

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C07K 14/65

(11) 공개번호 특2002 - 0093053
(43) 공개일자 2002년12월12일

(21) 출원번호 10 - 2002 - 7014048
(22) 출원일자 2002년10월18일
 번역문 제출일자 2002년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/03399
(86) 국제출원출원일자 2001년04월20일

(87) 국제공개번호 WO 2001/81562
(87) 국제공개일자 2001년11월01일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 - 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨, 콜롬비아, AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쑈, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장

JP - P - 2000 - 00126340	2000년04월21일	일본(JP)
JP - P - 2000 - 00205587	2000년07월03일	일본(JP)
JP - P - 2000 - 00247962	2000년08월10일	일본(JP)
JP - P - 2000 - 00395050	2000년12월22일	일본(JP)

(71) 출원인

다케다 야쿠힌 고교 가부시기가이샤
일본 오사카시 주오구 도쇼마찌 4 - 1 - 1

(72) 발명자 이또야스아끼
일본이바라끼켄쯔찌우라시사꾸라가오까마찌36반찌16
스즈끼노부히로
일본이바라끼켄쯔꾸바시오아자야따베1077반찌50
니시가즈노리
일본이바라끼켄쯔꾸바시나미끼4쵸메16반찌1고 - 402고
기자와히데끼
일본이바라끼켄쯔꾸바시가스가1쵸메7반찌9 - 1103고
하라다마사따까
일본이바라끼켄쯔꾸바시히가시2쵸메14반찌5 - 201
오기가즈히로
일본이바라끼켄쯔꾸바시우메조노2쵸메16반찌1 - 206고

(74) 대리인 특허법인코리아나

심사청구 : 없음

(54) 신규 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리 폴리펩티드 및 그의DNA

요약

```

ATG GCC AGG TAC ATG CTG CTG CTC CTG GCG GTA TGG GTG CTG ACC GGG EAG 54
Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr Gly Glu 18

CTG TGG CCG GGA GCT GAG GCC CCG GCA GCG CCT TAC GGG GTC AGG CTT TGC GGC 108
Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly 36

CGA GAA TTC ATC CGA GCA GTC ATC TTC ACC TGC GGG GGC TCC CCG TGG AGA CGA 162
Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg 54

TCA GAC ATC CTG GCC CAC GAG GCT ATG GGA GAT ACC TTC CCG GAT GCA GAT GCT 216
Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala 72

GAT GAA GAC AGT CTG GCA GGC GAG CTG GAT GAG GCC ATG GGG TCC AGC GAG TGG 270
Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp 90

CTG GCC CTG ACC AAG TCA CCC CAG GCC TTT TAC AGG GGG CGA CCC AGC TGG CAA 324
Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln 108

GGA ACC CCT GGG GTT CTT CCG GGC AGC CGA GAT GTC CTG GCT GGC CTT TCC AGC 378
Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser 126

AGC TGC TGC AAG TGG GGG TGT AGC AAA AGT GAA ATC AGT AGC CTT TGC TAG 429
Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys *** 142

```

본 발명은, ①서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드(A 사슬), ②서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드(B 사슬), ③A 사슬 및 B 사슬이 디설피드 결합으로 결합되어 있는 폴리펩티드 또는 그 염(2개 사슬), ④이들을 코딩하는 DNA 등에 관한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 DNA는, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병 등) 등과 같은 질병의 진단, 치료, 예방 등에 사용할 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 신규 분비성 생체기능조절 단백질 및 그의 DNA 등에 관한 것이다. 상세하게는 신규 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리 단백질 및 그의 DNA 등에 관한 것이다.

배경기술

생체는 세포 사이 또는 조직 사이에서 서로 정보 전달을 함으로써, 발생, 분화, 증식 및 항상성 유지 등을 종합적으로 조절하고 있다. 대부분의 경우 단백질성 인자가 이들의 중간 역할을 하고 있다. 예컨대, 면역계, 조혈계에 관여하는 분비성 인자(액성 인자)가 많이 발견되었으며, 이들은 사이토카인이라고 불린다. 림포카인, 모노카인, 인터페론, 콜로니자극인자, 종양괴사인자 등이 이것들에 포함된다. 이들에 대해서 질병과의 관계나 의약으로서의 이용방법에 대해서 활발하게 연구되고 있다.

또, 내분비 조직에서 생산되는 펩티드 호르몬이나 증식인자 등의 액성 인자도 항상성 유지나 성장에 매우 중요한 기능을 하고 있고, 이들에 대해서도 의약에 대한 응용이 활발하게 연구되고 있다.

인슐린(insulin), 인슐린형 성장인자 - I (IGF - I), 인슐린형 성장인자 - II (IGF - II), 릴렉신 H1(relaxin H1), 릴렉신 H2(relaxin H2)는 그 구조적 특징 면에서 1군 패밀리를 형성하는 액성 인자로 생각되고, 생체에서 탄수화물의 대사조절, 조직의 성장 촉진, 생식기능의 조절 등 폭넓은 생리적 역할을 하고 있다[BioScience 용어 라이브러리 사이토카인·생식인자, 요오도사, pp.108 - 109, 1995년; 호르몬의 분자생물학 6 발생과 성장인자·호르몬, 학회출판센터, pp.1 - 23, 1996년]. 또, 같은 패밀리에 속하는 새로운 분자종도 발견되고 있다[Molecular Endocrinology, 13권, pp. 2163 - 2174, 1999년]. 이들 전구체 단백질의 구조적 특징은 시그널배열 - B도메인 - C도메인 - A도메인 구조를 갖고 있음으로써, 성숙형 분자가 되는 B도메인과 A도메인은 두개의 디설피드 결합으로 연결되어 있다. 또한, A도메인 내에 있는 하나의 디설피드 결합은 입체구조 유지나 활성 발현에 중요하다. 인슐린, 인슐린형 성장인자, 릴렉신은 대부분의 생리활성을 가지고 있어 생체에 있어서 중요한 정보전달인자이다. 인슐린은 췌장의 β 세포에서 분비되어 간장, 근육, 지방조직에서의 당 흡입 촉진, 지방산 합성 촉진, 글리코겐 합성 촉진 등과 같은 에너지대사 조절에 중요할 뿐만 아니라 세포증식작용을 갖는다. IGF - I은 주로 간장에서 합성되고, 골유래 세포를 비롯한 대부분 세포에 대하여 증식이나 분화를 촉진한다. IGF - II는 IGF - I과 동일하게 세포증식 촉진작용, 인슐린양 작용을 갖는다. 이들 인자는 특이한 수용체에 결합되어 이 수용체의 자기 인산화를 일으키는 것이 그 이후의 일련 작용의 계기가 된다. 한편, 릴렉신은 산도 이완, 콜라겐의 재구축에 따른 결합조직 연화, 유선의 증식 분화 촉진 등 주로 생식기능에 관련된 작용을 비롯해 폭넓은 생리작용을 갖고 있음이 최근 밝혀지고 있다. 예컨대, 자궁, 유선, 폐, 심장 등에 분포되어 있는 혈관의 확장 촉진, 심장 박동에 대한 작용, 비만 세포로부터의 히스타민의 방출 저해, 혈소판의 응집 저해, 하수체 호르몬의 분비 조절, 체액 균형 조절, 배양계의 유방암 세포의 증식이나 분화 조절 등이다[Gen. Pharmacol., 28권, pp.13 - 22, 1997년].

생체에 있어서 중요한 이들 단백질성 및 펩티드성 인자는 종래에 그 고유한 생물활성을 지표로 하여 발견되었다. 또, 이미 알려진 생리활성 단백질에 대한 상동성을 단서로 한 클로닝 기술에 의해 상동성이 높은 유사 유전자가 뒤따라 발견되고 있다. 그러나, 고등생물, 특히 포유류동물이 건강체를 계속 유지하기 위해서, 공지된 유전자군 이외에도 기존 방법으로 아직 동정되지 않고 그 존재가 알려져 있지 않은 액성 기능 분자가 중요한 생리적 역할을 하고 있을 가능성은 매우 높은 것으로 생각된다.

그래서, 최근에는 컴퓨터를 사용한 정보처리기술의 도움을 빌려 DNA의 배열 정보에서 발견된 신규 유전자 산물을, 생물학, 의학, 수의학 등에 유용하게 쓰고자 하는 시도, 즉 바이오인포매틱스(bioinformatics)에 대한 각종 연구가 이루어지고 있다[Trends in Biotechnology, 14권, pp.294 - 298, 1996년]. 최근에 cDNA 라이브러리의 대규모 시퀀싱이 가능해짐으로써 EST(expressed sequence tag) 정보의 축적 등에 따라 방대한 수의 신규 유전자 또는 그 후보가 발견되고 있지만, 아직 서열 정보가 단편적이고 부정확한 경우도 많고, 또 현실 문제로서 현존하는 cDNA 관련 각종 공개 데이터베이스가 각 생물의 전체 발현 유전자를 완전히 망라할 수 없는 것이 현 상황이다. 따라서, 이러한 가운데 더욱더 새로운 유용 유전자 산물을 탐색하는 것은 반드시 쉽지 않다. 한편, 현재 하나의 생물이 갖는 전체 DNA, 즉 게놈의 구조 해석이 세균류, 진균류(효모 등), 곤충, 식물에서는 이미 그 몇가지 종으로 종료되고, 인간의 그것도 몇년안에 완성될 것으로 전망된다. 확실히 지금까지 수많은 분비 단백질 또는 분비 펩티드를 코딩하는 유전자가 단리되어 왔으나, 그 수는 전체 게놈에서 보면 도저히 그 전부를 망라했다고는 할 수 없다. 그리고, 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 속하는 신규 물질에 대해서는 상기 기술한 바와 같이 의료에 대한 응용을 크게 기대할 수 있다는 점에서 그 등장이 절실하게 요구되었다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명의 목적은 생물학, 의학, 수의학 등에 이용할 수 있는 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 속하는 신규 단백질 및 그 구조 단백질, 이들의 단편 및 이것들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 이러한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 재조합 벡터, 이 벡터를 함유하는 형질전환 숙주세포, 이러한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자가 도입된 트랜스제닉 동물도 제공하는 것이다. 또, 이러한 단백질 또는 폴리펩티드의 제조방법, 이러한 단백질 또는 폴리펩티드에 대한 항체, 아고니스트 또는 안타고니스트, 수용체 및 이들 동정방법도 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 안타고니스트, 항체, 수용체를 함유하는 의약조성물, 질병의 치료방법 및 예방방법 등을 제공하는 것도 목적으로 한다.

본 발명자들은 상기 문제를 해결하기 위해서 거듭 예의 연구한 결과, 인간 생체내에서 발현되는 신규 유전자 발견에 성공하고, 여기에 코딩되는 단백질이 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 속하는 새로운 분비성 생체기능조절 단백질을 발견하였다.

또, 본 발명자들은 거듭 예의 연구한 결과, 신규 인간형 분비성 생체기능조절 단백질에 이어서 신규 래트형, 이 래트형 변종, 마우스형 및 돼지형 분비성 생체기능조절 단백질을 발견하였다.

본 발명자들은 이들 지견에 따라 추가로 검토를 거듭한 결과 본 발명을 완성하는 데에 이르렀다.

즉, 본 발명은

- (1) 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (2) 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열인 청구항 1에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (3) 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (4) 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열인 청구항 3에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,

- (5) 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 청구항 1 또는 청구항 3에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (6) 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그 아미드 또는 그 에스테르 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그 아미드 또는 그 에스테르가 디설피드 결합으로 결합되어 있는 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (7) 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열이고, 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열인 청구항 5 또는 청구항 6에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (8) 청구항 1 또는 청구항 3에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 DNA,
- (9) 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 청구항 1 또는 청구항 3에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (10) 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:17, 서열번호:23, 서열번호:45 또는 서열번호:51로 표시되는 아미노산서열인 청구항 9에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염,
- (11) 청구항 9에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 청구항 8에 기재된 DNA,
- (12) 서열번호:12, 서열번호:18, 서열번호:24, 서열번호:46 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열을 갖는 청구항 10에 기재된 DNA,
- (13) 청구항 8에 기재된 DNA를 함유하는 재조합 벡터,
- (14) 청구항 13에 기재된 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체,
- (15) 청구항 14에 기재된 형질전환체를 배양하여 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드를 생성시키는 것을 특징으로 하는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 제조법,
- (16) 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염에 대한 항체,
- (17) 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 사용하는 것을 특징으로 하는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법,
- (18) 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 함유하는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝용 키트,
- (19) 청구항 17에 기재된 스크리닝 방법 또는 청구항 18에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염,

(20) 청구항 17에 기재된 스크리닝 방법 또는 청구항 18에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염을 함유하는 의약,

(21) 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 함유하는 의약,

(22) 청구항 16에 기재된 항체를 함유하는 의약,

(23) ①청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ②청구항 19에 기재된 화합물 또는 그 염, 또는 ③청구항 16에 기재된 항체를 함유하는 대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료제,

(24) 간경변·폐선유증, 강피증, 신선유증 또는 말초동맥질환의 예방·치료제인 청구항 23에 기재된 제,

(25) 청구항 16에 기재된 항체를 함유하는 진단제,

(26) 대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료작용을 갖는 의약을 제조하기 위한, ①청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ②청구항 17에 기재된 스크리닝 방법 또는 청구항 18에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염, 또는 ③청구항 16에 기재된 항체의 용도 및,

(27) ①청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ②청구항 17에 기재된 스크리닝 방법 또는 청구항 18에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 청구항 1, 청구항 3 및 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염, 또는 ③청구항 16에 기재된 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 특징으로 하는 대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료방법 등을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 DNA 및 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염 등은 분자량 마커, 조직 마커, 염색체 매핑, 유전병의 동정, 프라이머, 프로브의 설계 등과 같은 기초 연구에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 신규 단백질(전구체 단백질)의 오픈 리딩 프레임 및 코딩되는 아미노산서열을 나타낸다.

도 2는 실시예 4에서 본 발명의 인간형 폴리펩티드의 발현 조직을 RT-PCR로 조사한 결과를 나타낸다.

도면 중 라인 1은 heart(심장), 라인 2는 brain(뇌), 라인 3은 placenta(태반), 라인 4는 lung(폐), 라인 5는 liver(간장), 라인 6는 skeletal muscle(골격근), 라인 7은 kidney(신장), 라인 8은 pancreas(췌장), 라인 9는 spleen(비장), 라인 10은 thymus(흉선), 라인 11은 prostate(전립선), 라인 12는 testis(정소), 라인 13은 ovary(난소), 라인

14는 small intestine(소장), 레인 15는 colon(결장), 레인 16은 peripheral blood leukocyte(말초혈백혈구), 레인 17은 hypothalamus(시상 하부), 레인 18은 hippocampus(해마), 레인 19는 pituitary(하수체), 레인 20은 adipocyte(지방세포), 레인 21은 fetal brain(태아 뇌), 레인 22는 fetal lung(태아 폐), 레인 23은 fetal liver(태아 간장), 레인 24는 fetal kidney(태아 신장), 레인 25는 fetal heart(태아 심장), 레인 26은 fetal spleen(태아 비장), 레인 27은 fetal thymus(태아 흉선), 레인 28은 fetal skeletal muscle(태아 골격근), 레인 29는 genomic DNA(게놈 DNA)를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 인간형·마우스형·랫트형·돼지형 신규 단백질(전구체 단백질)의 각 아미노산서열의 얼라인먼트를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 신규 폴리펩티드 A 사슬 N 말단 펩티드에 대한 마우스 항혈청의 항체가를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 신규 폴리펩티드 유전자 도입 AtT20 세포주 배양상등액에서 신규 폴리펩티드를 역상-HPLC로 정제했을 때의 215nm에서의 흡광도 및 면역활성에 의한 검출 결과를 나타낸다.

도 6은 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 THP-1 세포주에서의 세포내 cAMP 생산촉진작용을 나타낸다.

도 7은 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 대장균 (E. coli) 발현용 플라스미드의 구축도를 나타낸다. 도면 중 「T7/lacO promoter」는 T7 프로모터 및 lac 오퍼레이터 영역을, 「Amp」는 암피실린 내성 영역을, 「ColE1 ori」는 플라스미드 복제개시점을, 「lac I^q」는 lac 리프레서 (repressor) 영역을, 「B 사슬」은 서열번호:16으로 표시되는 염기서열을, 「A 사슬」은 서열번호:15로 표시되는 염기서열을, 「C 사슬」은 서열번호:4로 표시되는 염기서열의 184번째 375번째의 염기서열을 나타낸다.

도 8은 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균 (E. coli) 으로 조제된 전체 균체 단백질의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

도 9는 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 THP-1 세포주에서의 세포자극작용을 나타낸다.

도 10은 (16-53)/(110-133)을 트립신과 CPB로 처리한 후 반응생성물을 TSKgel ODS-80Ts 칼럼을 이용한 HPLC로 분리했을 때의 패턴을 나타낸다.

도 11은 대장균으로부터 조제된 인간 신규 폴리펩티드의 THP-1 세포주에서의 세포내 cAMP 생산촉진작용을 나타낸다.

도 12는 대장균으로부터 조제된 인간 신규 폴리펩티드 유도체의 THP-1 세포주에서의 세포내 cAMP 생산촉진작용을 나타낸다. 도면 중 -●-는 인간 신규 폴리펩티드 (16-42)/(110-133)을 나타내고, -□-는 (16-53)/(110-133), -△-는 (16-41)/(110-133)을 나타낸다.

도 13은 인간 신규 폴리펩티드 (16-42)/(110-133) 정제 표품에 의한 정상 인간 폐선유아 세포주 CCD-19Lu에서의 MMP-1 및 VEGF 유전자의 발현촉진작용의 결과도를 나타낸다.

도 14는 인간 신규 폴리펩티드 (16-42)/(110-133) 정제 표품의 정상 인간 피부선유아 세포주 HNDF에서의 세포내 cAMP 생산촉진작용을 나타낸다.

도 15는 인간 신규 폴리펩티드 (16-42)/(110-133) 정제 표품의 랫트 하수체 전엽 초대 배양세포에서의 세포내 cAMP 생산촉진작용을 나타낸다.

도 16은 인간 신규 폴리펩티드 (16-42)/(110-133) 정제 표품의 THP-1 세포에 대한 VEGF 유전자의 발현촉진작용을 나타낸다.

도 17은 각종 신규 폴리펩티드 발현 벡터를 도입한 COS - 7 세포 배양상등액 내의 신규 폴리펩티드의 면역활성을 나타낸다. Control은 원래의 친플라스미드 pCAN618을 도입한 COS - 7 세포 배양상등액 내의, blank는 COS - 7 세포 배양상등액 내의 면역활성을 나타낸다.

도 18은 신규 폴리펩티드 발현 벡터를 도입한 COS - 7 세포 배양상등액 내의 THP - 1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산 촉진활성을 나타낸다. Control은 원래의 친플라스미드 pCAN618을 도입한 COS - 7 세포의 배양상등액을, 100nM 신규 폴리펩티드는 신규 폴리펩티드 정제 표품 100nM을 첨가했을 때 THP - 1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산촉진활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 최선의 형태

본 발명의 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드는(이하, 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드를 총칭하여 본 발명의 폴리펩티드라고 함), 인간 또는 온혈동물(예컨대, 모르모트, 래트, 마우스, 닭, 토끼, 돼지, 양, 소, 원숭이 등)의 세포(예컨대, 간세포, 지라세포, 신경세포, 내분비세포, 신경내분비세포, 글리아세포, 췌장 β 세포, 골수세포, 메산기움세포, 랑겔한스세포, 표피세포, 상피세포, 내피세포, 섬유아세포, 섬유세포, 근세포, 지방세포, 면역세포(예, 매크로파지, T 세포, B 세포, 내추럴킬러세포, 비만세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 단구, 수상세포), 거핵구, 골막세포, 연골세포, 골세포, 골아세포, 파골세포, 유선세포, 또는 간질세포, 또는 이들 세포의 전구세포, 줄기세포 또는 암세포 등) 또는 이들 세포가 존재하는 모든 조직, 예컨대 뇌, 뇌의 각 부위(예, 후구, 편도핵, 대뇌기저구, 해마, 시상, 시상 하부, 대뇌 피질, 연수, 소뇌), 척수, 하수체, 위, 췌장, 신장, 간장, 생식선, 갑상선, 담낭, 골수, 부신, 피부, 근육, 폐, 소화관(예, 대장, 소장), 혈관, 심장, 흉선, 비장, 타액선, 말초혈, 전립선, 고환(정소), 난소, 태반, 자궁, 골, 연골, 관절, 골격근 등에서 유래하는 폴리펩티드이거나 재조합 폴리펩티드이거나 합성 폴리펩티드일 수도 있다.

또, 본 발명의 폴리펩티드가 시그널 펩티드를 갖고 있는 경우에는, 폴리펩티드를 효율적으로 세포밖으로 분비시킬 수 있다.

서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열로는, 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 약 50% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상, 더 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산서열 등을 들 수 있다.

서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열은 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열 양쪽을 함유한다.

서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열로는, 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 약 50% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상, 더 바람직하게는 약 70% 이상, 보다 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산서열 등을 들 수 있다.

본 발명의 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드로는, 예컨대 상기 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하고, 서열번호:7 또는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 성질을 갖는 폴리펩티드 등이 바람직하다.

서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열로서, 보다 구체적으로는 예컨대 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열 등을 들 수 있다.

또, 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열로서, 보다 구체적으로는 예컨대 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열 등을 들 수 있다.

또한, 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드로는, 예컨대 상기 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하고, 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 성질을 갖는 폴리펩티드 등이 바람직하다.

서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열로서, 보다 구체적으로는 예컨대 서열번호:17, 서열번호:23, 서열번호:45 또는 서열번호:51로 표시되는 아미노산서열 등을 들 수 있다.

실질적으로 동질의 성질로는, 예컨대 항원성이나 분비되어 액성 인자로서 작용하는 것, 세포내 사이클릭 AMP 생산촉진작용 등을 들 수 있다. 실질적으로 동질이라 함은 이들의 성질이 정성적(定性的)으로 동질임을 나타낸다. 따라서, 분비작용이나 용해도 등이나 생리작용의 성질이 동등(예, 약 0.1 100배, 바람직하게는 약 0.5 10배, 보다 바람직하게는 0.5 2배)한 것이 바람직하지만, 이들의 성질 정도, 폴리펩티드의 분자량 등의 양적 요소는 다를 수도 있다.

또, 서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드로서, 보다 구체적으로는 예컨대 ①서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열 중 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 30개 정도, 더 바람직하게는 1 10개 정도, 더욱더 바람직하게는 몇(1 5)개)의 아미노산이 결실된 아미노산서열, ②서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 30개 정도, 더 바람직하게는 1 10개 정도, 더욱더 바람직하게는 몇(1 5)개)의 아미노산이 부가된 아미노산서열, ③서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 30개 정도, 더 바람직하게는 1 10개 정도, 더욱더 바람직하게는 몇(1 5)개)의 아미노산이 삽입된 아미노산서열, ④서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열 중 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 30개 정도, 더 바람직하게는 1 10개 정도, 더욱더 바람직하게는 몇(1 5)개)의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산서열, 또는 ⑤이들을 조합한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드 등의 이른바 뮤테인도 포함된다.

상기와 같이 아미노산서열이 삽입, 결실 또는 치환되어 있는 경우, 이 삽입, 결실 또는 치환의 위치로는 특별히 한정되지 않지만, 서열번호:7, 서열번호:8 또는 서열번호:3 각각의 서열번호로 표시되는 아미노산서열 중 시스테인 잔기 이외의 아미노산 잔기를 들 수 있다.

서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드는, 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열 양쪽을 함유하는 1개 사슬 폴리펩티드에 추가로 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드(이하, 본 명세서에서 A 사슬이라고 함)와 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드(이하, 본 명세서에서 B 사슬이라고 함) 2개의 폴리펩티드사슬로 이루어지는 폴리펩티드(이하, 본 명세서에서 2개 사슬 폴리펩티드라고 함)를 포함한다.

2개 사슬 폴리펩티드로서, 보다 구체적으로는 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열이 디설피드 결합으로 결합되어 있는 폴리펩티드를 의미하고, A 사슬 및 B 사슬 내의 시스테인 잔기가 분자 사이 및 분자내에서 디설피드 결합을 형성하고 있는 폴리펩티드를 나타낸다. 시스테인 잔기끼리의 결합 조합으로는, 예컨대 특히 A 사슬의 Cys11(A 사슬의 Cys11이란 서열번호:7, 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열의 N 말단으로부터 11번째인 시스테인 잔기를 나타낸다. 이하 동일함)과 B 사슬의 Cys10(B 사슬의 Cys10이란 서열번호:8, 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열의 N 말단으로부터 10번째의 시스테인 잔기를 나타낸다. 이하 동일함)이 결합되고, 또 A 사슬의 Cys24와 B 사슬의 Cys22가 결합되며, 또한 A 사슬의 Cys10과 A 사슬의 Cys15가 결합되어 있는 것이 바람직하다.

서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드(이하, 단순히 전구체 단백질이라고 함)로서 바람직한 것은, ①서열번호:3의 경우, N 말단으로부터 26번째(Arg) 52번째(Trp)에 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열(즉, B 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고, 서열번호:3의 N 말단으로부터 119번째(Asp) 142번째(Cys)에 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열(즉, A 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고 있으며,

②서열번호:17의 경우, N 말단으로부터 25번째(Arg) 51번째(Trp)에 서열번호:21로 표시되는 아미노산서열(즉, B 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고, 서열번호:17의 N 말단으로부터 118번째(Asp) 141번째(Cys)에 서열번호:19로 표시되는 아미노산서열(즉, A 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고 있으며,

③서열번호:23의 경우, N 말단으로부터 24번째(Arg) 50번째(Trp)에 서열번호:21로 표시되는 아미노산서열(즉, B 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고, 서열번호:23의 N 말단으로부터 117번째(Asp) 140번째(Cys)에 서열번호:19로 표시되는 아미노산서열(즉, A 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고 있으며,

④서열번호:45의 경우, N 말단으로부터 27번째(Arg) 53번째(Trp)에 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열(즉, B 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고, 서열번호:45의 N 말단으로부터 117번째(Asp) 140번째(Cys)에 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열(즉, A 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고 있으며,

⑤서열번호:51의 경우, N 말단으로부터 24번째(Arg) 50번째(Trp)에 서열번호:21로 표시되는 아미노산서열(즉, B 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고, 서열번호:51의 N 말단으로부터 151번째(Asp) 174번째(Cys)에 서열번호:19로 표시되는 아미노산서열(즉, A 사슬을 코딩하는 아미노산서열)을 함유하고 있으며, A 사슬, B 사슬, 2개 사슬 폴리펩티드의 전구체로서의 성질을 갖는다.

본 발명의 폴리펩티드(이하, A 사슬, B 사슬, 2개 사슬 폴리펩티드, 전구체 단백질을 총칭하여 「본 발명의 폴리펩티드」라고 함)는 펩티드 표기의 관례에 따라 좌측단이 N 말단(아미노 말단), 우측단이 C 말단(카르복실 말단)이다. 서열번호:3, 서열번호:7 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드를 비롯한 본 발명의 폴리펩티드는 C 말단이 통상 카르복실기(-COOH) 또는 카르복실레이트(-COO⁻)이지만, C 말단이 아미드(-CONH₂) 또는 에스테르(-COOR)일 수도 있다.

여기에서, 에스테르의 R로는, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필 또는 n-부틸 등과 같은 C₁₋₆ 알킬기, 예컨대 시클로펜틸, 시클로헥실 등과 같은 C₃₋₈ 시클로알킬기, 예컨대 페닐, α-나프틸 등과 같은 C₆₋₁₂ 아릴기, 예컨대 벤질, 페네틸 등과 같은 페닐-C₁₋₂ 알킬기 또는 α-나프틸메틸 등과 같은 α-나프틸메틸-C₁₋₂ 알킬기 등의 C₇₋₁₄ 아르알킬기 이외에 경구용 에스테르로서 범용되는 피바로일옥시메틸기 등이 사용된다.

본 발명의 폴리펩티드가 C 말단 이외에 카르복실기(또는 카르복실레이트)를 갖고 있는 경우, 카르복실기가 아미드화 또는 에스테르화되어 있는 것도 본 발명의 폴리펩티드에 포함된다. 이 경우 에스테르로는 예컨대 상기 C 말단의 에스테르 등이 사용된다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드에는, N 말단의 아미노산 잔기(예, 메티오닌 잔기)의 아미노기가 보호기(예컨대, 포르밀기, 아세틸기 등과 같은 C₁₋₆ 알카노일 등의 C₁₋₆ 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 생체 내에서 절단되어 생성되는 N 말단의 글루타민 잔기가 피로글루타민산화된 것, C 말단의 아미노산 잔기가 호모세린이나 호모세린 락톤인 것이나, 분자내의 아미노산의 측쇄 상의 치환기(예컨대, -OH, -SH, 아미노기, 이미다졸기, 인돌기, 구아니디노기 등)가 적당한 보호기(예컨대, 포르밀기, 아세틸기 등과 같은 C₁₋₆ 알카노일기 등의 C₁₋₆ 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 또는 당쇄가 결합된 이른바 당 폴리펩티드 등의 복합 폴리펩티드 등도 포함된다.

또, 본 발명의 폴리펩티드는 일량체이거나, 예컨대 이량체, 사량체, 육량체, 팔량체 등과 같은 다량체일 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염으로는, 생리학적으로 허용되는 산(예, 무기산, 유기산)이나 염기(예, 알칼리금속염) 등과의 염이 사용되고, 특히 생리학적으로 허용되는 산 부가염이 바람직하다. 이와 같은 염으로는, 예컨대 무기산(예컨대, 염산, 인산, 브롬화수소산, 황산)과의 염 또는 유기산(예컨대, 아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸말산, 말레산, 숙신산, 타르타르산, 시트르산, 말산, 옥살산, 벤조산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산)과의 염 등이 사용된다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염은 상기 기술한 인간 또는 온혈동물의 세포 또는 조직에서 자체 공지된 폴리펩티드(단백질)의 정제방법으로 제조할 수도 있고, 후술하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 형질전환체를 배양함으로써 제조할 수도 있다. 또, 후술하는 펩티드 합성법에 준하여 제조할 수도 있다.

인간 또는 포유동물의 조직 또는 세포로부터 제조하는 경우, 인간 또는 포유동물의 조직 또는 세포를 호모게나이징한 후 산 등으로 추출하고, 이 추출액을 역상 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피를 조합함으로써 정제 분리할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염 또는 그의 아미드체의 합성에는, 통상 시판되는 폴리펩티드(단백질) 합성용 수지를 사용할 수 있다. 이러한 수지로는, 예컨대 클로로메틸수지, 히드록시메틸수지, 벤즈히드릴아민수지, 아미노메틸수지, 4-벤질옥시벤질알콜수지, 4-메틸벤즈히드릴아민수지, PAM수지, 4-히드록시메틸메틸페닐아세트아미드메틸수지, 폴리아크릴아미드수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-히드록시메틸)페녹시수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc아미노에틸)페녹시수지 등을 들 수 있다. 이러한 수지를 사용하여 α -아미노기와 측쇄 관능기를 적당히 보호한 아미노산을, 목적하는 폴리펩티드의 배열대로 자체 공지된 각종 축합방법에 따라 수지 상에서 축합시킨다. 반응 마지막에 수지로부터 폴리펩티드를 절단하는 동시에 각종 보호기를 제거하고, 추가로 고희석용액 내에서 분자내 디설피드 결합 형성반응을 실시하여 목적하는 폴리펩티드 또는 이들의 아미드체를 취득한다.

상기한 보호 아미노산의 축합에 관해서는, 폴리펩티드 합성에 사용할 수 있는 각종 활성화 시약을 사용할 수 있으나 특히 카르보디이미드류가 좋다. 카르보디이미드류로는, DCC, N,N'-디이소프로필카르보디이미드, N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 등이 사용된다. 이것들에 의한 활성화에는 라세미화 억제첨가제(예컨대, HOBt, HOOBt)와 함께 보호 아미노산을 직접 수지에 첨가하거나, 대칭 산무수물 또는 HOBt 에스테르 또는 HOOBt 에스테르의 형태로 미리 보호 아미노산의 활성화를 실시한 후에 수지에 첨가할 수 있다.

보호 아미노산의 활성화 또는 수지와와의 축합에 사용되는 용매로는, 폴리펩티드(단백질) 축합반응에 사용할 수 있음이 알려져 있는 용매에서 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, N,N'-디메틸포름아미드, N,N'-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등과 같은 산 아미드류, 염화메틸렌, 클로로포름 등과 같은 할로겐화 탄화수소류, 트리플루오로에탄올 등과 같은 알콜류, 디메틸설폭시드 등과 같은 설폭시드류, 피리딘, 디옥산, 테트라히드로푸란 등과 같은 에테르류, 아세트니트릴, 프로피오니트릴 등과 같은 니트릴류, 아세트산메틸, 아세트산에틸 등과 같은 에스테르류 또는 이들의 적절한 혼합물 등이 사용된다. 반응온도는 폴리펩티드(단백질) 결합 형성반응에 사용될 수 있는 것으로 공지된 범위에서 적절하게 선택되고, 통상 약 -20°C ~ 50°C 범위에서 적절하게 선택된다. 활성화된 아미노산 유도체는 통상 1.5 ~ 4배 과잉으로 사용된다. 닐히드린 반응을 사용한 테스트 결과, 축합이 불충분한 경우에는 보호기의 이탈을 실시하지 않고 축합반응을 반복함으로써 충분한 축합을 실시할 수 있다. 반응을 반복해도 충분한 축합이 수득되지 않는 경우에는 무수아세트산 또는 아세틸이미다졸을 사용하여 미반응 아미노산을 아세틸화시킴으로써 이후의 반응에 영향을 주지 않도록 할 수 있다.

원료 아미노기의 보호기로는, 예컨대 Z, Boc, t-펜틸옥시카르보닐, 이소보르닐옥시카르보닐, 4-메톡시벤질옥시카르보닐, Cl-Z, Br-Z, 아다만틸옥시카르보닐, 트리플루오로아세틸, 프탈로일, 포르밀, 2-니트로페닐설포닐, 디페닐포스포노티오일, Fmoc 등이 사용된다.

카르복실기는, 예컨대 알킬에스테르화(예컨대, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, t-부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 2-아다만틸 등과 같은 직쇄형, 분지형 또는 고리형 알킬에스테르화), 아르알킬에스테르화(예컨대, 벤질에스테르, 4-니트로벤질에스테르, 4-메톡시벤질에스테르, 4-클로로벤질에스테르, 벤즈히드릴에스테르화), 페나실에스테르화, 벤질옥시카르보닐히드라지드화, t-부톡시카르보닐히드라지드화, 트리틸히드라지드화 등에 의해 보호될 수 있다.

세린의 수산기는 예컨대 에스테르화 또는 에테르화에 의해 보호될 수 있다. 이 에스테르화에 적합한 기로는, 예컨대 아세틸기 등의 저급(C_{1-6})알카노일기, 벤조일기 등의 알로일기, 벤질옥시카르보닐기, 에톡시카르보닐기 등의 탄산에서 유도되는 기 등이 사용된다. 또, 에테르화에 적합한 기로는 예컨대 벤질기, 테트라히드로피라닐기, t-부틸기 등이다.

티로신의 페놀성 수산기의 보호기로는 예컨대 Bzl, Cl_2 -Bzl, 2-니트로벤질, Br-Z, t-부틸 등이 사용된다.

히스티딘의 이미다졸의 보호기로는, 예컨대 Tos, 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술포닐, DNP, 벤질옥시메틸, Bum, Boc, Trt, Fmoc 등이 사용된다.

원료 카르복실기가 활성화된 것으로는, 예컨대 대응하는 산무수물, 아지드, 활성에스테르[알콜(예컨대, 펜타클로로페놀, 2,4,5-트리클로로페놀, 2,4-디니트로페놀, 시아노메틸알콜, 파라니트로페놀, HONB, N-히드록시숙시미드, N-히드록시프탈이미드, HOBt)과의 에스테르] 등이 사용된다. 원료인 아미노기가 활성화된 것으로는 예컨대 대응하는 인산아미드가 사용된다.

보호기의 제거(이탈)방법으로는, 예컨대 Pd-혹 또는 Pd-탄소 등의 촉매 존재 하의 수소기류 내에서의 접촉환원이나 또한 무수플루오르화수소, 메탄술포산, 트리플루오로메탄술포산, 트리플루오로아세트산 또는 이것들의 혼합액 등에 의한 산 처리나 디소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 피페리딘, 피페라진 등에 의한 염기처리, 그리고 액체 암모니아 중 나트륨에 의한 환원 등도 사용된다. 상기 산 처리에 의한 이탈반응은 일반적으로 약 $-20^{\circ}C$ $40^{\circ}C$ 온도에서 실시되지만, 산 처리에서는, 예컨대 아니솔, 페놀, 티오아니솔, 메탄크레졸, 파라크레졸, 디메틸술포드, 1,4-부탄디티올, 1,2-에탄디티올 등과 같은 양이온 보축제의 첨가가 유효하다. 또, 히스티딘의 이미다졸 보호기로 사용되는 2,4-디니트로페닐기는 티오페놀 처리에 의해 제거되고, 트립토판의 인돌 보호기로 사용되는 포르밀기는 상기 1,2-에탄디티올, 1,4-부탄디티올 등의 존재 하의 산처리에 의한 탈보호 이외에 묽은 수산화나트륨 용액, 묽은 암모니아 등에 의한 알칼리 처리에 의해서도 제거된다.

원료 반응에 관여하지 않는 관능기의 보호 및 보호기, 그리고 이 보호기의 이탈, 반응에 관여하는 관능기의 활성화 등은 공지된 기 또는 공지된 수단에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

폴리펩티드의 아미드체를 수득하는 다른 방법으로는, 예컨대 먼저 카르복시 말단 아미노산의 α -카르복실기를 아미드화시켜 보호한 후, 아미노기측에 펩티드(폴리펩티드) 사슬을 원하는 사슬길이까지 신장시킨 후, 이 펩티드사슬의 N 말단의 α -아미노기의 보호기만을 제거한 폴리펩티드와 C 말단의 카르복실기의 보호기만을 제거한 폴리펩티드를 제조하고, 이 두 폴리펩티드를 상기한 바와 같은 혼합용액 내에서 축합시킨다. 축합반응의 상세함에 대해서는 상기한 바와 같다. 축합에 의해 수득된 보호 폴리펩티드를 정제한 후, 상기 방법으로 모든 보호기를 제거하여 원하는 비정제 폴리펩티드를 수득할 수 있다. 이 비정제 폴리펩티드는 이미 알려진 각종 정제수단을 구사하여 정제하고, 주요 분획을 동결 건조 시킴으로써 원하는 폴리펩티드의 아미드체를 수득할 수 있다.

폴리펩티드의 에스테르체를 수득하기 위해서는, 예컨대 카르복시 말단 아미노산의 α -카르복실기를 원하는 알콜류와 축합시켜 아미노산에스테르로 한 후, 폴리펩티드의 아미드체와 동일하게 하여 원하는 폴리펩티드의 에스테르체를 수득할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염은 자체 공지된 펩티드의 합성법에 따라 제조할 수 있다. 펩티드의 합성법으로는 예컨대 고상 합성법, 액상 합성법 중 어느 방법이어도 된다. 즉, 본 발명의 부분 펩티드를 구성할 수 있는 부분 펩티드 또는 아미노산과 잔여 부분을 축합시켜 생성물이 보호기를 갖는 경우에는, 보호기를 이탈함으로써 목적하는 펩티드를 제조할 수 있다. 공지된 축합방법이나 보호기의 이탈로는 예컨대 다음과 같은 ① ⑤에 기재된 방법을 들 수 있다.

①M. Bodanszky 및 M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966년)

②Schroeder 및 Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965년)

③이즈미야 노부오 외, 펩티드 합성의 기초와 실험, 마루젠(주) (1975년)

④야지마 하루아키 및 사카키바라 순페이, 생화학 실험강좌1, 단백질의 화학IV, 205 (1977년)

⑤야지마 하루아키 감수, 속 의약품의 개발, 14권, 펩티드 합성, 히로가와 서점

또, 반응 후에는 통상적인 정제법, 예컨대 용매 추출·증류·칼럼 크로마토그래피·액체 크로마토그래피·재결정 등을 조합하여 본 발명의 폴리펩티드를 정제 분리할 수 있다. 상기 방법으로 수득되는 폴리펩티드가 유리체인 경우에는, 공지 방법 또는 이에 준하는 방법으로 적당한 염으로 변환할 수 있고, 반대로 염으로 수득된 경우에는, 공지 방법 또는 이에 준하는 방법으로 유리체 또는 다른 염으로 변환할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA로는, 상기 기술한 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산서열을 코딩하는 염기서열을 함유하는 것이면 어떠한 것이어도 된다. 또, 게놈 DNA, 상기 세포·조직 유래의 cDNA, 합성 DNA 중 어느 것이어도 된다.

라이브러리에 사용되는 벡터는 박테리오파지, 플라스미드, 코스미드, 파지미드 등 어느 것이어도 된다. 또, 상기 세포·조직에서 total RNA 또는 mRNA 분획을 정제한 것을 사용하여 직접 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(이하, RT-PCR 법이라고 함)으로 증폭시킬 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열을 함유하는 DNA, 또는 서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열과 매우 엄중한 조건 하에서 하이브리다이징하는 염기서열을 가지며, 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 성질(예, 생물활성, 면역원성, 분비되어 액성 인자로서 작용하는 것, 세포내 사이클릭 AMP 생산촉진작용 등)을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 등을 가지고, 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 성질을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA이면 어느 것이어도 된다.

서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열과 매우 엄중한 조건 하에서 하이브리다이징할 수 있는 DNA로는, 예컨대 서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 함유하는 DNA 등이 사용된다.

또, 서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서

열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열과 매우 엄중한 조건 하에서 하이브리다이징할 수 있는 DNA로서, 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 성질(예, 생물활성, 면역원성, 분비되어 액성 인자로서 작용하는 것, 세포내 사이클릭 AMP 생산촉진작용 등)을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 등을 가지고, 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 성질을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 등을 들 수 있다.

하이브리다이제이션은 자체 공지 방법 또는 이에 준하는 방법, 예컨대 Molecular Cloning 2nd (J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)에 기재된 방법 등에 따라 실시할 수 있다. 또, 시판되는 라이브러리를 사용하는 경우, 첨부된 사용설명서에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다. 보다 바람직하게는 매우 엄중한 조건에 따라 실시할 수 있다.

매우 엄중한 조건이란 예컨대 나트륨 농도가 약 19 40mM, 바람직하게는 약 19 20mM이고, 온도가 약 50 70°C, 바람직하게는 약 60 65°C 조건을 나타낸다

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA로는, 서열번호:12, 서열번호:15, 서열번호:16, 서열번호:18, 서열번호:20, 서열번호:22, 서열번호:24, 서열번호:25, 서열번호:26, 서열번호:46, 서열번호:48, 서열번호:50 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA 등이 사용된다.

보다 구체적으로는

- (I) A 사슬(인간형; 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:15로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (II) A 사슬(랫트형; 서열번호:19로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:20으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (III) A 사슬(마우스형; 서열번호:19로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:25로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (IV) A 사슬(돼지형; 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:48로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (V) B 사슬(인간형; 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:16으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (VI) B 사슬(랫트형; 서열번호:21로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:22으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (VII) B 사슬(마우스형; 서열번호:21로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:26으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (VIII) B 사슬(돼지형; 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:50으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,
- (IX) 2개 사슬 폴리펩티드(인간형) 및 전구체 단백질(인간형; 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:12로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,

(X) 2개 사슬 폴리펩티드(래트형) 및 전구체 단백질(래트형; 서열번호:17 또는 서열번호:51로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:18 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,

(XI) 2개 사슬 폴리펩티드(마우스형) 및 전구체 단백질(마우스형; 서열번호:23으로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:24로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을,

(XII) 2개 사슬 폴리펩티드(돼지형) 및 전구체 단백질(돼지형; 서열번호:45로 표시되는 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드)을 코딩하는 DNA로는, 예컨대 서열번호:46으로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA를 함유하는 DNA 등을 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 완전히 코딩하는 DNA의 클로닝 수단으로는, 본 발명의 폴리펩티드의 부분 염기서열을 갖는 합성 DNA 프라이머를 사용하여 PCR법으로 증폭시키거나 또는 적당한 벡터에 조합된 DNA를 본 발명의 폴리펩티드의 일부 또는 전체영역을 코딩하는 DNA 단편 또는 합성 DNA를 사용하여 표지한 것과의 하이브리다이제이션으로 선별할 수 있다. 하이브리다이제이션 방법은 예컨대 Molecular Cloning 2nd (J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)에 기재된 방법 등에 따라 실시할 수 있다. 또, 시판되는 라이브러리를 사용하는 경우, 첨부된 사용설명서에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

DNA의 염기서열의 변환은 PCR이나 공지된 키트, 예컨대 Mutan(등록상표) - super Express Km(Takara Shuzo Co., Ltd.), Mutan(등록상표) - K(Takara Shuzo Co., Ltd.) 등을 사용하며, ODA - LA PCR법이나 Gapped duplex법이나 Kunkel법 등의 자체 공지 방법 또는 이들에 준하는 방법에 따라 실시할 수 있다.

클론화된 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 목적에 따라 그대로 또는 원하는 바에 따라 제한효소로 자르거나 링커를 부가하여 사용할 수 있다. 이 DNA는 그 5' 말단측에 번역 개시 코돈으로서의 ATG를 가지며, 그리고 3' 말단측에는 번역 종지 코돈으로서의 TAA, TGA 또는 TAG를 가질 수도 있다. 이들 번역 개시 코돈이나 번역 종지 코돈은 적당한 합성 DNA 어댑터를 사용하여 부가할 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 발현 벡터는 예컨대 (가) 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA로부터 목적하는 DNA 단편을 절단하고, (나) 이 DNA 단편을 적당한 발현 벡터 내의 프로모터 하류 또는 적당한 보호 펩티드를 코딩하는 염기서열 하류에 연결함으로써 제조할 수 있다.

벡터로는 대장균 (E. coli) 유래의 플라스미드(예, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 고초균 (Bacillus Subtilis) 유래의 플라스미드(예, pUB110, pTP5, pC194), 효모 유래의 플라스미드(예, pSH19, pSH15), λ 파지 등의 박테리오파지, 레트로 바이러스, 백시니아 바이러스, 배쿨로 바이러스 등과 같은 동물 바이러스 등 이외에 pA1 - 11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo, pET - 1, pET - 2, pET - 3, pET - 4, pET - 5, pET - 11 등이 사용된다.

본 발명에서 사용되는 프로모터로는 유전자 발현에 사용되는 숙주에 대응하여 적절한 프로모터이면 어떠한 것이어도 된다. 예컨대, 동물세포를 숙주로 하여 사용하는 경우에는, SR α 프로모터, SV40 프로모터, LTR 프로모터, CMV 프로모터, HSV - TK 프로모터, β - 액틴 프로모터 등을 들 수 있다.

이들 중에서 CMV(사이토메가로 바이러스) 프로모터, SR α 프로모터, β - 액틴 프로모터 등을 사용하는 것이 바람직하다. 숙주가 에세리키아속균인 경우에는 trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λ PL 프로모터, lpp 프로모터, T7 프로모터 등이, 숙주가 바실러스속균인 경우에는 SPO1 프로모터, SPO2 프로모터, penP 프로모터 등이, 숙주가 효모인 경우에는 PHO5 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터 등이 바람직하다. 숙주가 곤충세포인 경우에는 폴리헤드린 프로모터, P10 프로모터 등이 바람직하다.

T7 프로모터의 발현계를 사용하는 경우에는, T7 프로모터로는 T7 DNA 상에서 발견된 17종류의 프로모터[J.L.Oakley 외, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A, 74: 4266 - 4270 (1977), M.D.Rosa, Cell 16: 815 - 825 (1979), N.Panayotatos 외, Nature, 280: 35 (1979), J.J.Dunn 외, J.Mol.Biol., 166: 477 - 535 (1983)] 어느 것이나 되지만, ϕ 10 프로모터[A.H.Rosenberg 외, Gene, 56: 125 - 135(1987)]가 바람직하다.

벡터는 상기 벡터에 T7 프로모터, T7 터미네이터를 조합하여 구축되는 것이 바람직하고, 이러한 벡터로는, pET - 1, pET - 2, pET - 3, pET - 4, pET - 5, pET - 11[A.H.Rosenberg, Gene 56: 125 - 135(1987)] 등을 들 수 있다.

발현 벡터에는 상기 이외에 원하는 바에 따라 인핸서 (enhancer), 스플라이싱 (splicing) 시그널, 폴리A 부가 시그널, 선택 마커, SV40 복제 오리진(이하, SV40 ori라고 함) 등을 함유하고 있는 것을 사용할 수 있다. 선택 마커로는 예컨대 디히드로엽산 환원효소(이하, dhfr이라고 함) 유전자[메소트렉세이트 (MTX) 내성], 암피실린 내성 유전자(이하, Amp^r이라고 함), 네오마이신 내성 유전자(이하, Neo^r이라고 함, Geneticin 내성) 등을 들 수 있다. 특히, dhfr 유전자 결손 차이나스 햄스터 세포를 사용하며 dhfr 유전자를 선택 마커로서 사용하는 경우, 재조합 세포를 티미딘을 함유하지 않은 배지에 의해서도 선택할 수 있다.

또한, 필요에 따라 숙주에 맞는 시그널배열을 본 발명의 폴리펩티드의 N 말단측에 부가한다. 숙주가 에세리키아속균인 경우에는 PhoA 시그널배열, OmpA 시그널배열 등을, 숙주가 바실러스속균인 경우에는 α - 아밀라아제 시그널배열, 서브틸리신 시그널배열 등을, 숙주가 효모인 경우에는 MF α 시그널배열, SUC2 시그널배열 등을, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널배열, α - 인터페론 시그널배열, 항체분자 시그널배열 등을 각각 이용할 수 있다.

이렇게 해서 구축된 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유한 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조할 수 있다.

숙주로는 예컨대 에세리키아 (Escherichia) 속균, 바실러스 (Bacillus) 속균, 효모, 곤충세포, 곤충, 동물세포 등이 사용된다.

에세리키아 (Escherichia) 속 균의 구체예로는, 예컨대 에세리키아 콜리(Escherichia coli) K12 · DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 60권, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9권, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120권, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41권, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39권, 440 (1954)] 등이 사용된다.

T7 프로모터의 발현계를 사용하는 경우에는, 그 형질전환체의 숙주로는, T7 RNA 폴리머라아제 유전자[F.W.Studier 외, J.Mol.Biol.189: 113 - 130 (1986)]를 조합한 대장균주, 예컨대 MM294, DH - 1, C600, JM109, BL21 또는 T7 RNA 폴리머라아제 유전자를 다른 플라스미드와 함께 조합한 대장균주 등이 사용된다. 바람직하게는 T7 RNA 폴리머라아제 유전자를 조합한 λ 파지가 용원화된 MM294주, BL21주 및 BL21(DE3)주 등이 사용된다. 이 경우, T7 RNA 폴리머라아제 유전자의 프로모터로는 이소프로필 - 1 - 티오 - β - d - 갈락토피라노시드(IPTG)로 발현이 유도되는 lac 프로모터가 사용된다.

바실러스 (Bacillus) 속균으로는 예컨대 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis) MI114 [Gene, 24권, 255 (1983)], 207 - 21 [Journal of Biochemistry, 95권, 87 (1984)] 등이 사용된다.

효모로는 예컨대 사카로마이세스 세레비시아에 (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87 - 11A, DKD - 5D, 20B - 12, 쉬조아카로마이세스 폼베 (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, 피키아 파스토리스 (Pichia pastoris) KM71 등이 사용된다.

곤충세포로는, 예컨대 바이러스가 AcNPV인 경우에는 야행성 나방의 유충 유래 주화세포 (스포돔테라 프루기페르다 세포(Spodoptera frugiperda cell); Sf세포), 트리코플루시아 니 (Trichoplusia ni) 의 중장 유래의 MGI 세포, 트리코플루시아 니 (Trichoplusia ni) 의 난 유래의 High FiveTM 세포, 마메스트라 브라시카에 (Mamestra brassicae) 유래의 세포 또는 에스티그메나 아크레아 (Estigmena acrea) 유래의 세포 등이 사용된다. 바이러스가 BmNPV인 경우에는 누에 유래 주화세포 (Bombyx mori N 세포; BmN 세포) 등이 사용된다. 이 Sf 세포로는 예컨대 Sf9 세포(ATC C CRL1711), Sf21 세포(이상, Vaughn, J.L. 외, In Vivo, 13, 213 - 217, (1977)) 등이 사용된다.

곤충으로는 예컨대 누에의 유충 등이 사용된다 [마에다 외, Nature, 315권, 592 (1985)].

동물세포로는, 예컨대 원숭이 세포 COS - 7, Vero, 차이나스 햄스터 세포 CHO(이하, CHO 세포라고 함), dhfr 유전자 결손 차이나스 햄스터 세포 CHO(이하, CHO(dhfr⁻) 세포라고 함), 마우스 L세포, 마우스 AtT - 20, 마우스 미엘로마 세포, 래트 GH3, 인간 FL 세포 등이 사용된다.

에세리키아 (Escherichia) 속균을 형질 전환하기 위해서는, 예컨대 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69권, 2110 (1972)]이나 [Gene, 17권, 107 (1982)] 등에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

바실러스 (Bacillus) 속균을 형질 전환하기 위해서는, 예컨대, [Molecular & General Genetics, 168권, 111 (1979)] 등에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

효모를 형질 전환하기 위해서는, 예컨대 [Methods in Enzymology, 194권, 182 - 187 (1991)], [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75권, 1929 (1978)] 등에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

곤충세포 또는 곤충을 형질 전환하기 위해서는, 예컨대 [Bio/Technology, 6, 47 - 55 (1988)] 등에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

동물세포를 형질 전환하기 위해서는, 예컨대 [세포공학 별책 8 신세포공학 실험 프로토콜 263 - 267 (1995) (슈준사 발행)], [Virology, 52권, 456 (1973)] 등에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

이렇게 해서 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 수득할 수 있다.

숙주가 에세리키아 (Escherichia) 속균, 바실러스 (Bacillus) 속균인 형질전환체를 배양할 때에 배양에 사용되는 배지로는 액체 배지가 적당하고, 그 중에는 이 형질전환체의 생육에 필요한 탄소원, 질소원, 무기물 기타가 함유된다. 탄소원으로는 예컨대 글루코스, 덱스트린, 가용성 전분, 자당 등, 질소원으로는 예컨대 암모늄염류, 질산염류, 콘스팁 리커, 펩톤, 카제인, 효모 엑스, 고기 엑스, 대두박, 감자 추출액 등과 같은 무기 또는 유기물질, 무기물로는 예컨대 염화칼슘, 인산2수소나트륨, 염화마그네슘 등을 들 수 있다. 또한, 효모 엑스, 비타민류, 성장촉진인자 등을 첨가할 수도 있다. 배지의 pH 는 약 5 ~ 8 이 바람직하다.

에세리키아속균을 배양할 때의 배지로는 예컨대 글루코스, 카자미노산을 함유하는 M9 배지[Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431 - 433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972]가 바람직하다. 여기에 필요에 따라 프로모터를 효율적으로 작용시키기 위해서, 예컨대 3β - 인돌릴아크릴산과 같은 약제를 첨가할 수 있다.

숙주가 에세리키아속균인 경우, 배양은 통상 약 15 ~ 43°C에서 약 3 ~ 24시간 동안 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 가할 수도 있다.

숙주가 바실러스속균인 경우, 배양은 통상 약 30 ~ 40°C에서 약 6 ~ 24시간 동안 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 가할 수도 있다.

숙주가 효모인 형질전환체를 배양할 때에 배지로는, 예컨대 Burkholder 최소 배지[Bostian, K.L.외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77권, 4505 (1980)] 나 0.5% 카자미노산을 함유하는 SD 배지[Bitter, G.A.외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81권, 5330 (1984)]를 들 수 있다. 배지의 pH는 약 5 ~ 8로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20 ~ 35°C에서 약 24 ~ 72시간 동안 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 가한다.

숙주가 곤충세포나 곤충인 형질전환체를 배양할 때에, 배지로는 Grace's Insect Medium(Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962))에 비등화된 10% 소 혈청 등의 첨가물을 적절하게 첨가한 것 등이 사용된다. 배지의 pH는 약 6.2 ~ 6.4로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 27°C에서 약 3 ~ 5일간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 가한다.

숙주가 동물세포인 형질전환체를 배양할 때에, 배지로는 예컨대 약 5 ~ 20% 태아 소 혈청을 함유하는 MEM 배지[Science, 122권, 501 (1952)], DMEM 배지[Virology, 8권, 396 (1959)], RPMI 1640 배지[The Journal of the American Medical Association 199권, 519 (1967)], 199 배지[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73권, 1 (1950)] 등이 사용된다. pH는 약 6 ~ 8인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 30 ~ 40°C에서 약 15 ~ 60시간 동안 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 가한다.

이상과 같이 해서 형질전환체의 세포내, 세포막 또는 세포밖에 본 발명의 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다.

상기 배양물로부터 본 발명의 폴리펩티드를 분리 정제하기 위해서는, 예컨대 다음과 같은 방법으로 실시할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 배양 균체 또는 세포로부터 추출할 때에는, 배양 후 공지 방법으로 균체 또는 세포를 모아 이것을 적당한 완충액에 현탁시키고, 초음파, 리조치임 및/또는 동결 용해 등으로 균체 또는 세포를 파괴한 후, 원심 분리나 여과에 의해 폴리펩티드의 비정제 추출액을 수득하는 방법 등이 적절하게 사용된다. 재조합체가 생산하는 폴리펩티드가 균체 내에서 밀봉체를 형성하는 경우에는, 원심 분리로 집균한 후 초음파 등으로 균체를 파쇄하여 수득된 밀봉체를 변성제(2-8M 염산 구아니딘, 5-9M 우레아 등)를 사용하여 가용화시킴으로써 폴리펩티드를 추출할 수 있다. 배양액 내에 폴리펩티드가 분비되는 경우에는, 배양 종료 후 그 자체의 공지 방법으로 균체 또는 세포와 상등액을 분리하고 상등액을 모은다.

이렇게 해서 수득된 배양상등액 또는 추출액 내에 함유되는 폴리펩티드의 정제는 자체 공지된 분리·정제법을 적절하게 조합하여 실시할 수 있다. 이들의 공지 분리, 정제법으로는, 염석이나 용매 침전법 등과 같은 용해도를 이용하는 방법, 투석법, 한외여과법, 겔여과법 및 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동법 등과 같은 주로 분자량의 차이를 이용하는 방법, 이온 교환 크로마토그래피 등의 하전의 차이를 이용하는 방법, 친화성 크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고속 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차이를 이용하는 방법, 등전점 전기영동법 등의 등전점의 차이를 이용하는 방법 등이 이용된다.

이렇게 해서 수득되는 폴리펩티드가 유리체로 수득된 경우에는, 자체 공지 방법 또는 이에 준하는 방법으로 염으로 변환할 수 있고, 반대로 염으로 수득된 경우에는 자체 공지 방법 또는 이에 준하는 방법으로 유리체 또는 다른 염으로 변환할 수 있다.

또, 재조합체가 생산하는 폴리펩티드를 정제 전 또는 정제 후에 적당한 단백질 수식 효소 또는 단백질 분해 효소 등을 작용시키는 것, 또는 화학반응에 의해 임의로 수식을 가하거나 폴리펩티드를 부분적으로 제거할 수도 있다. 이들 효소로는, 예컨대 트립신, 키모트립신, 아르기닐 엔드 펩티다아제, 푸린, 프로호르몬콤벨다아제1(PC1), 프로호르몬콤벨다아제2(PC2), 카르복시펩티다아제B, 프로테inkin아아제, 글리코시다아제 등이 사용된다. 화학반응으로는 예컨대 브롬화

시아(CNBr)를 사용한 절단반응 등을 들 수 있다.

추출된 목적 단백질 또는 분리 정제된 목적 단백질은 필요에 따라 단백질의 리폴딩에 사용된다. 리폴딩은 예컨대 「단백질의 폴딩」(R.H.Pain 편, 245 - 279 (1995), Springer Verlag 도쿄)에 기재된 공지 방법 또는 이에 준하는 방법으로 실시할 수 있다. 추출제(예컨대, 구아니딘 염산염, 우레아와 같은 카오토픽 가용화제, n - 라우릴메틸글리신, SDS와 같은 계면활성제 등)를 함유하지 않거나 또는 저농도 추출제를 함유하는 완충액으로 1 단계 또는 다단계에서의 희석이나 반투막을 이용한 투석, 겔 여과를 이용한 완충액의 치환 등으로 실시할 수 있다. 이 경우 목적 단백질의 응집을 방지하기 위해서 아르기닌, 폴리에틸렌글리콜, 중성 계면활성제 등을 첨가할 수 있다. 단백질의 디설피드 결합을 형성시키기 위해서 공기 산화시키거나 산화 환원완충액계 등을 첨가할 수 있다. 산화 환원완충액에는 글루타치온, 시스테인, 디티오슬레이톨, 2 - 메틸카프토에탄올 또는 시스테아민을 기재로 한 것을 들 수 있다.

또, 본 발명의 폴리펩티드인 A 사슬 및 B 사슬을 별도로 생산한 후 양쪽을 디설피드 결합으로 연결시킬 수 있다. 예컨대, A 사슬과 B 사슬을 코딩하는 DNA 단편을 각각 lacZ(β - 갈락토시다아제)유전자에 연결하고 대장균을 숙주로 이용하여 β - 갈락토시다아제 + A 사슬 및 β - 갈락토시다아제 + B 사슬의 융합단백질을 제조한 후, 브롬화 시안 처리나 효소 처리로 A 사슬과 B 사슬을 융합단백질에서 잘라낼 수 있다. 잘라진 A 사슬과 B 사슬을 환원상태로 혼합하고 서서히 산화시킴으로써, A 사슬과 B 사슬이 디설피드 결합으로 연결된 단백질로 변환시킬 수 있다. A 사슬과 B 사슬의 연결상태는 예컨대 A 사슬의 Cys11과 B 사슬의 Cys10이 결합되고, 또 A 사슬의 Cys24와 B 사슬의 Cys22가 결합되며, 또한 A 사슬의 Cys10과 A 사슬의 Cys15가 결합되어 있는 것이 바람직하다. 이 때, 변환조건으로는, 예컨대 인슐린 분자의 제조법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76권, 106 (1979)]에 준하여 실시할 수 있다.

이렇게 생성되는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염의 존재는 특이 항체를 사용한 효소 면역 검정 (Enzyme Immunoassay) 또는 웨스턴 블롯 분석 등으로 측정할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드, 그 아미드, 또는 그 에스테르 또는 그 염(이하, 단순히 본 발명의 폴리펩티드라고 함)에 대한 항체는, 본 발명의 폴리펩티드를 인식할 수 있는 항체라면 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 중 어느 것이어도 된다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체는, 본 발명의 폴리펩티드를 항원으로 사용하며 자체 공지된 항체 또는 항혈청의 제조법에 따라 제조할 수 있다.

[모노클로날 항체의 제조]

(a) 모노클로날 항체 생산세포의 제조

본 발명의 폴리펩티드는 온혈동물에 대하여 투여에 의해 항체 생산이 가능한 부위에 그 자체 또는 담체, 희석제와 함께 투여된다. 투여할 때에 항체 생산능을 높이기 위해서, 완전 프로인트 아주반트 (Freund's adjuvant) 나 불완전 프로인트 아주반트를 투여해도 된다. 투여는 통상 2 ~ 6 주마다 1회씩, 총 2 ~ 10회 정도 실시된다. 사용되는 온혈동물로는 예컨대 원숭이, 토끼, 개, 모르모트, 마우스, 래트, 양, 염소, 닭을 들 수 있으나 마우스 및 래트가 바람직하게 사용된다.

모노클로날 항체 생산세포의 제조시에는 항원으로 면역된 온혈동물, 예컨대 마우스로부터 항체가가 인식된 개체를 선택하여 최종 면역의 2 ~ 5 일 후에 비장 또는 림프절을 채취하고, 이것들에 함유되는 항체 생산세포를 동종 또는 이종 동물의 골수종 세포와 융합시킴으로써, 모노클로날 항체 생산 하이브리도마를 조제할 수 있다. 항혈청 중의 항체가 측정된 예컨대 후술하는 표지화 폴리펩티드과 항혈청을 반응시킨 후, 항체에 결합된 표지제의 활성을 측정함으로써 실시할 수 있다. 융합 조작은 기존 방법, 예컨대 켈러와 밀스타인의 방법[Nature, 256, 495 (1975)]에 따라 실시할 수 있다. 융합 촉진제로는 예컨대 폴리에틸렌글리콜(PEG)이나 센다이 바이러스 등을 들 수 있으나 바람직하게는 PEG가 사용된다.

다.

골수종 세포로는 예컨대 NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 등과 같은 온혈동물의 골수종 세포를 들 수 있으나 P3U1이 바람직하게 사용된다. 사용되는 항체 생산세포(비장세포) 수와 골수종세포 수의 바람직한 비율은 1:1 20:1 정도이고, PEG(바람직하게는 PEG1000 PEG6000)가 10 80% 정도의 농도로 첨가되고, 약 20 40°C, 바람직하게는 약 30 37°C 에서 약 1 10 분간 인큐베이트함으로써 효율적으로 세포융합을 실시할 수 있다.

모노클로날 항체 생산 하이브리도마의 스크리닝에는 여러 방법을 사용할 수 있으나, 예컨대 폴리펩티드 항원을 직접 또는 담체와 함께 흡착시킨 고상(예, 마이크로플레이트)에 하이브리도마 배양상등액을 첨가하고, 이어서 방사성물질이나 효소 등으로 표지한 항면역 글로불린 항체(세포융합에 사용되는 세포가 마우스인 경우 항마우스 면역 글로불린 항체가 사용됨) 또는 프로테인A를 첨가하여 고상에 결합된 모노클로날 항체를 검출하는 방법, 항면역 글로불린 항체 또는 프로테인A를 흡착시킨 고상에 하이브리도마 배양상등액을 첨가하고, 방사성물질이나 효소 등으로 표지한 폴리펩티드를 첨가하여 고상에 결합된 모노클로날 항체를 검출하는 방법 등을 들 수 있다.

모노클로날 항체의 선별은 자체 공지되거나 이에 준하는 방법에 따라 실시할 수 있다. 통상 HAT(히포크산틴, 아미노프테린, 티미딘)를 첨가한 동물세포용 배지에서 실시할 수 있다. 선별 및 육종용 배지로는 하이브리도마를 생육할 수 있는 것이라면 어떠한 배지를 사용해도 된다. 예컨대, 약 1 20%, 바람직하게는 약 10 20% 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640배지, 약 1 10% 소 태아 혈청을 함유하는 GIT 배지(Wako Pure Chemical Industries Ltd. 공업주) 또는 하이브리도마 배양용 무혈청 배지(SFM-101, 닛스이 제약(주)) 등을 사용할 수 있다. 배양온도는 통상 약 20 40°C, 바람직하게는 약 37°C이다. 배양시간은 통상 5일 3주일, 바람직하게는 1주일 2주일이다. 배양은 통상 5% 탄산가스하에서 실시할 수 있다. 하이브리도마 배양상등액의 항체가는 상기 항혈청 중의 항체가 측정과 동일하게 하여 측정할 수 있다.

(b) 모노클로날 항체의 정제

모노클로날 항체의 분리 정제는 자체 공지 방법, 예컨대 면역 글로불린의 분리 정제법[예, 염석법, 알콜침전법, 등전점 침전법, 전기영동법, 이온교환체(예, DEAE)에 의한 흡탈착법, 초원심법, 겔여과법, 항원결합고상 또는 프로테인A 또는 프로테인G 등과 같은 활성흡착제로 항체만을 채취하고 결합을 해리시켜 항체를 수득하는 특이적 정제법]에 따라 실시할 수 있다.

[폴리클로날 항체의 제조]

본 발명의 폴리클로날 항체는 그 자체 공지되거나 이에 준하는 방법에 따라 제조할 수 있다. 예컨대, 면역 항원(본 발명의 폴리펩티드 항원) 자체 또는 이것과 캐리어 단백질의 복합체를 제조하여 상기 모노클로날 항체의 제조법과 마찬가지로 온혈동물에게 면역을 실시하고, 이 면역동물로부터 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체 함유물을 채취하여 항체의 분리 정제를 실시함으로써 제조할 수 있다.

온혈동물을 면역시키기 위해서 사용되는 면역 항원과 캐리어 단백질의 복합체에 관하여, 캐리어 단백질 종류 및 캐리어와 합텐의 혼합비는 캐리어에 가교시켜 면역시킨 합텐에 대하여 항체를 효율적으로 할 수 있으면 어떠한 것을 어떠한 비율로 가교시켜도 되지만, 예컨대 소 혈청 알부민이나 소 사일로 글로불린, 헤모시아닌 등을 중량비로 합텐 1에 대하여 약 0.1 20, 바람직하게는 약 1 5 비율로 커플시키는 방법이 이용된다.

또한, 합텐과 캐리어의 커플링에는 각종 축합제를 사용할 수 있으나, 글루탈알데히드나 카르보디이미드, 말레이미드 활성 에스테르, 티올기, 디티올피리딜기를 함유하는 활성 에스테르 시약 등이 사용된다.

축합 생성물은 온혈동물에 대하여 항체 생산이 가능한 부위에 그 자체 또는 담체, 희석제와 함께 투여된다. 투여할 때에 항체 생산능을 높이기 위해서, 완전 프로인트 아주반트나 불완전 프로인트 아주반트를 투여해도 된다. 투여는 통상 약 2~6주마다 1회씩, 총 약 3~10회 정도 실시된다.

폴리클로날 항체는 상기 방법으로 면역된 온혈동물의 혈액, 복수 등 바람직하게는 혈액에서 채취할 수 있다.

항혈청 중의 폴리클로날 항체가 측정은 상기 항혈청 중의 항체가 측정과 동일하게 하여 측정할 수 있다. 폴리클로날 항체의 분리 정제는 상기 모노클로날 항체의 분리 정제와 동일한 면역 글로불린의 분리 정제법에 따라 실시할 수 있다.

또, 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 [Nat. Biotechnol, 14, 845 - 851 (1996)], [Nat Genet.15 146 - 156 (1997)], [PNAS, 97(2), 722 - 727 (2000)] 등에 기재된 방법에 준하여 인간화 항체를 제조할 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA(이하, 본 발명의 DNA라고 함)에 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 염기서열을 갖는 안티센스 DNA로는, 본 발명의 DNA에 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 염기서열을 가지며, 이 DNA의 발현을 억제할 수 있는 작용을 갖는 것이면 어떤 안티센스 DNA여도 된다.

본 발명의 DNA에 실질적으로 상보적인 염기서열이란, 예컨대 본 발명의 DNA에 상보적인 염기서열(즉, 본 발명의 DNA의 상보사슬)의 전체 염기서열 또는 부분 염기서열과 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열 등을 들 수 있다. 특히, 본 발명의 DNA의 상보사슬의 전체 염기서열 중, 본 발명의 폴리펩티드의 N 말단 부위를 코딩하는 부분의 염기서열(예컨대, 개시 코돈 부근의 염기서열 등)의 상보사슬과 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 안티센스 DNA가 적합하다. 이들 안티센스 DNA는 공지된 DNA 합성장치 등을 사용하여 제조할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드가 시그널 펩티드를 갖는 경우에는, 세포밖으로 효율적으로 분비되어 액성 인자로서 생체기능조절 등의 중요한 생물활성을 발휘한다.

다음에 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 DNA, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염에 대한 항체(이하, 본 발명의 항체라고 함) 및 안티센스 DNA의 용도를 설명한다.

(1) 본 발명의 폴리펩티드는 조직 특이적으로 발현되므로 조직 마커로서 사용할 수 있다. 즉, 조직 분화, 병태, 암 전이 등과 같은 검출을 위한 마커로서 유용하다. 또, 대응하는 수용체, 결합 폴리펩티드 등의 분취에도 이용할 수 있다. 또한, 자체 공지된 하이스루풋 스크리닝 (High Throughput Screening) 용 패널을 제조함으로써 생물활성을 조사하는 데에 이용할 수 있다.

(2) 본 발명의 폴리펩티드가 관여하는 각종 질병의 치료·예방제

본 발명의 폴리펩티드는 생체 내에서 액성 인자로 존재하고, 후술하는 실시예에 기재된 바와 같이 MMP-1(매트릭스 메탈로프로티나아제 - 1)이나 VEGF(혈관 내피세포 증식인자)의 발현촉진작용을 갖기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 DNA 등에 이상이 있거나 결손되어 있는 경우 또는 발현량이 이상하게 감소되거나 항진되어 있는 경우, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병이 발증한다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 및 본 발명의 DNA는, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사 조절 (당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상 (예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화 (예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애 (말

초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다.

또, 본 발명의 폴리펩티드는 다른 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리 폴리펩티드와 패밀리를 형성하기 위해, 다른 패밀리의 폴리펩티드, 또는 그 DNA 등에 이상이 있거나 결손되어 있는 경우 또는 발현량이 이상하게 감소되거나 항진되어 있는 경우에도, 다른 패밀리와 상보적으로 작용함으로써 또한 특히 발현량에 이상함이 확인되지 않는 경우에도 본 발명의 폴리펩티드 단독의 약리작용에 따라, 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 알러지 등의 면역계 질환, 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드는 상기 기술한 바와 같이 1 세트의 A 사슬내 디설피드 결합과 2 세트의 A 사슬과 B 사슬 간 디설피드 결합으로 형성되는 것이 바람직하지만, 2 세트의 디설피드 결합을 갖는 A 사슬 단독 또는 1 세트의 디설피드 결합을 갖는 B 사슬 단독의 분자종도 존재할 수 있다. 후자의 A 사슬 또는 B 사슬 단독의 분자종도 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다.

예컨대, 생체내에서 본 발명의 폴리펩티드가 감소되거나 결손되어 있기 때문에, 세포에서의 정보전달이 충분히 또는 정상적으로 발휘되지 않는 환자가 있는 경우에, (가) 본 발명의 DNA를 이 환자에게 투여하여 생체내에서 본 발명의 폴리펩티드를 발휘시킴으로써, (나) 세포에 본 발명의 DNA를 삽입하여 본 발명의 폴리펩티드를 발휘시킨 후 이 세포를 환자에게 이식함으로써, 또는 (다) 본 발명의 폴리펩티드를 이 환자에게 투여하거나 함으로써, 이 환자에게 본 발명의 폴리펩티드 역할을 충분히 또는 정상적으로 발휘시킬 수 있다.

본 발명의 DNA를 상기 치료·예방제로서 사용하는 경우에는, 이 DNA를 단독 또는 레트로 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 어소시에이티드 바이러스 벡터 등과 같은 적당한 벡터에 삽입한 후, 통상적인 수단에 따라 인간 또는 온혈동물에게 투여할 수 있다. 본 발명의 DNA는 그대로 또는 섭취 촉진을 위한 보조제 등의 생리학적으로 인정되는 담체와 함께 제제화하여 유전자 총이나 하이드로 겔 카테터와 같은 카테터로 투여할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 상기 치료·예방제로서 사용하는 경우에는, 적어도 90%, 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 더 바람직하게는 99% 이상으로 정제된 것을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 폴리펩티드는 예컨대 필요에 따라 당의를 실시한 정제, 캡슐제, 엘릭서제, 마이크로캡슐제 등으로서 경구적으로, 또는 물 또는 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제 등의 주사제 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 폴리펩티드를 생리학적으로 인정되는 담체, 향미제, 부형제, 비히클, 방부제, 안정제, 결합제 등과 함께 일반적으로 인정된 제제 실시예에 요구되는 단위용량 형태로 혼합함으로써 제조할 수 있다. 이들 제제의 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 수득할 수 있도록 하는 것이다. 정제, 캡슐제 등에 혼합할 수 있는 첨가제로는, 예컨대 젤라틴, 옥수수전분, 트라칸트, 아라비아검과 같은 결합제, 결정성 셀룰로오스와 같은 부형제, 옥수수전분, 젤라틴, 아르긴산 등과 같은 팽화제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 자당, 젓당 또는 사카린과 같은 감미제, 페파민트, 아까모노(학명: *Gaultheria ovatifolia* ssp. *adenothrix*) 오일 또는 체리와 같은 향미제 등이 사용된다. 조제단위형태가 캡슐인 경우에는 상기 타입의 재료에 추가로 유지와 같은 액상담체를 함유할 수 있다. 주사를 위한 무균조성물은 주사용수와 같은 비히클 내의 활성물질, 참기름, 야자유 등과 같은 천연산출 식물유 등을 용해 또는 현탁시키는 등 통상적인 제제 실시예에 따라 처방할 수 있다. 주사용 수성액으로는 예컨대 생리식염수, 포도당이나 그 이외의 보조약을 함유하는 등장액(예컨대, D-소르비톨, D-만니톨, 염화나트륨 등) 등을 들 수 있고, 적당한 용해보조제, 예컨대 알코올(예컨대, 에탄올 등), 폴리알코올(예컨대, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등), 비이온성 계면활성제(예컨대, Polysorbate 80TM, HCO-50 등) 등과 병용해도 된다. 유성액으로는 예컨대 올리브유, 참깨유, 대두유, 땅콩유, 면실유, 옥수수유 등과 같은 식물유, 프로필렌글리콜 등을 들 수 있고, 용해보조제로서 벤조산벤질, 벤질알코올 등과 병용해도 된다. 또, 완충제(예컨대, 인산염 완충액, 아세트산나트륨 완충액 등), 무통화제(예컨대, 염화벤잘코늄, 염산프로카인 등), 안정제(예컨대, 인간 혈청 알부민, 폴리에틸렌글리콜 등), 보존제(예컨대, 벤질알코올, 페놀 등), 산화방지제 등과 배합해도 된다. 조제된 주사액은 통상 적당한 앰플에 충전된다.

본 발명의 DNA가 삽입된 벡터도 상기와 마찬가지로 제제화되어 통상 비경구적으로 사용된다. 이렇게 해서 수득되는 제제는 안전하고 저독성이기 때문에, 예컨대 온혈동물(예컨대, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 토끼, 닭, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 투여할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 투여량은 대상질환, 투여대상, 투여 경로 등에 따라 차이는 있지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료 목적에서 본 발명의 폴리펩티드를 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 본 발명의 폴리펩티드를 약 0.01mg 1000mg, 바람직하게는 약 1 mg 1000mg, 더 바람직하게는 약 10 500mg, 보다 바람직하게는 약 10 200mg 투여한다. 비경구적으로 투여하는 경우에는, 이 폴리펩티드의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환 등에 따라라도 다르지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료 목적에서 본 발명의 폴리펩티드를 주사제 형태로 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 폴리펩티드를 약 0.001 500mg 정도, 바람직하게는 약 0.01 500mg 정도, 더 바람직하게는 약 0.1 200mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 100mg 정도를 환부 또는 전신성에 주사함으로써 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

(2) 질병에 대한 의약 후보화합물의 스크리닝

본 발명의 폴리펩티드는 생체내에서 액성 인자로서 존재하기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드 기능(활성)을 촉진시키는 화합물 또는 그 염은 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경

화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다.

한편, 본 발명의 폴리펩티드 기능(활성)을 저해하는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드의 생산 과정에서 기인되는 질환의 치료·예방제 등의 의약으로서 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드 기능(활성)을 촉진하거나 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝을 위한 시약으로서 유용하다.

즉, 본 발명은

(1) 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염을 사용하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염의 기능(활성)을 촉진하는 화합물 또는 그 염(이하, 촉진제라고 함) 또는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염의 기능(활성)을 저해하는 화합물(이하, 저해제라고 함)의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝용 키트는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염을 함유하는 것이다.

본 발명의 폴리펩티드를 사용하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드 기능(활성)을 촉진하거나 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법으로 구체적으로는

(i) 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 본 발명의 폴리펩티드를 접촉시킨 경우 및 (ii) 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 본 발명의 폴리펩티드 및 시험화합물을 접촉시킨 경우를 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 조직, 세포 또는 이들 막 분획의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법 등을 들 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에서는, (i) 상기 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 본 발명의 폴리펩티드를 접촉시킨 경우와 (ii) 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 본 발명의 폴리펩티드 및 시험화합물을 접촉시킨 경우에, 예컨대 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 대한 리간드의 결합량, 세포자극활성, 조직반응성 등을 측정하여 비교한다.

본 발명의 스크리닝 방법은 구체적으로는

①표지된 본 발명의 폴리펩티드를 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 접촉시킨 경우와 표지된 본 발명의 폴리펩티드 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 접촉시킨 경우에, 표지된 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획에 대한 결합량을 측정 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법,

②표지된 본 발명의 폴리펩티드를 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포 또는 이 세포의 막 분획에 접촉시킨 경우와 표지된 본 발명의 폴리펩티드 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포 또는 이 세포의 막 분획에 접촉시킨 경우에, 표지된 본 발명의 폴리펩티드의 이 세포 또는 이 막 분획에 대한 결합량을 측정 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법,

③표지된 본 발명의 폴리펩티드를 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA를 함유하는 형질전환체를 배양함으로써 세포막 상에 발현된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 접촉시킨 경우와 표지된 본 발명의 폴리펩티드 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA를 함유하는 형질전환체를 배양함으로써 세포막 상에 발현된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 접촉시킨 경우에, 표지된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체로의 결합량을 측정 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법,

④본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물(예컨대, 본 발명의 폴리펩티드)을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포에 접촉시킨 경우와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포에 접촉시킨 경우에, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성(예컨대, 아라키돈산 유리, 아세틸콜린 유리, 세포내 Ca^{2+} 유리, 세포내 cAMP 생성, 세포내 cGMP 생성, 이노시톨인산 생산, 세포막 전위변동, 세포내 단백질의 인산화, c-fos 활성화, 세포외 액의 pH 저하, NO 생산, 이 세포가 특유하게 생산하고 있는 생리활성물질의 생산 등을 촉진하는 활성 또는 억제하는 활성 등)을 측정 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법 및,

⑤본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물(예컨대, 본 발명의 폴리펩티드 등)을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA를 함유하는 형질전환체를 배양함으로써 세포막 상에 발현된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 접촉시킨 경우와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA를 함유하는 형질전환체를 배양함으로써 세포막 상에 발현된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 접촉시킨 경우에, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성(예컨대, 아라키돈산 유리, 아세틸콜린 유리, 세포내 Ca^{2+} 유리, 세포내 cAMP 생성, 세포내 cGMP 생성, 이노시톨인산 생산, 세포막 전위변동, 세포내 단백질의 인산화, c-fos 활성화, 세포외 액의 pH 저하, NO 생산, 이 세포가 특유하게 생산하고 있는 생리활성물질의 생산 등을 촉진하는 활성 또는 억제하는 활성 등)을 측정 비교하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝 방법 등이다.

⑥본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA는 다음과 같은 방법으로 취득할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를¹²⁵I 등의 방사성동위원소나 플루오레세인 등과 같은 형광물질, 또는 비오틴 등으로 표지하고, 이 표지체가 특이적으로 결합되는 세포주, 조직, 기관 등을 건출한다. 이어서, 공지 방법으로 거기에서 mRNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후, 동물세포용 발현벡터에 클로닝한다. 이것을 COS-7 세포 등에 도입하고, 이 형질전환세포에 상기 표지체가 결합되는지의 여부를 지표로 하여 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA가 조합된 형질전환세포를 선출할 수 있다(발현 클로닝).

⑦또, 인슐린 수용체 패밀리에 공통된 구조적 특징(예컨대, 티로신키나아제 도메인 등의 아미노산서열)에 대한 혼합 프라이머를 제조하고 RT-PCR을 실시함으로써, 인슐린 수용체 패밀리에 속하는 신규 수용체 cDNA 단편을 취득할 수 있다. 계속해서 수득된 DNA 배열을 토대로 하여 5' - RACE 및 3' - RACE PCR을 실시하여 전체길이의 cDNA를 취득한다. 이것을 상기 동물세포용 발현 벡터에 삽입하여 CHO 세포나 COS-7 세포 등과 같은 적당한 동물배양세포에서 발현시키고, 본 발명의 폴리펩티드가 특이적으로 결합되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 코딩하는 DNA임을 확인할 수 있다.

다음에 본 발명의 스크리닝 방법을 구체적으로 설명한다.

먼저, 본 발명의 스크리닝 방법에 사용되는 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 조직, 세포 또는 이들 막 분획 등, 즉 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체로는, 본 발명의 폴리펩티드가 특이적으로 결합되는 것이면 어느 것이어도 되지만, 인간 또는 온혈동물의 장기, 배양세포 또는 이들 막 분획 등이 바람직하다. 그러나, 특히 인간 유래의 장기는 입수하기가

매우 어렵기 때문에, 스크리닝에 사용되는 것으로는 재조합체를 사용하여 대량 발현시킨 인간의 재조합 수용체 등이 적합하다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 제조하기 위해서는 상기 기술한 본 발명의 폴리펩티드의 제조방법 등이 이용된다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포 또는 이 세포막 분획 등을 사용하는 경우 후술하는 조제법에 따르면 된다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포를 사용하는 경우, 이 세포를 글루타알데히드, 포르말린 등으로 고정화시킬 수도 있다. 고정화 방법은 그 자체 공지된 방법에 따라 실시할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포로는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 발현시킨 세포주를 말하는데, 대장균 (*Escherichia coli*), 고초균 (*Bacillus subtilis*), 효모, 곤충세포, 동물세포 등을 숙주세포로 하는 형질전환체일 수도 있다. 또, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 발현시킨 숙주세포의 취득방법으로는, 상기 기술한 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체의 제조방법과 동일한 방법 등을 들 수 있다.

막 분획으로는 세포를 파쇄한 후 그 자체 공지된 방법으로 수득되는 세포막이 많이 함유되는 분획을 말한다. 세포의 파쇄방법으로는, Potter - Elvehjem형 호모게나이저로 세포를 파쇄하는 방법, 워링 블렌더 (Waring blender) 나 폴리트론 (Polytron) (Kinematica사 제조)에 의한 파쇄, 초음파에 의한 파쇄, 프렌치 프레스 (French Press) 등으로 가압하면서 세포를 가는 노즐에서 분출시키는 파쇄 등을 들 수 있다. 세포막의 분획에는 분획 원심분리법이나 밀도구배 원심분리법 등과 같은 원심력에 의한 분획법이 주로 이용된다. 예컨대, 세포 파쇄액을 저속(500rpm ~ 3000rpm)으로 단시간(통상 약 1분 ~ 10분) 원심하고, 상청액을 다시 고속(15000rpm ~ 30000rpm)으로 통상 30분 ~ 2시간 동안 원심하여 수득되는 침전물을 막 분획으로 한다. 이 막 분획 중에는 발현된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체와 세포 유래의 인 지질이나 막 단백질 등의 막 성분이 많이 함유되어 있다.

이 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포나 막 분획 내의 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 양은 1 세포당 10^3 ~ 10^8 분자인 것이 바람직하고, 10^5 ~ 10^7 분자인 것이 더 바람직하다. 또, 발현량이 많을수록 막 분획당 리간드 결합 활성(비활성)이 높아져 고감도의 스크리닝계를 구축할 수 있게 될 뿐만아니라 동일한 로트 (lot) 에서 대량 시료를 측정할 수 있게 된다.

본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물)을 스크리닝하는 상기 ① ~ ③을 실시하기 위해서는, 적당한 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 분획과 표지된 본 발명의 폴리펩티드 등이 사용된다. 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 분획으로는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 천연 조직이나 세포의 수용체 분획이거나 또는 이것과 동등한 활성을 갖는 재조합형 수용체 분획 등이 바람직하다. 여기에서, 동등한 활성이란 동등한 리간드 결합 활성 등을 나타낸다. 표지된 리간드로는 표지된 본 발명의 폴리펩티드 등이 사용된다. 예컨대, [^3H], [^{125}I], [^{14}C], [^{35}S], 형광색소, 비오틴, β 갈락토시다아제나 퍼옥시다아제 등과 같은 효소 등으로 표지된 본 발명의 폴리펩티드를 이용할 수 있다.

구체적으로는 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물의 스크리닝을 실시하기 위해서는, 먼저 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포 또는 세포의 막 분획을 스크리닝에 적합한 버퍼에 현탁시킴으로써 수용체 표품을 조제한다. 버퍼에는 pH 4 ~ 10(바람직하게는 pH 6 ~ 8)의 인산 버퍼, 트리스-염산 버퍼 등의, 리간드와 수용체의 결합을 저해하지 않는 버퍼라면 어느 것이어도 된다. 또, 비특이적 결합을 저감시키는 목적에서 CHAPS, Tween - 80TM (카오 - 아틀라스사), 디기토닌, 데옥시콜레이트 등과 같은 계면활성제를 버퍼에 첨가할 수도 있다. 또한, 프로테아제에 의한 수용체나 본 발명의 폴리펩티드 등의 분해를 억제하는 목적에서 PMSF, 로이펩틴, E - 64(펩티드 연구소 제조), 펩스타틴 등과 같은 프로테아제 저해제를 첨가할 수도 있다. 0.01ml ~ 1.0ml의 상기 수용체 용액에 일정량(5000cpm ~ 500000cpm)으로 표지된 본 발명의 폴리펩티드를 첨가하고, 동시에 10^{-10} ~ 10^{-6} M 시험화합물을 공존시킨다. 비특이적 결합량(NSB)을 알기 위해 대과잉의 미표지 본 발명의 폴리펩티드를 첨가한 반응튜브도 준비한다. 반응은 0°C ~ 50°C, 바람직하게는 4°C ~ 37°C에서 20분 ~ 24시간, 바람직하게는 30분 ~ 3시간 동안 실시한다. 반응 후 유리섬유 여과지 등으로 여과하고 적당량의 동일 버퍼로 세정한 후, 유리섬유 여과지에 잔존하는 방사활성을 액체 신틸레이션 카운터 또는 γ - 카운터로 계측한다. 길항 물질이 없는 경우 카운트(B_0)에서 비특이적 결합량(NSB)을 뺀 카운트(B_0 - NSB)를 100%로 했을 때, 특이적 결합량(B - NSB)이 예컨대 50% 이하가 되는 시험화합물을 길항저해 능력이 있는 후보물질로 선택할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물)을 스크리닝하는 상기 ④ ⑤ 방법을 실시하기 위해서는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성(예컨대, 아라키돈산 유리, 아세틸콜린 유리, 세포내 Ca^{2+} 유리, 세포내 cAMP 생성, 세포내 cGMP 생성, 이노시톨인산 생산, 세포막 전위변동, 세포내 단백질의 인산화, c - fos 활성화, 세포외 액의 pH 저하, NO 생산, 이 세포가 특유하게 생산하고 있는 생리활성물질 생산 등을 촉진하는 활성 또는 억제하는 활성 등)을 공지 방법 또는 시판되는 측정용 키트를 사용하여 측정할 수 있다. 구체적으로는 먼저 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포를 멀티 웰 플레이트 등에 배양한다. 스크리닝을 실시함에 있어서는, 미리 신선한 배지 또는 세포에 독성을 발휘하지 않는 적당한 버퍼로 교환하고, 시험화합물 등을 첨가하여 일정 시간 인큐베이트한 후 세포를 추출 또는 상등액을 회수하여 생성된 산물을 각각의 방법에 따라 정량한다. 세포자극활성의 지표로 하는 물질(예컨대, 아라키돈산 등)의 생성이, 세포가 함유하는 분해효소로 검정하기 어려운 경우에는, 이 분해효소에 대한 저해제를 첨가하여 검정을 실시할 수도 있다. 또, cAMP 생산 억제 등의 활성에 대해서는 폴스콜린 등으로 세포의 기초적 생산량을 증대시켜 둔 세포에 대한 생산억제작용으로 검출할 수 있다. 또, 세포외 액의 pH 저하에 대해서는 마이크로피지오미터(CytosensorTM 등)를 사용하여 그 산성화율의 변화를 측정할 수 있다.

세포자극활성을 측정하여 스크리닝을 실시하기 위해서는 적당한 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 발현한 세포가 필요하다. 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 발현한 세포로는 천연 세포주나 상기 기술한 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 발현 세포주 등이 바람직하다.

시험화합물로는, 예컨대 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성화합물, 발효생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 등을 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물) 또는 그 염의 스크리닝용 키트는, 본 발명의 폴리펩티드 및 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 대상(본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포 또는 본 발명의 폴리펩티드의 수용체를 함유하는 세포의 막 분획 등)을 함유하는 것이다.

본 발명의 스크리닝 방법 또는 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는(결합을 저해하거나 촉진하는) 화합물(본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물)로, 구체적으로는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통해 세포자극활성을 갖는 화합물 또는 그 염(이른바, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트), 또는 이 자극활성을 갖지 않는 화합물(이른바, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 안타고니스트)이다. 이 화합물로는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성화합물, 발효생산물 등을 들 수 있고, 이들 화합물은 신규 화합물이거나 공지 화합물일 수도 있다.

상기 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트인지 안타고니스트인지의 구체적인 평가방법은 다음 (i) 또는 (i)에 따르면 된다.

(i) 본 발명의 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체의 결합성을 변화시키는(특히, 결합을 저해하는) 화합물을 수득한 후, 이 화합물이 상기 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성을 갖고 있는지의 여부를 측정한다. 세포자극활성을 갖는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트이고, 이 활성을 갖지 않는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 안타고니스트이다.

(ii) (a)시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포에 접촉시켜 상기 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성을 측정한다. 세포자극활성을 갖는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트이다.

(b)본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물(예컨대, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트 등)을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포에 접촉시킨 경우와 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물 및 시험화합물을 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 함유하는 세포에 접촉시킨 경우에, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 통한 세포자극활성을 측정 비교한다. 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체를 활성화시키는 화합물에 의한 세포자극활성을 감소시킬 수 있는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 안타고니스트이다.

이 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 아고니스트는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 대해 본 발명의 폴리펩티드가 갖는 생리활성과 동일한 작용을 갖고 있기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드와 동일하게 안전하고 저독성의 의약으로 유용하다.

반대로, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체 안타고니스트는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 수용체에 대해 본 발명의 폴리펩티드가 갖는 생리활성을 억제할 수 있기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드가 과잉된 경우 활성을 억제하는 안전하고 저독성의 의약으로 유용하다.

본 발명의 스크리닝방법 또는 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 화합물 또는 그 염은, 예컨대 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성화합물, 발효생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액, 혈장 등에서 선택된 화합물로, 본 발명의 폴리펩티드 기능을 촉진하거나 저해하는 화합물이다.

이 화합물의 염으로는 상기 본 발명의 폴리펩티드의 염과 동일한 것이 사용된다.

본 발명의 스크리닝 방법 또는 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 화합물을 상기 기술한 치료·예방제로서 사용하는 경우, 통상적인 수단에 따라 실시할 수 있다. 예컨대, 상기 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 의약과 동일하게 하여 정제, 캡슐제, 엘릭서제, 마이크로캡슐제, 무균성 용액, 현탁액제 등으로 할 수 있다.

이렇게 해서 수득되는 제제는 안전하고 저독성이므로, 예컨대 온혈동물(예컨대, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 양, 돼지, 소, 말, 닭, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 투여할 수 있다.

이 화합물 또는 그 염의 투여량은 그 작용, 대상질환, 투여대상, 투여 경로 등에 따라 차이는 있지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 앨리지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료 목적에서 본 발명의 폴리펩티드 기능을 촉진하는 화합물을 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 화합물을 약 0.01mg 1000mg, 바람직하게는 약 0.1mg 1000mg, 더 바람직하게는 약 1.0 200mg, 보다 바람직하게는 약 1.0 50mg 투여한다. 비경구적

으로 투여하는 경우에는, 이 화합물의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환 등에 따라서도 다르지만, 예컨대 대사조절(당 대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 앨러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 치료 목적에서 본 발명의 폴리펩티드 기능을 촉진하는 화합물을 주사제 형태로 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 30mg 정도, 바람직하게는 약 0.1 ~ 20mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 ~ 10mg 정도를 정맥주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

한편, 본 발명의 폴리펩티드 기능을 저해하는 화합물을 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 1000mg, 바람직하게는 약 0.1 ~ 1000mg, 더 바람직하게는 약 1.0 ~ 200mg, 보다 바람직하게는 1.0 ~ 50mg 투여한다. 비경구적으로 투여하는 경우에는, 이 화합물의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환에 따라서도 다르지만, 본 발명의 폴리펩티드 기능을 저해하는 화합물을 주사제 형태로 통상 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 30mg 정도, 바람직하게는 약 0.1 ~ 20mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 ~ 10mg 정도를 정맥주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

(3) 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염의 정량

본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체(이하, 본 발명의 항체라고 함)는 본 발명의 폴리펩티드를 특이적으로 인식할 수 있기 때문에, 피검액 내의 본 발명의 폴리펩티드의 정량, 특히 샌드위치 면역측정법에 의한 정량 등에 사용할 수 있다.

즉, 본 발명은

- (i) 본 발명의 항체와 피검액 및 표지화된 본 발명의 폴리펩티드를 경합적으로 반응시키고, 이 항체에 결합된 표지화된 본 발명의 폴리펩티드 비율을 측정하는 것을 특징으로 하는 피검액 내의 본 발명의 폴리펩티드의 정량법 및,
- (ii) 피검액과 담체 상에 불용화된 본 발명의 항체 및 표지화된 본 발명의 다른 항체를 동시 또는 연속적으로 반응시킨 후, 불용화 담체 상의 표지제 활성을 측정하는 것을 특징으로 하는 피검액 내의 본 발명의 폴리펩티드의 정량법을 제공한다.

또, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체(이하, 본 발명의 모노클로날 항체라고 함)를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드의 정량을 실시할 수 있는 것 이외에 조직염색 등에 의한 검출을 실시할 수도 있다. 이들 목적에는 항체 분자 그 자체를 사용해도 되고, 또한 항체 분자의 $F(ab')_2$, Fab' 또는 Fab 분획을 사용해도 된다.

본 발명의 항체를 사용하는 본 발명의 폴리펩티드의 정량법은 특별히 제한되어야 하는 것은 아니지만, 피측정액 내의 항원량(예컨대, 본 발명의 폴리펩티드량)에 대응한 항체, 항원 또는 항체-항원 복합체의 양을 화학적 또는 물리적 수단으로 검출하고, 이것을 이미 알려진 양의 항원을 함유한 표준액을 사용하여 제조한 표준 곡선에서 산출하는 측정법이면 어떠한 측정법을 이용할 수도 있다. 예컨대, 네프로메트리(nephrometry), 경합법, 면역 계량법 및 샌드위치법(Sandwich method)이 바람직하게 사용되지만, 감도, 특이성의 면에서 후술하는 샌드위치법을 이용하는 것이 특히 바람직하다.

표지물질을 사용하는 측정법에 사용되는 표지제로는, 예컨대 방사성 동위원소, 효소, 형광물질, 발광물질 등이 사용된다. 방사성 동위원소로는, 예컨대 [^{125}I], [^{131}I], [^3H], [^{14}C] 등이 사용된다. 상기 효소로는, 안정하고 비활성(比活性)이 큰 것이 바람직하고, 예컨대 β -갈락토시다아제, β -글루코시다아제, 알칼리포스파타아제, 펄록시다아제, 말산탈수소효소 등이 사용된다. 형광물질로는, 예컨대 플루오레스카민, 플루오레센이소티오시아네이트 등이 사용된다. 발광물질로는, 예컨대 루미놀, 루미놀 유도체, 루시페린, 루시게닌 등이 사용된다. 또한, 항체 또는 항원과 표지제의 결합에 비오틴-아비딘계를 사용할 수도 있다.

항원 또는 항체의 불용화에 있어서는, 물리흡착을 사용해도 되고, 또한 통상 폴리펩티드 또는 효소 등을 불용화, 고정화 시키기에 사용되는 화학결합을 이용하는 방법이어도 된다. 담체로는, 아가로오스, 덱스트란, 셀룰로오스 등과 같은 불용성 다당류, 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 실리콘 등과 같은 합성수지 또는 유리 등을 들 수 있다.

샌드위치법에서는 불용화된 본 발명의 모노클로날 항체에 피검액을 반응시키고(1차 반응), 다시 표지화된 다른 본 발명의 모노클로날 항체를 반응시킨(2차 반응) 후, 불용화 담체 상의 표지제 활성을 측정함으로써 피검액 내의 본 발명의 폴리펩티드량을 정량할 수 있다. 1차 반응과 2차 반응은 반대 순서로 실시해도 되고, 또한 동시에 실시해도 되며 시간차를 두어 실시해도 된다. 표지화제 및 불용화 방법은 상기 이들에 준하여 실시할 수 있다. 또, 샌드위치법에 의한 면역 측정법에서 고상용 항체 또는 표지용 항체에 사용되는 항체는 반드시 1종류일 필요는 없고, 측정감도를 향상시키는 등의 목적에서 2종류 이상의 항체의 혼합물을 사용해도 된다.

본 발명의 샌드위치법에 의한 본 발명의 폴리펩티드 측정법에서는, 1차 반응과 2차 반응에 사용되는 본 발명의 모노클로날 항체는 본 발명의 폴리펩티드가 결합되는 부위가 상이한 항체가 바람직하게 사용된다. 즉, 1차 반응 및 2차 반응에 사용되는 항체는 예컨대 2차 반응에서 사용되는 항체가 본 발명의 폴리펩티드의 C 말단을 인식하는 경우, 1차 반응에서 사용되는 항체는 바람직하게는 C 말단 이외에, 예컨대 N 말단을 인식하는 항체가 사용된다.

본 발명의 모노클로날 항체를 샌드위치법 이외의 측정시스템, 예컨대 경합법, 면역 계량법 또는 네프로메트리 등에 사용할 수 있다.

경합법에서는, 피검액 내의 항원과 표지 항원을 항체에 대하여 경합적으로 반응시킨 후, 미반응 표지항원(F)과, 항체와 결합한 표지항원(B)을 분리하고(B/F 분리), B, F 중 어느 하나의 표지량을 측정하여 피검액 내의 항원량을 정량한다. 본 반응법에는 항체로서 가용성 항체를 사용하여 B/F 분리를 폴리에틸렌글리콜, 상기 항체에 대한 제 2 항체를 사용하는 액상법 및 제 1 항체로서 고상화 항체를 사용하거나 또는 제 1 항체는 가용성의 것을 사용하고 제 2 항체로서 고상화 항체를 사용하는 고상화법이 이용된다.

면역 계량법에서는, 피검액 내의 항원과 고상화 항원을 일정량의 표지화 항체에 대하여 경합 반응시킨 후, 고상과 액상을 분리하거나 또는 피검액 내의 항원과 과잉량의 표지화 항체를 반응시키고, 이어서 고상화 항원을 첨가하고 미반응 표지화 항체를 고상으로 결합시킨 후 고상과 액상을 분리한다. 이어서, 어느 하나의 상의 표지량을 측정하여 피검액 내의 항원량을 정량한다.

또, 네프로메트리에서는, 겔내 또는 용액 내에서 항원 항체반응의 결과 발생된 불용성 침강물의 양을 측정한다. 피검액 내의 항원량이 약간이며 소량의 침강물 밖에 수득되지 않는 경우에도 레이저 산란을 이용하는 레이저 네프로메트리 등이 바람직하게 사용된다.

이들 개개의 면역학적 측정법을 본 발명의 정량방법에 적용함에 있어서는, 특별한 조건, 조작 등의 설정은 필요하지 않게 된다. 각각의 방법에서의 통상 조건, 조작법에 당업자의 통상적인 기술적 배려를 가하여 본 발명의 폴리펩티드의 측정계를 구축하면 된다. 이들 일반적인 기술수단의 상세함에 대해서는, 총설, 도서 등을 참조할 수 있다.

예컨대, 이리에 히로시 편 「Radioimmuno assay」 (코우단사, 1974년 발행), 이리에 히로시 편 「Radioimmuno assay, 2nd edition」 (코우단사, 1979년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「효소면역 측정법」 (의학서원, 1978년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「효소면역 측정법」 (제2판) (의학서원, 1982년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「효소면역 측정법」 (제3판) (의학서원, 1987년 발행), 「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol.70 (Immunochemical Techniques (Part A)), 상기 문헌 Vol.73 (Immunochemical Techniques(Part B)), 상기 문헌 Vol.74 (Immunochemical Techniques(Part C)), 상기 문헌 Vol.84 (Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays)), 상기 문헌 Vol.92 (Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 상기 문헌 Vol.121 (Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (이상, Academic Press 발행) 등을 참조할 수 있다.

이상과 같이 하여 본 발명의 항체를 사용함으로써 본 발명의 폴리펩티드를 고감도로 정량할 수 있다.

또한, 본 발명의 항체를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 농도를 정량함으로써, 본 발명의 폴리펩티드 농도의 증대 또는 감소가 검출된 경우, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병일 가능성 또는 장래에 발병될 가능성이 높은 것으로 진단할 수 있다.

또, 본 발명의 항체는 체액이나 조직 등의 피검체 내에 존재하는 본 발명의 폴리펩티드를 검출하기 위하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 정제하기 위하여 사용하는 항체 칼럼의 제조, 정제시의 각 분획 중의 본 발명의 폴리펩티드 검출, 피검체포내에서의 본 발명의 폴리펩티드의 거동 분석 등을 위하여 사용할 수 있다.

(4) 유전자 진단제

본 발명의 DNA는 예컨대 프로브로서 사용함으로써, 온혈동물(예컨대, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 토끼, 닭, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 개, 원숭이 등)에서 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 mRNA의 이상(유전자 이상)을 검출할 수 있기 때문에, 예컨대 이 DNA 또는 mRNA의 손상, 돌연변이 또는 발현 저하나, 이 DNA 또는 mRNA의 증가 또는 발현 과다 등의 유전자 진단제로서 유용하다. 또, 면역체 매핑을 실시하여 유전병의 연구에도 이용할 수 있다.

본 발명의 DNA를 사용하는 상기 유전자 진단은 예컨대 자체 공지된 노던 하이브리다이제이션이나 PCR-SSCP법(Genomics, 5권, pp. 874-879 (1989년), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86권, pp. 2766-2770 (1989년)), DNA 마이크로어레이(Science, 270권, pp.467-470 (1995)) 등에 의해 실시할 수 있다.

예컨대, 노던 하이브리다이제이션, DNA 마이크로어레이에 의해 발현 저하가 검출된 경우 또는 PCR-SSCP법, DNA 마이크로어레이에 의해 DNA의 돌연변이가 검출된 경우에는, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환), 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병 등일 가능성이 높은 것으로 진단할 수 있다.

(5) 안티센스 DNA를 함유하는 의약

본 발명의 DNA에 상보적으로 결합하여 이 DNA의 발현을 억제할 수 있는 안티센스 DNA는, 생체 내에서 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 DNA의 기능을 억제할 수 있기 때문에, 예컨대 본 발명의 폴리펩티드의 발현 과다에서 기인되는 질병의 치료·예방제로서 사용할 수 있다.

상기 안티센스 DNA를 상기 치료·예방제로서 상기 본 발명의 DNA를 함유하는 각종 질병의 치료·예방제와 동일하게 하여 사용할 수 있다.

예컨대, 이 안티센스 DNA를 단독 또는 레트로 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 어소시에이티드 바이러스 벡터 등과 같은 적당한 벡터에 삽입한 후 통상적인 수단에 따라 실시할 수 있다. 이 안티센스 DNA는 그대로 또는 섭취 촉진을 위해 보조제 등의 생리학적으로 인정되는 담체와 함께 제제화하여 유전자 총이나 하이드로 겔 카테터와 같은 카테터에 의해 투여할 수 있다. 또는 에어로졸화시켜 흡입제로서 기관내에 국소 투여할 수도 있다.

이 안티센스 DNA의 투여량은 대상질환, 투여대상, 투여 경로 등에 따라 차이는 있지만, 예컨대 본 발명의 안티센스 DNA를 흡입제로서 기관 내에 국소 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 안티센스 DNA를 약 0.1 ~ 100mg 투여한다.

또한, 이 안티센스 DNA는 조직이나 세포에서 본 발명의 DNA 존재 여부 또는 그 발현 상황을 조사하기 위한 진단용 올리고뉴클레오티드 프로브로서 사용할 수도 있다.

(6) 본 발명의 항체를 함유하는 의약

본 발명의 폴리펩티드 활성을 중화시키는 작용을 갖는 본 발명의 항체는, 예컨대 본 발명의 폴리펩티드의 발현 과다에서 기인하는 질환의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다.

본 발명의 항체를 함유하는 상기 질환의 치료·예방제는 그대로 액제로서 또는 적당한 제형의 의약조성물로서 포유동물(예, 인간, 래트, 토끼, 양, 돼지, 소, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 경구적 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 투여량은 투여대상, 대상질환, 증상, 투여 경로 등에 따라서도 다르지만, 예컨대 본 발명의 항체를 1회량으로 통상 0.01 ~ 20mg/kg 체중 정도, 바람직하게는 0.1 ~ 10mg/kg 체중 정도, 더욱 바람직하게는 0.1 ~ 5mg/kg 체중 정도를, 1일 1 ~ 5회 정도, 바람직하게는 1일 1 ~ 3회 정도, 정맥주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 비경구 투여 및 경구 투여의 경우에도 이에 준하는 양을 투여할 수 있다. 증상이 특히 심한 경우에는 그 증상에 따라 증량해도 된다.

본 발명의 항체는 그 자체 또는 적당한 의약조성물로서 투여할 수 있다. 상기 투여에 사용되는 의약조성물은 상기 또는 그 염과 약리학적으로 허용될 수 있는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 것이다. 이러한 조성물은 경구 또는 비경구 투여에 적합한 제형으로서 제공된다.

즉, 예컨대 경구 투여를 위한 조성물로는, 고체 또는 액체의 제형, 구체적으로는 정제(당의정, 필름코팅정을 포함함), 환제, 과립제, 산제, 캡슐제(소프트캡슐제를 포함함), 시럽제, 유제, 현탁제 등을 들 수 있다. 이러한 조성물은 자체 공지 방법으로 제조되고, 제제 분야에서 통상 사용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 것이다. 예컨대, 정제용 담체, 부형제로는, 젓당, 전분, 자당, 스테아르산마그네슘 등이 사용된다.

비경구 투여를 위한 조성물로는, 예컨대 주사제, 좌제 등이 사용되고, 주사제는 정맥주사제, 피하주사제, 피내주사제, 근육주사제, 점적주사제 등과 같은 제형을 포함한다. 이러한 주사제는 자체 공지 방법에 따라 예컨대 상기 항체 또는 그 염을 통상 주사제에 사용되는 무균 수성 또는 유성액에 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 조제된다. 주사용 수성액으로는 예컨대 생리식염수, 포도당이나 기타 보조약을 포함한 등장액 등이 사용되고, 적당한 용해보조제, 예컨대 알콜(예, 에탄올), 폴리알콜(예, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜), 비이온 계면활성제(예, 폴리소르베이트80, HCO-50(polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil)) 등과 병용할 수도 있다. 유성액으로는 예컨대 올리브유, 참깨유, 대두유, 땅콩유, 면실유, 옥수수유 등과 같은 식물유, 프로필렌글리콜 등이 사용되고, 용해보조제로 벤조산

벤질, 벤질알콜 등을 병용할 수도 있다. 조제된 주사액은 통상 적당한 앰플에 충전된다. 직장 투여에 사용되는 좌제는 상기 항체 또는 그 염을 통상적인 좌약용 기제에 혼합함으로써 조제된다.

상기 경구용 또는 비경구용 의약조성물은 활성성분의 투여량에 적합한 투약 단위의 제형으로 조제되는 것이 바람직하다. 이러한 투약 단위의 제형으로는, 정제, 환제, 캡슐제, 주사제(앰플), 좌제 등이 예시되고, 각각의 투약 단위 제형당 통상 5 ~ 500mg 정도, 특히 주사제에서는, 5 ~ 100mg 정도, 기타 제형에서는 10 ~ 250mg 정도의 상기 항체가 함유되어 있는 것이 바람직하다.

또, 상기 각 조성물은 상기 항체와의 배합에 따라 바람직하지 않은 상호 작용을 발생시키지 않는 한 다른 활성성분을 함유할 수도 있다.

(7) DNA 전이동물

본 발명은 외인성인 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA(이하, 본 발명의 외인성 DNA (exogenous DNA) 라고 함) 또는 그 변이 DNA(본 발명의 외인성 변이 DNA라고 함)를 갖는 인간 이외의 포유동물을 제공한다.

즉, 본 발명은 (1) 본 발명의 외인성 DNA 또는 그 변이 DNA를 갖는 인간 이외의 포유동물, (2) 인간 이외의 포유동물이 설치류 동물인 제 (1) 에 기재된 동물, (3) 설치류 동물이 마우스 또는 래트인 제 (2) 에 기재된 동물 및 (4) 본 발명의 외인성 DNA 또는 그 변이 DNA를 함유하고 포유동물에서 발현될 수 있는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 외인성 DNA 또는 그 변이 DNA를 갖는 인간 이외의 포유동물(이하, 본 발명의 DNA 전이동물이라고 함)은, 미수정란, 수정란, 정자 및 그 원시세포를 포함하는 배아세포 등에 대하여, 바람직하게는 인간 이외의 포유동물의 발생에서 배 발생의 단계(더욱 바람직하게는 단세포 또는 수정란 세포의 단계이며 일반적으로 8 세포기 이전)에 인산칼슘법, 전기펄스법, 리포펙션법, 응집법, 마이크로 인젝션법, 파티클건법, DEAE-덱스트란법 등으로 목적하는 DNA를 전이함으로써 작출할 수 있다. 또한, 이 DNA 전이방법으로 체세포, 생체의 장기, 조직 세포 등에 목적하는 본 발명의 외인성 DNA를 전이하여 세포 배양, 조직 배양 등에 이용할 수도 있고, 또 이들 세포를 상기 기술한 배아세포와 자체 공지된 세포융합법으로 융합시킴으로써 본 발명의 DNA 전이동물을 작출할 수도 있다.

인간 이외의 포유동물로는, 예컨대 원숭이, 소, 돼지, 양, 염소, 토끼, 개, 고양이, 모르모트, 햄스터, 마우스, 래트 등이 사용된다. 그 중에서도 병체 동물 모델계의 작성 면에서 개체 발생 및 생물 사이클이 비교적 짧고, 또한 번식이 쉬운 설치류 동물, 특히 마우스(예컨대, 순수계로 C57BL/6 계통, DBA2 계통 등, 교배계로 B6C3F₁ 계통, BDF₁ 계통, B6D2F₁ 계통, BALB/C 계통, ICR 계통 등) 또는 래트 (예컨대 Wistar, SD 등) 등이 바람직하다.

포유동물에서 발현될 수 있는 재조합 벡터에서의 「포유동물」 로는 상기 인간 이외의 포유동물 이외에 인간 등을 들 수 있다.

본 발명의 외인성 DNA란 인간 이외의 포유동물이 본래 갖고 있는 본 발명의 DNA가 아니라 일단 포유동물로부터 단리 배출된 본 발명의 DNA를 말한다.

본 발명의 변이 DNA로는, 원래 본 발명의 DNA 염기서열에 변이(예컨대, 돌연변이 등)가 발생한 것, 구체적으로는 염기의 부가, 결손, 다른 염기로의 치환 등이 발생한 DNA 등이 사용되고, 또한 이상 DNA도 포함된다. 상기 이상 DNA로는 이상한 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 DNA를 의미하고, 예컨대 정상적인 본 발명의 폴리펩티드 기능을 억제하는 폴리펩티드를 발현시키는 DNA 등이 사용된다.

본 발명의 외인성 DNA는 대상 동물과 동종 또는 이종 중 어느 종의 포유동물 유래의 것이어도 된다. 본 발명의 DNA를 대상 동물에게 전이시킴에 있어서는, 상기 DNA를 동물세포에서 발현시킬 수 있는 프로모터 하류에 결합된 DNA 컨스

트럭트로서 사용하는 것이 일반적으로 유리하다. 예컨대, 본 발명의 인간 DNA를 전이시키는 경우, 이것과 상동성이 높은 본 발명의 DNA를 갖는 각종 포유동물(예컨대, 토끼, 개, 고양이, 모르모트, 햄스터, 래트, 마우스 등) 유래의 DNA를 발현시킬 수 있는 각종 프로모터 하류에 본 발명의 인간 DNA를 결합한 DNA 컨스트럭트(예, 벡터 등)를 대상 포유동물의 수정란, 예컨대 마우스 수정란에 마이크로인젝션함으로써 본 발명의 DNA를 고발현하는 DNA 전이 포유동물을 작출할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 발현 벡터로는, 대장균 (*E. coli*) 유래의 플라스미드, 고초균 (*Bacillus subtilis*) 유래의 플라스미드, 효모 유래의 플라스미드, λ 파지 등과 같은 박테리오파지, 모로니 백혈병 바이러스 등과 같은 레트로 바이러스, 백시니아 바이러스 또는 배쿨로 바이러스 등과 같은 동물 바이러스 등이 사용된다. 그 중에서도 대장균 유래의 플라스미드, 고초균 유래의 플라스미드 또는 효모 유래의 플라스미드 등이 바람직하게 사용된다.

상기 DNA 발현을 조절하는 프로모터로는, 예컨대 ①바이러스(예, 시미안 바이러스, 사이토메가로 바이러스, 모로니 백혈병 바이러스, JC 바이러스, 유방암 바이러스, 폴리오 바이러스 등)에서 유래하는 DNA의 프로모터, ②각종 포유동물(인간, 토끼, 개, 고양이, 모르모트, 햄스터, 래트, 마우스 등) 유래의 프로모터, 예컨대 알부민, 인슐린 II, 우로파라킨 II, 엘라스타아제, 에리트로포에틴, 엔도세린, 근(筋)크레아틴키나아제, 글리아선유성 산성 단백질, 글루타티온S-트랜스페라아제, 혈소판 유래 성장인자 β , 케라틴K1, K10 및 K14, 콜라겐 I 형 및 II 형, 사이클릭 AMP 의존 단백질 키나아제 β I 서브유닛, 디스트로핀, 타르타르산 저항성 알칼리 포스파타아제, 심방 나트륨 이뇨성 인자, 내피 리셉터 티로신 키나아제(일반적으로 Tie2 라고 함), 나트륨칼륨아데노신3인산화효소(Na, K - ATPase), 뉴로필라멘트 경쇄, 메탈로티오네인 I 및 II A, 메탈로프로티나아제 1조각 인히비터, MHC 클래스 I 항원(H - 2L), H - ras, 레닌, 도파민 β - 수산화효소, 갑상선과옥시다아제(TPO), 폴리펩티드사슬 연장인자1 α (EF - 1 α), β 액틴, α 및 β 미오신 중쇄, 미오신 경쇄 1 및 2, 미엘린 기초 단백질, 티로글로불린, Thy - 1, 면역 글로불린, H 사슬 가변부(VNP), 혈청 아밀로이드 P 컴포넌트, 미오글로빈, 트로포닌C, 평활근 α 액틴, 프리프로엔케파린A, 바소프레신 등과 같은 프로모터 등이 사용된다. 그 중에서도 전신에서 고발현할 수 있는 사이토메가로 바이러스 프로모터, 인간 폴리펩티드사슬 연장인자1 α (EF - 1 α)의 프로모터, 인간 및 닭 β 액틴프로모터 등이 바람직하다.

상기 벡터는 DNA 전이 포유동물에서 목적하는 메신저 RNA의 전사를 종결하는 서열(일반적으로 터미네이터라고 함)을 갖고 있는 것이 바람직하고, 예컨대 바이러스 유래 및 각종 포유동물 유래의 각 DNA 배열을 사용할 수 있고, 바람직하게는 시미안 바이러스의 SV40 터미네이터 등이 사용된다.

기타 목적하는 외인성 DNA를 더욱 고발현시키는 목적에서 각 DNA의 스프라이싱 시그널, 인헨서 영역, 진핵 DNA의 인트론의 일부 등을 프로모터 영역의 5' 상류, 프로모터 영역과 번역 영역 사이 또는 번역 영역의 3' 하류에 연결하는 것도 목적에 따라 가능하다.

이 번역 영역은 전이동물에서 발현될 수 있는 DNA 컨스트럭트로서 상기 프로모터 하류 및 원하는 바에 따라 전사종결 부위 상류에 연결시키는 통상적인 DNA 공학적 수법으로 제조할 수 있다.

수정란 세포단계에서 본 발명의 외인성 DNA 전이는 대상 포유동물의 배아세포 및 체세포 전체에 존재하도록 확보된다. DNA 전이 후의 작출동물의 배아세포에서 본 발명의 외인성 DNA가 존재하는 것은 작출동물의 후대가 모두 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 외인성 DNA를 유지하는 것을 의미한다. 본 발명의 외인성 DNA를 이어받은 이런 종류의 동물 자손은 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 외인성 DNA를 갖는다.

본 발명의 외인성 정상 DNA를 전이시킨 인간 이외의 포유동물은 교배로 외인성 DNA를 안정적으로 유지하는 것을 확인하고 이 DNA 보유동물로서 통상적인 사육환경에서 계대 사육할 수 있다.

수정란 세포단계에서 본 발명의 외인성 DNA 전이는 대상 포유동물의 배아세포 및 체세포 전체에 과잉되게 존재하도록 확보된다. DNA 전이 후의 작출동물의 배아세포에서 본 발명의 외인성 DNA가 과잉되게 존재하는 것은 작출동물의 자손이 모두 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 외인성 DNA를 과잉되게 갖는 것을 의미한다. 본 발명의 외인성 DNA를 이어받은 이런 종류의 동물 자손은 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 외인성 DNA를 과잉되게 갖는다.

도입 DNA를 상동 염색체 양쪽에 갖는 동형접합체 동물을 취득하여 이 암수동물을 교배함으로써, 모든 자손이 상기 DNA를 과잉되게 갖도록 번식 계대할 수 있다.

본 발명의 정상 DNA를 갖는 인간 이외의 포유동물은, 본 발명의 정상 DNA가 고발현되어 있어 내재성을 갖는 정상 DNA 기능을 촉진함으로써, 최종적으로 본 발명의 폴리펩티드 기능 항진증을 발증하기 때문에 그 병태 모델 동물로서 이용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 정상 DNA 전이동물을 사용하고, 본 발명의 폴리펩티드 기능 항진증이나 본 발명의 폴리펩티드가 관련된 질환의 병태 기서의 해명 및 이들 질환의 치료 방법을 검토할 수 있다.

또한, 본 발명의 외인성 정상 DNA를 전이시킨 포유동물은 유리된 본 발명의 폴리펩티드의 증가 증상을 갖고 있기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드에 관련된 질환에 대한 치료약의 스크리닝 시험에도 이용 가능하다.

한편, 본 발명의 외인성 이상 DNA를 갖는 인간 이외의 포유동물은 교배에 의해 외인성 DNA를 안정적으로 유지하는 것을 확인하고 이 DNA 보유동물로서 통상적인 사육 환경에서 계대 사육할 수 있다. 또한, 목적하는 외인성 DNA를 상기 기술한 플라스미드에 조합하여 원료로써 사용할 수 있다. 프로모터와의 DNA 컨스트럭트는 통상적인 DNA 공학적 수법으로 제조할 수 있다. 수정란 세포 단계에서 본 발명의 이상 DNA 전이는 대상 포유동물의 배아세포 및 체세포 전체에 존재하도록 확보된다. DNA 전이 후의 작출동물의 배아세포에서 본 발명의 이상 DNA가 존재하는 것은, 작출동물의 자손이 모두 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 이상 DNA를 갖는 것을 의미한다. 본 발명의 외인성 DNA를 이어받은 이런 종류의 동물 자손은 그 배아세포 및 체세포 전체에 본 발명의 이상 DNA를 갖는다. 도입 DNA를 상동 염색체 양쪽에 갖는 동형접합체 동물을 취득하여 이 암수 동물을 교배함으로써, 모든 자손이 이 DNA를 갖도록 번식 계대할 수 있다.

본 발명의 이상 DNA를 갖는 인간 이외의 포유동물은, 본 발명의 이상 DNA가 고발현되어 있어 내재성을 갖는 정상 DNA의 기능을 저해함으로써, 최종적으로 본 발명의 폴리펩티드 기능 불활성형 불응증이 되는 경우가 있어 그 병태 모델 동물로서 이용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 이상 DNA 전이동물을 사용하고, 본 발명의 폴리펩티드 기능 불활성형 불응증의 병태 기서의 해명 및 이 질환의 치료 방법을 검토할 수 있다.

또, 구체적인 이용 가능성으로는, 본 발명의 이상 DNA 고발현동물은 본 발명의 폴리펩티드 기능 불활성형 불응증에 있어서의 본 발명의 이상 폴리펩티드에 의한 정상 폴리펩티드의 기능 저해(dominant negative 작용)를 해명하는 모델이 된다.

또한, 본 발명의 외래 이상 DNA를 전이시킨 포유동물은 유리된 본 발명의 폴리펩티드 증가 증상을 갖고 있기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드 기능 불활성형 불응증에 대한 치료약 스크리닝 시험에도 이용 가능하다.

그리고, 상기 2 종류의 본 발명의 DNA 전이동물의 기타 이용 가능성으로, 예컨대

- ①조직 배양을 위한 세포원으로서의 사용,
- ②본 발명의 DNA 전이동물의 조직 중의 DNA 또는 RNA를 직접 분석하거나 또는 DNA에 의해 발현된 폴리펩티드 조직을 분석하는 것에 의한 본 발명의 폴리펩티드에 의해 특이적으로 발현 또는 활성화시키는 폴리펩티드와의 관련성에 대한 해석,
- ③DNA를 갖는 조직 세포를 표준 조직 배양기술로 배양하고, 이것들을 사용하여 일반적으로 배양하기 어려운 조직으로부터의 세포 기능의 연구,
- ④상기 ③에 기재된 세포를 사용하는 것에 의한 세포 기능을 높이는 약제의 스크리닝 및
- ⑤본 발명의 변이 폴리펩티드의 단리 정제 및 그 항체 제조 등을 생각할 수 있다.

또, 본 발명의 DNA 전이동물을 사용하며 본 발명의 폴리펩티드의 기능 불활성형 불응증 등을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드에 관련된 질환의 임상증상을 조사할 수 있고, 또한 본 발명의 폴리펩티드에 관련된 질환 모델의 각 장기에서의 보다 상세한 병리학적 소견을 얻을 수 있고, 새로운 치료 방법의 개발, 그리고 이 질환에 의한 2차적 질환의 연구 및 치료에 공헌할 수 있다.

또한, 본 발명의 DNA 전이동물로부터 각 장기를 꺼내어 가늘게 자른 후, 트립신 등의 폴리펩티드(단백질) 분해효소에 의해 유리된 DNA 전이세포의 취득, 그 배양 또는 그 배양세포의 계통화를 실시할 수 있다. 또, 본 발명의 폴리펩티드 생산세포의 특정화, 아포토시스 (apoptosis), 분화 또는 증식과의 관련성 또는 이들의 시그널 전달기구를 조사하여 이들의 이상을 조사할 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드 및 그 작용해명을 위한 유효한 연구 재료가 된다.

그리고, 본 발명의 DNA 전이동물을 사용하며 본 발명의 폴리펩티드의 기능 불활성형 불응증을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드에 관련된 질환의 치료약 개발을 실행하기 위해서, 상기 기술한 검사법 및 정량법 등으로 유효하고 신속한 상기 질환 치료약의 스크리닝법을 제공할 수 있게 된다. 또한, 본 발명의 DNA 전이동물 또는 본 발명의 외인성 DNA 발현 벡터를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드가 관련된 질환의 DNA 치료법을 검토, 개발할 수 있다.

(9) 노크아웃 (knockout) 동물

본 발명은 본 발명의 DNA가 불활성화된 인간 이외의 포유동물 배간세포 및 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물을 제공한다.

즉, 본 발명은

- (1) 본 발명의 DNA가 불활성화된 인간 이외의 포유동물 배간세포,
- (2) 이 DNA가 리포터 유전자(예, 대장균 유래의 β - 갈락토시다아제 유전자)를 도입함으로써 불활성화된 제(1) 항에 기재된 배간세포,
- (3) 네오마이신 내성인 제 (1) 항에 기재된 배간세포,
- (4) 인간 이외의 포유동물이 설치류 동물인 제 (1) 항에 기재된 배간세포,
- (5) 설치류 동물이 마우스인 제 (4) 항에 기재된 배간세포,
- (6) 본 발명의 DNA가 불활성화된 상기 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물,
- (7) 이 DNA가 리포터 유전자(예, 대장균 유래의 β - 갈락토시다아제 유전자)를 도입함으로써 불활성화되고, 상기 리포터 유전자가 본 발명의 DNA에 대한 프로모터의 제어 하에서 발현될 수 있는 제 (6) 항에 기재된 인간 이외의 포유동물,
- (8) 인간 이외의 포유동물이 설치류 동물인 제 (6) 항에 기재된 인간 이외의 포유동물,
- (9) 설치류 동물이 마우스인 제 (8) 항에 기재된 인간 이외의 포유동물 및,
- (10) 제 (7) 항에 기재된 동물에게 시험화합물을 투여하고 리포터 유전자의 발현을 검출하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 DNA가 불활성화된 인간 이외의 포유동물 배간세포란 이 인간 이외의 포유동물이 갖는 본 발명의 DNA에 인위적으로 변이를 가함으로써, 이 DNA의 발현능을 억제하거나 이 DNA가 코딩되어 있는 본 발명의 폴리펩티드 활성을 실질적으로 상실시킴으로써, DNA가 실질적으로 본 발명의 폴리펩티드의 발현능을 갖지 않는(이하, 본 발명의 노크아웃 DNA라고 함) 인간 이외의 포유동물의 배간세포(이하, ES 세포라고 함)를 말한다.

인간 이외의 포유동물로는 상기와 동일한 것이 사용된다.

본 발명의 DNA에 인위적으로 변이를 가하는 방법으로는 예컨대 유전자 공학적 수법으로 이 DNA 배열의 일부 또는 전부의 삭제, 다른 DNA를 삽입 또는 치환시킴으로써 실시할 수 있다. 이들의 변이에 따라 예컨대 코돈의 판독구조를 어긋나게 하거나 프로모터 또는 엑손 기능을 파괴함으로써 본 발명의 노크아웃 DNA를 제조하면 된다.

본 발명의 DNA가 불활성화된 인간 이외의 포유동물 배간세포(이하, 본 발명의 DNA 불활성화 ES 세포 또는 본 발명의 노크아웃 ES 세포라고 함)의 구체예로는, 예컨대 목적하는 인간 이외의 포유동물이 갖는 본 발명의 DNA를 단리하고 그 엑손 부분에 네오마이신 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자를 대표로 하는 약제 내성 유전자 또는 lacZ (β -갈락토시다아제 유전자), cat(클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제 유전자)를 대표로 하는 리포터 유전자 등을 삽입함으로써, 엑손 기능을 파괴하거나 또는 엑손 사이의 인트론 부분에 유전자의 전사를 종결시키는 DNA 배열(예컨대, polyA 부가 시그널 등)을 삽입하고 완전한 메신저 RNA를 합성할 수 없게 함으로써, 결과적으로 유전자를 파괴하도록 구축된 DNA 배열을 갖는 DNA 사슬(이하, 타깃팅 벡터라고 함)을, 예컨대 상동 재조합법으로 이 동물의 염색체로 도입하며, 수득된 ES 세포에 대해서 본 발명의 DNA 상 또는 그 근방의 DNA 배열을 프로브로 한 서던 하이브리다이제이션 해석 또는 타깃팅 벡터 상의 DNA 배열과 타깃팅 벡터 제조에 사용된 본 발명의 DNA 이외의 근방영역의 DNA 배열을 프라이머로 한 PCR 법으로 해석하고, 본 발명의 노크아웃 ES 세포를 선별함으로써 수득할 수 있다.

또, 상동 재조합법 등으로 본 발명의 DNA를 불활성화시키는 원래의 ES 세포로는, 예컨대 상기 기술한 바와 같은 이미 수립한 것을 사용해도 되고, 또한 공지된 Evans와 Kaufman의 방법에 준하여 새롭게 수립한 것이어도 된다. 예컨대, 마우스의 ES 세포의 경우 현재 일반적으로는 129계의 ES 세포가 사용되고 있으나, 면역학적 배경이 확실하지 않기 때문에, 이를 대신하는 순수계에서 면역학적으로 유전적 배경이 명확한 ES 세포를 취득하는 등의 목적에서, 예컨대 C57BL/6 마우스나 C57BL/6의 채란 수의 적음을, DBA/2와의 교배에 의해 개선된 BDF₁ 마우스(C57BL/6 및 DBA/2의 F₁ 사이의 하이브리드)를 사용하여 수립한 것 등도 양호하게 사용할 수 있다. BDF₁ 마우스는 채란 수가 많으면서 난이 건강하다는 이점에 추가로 C57BL/6 마우스를 배경으로 하고 있어 이것을 사용하여 수득된 ES 세포는 병태 모델 마우스를 작출하였을 때에, C57BL/6 마우스와 복귀 교배(백 크로스)함으로써 그 유전적 배경을 C57BL/6 마우스에 대신할 수 있다는 면에서 유리하게 사용할 수 있다.

또, ES 세포를 수립하는 경우 일반적으로는 수정 후 3.5일째의 배반포를 사용하지만, 그 이외에 8 세포기 배를 채란하고 배반포까지 배양하여 사용함으로써 효율적으로 다수의 초기 배를 취득할 수 있다.

또한, 암수 어느 한쪽의 ES 세포를 사용할 수도 있으나, 통상 수컷 ES 세포가 생식계열 키메라를 작출하기에 편리하다. 또, 번잡한 배양에 드는 수고를 삭감하기 위해서도 될 수 있으면 빨리 암수 판별을 하는 것이 바람직하다.

ES 세포의 암수 판정방법으로는 예컨대 PCR 법으로 Y 염색체 상의 성 결정영역의 유전자를 증폭, 검출하는 방법을 그 일례로 들 수 있다. 이 방법을 사용하면 종래 핵형 분석을 하는 데에 약 10^6 개의 세포 수를 필요로 한 반면에, 1 콜로니 정도의 ES 세포 수(약 50개)이면 충분하기 때문에 배양 초기의 ES 세포의 제 1차 선택을 암수 판별로 할 수 있고, 조기에 수컷 세포의 선정을 가능하게 함으로써 배양 초기의 수고는 대폭 삭감할 수 있다.

또, 제 2 차 선택으로는 예컨대 G-밴딩법에 따른 염색체 수의 확인 등으로 실시할 수 있다. 수득되는 ES 세포의 염색체 수는 정상수의 100%가 바람직하지만, 수립시의 물리적 조작 등의 관계상 어려운 경우에는 ES 세포의 유전자를 노크아웃한 후, 정상 세포(예컨대, 마우스는 염색체 수가 $2n=40$ 인 세포)에 다시 클로닝하는 것이 바람직하다.

이렇게 해서 수득된 배간세포주는 통상 그 증식성은 매우 좋지만, 개체 발생할 수 있는 능력을 잃기 쉽기 때문에 주의깊게 계대 배양하는 것이 필요하다. 예컨대, STO 섬유아세포와 같은 피더 세포 상에서 LIF(1 - 10000U/ml) 존재 하에 탄산가스 배양기 내(바람직하게는 약 5% 탄산가스, 약 95% 공기 또는 약 5% 산소, 약 5% 탄산가스, 약 90% 공기)에서 약 37°C에서 배양하는 등의 방법으로 배양하고, 계대시에는 예컨대 트립신/EDTA 용액(통상 약 0.001 - 0.5% 트립신/약 0.1 - 5mM EDTA, 바람직하게는 약 0.1% 트립신/약 1mM EDTA) 처리로 단세포화시키고, 새로 준비한 피더

세포 상에 파종하는 방법 등을 들 수 있다. 이와 같은 계대는 통상 1-3일마다 행하지만, 이 때에 세포를 관찰하여 형태적으로 이상한 세포가 발견된 경우에는 그 배양세포는 포기하는 것이 요구된다.

ES 세포는 적당한 조건에 의해 고밀도에 이를 때까지 단층 배양하거나 또는 세포 집괴를 형성할 때까지 부유 배양함으로써, 두정근, 내장근, 심근 등과 같은 여러 타입 세포로 분화시키는 것이 가능하고 [M. J. Evans 및 M. H. Kaufman, Nature 292권, p154, 1981년; G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78권, p7634, 1981년; T. C. Doetschman 외, J. Embryology and Experimental Morphology, 87권, p27, 1985년], 본 발명의 ES 세포를 분화시켜 수득되는 본 발명의 DNA 발현 부전 세포는 생체외에서의 본 발명의 폴리펩티드의 세포생물학적 검토에서 유용하다.

본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물은 이 동물의 mRNA 량을 공지 방법으로 측정하여 간접적으로 그 발현량을 비교함으로써 정상 동물과 구별할 수 있다.

상기 인간 이외의 포유동물로는 상기와 동일한 것이 사용된다.

본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물은 예컨대 상기 기술한 바와 같이 하여 제조된 타깃팅 벡터를 마우스 배간세포 또는 마우스 난세포에 도입하고, 도입에 의해 타깃팅 벡터의 본 발명의 DNA가 불활성화된 DNA 배열이 유전자 상동 재조합에 의해 마우스 배간세포 또는 마우스 난세포의 염색체 상의 본 발명의 DNA와 교체되는 상동 재조합을 시킴으로써 본 발명의 DNA를 노크아웃시킬 수 있다.

본 발명의 DNA가 노크아웃된 세포는, 본 발명의 DNA 상 또는 그 근방의 DNA 배열을 프로브로 한 서던 하이브리다이제이션 해석 또는 타깃팅 벡터 상의 DNA 배열과, 타깃팅 벡터에 사용한 마우스 유래의 본 발명의 DNA 이외의 근방 영역의 DNA 배열을 프라이머로 한 PCR 법에 따른 해석으로 판정할 수 있다. 인간 이외의 포유동물 배간세포를 사용한 경우에는, 유전자 상동 재조합에 의해 본 발명의 DNA가 불활성화된 세포주를 클로닝하여 이 세포를 적당한 시기, 예컨대 8 세포기의 인간 이외의 포유동물 배 또는 배반포에 주입하여 제조된 키메라 배를 위임시킨 이 인간 이외의 포유동물의 자궁에 이식한다. 작출된 동물은 정상적인 본 발명의 DNA 자리를 갖는 세포와 인위적으로 변이된 본 발명의 DNA 자리를 갖는 세포 둘로 구성된 키메라 동물이다.

상기 키메라 동물의 생식세포의 일부가 변이된 본 발명의 DNA 자리를 갖는 경우, 이러한 키메라 개체와 정상 개체를 교배함으로써 수득된 개체군에서 모든 조직이 인위적으로 변이를 가한 본 발명의 DNA 자리를 갖는 세포로 구성된 개체를, 예컨대 코트컬러의 판정 등으로 선별함으로써 수득된다. 이렇게 해서 수득된 개체는 통상 본 발명의 폴리펩티드의 헤테로 발현 부전 개체로서, 본 발명의 폴리펩티드의 헤테로 발현 부전 개체끼리를 교배하고 이들의 자손으로부터 본 발명의 폴리펩티드의 호모 발현 부전 개체를 수득할 수 있다.

난세포를 사용하는 경우에는 예컨대 난세포 핵 내에 마이크로 인젝션법으로 DNA 용액을 주입함으로써 타깃팅 벡터를 염색체 내로 도입한 트랜스제닉 인간 이외의 포유동물을 수득할 수 있고, 이들 트랜스제닉 인간 이외의 포유동물에 비하여 유전자 상동 재조합에 의해 본 발명의 DNA 자리에 변이가 있는 것을 선택함으로써 수득된다.

이렇게 해서 본 발명의 DNA가 노크아웃되어 있는 개체는, 교배에 의해 수득된 동물 개체도 이 DNA가 노크아웃되어 있음을 확인하고 통상적인 사육환경에서 사육 계대를 행할 수 있다.

또한, 생식계열의 취득 및 유지에 대해서도 통상적인 방법에 따르면 된다. 즉, 이 불활성 DNA가 보유하는 암수 동물을 교배함으로써 이 불활성화 DNA를 상동 염색체 양쪽에 갖는 동형접합체 동물을 취득할 수 있다. 수득된 동형접합체 동

물은 모친동물에 대하여 정상 개체 하나, 동형접합체 둘 이상이 되는 상태에서 사육함으로써 효율적으로 얻을 수 있다. 헤테로자이고트 동물의 암수를 교배함으로써 상기 불활성화 DNA를 갖는 동형접합체 및 헤테로자이고트 동물을 번식 계대한다.

본 발명의 DNA가 불활성화된, 인간 이외의 포유동물 배간세포는 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물을 작출하는 데에 매우 유용하다.

또한, 본 발명의 DNA 발현 부전의, 인간 이외의 포유동물은 본 발명의 폴리펩티드에 의해 유도될 수 있는 각종 생물활성을 결실하기 때문에, 본 발명의 폴리펩티드의 생물활성의 불활성화를 원인으로 하는 질병 모델이 될 수 있어 이들 질병의 원인 규명 및 치료법 검토에 유용하다.

(8a) 본 발명의 DNA의 결손 또는 손상 등에서 기인되는 질병에 대하여 치료·예방 효과를 갖는 화합물의 스크리닝 방법

본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물은 본 발명의 DNA의 결손 또는 손상 등에서 기인되는 질병(탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 앨러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등에 대하여 치료·예방 효과를 갖는 화합물의 스크리닝에 사용할 수 있다.

즉, 본 발명은 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물에게 시험화합물을 투여하고 그 동물의 변화를 관찰·측정하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 DNA의 결손 또는 손상 등에서 기인되는 질병에 대하여 치료·예방 효과를 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 제공한다.

이 스크리닝 방법에서 사용되는 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물로는 상기와 동일한 것을 들 수 있다.

시험화합물로는, 예컨대 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성화합물, 발효생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액, 혈장 등을 들 수 있고, 이들 화합물은 신규 화합물이거나 공지 화합물일 수도 있다.

구체적으로는 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물을 시험화합물로 처리하고, 처리되지 않은 대조 동물과 비교하여, 이 동물의 각 기관, 조직, 질병의 증상 등과 같은 변화를 지표로 하여 시험화합물의 치료·예방 효과를 시험할 수 있다.

시험동물을 시험화합물로 처리하는 방법으로는 예컨대 경구 투여, 정맥 주사 등이 사용되고, 시험동물의 증상, 시험화합물의 성질 등에 맞춰 적절하게 선택할 수 있다. 또한, 시험화합물의 투여량은 투여방법, 시험화합물의 성질 등에 맞춰 적절하게 선택할 수 있다.

예컨대, 췌장 기능 장애에 대하여 치료·예방 효과를 갖는 화합물을 스크리닝하는 경우, 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물에게 당 부하 처치를 실시하는데, 당 부하 처리 전 또는 처리 후에 시험화합물을 투여하고 이 동물의 혈당치 및 체중 변화 등을 시간 경과에 따라 측정한다.

본 발명의 스크리닝 방법으로 수득되는 화합물은 상기 시험화합물에서 선택된 화합물로, 본 발명의 폴리펩티드의 결손이나 손상 등에 의해 야기되는 질환(탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등),

동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애에 대하여 치료·예방 효과를 가지기 때문에, 이 질환에 대한 안전하고 저독성의 치료·예방제 등의 의약으로 사용할 수 있다. 또한, 상기 스크리닝으로 수득된 화합물에서 유도되는 화합물도 동일하게 사용할 수 있다.

이 스크리닝 방법으로 수득된 화합물은 염을 형성해도 되고, 이 화합물의 염으로는 생리학적으로 허용되는 산(예, 무기산, 유기산)이나 염기(예, 알칼리금속)등과의 염이 사용되고, 특히 생리학적으로 허용되는 산 부가염이 바람직하다. 이와 같은 염으로는, 예컨대 무기산(예컨대, 염산, 인산, 브롬화수소산, 황산)과의 염 또는 유기산(예컨대, 아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸말산, 말레산, 숙신산, 타르타르산, 시트르산, 말산, 옥살산, 벤조산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산)과의 염 등이 사용된다.

상기 스크리닝 방법으로 수득된 화합물 또는 그 염을 함유하는 의약은 상기 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 의약과 동일한 방법으로 제조할 수 있다.

이렇게 해서 수득되는 제제는 안전하고 저독성이므로, 예컨대 포유동물(예컨대, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 토끼, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 투여할 수 있다.

이 화합물 또는 그 염의 투여량은 대상질환, 투여대상, 투여 경로 등에 따라 차이는 있지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등의 치료 목적에서 이 화합물을 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 화합물을 약 0.01 1000mg, 바람직하게는 약 0.1 1000mg, 더 바람직하게는 약 1.0 200mg, 보다 바람직하게는 약 1.0 50mg 투여한다. 비경구적으로 투여하는 경우에는, 이 화합물의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환 등에 따라서도 다르지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등의 치료 목적에서 이 화합물을 주사제 형태로 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 화합물을 약 0.01 30mg 정도, 바람직하게는 약 0.1 20mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 10mg 정도를 정맥 주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

(8b) 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물을 스크리닝하는 방법

본 발명은 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물에게 시험화합물을 투여하고 리포터 유전자의 발현을 검출하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 스크리닝 방법에서 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물로는, 상기 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물 중에서도 본 발명의 DNA가 리포터 유전자를 도입함으로써 불활성화되고, 이 리포터 유전자가 본 발명의 DNA에 대한 프로모터의 제어 하에서 발현될 수 있는 것이 사용된다. 시험화합물로는 상기과 동일한 것을 들 수 있다. 리포터 유전자로는 상기과 동일한 것이 사용되고, β - 갈락토시다아제 유전자(lacZ), 가용성 알칼리포스파타아제 유전자 또는 루시페라아제 유전자 등이 바람직하다.

본 발명의 DNA를 리포터 유전자로 치환된 본 발명의 DNA 발현 부전 인간 이외의 포유동물에서는, 리포터 유전자가 본 발명의 DNA에 대한 프로모터의 지배하에 존재하기 때문에, 리포터 유전자가 코딩되는 물질의 발현을 추적함으로써 프로모터 활성을 검출할 수 있다.

예컨대, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 영역의 일부를 대장균 유래의 β - 갈락토시다아제 유전자(lacZ)로 치환하는 경우, 본래 본 발명의 폴리펩티드가 발현되는 조직에서 본 발명의 폴리펩티드 대신에 β - 갈락토시다아제가 발현된다. 따라서, 예컨대 5 - 브로모 - 4 - 클로로 - 3 - 인돌릴 - β - D - 갈락토피라노시드(X - gal)와 같은 β - 갈락토시다아제의 기질이 되는 시약을 사용하여 염색함으로써, 간편하게 본 발명의 폴리펩티드의 동물 생체 내의 발현 상태를 관찰할 수 있다. 구체적으로는 본 발명의 폴리펩티드 결손 마우스 또는 그 조직 절편을 글루탈알데히드 등으로 고정시키고 인산완충 생리식염액(PBS)으로 세정한 후, X - gal을 함유하는 염색액으로 실온 또는 37°C 부근에서 약 30분 내지 1시간 반응시킨 후, 조직 표본을 1mM EDTA/PBS 용액으로 세정함으로써 β - 갈락토시다아제 반응을 정지시키고 나타난 색을 관찰하면 된다. 또한, 통상적인 방법에 따라 lacZ를 코딩하는 mRNA를 검출해도 된다.

상기 스크리닝 방법으로 수득되는 화합물 또는 그 염은 상기 시험화합물에서 선택된 화합물로, 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물이다.

상기 스크리닝 방법으로 수득된 화합물은 염을 형성해도 되고, 이 화합물의 염으로는 생리학적으로 허용되는 산(예, 무기산)이나 염기(예, 유기산) 등과의 염이 사용되고, 특히 생리학적으로 허용되는 산 부가염이 바람직하다. 이러한 염으로는 예컨대 무기산(예컨대, 염산, 인산, 브롬화수소산, 황산)과의 염 또는 유기산(예컨대, 아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸말산, 말레산, 숙신산, 타르타르산, 시트르산, 말산, 옥살산, 벤조산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산)과의 염 등이 사용된다.

본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하는 화합물 또는 그 염은 본 발명의 폴리펩티드 발현을 촉진하고 이 폴리펩티드의 기능을 촉진할 수 있기 때문에, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등의 질병에 대한 안전하고 저독성의 치료·예방제 등의 의약으로 유용하다.

또한, 상기 스크리닝으로 수득된 화합물에서 유도되는 화합물도 동일하게 사용할 수 있다.

이 스크리닝 방법으로 수득된 화합물 또는 그 염을 함유하는 의약은 상기 본 발명의 폴리펩티드 또는 그 염을 함유하는 의약과 동일한 방법으로 제조할 수 있다.

이렇게 해서 수득되는 제제는 안전하고 저독성이므로, 예컨대 포유동물(예컨대 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 토끼, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 투여할 수 있다.

이 화합물 또는 그 염의 투여량은 대상질환, 투여대상, 투여 경로 등에 따라 차이는 있지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등의 치료 목적에서 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하는 화합물을 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 1000mg, 바람직하게는 약 0.1 ~ 1000mg, 더 바람직하게는 약 1.0 ~ 200mg, 보다 바람직하게는 약 1.0 ~ 50mg 투여한다. 비경구적으로 투여하는 경우에는, 이 화합물의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환 등에 따라서도 다르지만, 예컨대 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병, 비만증 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 동맥경화, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환(예컨대, 알러지, 염증, 자기면역질환 등), 혈관신생 장애 등의 치료 목적에서 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 촉진하는 화합물을 주사

제 형태로 통상 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 30mg 정도, 바람직하게는 약 0.1 ~ 20mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 ~ 10mg 정도를 정맥 주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

한편, 예컨대 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 저해하는 화합물을 경구 투여하는 경우, 일반적으로 성인(체중 60kg)에게는 하루에 이 화합물을 약 0.1 ~ 1000mg, 바람직하게는 약 0.1 ~ 200mg, 보다 바람직하게는 약 1.0 ~ 50mg 투여한다. 비경구적으로 투여하는 경우에는, 이 화합물의 1회 투여량은 투여대상, 대상질환 등에 따라서도 다르지만, 본 발명의 DNA에 대한 프로모터 활성을 저해하는 화합물을 주사제 형태로 통상 성인(60kg)에게 투여하는 경우, 하루에 이 화합물을 약 0.01 ~ 30mg 정도, 바람직하게는 약 0.1 ~ 20mg 정도, 보다 바람직하게는 약 0.1 ~ 10mg 정도를 정맥 주사로 투여하는 것이 바람직하다. 다른 동물의 경우에도 60kg당으로 환산한 양을 투여할 수 있다.

본 명세서 및 도면에서 염기나 아미노산 등을 약칭으로 표시하는 경우 IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature 에 의한 약칭 또는 당해 분야에서 관용되는 약칭에 의거한 것으로, 그 예를 다음과 같이 기재한다. 또, 아미노산에 관하여 광학이성체가 있을 수 있는 경우에는 특별히 명시하지 않으면 L체를 나타내는 것으로 한다.

DNA: 디옥시리보핵산

cDNA: 상보적 디옥시리보핵산

A: 아데닌

T: 티민

G: 구아닌

C: 시토신

RNA: 리보핵산

mRNA: 메신저리보핵산

dATP: 디옥시아데노신3인산

dTTP: 디옥시티미딘3인산

dGTP: 디옥시구아노신3인산

dCTP: 디옥시시티딘3인산

ATP: 아데노신3인산

EDTA: 에틸렌디아민4아세트산

SDS: 도데실황산나트륨

Gly 또는 G: 글리신

Ala 또는 A: 알라닌

Val 또는 V: 발린

Leu 또는 L: 류신

Ile 또는 I: 이소류신

Ser 또는 S: 세린

Thr 또는 T: 트레오닌

Cys 또는 C: 시스테인

Met 또는 M: 메티오닌

Glu 또는 E: 글루타민산

Asp 또는 D: 아스파라긴산

Lys 또는 K: 리신

Arg 또는 R: 아르기닌

His 또는 H: 히스티딘

Phe 또는 F: 페닐알라닌

Tyr 또는 Y: 티로신

Trp 또는 W: 트립토판

Pro 또는 P: 프롤린

Asn 또는 N: 아스파라긴

Gln 또는 Q: 글루타민

pGlu: 피로글루타민산

Hse: 호모세린

또한, 본 명세서 중에서 자주 사용되는 치환기, 보호기 및 시약을 다음과 같은 기호로 표기한다.

Me: 메틸기

Et: 에틸기

Bu: 부틸기

Ph: 페닐기

TC: 티아졸리딘 - 4(R) - 카르복사미드기

Tos: p - 톨루엔술포닐

CHO: 포르밀

Bzl: 벤질

Cl₂ - Bzl : 2,6 - 디클로로벤질

Bom: 벤질옥시메틸

Z: 벤질옥시카르보닐

Cl - Z: 2 - 클로로벤질옥시카르보닐

Br - Z: 2 - 브로모벤질옥시카르보닐

Boc: t - 부톡시카르보닐

DNP: 디니트로페닐

Trt: 트리틸

Bom: t - 부톡시메틸

Fmoc: N - 9 - 플루오레닐메톡시카르보닐

HOBt: 1 - 히드록시벤조트리아졸

HOObt: 3,4 - 디히드로 - 3 - 히드록시 - 4 - 옥소 - 1,2,3 - 벤조트리아진

HONB: 1 - 히드록시 - 5 - 노르보르넨 - 2,3 - 디카르복시이미드

DCC: N,N' - 디시클로헥실카르보디이미드

본원 명세서의 서열표의 서열번호는 다음과 같은 서열을 나타낸다.

[서열번호:1]

실시에 1에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:2]

실시에 1 및 실시에 3에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:3]

본 발명의 신규 단백질 전구체(인간형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:4]

실시예 1 및 실시예 2에서 판명된 본 발명의 신규 단백질 전구체(인간형)를 코딩하는 cDNA 단편의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:5]

실시예 2 및 실시예 4에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:6]

실시예 4에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:7]

신규 폴리펩티드의 A 사슬(인간형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:8]

신규 폴리펩티드의 B 사슬(인간형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:9]

실시예 2에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:10]

실시예 2에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:11]

실시예 2에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:12]

실시예 3에서 사용된 본 발명의 신규 단백질 전구체(인간형)를 코딩하는 cDNA 단편 중의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:13]

실시예 3에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:14]

실시예 3에서 사용된 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:15]

A 사슬(인간형)을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:16]

B 사슬(인간형)을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:17]

본 발명의 신규 단백질 전구체(랫형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:18]

서열번호:17로 표시되는 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:19]

A 사슬(랫형, 마우스형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:20]

A 사슬(랫형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:21]

B 사슬(랫형, 마우스형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:22]

B 사슬(랫형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:23]

본 발명의 신규 단백질 전구체(마우스형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:24]

서열번호:23으로 표시되는 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:25]

A 사슬(마우스형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:26]

B 사슬(마우스형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:27]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R1의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:28]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R2의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:29]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 L1의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:30]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R8의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:31]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R9의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:32]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R6의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:33]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 R7의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:34]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 U1의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:35]

후술하는 실시예 5에서 사용된 프라이머 U2의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:36]

후술하는 실시예 6, 7에서 사용된 프라이머 UP의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:37]

후술하는 실시예 6에서 사용된 프라이머 RL의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:38]

후술하는 실시예 7에서 사용된 프라이머 ML의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:39]

후술하는 실시예 6에서 수득된 래트 ORF를 함유하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:40]

후술하는 실시예 7에서 수득된 마우스 ORF를 함유하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:41]

후술하는 실시예 5에서 밝혀진 래트형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 1 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:42]

후술하는 실시예 5에서 밝혀진 래트형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 2 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:43]

후술하는 실시예 5에서 밝혀진 마우스형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 1 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:44]

후술하는 실시예 5에서 밝혀진 마우스형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 2 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:45]

본 발명의 신규 단백질 전구체(돼지형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:46]

서열번호:45로 표시되는 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:47]

A 사슬(돼지형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:48]

A 사슬(돼지형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:49]

B 사슬(돼지형)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:50]

B 사슬(돼지형)의 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:51]

본 발명의 신규 단백질 전구체(래트형 변종)의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:52]

서열번호:51로 표시되는 아미노산서열을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:53]

후술하는 실시예 8에서 사용된 센스 사슬 프라이머 exlF1의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:54]

후술하는 실시예 8에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머 exlR1의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:55]

후술하는 실시예 8에서 수득된 돼지형 전구체 단백질의 N 말단에서 시그널 펩티드를 거쳐 B 사슬 펩티드까지를 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:56]

후술하는 실시예 8에서 수득된 PCR 산물의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:57]

후술하는 실시예 8에서 사용된 올리고 DNA(PORexlF1)의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:58]

후술하는 실시예 8에서 사용된 올리고 DNA(PORexlF2)의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:59]

후술하는 실시예 8에서 밝혀진 돼지형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 1 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:60]

후술하는 실시예 8에서 밝혀진 돼지형 전구체를 코딩하는 DNA 중 제 2 엑손영역의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:61]

후술하는 실시예 9에서 밝혀진 래트형 전구체 변종을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:62]

후술하는 실시예 9에서 밝혀진 래트형 전구체 변종의 일부를 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:63]

후술하는 실시예 9에서 밝혀진 서열번호:62로 표시되는 DNA 염기서열로 코딩되는 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:64]

후술하는 실시예 19에서 사용된 센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:65]

후술하는 실시예 19에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:66]

후술하는 실시예 19에서 사용된 센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:67]

후술하는 실시예 19에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:68]

후술하는 실시예 19에서 수득된 융합단백질을 코딩하는 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:69]

후술하는 실시예 19에서 수득된 융합단백질의 아미노산서열을 나타낸다.

[서열번호:70]

후술하는 실시예 23에서 사용된 센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:71]

후술하는 실시예 23에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:72]

후술하는 실시예 23에서 사용된 TaqMan 프로브의 올리고 DNA 부분의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:73]

후술하는 실시예 23에서 사용된 센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:74]

후술하는 실시예 23에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:75]

후술하는 실시예 23에서 사용된 TaqMan 프로브의 올리고 DNA 부분의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:76]

후술하는 실시예 23에서 사용된 센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:77]

후술하는 실시예 23에서 사용된 안티센스 사슬 프라이머의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:78]

후술하는 실시예 23에서 사용된 TaqMan 프로브의 올리고 DNA 부분의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:79]

후술하는 실시예 29에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:80]

후술하는 실시예 29에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:81]

후술하는 실시예 29에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:82]

후술하는 실시예 29에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:83]

후술하는 실시예 29에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:84]

후술하는 실시예 30에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:85]

후술하는 실시예 30에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

[서열번호:86]

후술하는 실시예 30에서 사용된 합성 DNA의 염기서열을 나타낸다.

후술하는 실시예 1에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) INV α F'/pVH7U5Lh는 2000년 4월 12일부터 일본 이바라키켄 츠크바시 히가시 1-1-3 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7130으로 기탁되어 있고, 2000년 4월 18일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16423으로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 3에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) INV α F'/pVHNC5Lh는 2000년 4월 18일부터 일본 이바라키켄 츠크바시 히가시 1-1-3 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7139로 기탁되어 있고, 2000년 4월 18일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16424로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 6에서 수득된 플라스미드 pVHUPTr은 2000년 7월 3일부터 일본 이바라키켄 츠크바시 히가시 1-1-3 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7204로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 6에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) TOP10/pVHUPTr은 2000년 7월 17일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16455로

기탁되어 있다. 후술하는 실시예 7에서 수득된 플라스미드 pVHUPtM은 2000년 7월 3일부터 일본 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1-1-3 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7205로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 7에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) TOP10/pVHUPtM은 2000년 7월 17일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16454로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 9에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) TOP10/pVHABDr은 2000년 8월 10일부터 일본 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1-1-3 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7268로 기탁되어 있고, 2000년 8월 3일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16461로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 19에서 수득된 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) BL21-Gold(DE3)/pETVHMMh는 2001년 2월 1일부터 일본 오사카후 오사카시 주산본마치 2-17-85 재단법인 발효연구소(IFO)에 기탁번호 IFO 16531로 기탁되어 있다. 후술하는 실시예 14에서 수득된 하이브리도마 HK4-144-10은 2001년 3월 26일부터 일본 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1-1-3 경제산업성 산업기술종합연구소 생명공학 공업기술연구소(NIBH)에 기탁번호 FERM BP-7520으로 기탁되어 있다.

실시예

다음에 실시예를 들어 본 발명을 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다. 또, 대장균을 사용한 유전자 조작법은 Molecular cloning에 기재되어 있는 방법에 따른다.

실시예 1 신규 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA의 클로닝

본 발명의 신규 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA는 다음과 같은 PCR법으로 취득한다. 서열번호:1로 표시되는 올리고 DNA(CTGGCGGTATGGGTGCTGAC)를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:2로 표시되는 올리고 DNA(ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG)를 안티센스 사슬 프라이머로 각각 5pmol, 100mM 트리스 염산완충액(pH 9.0) 5μl, 500mM 염화칼륨 용액 5μl, 25mM 염화마그네슘 용액 3μl, 2.5mM 디옥시리보뉴클레오티드 용액 4μl, 주형 DNA로 Human Testis polyA⁺ RNA(Clontech)로부터 조제된 cDNA 용액 1μl 및 TaKaRa TaqTM 0.5μl를 함유하는 혼합액 50μl을 조제하고, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 처음에 95°C에서 1분간 방치한 후, 95°C에서 30초, 65°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 사이클로 하여 35 사이클 각 반응을 반복하고, 다시 72°C에서 10분간 반응시키는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동한 후 에티뮴브로마이드 염색하고, 분자량 마커 환산으로 0.45kb 부근 위치에 PCR 반응으로 증폭된 DNA에 대응하는 밴드를 확인한다. 이어서, GENE CLEAN SPIN KIT(BIO101사)를 사용하여 이 DNA 단편을 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR(등록상표) 2.1 (Invitrogen Inc.)을 사용하여 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균 INVαF'주의 컴피턴트 세포에 도입한다. 암피실린 함유 LB 한천배지 상에 출현하는 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 이 플라스미드 DNA, pVH7U5Lh를 조제한다. 삽입 DNA의 염기서열을 결정하기 위해 pVH7U5Lh를 주형 DNA, 상기 서열번호:1로 표시되는 올리고 DNA와 상기 서열번호:2로 표시되는 올리고 DNA를 시퀀스 프라이머로 하고, ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin Elmer Inc.)를 사용한 시퀀스 반응을 첨부자료의 조건에 따라 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)로 실시한 후, 이 반응 시료를 DNA 시퀀서 ABI PRISMTM 377(Perkin Elmer Inc.)로 분석한다.

그 결과, pVH7U5Lh에는, 서열번호:4로 표시되는 49번째 494번째에 상당하는 염기서열, 즉 서열번호:3으로 표시되는 142개 아미노산으로 이루어지는 신규 폴리펩티드 중 N 말단의 9 아미노산 잔기를 제외한 C 말단측의 133 잔기의 아미노산서열에 상당하는 영역을 코딩하고 있음이 판명되었다. 해당 부분의 아미노산서열에서는 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 특징적인 1차 구조(N 말단의 소수성 영역, 염기성 아미노산 잔기 사이에 위치하고 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:7) 및 B 사슬(서열번호:8))가 확인된다.

이렇게 해서 수득된 플라스미드 pVH7U5Lh를 대장균 INVαF'에 도입하고 형질전환체 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) INVαF'/pVH7U5Lh를 수득한다.

실시에 2신규 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA의 5' RACE 및 3' RACE 해석

다음과 같은 요령으로 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) PCR 및 3' RACE PCR을 실시함으로써 신규 폴리펩티드를 코딩하는 완전길이 cDNA를 분석한다. RACE PCR의 주형 DNA에는 MarathonTM - Ready cDNA Human Testis(Clontech)를 사용한다. 실시예 1에서 수득된 pVH7U5Lh의 삽입 DNA 배열을 기초로 5' RACE PCR의 1차 PCR 반응에서는 서열번호:9로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로, MarathonTM - Ready cDNA Human Testis 첨부의 AP1을 센스 사슬 프라이머로 사용한다. 계속되는 nested PCR에서는 서열번호:10으로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로, MarathonTM - Ready cDNA Human Testis 첨부의 AP2를 센스 사슬 프라이머로 사용한다. 반응조건은 키트에 부속된 사용설명서에 따라 실시하고, PCR의 사이클은 1회째에서는 35회, 계속되는 nested PCR에서는 20회 실시한다. 증폭된 PCR 단편을 2.0% 아가로오스 겔을 사용하여 분리하고 전기 영동 용출로 회수한 후, 서열번호:10으로 표시되는 합성 DNA를 서열분석용 프라이머에 사용하여 직접 이 PCR 단편의 염기서열을 결정한다. 그 결과, 서열번호:4로 표시되는 1번째 48번째에 상당하는 염기서열 및 서열번호:3으로 표시되는 1번째 9번째에 상당하는 아미노산서열이 새로 밝혀졌다.

다음으로, 실시예 1에서 수득된 pVH7U5Lh의 삽입 DNA 배열을 기초로 3' RACE PCR을 다음과 같은 요령으로 실시한다. 1차 PCR 반응에서는 센스 사슬 프라이머로 서열번호:5로 표시되는 올리고 DNA를, 그리고 안티센스 사슬 프라이머로는 MarathonTM - Ready cDNA Human Testis 첨부의 AP1을 사용하고, 계속되는 nested PCR에서는 센스 사슬 프라이머로 서열번호:11로 표시되는 올리고 DNA를, 그리고 안티센스 사슬 프라이머로 MarathonTM - Ready cDNA Human Testis 첨부의 AP2를 사용하여 반응을 실시한다. 반응종료액을 2.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고 에티뮴브로마이드 염색한 결과, 0.7kb 위치에 RACE PCR 산물로 밴드가 검출된다. 그래서, 이 DNA 단편을 QIA quick Gel Extraction kit (Qiagen) 를 사용하여 회수 정제하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR(등록상표) 2.1 - TOPO (Invitrogen Inc.)를 사용하여 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균 DH5 α 주의 컴피턴트 세포에 도입한다. 암피실린함유 LB 한천배지 상에 출현하게 된 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론 4주를 선택하고, 각 플라스미드 DNA를 조제한 후, 삽입 DNA 단편의 염기서열을 결정한다. 그 결과, 모든 클론의 플라스미드에 서열번호:11로 표시되는 nested primer를 기점으로 하는 서열번호:4로 표시되는 413번째 1061번째에 상당하는 염기서열에 계속되고, 그리고 그 3' 측에 폴리A 배열이 부가된 DNA 단편이 삽입되어 있음을 알 수 있다. 이상과 같은 결과에서 서열번호:4의 오픈 리딩 프레임이 밝혀지고, 이 오픈 리딩 프레임에 코딩되어 있는 서열번호:3으로 표시되는 단백질의 특징(시그널배열, 염기성 아미노산 잔기 사이에 위치하고 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:7) 및 B 사슬(서열번호:8))으로부터 본 발명의 신규 단백질은 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 속하는 새로운 분비성 생체기능조절 단백질의 전구체임이 판명되었다(도 1).

실시에 3신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)를 코딩하는 전체길이 cDNA의 클로닝

본 발명의 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)를 코딩하는 전체길이 cDNA는 다음과 같은 5' - RACE법으로 취득한다.

5' - RACE System(GIBCO BRL사)을 사용하여 실시예 1에서 수득된 pVH7U5Lh의 삽입 DNA 배열을 기초로 제조한 서열번호:13으로 표시되는 올리고 DNA(GGGCAGGGGTCTCTGTGT)를 프라이머로 하고, 주형으로 Human Testis polyA⁺ RNA(Clontech)를 사용한 역전사 반응으로 cDNA 용액을 조제한다. 이 cDNA를 주형으로 하고 센스 사슬 프라이머로 5' - RACE System 첨부 AAP를, 안티센스 사슬 프라이머로 상기 서열번호:13으로 표시되는 올리고 DNA를 사용하여 1차 PCR 반응을 실시한다. 다음으로, 센스 사슬 프라이머로 실시예 1에서 수득된 pVH7U5Lh의 삽입 DNA 배열을 기초로 제조한 서열번호:14로 표시되는 올리고 DNA(TTCAAAGCATCTCCGTCCAGC)를, 안티센스 사슬 프라이머로 상기 서열번호:2로 표시되는 올리고 DNA(ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG)을 사용하여 nested PCR을 실시한다. 이 반응종료액을 1.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고 에티뮴브로마이드 염색한 결과, 0.5kb 위치에서 밴드가 검출된다. 이어서, 이 DNA 단편을 GENE CLEAN SPIN KIT(BIO101사)를 사용하여 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR(등록상표) 2.1 (Invitrogen Inc.)을 사용하여 TA 클로닝하고, 이 플라스미드를 대장균 I NV α F'주의 컴피턴트 세포에 도입한다. 암피실린 함유 LB 한천배지 상에 출현하는 암피실린 내성 형질전환체의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 이 플라스미드 DNA, pVHNC5Lh를 조제한다. 삽입 DNA의 염기서열을 결정하기 위해서 pVHNC5Lh를 주형 DNA, 서열번호:14로 표시되는 올리고 DNA(TTCAAAGCATCTCCGTCCAGC)와 서열번호:2로 표시되는 올리고 DNA(ACTGGGGCATTGGTCCTGGTG)을 시퀀스 프라이머로 하고, ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin Elmer Inc.)를 사용한 시퀀스 반응을 첨부자료의 조건에 따라 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)로 실시한 후, 이 반응 시료를 DNA 시퀀서 ABI PRISMTM 377(Perkin Elmer Inc.)로 분석한다.

그 결과, pVHNC5Lh에는 서열번호:4로 표시되는 1번째 494번째에 해당하는 염기서열, 즉 서열번호:3으로 표시되는 142개 아미노산으로 이루어지는 신규 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)이 포함됨이 판명되었다(도 1).

이렇게 해서 수득된 플라스미드 pVHNC5Lh를 대장균 INV α F'에 도입하고 형질전환체 Escherichia coli INV α F'/pVHNC5Lh를 수득한다.

실시예 4신규 폴리펩티드의 조직 발현 분포의 분석

다음에 나타낸 PCR법으로 신규 폴리펩티드의 발현 조직을 조사한다. 먼저, 서열번호:5로 표시되는 올리고 DNA(CCGGATGCAGATGCTGATGAA)를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:6으로 표시되는 올리고 DNA(TGGTCAAAGGGCAGGGTTGG)를 안티센스 사슬 프라이머로 각각 2.5pmol, 100mM 트리스 염산완충액(pH 9.0) 2.5 μ l, 500mM 염화칼륨 용액 2.5 μ l, 25mM 염화마그네슘 용액 1.5 μ l, 2.5mM 디옥시리보뉴클레오티드 용액 2 μ l, 주형 DNA로 Human multiple tissue cDNA(MTCTM) panels(Clontech)의 각 조직별 cDNA 용액 1 μ l 및 TaKaRa TaqTM 0.25 μ l를 함유하는 혼합액 25 μ l를 조제하고, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 처음에 95°C에서 1분간 방치한 후, 95°C에서 30초, 66°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 사이클로 하여 35 사이클 각 반응을 반복하는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.5% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동한 후 아가로오스 겔을 에티뮴브로마이드 염색하여 증폭 산물의 유무를 조사한다. 그 결과, 신규 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에서 유래하는 0.45kb의 DNA 단편이 주로 태반, 폐, 정소, 하수체 등과 같은 반응액에서 검출되기 때문에 본 신규 폴리펩티드가 이들 생체 조직에서 발현되고 있음을 알 수 있다(도 2).

실시예 5신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 래트 카운터 파트 및 마우스 카운터 파트를 코딩하는 염색체 유전자 및 cDNA의 서열 분석

실시에 3에서 수득된 인간 유래 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 래트 카운터 파트 및 마우스 카운터 파트를 코딩하는 cDNA를 클로닝하기 위해서, 먼저 두 동물종의 염색체 유전자 구조를 다음과 같은 genome walking법으로 해석한다. 피검 재료로는 래트 염색체 DNA에 대해서는 Rat GenomeWalker™ Kit(Clontech)를, 그리고 마우스 염색체 DNA에 대해서는 Mouse GenomeWalker™ Kit(Clontech)를 사용한다. 방법은 PCR 반응용 효소로 TaKaRa Ex Taq™ (Takara Shuzo Co., Ltd.)을 사용한 점을 제외하고는 각 키트의 첨부자료에 따른다. 1회째의 5' 상류방향으로의 genome walking을 실시함에 있어서, 먼저 서열번호:12로 표시되는 인간 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)를 코딩하는 cDNA의 염기서열을 쿼리(query)로 하여 public EST(Expressed Sequence Tag) 데이터 베이스에서 발견된 이 폴리펩티드의 래트 카운터 파트를 코딩하는 cDNA의 3' 측의 일부 영역을 포함하는 것으로 생각되는 EST, AW523625 및 AW521175의 염기서열을 기초로 이들 염기서열의 일부에 상보적인 배열의 3종류의 올리고 DNA(R1(서열번호:27), R2(서열번호:28), L1(서열번호:29))를 화학 합성하여 gene specific primer로 한다. 그 결과, 래트 염색체 DNA에 관해서는 1st PCR에서는 L1, 계속되는 nested PCR에서 R2를 사용한 반응계에서, 그리고 마우스 염색체 DNA에 관해서는 1st PCR에서는 R1, 계속되는 nested PCR에서 R2를 사용한 반응계에서 각각 특이한 증폭 DNA 단편을 얻는다. 이들 DNA 단편에 대해서 어댑터 프라이머(AP2) 배열을 말단으로 하는 측의 각 게놈 유래의 염기서열을 이미 서술한 실시예의 방법에 준거하여 결정하고, 그 배열을 기초로 다시 2회째의 5' 상류방향으로의 genome walking을 진행시키기 위해서 새로운 gene specific primer를 설계한다. 즉, 래트 염색체 DNA에 관해서는 1st PCR용으로 R8(서열번호:30), nested PCR용으로 R9(서열번호:31), 그리고 마우스 염색체 DNA에 관해서는 1st PCR용으로 R6(서열번호:32), nested PCR용으로 R7(서열번호:33) 총 4종류의 올리고 DNA이다. 이들 프라이머를 사용하여 상기 Rat GenomeWalker™ Kit, Mouse GenomeWalker™ Kit의 각 DNA 샘플에 대해서 재차 동일한 조건에서 PCR 반응을 실시한 결과, 마우스, 래트 각각에 대해서 특이한 증폭 DNA 단편이 새로 수득된다. 그래서, 앞의 1회째의 genome walking에서 수득된 DNA 단편 함께 각 증폭 DNA 단편의 염기서열을 결정하고, 실시예 3에서 수득된 본 발명의 인간 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)를 코딩하는 cDNA의 염기서열과의 상동성을 비교하면서 구조 해석한다.

그 결과, 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 래트 카운터 파트는 이상과 같은 실험에서 판명된 게놈의 염기서열과 상기 퍼블릭 EST 배열(AW523625 및 AW521175)로부터 서열번호:18로 표시되는 420 염기의 DNA로 코딩되는 서열번호:17로 표시되는 140개 아미노산 잔기로 이루어지는 폴리펩티드인 것, 그리고 이 유전자는 래트 염색체 상에서 하나의 개재 배열 사이에 위치하고 두개의 엑손(exon)으로 구성되고, 420 염기 중 제 1 엑손에는 서열번호:41로 표시되는 184 염기가, 제 2 엑손에는 서열번호:42로 표시되는 236 염기가 코딩되어 있음이 밝혀진다. 이 폴리펩티드에는 인간 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)와 동일하게 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 특징적인 배열, 즉 시그널배열, 염기성 아미노산 잔기 사이에 위치하고, 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:19) 및 B 사슬(서열번호:21)이 포함되어 있다. 또한, 이 래트 신규 폴리펩티드의 인간 신규 폴리펩티드와의 상동성은 75.0%이다.

또, 마우스에 대해서도 상기 실험에서 본원 신규 폴리펩티드 카운터 파트 유전자의 5' 측 영역으로 생각되는 배열이 수득되기 때문에, 이어서 남은 3' 측 배열과 mRNA로서의 발현을 함께 조사하기 위한 3' RACE PCR을 실시한다. RACE PCR의 주형 DNA에는 MarathonTM - Ready cDNA Mouse Testis(Clontech)를 사용하고, gene specific primer로서 1회째의 genome walking에서 수득된 제 2 엑손 상당 영역의 배열로부터 2종류의 올리고 DNA(U1(서열번호:34), U2(서열번호:35))를 설계하고 각각 화학 합성한다. 1st PCR 반응에서는 U1을 센스 사슬 프라이머로, 그리고 MarathonTM - Ready cDNA Mouse Testis 첨부의 AP1을 안티센스 사슬 프라이머로 사용하고, 계속되는 nested PCR 반응에서는 U2를 센스 사슬 프라이머로, 그리고 MarathonTM - Ready cDNA Mouse Testis 첨부의 AP2를 안티센스 사슬 프라이머로 사용한다. 이들 PCR 반응 결과 단일한 DNA 단편이 최종 증폭 산물로 수득되고, 이미 기술한 방법에 준하여 염기서열을 결정한 결과, 이 DNA 단편에는 U2를 기점으로 마우스 제 2 엑손 상당 영역의 염기서열이 종지 코돈까지 포함되고, 또한 그 3' 측의 비번역 영역 말단에는 폴리A 부가 시그널배열과 폴리A 배열이 존재한다. 이 cDNA 부분 배열과 본 실시예에서 수득한 마우스 염색체 DNA 단편의 1차 구조에서 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 마우스 카운터 파트는 서열번호:24로 표시되는 423 염기의 DNA로 코딩되는 서열번호:23으로 표시되는 141개 아미노산 잔기로 이루어지는 폴리펩티드인 것, 그리고 이 유전자는 래트와 동일하게 염색체 상에서 하나의 개재 배열 사이에 위치하고 두개의 엑손(exon)으로 구성되고, 423 염기 중 제 1 엑손에는 서열번호:43으로 표시되는 187 염기가, 제 2 엑손에는 서열번호:44로 표시되는 236 염기가 코딩되어 있음이 밝혀진다. 이 폴리펩티드에는 인간 신규 폴리펩티드, 또 상기 래트 신규 폴리펩티드와 동일하게 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 특징적인 배열, 즉 시그널배열, 염기성 아미노산 잔기 사이에 위치하고, 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:19) 및 B 사슬(서열번호:21)이 포함되어 있다. 또한, 이 마우스 신규 폴리펩티드의 인간 신규 폴리펩티드, 래트 신규 폴리펩티드와의 상동성은 각각 77.3%, 92.1%로, A 사슬 및 B 사슬의 아미노산서열은 상기 기술한 래트 유래의 그것과 완전히 일치한다.

실시에 6신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 래트 카운터 파트를 코딩하는 완전길이 cDNA의 클로닝

본 발명의 신규 폴리펩티드 래트 카운터 파트를 코딩하는 완전길이 cDNA는 다음과 같은 요령으로 PCR을 실시함으로써 취득한다.

먼저, 센스 사슬 프라이머로 실시에 5에서 수득된 신규 폴리펩티드 마우스 카운터 파트 유전자의 5' 측 비번역 영역 염기서열을 기초로 화학 합성한 올리고 DNA(UP(서열번호:36))를, 그리고 안티센스 사슬 프라이머로 실시에 5에 기재된 public EST, AW523625 및 AW521175의 염기서열을 기초로 화학 합성한 올리고 DNA(RL(서열번호:37))를 각각 5pmol, 100mM 트리스 염산완충액(pH 8.3) 5μl, 500mM 염화칼륨 용액 5μl, 25mM 염화마그네슘 용액 3μl, 2.5mM 디옥시리보뉴클레오타이드 용액 4μl, 주형 DNA로 SD 래트(생후 9주) 정소 유래 total RNA로 조제된 cDNA 용액 4μl 및 TaKaRa TaqTM (Takara Shuzo Co., Ltd.) 0.5μl를 함유하는 혼합액 50μl를 조제한다. 다음으로, 이 혼합액에 대하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 처음에 95°C에서 1분간 방치한 후, 95°C에서 30초, 67°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 사이클로 하여 40 사이클 각 반응을 반복하고, 다시 72°C에서 10분간 반응시키는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동한 후 에티듐브로마이드 염색하고, 분자량 마커 환산으로 0.45kb 부근 위치에 PCR 반응으로 증폭된 DNA에 대응하는 밴드를 확인한다. 이어서, GENE CLEAN SPIN KIT(BIO101사)를 사용하여 이 DNA 단편을 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR(등록상표) 2.1 - TOPO (Invitrogen Inc.)에 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균 TOP10주의 컴피턴트 세포(Invitrogen Inc.)에 도입한다. 암피실린함유 LB 한천평판배지 상의 배양에 출현하게 된 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 이 클론으로 플라스미드 DNA, pVHUPTr을 조제하여 삽입 DNA 단편의 염기서열을 결정한다.

그 결과, pVHUPTr에는 서열번호:17로 표시되는 140개 아미노산으로 이루어지는 신규 폴리펩티드 전구체의 래트 카운터 파트를 코딩하는 서열번호:18로 표시되는 420 염기로 이루어지는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 서열번호:39로 표시되는 470 염기쌍의 DNA 단편이 포함됨이 판명되었다.

이렇게 해서 수득된 래트 신규 폴리펩티드(전구체 단백질)를 코딩하는 DNA를 유지하는 플라스미드 pVHUPTr을 대장균(Escherichia coli) TOP10에 도입하고 형질전환체 에세리키아 콜리(Escherichia coli) TOP10/pVHUPTr을 수득한다.

실시에 7신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 마우스 카운터 파트를 코딩하는 완전길이 cDNA의 클로닝

본 발명의 신규 폴리펩티드 마우스 카운터 파트를 코딩하는 완전길이 cDNA는 다음과 같은 요령으로 PCR을 실시함으로써 취득한다.

먼저, 센스 사슬 프라이머로 실시예 5에서 수득된 신규 폴리펩티드 마우스 카운터 파트 유전자의 5' 측 비번역 영역 염기서열을 기초로 화학 합성한 올리고 DNA(UP(서열번호:36))를, 그리고 안티센스 사슬 프라이머로 실시예 5에서 수득된 cDNA 부분 배열을 기초로 화학 합성한 올리고 DNA(ML(서열번호:38))를 각각 5pmol, 100mM 트리스 염산완충액(pH 8.3) 5μl, 500mM 염화칼륨 용액 5μl, 25mM 염화마그네슘 용액 3μl, 2.5mM 디옥시리보뉴클레오타이드 용액 4μl, 주형 DNA로 MarathonTM - Ready cDNA Mouse Testis(Clontech) 4μl 및 TaKaRa TaqTM (Takara Shuzo Co., Ltd.) 0.5μl를 함유하는 혼합액 50μl를 조제한다. 다음으로, 이 혼합액에 대하여 TaKaRa PCR Thermal Cycle r MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 처음에 95°C에서 1분간 방치한 후, 95°C에서 30초, 67°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 사이클로 하여 40 사이클 각 반응을 반복하고, 다시 72°C에서 10분간 반응시키는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동한 후 에티뮴브로마이드 염색하고, 분자량 마커 환산으로 0.45kb 부근 위치에서 PCR 반응으로 증폭된 DNA에 대응하는 밴드를 확인한다. 이어서, GENE CLEAN SPIN KIT(BIO101사)를 사용하여 이 DNA 단편을 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR(등록상표) 2.1 - TO PO (Invitrogen Inc.)에 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균 TOP10주의 컴피턴트 세포(Invitrogen Inc.)에 도입한다. 암피실린함유 LB 한천평판배지 상의 배양에 출현하게 된 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 이 클론으로 플라스미드 DNA, pVHUPTm을 조제하여 삽입 DNA 단편의 염기서열을 결정한다.

그 결과, pVHUPTm에는 서열번호:23으로 표시되는 141개 아미노산으로 이루어지는 신규 폴리펩티드 전구체의 마우스 카운터 파트를 코딩하는 서열번호:24로 표시되는 423 염기로 이루어지는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 서열번호:40으로 표시되는 475 염기쌍의 DNA 단편이 포함되어 있음이 판명되었다.

이렇게 해서 수득된 신규 폴리펩티드(전구체 단백질)를 코딩하는 DNA를 유지하는 플라스미드 pVHUPTm을 대장균(Escherichia coli) TOP10에 도입하고 형질전환체 Escherichia coli TOP10/pVHUPTm을 수득한다.

실시예 8신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드)의 돼지 카운터 파트를 코딩하는 염색체 유전자의 해석

먼저, 돼지형 신규 폴리펩티드(전구체 단백질)의 일부를 코딩하는 DNA 단편을 다음과 같은 PCR법으로 취득한다. 즉, 서열번호:53(exIF1)로 표시되는 올리고 DNA를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:54(exIR1)로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로 각각 20pmol 함유하고, 추가로 Premix TaqTM (Ex TaqTM Version)(Takara Shuzo Co., Ltd.) 20μl, 주형 DNA로 돼지 genomic DNA(Clontech, #6651 - 1) 1μl를 함유하는 혼합액 40μl를 조제하고, 서멀 사이클러 (Thermal Cycler) (GeneAmpTM PCR system model 9700(PE Biosystems))를 사용하여 94°C에서 2분간, 계속해서 94°C에서 10초간 → 55°C에서 10초간 → 72°C에서 30초간을 30 사이클 반복하고, 다시 72°C에서 1분 30초간 신장 반응시키는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 2% 아가로오스 겔로 전기 영동한 후 이 겔을 에티뮴브로마이드 염색한 결과, PCR 반응에서 증폭된 DNA가 단일 밴드로 확인된다. QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen)를 사용하여 이 DNA 단편을 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCRTM 2.1 - ToPO (Invitrogen Inc.)를 사용하여 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균(Escherichia coli) DH5α 컴피턴트 세포(Toyobo Co., Ltd.)에 도입한다. 암피실린함유 LB 한천배지 상에 출현하게 된 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 삽입 DNA 단편의 염기서열을 결정하기 위해 암피실린 존재 하에서 다시 배양한 클론 균체로 조제된 이 플라스미드를 주형 DNA, 시판되는 프라이머 DNA(PRM - 007, PRM - 008(Toyobo Co., Ltd.))를 시퀀스 프라이머로 하고, ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems)를 사용한 시퀀스 반응을 첨부자료의 조건에 준거하여 서멀 사이클러(GeneAmpTM PCR system model 9700(PE Biosystems))에서 실시한 후, 이 반응시료를 DNA 시퀀서 ABI PRISM 377(PE Biosystems)에서 분석한다.

그 결과, 이 PCR 산물은 상기 프라이머 배열을 양 말단에 가지고 또 그 내측에는 돼지형 전구체 단백질의 N 말단에서 시그널 펩티드를 거쳐 B 사슬 펩티드까지를 코딩하는 서열번호:55로 표시되는 염기서열을 함유하는, 서열번호:56으로 표시되는 239 염기쌍의 DNA를 함유하는 DNA 단편임이 판명되었다. 그래서, 다음으로, 돼지형 전구체 단백질을 코딩하는 염색체 유전자에 대해서 추가로 하류(3')측 구조를 조사하기 위해서 genome walking을 실시한다. 피검 재료로는 상기 돼지 genomic DNA에 대하여 Universal GenomeWalker™ Kit(Clontech)로 가공한 GenomeWalker 라이브러리 DNA를 사용하고, 방법은 실시예 5의 Rat GenomeWalker™ Kit 및 Mouse GenomeWalker™ Kit(Clontech)를 적용할 때의 그것에 준거한다. 먼저, gene specific primer로 서열번호:56으로 표시되는 염기서열의 일부에 상당하는 2종류의 올리고 DNA(PORexIF1(서열번호:57), PORexIF2(서열번호:58))를 각각 화학 합성하고, PORexIF1을 1st PCR 반응시에, PORexIF2를 nested PCR 반응시에 각각 사용한다. nested PCR 반응 후에 수득된 증폭 DNA 단편에 대해서 상기 기술한 방법에 준하여 염기서열을 결정하고, PORexIF2 프라이머 배열 부위를 기점으로 인간, 마우스 및 래트의 전구체 단백질을 코딩하는 cDNA의 염기서열과의 상동성을 비교하면서 그 염기서열을 해석한다. 그 결과, 판명된 계통의 1차 구조에서 신규 폴리펩티드(전구체 단백질)의 돼지 카운터 파트는 서열번호:46으로 표시되는 420 염기의 DNA로 코딩되는 서열번호:45로 표시되는 140개 아미노산 잔기로 이루어지는 폴리펩티드인 것, 그리고 이 유전자는 돼지 염색체 상에서 하나의 개재물을 사이 위치하고 두개의 엑손(exon)으로 구성되고, 420 염기 중 제 1 엑손에는 서열번호:59로 표시되는 193 염기가, 제 2 엑손에는 서열번호:60으로 표시되는 227 염기가 코딩되어 있음이 밝혀진다. 이 폴리펩티드에는 신규 폴리펩티드(전구체 단백질)와 동일하게 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 특징적인 서열, 즉 시그널배열, 염기성 아미노산 잔기 사이에 위치하고, 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:47) 및 B 사슬(서열번호:49)이 포함되어 있다. 또한, 이 돼지 신규 폴리펩티드의 인간 전구체 단백질, 마우스 전구체 단백질 및 래트 전구체 단백질의 아미노산 레벨에서의 상동성은 각각 77.1%, 70.0%, 67.1%이다.

실시에 9래트 장간막 지방조직 유래 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드) 변종을 코딩하는 전체길이 cDNA의 클로닝

래트 장간막 지방조직 유래 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드) 변종을 코딩하는 전체길이 cDNA는 다음과 같은 PCR 방법으로 취득한다.

먼저, 실시예 6에서 사용한 올리고 DNA 중 UP(서열번호:36)를 센스 사슬 프라이머로, 그리고 RL(서열번호:37)를 안티센스 사슬 프라이머로 각각 5pmol, 100mM 트리스 염산완충액(pH 8.3) 5μl, 500mM 염화칼륨 용액 5μl, 25mM 염화마그네슘 용액 3μl, 2.5mM 디옥시리보뉴클레오타이드 용액 4μl, 주형 DNA로 래트 장간막 지방조직 유래 total RNA로 조제된 cDNA 용액 1μl 및 TaKaRa Taq™ (Takara Shuzo Co., Ltd.) 0.5μl를 함유하는 혼합액 50μl를 조제한다. 다음으로, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 처음에 95°C에서 1분간 방치한 후, 95°C에서 30초, 67°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 사이클로 하여 35 사이클 각 반응을 반복하고, 다시 72°C에서 10분간 반응시키는 프로그램으로 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.0% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동한 후 에티뮴브로마이드 염색하고, 분자량 마커 환산으로 0.6kb 부근 위치에 PCR 반응으로 증폭된 DNA에 대응하는 밴드를 확인한다. 이어서, GENE CLEAN SPIN KIT(BIO101사)를 사용하여 이 DNA 단편을 회수하고, 염기서열을 결정하기 위해서 pCR™ 2.1-TOPO (Invitrogen Inc.)를 사용하여 TA 클로닝하고 이 플라스미드를 대장균 TOP10주의 컴피턴트 세포에 도입한다. 암피실린함유 LB 한천배지 상에 출현하는 암피실린 내성 형질전환주의 콜로니 중에서 외래 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 이 플라스미드 DNA, pVHABDr을 조제한다. 삽입 DNA의 염기서열을 결정하기 위해서 pVHABDr을 주형 DNA, 시판되는 프라이머 DNA(PRM-007, PRM-008(Toyobo Co., Ltd.)를 시퀀스 프라이머로 하고, ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems)를 사용한 시퀀스 반응을 첨부자료의 조건에 준거하여 서열 사이클러(GeneAmp™ PCR system model 9700(PE Biosystems))로 실시한 후, 이 반응시료를 DNA 시퀀서 ABI PRISM 377(PE Biosystems)로 분석한다.

그 결과, pVHABDr에는 서열번호:52로 표시되는 522 염기로 이루어지는 DNA로 코딩되는 서열번호:51로 표시되는 174개 아미노산 잔기로 이루어지는 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드) 변종을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 서열번호:61로 표시되는 572 염기쌍의 DNA 단편이 삽입되어 있음이 판명되었다. 이 폴리펩티드 변종에는 인슐린/IGF/릴렉신 패밀리에 특징적인 배열, 즉 실시예 5 및 실시예 6에 기재된 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드) 래트형 카운터 파트와 완전히 동일한 시그널배열과 염기성 아미노산 사이에 위치하고, 또 Cys 잔기를 갖는 A 사슬(서열번호:19) 및 B 사슬(서열번호:21)을 갖고 있고, 또 실시예 5에 기재된 신규 폴리펩티드(전구체 폴리펩티드) 래트형

카운터 파트의 제 1 엑손과 제 2 엑손 사이에 한군데 존재하는 개재 배열의 일부에서 유래하는 서열번호:62로 표시되는 102 염기로 이루어지는 DNA로 코딩되는 서열번호:63으로 표시되는 34 아미노산 잔기로 이루어지는 폴리펩티드가 삽입된 구조를 갖고 있음이 판명되었다.

이렇게 해서 수득된 플라스미드 pVHABDr을 대장균 TOP10에 도입하고 형질전환체 에세리키아 콜리 (Escherichia coli) TOP10/pVHABDr을 수득한다.

실시에 10인간 신규 폴리펩티드 유전자 발현 AtT20 세포주의 제조

실시에 3에서 수득된 신규 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 단편이 삽입된 플라스미드인 pVHNC5Lh를 제한효소 EcoRI로 자른 후, 반응종료액을 1.5% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고, 0.15kb와 0.35kb에 해당하는 두개의 밴드를 겔에서 회수한다. 포유동물세포 발현 벡터인 pcDNA3.1(-) (Invitrogen)을 EcoRI로 자르고 Calf intestine alkaline phosphatase(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 탈인산화 처리를 실시한 후 반응종료액을 1.5% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고, 약 5.5kb에 해당하는 밴드를 겔에서 회수한다. DNA Ligation Kit ver.2(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 이들 DNA 단편을 연결시킨 후, 이 반응액을 E. coli JM109 Competent Cells(Takara Shuzo Co., Ltd.)에 첨가하여 형질 전환시킨다. 수득된 암피실린 내성 콜로니 중에서 벡터 삽입 부위의 CMV 프로모터측에 0.15kb Eco RI 단편, 폴리A 시그널측에 0.35kb EcoRI 단편의 total 0.5kb의 DNA 단편이 삽입된 플라스미드를 유지한 클론을 선택하고, 재배양한 균체로부터 이 플라스미드를 Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)를 사용하여 대량 조제한다.

이렇게 해서 수득된 플라스미드를 Lipofectin(GIBCO - BRL)을 사용하고, 첨부한 프로토콜에 기재된 방법에 따라 마우스 뇌 하수체 종양세포주 AtT20(Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)에 도입한다. 10% FCS, 페니실린(100 단위/ml), 스트렙토마이신(100µg/ml) 및 500µg/ml의 G418(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)을 함유하는 DMEM 내에서 생육할 수 있는 콜로니를 선택함으로써 인간 발현 폴리펩티드 유전자 발현 AtT20 세포주를 취득한다.

실시에 11신규 폴리펩티드(인간형) A 사슬 N 말단 펩티드를 함유하는 면역원의 제조 및 면역

상기 실시에 3에서 수득된 신규 폴리펩티드(인간형)의 A 사슬 N 말단 펩티드, AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSerCys (서열번호:7의 N 말단(1 - 10) 부분 배열: 공지 수법에 준하여 합성함)와 헤모시아닌(KLH)의 복합체를 제조하여 면역원으로 한다. 즉, KLH 20mg을 0.1M 인산완충액(pH 6.7) 2.0ml에 용해시키고, N-(γ-말레이미드부티릴옥신)숙신이미드(GMBS) 2.8mg을 함유하는 DMSO 용액 200µl와 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨다. 2mM EDTA를 함유하는 0.1M 인산완충액(pH 6.5)으로 평형화시킨 세파덱스 G-25 칼럼으로 과잉된 GMBS 시약을 제거한 후, 말레이미드기의 도입된 KLH 5mg과 0.1ml의 DMSO에 용해시킨 A 사슬 N 말단 펩티드 0.84mg을 혼합하고 4°C에서 1액 반응시킨다. 반응 후 생리식염수에 대하여 4°C에서 2일간 투석시킨다.

생후 8주된 BALB/C 암컷 마우스에 상기 A 사슬 N 말단 펩티드 - KLH 복합체, 약 0.1mg/마리를 완전 프로인트 아췌반트와 함께 피하 면역시킨다. 3 주일 후 동량의 면역원을 불완전 프로인트 아췌반트와 함께 추가 면역시킨 후 1 주일 후에 채혈한다.

실시에 12서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP) 표지화 A 사슬 N 말단 펩티드의 제조

상기 A 사슬 N 말단 펩티드와 HRP(효소면역 측정법용, Boehringer Mannheim 제조)를 가교하고, 효소면역 측정법(EIA)의 표지체로 한다. 즉, HRP 23mg을 2.3ml 0.1M 인산완충액, pH 6.7로 용해시키고, GMBS 1.6mg을 함유하는 DMF 용액 0.23ml와 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨 후, 2mM EDTA를 함유하는 0.1M 인산완충액, pH 6.5로 평형화시킨 세파덱스 G-25 칼럼으로 분획한다. 이렇게 해서 제조된 말레이미드기가 도입된 HRP 2.3mg과 A 사슬 N 말

단 펩티드 1mg을 혼합하여 4°C에서 하루동안 반응시킨다. 반응 후 0.1M 인산완충액, pH 6.5로 평형화시킨 Ultrogel AcA54(Pharmacia 제조) 칼럼으로 분획하고 HRP 표지화 A 사슬 N 말단 펩티드를 수득한다.

실시에 13A 사슬 N 말단 펩티드를 면역시킨 마우스의 항혈청 내의 항체가 측정

마우스 항혈청 중의 항체가를 다음과 같은 방법으로 측정한다. 항마우스 이뮤노 글로불린 항체 결합 마이크로플레이트를 제조하기 위해, 먼저 항마우스 이뮤노 글로불린 항체(IgG 분획, Cappel 제조)를 0.1mg/ml 함유하는 0.1M 탄산완충액, pH 9.6 용액을 96 웰 마이크로플레이트에 0.1ml씩 붓고 4°C에서 24시간 동안 방치한다. 다음으로, 플레이트를 인산완충액 생리식염수(PBS, pH 7.4)로 세정한 후, 웰의 과잉된 결합 부위를 방지하기 위해 25% Block Ace (유키지루시 유업(주) 제조) 및 0.05% NaN₃ 을 함유하는 PBS, pH 7.2를 0.3ml씩 붓고 4°C에서 적어도 24시간 동안 처리한다.

상기 항마우스 이뮤노 글로불린 항체 결합 마이크로플레이트의 각 웰에 버퍼 EC[0.2% BSA, 0.4M NaCl, 0.4% Block Ace, 0.05% CHAPS[3 - [(콜라미드프로필)디메틸암모니오]프로판술포산], 2mM EDTA 및 0.05% NaN₃ 을 함유하는 0.02M 인산완충액, pH 7.0]로 희석한 마우스 항혈청 0.14ml를 첨가하고 4°C에서 16시간 동안 반응시킨다. 다음으로, 이 플레이트를 PBS, pH 7.4에서 세정한 후, 버퍼 C[1% BSA, 0.4M NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 0.02M 인산완충액, pH 7.0]로 1000배 희석한 상기 실시예 12에서 제조된 HRP 표지 A 사슬 N 말단 펩티드 0.1ml를 첨가하고 4°C에서 하루동안 반응시킨다. 이어서, 이 플레이트를 PBS, pH 7.4에서 세정한 후, 고상 상의 효소활성을 TMB 마이크로 웰 퍼옥시다아제 기질 시스템(KIRKEGAARD & PERRY LAB. Funakoshi Pharmaceutical Co., Ltd.) 0.1ml를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킴으로써 측정한다. 반응을 1M 인산 0.1ml를 첨가하고 정지시킨 후, 450nm 흡광도(Abs.450)를 플레이트 리더(MTP - 120, Corona Co. 제조 또는 Multiskan Ascent, Labsystems사 제조)로 측정한다. 결과를 도 4에 나타낸다. 면역된 8마리의 마우스 모두에게서 A 사슬 N 말단 펩티드에 대한 항체가의 상승이 확인된다.

실시에 14항A 사슬 N 말단 펩티드 모노클로날 항체의 제조

실시에 13에서 비교적 높은 항체가를 나타낸 마우스 No.1 및 No.7에 대하여 KLH로서 0.08 - 0.1mg A 사슬 N 말단 펩티드 - KLH를 정맥 내에 투여함으로써 최종 면역을 실시한다. 최종 면역 3일 후의 마우스로부터 비장을 적출하여 스테인리스 메시로 압박 여과시키고 이글스 미니멈 에센셜 매디움(MEM)에 부유시켜 비장세포 부유액을 수득한다. 세포융합에 사용하는 세포로서 BALB/C 마우스 유래 미엘로마 세포 P3 - X63. Ag 8. UI(P3U1)을 사용한다[Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1 (1978)]. 세포융합은 원법[Nature, 256, 495 (1975)]에 준하여 실시한다. 즉, 비장세포 및 P3U1을 각각 혈청을 함유하지 않은 MEM에서 3번 세정하고, 비장세포와 P3U1 수의 비율을 6.6:1이 되도록 혼합하고 750 회전으로 15분간 원심을 실시하여 세포를 침전시킨다. 상등액을 충분히 제거한 후 침전을 가볍게 풀어 45% 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 6000(코폴라이트사 제조)을 0.3ml 첨가하고, 37°C 온수조 안에서 7분간 정치시키고 융합을 실시한다. 융합 후 세포에 서서히 MEM을 첨가하여 합계 15ml MEM을 첨가한 후 750 회전 15분간 원심하여 상등액을 제거한다. 이 세포 침전물을 10% 소 태아 혈청을 함유하는 GIT 매디움(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)(GIT - 10% FCS)에 P3U1이 1ml당 2×10^5 개가 되도록 부유하고, 24 웰 멀티 디시(Linbro 제조)에 1 웰 1ml씩 168 웰에 파종한다. 파종 후 세포를 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 안에서 배양한다. 24시간 후 HAT(히포크산틴 1×10^{-4} M, 아미노프테린 4×10^{-7} M, 티미딘 1.6×10^{-3} M)를 함유한 GIT - 10% FCS 배지(HAT 배지)를 1 웰당 1ml씩 첨가함으로써 HAT 선택 배양을 개시한다. HAT 선택 배양은 배양 개시 5, 8일 후에 원래 액을 1ml 버린 후, 1ml HAT 배지를 첨가함으로써 계속하여 세포융합 후 9일째에 상등액을 채취한다.

배양상등액 내의 항체가 실시예 13에 기재된 방법에 준하여 실시한다. 즉, 항마우스 이뮤노 글로불린 항체 결합 마이크로 플레이트의 각 웰에 배양상등액 0.07ml 및 버퍼 EC 0.07ml를 첨가하고 4°C에서 밤새 반응시킨 후, 버퍼 C로 100배로 희석한 HRP 표지화 A 사슬 N 말단 펩티드 0.1ml를 비표지 A 사슬 N 말단 펩티드 0.002mM의 존재 하 또는 비존재 하 실온에서 7시간 반응시킨다. 이 플레이트를 PBS로 세정한 후 실시예 13에 기재된 방법에 따라 고상 상의 효소활성을 측정한다. 그 결과, 168 웰 중에서 특이적인 항체가 확인된 31 웰을 선택하고, 하이브리도마를 동결 보존한다. 또한, 5 웰의 하이브리도마, No.14, No.43, No.144, No.146 및 No.149는 희석법에 의한 클로닝에 공급된다. 클로닝시에는 피더 세포로 BALB/C 마우스의 흉선 세포를 웰당 5×10^5 개가 되도록 첨가한다. 클로닝 후 배양상등액 내의 항체를 동일한 방법에 따라 측정한다. 양성 클론은 No.14로부터는 33 웰 중 2 웰로, No.43으로부터는 28 웰 중 1 웰로, No.144로부터는 25 웰 중 23 웰로, No.149로부터는 58 웰 중 15 웰로, No.146으로부터는 288 웰 중 7 웰로 검출된다.

이들 클론 중에서 항A 사슬 N 말단 펩티드 모노클로날 항체 생산 하이브리도마로서 No.144 - 10(하이브리도마 HK4 - 144 - 10)을 선택한다.

실시예 15하이브리도마의 마우스 복수화 및 모노클로날 항체의 정제

하이브리도마, No.144 - 10의 마우스 복수화를 실시한다. 미리 미네랄 오일 0.5ml 가 복강내 투여된 마우스(BALB/C, 암컷)에 $1 \sim 3 \times 10^6$ 세포/마리의 상기 하이브리도마를 복강내 투여한 후 6 ~ 20일 후에 항체함유 복수를 채취한다. 모노클로날 항체는 수득된 복수로부터 프로테인 - A 칼럼으로 정제한다. 즉, 복수 약 25ml를 등량의 결합완충액(3.5M NaCl, 0.05% NaN₃을 함유하는 1.5M 글리신, pH 9.0)으로 희석한 후, 미리 결합완충액으로 평형화시킨 재조합 프로테인 - A - 아가로오스(Repligen사 제조) 칼럼에 공급하고, 특이 항체를 용리 완충액(0.05% NaN₃을 함유하는 0.1M 시트르산완충액, pH 3.0)으로 용출한다. 용출액은 PBS, pH 7.4에 대하여 4°C, 2일간 투석시킨 후, 0.22μm 필터(Millipore 제조)에 의해 제균 여과하고 4°C 또는 - 80°C에서 보존한다. 수득된 모노클로날 항체를 HK4 - 144 - 10으로 명명한다.

실시예 16AtT20 배양상등액으로부터의 신규 폴리펩티드(인간형)의 정제

10% FCS를 함유하는 DMEM 또는 5% FCS를 함유하는 OPTI - MEM에 0.5mg/ml G418를 첨가한 배지로 실시예 10에 기재된 신규 폴리펩티드(인간형) 전구체 발현 AtT20을 배양한다. 배양상등액 2L 분을 HK4 - 144 - 10 결합 트레실 토요펠 고상 3.2ml에 통과시키고 PBS, pH 7.4에서 세정한 후, 10ml 0.1% TFA(트리플루오로아세트산)를 함유하는 60% 아세토니트릴로 용출한다. HK4 - 144 - 10 결합 트레실 토요펠 고상은 125mg HK4 - 144 - 10 항체를 5g AF - T resyl Toyopearl(TOSOH사 제조)에 첨부된 지침서에 따라 결합시킨다. 용출액을 동결 건조시킨 후 0.5ml 0.1% TFA를 함유하는 40% 아세토니트릴에 용해시키고, 0.1% TFA를 함유하는 40% 아세토니트릴로 평형화시킨 TSK G300 OPW 칼럼(7.8 × 30mm, TOSOH사 제조)을 이용하는 겔 여과로 분리한다. 유속은 0.25ml/min으로 하고 2분간을 1 분획으로 모은다.

각 분획의 면역활성을 상기 실시예 15에 기재된 모노클로날 항체, HK4 - 144 - 10 및 실시예 12에 기재된 HRP 표지화 A 사슬 N 말단 펩티드를 사용하는 경쟁법 - EIA로 조사한다. 즉, 항마우스 이뮤노 글로불린 항체 결합 마이크로 플레이트에 0.05% CHAPS를 함유하는 버퍼 C(버퍼 CC)로 3ng/ml로 희석한 HK4 - 144 - 10, 0.05ml, 버퍼 CC에서 단계적(0, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10ng/ml)으로 희석된 A 사슬 N 말단 펩티드 또는 버퍼 CC에서 250배 희석된 상기 겔 여과 분획, 0.05ml 및 HRP 표지화 A 사슬 N 말단 펩티드(버퍼 CC에서 6000배 희석)를 0.05ml 첨가하고, 4°C에서 하루동안 반응시킨다. 반응 후 PBS, pH 7.4에서 세정한 후 고상 상의 효소활성을 상기 실시예 13에 기재된 방법으로 측정한다. 그 결과, 분획 No.19 - 21에 A 사슬 N 말단 펩티드의 표준 곡선으로부터의 계산값으로 약 1.8nmol 신규 폴리펩티드(인간형)의 면역활성이 검출된다.

동일한 조작에 의해 신규 폴리펩티드 전구체(인간형) 발현 AtT20 이외의 배양상등액 1L로부터도 약 0.8nmol 신규 폴리펩티드(인간형)의 면역활성이 분획 No.19 - 21로 검출된다.

다음으로, 합계 3L 배양상등액에서 부분 정제된 신규 폴리펩티드(인간형)(면역활성으로 약 2.6nmol)를 TSK ODS - 80TS 칼럼(4.6 × 250mm, TOSOH)으로 분리한다. 용리액의 아세토니트릴 농도는 17% - 38%의 직선 구배(0.05% TFA를 함유함)로 하고 40분간 상승시킨다. 유속 1ml/분으로 0.5분간을 1 분획으로 하여 모으고, UV 피크는 215nm 흡광도이고, 또 면역활성은 상기 결합법 EIA로 검출한다. 결과를 도 5에 나타낸다. 주요한 UV 피크, No.1, No.2 및 No.3은 각각 면역활성 분획 No.56, No.64 및 No.65에 일치한다. 이들 분획에 대해서 질량 분석(LCQduo, ThermoQuest사 제조) 및 아미노산서열 분석(491cLC, Applied Biosystems사 제조)을 실시한다. 그 결과, 분획 No.56의 질량 분석으로부터는 분자량 2459.9 값이, 그리고 아미노산 분석으로부터는 A 사슬 N 말단 배열, AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSer(서열번호:7의 N 말단(1 - 10) 부분 배열)이 수득된다. 이 분자량은 A 사슬의 환원형에서의 분자량 2463.8보다 약 4가 작기 때문에 분획 No.56에는 산화형 A 사슬이 단독으로 용출되어 있음을 알 수 있다. 한편, 분획 No.64의 질량 분석에서는 분자량 5500.5 값이 수득되고, 아미노산서열 분석에서는 B 사슬 N 말단 배열, ArgAlaAlaProTyrGlyValArgLeu(서열번호:8의 N 말단(1 - 9) 부분 배열) 및 A 사슬 N 말단 배열, AspValLeuAlaGlyLeuSerSerSer(서열번호:7의 N 말단(1 - 9) 부분 배열)의 혼합 배열이 수득된다. 이 분자량은 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬과 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬로 이루어지는 신규 폴리펩티드(인간형)의 분자량 5500.4에 거의 일치하기 때문에, 분획 No.64에는 당해 신규 폴리펩티드(인간형) 그 자체가 용출되어 있음을 알 수 있다. 또한, 분획 No.65의 질량 분석에서는 적어도 2종류의 성분이 검출되고, 주성분의 분자량은 5343.7, 부성분의 분자량은 5272.8이다. 신규 폴리펩티드(인간형)의 B 사슬의 N 말단 아미노산 Arg가 결손된 것 및 또한 Ala가 결손된 것의 분자량은 각각 5344.2 및 5273.1이고, 관측된 분자량에 거의 일치하기 때문에 주성분은 B 사슬의 N 말단 아미노산 Arg가 결손된 것, 부성분은 또한 Ala도 결손된 것으로 추정된다.

이상과 같은 결과에서 신규 폴리펩티드 전구체(인간형)으로부터 AtT20 세포에서 실제로 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬과 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬로 이루어지는 신규 폴리펩티드가 분비·생산됨이 확인되었다. 또한, 산화형 A 사슬이 단독으로 분비·생산될 수 있음도 밝혀진다.

실시에 17인간 신규 폴리펩티드 정제 제품의 인간 단구계 세포주 THP - 1 세포(Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)에 대한 세포내 고리형 아데노신 - 1인산(cAMP) 생산촉진작용

신규 폴리펩티드 전구체(인간형) 발현 AtT20 세포의 다른 로트(lot)의 배양상등액 3.5L로부터 상기 실시예 16에 기재된 방법에 따라 별도 정제된 신규 폴리펩티드(인간형)를 함유하는 분획을 동결 건조시키고, 200μl 완충액(PBS, 1% BSA, 0.05% CHAPS)를 첨가하여 용해시킨 것(농도 3.8 μM)을 인간 신규 폴리펩티드 정제 제품으로 다음 실험에 사용한다. 인간 단구계 세포주 THP - 1 세포를 10⁶ cells/ml가 되도록 배지A(DMEM/F12(1:1), 10mM HEPES(pH 7.5), 0.1% BSA, 0.1mM 3 - 이소부틸 - 1 - 메틸크산틴(IBMx))에 현탁시키고 그 세포 현탁액을 1.5ml 용적 마이크로튜브에 200μl씩 붓고 37°C에서 1시간 프리인큐베이트한다. 추가로 완충액 A에서 반응액당 희석 배수가 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸이 되도록 희석된 인간 신규 폴리펩티드 정제 제품 용액 25μl씩을 상기 세포 현탁액에 첨가하고, 다시 배지A에 용해된 폴스콜린(Wako Pure Chemical Industries Ltd.) 용액(최종농도 1 μM) 25μl씩을 상기 세포 현탁액에 첨가한 후 37°C에서 30분간 인큐베이트한다. 3,000rpm, 5분간, 4°C에서 원심함으로써 세포를 침전시키고 상등액을 버린 후, 배지 A를 1ml 첨가하여 세포를 현탁시킨다. 원심 분리(30,000rpm, 5분간, 4°C)하고 상등액을 버린 후, 250μl 배지A에 세포를 현탁시킨다. 이 현탁액에 20% 과염소산 용액 50μl를 첨가한 후 4°C에서 20분간 정치시킨다. 원심 분리(15,000rpm, 10분간, 4°C)한 후, 상등액 250μl를 다른 1.5ml 용적 마이크로튜브에 옮기고 60mM HEPES, 1.5M KOH 용액을 첨가하여 중화시킨 것을 cAMP 어세이용 샘플로 한다.

세포내 cAMP량은 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia)을 이용하고 키트 첨부된 프로토콜에 준하여 측정한다.

그 결과, 인간 신규 폴리펩티드 정제 제품은 THP - 1 세포에 대하여 농도 의존적으로 세포내 cAMP 생산량을 증가시키는 활성을 나타낸다(도 6).

실시에 18마이크로피지오미터에 의한 인간 신규 폴리펩티드 정제 제품의 THP - 1 세포주에 대한 세포자극작용의 해석

인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 THP - 1 세포주에 대한 세포자극작용을, 다음과 같은 마이크로피지오미터를 이용한 세포의 산성화율(Acidification Rate)의 측정으로 조사한다. 먼저, 미리 10% FCS함유 RPMI 1640 배지 내에서 부유 배양시킨 증식상태의 THP - 1 세포를 측정 배지(low buffered RPMI(Molecular Devices, Ltd.))에서 1×10^8 cell s/ml로 현탁시키고, 또한 아가로오스 셀 엔트랩 메디움(Molecular Devices, Ltd.)과 3대 1의 비율로 혼합된 액을 7 μ l 씩 각 캡슐캡(Molecular Devices, Ltd.) 중심에 붓는다. 아가로오스는 고화시킨 후 측정 배지에서 침지시키고 그 상태로 컵 위에 스페이서, 캡슐 인서트를 순서대로 넣고, 마지막에 측정 배지에서 인서트를 완전히 침지시킴으로써 측정용 캡슐을 완성시킨다. 이 캡슐은 바로 센서 챔버에 옮기고 사이트센서 마이크로피지오미터(CytosensorTM Microphysiometer, Molecular Devices, Ltd.) 본체에 장착한다. 챔버 내의 산성화율 측정 및 데이터 해석은 이 장치 부속의 어플리케이션 프로그램인 Cytosoft로 실시한다. 펌프 스피드는 측정 배지의 유속이 펌프 작동 중 100 μ l/분이 되도록 설정하고, 산성화율의 측정은 2분 30초의 각 펌프 사이클 중의 40초간의 인터벌마다 실시한다. 피검 시료로는 실시예 16에서 수득된 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품을 실시예 17에 기재된 완충액A(PBS, 1% BSA, 0.05% CHAPS)에 용해시킨 후 측정 배지로 500배 희석한 것을 사용한다. 이 희석액을 사이트센서의 2 유동로(flow path) 중 한 곳에 세팅했다. 밸브 전환에 따라 인간 신규 폴리펩티드 용액을 일정시간(7 분) 동안 세포에 노출시킨다. 산성화율의 변화는 각 시간에서의 산성화율을 세포 노출 전의 비율에 대한 백분율로 전환하여 비교한다. 그 결과 도 9에 나타난 바와 같이, 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품이 노출되면서 비율의 순간적인 증가가 관측된다. 따라서, 이 펩티드의 세포자극 활성이 검출된다.

실시예 19인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균주의 제조

실시예 3에서 수득된 인간 신규 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 단편을 함유하는 플라스미드인 pVHNC5Lh를 주형으로 하고, 서열번호:64로 표시되는 올리고 DNA(CCGGATCCATGCGGGCAGCGCCTTA)를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:65로 표시되는 올리고 DNA(ATCTCGACTGCCCCGAAGAACC)를 안티센스 사슬 프라이머로, 그리고 서열번호:66으로 표시되는 올리고 DNA(CAGTCGAATGGATGTCCTGGCTGGC)를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:67로 표시되는 올리고 DNA(CCGGATCCTAGCAAAGGCTACTGATTTCA)를 안티센스 사슬 프라이머로 각각 LA - Taq 폴리머라아제(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 PCR 반응을 실시한다. 반응종료액을 1.5% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고, 각각 반응에 따라 발생된 0.3kb 및 0.1kb DNA 단편을 겔에서 회수한다. 이들 DNA 단편을 제한효소 BamHI 및 TaqI로 자름으로써 말단에 BamHI 사이트 및 TaqI 사이트를 형성시킨다. pET - 11a(STRATAGENE) 발현 벡터를 BamHI로 자르고, Calf intestine phosphatase(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 탈인산화 처리한 후 반응종료액을 1% 아가로오스 겔을 사용하여 전기 영동하고, 5.5kb DNA 단편을 겔에서 회수한다. DNA Ligation Kit ver.2(Takara Shuzo Co., Ltd.)를 사용하여 이들 3개의 DNA 단편을 연결시킨 후 이 반응액을 E. coli JM109 Competent Cells(Takara Shuzo Co., Ltd.)에 첨가하여 형질 전환시킨다. 수득된 암피실린 내성 콜로니 중에서 상기 0.1kb 단편과 0.3kb 단편이 직렬로 연결된 0.4kb DNA 단편이 삽입된 플라스미드(pETVHMMh)를 유지한 클론을 선택한다. 이 플라스미드의 구축 과정을 도 7에 나타낸다.

삽입 DNA 단편의 염기서열을 확인한 후, 이 플라스미드를 Epicurian Coli BL21 - Gold(DE3) Competent Cells(STRATAGENE)에 도입함으로써, 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질을 위한 재조합 대장균주 Escherichia coli BL21 - Gold(DE3)/pETVHMMh를 수득한다. 이 융합단백질은 서열번호:68에 나타내는 전 399개의 염기서열에 의해 코딩되고, 14 아미노산으로 이루어지는 리더 펩티드 배열 - Met - B 사슬 - 프로세싱 프로테아제 인식배열(Arg - Trp - Arg - Arg) - C 사슬 - Met - A 사슬 순서대로 연결된 서열번호:69에 나타내는 133개 아미노산 잔기로 구성된다.

실시예 20인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균주에 의한 융합단백질의 발현

실시예 19에서 취득된 대장균주 에세리키아 콜리 (Escherichia coli) BL21 - Gold (DE3)/pETVHMMh를 50 μ g/ml 암피실린을 함유하는 B 배지 내에서 37°C에서 OD600이 0.5가 될 때까지 배양한 후, 최종농도 1mM이 되도록 이소프로필 - β - D - 티오갈락토포라노시드(IPTG)를 첨가하고 다시 3시간 동안 배양한다. 배양종료액을 원심 분리하여 집균하고 전체 균체 단백질을 추출한 후 SDS - PAGE로 분석한다.

그 결과, 도 8에 나타내는 바와 같이 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질에 상당하는 17KDa 단백질의 밴드가 IPTG 유도 하에서 확인된다. 본 실시예에 따라 배양된 대장균주 균체로부터 이 융합단백질을 밀봉체로 회수하고, 변성, 되감기로 올바른 조합으로 S-S 결합을 형성시킨 후, Met 잔기 C 말단측의 브롬화시안(CNBr)에 의한 화학적 절단, Arg-Tyr-Arg-Arg 배열 C 말단측의 한정 분해와 이로 인해 발생된 2개의 Arg 절단을 효소반응으로 실시함으로써 인간 신규 폴리펩티드 성숙체를 얻을 수 있다.

실시에 21인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균주로부터의 인간 신규 폴리펩티드 및 그 유도체의 조제

실시에 19에서 취득한 대장균주 에세리키아 콜리 (Escherichia coli) BL21 - Gold(DE3)/pETVHMMh를 실시에 20에 기재된 방법으로 배양하여 수득한 균체를 파쇄용 완충액(50mM Tris.HCl(pH 6.8), 5mM EDTA)에 현탁시키고, 초음파 처리(1분간 × 3회)를 실시한 후 원심 분리(15,000rpm, 20분간, 4°C)한다. 침전물을 세정용 완충액(50mM Tris.HCl(pH 6.8), 5mM EDTA, 4% Triton X-100)에 현탁시키고, 원심 분리(15,000rpm, 20분간, 4°C)한 후, 침전물을 재차 세정용 완충액에 현탁시키고 동일하게 원심 분리한다. 침전물을 증류수에 현탁시키고 동일하게 원심 분리하는 조작을 2회 실시한다. 이렇게 해서 수득한 침전물, 즉 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질을 함유하는 용입체를 가용화용 완충액(50mM Tris.HCl(pH 6.8), 4M 염산구아니딘, 5mM 2-메르캅토에탄올)에 용해시키고 이 가용화액을 재생용 완충액(50mM Tris.HCl(pH 8.0), 5mM EDTA, 5mM 환원형 글루타티온, 0.5mM 산화형 글루타티온, 0.8M 아르기닌 염산염)으로 20배로 희석한 후 4°C에서 하룻밤 교반한다. 이 용액을 원심 분리(15,000rpm, 15분간, 4°C)하여 수득된 상등액을 세팩 C-18(Waters, Inc.)을 사용하여 농축시킨 후 동결 건조시킨다. 이 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질을 함유하는 동결건조물로부터 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 TSKgel ODS-80Ts 칼럼을 사용하여 분획된 주 피크의 분획에 대해서 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 질량 분석을 실시한 결과, 수득된 측정 분자량의 값이 서열번호:69에 나타내는 133개 아미노산으로 구성되는 폴리펩티드 중 N 말단의 1 아미노산(Met)을 결실한 폴리펩티드인 (2-133)의 이론 분자량의 값과 일치한다(질량 분석값: 실측값:14156.9, 이론값:14157.0).

다음으로, 상기 폴리펩티드 (2-133)을 0.1N 염산과 5% 브롬화시안(CNBr)의 존재 하에서 실온, 어두운 곳에서 하룻밤 인큐베이션시킴으로써 화학적으로 분해시킨다. 이 분해반응 산물로부터 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 TSKgel ODS-80Ts 칼럼을 사용하여 분획된 주 분해 산물의 분획에 대해서 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 질량 분석을 실시한 결과, 이 때의 측정 분자량의 값이 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬의 C 말단에 11 아미노산(ArgArgSerAspIleLeuAlaHisGluAlaHse)이 부가된 펩티드와 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬로 구성되는 폴리펩티드 ((16-53)/(110-133))의 이론 분자량의 값과 일치한다(질량 분석값: 실측값:6732.9, 이론값:6732.8).

상기 폴리펩티드 (16-53)/(110-133)을 기질로 하고 트립신(Boehringer Mannheim)과 카르복시펩티다아제(CPB)(Boehringer Mannheim)의 존재 하(각각 효소/기질(중량비)=1/1000), 0.1M Tris.HCl(pH 8.5)을 함유하는 반응액 내에서 37°C, 45분간 인큐베이션한 후 반응생성물을 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 TSKgel ODS-80Ts 칼럼을 사용하여 분획한다(도 10). 31.681 분으로 용출된 분획에 대해서 실시에 16에 기재된 방법에 준하여 질량 분석을 실시한 결과, 측정 분자량의 값이 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬과 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬로 구성되는 폴리펩티드인 ((16-42)/(110-133)), 즉 인간 신규 폴리펩티드의 이론 분자량의 값과 일치한다(질량 분석값: 실측값:5500.3, 이론값:5500.4). 이 분획에 대해서 추가로 아미노산서열을 분석하고 환원한 후에 발생된 2개의 펩티드 질량을 분석한다. 그 결과, 이 분획의 아미노산서열 분석에 의해 B 사슬 N 말단 배열, ArgAlaAlaProTyr(서열번호:8의 N 말단(1-5) 부분 배열)과 A 사슬 N 말단 배열, AspValLeuAlaGly(서열번호:7의 N 말단(1-5) 부분 배열)의 혼합 배열이 수득된다. 또, 이 분획을 환원한 후에 발생된 발생된 2개의 펩티드 질량 분석에 의해 수득된 측정 분자량의 값이 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬의 이론 분자량의 값(질량 분석값: 실측값:3043.1, 이론값:3042.6)과 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬의 이론 분자량의 값(질량

분석값: 실측값:2463.1, 이론값:2463.8)과 일치한다.

이상과 같은 결과에서, (16-53)/(110-133)을 트립신과 CPB로 처리함으로써, 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬과 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬로 구성되는 폴리펩티드 (16-42)/(110-133), 즉 인간 신규 폴리펩티드가 수득됨이 밝혀진다.

또, 후술하는 실시예 22에서 사용되는 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열을 갖는 B 사슬의 C 말단으로부터 1 아미노산(Trp)을 결실한 펩티드와 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열을 갖는 A 사슬로 구성되는 폴리펩티드 (16-41)/(110-133)도 상기 과정에서 부산물로 수득된다.

실시에 22인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균주로 조제된 인간 신규 폴리펩티드 및 그 유도체의 THP-1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산촉진작용

실시에 17에 기재된 방법에 준하여 인간 신규 폴리펩티드 융합단백질 발현 재조합 대장균주로 조제된 인간 신규 폴리펩티드 및 그 유도체의 THP-1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산에 대한 효과를 조사한다. 유도체는 (16-53)/(110-133) 이외에 폴리펩티드 (16-41)/(110-133)에 대해서 조사한다. 그 결과, 인간 신규 폴리펩티드[폴리펩티드 ((16-42)/(110-133))](도 11) 및 그 유도체(도 12)는 모두 농도 의존적으로 세포내 cAMP 생산량을 증가시키는 활성을 나타낸다.

또, 인간 신규 폴리펩티드와 B 사슬 C 말단 배열이 다른 인간 신규 폴리펩티드 유도체에서 활성 강도를 비교하면, (16-53)/(110-133) > (16-42)/(110-133) (인간 신규 폴리펩티드) > (16-41)/(110-133) 순서대로 강하다.

이 결과에서 B 사슬 C 말단 배열이 활성에 중요함이 밝혀진다.

실시에 23인간 신규 폴리펩티드에 의한 정상 인간 폐선유아 세포주 CCD-19Lu(ATCC CCL-210)에서의 매트릭스 메탈로프로티나아제-1(MMP-1) 및 혈관 내피세포 증식인자(VEGF) 유전자의 발현촉진작용

정상 인간 폐선유아 세포주 CCD - 19Lu를 10^6 cells/ml가 되도록 배지 B(Minimum Essential Medium with Earle's Salts(GIBCO - BRL사), 100 μ M MEM Non - Essential Amino Acids(GIBCO - BRL사), 10% FCS, 100U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신)에 현탁시키고, 이 세포 완충액을 6 웰 플레이트의 1 웰당 2ml씩 붓고 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 배양한다. 세포가 confluent에 도달한 지점에서 2ml 배지 C(Minimum Essential Medium with Earle's Salts(GIBCO - BRL사), 100 μ M MEM Non - Essential Amino Acids(GIBCO - BRL사), 100U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 0.025% CHAPS, 0.2% BSA)에서 세포를 2회 세정한 후, 배지 C를 2ml씩 넣고 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 다시 24시간 동안 배양한다. 배지를 흡인 제거하고 배지 C를 1ml씩 첨가한 후 배지 C로 웰당 최종농도의 2배 농도로 조제된 인간 신규 폴리펩티드 용액을 1ml씩 첨가하고, 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 24시간 동안 배양한다. 이렇게 처리된 세포로부터 트리졸 시약(GIBCO BRL사)을 사용하여 제조사 추천의 프로토콜에 준하여 전체 RNA를 추출한 후, TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.2.1(Takara Shuzo Co., Ltd.)을 사용하여 키트 첨부 프로토콜에 준하여 역전사 반응을 실시함으로써 cDNA를 합성한다. CCD - 19Lu 세포주에서의 MMP - 1, VEGF 및 하우스키퍼 유전자인 글리세르알데히드3 - 인산탈수소효소(G3PDH) 유전자 발현량의 측정에는 모두 이 역전사 반응액을 주형 DNA로 사용하고, TaqMan PCR Core Reagents Kit with AmpliTaq Gold(Applied Biosystems사)를 사용하여 키트 첨부 프로토콜에 따라 ABI PRISM 7700(Applied Biosystems사)를 사용하는 TaqMan PCR법으로 실시한다. 이 때 인간 MMP - 1 유전자 발현량의 측정에는, 서열번호:70으로 표시되는 올리고 DNA를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:71로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로, 그리고 서열번호:72로 표시되는 올리고 DNA의 5' 말단에 리포터 색소로서 Fam을, 3' 말단에 켄처 색소로서 Tamra를 결합한 것을 TaqMan 프로브로 사용한다. 인간 VEGF 유전자 발현량의 측정에는, 서열번호:73으로 표시되는 올리고 DNA를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:74로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로, 그리고 서열번호:75로 표시되는 올리고 DNA의 5' 말단에 리포터 색소로서 Fam을, 3' 말단에 켄처 색소로서 Tamra를 결합시킨 것을 TaqMan 프로브로 사용한다. 인간 G3PDH 유전자 발현량의 측정에는, 서열번호:76으로 표시되는 올리고 DNA를 센스 사슬 프라이머로, 서열번호:77로 표시되는 올리고 DNA를 안티센스 사슬 프라이머로, 그리고 서열번호:78로 표시되는 올리고 DNA의 5' 말단에 리포터 색소로서 Fam을, 3' 말단에 켄처 색소로서 Tamra를 결합한 것을 TaqMan 프로브로 사용한다.

PCR 반응은 처음에 50°C에서 2분간 보온한 후 계속해서 95°C에서 15초 및 60°C에서 1분을 1 사이클로 하여 40 사이클 각 반응을 반복하는 프로그램으로 실시한다.

그 결과 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품은 MMP - 1 및 VEGF 유전자 발현량의 G3PDH의 그것에 대한 상대비를 증가시킨다(도 13). 이런 점에서 정상 인간 폐선유아 세포주 CCD - 19Lu에서 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품이 MMP - 1 및 VEGF 유전자 발현을 촉진시키는 작용을 갖고 있음이 밝혀진다.

실시에 24인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 THP - 1 세포에 대한 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 유전자의 발현촉진 작용

인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 THP - 1 세포에 대한 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 유전자의 발현에 대한 영향을 다음과 같은 요령으로 조사한다.

먼저, 증식기에 있는 THP - 1 세포를 5×10^4 cells/ml가 되도록 10% FCS 함유 RPMI - 1640 배지에 현탁시키고, 0.4ml씩 24 웰 배양플레이트에 붓는다. 다음으로, 이 배지로 소정 농도로 희석한 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품(실시에 21과 동일한 로트(lot))을 각 웰에 0.1ml씩 첨가 혼합한 후, 이 배양플레이트 내에서 이 세포를 37°C, 24시간 동안 배양한다. 이렇게 처리된 각 세포로부터 RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 바로 total RNA를 회수한 후, THER MOSCRIPT™ RT - PCR System(Lifetech Oriental)을 이용하여 역전사 반응을 실시하여 먼저 cDNA를 합성한다. 유전자 발현의 정량은 실시에 23 방법에 준하여 이 cDNA를 주형 DNA로 한 TaqMan™ PCR(Applied Biosystems)을 실시하여 생성되는 타깃 특이적 시그널을 ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems(Applied Biosystems)으로 검출함으로써 실시한다.

그 결과 도 16에 나타내는 바와 같이 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품은 G3PDH 유전자 발현량에 대한 VEGF 유전자 발현량의 상대비를 상승시켜 VEGF 유전자 발현을 촉진하는 활성을 갖고 있다.

실시에 25인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 인간 정상 피부선유아 세포주 NHDF 세포에 대한 cAMP 생산촉진작용

인간 정상 피부선유아 세포주 NHDF 세포(Bio Whittaker사)를 10^5 cells/ml가 되도록 배지 D(선유아 세포 배지 키트(Bio Whittaker사))에 현탁시키고, 이 세포 완충액을 1ml씩 24 웰 플레이트에 붓고 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 2일간 배양한다. 실시예 17에 기재된 1ml 배지A로 세포를 2회 세정하고 0.4ml 배지A를 첨가한 후, 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 1일간 배양한다. 실시예 17에 기재된 완충액 A에서 반응할 때의 최종농도의 10배 농도가 되도록 조제된 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품 용액 50 μ l 및 배지A에 용해된 10 μ M 폴스콜린(Wako Pure Chemical Industries Ltd.) 용액 50 μ l를 상기 세포 현탁액에 첨가하고, 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 30분간 인큐베이트한다. 1ml 배지A로 세포를 2회 세정하고 0.5ml 배지A를 첨가한 후, 100 μ l 20% 과염소산 용액을 첨가하고 4°C에서 20분간 정치시킨다. 이 세포 추출액을 1.5ml 용적 마이크로튜브에 옮기고 원심 분리(15,000rpm, 20분간, 4°C)한다. 500 μ l 상등액을 다른 1.5ml 용적 마이크로튜브에 옮기고 60mM HEPES, 1.5M KOH 용액을 첨가하여 중화시킨 것을 cAMP 어세이용 샘플로 한다. 세포내 cAMP량은 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia)을 이용하여 키트 첨부부의 프로토콜에 준하여 측정한다.

그 결과, 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품은 NHDF 세포에 대하여 농도 의존적으로 세포내 cAMP 생산량을 증가시키는 활성을 나타낸다(도 14).

실시예 26인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 래트 하수체 전엽 초대 배양세포에 대한 cAMP 생산촉진작용

위스터 래트(생후 8주된 수컷) 32마리를 무마취 하에서 단두하고 적출한 하수체 전엽을 완충액 B(137mM 염화나트륨, 5mM 염화칼륨, 0.7mM 인산수소2나트륨, 25mM HEPES(pH 7.3), 50 μ g/ml 황산겐타마이신)가 들어가 있는 페트리 디쉬에 넣고 완충액 B에서 1회 세정한다. 이것을 가위로 4 분할하여 다시 2회 세정한 후, 하수체편을 30ml 효소액 I (0.4% 콜라게나아제A(Boehringer Mannheim), 0.4% 소 혈청 알부민, 10 μ g/ml 디옥시리보뉴클레아제 I (Sigma), 0.2% 글루코오스를 함유하는 완충액 B) 내에서 진탕하면서 37°C에서 인큐베이트한다. 조직편을 코마고메 (Komagome) 피펫으로 분산시키고 원심 분리(480 $\times$ g, 6분간)하여 상등액을 제거한다. 침전물을 30ml 효소액 II (0.25% 판크레아틴 (Sigma)을 함유하는 완충액 B)에 현탁시키고 진탕하면서 37°C에서 8분간 인큐베이트한다. 2ml 소 태아 혈청을 첨가하고 다시 원심 분리(480 $\times$ g, 6분간)한 후 상등액을 제거한다. 침전물에 10ml 배지 D(10% 소 태아 혈청, 20mM HEPES(pH 7.3), 50U/ml 페니실린G, 50 μ g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 Dulbecco modified Eagles Medium(DMEM))를 첨가하여 현탁시키고 나일론 메시를 사용하여 여과한다. 10ml 배지 D로 다시 2회 세정한 후, 세포 수를 측정하여 세포를 1.8×10^5 cells/ml가 되도록 배지 D에 부유시킨다. 세포 부유액을 1ml씩 24 웰 플레이트의 각 웰에 붓고 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 3일간 배양한다. 1ml 배지E(실시예 17에 기재된 배지A 중 IBMX 농도를 1 mM으로 한 것)로 세포를 2회 세정하고 0.45ml 배지E를 첨가한 후, 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 1시간 동안 인큐베이트한다. 실시예 17에 기재된 완충액A에서 반응할 때의 최종농도의 10배 농도가 되도록 조제된 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품 용액 50 μ l를 상기 세포 현탁액을 첨가하고, 37°C에서 5% 탄산가스 인큐베이터 내에서 30분간 인큐베이트한다. 1ml 배지E로 세포를 2회 세정하고 0.5ml 배지E를 첨가한 후 100 μ l 20% 과염소산 용액을 첨가하고 4°C에서 20분간 정치시킨다. 이 세포 추출액을 1.5ml 용적 마이크로튜브에 옮기고 원심 분리(15,000rpm, 10분간, 4°C)한다. 500 μ l 상등액을 다른 1.5ml 용적 마이크로튜브에 옮기고 60mM HEPES, 1.5M KOH 용액을 첨가하여 중화시킨 것을 cAMP 어세이용 샘플로 한다. 세포내 cAMP량은 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia)을 이용하여 키트 첨부부의 프로토콜에 준하여 측정한다.

그 결과, 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품은 래트 하수체 전엽 초대 배양세포에 대하여 농도 의존적으로 세포내 cAMP량을 증가시키는 활성을 나타낸다(도 15).

실시예 27인간 신규 폴리펩티드 정제 표품의 마우스 폐포 매크로파지에 대한 cAMP 생산촉진작용

마우스 폐포 매크로파지는 님브탈(Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)을 투여하여 마취된 BALB/C 마우스(생후 8 주된 암컷)로부터 항크스 (Hank's) 액(Lifetech Oriental)을 사용한 폐포 세정액을 공지 방법으로 회수함으로써 취득한다. 이 폐포 매크로파지 세포는 5×10^4 개씩 24 웰 배양플레이트에 파종하고, 10% FCS 함유 RPMI - 1640 배지 내에서 37°C, 2시간 동안 정치 배양하고, 세포를 배양플레이트 바닥면에 부착시킨다. 다음으로, 10% FCS와 50 μ M IBM X를 함유하는 RPMI - 1640 배지에 배지 교환하고, 여기에 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품(신규 폴리펩티드 전구체(인간형) 발현 AtT20 세포로부터 상기 실시예 16에 기재된 방법에 따라 별도로 정제되고, 실시예 17에 기재된 완충액 A에서 농도 5.0 μ M로 용해한 것)을 최종 농도 100nM이 되도록 첨가한 후 세포를 다시 37°C, 45분간 정치 배양한다. 이렇게 처리된 세포의 세포내 cAMP량은 cAMP EIA System(Amersham Pharmacia)을 이용하여 이 키트의 프로토콜에 준하여 측정한다.

그 결과, 인간 신규 폴리펩티드 정제 표품이 첨가된 마우스 폐포 매크로파지에서는 미첨가 대조군과 비교하여 약 1.4배의 세포내 cAMP량의 상승이 확인된다.

실시예 28마우스 모노클로날 항체, HK4 - 144 - 10의 클래스, 서브클래스의 결정

상기 실시예 15에 기재된 마우스 모노클로날 항체, HK4 - 144 - 10의 클래스, 서브클래스는 시판되는 항혈청(Bio - Rad사 제조)을 사용하는 EIA로, IgG1, κ 로 결정된다.

실시예 29인간 신규 폴리펩티드 유전자의 동물세포 발현 벡터의 구축

인간 신규 폴리펩티드 유전자를 COS - 7 세포 내에서 발현시키기 위한 발현 벡터의 구축을 실시한다. COS - 7 세포는 폴리펩티드 전구체의 프로세싱에 필요한 프로세싱 효소 PC1을 발현시키지 않기 때문에, 폴리펩티드 전구체 A 사슬 앞의 PC1 프로세싱 인식배열(Arg - Xaa - Xaa - Arg)을, 프로세싱 효소 furin에 의해 인식 프로세싱되는 배열(Arg - Xaa - Arg - Xaa - Arg - Arg)로 치환하고, 또 인간 furin을 동시에 발현시키는 발현 플라스미드를 구축한다. 이 때 furin 발현 산물을 분비 단백질로 수득할 수 있도록 C 말단 부분의 막 관통영역에 상당하는 부분을 제거하여 검출을 더 쉽게 하기 위해서 그 C 말단측에 6 아미노산 잔기로 이루어지는 His - tag 배열을 도입한다.

인간 furin cDNA는 인간 췌장 cDNA(Clontech사)를 주형으로 하고 인간 furin 단백질의 번역 개시 부분에 상당하는 합성 DNA(서열번호:79)와 furin 단백질의 ⁵⁹⁵ Ala까지의 아미노산서열에 계속해서 His - His - His - His - His - His 배열, 종지 코돈이 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:80), Pfu DNA polymerase(Stratagene사)를 사용하여 PCR(반응조건: 94°C 1분 → (98°C 10초 → 68°C 3분30초) × 25회 → 72°C 10분 → 4°C)을 실시하여 DNA 단편을 수득한다. 이 DNA 단편을 제한효소 BlnI(Takara Shuzo Co., Ltd.)로 자른 후 pCAN618의 BlnI 부위에 도입하고 먼저 분비형 furin/His - tag 발현 플라스미드를 구축한다.

다음으로, 인간 신규 폴리펩티드 유전자를 코딩하고 있는 cDNA 단편을 주형으로 하고 번역 개시 코돈의 ATG 직전에 MfeI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:81)와 인간 신규 폴리펩티드 유전자의 C 말단측을 코딩하는 배열, 계속해서 종지 코돈이 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:82), Pfu DNA polymerase(Stratagene사)를 사용하여 PCR(반응조건: 95°C 1분 → (98°C 10초 → 68°C 35초) × 25회 → 72°C 5분 → 4°C)을 실시하여, 인간 신규 폴리펩티드 유전자의 ORF를 함유하고¹¹³ Val →¹¹³ Arg, ¹¹⁷ Ser →¹¹⁷ Arg의 아미노산 치환을 수반한 DNA 단편을 수득한다. 이 DNA 단편을 제한효소 MfeI(New England Biolabs)로 자른 후, 상기에서 수득한 분비형 furin/His - tag 발현 플라스미드의 EcoRI, 평활말단화된 NotI 부위에 도입하고, A 사슬 앞에 furin에 의해 인식 프로세싱되는 배열(Arg - Leu - Arg - Gly - Arg - Arg)을 갖는 인간 신규 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 (co - expression)벡터 pCAN618/hVH1,3을 수득한다.

동시에, 대조군으로 아미노산 치환을 실시하지 않은 상태대로의 인간 신규 폴리펩티드 전구체 단백질/furin - His - tag 공발현 벡터를 동일한 방법으로 구축한다.

인간 신규 폴리펩티드 유전자를 코딩하고 있는 cDNA 단편을 주형으로 하고 번역 개시 코돈의 ATG 직전에 MfeI 제한 효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:81)와 인간 신규 폴리펩티드 유전자의 C 말단측을 코딩하는 배열, 계속해서 종시 코돈 NotI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:83), Pfu DNA polymerase(Stratagene사)를 사용하여 PCR(반응조건: 95°C 1분 →(98°C 10초 →68°C 35초) ×25회 →72°C 5분 →4°C)을 실시하여 인간 폴리펩티드 전구체의 ORF를 함유하는 DNA 단편을 수득한다. 이 DNA 단편을 제한효소 MfeI(New England Biolabs), NotI(New England Biolabs)로 이중으로 자른 후, 상기에서 수득한 분비형 furin/His - tag 발현 플라스미드의 EcoRI, NotI 부위에 도입하고, 인간 신규 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/hVH1,4를 수득한다.

실시에 30마우스 신규 폴리펩티드 유전자의 동물세포 발현 벡터의 구축

마우스 신규 폴리펩티드 유전자를 COS - 7 세포 내에서 발현시키기 위한 발현 벡터의 구축을 상기 실시예 29와 동일한 수법으로 실시한다.

마우스 신규 폴리펩티드 유전자를 코딩하고 있는 cDNA 단편을 주형으로 하고 번역 개시 코돈의 ATG 직전에 EcoRI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:84)와 마우스 신규 폴리펩티드 유전자의 C 말단측을 코딩하는 배열, 계속해서 종시 코돈 NotI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:85), Pfu DNA polymerase(Stratagene사)를 사용하여 PCR(반응조건: 95°C 1분 →(98°C 10초 →68°C 35초) ×25회 →72°C 5분 →4°C)을 실시하여 마우스 폴리펩티드 전구체의 ORF를 함유하고, ¹¹² Val →¹¹² Arg, ¹¹⁶ Ser →¹¹⁶ Arg의 아미노산 치환을 수반한 DNA 단편을 수득한다. 이 DNA 단편을 제한효소 EcoRI, NotI(New England Biolabs)로 이중으로 자른 후, 상기 실시예 29에서 수득한 분비형 furin/His - tag 발현 플라스미드의 EcoRI, NotI 부위에 도입하고, A 사슬 앞에 furin에 의해 인식 프로세싱되는 배열(RVRGRR)을 갖는 마우스 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/mVH1,3을 수득한다.

동시에, 대조군으로 아미노산 치환을 실시하지 않은 상태대로의 마우스 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터를 동일한 방법으로 구축한다.

마우스 신규 폴리펩티드 유전자를 코딩하고 있는 cDNA 단편을 주형으로 하고 번역 개시 코돈의 ATG 직전에 EcoRI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:84)와 마우스 신규 폴리펩티드 유전자의 C 말단측을 코딩하는 배열, 계속해서 종시 코돈 NotI 제한효소 부위가 오도록 설계한 합성 DNA(서열번호:86), Pfu DNA polymerase(Stratagene사)를 사용하여 PCR(반응조건: 95°C 1분 →(98°C 10초 →68°C 35초) ×25회 →72°C 5분 →4°C)을 실시하여 폴리펩티드 전구체의 ORF를 함유하는 DNA 단편을 수득한다. 이 DNA 단편을 제한효소 EcoRI, NotI(New England Biolabs)로 이중으로 자른 후, 상기 실시예 29에서 수득한 분비형 furin/His - tag 발현 플라스미드의 EcoRI, NotI 부위에 도입하고, 마우스 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/mVH1,2를 수득한다.

실시에 31신규 폴리펩티드 성숙체의 COS - 7 배양상등액 내로의 분비 발현

신규 폴리펩티드 성숙체가 배양상등액 내로 분비 발현되고 있음을 확인하기 위해서, COS - 7 세포에 상기 실시예 29 및 실시예 30에서 제조된 인간 폴리펩티드 전구체 발현 벡터를 도입하여 배양상등액 내의 성숙 펩티드를 EIA로 측정한다. 상기 실시예 29에서 제조된 발현 벡터를 트랜스펙션하기 전날에 4×10^5 cells/well이 되도록 6 웰 플레이트에 파종하고, 10% FBS(Hyclone)를 함유하는 DMEM 배지(Gibco - BRL)에서 24시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내에서 배양한다. 실시예 29에서 제조된 발현 벡터 및 pCAN618과 FuGENE6(Roche Diagnostics)을 사용하여 트랜스펙션을 실시한 후, 24 시간 후에 1ml 0.1mM 4 - (2 - aminoethyl benzen sulfonyl fluolide(pABSF)(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)와 0.05% CHAPS(Dojin Kagaku)을 함유하는 DMEM(Phenol Red) 배지(Gibco - BRL)에 배지 교환을 실시하고, 48시간 동안 계속 배양한다. 배양상등액은 eppendorf 샘플 튜브에 옮기고 원심하여 부유되어 있는 세포를 제거한 후, 이 원액을 그대로 EIA의 검정에 사용한다. EIA는 실시예 16에 기재된 경합법에 준하여 실시한다(도 17).

그 결과, A 사슬 앞에 furin에 의해 인식 프로세싱되는 배열(RLRGRR)을 갖는 인간 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/hVH1,3을 도입한 COS - 7 세포 배양상등액 내에는 약 35nM 면역반응성을 갖는 폴리펩티드가, 마우스 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/mVH1,3을 도입한 COS - 7 세포 배양상등액 내에는 약 41nM 면역반응성을 갖는 폴리펩티드가 존재함이 판명되었다.

실시에 32COS - 7 세포 배양상등액 내에 존재하는 신규 폴리펩티드의 THP - 1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산촉진작용

실시에 31에서 면역반응성을 갖는 인간 폴리펩티드가 COS - 7 세포 배양상등액 내에 분비 발현되는 것이 확인되므로, 이 생물활성을 확인하기 위해서 배양상등액 원액을 사용하여 실시예 17에 나타난 방법으로 THP - 1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산촉진작용을 확인한다(도 18).

그 결과, A 사슬 앞에 furin에 의해 인식 프로세싱되는 배열(RLRGRR)을 갖는 인간 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/hVH1,3을 도입한 COS - 7 세포 배양상등액을 첨가한 경우 대조군에 비해 약 1.8배의, 마우스 폴리펩티드 전구체/furin - His - tag 공발현 벡터 pCAN618/mVH1,3을 도입한 COS - 7 세포 배양상등액을 첨가한 경우 약 1.6배의 THP - 1 세포에 대한 세포내 cAMP 생산촉진작용이 있음이 판명되고, 생물활성을 갖는 신규 폴리펩티드가 생산되고 있음이 밝혀진다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 DNA는, 예컨대 탄수화물 등의 에너지원의 대사조절(당대사, 지질대사 등) 이상(예컨대, 당뇨병 등), 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상(예컨대, 강피증 등), 조직의 선유화(예컨대, 간경변·폐선유증, 강피증 또는 신선유증 등), 순환기 장애(말초동맥질환, 심근경색 또는 심부전 등), 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환 및 알러지 등과 같은 면역계 질환, 혈관신생 장애 등과 같은 각종 질병의 진단, 치료, 예방에 사용할 수 있다. 또, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드 활성을 촉진하거나 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝을 위한 시약으로 유용하다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체는 본 발명의 폴리펩티드를 특이적으로 인식할 수 있으므로, 피검액 내의 본 발명의 폴리펩티드의 검출, 정량, 중화 등에 사용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열인 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 3.

서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열인 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 5.

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 6.

서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그 아마이드 또는 그 에스테르 및 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그 아마이드 또는 그 에스테르가 디설피드 결합으로 결합되어 있는 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 7.

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 서열번호:7로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:19 또는 서열번호:47로 표시되는 아미노산서열이고, 서열번호:8로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:21 또는 서열번호:49로 표시되는 아미노산서열인 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 8.

제 1 항 또는 제 3 항에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 DNA.

청구항 9.

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 서열번호:3으로 표시되는 아미노산서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 아미노산서열을 함유하는 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 실질적으로 동일한 아미노산서열이 서열번호:17, 서열번호:23, 서열번호:45 또는 서열번호:51로 표시되는 아미노산서열인 폴리펩티드, 그의 아마이드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염.

청구항 11.

제 8 항에 있어서, 제 9 항에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 함유하는 DNA.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, 서열번호:12, 서열번호:18, 서열번호:24, 서열번호:46 또는 서열번호:52로 표시되는 염기서열을 갖는 DNA.

청구항 13.

제 8 항에 기재된 DNA를 함유하는 재조합 벡터.

청구항 14.

제 13 항에 기재된 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체.

청구항 15.

제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드를 제 14 항에 기재된 형질전환체를 배양하여 생성시키는 것을 특징으로 하는, 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 제조법.

청구항 16.

제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염에 대한 항체.

청구항 17.

제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 사용하는 것을 특징으로 하는, 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법.

청구항 18.

제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 함유하는, 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염의 스크리닝용 키트.

청구항 19.

제 17 항에 기재된 스크리닝 방법 또는 제 18 항에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는, 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염.

청구항 20.

제 17 항에 기재된 스크리닝 방법 또는 제 18 항에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는, 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염을 함유하는 의약.

청구항 21.

제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염을 함유하는 의약.

청구항 22.

제 16 항에 기재된 항체를 함유하는 의약.

청구항 23.

①제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ② 제 19 항에 기재된 화합물 또는 그 염, 또는 ③제 16 항에 기재된 항체를 함유하는 대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료제.

청구항 24.

제 23 항에 있어서, 간경변·폐선유증, 강피증, 신선유증 또는 말초동맥질환의 예방·치료제인 제.

청구항 25.

제 16 항에 기재된 항체를 함유하는 진단제.

청구항 26.

대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료작용을 갖는 의약을 제조하기 위한, ①제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ②제 17 항에 기재된 스크리닝 방법 또는 제 18 항에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염, 또는 ③제 16 항에 기재된 항체의 용도.

청구항 27.

①제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염, ② 제 17 항에 기재된 스크리닝 방법 또는 제 18 항에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 수득되는 제 1 항, 제 3 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드, 그의 아미드 또는 그의 에스테르 또는 그의 염의 활성을 촉진하거나 또는 저해하는 화합물 또는 그 염, 또는 ③제 16 항에 기재된 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 특징으로 하는 대사조절 이상, 조직의 성장·증식·분화 저해, 생식기능의 기능 저하, 결합조직의 형성 이상, 조직의 선유화, 순환기 장애, 내분비 장애, 체액 균형 이상, 중추성 질환, 면역계 질환, 혈관신생 장애의 예방·치료방법.

도면

도면 1

ATG GCC AGG TAC ATG CTG CTG CTG CTC CTG GCG GTA TGG GTG CTG ACC GGG GAG 54
Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr Gly Glu 18

CTG TGG CCG GGA GCT GAG GCC CGG GCA GCG CCT TAC GGG GTC AGG CTT TGC GGC 108
Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly 36

CGA GAA TTC ATC CGA GCA GTC ATC TTC ACC TGC GGG GGC TCC CGG TGG AGA CGA 162
Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg 54

TCA GAC ATC CTG GCC CAC GAG GCT ATG GGA GAT ACC TTC CCG GAT GCA GAT GCT 216
Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala 72

GAT GAA GAC AGT CTG GCA GGC GAG CTG GAT GAG GCC ATG GGG TCC AGC GAG TGG 270
Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp 90

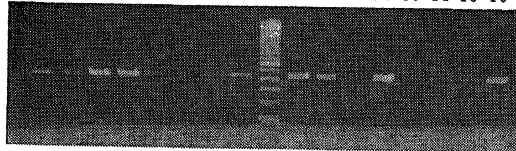
CTG GCC CTG ACC AAG TCA CCC CAG GCC TTT TAC AGG GGG CGA CCC AGC TGG CAA 324
Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln 108

GGA ACC CCT GGG GTT CTT CCG GGC AGC CGA GAT GTC CTG GCT GGC CTT TCC AGC 378
Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser 126

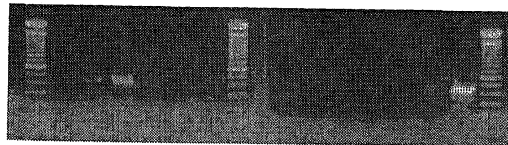
AGC TGC TGC AAG TGG GGG TGT AGC AAA AGT GAA ATC AGT AGC CTT TGC TAG 429
Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys *** 142

도면 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



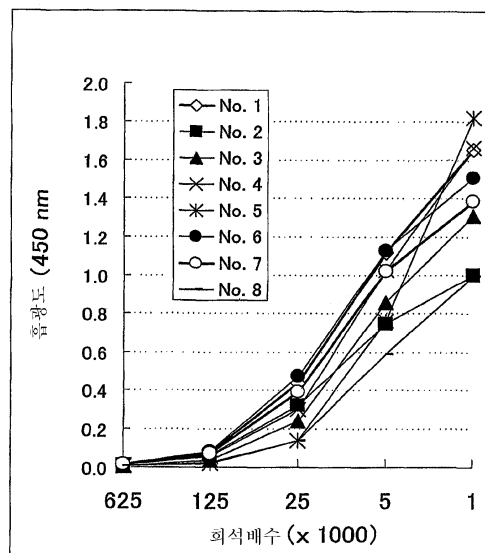
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29



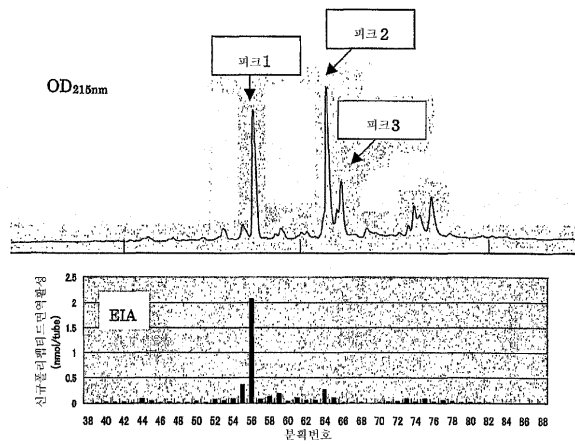
도면 3

인간 프로모터	MA-RYMLL	LLLA	VWV	LTG	ELW	PC	AA	AA	28
마우스 프로모터	MAMLG	-	LLLA	SWAL	GLG	Q	AA	AA	27
랫 프로모터	MATR	G	-	LLLA	SWAL	GLG	Q	AA	26
돼지 프로모터	MAKR	P	LLLA	VWV	L	CS	EW	KT	29
인간 프로모터	PYGV	RL	CG	RE	IR	AV	I	FT	57
마우스 프로모터	PYGV	KL	CG	RE	IR	AV	I	FT	56
랫 프로모터	PYGV	KL	CG	RE	IR	AV	I	FT	55
돼지 프로모터	PYGV	KL	CG	RE	IR	AV	I	FT	58
인간 프로모터	LAHE	AM	CD	TF	PD	AD	DE	DS	86
마우스 프로모터	LAHE	SL	GD	FF	AD	GE	AN	TD	85
랫 프로모터	LAHD	PL	GD	FF	AD	GE	AN	TD	84
돼지 프로모터	LAHE	AL	GD	VFS	D	TS	NA	DS	84
인간 프로모터	SSEN	LA	LT	KS	FP	QA	FY	YR	113
마우스 프로모터	SSEN	LA	LT	KS	FP	QA	FY	YR	114
랫 프로모터	SSEN	LA	LT	KS	FP	QA	FY	YR	113
돼지 프로모터	SSEN	LA	LT	KS	FP	QA	FY	YR	113
인간 프로모터	GSRD	VL	AG	LS	SS	CC	KN	GC	142
마우스 프로모터	GSRD	VL	AG	LS	SS	CC	KN	GC	141
랫 프로모터	GSRD	VL	AG	LS	SS	CC	KN	GC	140
돼지 프로모터	GSRD	VL	AG	LS	SS	CC	KN	GC	140

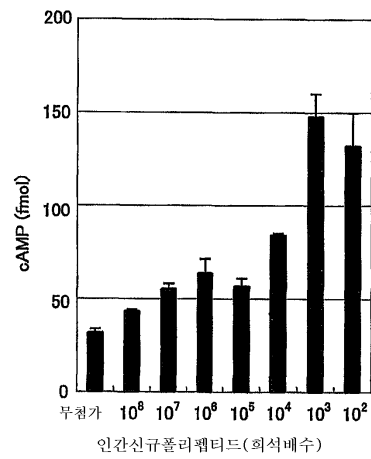
도면 4



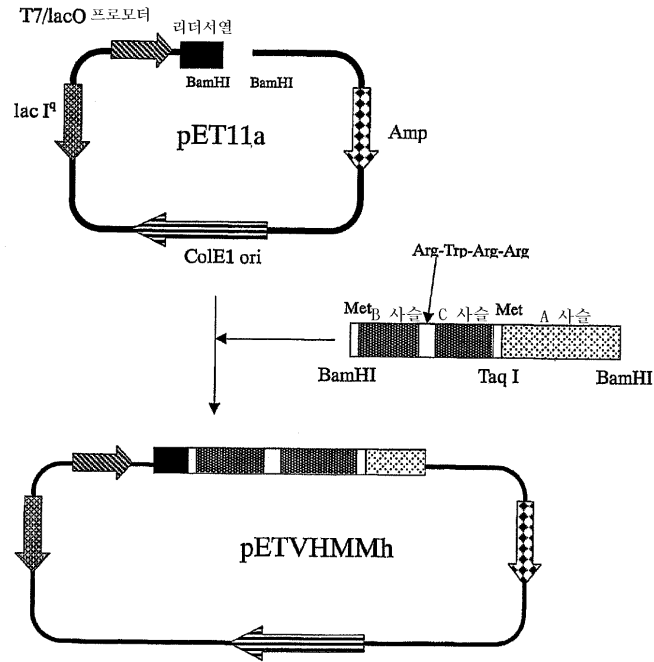
도면 5



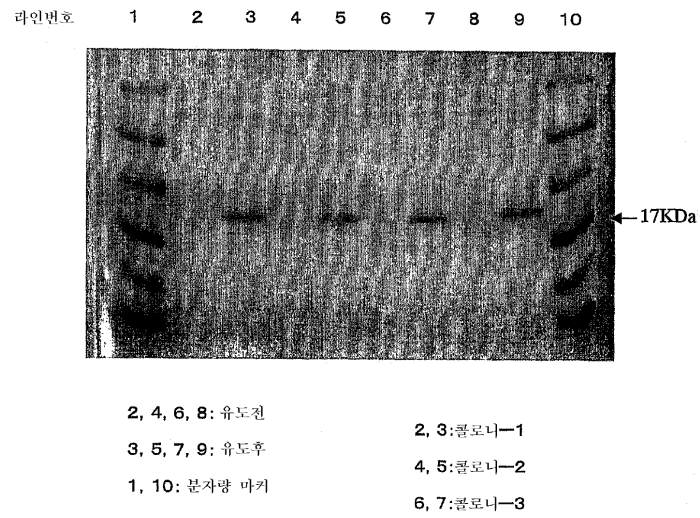
도면 6



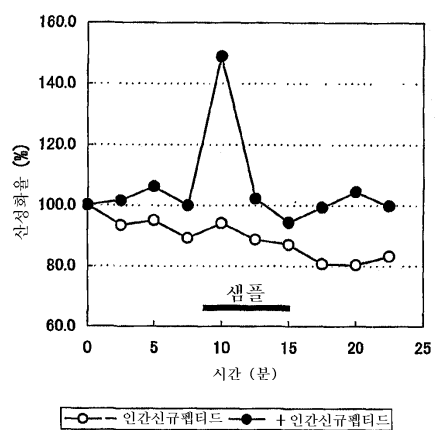
도면 7



도면 8

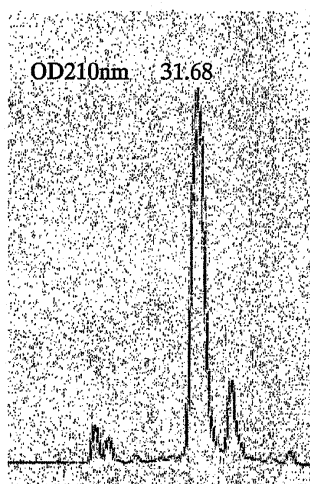


도면 9

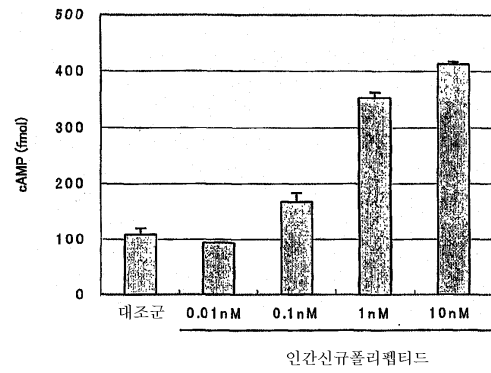


도면 10

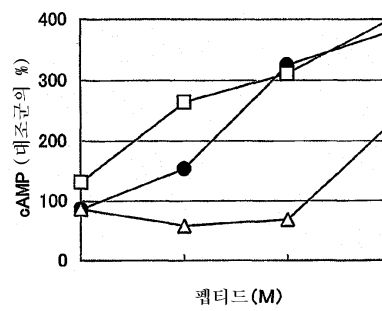
인간신규펩리펩티드



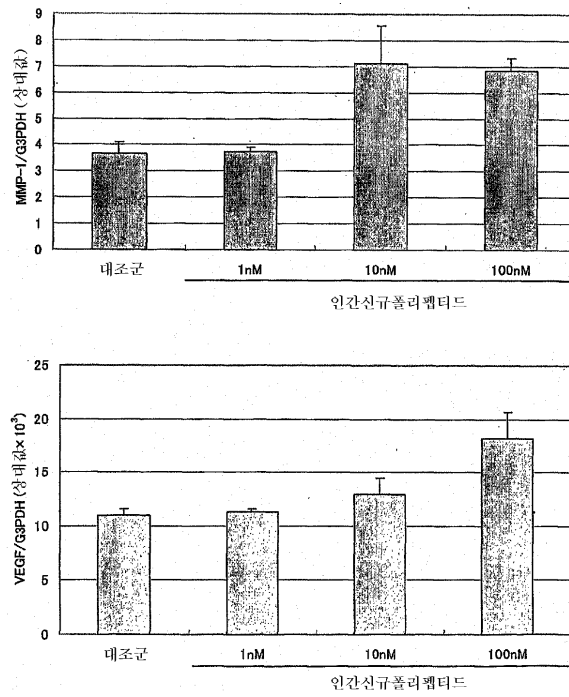
도면 11



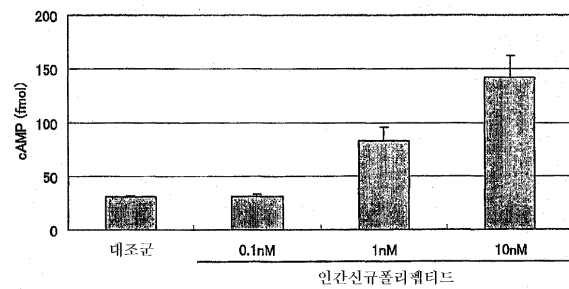
도면 12



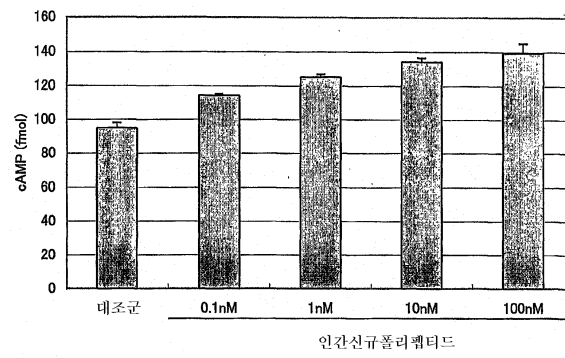
도면 13



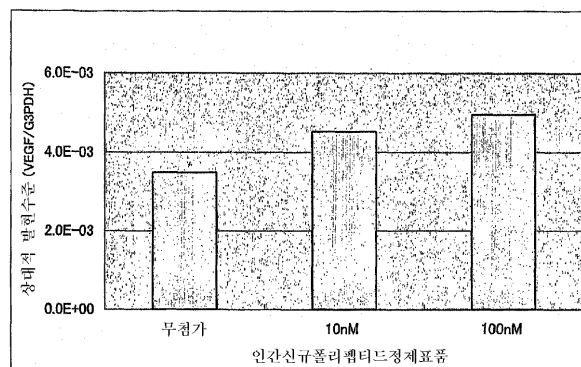
도면 14



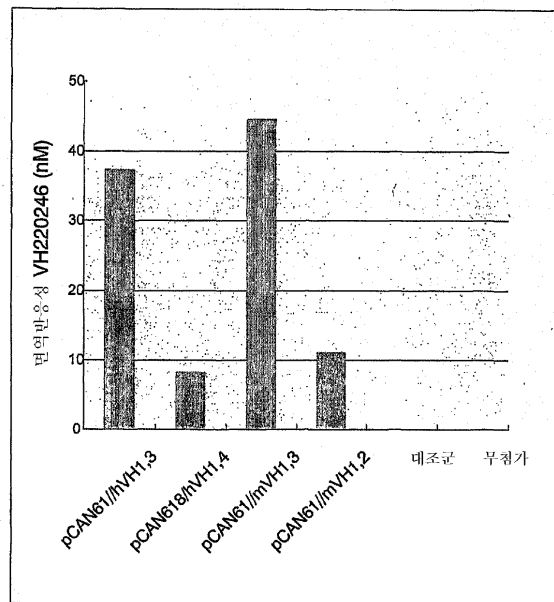
도면 15



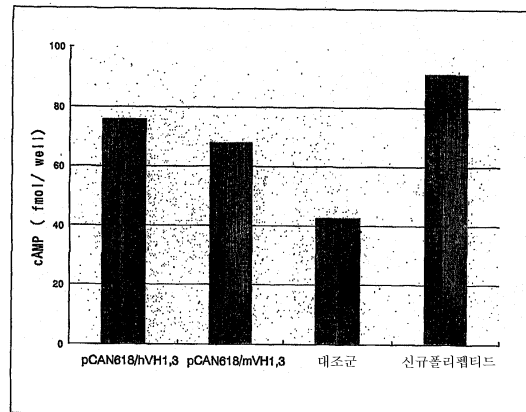
도면 16



도면 17



도면 18



- <110> Takeda Chemical Industries, Ltd.
- <120> Novel Insulin/IGF/Relaxin Family Polypeptide and Its DNA
- <130> P02-0082
- <150> JP 12-126340
- <151> 2000-04-21
- <150> JP 12-205587
- <151> 2000-07-03
- <150> JP 12-247962

<151> 2000-08-10
 <150> JP 12-395050
 <151> 2000-12-22
 <160> 86
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 1
 ctggcggatat ggggtgctgac 20
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 2
 actggggcat tggctcctggt g 21
 <210> 3
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 3
 Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val
 20 25 30
 Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly
 35 40 45
 Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly
 50 55 60
 Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser
 85 90 95
 Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly
 100 105 110
 Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys
 115 120 125
 Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
 130 135 140
 <210> 4
 <211> 1061
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 4
 ttcaaagcat ctccgtccag catggccagg tacatgctgc tgctgctcct ggcggtatgg 60

```

gtgctgaccg gggagctgtg gccgggagct gaggcccggg cagcgcctta cggggtcagg      120
ctttgcggcc gagaattcat ccgagcagtc atcttcacct gcgggggctc ccggtggaga      180
cgatcagaca tcctggccca cgaggctatg ggagatacct tcccggatgc agatgctgat      240
gaagacagtc tggcaggcga gctggatgag gccatggggg ccagcgagtg gctggccctg      300
accaagtcac cccaggcctt ttacaggggg cgaccagct ggcaaggaac ccctgggggtt      360
cttcggggga gccgagatgt cctggctggc ctttccagca gctgctgcaa gtgggggtgt      420
agcaaaagtg aaatcagtag cctttgctag tttgagggtt gggcagccgt gggcaccagg      480
accaatgccc cagtccctgc atccactcaa ctagtgtctg gctgggcacc tgtctttcga      540
gcctcacaca ttcattcatt catctacaag tcacagaggc actgtgggct caggcacagt      600
ctcccgacac cacctatcca accctgccct ttgaccagcc tatcatgacc ctggccccta      660
aggaagctgt gccctgcct ggtcaagtgg ggaccccccc atcctgacct ctgacctctc      720
cccagcccta accatgcgtt tgcctggcct acacactcca ctgccacaac tgggtcccta      780
ctctacctag gctggccaca cagagacccc tgcccccttc ccagtccaaa ctgtggccat      840
tgtcccctga ccagctaaaa tcaagcctct gtctcagtc agcctttgca cgcacgcttc      900
ctttgccttg ctttccatcc cctctccctc caactccctt gccagagttc caaggctgtg      960
gaccccagag aaggtggcag gtggccccc taggagagct ctgggcacat tcgaatcttc     1020
ccaaactcca ataataaaaa ttcgaagact ttggcagaga g                               1061

```

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

```

<400> 5
ccggatgcag atgctgatga a                               21

```

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

```

<400> 6
tggtcaaagg gcagggttgg                               20

```

<210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 7

```

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser
 1          5          10          15
Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
          20

```

<210> 8
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 8

```

Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg
 1          5          10          15
Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp

```

	20	25	
<210>	9		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	9		
ggtgaagatg actgctcgga tga			23
<210>	10		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	10		
ccgcaaagcc tgaccccgta ag			22
<210>	11		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	11		
gggggtgtag caaaagtga a			21
<210>	12		
<211>	426		
<212>	DNA		
<213>	Human		
<400>	12		
atggccaggt acatgctgct gctgctcctg gcggtatggg tgctgaccgg ggagctgtgg			60
ccgggagctg aggcccgggc agcgccttac ggggtcaggc tttgcggccg agaattcatc			120
cgagcagtca tcttcacctg cgggggctcc cgggtggagac gatcagacat cctggcccac			180
gaggctatgg gagatacctt cccggatgca gatgctgatg aagacagtct ggcaggcgag			240
ctggatgagg ccatggggtc cagcgagtgg ctggccctga ccaagtcacc ccaggccttt			300
tacagggggc gaccagctg gcaaggaacc cctgggggttc ttcggggcag ccgagatgtc			360
ctggctggcc tttccagcag ctgctgcaag tgggggtgta gcaaaagtga aatcagtagc			420
ctttgc			426
<210>	13		
<211>	18		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	13		
gggcaggggt ctctgtgt			18
<210>	14		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		

<220>
 <223> Primer
 <400> 14
 ttcaaagcat ctccgtccag c 21
 <210> 15
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 15
 gatgtcctgg ctggcctttc cagcagctgc tgcaagtggg ggtgtagcaa aagtgaaatc 60
 agtagccttt gc 72
 <210> 16
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 16
 cgggcagcgc cttacgggggt caggctttgc ggccgagaat tcatccgagc agtcatcttc 60
 acctgcgggg gctcccgggtg g 81
 <210> 17
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Rat
 <400> 17
 Met Ala Thr Arg Gly Leu Leu Leu Ala Ser Trp Ala Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Gln Ala Glu Ala Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu
 20 25 30
 Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser
 35 40 45
 Arg Trp Arg Arg Ala Asp Ile Leu Ala His Asp Pro Leu Gly Glu Phe
 50 55 60
 Phe Ala Asp Gly Glu Ala Asn Thr Asp His Leu Ala Ser Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln
 85 90 95
 Val Phe Tyr Gly Gly Arg Ser Ser Trp Gln Gly Ser Pro Gly Val Val
 100 105 110
 Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Glu
 115 120 125
 Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
 130 135 140
 <210> 18
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 18
 atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag 60
 gccgaggcga ggcccgcgcc ctatgggggtg aagctctgcg gtcgggagtt catccgcgcg 120
 gtcattctca cctgcggggg ctcacgatgg cgccgggcgg acatcttggc ccacgaccct 180
 ctgggggaat tcttcgctga tggagaagcc aatacagacc acctggccag cgaactggac 240

gaagctgtgg gctccagcga gtggctggcc ctgaccaaat cccccaggt cttctatggg 300
 ggtcgatcca gctggcaagg gtctcccga gtggttcggg gcagcagaga tgtgctggct 360
 ggcctttcca gcagctgttg cgagtggggc tgtagtaaga gccaaattag cagcttgtgc 420
 420

<210> 19
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Rat, Mouse
 <400> 19

Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Glu Trp Gly Cys Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
 20

<210> 20
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 20

gagtgtggc tggcctttcc agcagctgtt gcgagtgggg ctgtagtaag agccaaatta 60
 gcagcttgtg c 71

<210> 21
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Rat, Mouse
 <400> 21

Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp
 20 25

<210> 22
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 22

aggcccgcgc cctatgggggt gaagctctgc ggtcgggagt tcatccgcgc ggatcatcttc 60
 acctgcgggg gctcacgatg g 81

<210> 23
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 23

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

65	70	75	80	
Asp Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro				
	85	90	95	
Gln Ala Phe Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Trp Gln Gly Ser Pro Gly Val				
	100	105	110	
Val Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys				
	115	120	125	
Glu Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys				
	130	135	140	
<210>	24			
<211>	423			
<212>	DNA			
<213>	Mouse			
<400>	24			
atggcaatgc tcgggctgct gctgctggct tcctgggctc tcctcggggc tctggggctg			60	
caggccgagg cgaggccggc gccctacggg gtgaagctct gcggtcggga gttcatccgc			120	
gcggtcatct tcacttgagg aggtcacga tggcgccggg cggacatctt ggcccacgaa			180	
tctctggggg acttcttcgc tgatggagaa gccaatacag accacctggc cagcgagctg			240	
gatgaagcgg tgggctccag cgagtggctg gccctaacca aatcccccca ggctttctac			300	
ggtggtcgag ccagctggca agggtcacct ggagtggttc ggggcagcag agatgtgttg			360	
gctggccttt ccagcagttg ctgcgagtgg ggctgtagca agagccaaat tagcagcttg			420	
tgc			423	
<210>	25			
<211>	72			
<212>	DNA			
<213>	Mouse			
<400>	25			
gatgtgttgg ctggcctttc cagcagttgc tgcgagtggg gctgtagcaa gagccaaatt			60	
agcagcttgt gc			72	
<210>	26			
<211>	81			
<212>	DNA			
<213>	Mouse			
<400>	26			
aggccggcgc cctacggggg gaagctctgc ggtcgggagt tcatccgcgc ggtcatcttc			60	
acttgcggag gtcacgatg g			81	
<210>	27			
<211>	30			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				
<223>	Primer			
<400>	27			
ggctcttact acagccccac tcgcaacagc			30	
<210>	28			
<211>	28			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				
<223>	Primer			

<400>	28	
tgctggaaag gccagccagc acatctct		28
<210>	29	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	29	
ggctgctagg ggtatggttg gag		23
<210>	30	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	30	
aagggtggcc taatggcttt cggatttc		28
<210>	31	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	31	
ttaaaggcca ggcagaggtg tttccactg		29
<210>	32	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	32	
cactctcctg attggcctcc tgctgctc		28
<210>	33	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	33	
ggtcccgaga aagcttaaag gcaggcagag		30
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	34	
ggagaagcca atacagacca cctg		24

<210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 35
 agtggctggc cctaacaaaa tc 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 36
 ggtcgcaggc atctcagctg at 22
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 37
 cttcccaatc gtcagccca 20
 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 38
 cgcttctcca ttgctcaacc ct 22
 <210> 39
 <211> 470
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 39
 ggtcgcaggc atctcagctg atcatggcaa ctcgggggct gctgctggct tcctgggctc 60
 tcctcggggc tctggtgctg caggccgagg cgaggccgc gccctatggg gtgaagctct 120
 gcggtcggga gttcatccgc gcggtcatct tcacctgcgg gggctcacga tggcgccggg 180
 cggacatctt ggcccacgac cctctggggg aattcttcgc tgatggagaa gccaatacag 240
 accacctggc cagcgaactg gacgaagctg tgggctccag cgagtggctg gccctgacca 300
 aatcccccca ggtcttctat gggggtcgat ccagctggca agggctctcc ggagtgggtc 360
 ggggcagcag agatgtgctg gctggccttt ccagcagctg ttgcgagtgg ggctgtagta 420
 agagccaaat tagcagcttg tgctaggatc tgggctgagc gattgggaag 470
 <210> 40
 <211> 475
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 40

```

ggtcgcaggc atctcagctg atcatggcaa tgctcgggct gctgctgctg gcttcctggg      60
ctctcctcgg ggctctgggg ctgcaggccg aggcgaggcc ggcgccctac ggggtgaagc      120
tctgcgggtcg ggagttcatc cgcgcgggtca tcttcacttg cggaggctca cgatggcgcc      180
gggcggaacat cttggccac gaatctcttg gggacttctt cgctgatgga gaagccaata      240
cagaccacct ggccagcgag ctggatgaag cgggtgggctc cagcgagtgg ctggccctaa      300
ccaaatcccc ccaggctttc tacggtgggtc gagccagctg gcaaggggtca cctggagtgg      360
ttcggggcag cagagatgtg ttggctggcc tttccagcag ttgctgagag tggggctgta      420
gcaagagcca aattagcagc ttgtgctagg atcaggggtg agcaatggag aagcg          475
<210>      41
<211>      184
<212>      DNA
<213>      Rat
<400>      41
atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag      60
gccgaggcga ggcccgcgcc ctatgggggtg aagctctgag gtcgggagtt catccgcgcg      120
gtcatcttca cctgcggggg ctcacgatgg cgccggggcg acatcttggc ccacgaccct      180
ctgg          184
<210>      42
<211>      236
<212>      DNA
<213>      Rat
<400>      42
gggaattctt cgctgatgga gaagccaata cagaccacct ggccagcgaa ctggacgaag      60
ctgtgggctc cagcgagtgg ctggccctga ccaaatcccc ccaggctctc tatgggggtc      120
gatccagctg gcaaggggtc cccggagtgg ttcggggcag cagagatgtg ctggctggcc      180
tttccagcag ctgttgcgag tggggctgta gtaagagcca aattagcagc ttgtgc          236
<210>      43
<211>      187
<212>      DNA
<213>      Mouse
<400>      43
atggcaatgc tcgggctgct gctgctggct tcctgggctc tcctcggggc tctggggctg      60
caggccgagg cgaggccggc gccctacggg gtgaagctct gcggtcggga gttcatccgc      120
gcggtcatct tcacttgagg aggtcacga tggcgccggg cggacatctt ggcccacgaa      180
tctctgg          187
<210>      44
<211>      236
<212>      DNA
<213>      Mouse
<400>      44
gggacttctt cgctgatgga gaagccaata cagaccacct ggccagcgag ctggatgaag      60
cgggtgggctc cagcgagtgg ctggccctaa ccaaatcccc ccaggctttc tacggtgggtc      120
gagccagctg gcaaggggtca cctggagtgg ttcggggcag cagagatgtg ttggctggcc      180
tttccagcag ttgctgagag tggggctgta gcaagagcca aattagcagc ttgtgc          236
<210>      45
<211>      140
<212>      PRT
<213>      Porcine
<400>      45
Met Ala Lys Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu

```

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

<210>	46					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	Porcine					
<400>	46					
atggccaaac	gtccactgct	gctgctgctg	ctggccgatat	gggtgctggc	tggggagctg	60
tggctgagga	ctgaggccccg	ggcgtcaccc	tatggagtga	agctttgcgg	ccgtgaattc	120
atccgagcgg	tcatactttac	ctgcgggggc	tcccgggtga	gacggtcgga	catgctggcc	180
catgaagctc	tgggggatgt	cttctcagac	acagattcca	acgcagacag	cgaattggac	240
gaggcaatgg	cctccagcga	atggctggcc	ctgaccaagt	cccctgagac	cttctatggg	300
gttcaaccag	gctggcagag	aacctctggg	gctcttaggg	gcagtcgtga	tgtcctggct	360
ggcctctcca	gcaactgctg	caagtggggg	tgcagcaaga	gtgaaatcag	cagcctctgc	420
						420

```

<210>      47
<211>      24
<212>      PRT
<213>      Porcine
<400>      47
Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Asn Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser
  1             5             10             15
Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
          20
<210>      48
<211>      72
<212>      DNA
<213>      Porcine
<400>      48
gatgtccttg ctggcctctc cagcaactgc tgcaagtggg ggtgcagcaa gagtgaaatc
agcagcctct gc
<210>      49
<211>      27
<212>      PRT
<213>      Porcine

```

<400> 49
 Arg Ala Ser Pro Tyr Gly Val Lys Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp
 20 25
 <210> 50
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Porcine
 <400> 50
 cgggcgtcac cctatggagt gaagctttgc ggccgtgaat tcatccgagc ggtcatcttt 60
 acctgcgggg gctcccgggtg g 81
 <210> 51
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Rat
 <400> 51
 Met Ala Thr Arg Gly Leu Leu Leu Ala Ser Trp Ala Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Gln Ala Glu Ala Arg Pro Ala Pro Tyr Gly Val Lys Leu
 20 25 30
 Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser
 35 40 45
 Arg Trp Arg Arg Ala Asp Ile Leu Ala His Asp Pro Leu Gly Glu Cys
 50 55 60
 Gly Gly Lys Ala Met Asp Leu Glu Gln Val Ser Leu Ile Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Arg Asp Val Ala Gly Phe Ser Pro Val His Pro Leu Ser Phe Ala Gly
 85 90 95
 Glu Phe Phe Ala Asp Gly Glu Ala Asn Thr Asp His Leu Ala Ser Glu
 100 105 110
 Leu Asp Glu Ala Val Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser
 115 120 125
 Pro Gln Val Phe Tyr Gly Gly Arg Ser r Trp Gln Gly Ser Pro Gly
 130 135 140
 Val Val Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys
 145 150 155 160
 Cys Glu Trp Gly Cys Ser Lys Ser Gln Ile Ser Ser Leu Cys
 165 170
 <210> 52
 <211> 522
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 52
 atggcaactc gggggctgct gctggcttcc tgggctctcc tcggggctct ggtgctgcag 60
 gccgaggcga ggcccgcgcc ctatggggtg aagctctgcg gtcgggagtt catccgcgcg 120
 gtcattctca cctgcggggg ctcacgatgg cgccgggchg acatcttggc ccacgaccct 180
 ctgggtgagt gcggaggga agcaatggac ctggaacagg tgtccttgat cctccagacc 240
 agagatgtag ccggattcag ccctgttcat ccactttctt ttgcagggga attcttcgct 300
 gatggagaag ccaatacaga ccacctggcc agcgaactgg acgaagctgt gggctccagc 360

gagtggctgg ccctgaccaa atccccccag gtcttctatg ggggtcgatc cagctggcaa 420
 ggggtctccc gagtgggttc gggcagcaga gatgtgctgg ctggcctttc cagcagctgt 480
 tgcgagtggg gctgtagtaa gagccaaatt agcagcttgt gc 522
 <210> 53
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 53
 ggragccass mtgtataaat r 21
 <210> 54
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 54
 cacccakags stcgtggggc aagatgtc 28
 <210> 55
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Porcine
 <400> 55
 atggccaaac gtccactgct gctgctgctg ctggccgtat ggggtgctggc tggggagctg 60
 tggctgagga ctgaggccc ggcgtcacc tatggagtga agctttgcgg ccgtgaattc 120
 atccgagcgg tcattctttac ctgcgggggc tcccgggtg 159
 <210> 56
 <211> 239
 <212> DNA
 <213> Porcine
 <400> 56
 tccaggaggc accaaccatc agaaagctgc cttgctgctg ccactctcac atctcaggca 60
 gccgtccag aatggccaaa cgtccactgc tgctgctgct gctggccgta tgggtgctgg 120
 ctggggagct gtggctgagg actgaggccc ggcgtcacc ctatggagtg aagctttgcg 180
 gccgtgaatt catccgagcg gtcattcttta cctgcggggg ctcccgggtg agacggctc 239
 <210> 57
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 57
 gctgccttgc tgcgtccact ctcacatct 29
 <210> 58
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer

<400> 58
cactctcaca tctcaggcag cccgtccag 29

<210> 59
<211> 193
<212> DNA
<213> Porcine

<400> 59
atggccaaac gtccactgct gctgctgctg ctggccgtat ggggtgctggc tggggagctg 60
tggctgagga ctgaggcccg ggcgtcacc ctatggagtga agctttgctg cctgaattc 120
atccgagcgg tcatctttac ctgcgggggc tcccgggtga gacggtcgga catgctggcc 180
catgaagctc tgg 193

<210> 60
<211> 227
<212> DNA
<213> Porcine

<400> 60
gggatgtctt ctacagacaca gattccaacg cagacagcga gttggacgag gcaatggcct 60
ccagcgaatg gctggccctg accaagtccc ctgagacctt ctatgggggt caaccaggct 120
ggcagagaac ccctggggct cttaggggca gtcgtgatgt cctggctggc ctctccagca 180
actgctgcaa gtgggggtgc agcaagagtg aaatcagcag cctctgc 227

<210> 61
<211> 572
<212> DNA
<213> Rat

<400> 61
ggtcgcaggc atctcagctg atcatggcaa ctcgggggct gctgctggct tcctgggctc 60
tcctcggggc tctggtgctg caggccgagg cgaggcccg gccctatggg gtgaagctct 120
gcggtcggga gttcatccgc gcggtcatct tcacctgcgg gggctcacga tggcgccggg 180
cggacatctt ggcccacgac cctctgggtg agtgccgagg gaaagcaatg gacctggaac 240
aggtgtcctt gatcctccag accagagatg tagccggatt cagccctgtt catccacttt 300
cttttgagg ggaattcttc gctgatggag aagccaatac agaccacctg gccagcgaac 360
tggacgaagc tgtgggctcc agcgagtggc tggccctgac caaatcccc caggtcttct 420
atgggggtcg atccagctgg caaggtctc ccggagtggg tcggggcagc agagatgtgc 480
tggctggcct ttccagcagc tgttgcgagt ggggctgtag taagagccaa attagcagct 540
tgtgctagga tctgggctga gcgattggga ag 572

<210> 62
<211> 102
<212> DNA
<213> Rat

<400> 62
gtgagtgcgg agggaaagca atggacctgg aacaggtgtc cttgatcctc cagaccagag 60
atgtagccgg attcagccct gttcatccac tttcttttgc ag 102

<210> 63
<211> 34
<212> PRT
<213> Rat

<400> 63
Gly Glu Cys Gly Gly Lys Ala Met Asp Leu Glu Gln Val Ser Leu Ile
1 5 10 15
Leu Gln Thr Arg Asp Val Ala Gly Phe Ser Pro Val His Pro Leu Ser

	20	25	30
Phe Ala			
<210>	64		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	64		
ccggatccat gcgggcagcg cctta			25
<210>	65		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	65		
atctcgactg ccccgaagaa cc			22
<210>	66		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	66		
cagtcgaatg gatgtcctgg ctggc			25
<210>	67		
<211>	29		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Primer		
<400>	67		
ccggatccta gcaaaggcta ctgatttca			29
<210>	68		
<211>	399		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	artificial sequence		
<400>	68		
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatgcgggc agcgccttac			60
ggggtcaggc tttgcggccg agaattcatc cgagcagtca tcttcacctg cgggggctcc			120
cggtggagac gatcagacat cctggcccac gaggctatgg gagatacctt cccggatgca			180
gatgctgatg aagacagtct ggcaggcgag ctggatgagg ccatggggtc cagcgagtgg			240
ctggccctga ccaagtcacc ccaggccttt tacagggggc gaccagctg gcaaggaacc			300
cctgggggtt ttcggggcag ccgaatggat gtcctggctg gcctttccag cagctgctgc			360
aagtgggggt gtagcaaaag tgaaatcagt agcctttgc			399
<210>	69		
<211>	133		

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 69
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Arg
 5 9 14 19
 Ala Ala Pro Tyr Gly Val Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala
 24 29 34
 Val Ile Phe Thr Cys Gly Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile Leu
 39 44 49
 Ala His Glu Ala Met Gly Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp Glu
 54 59 64
 Asp Ser Leu Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp
 69 74 79 84
 Leu Ala Leu Thr Lys Ser Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser
 89 94 99
 Trp Gln Gly Thr Pro Gly Val Leu Arg Gly Ser Arg Met Asp Val Leu
 104 109 114
 Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu
 119 124 129
 Ile Ser Ser Leu Cys
 134

<210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 70

acggataccc caaggacatc t 21

<210> 71
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 71

ctcagaaaga gcagcatcga tatg 24

<210> 72
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 72

cagctccttt ggcttccta gaactgtga 29

<210> 73
 <211> 22
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	73	
	ccagcacata ggagagatga gc	22
<210>	74	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	74	
	ggaacattta cacgtctgcg g	21
<210>	75	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	artificial sequence	
<400>	75	
	agcaagacaa gaaaatccct gtggg	25
<210>	76	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	76	
	gaaggtgaag gtcggagtc	19
<210>	77	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	77	
	gaagatggtg atgggatttc	20
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	78	
	caagcttccc gttctcagcc	20
<210>	79	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		

<223> artificial sequence
 <400> 79
 ctccagccta ggcttttgca aaaaccacca tggagctgag gccctggttg ctat 54
 <210> 80
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 80
 ttatttccta gggaattcat caatggatgat ggtgatgatg gccctgactg gacgtgaggg 60
 tcttgc 66
 <210> 81
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 81
 aacagtcaat tgccaccatg gcaagataca tgctgctgct gtcctggcg gtatgggtgc 60
 60
 <210> 82
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 82
 tcagcaaagg ctactgattt cacttttgct gcacccccac ttgcaacagg agctgctaag 60
 gccagccagg acatcgcggc ggccccgaag cctcccaggg gttccttgcc aggaggggtcg 120
 120
 <210> 83
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 83
 tttattagcg gccgctcagc aaaggctact gatttcactt ttgctacacc cccacttgc 59
 <210> 84
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 84
 aggcatgaat tcccaccatg gcaatgctcg ggctgctgct gctggcttcc tgggctctcc 60
 tcggggctct 70
 <210> 85
 <211> 120

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 85
 caacgcggcc gctagcaca gctgctaatt tggctcttgc tacagcccca ctgcgagcaa 60
 ctgctggaaa ggccagccaa cacatctctc ctgccccgaa cccttccagg tgacccttgc 120
 120
 <210> 86
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 86
 tcaacgcggc cgctagcaca agctgctaatt ttggctcttg ctacagcccc actgcgagca 60
 ac 62