



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월22일
(11) 등록번호 10-1921350
(24) 등록일자 2018년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7018840
(22) 출원일자(국제) 2011년12월16일
심사청구일자 2016년11월25일
(85) 번역문제출일자 2013년07월17일
(65) 공개번호 10-2014-0016881
(43) 공개일자 2014년02월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2011/003265
(87) 국제공개번호 WO 2012/080844
국제공개일자 2012년06월21일
(30) 우선권주장
61/424,273 2010년12월17일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
W02004055155 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
바이오라미나 에이비
스웨덴, 스톡홀름 에스-17266, 순드뷔베리, 로프
스트롭스 알레 5
(72) 발명자
트리그베이슨, 칼
스웨덴, 드주르솔름 에스-18261, 로케바겐 8에이
로딘, 세르게이
스웨덴, 스톡홀름 에스-11346, 아파트 제이12, 스
베아마겐 164
(74) 대리인
청운특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

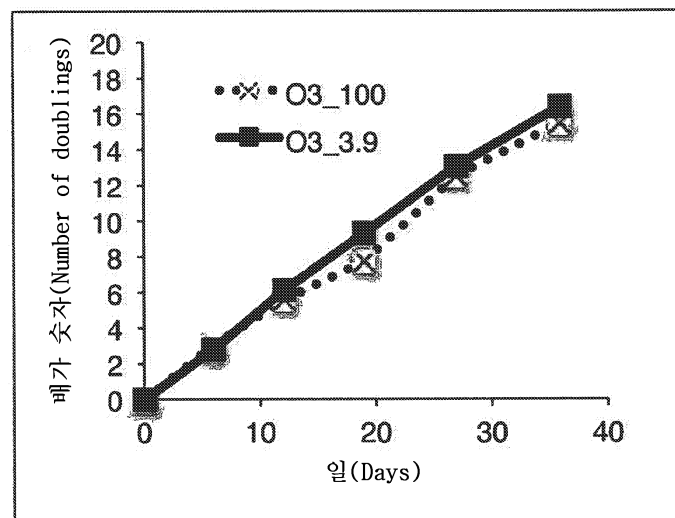
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템

(57) 요약

본 발명은 단리된 라미닌-521, 제조합 라미닌-521의 제조방법, 제조합 라미닌-521을 발현하는 숙주세포, 및 라미닌-521을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 라미닌-521은 줄기 세포의 생체 외 다능성을 유지시킬 수 있으며, 자가 재생을 가능하게 하며, 인간 배아 줄기 세포의 단일 세포 생존을 가능하게 한다. 분화 억제제 또는 지지세포의 부재 하에, 다능성 인간 배아 줄기 세포가 제조합 라미닌-521 (라미닌 11)의 기질로 코팅된 플레이트 상에서 배양될 때, 상기 배아 줄기 세포는 증식하며 그들의 다능성을 유지한다. 인간 제조합 라미닌-521 (라미닌-511)이 단일 세포 현탁액으로의 완전한 해리 후에 줄기 세포의 단일 세포 생존을 제공한다는 점이 또한 발견되었다. 최대 3.9 ng/ml의 베타 섬유아세포 성장인자 (bFGF)를 함유하는 유용한 세포 배양 배지가 또한 본 발명에서 기술되었다.

대표도 - 도22



(30) 우선권주장

61/488,353	2011년05월20일	미국(US)
61/533,063	2011년09월09일	미국(US)
61/537,940	2011년09월22일	미국(US)
61/565,380	2011년11월30일	미국(US)
61/565,849	2011년12월01일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

0 초과 내지 3.5 ng/mL의 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF)를 포함하는 세포 배양 배지; 및

줄기세포에 대한 지지체를 제공하기 위한 라미닌-521을 포함하는 기질 (substrate);

을 포함하는 인간 다능성 줄기세포 (pluripotent stem cells)를 유지하기 위한 시스템.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 기질은 카드헤린 (cadherin)을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 0.5 내지 3.5 ng/mL의 bFGF를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 추가적인 성장 인자, 적어도 하나의 미량 미네랄 (trace mineral), 및 적어도 하나의 지질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 무기염을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 미량 미네랄을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 에너지 기질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 지질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 14

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 아미노산을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 15

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 비타민을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 16

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 부가적인 성장인자를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 17

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 무기염, 적어도 하나의 미량 미네랄, 적어도 하나의 에너지 기질, 적어도 하나의 지질, 적어도 하나의 아미노산, 및 적어도 하나의 비타민을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 18

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 (1) 알부민, (2) 인슐린 또는 인슐린 대체물, 또는 (3) 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물 중 임의의 하나를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 19

청구항 1에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 알부민, 인슐린, 염화리튬, GABA, TGF 베타 1, 피페콜린산 (pipecolic acid), L-글루타민, MEM 비-필수 아미노산 용액 (MEM non-essential amino acid solution), 및 DMEM/F12 용액을 더욱 포함하는

것을 특징으로 하는 인간 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템.

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2010년 12월 17일에 출원된, 미국 가 특허출원 제 61/424,273호; 2011년 5월 20일에 출원된 미국 가 특허출원 제 61/488,353호; 2011년 9월 9일에 출원된 미국 가 특허출원 제 61/533,063호; 2011년 9월 22일에 출원된 미국 가 특허출원 제 61/537,940호; 2011년 11월 30일에 출원된 미국 가 특허출원 제 61/565,380호; 및 2011년 12월 1일에 출원된 미국 가 특허출원 제 61/565,849호의 우선권을 주장한다. 상기 가출원들은 전체 본 명세서에서 참조로서 포함된다.

[0002] 본 출원은 세포 생물학, 세포 분화, 세포 요법, 분자 생물학, 단백질, 재조합 인간 단백질, 핵산, 및 라미닌류에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기저판들 (Basal laminae) (기저막)은 관상의, 세포와 연합된 세포의 매트릭스로서, 세포 성장, 세포 분화, 세포 표현형 유지, 조직 발달, 및 조직 유지에 중요한 역할을 한다. 이것들은 실질적으로 모두 조직에 있고, 배 발달 초기 단계에서 나타난다.

[0004] 기저판들은 다양한 구조 및 세포 상호작용에 중심적이다. 예를 들어:

[0005] 1. 이들은 조직에 대해 구조적 지지체로 작용하여, 세포에 대하여 접착성 기질을 제공한다.

[0006] 2. 이들은 조직 분획구조 간의 영구-선택적 장애물을 만들어서, 세포의 이동을 방해하고 거대 분자의 교환을 수동적으로 조절한다. 이러한 특징들은, 중요한 여과 구조체로서 작용하여 대부분의 단백질과 세포에 대하여 불투과적인 효과적인 혈액-조직 장애물을 만드는 신장 사구체 기적막에 의해 예시된다.

[0007] 3. 기저판들은 고도로 상호작용적인 표면을 만들어서, 배발생 및 상처 치유동안 세포 이동과 세포 신장을 촉진할 수 있다. 상처 후에, 이들은 표면을 제공하고 그 위에서 세포가 재생되어 정상적인 조직 기능을 회복시킨다.

[0008] 4. 기저판들은 접촉하는 세포들에게 그 구조에 내재된 정보를 제공하는 데 이는 세포 분화, 어팍토시스 (apoptosis)의 방지, 및 조직 유지에 중요하다. 이러한 정보는 인테그린류 (integrins), 디스트로글리칸 (dystroglycan), 및 세포 표면 프로테오글리칸류를 포함하는 다양한 수용체를 통해 세포로 전달된다. 신호전달은 매트릭스 리간드 및 이와 충분한 친화도로 상호작용하는 상응하는 수용체의 존재뿐 아니라, 삼차원적 매트릭스 "환경 (landscape)"와 같은 지형적 요소 및 수용체를 집합하게 하는 기저판 요소의 능력에 의존한다. 이러한 매트릭스 단백질들이 오래 유지되기 때문에, 기저판들은 거기서 오래 및 일시적으로 있는 세포에 대하여 기저판에서 "표면 기억 (surface memory)"을 창출한다.

[0009] 상기 기저판은 크게 라미닌 및 타입 IV 콜라겐 이형삼중체 (heterotrimer)들로 구성되어 있고, 이들은 복합 중합체성 구조로 조직된다. 추가의 성분들은 아그린, 페리에칸 및 니도젠류 (엔타틴류)와 같은 프로테오글리칸류를 포함한다. 오늘날, 여섯 개의 타입 IV 콜라겐 폴리펩타이드 사슬 및 적어도 12 개의 라미닌 서브유닛 사슬들이 동정되었다. 이러한 사슬들은 공통 및 독특한 기능을 보유하며, 특정 시기 (발달상) 및 공간 (조직 위치 특이적) 패턴으로 발현된다.

[0010] 라미닌류는 이형삼중체성 당단백질 족으로서 일차적으로 기저판에 위치한다. 이들은 일측 상의 인접 세포 수용체와 결합 작용을 통해 및 다른 라미닌 분자 또는 콜라겐류, 니도젠류 또는 프로테오글리칸류와 같은 다른 매트릭스 단백질에 결합함으로써 작용한다. 상기 라미닌 분자들은 또한 세포 작용과 기능에 강하게 영향을 끼치는 신호전달 분자이다. 라미닌들은 조직 재생 및 발달에서 세포 성장과 분화에는 물론 세포/조직 표현형을 유지하는 데에 중요하다.

- [0011] 라미닌들은 크고, 다중-도메인 단백질로서, 공통의 구조 조직을 가진다. 라미닌 분자는 다양한 매트릭스 및 세포 상호작용성 기능을 하나의 분자로 통합한다.
- [0012] 라미닌 단백질 분자는 하나의 α -사슬 서브유닛, 하나의 β -사슬 서브유닛, 및 하나의 γ -사슬 서브유닛을 포함하고, 이들은 모두 겹 코일 (coiled-coil) 도메인을 통해 삼중체로 서로 연결되어 있다. 도 1은 상기 라미닌 분자의 구조를 나타낸다. 상기 12 개의 공지된 라미닌 서브유닛 사슬은 천연 조직에서 적어도 15 개 삼중체적 라미닌을 형성할 수 있다. 이러한 삼중체적 라미닌 구조체에는, 다른 라미닌 및 기저판 분자에 대해 결합활성을 가지는 확인될 수 있는 도메인, 및 막-결합 수용체가 있다. 도 2는 세 개 라미닌 사슬 서브유닛들을 각각 나타낸다. 예를 들어, 도메인 VI, IVb, 및 Iva는 구형 구조체를 형성하고, 도메인 V, IIIb, 및 IIIa (이들은 시스템인이 풍부한 EGF-유사 요소들을 포함한다)는 막대형 구조체를 형성한다. 상기 세 개 사슬 중에 도메인 I과 II는 삼 중 가닥 중복 겹 코일 구조 (긴 팔)의 형성에 참여한다.
- [0013] 다섯 개 다른 알파 사슬, 세 개 베타 사슬 및 세 개 감마 사슬이 인간 조직에서 적어도 15 개 상이한 조합으로 발견된다. 이러한 분자들은 이들의 발견되는 순서에 따라, 라미닌-1에서 라미닌-15까지 지칭되나, 사슬 구성에 기초하여 이소폼을 설명하는 다른 명칭, 예를 들어, 알파-1, 베타-1 및 감마-1 사슬을 포함하는 라미닌-111 (라미닌-1)가 있다. 라미닌류의 네 가지 구조적으로 정의된 군이 확인되었다. 다섯 개의 라미닌 분자들의 제1 군은 모두 $\beta 1$ 및 $\gamma 1$ 사슬을 공통으로 가지고, 그들의 α -사슬 조성 ($\alpha 1$ 내지 $\alpha 5$ 사슬)에 의해 변화한다. 라미닌-521을 위시한 다섯 개 동정된 라미닌 분자들의 제2 군은 $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬을 공통으로 가지며, 다시 그들의 α -사슬 구성에 의해 변화한다. 확인된 라미닌 분자들의 제3 군은 하나의 확인된 구성원 라미닌-332를 가지며, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ 사슬 조성이다. 확인된 라미닌 분자들의 제4 군은 하나의 확인된 구성원 라미닌-213으로, 새로이 확인된 $\gamma 3$ 사슬을 가진다 ($\alpha 2\beta 1\gamma 3$).
- [0014] 다른 라미닌 사슬들이 없는 단리된 라미닌-521에 대한 보고가 없다. 지금까지, 라미닌-521의 기능에 대한 연구가 없었다. 라미닌 사슬 항체를 사용하여 친화성 크로마토그래피로 세포원으로부터 라미닌-521을 정제하고자 하는 노력이 있었지만, 예를 들어, 라미닌-411 및 라미닌-511의 성분인 라미닌 $\beta 1$ 사슬을 제거하는 데 실패하였다. 라미닌-521 (aka LN-521)을 포함하는 조성물 및 라미닌-521을 제조하는 방법을 제공하는 것은 바람직한 것이 될 것이다.
- [0015] 인간 배아 줄기 (hES) 세포들은 척수와 심장 손상, I 형 당뇨병, 파킨슨 병과 같은 퇴행성 신경장애 (neurodegenerative disorders)에 대하여 재생 의학을 발전시키는 확실한 보증이다. 줄기 세포는 미분화된 세포로서 이로부터 특정 세포들이 후속적으로 유도된다. 배아줄기 세포는 막강한 자기 재생 능력과 모든 삼배엽의 세포로 분화할 잠재성을 가진 다능성을 보유하고 있다. 이들은 치료적 목적에 유용하고 조직 치환 요법, 약물 스크리닝, 기능적 유전체학 (genomics) 및 단백질체학 (proteomics)에 대해 제한되지 않는 세포 원을 공급할 수 있다.
- [0016] 재생 의학에 대한 줄기 세포 유도 세포의 발생에 대한 예비조건은 다능성 줄기세포를 오랫동안 배양하게 하는 방법, 화학적으로 규정되고 반복될 수 있는 분화 프로토콜은 물론 이물질이 없는 세포 배양 시스템이다. 그러나, 인간 배아줄기세포 (hES 세포) 및 유도 다능성 줄기세포 (hiPS 세포)를 배양하는 것은 많은 문제와 부딪힌다. 하나의 주요 문제는 hES 세포들이 집단체를 이루어 서서히 성장하는 것으로, 이 집단체들은 세포 증식을 위해 손으로 분리될 필요가 있다. 상기 세포들의 분리는 통상 상당한 세포 사멸로 나타나는 데, 완전히 분리 후 hES 세포의 클로닝 효율은 $\leq 1\%$ 이다.
- [0017] 다능성 hES 세포들을 유지하는 것은, 마우스 종양 유도 매트리지엘 (Matrigel) 또는 섬유아세포 지지 세포층 (feeder cell layer)와 같이, 면역원성 및 독성일 수 있고 및 실험의 신뢰성을 감소시키는 많은 배치마다의 다양성을 발생시키는, 세포와 매트릭스 단백질 혼합물과 같은 복합 배양 기질을 요구하고 있다. 지금까지, hES 세포 배양에 사용된 가장 성공적인 지지 세포는 매트리지엘로서, 이는 쥐의 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 육종 종양 조직으로부터 얻은 복합 종양 및 BM-유사 추출물이다. 매트리지엘은 주로 쥐의 LN-111, IV 형 콜라젠, 퍼레칸 (perlecan) 및 니도젠을 포함할 뿐 아니라, 성장 인자와 세포 단백질을 포함한 다양한 양의 다른 물질들을 포함하며, 따라서, 이의 조성은 정의되지 않고, 배치마다 다르다. 이러한 다양성은 과학적 결과를 재현하지 못하게 할 수 있고, 동물성 기원의 기질로 인해, 인간 세포 요법을 위해 hES 세포를 확장하고 유지하는 데 매트리지엘을 허용하지 못하게 한다.
- [0018] 그러나, hES 및 hiPS 세포의 자기 재생을 지지하는 다소간 정의된 코팅 물질을 성공적으로 개발한 것이 보고되었다. 재조합 비트로넥틴이 hES 세포의 점착 및 자기 재생을 지지한다고 보고되었다. 다양한 ECM 단백질로부터의 다양한 펩타이드를 함유하는 아크릴레이트 코팅이 이전에 개발되었고, 합성 메타크릴레이트-기재 폴리머가

또한 hES 세포의 점착 및 자기-재생을 용이하게 한다고 나타났다.

- [0019] hES 세포를 대규모 증식하는 데 있어서의 주요 문제점의 하나는 해리 (dissociation) 후 단일세포 현탁액으로 재분주시 생존율이 낮다는 것이다. 이는 계대배양을 끈덕지게 해야하고 대규모 자동 확장은 불가능하게 만든다. 그러나, 로 키나제 (rho-kinase (ROCK)) 억제제¹⁰ 또는 블레비스타틴¹¹의 존재하에서 트립신 처리하여 단일 세포 현탁액으로 배출된 hES 세포들은 단일 클론으로부터 분주되고 증식될 수 있으나, 상기 분자들은 천연 줄기 세포 영역의 분자들이 아니고, 액틴 세포골격에 영향을 끼쳐 세포 손상을 야기할 수 있다. 그러므로, ROCK 억제제의 사용은 세포 요법을 목적으로 하는 hES 세포의 장기 증식에 바람직한 해법이 될 수 없다.
- [0020] 재생 의학의 목적상, 화학적으로 정의되고, 불순물이 없고 (xeno-free), 병원균이 없고, 및 안정적인 배치간 조건하에서, 다능성 줄기 세포를 유도하고 장기 배양할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있다. 더욱이, 그러한 방법들은 빠르고 경제적으로 효율적으로 규모를 키울 수 있어서 단시간 내에 많은 양의 다능성 hES/hiPS 세포들을 얻을 수 있게 하여야 한다. 바람직하게는, 그러한 방법들은 어팍토시스의 합성 억제제를 함유하지 않은 배지에서 인간 ES 세포의 클론 생존을 확보하여 세포에서 세포 분류나 유전자 녹아웃에 관계된 학술적 및 임상적 적용을 용이하게 하여야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명은 단리된 라미닌-521 (LN-521 또는 라미닌-11으로도 알려진) 및 단리된 라미닌-521을 생산하는 방법을 제공한다. 다른 관점에서, 본 발명은 라미닌-521을 발현하고 및 재조합 라미닌-521을 분비하는 재조합 숙주 세포를 제공한다.
- [0022] 다른 관점에서, 본 발명은 인간 세포 요법용 세포를 개발하기 위해, 분화 및 유지용 세포를 배양하는 GMP 등급의 라미닌-521을 제공한다. 본 발명은 또한 단리된 라미닌-521과, 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 그러한 약학적 조성물은 조건적으로 세포의 매트릭스 성분을 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한 다양한 용도의 상당한 양의 단리된 라미닌-521을 생성하는 방법을 제공한다. 그러한 용도의 바람직한 구체 예에서, 재조합 라미닌-521이 사용된다. 일정 양의 라미닌-521, 또는 원하는 효과에 효과적인 이의 약학적 조성물, 및 이의 사용 용도에 관한 지침을 포함하는 키트가 또한 개시된다.
- [0024] 본 발명은 또한 세포 동종성, 세포 배양 플레이트 또는 다른 세포 지지체로부터 줄기 세포를 단일 세포 현탁액으로 제거하는 것, 및 줄기 세포를 단일 세포 현탁액으로 재분주하여 상당한 희석액으로 계대배양 및 증식하여 세포 배양의 증식 및 그러한 세포를 대규모로 생산할 수 있게 하는 것을 용이하게 하는 줄기 세포를 단일층 배양물로 배양하는 방법을 제공한다.
- [0025] 다른 관점에서, 본 발명은 라미닌-521 상에서 다능성 줄기 세포를 단일층 배양물로 배양하는 것, 다른 세포 지지 물질을 따라서, 세포 배양 플레이트로부터 줄기 세포를 단일 세포 현탁액으로 제거하는 것, 및 단일 세포 현탁액으로부터 상기 줄기 세포를 라미닌-521을 포함하는 매트릭스 상에 단일세포로서 재분주하는 것을 설명하며, 이러한 과정들은 자동화된 로봇 시스템에서 고효율로 수행되는 것을 제시한다.
- [0026] 다른 관점에서, 본 발명은 효과적인 양의 단리된 라미닌-521을 포함함으로써 개선된 의학적 장치 및 그래프트 (grafts)를 제공한다.
- [0027] 다른 관점에서, 본 발명은 효과적인 양의 단리된 라미닌-521을 세포 부착, 및 후속적인 세포 정지, 증식, 분화 및/또는 이동을 위한 세포 배양 장치에 제공함으로써, 배양 중의 세포의 성장 및 표현형의 유지를 위한, 향상된 세포 배양 장치, 및 향상된 세포 배양 장치를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0028] 다른 관점에서, 본 발명은 인간 재조합 라미닌-521과 같은 조성물, 인간 배아 줄기세포를 시험관 내에서 미분화된 상태로 배양하고 빠르게 증식시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 인간 배아 줄기세포를 단일 세포로 해리하는 것, 및 이들을 어떠한 로-연계 키나제 (Rho-associated kinase, ROCK) 억제제가 없는 (예를 들어, Y-27632가 없는) 배지가 있는 라미닌-521이 코팅된 세포 배양 접시에 분주하는 것을 포함한다 (Watanabe 등, *Nature Biotechnology* 25, 681 - 686 (2007)). 상기 개선점은 통상적인 인간 배아줄기세포 배양액에서보다 빠르게, 다능성 상태로 인간 배아줄기세포를 증식하는 가능성을 부여한다.

[0029] 다른 관점에서, 본 발명은 단일 세포 현탁액으로 해리 후 인간 배아세포 생존을 허용하는 인간 재조합 라미닌-521과 같은 신규 물질을 제공한다. 상기 개선점은 인간 배아 줄기 세포들의 클로닝 생존율을 더 높게 하며, 이는 클론들을 분리하는 것 (예, 유전적 조작 후), 또는 동질적인 및 일정한 인간 배아 줄기 세포군을 얻는 데 유리하다.

과제의 해결 수단

[0030] 특정 구체 예에서, 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열과 적어도 80% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 알파 사슬 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열과 적어도 70% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 베타 사슬 및 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열과 적어도 70% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 감마 사슬을 포함하고, 상기 알파, 베타 및 감마 사슬들은 재조합 라미닌-521로 조립되는, 단리된 재조합 라미닌-521이 개시된다.

[0031] 다른 구체 예에서, 상기 알파 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열과 적어도 90% 동일성을 가질 수 있다. 상기 베타 사슬 폴리펩타이드 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열과 또한 적어도 90% 동일성을 가질 수 있다. 상기 감마 사슬 폴리펩타이드는 또한 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열과 적어도 90% 동일성을 가질 수 있다.

[0032] 다른 구체 예에서, 상기 알파 사슬은 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열을 가진다. 또한, 상기 베타 사슬은 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열을 가질 수 있다. 더 상세하게는, 상기 감마 사슬은 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열을 가진다.

[0033] 상기 베타 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열과 적어도 80% 동일성 가질 수 있다. 상기 감마 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열과 적어도 80% 동일성을 가질 수 있다.

[0034] 또한, a) 청구항 1의 단리된 재조합 라미닌-521; 및 b) 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물이 개시된다.

[0035] 또한, 성장 배지, 및 그 위에, 재조합 라미닌 521 (라미닌-11)을 포함하는 코팅을 포함하는 시험관 내에서 성장된 다능성 줄기 세포를 자기 재생하게 하는 조성물이 개시된다.

[0036] 상기 조성물은 성장 인자를 더 포함할 수 있다.

[0037] 상기 조성물은 임의의 분화 억제제가 결합될 수 있다. 상기 조성물은 또한 임의의 지지 세포 (feeder cell)가 결합될 수 있다. 상기 조성물은 또한 임의의 분화 유도체가 결합될 수 있다. 특정 구체 예에서, 상기 조성물은 임의의 분화 억제제, 배양 보조 세포 또는 분화 유도체 (differentiation inductors)가 없을 수 있다.

[0038] 또한 성장 배지 및 그 위에, 재조합 라미닌 521 (라미닌-11)을 포함하는 코팅을 포함하는 기질을 제공하는 단계, 다능성 줄기 세포들을 단일 세포 현탁액으로 해체하는 단계 및 상기 다능성 줄기 세포들을 상기 코팅 상에 단일 세포 현탁액으로 분주하는 단계를 포함하는, 다능성 줄기 세포의 전분화능을 시험관에서 유지시키는 방법이 개시된다.

[0039] 상기 성장 배지는 성장인자 또는 성장인자들을 포함할 수 있다. 성장인자들의 예는 염기성 섬유아세포 성장인자 및 인슐린 성장인자를 포함한다.

[0040] 때때로, 상기 성장 배지 및 코팅은 임의의 분화 억제제가 결합되어 있다. 예를 들어, 백혈병 억제제 인자가 존재하지 않는다.

[0041] 상기 조성물은 마우스 섬유아세포 또는 인간 포피 (foreskin) 섬유아세포와 같은 임의의 지지 세포가 결합될 수 있다. 상기 조성물은 노긴 (noggin) 또는 케라틴세포 성장인자와 같은 분화 유도체가 결합될 수 있다. 특정 구체 예에서, 상기 조성물은 임의의 분화 억제제, 지지 세포 또는 분화 유도체가 결합되어 있다.

[0042] 상기 다능성 줄기 세포들은 라미닌-521 코팅에 단일층으로서 분주된다.

[0043] 상기 다능성 줄기 세포들은 200 세포/ mm^2 또는 그 이하의 밀도로 상기 코팅에 분주된다. 대안적으로, 상기 다능성 줄기 세포들은 200 세포/ mm^2 이상의 밀도로 상기 코팅에 놓여진다. 또는, 상기 다능성 줄기 세포들은 상기 코팅에 어떠한 두 가지 줄기 세포들이 서로 접촉하는 것이 없도록 분주된다.

- [0044] 또한, 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열과 적어도 80% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 제1 사슬, 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열과 적어도 70% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 제2 사슬, 및 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열과 적어도 70% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함하는 제3 사슬을 포함하고, 상기 제1, 제2 및 제3 사슬은 재조합 라미닌-521로 조립되는, 그러한 재조합 라미닌-521을 발현하는 숙주 세포를 제공하는 단계, 상기 숙주 세포를 세포 배양 배지에서, 상기 재조합 라미닌-521 사슬의 발현을 자극하는 조건하에서 배양하는 단계 상기 숙주 세포 배양 배지를, 상기 재조합 라미닌-521에 결합하는 화합물을 포함하는 칼럼을 통과시키는 단계 상기 칼럼을 세척하여 미결합 물질을 제거하는 단계 및 결합된 재조합 라미닌-521을 상기 칼럼으로부터 용출시키는 단계를 포함한 방법에 의해 생성된 단리된 재조합 라미닌-521이 개시된다.
- [0045] 다른 구체 예에 있어서, 온전한 라미닌을 포함하는 코팅을 그 위에 가지는 기질을 수납하는 단계, 다능성 줄기 세포 및 세포 배양 배지를 상기 기질 위에 두는 단계 및 PI3-키나제/Akt 경로를 활성화시키는 단계를 포함하는, 다능성 줄기세포의 전분화능을 시험관 내에서 유지시키는 방법이 개시된다.
- [0046] 상기 온전한 라미닌은 라미닌-521 또는 라미닌-511일 수 있다. 특정 구체 예에서, 상기 세포 배양 배지는 베타 섬유아세포 성장인자 (bFGF)와 같은 임의의 성장인자를 포함하지 않는다. 상기 코팅은 카드헤린 (cadherin)을 포함할 수 있다. 상기 다능성 줄기 세포는 200 세포/mm² 이하의 밀도로 코팅에 분주될 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또한 줄기 세포를 다능성 상태로 유지하는 데 사용될 수 있는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 다양한 구체 예에서, 0 보다 크고 3.9 ng/mL 까지의 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF)를 포함하는, 다능성 줄기세포에 영양을 공급하는 세포 배양 배지가 개시된다.
- [0048] 상기 세포 배양 배지는 0.5 내지 3.5 ng/mL의 bFGF를 위시한, 3.5 ng/mL 이하의 bFGF를 포함한다.
- [0049] 상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 무기염, 적어도 하나의 미량 미네랄, 적어도 하나의 에너지 기질, 적어도 하나의 지질, 적어도 하나의 아미노산, 적어도 하나의 비타민, 또는 적어도 하나의 추가의 성장인자를 더 포함할 수 있다. 특정 구체 예에서, 상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 무기염, 적어도 하나의 미량 미네랄, 적어도 하나의 에너지 기질, 적어도 하나의 지질, 적어도 하나의 아미노산, 및 적어도 하나의 비타민을 더 포함한다.
- [0050] 상기 세포 배양 배지는 (1) 알부민, (2) 인슐린 또는 인슐린 대체물, 또는 (3) 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물의 임의의 것을 포함하지 않을 수 있다.
- [0051] 상기 세포 배양 배지는 알부민, 인슐린, 염화리튬, GABA, TGF 베타 1, 피페콜린 산, L-글루타민, MEM 비-필수 아미노산 용액 및 DMEM/F12 용액을 더 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 추가의 성장인자, 적어도 하나의 미량 미네랄, 및 적어도 하나의 지질을 더 포함할 수 있다.
- [0053] 또한, 0보다 크고 3.9 ng/mL까지의 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF)를 포함하는 세포 배양 배지 및 줄기세포에 지지물을 제공하기 위한 기질을 포함하는, 다능성 줄기세포를 유지하기 위한 시스템이 개시된다.
- [0054] 상기 기질은 라미닌-521 또는 라미닌-511을 포함할 수 있다. 상기 기질은 카드헤린을 또한 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 및 다른 비제한적 특성들은 하기에 더욱 상세히 설명될 것이다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명에 따르면, 라미닌-521은 줄기 세포의 생체 외 다능성을 유지시킬 수 있으며, 자가 재생을 가능하게 하며, 인간 배아 줄기 세포의 단일 세포 생존을 가능하게 한다. 분화 억제제 또는 지지세포의 부재 하에, 다능성 인간 배아 줄기 세포가 재조합 라미닌-521 (라미닌 11)의 기질로 코팅된 플레이트 상에서 배양될 때, 상기 배아 줄기 세포는 증식하며 그들의 다능성을 유지한다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 본 특허 또는 출원서는 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면을 가진 이러한 특허 또는 특

허 출원 공개본의 사본은 필요한 요금 지불과 함께 요청시 특허청에서 제공될 것이다.

하기에 도면의 간단한 설명이 제시되며, 이는 본 명세서에 개시된 예증적 구체 예를 설명하기 위한 것으로 이를 제한하는 목적으로 제시되지 않는다.

도 1은 재조합 라미닌 분자의 회전 음영 전자 현미경 사진이다.

도 2는 라미닌, α , β , 및 γ 사슬의 구조적 모티프를 나타낸다. N-말단, 내부 및 C-말단 구형 도메인들이 흰색 타원으로 도시되어 있다. 겹코일 (coiled-coil) 형성 도메인들 (I 및 II)는 흰색 사각형으로 도시된다. 막대형 구조물 (도메인 V, IIIb, 및 IIIa)은 회색 사각형으로 도시되어 있다.

도 3은 SDS-PAGE를 사용한 인간 재조합 라미닌-521의 특성화 결과를 나타낸다. 재조합 라미닌-521의 면역 블롯이 비환원 (ox로서 표시) 및 환원 (불게 표시) 조건하에서 만들어졌다. 단백질을 3-8% 젤에서 PVDF 막으로 전이시킨 후, 라미닌 α 5 항체 (2F7), β 2 항체 (MAB2066), β 1 항체 (MAB1921) 및 γ 1 항체 (H-19)로 염색하였다.

도 4 및 5는 배양 하루 후에, 마트리젤 (Mg), 마우스 라미닌-111 (mLN111), 인간 재조합-라미닌-511 (r-라미닌-511 또는 r-LN-511), 인간 재조합-라미닌-521 (r-라미닌-521 또는 r-LN-521), 또는 r-라미닌-511과 r-라미닌-521의 혼합물 (mix)이 코팅된 배양 접시에 부착된 인간 ES 세포를 크리스탈 바이올렛 염색한 것을 나타낸다. 양도면은 5x 확대되었다. 도 4에서, 상기 세포들은 ROCK 억제제 없이 배양되었다. 도 5에서 상기 세포들은 ROCK 억제제 Y-27632를 사용하여 배양되었다.

도 6은 ROCK 억제제 없이 배양 한 시간 후에, 인간 r-라미닌-521 (LN521로 표시), 인간 r-라미닌-511 (LN511), 및 마트리젤 (Mg) 코팅 배양 접시로의 인간 ES 세포의 접착을 나타내는 그래프이다. 오차 막대는 측정치의 표준 오차를 나타낸다 (n=3).

도 7은 ROCK 억제제없이, 배양 하루 후, 마트리젤 (Mg), 마우스 라미닌-111 (mLN111), 인간 r-라미닌-511 (LN511), 인간 r-라미닌-521 (LN521), 또는 r-라미닌-511과 r-라미닌-521의 혼합물 (mix)로 코팅된 배양접시로, 인간 ES 세포가 부착된 것을 나타내는 그래프이다. 또한, ROCK 억제제 및 마트리젤 (In&Mg), 마우스 라미닌-111 (In&mLN111), 인간 r-라미닌-511 (In&LN511), 인간 r-라미닌-521 (In&LN521), 또는 r-라미닌-511과 r-라미닌-521의 혼합물 (In&mix)을 가지는 배양접시에서의 하루 동안 배양 후의 결과도 포함된다. 양쪽 실험에 대하여 세포는 동일한 밀도로 동일한 세포 배양 접시에 분주되었다. 오차 막대는 측정치의 표준 오차를 나타낸다 (n=3).

도 8은 단일 세포 해체 계대배양을 사용하여 r-라미닌-521 (LN-521_1 및 LN-521_2) 상에서 배양된 인간 ES 세포, 및 작은 덩어리로 계대배양하여 마트리젤 (Mg_1 및 Mg_2) 상에서 배양한 인간 ES 세포에 대한 성장 곡선을 도시한다. 후자의 세포는 Rodin 등, *Nature Biotechnol.*, vol. 28, pp. 611-615 (2010)에서 설명한 바와 같이 계대배양되었다.

도 9는 r-라미닌-521 상에서 수 번의 단일 세포 해체 계대 배양 후, 전분화능의 마커인 OCT4에 대한 인간 ES 세포의 FACS 분석이다. 양성 세포의 백분율이 괄호 안에 기입되어 있다.

도 10은 마트리젤 상에서 작은 덩어리로 해체하고 수 번의 계대배양 후 OCT4에 대한 인간 ES 세포의 FACS 분석이다. 양성 세포의 백분율이 괄호에 기입되어 있다.

도 11은 수 번의 단일 세포 해체 계대배양 후 인간 r-라미닌-521 (LN521) 상에서 배양된 인간 ES 세포에서 및 덩어리로 세포를 수 번 계대배양 후 마트리젤 (Mg)에서 배양된 세포에서 전분화능 마커인 Oct4 및 Nanog의 mRNA 전사체의 수를 비교한, 실시간 정량적 RT-PCR 분석을 결과를 나타낸다. 오차 바는 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 12는 분주 후, 1 시간 동안 마트리젤 (Mg), LN-111, LN-511, 및 LN-521에서 성장한 줄기세포에서 인산화된 미오신 경사슬 (P-MLC)의 수준을 비교한 웨스턴 블롯 (Western blot)이다.

도 13은 분주 후 6 시간동안 마트리젤 (Mg), LN-111, LN-511, 및 LN-521에서 성장한 줄기세포에서의 인산화된 미오신 경사슬 (P-MLC)의 수준을 비교한 웨스턴 블롯이다.

도 14는 분주 후 5 내지 7 시간 동안 마트리젤 (Mg), LN-111, LN-511, 및 LN-521에서 성장한 인간 배아줄기세포의 상대적 이동을 비교한 그래프이다.

도 15는 IgG 및 IgM 차단 항체(IgGM)를 적용하고, 및 인테그린 $\beta 1$ 에 대한 기능 차단 항체 (b1)를 적용하면서, LN-521 상에서 성장한 인간 배아줄기세포의 상대적 이동을 비교한 그래프이다.

도 16은 물, DMSO, LY294002 (Akt 억제제), 보르트만닌 (PI3K/Akt 억제제), 및 PD 98059 (MEK1 억제제)이 존재 하에서 LN-521 상의 hES 세포의 상대적 생존을 비교한 그래프이다. 이것은 LN-521 상에서 hES 세포 생존에 필요한 PI3K/Akt의 활성화를 나타낸다. 상기 배지는 bFGF를 포함하였다.

도 17은 DMSO, LY294002 (Akt 억제제), 및 PD 98059 (MEK1 억제제)의 존재 하에서 LN-521 상에서 hES의 상대적 인 생존을 비교한 그래프이다. 외부 bFGF를 넣지 않았다.

도 18은 LY 294002로 처리되고 LN-521 상에서 분주하고 한 시간 후에 수집된 세포를 대조군 세포 (DMSO)에 대하여 비교한 웨스턴 블롯이다.

도 19는 PD98059로 처리되고 LN-521 상에서 분주하고 한 시간 후에 수집된 세포를 대조군 세포 (DMSO)에 대하여 비교한 웨스턴 블롯이다.

도 20은 매트릭젤 (Mg), LN-111, LN-511, 또는 LN-521 상에 분주하고 한 시간 후에 수집된 세포 용해액에서 Akt2 인산화에 대한, 상대적인 수준을 ELISA로 수득한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 21은 매트릭젤 (Mg), LN-111, LN-511, 또는 LN-521 상에 분주하고, 한 시간 후에 수집된 세포 용해액에서, Akt1 인산화에 대한, 상대적인 수준을 ELISA로 수득한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 22는 더 높은 bFGF 배지 (03_100)와 비교하여, 낮은 bFGF 배지 (03_3.9)에서 배양된 HS181 hES 세포의 성장 곡선을 나타내는 그래프이다.

도 23은 더 높은 bFGF 배지 (03_100)와 비교하여 낮은 bFGF 배지 (03_3.9)에서 배양된 HS181 hES 세포에서의 두 개 전분화능 마커 (Oct4 및 Nanog)의 상대적인mRNA 발현 수준을 나타내는 그래프이다.

도 24는 라미닌-521/E-카드헤린 매트릭스 상에서의 새로운 인간 배아줄기 HS841 세포주의 초기 단계 유도화를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 첨부 도면을 참조하여 본 명세서에서 개시된 조성물과 방법을 좀 더 완전하게 이해할 수 있다. 이러한 도면들은 본 발명을 증명하는 편리와 편의에 기반하여 작성된 단순한 통계적 제시물일 뿐이고, 따라서, 예시적인 구체 예의 범위를 정의하거나 제한하려고 의도된 것이 아니다.
- [0059] 명확하게 하기 위해, 특정 용어가 하기 설명에서 사용되고 있지만, 이러한 용어들은 오로지 도면에서의 예시를 위해 선택된 구체 예의 특정 구조를 지적하는 것이고, 본 발명의 범위를 정의하거나 제한하기 위한 것이 아니다. 도면과 하기 설명에서, 유사 번호의 지시 대상은 유사 기능의 성분을 나타내는 것으로 이해하여야 한다.
- [0060] 본 명세서에서 논의된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원서들은 전체로서 참조 문헌으로 기입된다.
- [0061] 별다른 언급이 없는 한, 본 출원서에서 사용된 기술들은 하기와 같은 임의의 참조문헌에서 나타나는 것이다: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 등., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, D. Goeddel 편집, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M. P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, 등 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Second Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.), Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E. J. Murray, The human a Press Inc., Clifton, N.J.), or the Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, Tex.).
- [0062] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된 핵산 서열"은 핵산이 유도되는 유기체의 게놈성 DNA에서 핵산에 자연적으로 접하고 있는 유전 서열이 없는 핵산 서열을 지칭한다 (예, 그 핵산이 유도되는 유기체의 게놈성 DNA에서 단리된 핵산 분자의 유전자에 인접하여 위치한 유전적 서열). 상기 "단리된" 서열은, 그러나, 상기 언급된 서열에 자연적으로 접하고 있지 않은 다른 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 이중 프로모터 서열, 또는 다른 벡터 서열들에 연결될 수 있다. 본 발명에 따른 핵산 서열이 숙주 세포를 형질감염시키는 데 사용되는 발현

백터의 일 부분일 수있기 때문에 (하기 참조), 상기 단리된 핵산 서열이 "단리된" 것으로 간주되는 다른 세포성 물질이 없을 필요는 없다.

[0063] 본 발명은 인간 라미닌 $\beta 2$ 사슬의 전장 인간 라미닌 $\beta 2$ 사슬 핵산 서열 (서열번호 4)를 포함하는 재조합 발현 백터를 제공한다. 특정 구체 예에서, 상기 발현 백터는 이중성 프로모터 (즉, $\beta 2$ 라미닌 사슬에 대해 자연적으로 발생하는 프로모터가 아닌)에 작동가능하게 연결된, 서열번호 4에 의해 암호화된 핵산을 포함한다. 프로모터 및 라미닌 $\beta 2$ 사슬 핵산 서열은 상기 프로모터가 라미닌 $\beta 2$ 사슬 DNA를 RNA로 발현하는 것을 가능하게 할 수 있을 때, "작동가능하게 연결된: 것이다.

[0064] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "백터"는 그것이 연결되어진 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 백터의 일 유형은 "플라즈미드"로서, 이는 추가의 DNA 세그먼트들이 클론될 수 있는 원형의 이중 나선 DNA를 지칭한다. 백터의 다른 유형은 바이러스성 백터로서, 여기서, 추가의 DNA 세그먼트들이 바이러스 게놈으로 클론될 수 있다. 어떤 백터들은 그들이 도입된 숙주 세포에서 자발적으로 복제될 수 있다 (즉, 복제의 박테리아 기원을 가지는 박테리아 백터, 및 에피솜성 포유동물 백터 (episomal mammalian vectors)). 다른 백터들 (예, 비-에피솜성 포유동물 백터들)은 숙주 세포로 도입시 숙주세포의 게놈에 통합되며, 이로써 숙주 게놈에 따라 복제된다. 더욱이, 특정 백터들은 그들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 주도할 수 있다. 그러한 백터들은 본 명세서에서 "재조합 발현 백터" 또는 단순히 "발현 백터"로 지칭된다. 본 발명에서, 본 발명의 라미닌 폴리펩타이드 서열의 발현은 본 발명의 프로모터 서열을 발현될 유전자에 작동가능하게 연결함으로써, 본 발명의 프로모터 서열에 의해 조절된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 사용되는 발현 백터는 플라즈미드의 형태로 있다. 본 명세서에서, 플라즈미드가 백터의 가장 공통적으로 사용되는 형태이기 때문에, "플라즈미드" 및 "백터"는 상호교환하여 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능으로 작동하는, 바이러스성 백터 (예, 복제 결함, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 백터를 포함하는 것으로 의도된다.

[0065] 상기 백터는 또한, 핵산 서열을 서브클로닝하기 위한 폴리링커, 또는 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 수행하는 폴리아데닐화 신호와 같은 추가의 서열을 포함할 수 있다. 폴리아데닐화 신호의 특성이 본 발명의 방법을 성공적으로 실행하는 데 결정적인 것으로는 여겨지지 않고, SV40 및 소 성장 호르몬 폴리-A 위치를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 그러한 서열을 사용할 수 있다. 상기 백터의 요소로서 고려될 수 있는 것은 종결 서열로서, 이는 전달 수준을 향상시키며 구조체 (construct)에서 다른 서열로 초과번역하는 것을 최소화하는 기능을 한다. 또한, 발현 백터는 일반적으로, 종종 항생제 저항 유전자의 형태로 있는, 이러한 백터를 보유하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택성 마커를 가진다.

[0066] 다른 구체 예에서, 본 발명은 본 명세서에서 개시된 라미닌 $\beta 2$ 사슬-발현 재조합 발현 백터로 형질 감염된 숙주 세포를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 백터와 같은 본 발명의 핵산이 도입된 세포를 지칭하려고 하는 것이다. 그러한 세포들은, 예를 들어, 많은 양의 본 발명의 발현 백터를 빠르게 생성하는 데 사용될 수 있는 원핵세포, 또는 기능적 연구를 위한 원핵세포성일 수 있다.

[0067] 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본 발명에서 상호 교환적으로 사용된다. 그러한 용어는 특정 대상을 지칭할 뿐 아니라, 그러한 세포와 같은 자손 (progeny) 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인하여 후속 세대에 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손은, 사실, 부모 세포와 동일하지 않을 수 있으나, 본 발명에서 사용되는 바와 같이 여전히 그 용어의 범위 내에 포함된다.

[0068] 상기 숙주 세포는 본 발명의 하나 이상의 발현백터로 일시적 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 원핵 및 진핵세포로의 발현백터의 그러한 형질감염은 표준 세균 형질전환, 인간 칼슘염 공 침전, 전기천공, 또는 리포솜-매개, DEAE 텍스트란 매개, 다중 양이온 매개, 또는 바이러스 매개 형질감염을 포함하지만 이에 한정되지 않는 당해 분야에 공지된 임의의 기술을 통해 완수될 수 있다 (참조, 예를 들어, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 등, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2.sup.nd Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.)).

[0069] 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단리된 전장 인간 라미닌 $\beta 2$ 사슬 폴리펩타이드를 제공한다.

[0070] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "단리된 폴리펩타이드"는 다른 라미닌 사슬, 및 폴리아크릴아마이드 및 아가로스와의 겔 제제를 위시한 다른 단백질이 없는 폴리펩타이드를 지칭한다. 바람직한 구체 예에서, 상기 단리된 라미닌 폴리펩타이드는 검출할 수 있는 오염 라미닌 사슬이 없다. 따라서, 상기 단백질은 천연원천으로부터

터 분리할 수 있거나, 재조합 단백질은 상기 설명된 형질감염된 숙주 세포로부터 분리될 수 있다.

- [0071] 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 라미닌-521을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "라미닌-521"은 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬을 서로 결합함으로써 형성된 단백질을 지칭한다. 상기 용어는 재조합 라미닌-521 및 천연 발생 원으로부터 얻어진 이중삼중체성 라미닌-521 둘 다를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바람직한 구체 예에서, 상기 라미닌-521은 재조합 라미닌-521 (또는 "r-라미닌-521")을 포함한다.
- [0072] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "r-라미닌-521"은 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬들로부터 선택된 라미닌-521 사슬을 암호화하는 적어도 하나의 핵산 서열, 또는 이의 가공된 또는 분비된 형태를 포함하는 하나 이상의 발현 벡터로 형질 감염된 숙주 세포에 의해 발현된, 재조합 이중삼중체성 라미닌-521을 지칭한다. 그러한 r-라미닌-521은 따라서, 단일 유기체 또는 상이한 유기체로부터 얻는 $\alpha 5$, $\beta 2$, and $\gamma 1$ 서열들을 포함할 수 있다. 다양한 라미닌-521 사슬 DNA 서열들은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 발명의 r-라미닌-521을 제조하는 데 그러한 서열을 사용하는 용도가 고려된다 (참조, 예를 들어., Pouliot, N. 등, *Experimental Cell Research* 261(2):360-71, (2000); Kikkawa, Y. et al., *Journal of Cell Science* 113 (Pt 5):869-76, (2000); Church, H J. et al., *Biochemical Journal* 332 (Pt 2):491-8, (1998); Sorokin, L M. et al., *Developmental Biology* 189(2):285-300, (1997); Miner, J H. et al., *Journal of Biological Chemistry* 270(48):28523-6, (1995); Sorokin, L. 등., *European Journal of Biochemistry* 223(2):603-10, (1994)). 바람직한 구체 예에서, 상기 r-라미닌-521은 재조합 인간 $\alpha 5$, $\beta 2$, and $\gamma 1$ 폴리펩타이드 사슬들로부터 형성된 것이다.
- [0073] 본 발명은 재조합 이중삼중체성 라미닌-521을 구성하는 오직 하나 또는 두 개 사슬만이 내재적 라미닌-521 사슬에 의해 암호화되어 있는 그러한 라미닌 분자를 포함한다. 바람직한 구체 예에서, $\alpha 5$, $\beta 2$, 및 $\gamma 1$ 폴리펩타이드 사슬 각각은 재조합적으로 발현된다.
- [0074] 상기 라미닌-521은 온전한 단백질이다. 용어 "온전한"은 α -사슬, β -사슬, 및 γ -사슬의 도메인 모두로 구성되며, 이러한 세 개 사슬은 서로 연결되어 이중삼중체성 구조를 형성하는, 단백질을 지칭한다. 상기 단백질은 개별적인 사슬, 단편물 또는 기능성 도메인으로 분해되지 않는다. 용어 "사슬"은 라미닌 단백질의 알파, 베타, 또는 감마 사슬 전체를 지칭한다. 용어 "단편물"은 다른 분자 또는 수용체에 결합 활성을 보유하는, 하나, 두 개 또는 세 개 기능성 도메인들을 포함하는 임의의 단백질 단편을 지칭한다. 그러나, 각 사슬이 세 가지 그러한 도메인 이상을 가지기 때문에 사슬은 단편이라고 간주되어서는 안된다. 유사하게, 온전한 라미닌 단백질은 단편물로 간주되어서는 안된다. 기능성 도메인들의 예는 도메인 I, II, III, IV, V, VI, 및 G 도메인을 포함한다.
- [0075] 라미닌-521은 분비된 단백질로서, 신호 서열의 결과로, 소포체 (ER), 분비 벡클, 및 세포의 공간으로 향할 수 있다. 분비된 단백질이 세포의 공간으로 배출되는 경우, 분비된 단백질은 세포의 가공과정을 받게 되어 "성숙한" 단백질을 형성한다. 그러한 가공과정은 가변될 수 있고, 따라서 다양한 양태의 최종 "성숙 단백질"을 산출하게 된다. 예를 들어, $\alpha 5$, $\beta 2$, 및 $\gamma 1$ 사슬들의 길이는 단백질마다 다를 수 있다. 그러나, 최종 성숙 단백질은, 사슬 길이가 다르다 할지라도, 여전히 동일한 기능성을 가진다. 본 발명의 분리된 라미닌-521은 전장 폴리펩타이드 사슬 및 임의의 그러한 자연적으로 가공된 라미닌-521 폴리펩타이드 사슬 둘 다를 포함하는 이중삼중체를 포함한다.
- [0076] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 라미닌-521 폴리펩타이드 사슬은 하기 중 하나 이상에 따른 폴리펩타이드 사슬을 지칭한다:
- [0077] (a) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3, 및 R2-R4로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조를 포함하는 것으로서, R1은 아미노 말단 메티오닌 R2는 폴리펩타이드의 분비를 실행할 수 있는 신호 서열로, 이 신호 서열은 특정 라미닌 사슬에 대한 천연적 신호 서열, 다른 분비된 단백질에 대한 신호 서열 또는 인공적인 서열일 수 있는 것이고, R3는 $\alpha 5$ 사슬, $\beta 2$ 사슬, 및 $\gamma 1$ 사슬로 구성되는 군으로부터 선택된 분비된 라미닌 사슬이고, R4는 라미닌 사슬 아미노산 서열 내의 임의의 위치에 위치할 수 있는, 에피토프 태그 (후술하는 바와 같은)를 더 포함하는 분비된 $\alpha 5$, $\beta 2$, 또는 $\gamma 1$ 라미닌 사슬인, 폴리펩타이드 사슬; 또는
- [0078] (b) 본 발명에서 개시된 재조합 라미닌-521 사슬 DNA 서열들 (서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6), 또는 이의 상보 서열들 중 하나 이상의 암호화 부위 또는 이의 부분과 높은 또는 낮은 충실성 (stringency) 조건하에서 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 사슬; 또는
- [0079] (c) 상기 개시된 라미닌-521 폴리펩타이드 사슬 아미노산 서열들 (서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3) 중 하나 이상과 적어도 70% 동일성, 바람직하게는 적어도 80%, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성을 가지는

폴리펩타이드 사슬.

- [0080] "하이브리드화의 충실성 (stringency)"는 세척 조건을 지칭하기 위해 사용된 것으로, 그 조건하에서 핵산 하이브리드화물이 안정적인 조건을 지칭한다. 본 발명은 또한 본 발명에서 개시된 라미닌 사슬 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보물의 암호화 서열들의 전체 또는 일부에 대하여, 고도의 충실성 조건 (본 발명에서 정의된 바와 같이)하에서 하이브리드화하는 핵산을 포함한다. 상기 하이브리드화 핵산들의 하이브리드화 부분은 일반적으로 길이가 적어도 50 뉴클레오타이드 이상이다. 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 하이브리드화물의 안정성은 하이브리드화물의 용융점 (T_m)으로 반영된다. 서열 상동성이 매 1 % 감소될 때마다 T_m 은 약 1-1.5°C 감소한다. 일반적으로, 하이브리드화물의 안정성은 소듐 이온 농도와 온도의 함수이다. 일반적으로, 하이브리드화 반응은 더 낮은 충실성의 조건에서 실행되다가, 나중에, 다양한, 하지만, 더 높은 충실성의 세척에서 실행된다. 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 높은 충실성은 50% 포름아미드, 5xSSC (750 mM NaCl, 75 mM 구연산 나트륨염), 50 mM 인산 나트륨염 (pH 7.6), 5x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 셀레이트, 및 20 μ g/ml 변성된, 전단 (sheared) 연어 정자 DNA를 포함하는 용액에서 42°C에서 밤새 처리한 후, 0.1x SSC으로 약 65°C에서 필터를 세척하는 것을 지칭한다.
- [0081] 또한, 낮은 충실성 하이브리드화 조건에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 라미닌-521-암호화 핵산서열을 제공한다. 하이브리드화 및 신호 검출의 충실성에서의 변화는 포름아미드 농도 (더 낮은 포름아미드 농도는 낮은 충실성을 결과한다); 염 조건 또는 온도를 조절함으로써 일차적으로 달성된다. 예를 들어, 더 낮은 충실성 조건은 6x SSPE (20x SSPE=3M NaCl; 0.2M NaH_2PO_4 0.02M EDTA, pH 7.4), 0.5% SDS, 30% 포름아미드, 100 μ g/ml 연어 정자 차단 DNA를 포함하는 용액에서 밤새 37°C에서 처리한 후, 50°C에서 1x SSPE, 0.1% SDS로 세척하는 것을 포함한다. 또한, 더 낮은 충실성으로는, 충실성 하이브리드화 후에 실시된 세척을 더 높은 염 농도 (예, 5x SSC)에서 실시한다.
- [0082] 전술한 조건들의 변화는 하이브리드화 실험에서의 배경을 억제하는 데 사용되는 대안적인 차단 제제를 포함하고 및/또는 대체하는 것을 통해서 수행될 수 있다. 일반적인 차단 제제는 덴하르트 제제, BLOTTO, 헤파린, 변성된 연어 정자 DNA, 및 상업적으로 이용가능한 전매특허의 제품을 포함한다. 특정 차단 제제를 포함하는 것은, 양립성의 문제로 인해, 전술한 하이브리드화 조건의 변형이 요구될 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 두 개 아미노산 또는 두 개 핵산의 "동일성 백분율"은 칼린 (Karlin) 및 알트슐 (Altschul) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990)의 알고리즘으로 칼린과 알트슐이 변형한 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) 알고리즘을 사용하여 결정된다. 그러한 알고리즘은 알트슐 등 (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램들에 통합되어 있다. BLAST 뉴클레오타이드 조사를 NBLAST 프로그램, 점수 100, 단어길이=12를 사용하여 실시하여 본 발명의 핵산 분자에 대한 뉴클레오타이드 서열 동일성을 결정한다. BLAST 단백질 조사는 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어길이=3을 사용하여, 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열 동일성을 결정하였다. 비교 목적상 간극된 (gapped) 배열을 얻기 위해, Gapped BLAST를 알트슐 등. (Nucleic acids. Res. 25:3389-3402, 1997)에서 설명한 대로 사용하였다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램 사용시, 각 프로그램들 (예, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 (default) 매개변수를 사용하였다.
- [0084] 본 발명의 다른 구체 예들은 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 6에 포함된 폴리펩타이드 서열들의 하나 이상과, 적어도 70% 동일성, 바람직하게는 적어도 80% 동일성, 및 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 가지는 라미닌-521 사슬 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0085] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, "α5 폴리뉴클레오타이드" 라미닌 α5 사슬을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 그러한 폴리뉴클레오타이드는 하기중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다: (a) 서열번호 5의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 5의 암호화 서열 또는 이의 상보 서열에, 저 또는 고 충실성 조건하에서 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3, 및 R2-R4로 구성되는 군으로부터 선택된 일반 구조를 가지는 라미닌 α5 사슬 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 여기서 R1 및 R2 전술한 바와 같고, R3는 분비된 α5 사슬이고, 및 R4는 에피토프 태그를 포함하는 분비된 α5 사슬이다.
- [0086] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, "β2 폴리뉴클레오타이드"는 동일한 이름의 β2 라미닌 사슬을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 그러한 폴리뉴클레오타이드는 하기 중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다: (a)

서열번호 4의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 4의 암호화 서열 또는 이의 상보 서열에, 저 또는 고 충실성 조건하에서 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3, 및 R2-R4로 구성되는 군으로부터 선택된 일반 구조를 가지는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 여기서 R1 및 R2 전술한 바와 같고, R3는 분비된 $\beta 2$ 사슬이고, 및 R4는 에피토프 태그를 포함하는 분비된 $\beta 2$ 사슬이다.

[0087] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, " $\gamma 1$ 폴리뉴클레오타이드"는 동일한 이름의 $\gamma 1$ 라미닌 사슬을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 그러한 폴리뉴클레오타이드는 하기 중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다: (a) 서열번호 6의 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 가장 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 6의 암호화 서열 또는 이의 상보 서열에, 저 또는 고 충실성 조건하에서 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 (c) R1-R2-R3, R1-R2-R4, R3, R4, R1-R3, R1-R4, R2-R3, 및 R2-R4로 구성되는 군으로부터 선택된 일반 구조를 가지는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 여기서 R1 및 R2 전술한 바와 같고, R3는 분비된 $\gamma 1$ 사슬이고, 및 R4는 에피토프 태그를 포함하는 분비된 $\gamma 1$ 사슬이다.

[0088] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프 태그 (epitope tag)"는 키메릭 단백질 (chimeric protein)의 부분으로서 발현되는 폴리펩타이드 서열을 지칭하는 것으로서, 에피토프 태그는 에피토프 태그에 대하여 발생된 항체와의 결합에 대한 또는 그 태그를 포함하는 서열들의 친화성 정제에 사용될 수 있는 다른 분자들의 결합에 대한 인지 장소로서 작용한다.

[0089] 바람직한 구체 예에서, 라미닌 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬, 또는 이의 단편을 암호화하는 cDNA들이 발현 벡터로 서브클론된다. 대안적으로, 하나 이상의 인트론을 포함하는 라미닌 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및/또는 $\gamma 1$ 유전자 서열들을 사용하여 발현 벡터로 서브클로닝할 수 있다.

[0090] 다른 관점에서, 본 발명은 라미닌-521의 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬들로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 함유하는 발현벡터로 형질감염된 세포로서, 이러한 형질감염된 세포는 재조합 라미닌 사슬을 포함하는 이형삼중체성 라미닌-521을 발현하는, 라미닌-521 발현 세포를 제공한다. 바람직한 구체 예에서, 상기 세포들은, 더욱 바람직하게는 모두 인간 사슬인, 라미닌-521의 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬들을 포함하는 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터로 전체적으로 형질감염된다. 상기 다중 형질 감염 후, 상기 세포들은 이형삼중체성 r-라미닌-521을 형성하는 재조합 라미닌-521 사슬들을 발현한다.

[0091] 발현 벡터들을 진핵 세포에 형질감염시키는 것은 인산칼슘염 공침전, 전기천공, 또는 리포솜 매개-, DEAE 텍스트란 매개-, 다중양이온 매개-, 또는 바이러스 매개 형질감염을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 공지된 기술을 통해 완수될 수 있다. 세균 세포의 형질전환은 표준 방법으로 수행될 수 있다.

[0092] 바람직한 구체 예에서, 상기 세포들은 안정적으로 형질감염된다. 안정적 형질감염 및 적절한 형질감염된 세포의 선택 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 다른 바람직한 구체 예에서, CMV 프로모터-운행 (driven) 발현 벡터를 인간 신장 배아 293 세포주에서 사용한다.

[0093] r-라미닌-521을 발현하고 분비할 수 있는 임의의 세포를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 진핵 세포를 사용하며, 가장 바람직하게는, 신장 및 내피 세포 주를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 포유동물 세포를 사용한다. 개별 사슬 또는 r-라미닌-521의 발현을 조절하는 데 사용되는 프로모터 서열은 구성적 (CMV, SV40, RSV, 액틴, EF를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 다양한 프로모터에 의해 조절되는) 또는 유도적 (테트라사이클린, 액티손, 스테로이드-반응성을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 임의의 많은 유도성 프로모터들에 의해 조절되는)일 수 있다. 탄수화물 및 디설파이드 번역후 개질은 라미닌-521 단백질 폴딩과 기능에 필요한 것으로 여겨진다. 이것은, 비록 다른 시스템들이, 예를 들어, 항체 생산용으로 항원을 얻는 데 필요하다고 하더라도, 진핵 세포를 기능성 r-라미닌-521을 생산하는 데 더 유리하게 만든다. 가장 바람직한 구체 예에서, 상기 포유동물 세포는 상기 라미닌 $\beta 2$ 사슬을 내재적으로 발현하지 않는 것이다. 다른 바람직한 구체 예에서, 상기 세포는 모든 상기 라미닌-521 사슬들을 내재적으로 발현하지 않는 것이다.

[0094] 단백질은 단백질의 정제를 촉진하는 데에 유용한 추가의 서열, 예를 들면 에피토프 태그 및 수송 신호를 포함할 수 있다. 이러한 에피토프로는 FLAG (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), myc (9E 0) (Invitrogen, Carlsbad,

Calif.), 6-His (Invitrogen; Novagen, Madison, Wis.), 및 HA (Boehringer Mannheim Biochemicals)를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 이러한 수송 신호로는 유출 신호, 분비 신호, 핵 위치 신호, 및 혈장 멤브레인 위치 신호를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0095] 일부 구체 예에서, 적어도 하나의 라미닌 사슬 폴리펩티드 서열 또는 그 프래그먼트는 "에피토프 태그"를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 결합되어, 적어도 하나의 사슬이 발현된 에피토프 태그를 포함한 융합 단백질로서 발현된다. 에피토프 태그는 얻어진 γ -라미닌-521이 기능성을 유지할 수 있는 것이면, γ -라미닌-521을 포함한 폴리펩티드 사슬의 어느 하나에 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 내부로서 발현될 수 있다.

[0096] 다른 구체 예에서, 하나의 γ -라미닌-521 사슬은 제 1 에피토프 태그를 갖는 융합 단백질로서 발현되고, 적어도 하나의 다른 γ -라미닌 사슬은 제 2의 다른 에피토프 태그와 융합 단백질로서 발현되고, 수회의 정제를 실시할 수 있게 한다. 또한, 동일한 에피토프 태그를 사용하여 하나 이상을 초과한 γ -라미닌 사슬을 갖는 융합 단백질을 형성할 수 있다.

[0097] 또 다른 구체 예에서, 에피토프 태그는 γ -라미닌-521 사슬로부터 분해되도록 설계될 수 있다. 또한, γ -라미닌-521 사슬 중 어느 하나에 에피토프 태그가 융합되지 않고, γ -라미닌-521은 표준 방법에 의해서 단리되고, 상기 방법은 라미닌-521 특정 항체 또는 다른 라미닌-521 결합 분자를 사용하는 친화성 크로마토그래피를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0098] 하나의 라미닌 사슬로 감염된 세포로부터 매질은 초기에 라미닌 사슬-특정 항체를 사용해서 웨스턴 블롯으로 분석된다. 감염 후 단독의 라미닌 사슬의 발현은 일반적으로 세포 내에서 실시된다. 각각의 감염된 사슬에 대해서 반응성을 나타내는 클론은 임의의 적당한 방법, 예를 들면 PCR, 역전사 PCR, 또는 핵산 하이브리드화에 의해서 검증되어 감염된 유전자의 존재를 확인한다. 바람직하게, 이러한 클론으로부터 게놈 DNA 제제의 분석은 라미닌 사슬 특정 프라이머 쌍을 사용하는 PCR에 의해서 실시된다. 모든 3개의 사슬을 제조하는 감염된 클론으로부터 매질은 γ -라미닌-521 분비 및/또는 활성에 대해서 임의의 적당한 방법, 예를 들면 웨스턴 블롯 분석 및 세포 결합 검정 (assay)에 의해서 분석된다.

[0099] 바람직한 구체 예에서, γ -라미닌-521의 정제는 감염된 세포로부터 매질을 항체 친화성 칼럼을 통과시킴으로써 달성된다. 일부 구체 예에서, 적어도 하나의 재조합 사슬에 대해서 발현된 펩티드에 대한 항체가 친화성 칼럼에 부착되고, 매질로 분비된 γ -라미닌-521에 결합된다. γ -라미닌-521은 칼럼 위에 과잉의 펩티드를 통과시킴으로써 칼럼으로부터 제거한다. 용리된 분율은 임의의 적당한 방법에 의해서 분석하고, 예를 들면 이러한 방법은 겔 전기영동법 및 웨스턴 블롯을 들 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 펩티드 에피토프는 정제 후 분해될 수 있다. 다른 구체 예에서, 2개 또는 3개의 분비된 γ -라미닌 사슬은 각각 다른 에피토프 태그를 갖는 융합 단백질로서 발현되어, 2회 또는 3회의 정제를 실시하여 2배 또는 3배 단리된 γ -라미닌-521을 얻을 수 있다. 에피토프 태그는 정제 후 γ -라미닌-521 사슬로부터 분해되도록 설계될 수 있다. 또한, 에피토프 태그는 γ -라미닌-521 사슬 중 어느 하나에 융합되지 않고, 표준 방법에 의해서 γ -라미닌-521이 단리되고, 이러한 표준 방법은 라미닌-521-특정 항체 또는 다른 라미닌-521 결합 분자를 사용하는 친화성 크로마토 그래피를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지 않는다.

[0100] 다른 구체 예에서, γ -라미닌-521의 정제는 감염된 세포로부터의 매질을 겔 친화성 크로마토그래피 칼럼을 통과시킴으로써 달성된다. 용리된 분율은 임의의 적당한 방법에 의해서 분석하고, 예를 들면 이러한 방법은 겔 전기영동법 및 웨스턴 블롯을 들 수 있다. γ -라미닌-521을 함유하는 분율을 수집하고 표본 순도를 임의의 적당한 방법에 의해서 분석하고, 예를 들면 이러한 방법은 겔 전기영동법 및 웨스턴 블롯을 들 수 있다. 일부 구체 예에서, 단백질 용액을 겔 여과 크로마토그래피 칼럼에 다시 통과시켜서 단백질의 순도를 향상시킬 수 있다. 일부 구체 예에서, γ -라미닌-521의 순도를 높이기 위해서, 이전의 정제 단계로부터 매질 또는 γ -라미닌-521 용액을 이온 교환 칼럼에 통과시킬 수 있다. 용리된 분율은 임의의 적당한 방법에 의해서 분석하고, 예를 들면 이러한 방법은 겔 전기영동법 및 웨스턴 블롯을 들 수 있다. γ -라미닌-521을 함유하는 분율을 수집하고 표본 순도를 임의의 적당한 방법에 의해서 분석하고, 예를 들면 이러한 방법은 상기 기재된 대로이다.

[0101] 본 발명의 γ -라미닌-521 폴리펩티드 사슬은 (i) 하나 이상의 비-필수 아미노산 잔기로 치환, 상기 치환된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해서 코드화되거나 코드화되지 않을 수 있는 것, (ii) 치환기를 갖는 하나 이상의 아미노산 잔기로 치환, 또는 (iii) 상기 성숙 폴리펩티드와 또 다른 화합물, 예를 들면 폴리펩티드(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜)의 안정성 및/또는 용해성을 향상시키기 위한 화합물의 융합, 또는 (iv) 폴리펩티드와 추가의 아미노산, 예를 들면 IgG Fc 융합 영역 펩티드와의 융합, 또는 리더 또는 분비 서열 또는 정제를 용이하게 하는 서열을 포함한다. 이러한 다양한 폴리펩티드는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

- [0102] 예를 들면, 대전된 아미노산을 다른 대전된 아미노산 또는 천연 아미노산으로의 아미노산 대체물을 함유한 폴리펩티드 변형은 개선된 특성, 예를 들면 응집 감소를 포함한 단백질을 생성할 수 있다. 약학적 제형의 응집은 응집체의 면역활성 때문에 활성을 감소시키고 클리어런스를 증가시킨다. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331- 340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993).)
- [0103] 특정 구체 예에서, 상기 단리된 라미닌-521 세 개 사슬들을 포함한다. 제1 사슬은 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열 (즉, $\alpha 5$ 라미닌 사슬)에 적어도 80% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함한다. 제2 사슬은 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열 (즉 $\beta 2$ 라미닌 사슬)에 적어도 70% 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함한다. 제3 사슬은 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열 (즉 $\gamma 1$ 라미닌 사슬)에 적어도 70%의 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 제1, 제2, 및 제3 사슬은 재조합 라미닌-521으로 결집된다.
- [0104] 특정 구체 예에서, 제1 사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열에 적어도 80% 동일성을 가지고, 제2 사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열에 적어도 80%의 동일성을 가지며, 및 제3사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열에 적어도 80% 동일성을 가진다.
- [0105] 더 상세한 구체 예에서, 상기 제1 사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열에 적어도 90%의 동일성을 가지며, 제2 사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열에 적어도 90%의 동일성을 가지며, 및 제3 사슬의 폴리펩타이드는 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열에 적어도 90%의 동일성을 가진다.
- [0106] 특정 구체 예에서, 제1 사슬은 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 제2 사슬은 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열을 포함하며, 및 제3 사슬은 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0107] 특정 구체 예에서, 상기 제1 사슬은 서열번호 1의 폴리펩타이드 서열이고, 제2 사슬은 서열번호 2의 폴리펩타이드 서열이며, 제3 사슬은 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열이다.
- [0108] 본 발명은 단리된 라미닌-521 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물을 더 제공한다. 바람직한 구체 예에서, 상기 약학적 조성물은 단리된 r-라미닌-521을 포함한다. 본 발명의 이러한 관점에 따라서, 치료된 상태에 따라, 다른 제제들이 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 콜라겐류, 다른 라미닌 유형, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 카드헤린류, 인테그린류, α -디스트로글리칸, 엔탁틴/니도젠, α -디스트로글리칸, 당단백질류, 프로테오글리칸류, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸류, 표피 성장인자, 혈관 내피 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 또는 신경 성장인자류, 및 이의 펩타이드 단편물을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 하나 이상의 다른 화합물들을 더 포함할 수 있다.
- [0109] 단리된 라미닌-521을 포함하는 약학적 제형을 임의의 적절한 형태로 만들 수 있고, 이는 일반적으로 단리된 라미닌-521을 약학적 허용 담체와 조합하여 포함한다. 상기 담체는, 주사가 가능한 담체, 국소용 담체, 경피용 담체 등일 수 있다. 상기 제형은, 연고, 젤, 크림, 스프레이, 분산액, 현탁액, 또는 고약과 같이, 국소 투여 형태인 것이 유리할 수 있다. 유리하게는, 상기 제형은 보존제, 향균물질, 향진균물질, 항산화제, 삼투압제, 및 조성과 양에서 통상적으로 사용되는, 유사물질을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 용도에 적절한 용액은 멸균되어 있고, 제시된 적용에 유해하지 않고, 및 멸균과 같은 통상적인 약학적 과정으로 처리될 수 있고 및/또는 보존제, 안정제, 습윤제, 에멀전제, 완충제 등과 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 만드는 데 도움을 얻기 위해, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975)를 참조할 수 있다.
- [0110] 다른 관점에서, 본 발명은 그 외부 표면이 단리된 라미닌-521 또는 이의 약학적 조성물 단독 또는 그 표면의 생체적합성을 높이는 데 작용하는 다른 단백질 또는 제제와 조합하여 코팅된, 향상된 생체적합성을 가지는 의학적 기기를 포함한다. 상기 코팅된 장치는 세포 부착을 자극하고 (내피 세포 부착과 같이), 및 장치가 진입하는 입구 위치에서 염증 및/또는 감염을 줄인다.
- [0111] 이러한 의학적 장치는 신체에 이식하는 용도로 사용되는 임의의 물질에 관한 것일 수 있고, 바람직하게는 스테인레스 스틸 또는 티타늄과 같은 생체적합 금속으로 만들거나 코팅되어 진 것이다. 대안적으로, 상기 장치는 세라믹 물질 또는 폴리에스터, 폴리글리콜 산 또는 폴리갈락토즈-폴리글리콜 산 공중합체와 같은 중합체로 만들거나 코팅된다.
- [0112] 상기 장치가 망, 시트 또는 천의 형태로 있는 천연 또는 합성 생분해성 물질로 만들어진다면, 단리된 라미닌-521 또는 이의 약학적 조성물은 이의 표면에 직접적으로 적용될 수 있다. 다음, 적절한 세포를 매트릭스 상에

서 배양하여, 이빨 어버트먼트 (abutment) 조각, 바늘, 금속 핀이나 봉, 내재 카테터, 인공항문형성술 튜브, 외과 메쉬, 및 단리된 라미닌-521의 코팅이 바람직한 임의의 다른 적용물을 포함하는, 이식하거나 주입할 수 있는 장치를 형성한다. 대안적으로, 상기 장치는 이식될 수 있고, 세포가 생체 내에서 부착될 수 있는 것이다.

[0113] 상기 단리된 라미닌-521을 결합하는 것은 비공유결합 (흡착과 같은) 또는 공유결합 수단에 의할 수 있다. 상기 장치는 상기 단리된 라미닌-521 또는 이의 약학적 조성물에 침지되거나, 이 속에서 항온처리되거나, 이로써 스플레이될 수 있다.

[0114] 본 발명의 단리된 라미닌-521을 사용하여 다양한 치료를 수행하는 투약 용법은 손상 또는 상태의 유형, 개인의 나이, 몸무게, 성별, 의학적 상태, 상태의 심각도, 및 투여 경로를 위시한, 다양한 인자에 근거한다. 따라서, 투약 용법은 다양하게 변할 수 있으나, 표준 방법을 사용하여 의사에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 라미닌류들은 매우 강력한 분자이고, 세포당 하나 또는 수 개의 분자만 있어도 효과를 발휘할 수 있다. 따라서, 전달이 최적화되어 있다면, 밀리리터 당 피코 그람 정도의 범위가 효과적인 양으로 가능할 수 있다.

[0115] 다른 관점에서, 본 발명은, 인간 배아줄기세포를 단일세포 현탁액으로 해체된 후에도 생존하게 하는, 신규물질인, 단리된 라미닌-521을 제공한다. 상기 줄기 세포들은 트립신-EDTA 처리에 의해 단일 세포 현탁액으로 해체되고, 원심분리하여 펠렛화시키고, 03 배지에 재현탁시키고, 40 μm 체를 통해 여과하고, 및 단리된 라미닌-521, 라미닌-511, 또는 매트릭셀이 미리 코팅된 세포 배양 접시에 30 Kcells/cm²의 밀도로 분주한다. 하루 동안 배양 후에, 당해 분야에 공지되어 있듯이, 매트릭셀에 분주된 세포는 죽었다. 라미닌-521 및 대부분의 경우 라미닌-511상에 분주된 상기 인간 배아 줄기 세포들은 살았고, 증식을 시작하여, 다능성 세포의 소규모 콜로니를 형성하였다.

[0116] 다른 관점에서, 본 발명은 인간 배아 줄기 세포를 다능성 상태로 확장하는 증식하는 방법을 제공한다. 라미닌-521 상의 단일 세포 현탁액에 분주된 인간 배아줄기세포는 당해 분야에 공지된 통상적인 방법보다 더 높은 비율로 살았고 증식된 것으로 나타났다. 3 번의 계대배양 후 (1 개월), 단일 세포 현탁액으로 계대배양된 세포는 20번 계대 배양 후 (3 개월) 매트릭셀에서 덩어리로 계대배양된 세포 배양물과 같은 수의 세포 분열을 보였다. 따라서, 상기 신규 방법은 시간과 노동면에서 유리하며, 이는 상당한 경제적 이익을 제공할 수 있다.

[0117] 라미닌-521은 정상적으로 보통 인간 다능성 배아줄기세포에 의해 발현되고, 분비되며, 또한 신장, 신경근접합부, 폐, 및 태반에서 발견된다.

[0118] 순수한 라미닌-521의 이용할 수 있음으로써, 세포 표현형의 세포 분화 및 유지에 대하여 상기 단백질의 효과를 연구할 수 있게 될 것이다. 따라서, 조직에 대한 상해를 치료하는 것, 세포 부착, 확장 및 이동을 촉진하는 것, 생체의 세포 요법, 의학적 장치의 생체 적합성을 개선하는 것, 및 개선된 세포 배양 장비와 배지를 제조하는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 많은 연구와 치료 목적들은 순수한 온전한 단리된 라미닌-521을 이용할 수 있다면, 더 진전될 것이다. 또한, 줄기 세포에 대한 순수한 라미닌-521 효과는 이러한 단백질이 초기 포유동물 배에서 발현되기 때문에 연구에 중요한 것이 될 것이다.

[0119] 따라서, 연구와 치료 목적상의 단리된 라미닌-521 및 단리된 라미닌-521을 만드는 방법에 대한 요구가 있다. 라미닌-521은, 완벽히 화학적으로 정의된, 지지세포가 없는(feeder-free), 및 동물-단백질이 없는 (불순물이 없는, xeno-free) 조건하에서, 해체된 인간 ES 및 유도된 다능성 줄기 (iPS) 세포의 장기 자기 재생 및 신속한 증식용 매트릭스로서 기능할 수 있다. LN-521 기반 시스템을 사용하고 및 자동화하는 것은 용이하며, 및 인간 ES/iPS 배양물을 신속하게 규모 증가시킬 수 있다.

[0120] 본 발명은 또한 세포, 특히 줄기 세포에 양분을 공급하는 데 사용될 수 있는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 이와 관련하여, 줄기 세포들은 통상적으로 배양에 두 가지를 요구한다: (1) 줄기 세포에 구조적 지지체를 제공하는 기질 또는 코팅 및 (2) 줄기 세포에 배양을 공급하는 세포 배양배지. 상기 기질 또는 코팅 (1)은 일반적으로, 예를 들어, 페트리 디쉬 또는 다른 용기 상에 둔다.

[0121] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자기 재생"은 미분화 상태를 유지하면서 (예, 다능성) 많은 횟수의 세포 분열을 할 수 있는 줄기세포의 능력을 지칭한다. 전분화능 자체는 줄기세포가 임의의 다른 세포 유형으로 분화하는 능력을 지칭한다. 용어 "증식"은 분열할 수 있는 줄기세포의 능력을 지칭한다. 생존은 줄기세포가 분화가 되든지 또는 미분화이든지, 살아있는 능력을 지칭하며, 줄기세포가 분열하거나 분화되는 능력을 유지하는 것을 요하지는 않는다.

[0122] 본 발명의 세포 배양 배지는 라미닌-521 및/또는 라미닌-511를 포함하는 기질과 사용되는 것에 특히 적합하다. 이러한 라미닌류는 $\alpha 6 \beta 1$ 인테그린을 활성화하고, 이는 다음으로 PI3K/Akt 경로를 활성화시킨다. 이러한 것은

줄기세포의 전분화능, 자기 재생 및/또는 증식을 증가시킨다. 상기 기질이, 온전한 분리된 사슬로서, 또는 이의 단편물로서 존재하는, 라미닌-521 또는 라미닌-511으로 구성된다. 제조합 라미닌-521 및 제조합 라미닌-511은 상업적으로 판매된다. 많은 상이한 분자들이, 비록 상이한 효율이지만, PI3K/Akt 경로를 활성화시킨다.

예를 들어, TGF 베타 1 및 bFGF는 이 경로를 활성화시킨다. 라미닌-521 및/또는 라미닌-511을 사용하여 그러한 분자들의 양을 상기 세포 배양 배지에서 감소시킬 수 있다. 라미닌-521은 $\alpha 6 \beta 1$ 인테그린을 통해 최대량의 신호를 전달하여, PI3K/Akt 경로를 활성화시킨다. 라미닌-521을 사용하면, 세포 유해 로(rho)-키나제 (ROCK) 억제제를 추가하지 않고 단일 세포 현탁액 계대 배양이 가능하게 되어, 단일 세포 효소 해체 후에 세포 생존율을 증가시킨다. 이전에는, 인공적인 어팍토시스 억제제를 사용하지 않고 인간 ES 세포를 단일 세포 효소적 계대 배양을 하는 것이 불가능하였다. 계대 배양 과정의 단순성은 실험 변수가 줄어드는 것을 의미하며, 그 과정이 세포 배양 요원에 대한 막대한 훈련과 경비없이, 고도의 처리율의 세포 배양으로 자동화될 수 있게 한다. 또한, 라미닌-521 또는 라미닌-511 상에 분주된 인간 ES 및 iPS 세포들은 단일층으로 성장하며, 이는 세포가 상기 매트릭스 및 세포배양배지에 균등하게 노출되기 때문에 배양물을 동질적으로 만들어 준다. 화학적으로 정의되고, 불순물이 없는 환경 하의, 라미닌-521 상에서 성장하고, ROCK 억제제가 부재한 상태에서 단일 세포로서 계대배양된 인간 ES 세포 배양물은, 마트리젤에서 성장되고 덩어리로 계대배양된 세포에 비하여, 훨씬 더 높은 속도로 여러달 동안 계속적으로 확장된다. 이러한 다능성의 장기 확장된 세포들은 동질적으로 Oct4를 발현하고, 핵형이 정상적으로 유지된다. 따라서, 지속적인 생존 및 증식 능력을 가진 인간 ES 및 iPS 세포를 얻을 수 있다.

[0123] 다른 이용가능한 기질에 비하여, 라미닌-511 상에서 배양된 세포가, 평균적인 접촉 면적 및 확산 균일성이 훨씬 더 크다. 라미닌-511 상에서 3 개월 성장한 인간 ES 세포들은 전분화능을 유지하며, SCID 마우스로 생착 후에, 테라토마를 생성할 수 있다. 라미닌-511은 또한 LIF 또는 지지세포 없이, 5 개월에 걸쳐 마우스 ES 세포의 자기 재생을 지지하지만, 다른 공지된 매트릭스들은 2 주 이상을 그렇게 할 수 없다.

[0124] 이러한 세포 배양 배지로 성장될 줄기세포는 유도된 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 태아 줄기 세포, 양막 줄기 세포, 및 일반적으로 임의의 다능성 줄기 세포일 수 있다.

[0125] 일반적으로, 세포 배양 배지는 많은 수와 양의 다양한 성장인자와 사이토카인을 포함하여 분화를 저해하고 성장을 개선한다. 본 발명의 세포 배양 배지의 한가지 장점은, 많은 성장인자나 사이토카인을 그러한 많은 양으로 함유하지 않는다는 것이다.

[0126] 일반적으로, 본 발명의 세포 배양 배지는, 통상적으로 사용되는 것보다 더 적은 양의 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF)를 요구한다. 상기 세포 배양 배지는 bFGF를 밀리미터 당 0보다 크고 3.9 나노그램까지의 양으로 (ng/mL) 포함할 수 있다. bFGF는 인간 bFGF이어서 상기 세포 배양 배지는 전체적으로 인간에 한정된다. 특정 구체 예에서, 상기 세포 배양 배지는 3.5 ng/mL 이하의 bFGF를 포함할 수 있다. 다른 구체 예에서, 상기 세포 배양 배지는 0.5 내지 3.5 ng/mL의 bFGF를 포함할 수 있다. 특정 구체 예에서, 상기 세포 배양 배지는 bFGF를 포함하지 않을 수, 즉 bFGF이 없을 수 있다.

[0127] 일반적으로, 상기 세포 배양 배지는 적어도 하나의 무기염, 적어도 하나의 미량 미네랄, 적어도 하나의 에너지 기질, 적어도 하나의 지질, 적어도 하나의 아미노산, 적어도 하나의 비타민, 및 적어도 하나의 성장인자 (bFGF 외에)가 용해된 액상을 포함한다. 하기 표 1은 본 발명의 세포 배양 배지에 존재할 수 있는 그러한 다양한 성분, 및 존재하는 성분의 최저와 최대 농도에 대한 리스트를 포함한다. 값은 과학적 표기법으로 제시된다. 예를 들어, "4.1E-01"은 4.1×10^{-01} 로 해석되어야 한다.

[0128] [표 1]

성분	몰 질량 (g/mol)	최소농도 (mM)	최대농도 (mM)	최소농도 (mM)	최대농도 (mM)
무기염					
Calcium chloride (무수)	110.98	4.1E-01	1.6E+00	4.6E+04	1.8E+05
HEPES	238.3	5.9E+00	1.8E+01	1.4E+06	4.2E+06
Lithium Chloride (LiCl)	42.39	4.9E-01	1.5E+00	2.1E+04	6.2E+04
Magnesium chloride (무수)	95.21	1.2E-01	3.6E-01	1.1E+04	3.4E+04
Magnesium Sulfate (MgSO ₄)	120.37	1.6E-01	4.8E-01	1.9E+04	5.8E+04
Potassium chloride (KCl)	74.55	1.6E+00	4.9E+00	1.2E+05	3.6E+05
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	84.01	9.0E+00	4.4E+01	7.6E+05	3.7E+06
Sodium chloride (NaCl)	58.44	4.7E+01	1.4E+02	2.8E+06	8.3E+06
Sodium phosphate, dibasic (무수)	141.96	2.0E-01	5.9E-01	2.8E+04	8.3E+04

[0129]

Sodium phosphate, monobasic monohydrate (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	137.99	1.8E-01	5.3E-01	2.4E+04	7.3E+04
미량의 미네랄					
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O)	404	4.9E-05	1.9E-04	2.0E+01	7.5E+01
Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	278.01	5.9E-04	1.8E-03	1.6E+02	4.9E+02
Copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	249.69	2.0E-06	8.0E-06	5.1E-01	2.0E+00
Zinc sulfate heptahydrate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	287.56	5.9E-04	1.8E-03	1.7E+02	5.1E+02
Ammonium Metavanadate NH ₄ VO ₃	116.98	5.5E-06	1.6E-05	6.4E-01	1.9E+00
Manganese Sulfate monohydrate (MnSO ₄ · H ₂ O)	169.02	9.9E-07	3.0E-06	1.7E-01	5.0E-01
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262.85	4.9E-07	1.5E-06	1.3E-01	3.8E-01
Selenium	78.96	8.9E-05	2.7E-04	7.0E+00	2.1E+01
Sodium Meta Silicate Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	284.2	4.8E-04	1.4E-03	1.4E+02	4.1E+02
SnCl ₂	189.62	6.2E-07	1.9E-06	1.2E-01	3.5E-01
Molybdic Acid, Ammonium salt	1235.86	9.9E-07	3.0E-06	1.2E+00	3.7E+00
CdCl ₂	183.32	6.1E-06	1.8E-05	1.1E+00	3.4E+00
CrCl ₃	158.36	9.9E-07	3.0E-06	1.6E-01	4.7E-01
AgNO ₃	169.87	4.9E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
AlCl ₃ ·6H ₂ O	241.43	2.4E-06	7.3E-06	5.9E-01	1.8E+00
Barium Acetate (Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	255.42	4.9E-06	1.5E-05	1.3E+00	3.8E+00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	4.9E-06	1.5E-05	1.2E+00	3.5E+00
GeO ₂	104.64	2.5E-06	7.5E-06	2.6E-01	7.8E-01
KBr	119	4.9E-07	1.5E-06	5.9E-02	1.8E-01
KI	166	5.0E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
NaF	41.99	4.9E-05	1.5E-04	2.1E+00	6.2E+00
RbCl	120.92	4.9E-06	1.5E-05	5.9E-01	1.8E+00
ZrOCl ₂ ·8H ₂ O	178.13	4.9E-06	1.5E-05	8.7E-01	2.6E+00
에너지 기질					
D-Glucose	180.16	6.9E+00	2.1E+01	1.2E+06	3.7E+06
Sodium Pyruvate	110.04	2.0E-01	5.9E-01	2.2E+04	6.5E+04
LIPIDS					
Linoleic Acid	280.45	9.4E-05	2.8E-04	2.6E+01	7.9E+01

[0130]

Lipoic Acid	206.33	2.0E-04	7.8E-04	4.1E+01	1.6E+02
Arachidonic Acid	304.47	6.5E-06	1.9E-05	2.0E+00	5.9E+00
Cholesterol	386.65	5.6E-04	1.7E-03	2.2E+02	6.5E+02
DL-alpha tocopherol-acetate	472.74	1.5E-04	4.4E-04	6.9E+01	2.1E+02
Linolenic Acid	278.43	3.5E-05	1.0E-04	9.7E+00	2.9E+01
Myristic Acid	228.37	4.3E-05	1.3E-04	9.8E+00	2.9E+01
Oleic Acid	282.46	3.5E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
Palmitic Acid	256.42	3.8E-05	1.1E-04	9.8E+00	2.9E+01
Palmitoleic acid	254.408	3.9E-05	1.2E-04	9.8E+00	2.9E+01
Stearic Acid	284.48	3.4E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
아미노산					
L-Alanine	89.09	2.5E-02	2.1E-01	2.2E+03	1.8E+04
L-Arginine hydrochloride	147.2	2.7E-01	1.5E+00	4.0E+04	2.2E+05
L-Asparagine-H ₂ O	150.13	5.0E-02	2.1E-01	7.5E+03	3.1E+04
L-Aspartic acid	133.1	2.5E-02	2.1E-01	3.3E+03	2.7E+04
L-Cysteine-HCl-H ₂ O	175.63	3.9E-02	1.2E-01	6.9E+03	2.1E+04
L-Cystine dihydrochloride	313.22	3.9E-02	1.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-Glutamic acid	147.13	2.5E-02	2.1E-01	3.7E+03	3.0E+04
L-Glutamine	146.15	1.5E+00	4.4E+00	2.1E+05	6.4E+05
Glycine	75.07	1.5E-01	4.4E-01	1.1E+04	3.3E+04
L-Histidine monohydrochloride monohydrate	209.63	5.9E-02	1.8E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-Isoleucine	131.17	1.6E-01	4.9E-01	2.1E+04	6.4E+04
L-Leucine	131.17	1.8E-01	5.3E-01	2.3E+04	7.0E+04
L-Lysine hydrochloride	182.65	2.0E-01	5.9E-01	3.6E+04	1.1E+05
L-Methionine	149.21	4.5E-02	1.4E-01	6.8E+03	2.0E+04
L-Phenylalanine	165.19	8.5E-02	2.5E-01	1.4E+04	4.2E+04
L-Proline	115.13	1.1E-01	3.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-Serine	105.09	1.5E-01	4.4E-01	1.5E+04	4.6E+04
L-Threonine	119.12	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.3E+04
L-Tryptophan	204.23	1.7E-02	5.2E-02	3.5E+03	1.1E+04
L-Tyrosine disodium salt hydrate	225.15	8.4E-02	3.7E-01	1.9E+04	8.4E+04
L-Valine	117.15	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.2E+04
비타민					
Ascorbic acid	176.12	1.3E-01	3.8E-01	2.2E+04	6.7E+04
Biotin	244.31	5.6E-06	1.7E-05	1.4E+00	4.1E+00
B ₁₂	1355.37	2.0E-04	5.9E-04	2.7E+02	8.0E+02
Choline chloride	139.62	2.5E-02	7.5E-02	3.5E+03	1.1E+04
D-Calcium pantothenate	238.27	1.8E-03	1.4E-02	4.4E+02	3.4E+03
Folic acid	441.4	2.4E-03	7.1E-03	1.0E+03	3.1E+03
i-Inositol	180.16	2.7E-02	1.1E-01	4.9E+03	1.9E+04

[0131]

Niacinamide	122.12	6.5E-03	2.0E-02	7.9E+02	2.4E+03
Pyridoxine hydrochloride	205.64	3.8E-03	1.1E-02	7.8E+02	2.4E+03
Riboflavin	376.36	2.3E-04	6.8E-04	8.6E+01	2.6E+02
Thiamine hydrochloride	337.27	3.3E-03	3.6E-02	1.1E+03	1.2E+04
성장 인자/단백질					
GABA	103.12	0	1.5E+00	0	1.5E+05
Pipecolic Acid	129	0	1.5E-03	0	1.9E+02
bFGF	18000	0	2.17E-07	0	3.9E+00
TGF beta 1	25000	0	3.5E-08	0	8.8E-01
Human Insulin	5808	0	5.9E-03	0	3.4E+04
Human Holo-Transferrin	78500	0	2.1E-04	0	1.6E+04
Human Serum Albumin	67000	0	2.9E-01	0	2.0E+07
Glutathione (reduced)	307.32	0	9.6E-03	0	2.9E+03
OTHER COMPONENTS					
Hypoxanthine Na	136.11	5.9E-03	2.6E-02	8.0E+02	3.6E+03
Phenol red	354.38	8.5E-03	2.5E-02	3.0E+03	9.0E+03
Putrescine-2HCl	161.07	2.0E-04	5.9E-04	3.2E+01	9.5E+01
Thymidine	242.229	5.9E-04	1.8E-03	1.4E+02	4.3E+02
2-mercaptoethanol	78.13	4.9E-02	1.5E-01	3.8E+03	1.1E+04
Pluronic F-68	8400	1.2E-02	3.5E-02	9.8E+04	2.9E+05
Tween 80	1310	1.6E-04	4.9E-04	2.2E+02	6.5E+02

상기 액상의 세포 배양 배지는 물, 혈청, 또는 알부민일 수 있다.

상기 표 1에 리스트된 많은 성분 또는 구성분들은 필요하지 않거나, 또는 저농도로 사용될 수 있다.

상기 세포 배양 배지는 인슐린 또는 인슐린 대체물을 함유할 수 있는 것으로 구성된다. 유사하게, 상기 세포 배양 배지는 트랜스페린 (transferrin) 또는 트랜스페린 대체물을 함유할 수 있다.

좀더 특정 구체 예에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 (1) 알부민, (2) 인슐린 또는 인슐린 대체물, (3) 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 또는 이 세 성분의 어떤 조합을 함유하지 않는 것으로 구성된다.

다른 세포 배양 배지는 인터루킨-1 베타 (IL-1 β 또는 카타볼린), 인터루킨-6 (IL6), 또는 색소 상피 유래 인자 (pigment epithelium derived factor (PEDF))와 같은 성장 인자를 함유할 수 있는 것이 주목될 수 있다. 이러한 성장 인자는 본 발명의 세포 배양 배지에 존재하지 않는다.

세포 배양 배지에 대한 하나의 특정 조성은 하기 표 2에 제공된다:

[표 2]

성분	양	단위
bFGF	0.39	microgram (μ g)
Albumin	1.34	milligram (mg)
Insulin	2	mg
Lithium Chloride	4.23	mg
GABA	0.01	mg
TGF beta 1	0.06	μ g
Pipecolic acid	0.013	mg
L-glutamine	2.92	grams
MEM 비-필수 아미노산 용액	1	mL
DMEM/F12	100	mL

이러한 관점에서, MEM 비-필수 아미노산 용액은 통상적으로 100x 농도로 제공된다. 상기 표 2의 MEM은 1x로 희석한 후에 사용되고, 표 3에 리스트된 다음의 농도로 다음의 아미노산을 함유한다:

[0142] [표 3]

MEM 아미노산	농도 (ng/mL)
Glycine	7.50E+03
L-Alanine	8.90E+03
L-Asparagine	1.32E+04
L-Aspartic acid	1.33E+04
L-Proline	1.15E+04
L-Serine	1.05E+04

[0143]

[0144] DMEM/F12은 하기 표 4에 리스트된 다음 성분들을 함유한다:

[0145] [표 4]

DMEM/F12 성분	농도 (ng/mL)
Glycine	187.5
L-Alanine	44.5
L-Arginine hydrochloride	1475
L-Asparagine-H ₂ O	75
L-Aspartic acid	66.5
L-Cysteine hydrochloride-H ₂ O	175.6
L-Cystine 2HCl	312.9
L-Glutamic Acid	73.5
L-Glutamine	3650
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	314.8
L-Isoleucine	544.7

[0146]

[0147] [표 4 계속]

DMEM/F12 성분	농도 (ng/mL)
L-Leucine	590.5
L-Lysine hydrochloride	912.5
L-Methionine	172.4
L-Phenylalanine	354.8
L-Proline	172.5
L-Serine	262.5
L-Threonine	534.5
L-Tryptophan	90.2
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	557.9
L-Valine	528.5
Biotin	0.035
Choline chloride	89.8
D-Calcium pantothenate	22.4
Folic Acid	26.5
Niacinamide	20.2
Pyridoxine hydrochloride	20
Riboflavin	2.19
Thiamine hydrochloride	21.7
Vitamin B ₁₂	6.8
i-Inositol	126
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	1166
Cupric sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.013
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.5
Ferric sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	4.17
Magnesium Chloride (anhydrous)	286.4
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	488.4
Potassium Chloride (KCl)	3118
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	24380
Sodium Chloride (NaCl)	69955
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) 무수	710.2
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	625
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	4.32
D-Glucose (Dextrose)	31510
Hypoxanthine Na	23.9
Linoleic Acid	0.42
Lipoic Acid	1.05
Phenol Red	81
Putrescine 2HCl	0.81

[0148]

[0149] [표 4 계속]

DMEM/F12 성분	농도 (ng/mL)
Sodium Pyruvate	550
Thymidine	3.65

[0150]

[0151] 본 발명의 세포 배양 배지와 상기 라미닌 기질의 조합은 저렴할 수 있는 세포 배양 시스템을 결과하지만, 다능성 줄기 세포를 유지하는데 높은 효율을 제공한다. 본질적으로, 요구된 모든 것이 라미닌 및 최소량의 영양분이다. 이러한 세포 배양 배지와 조합에 사용된 상기 라미닌은 LN-511 또는 LN-521로 특별하게 구성된다.

[0152] 하기 실시 예는 본 발명을 좀더 설명하기 위한 목적이다. 실시 예들은 단지 설명하는 것이지, 여기에 기술된 물질, 조건 또는 공정 파라미터에 대한 본 발명에 따라 만들어진 장치를 한정하는 것은 아니다.

- [0153] 실시 예 1
- [0154] 인간 라미닌 (Laminin) $\beta 2$ cDNA의 클로닝
- [0155] 인간 라미닌 $\beta 2$ cDNA 5.6 kb 단편 (fragment)은 인간의 간 cDNA 라이브러리 (BD Biosciences)로부터 프라이머 5'-GTGGTACCCACAGGCAGAGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 7) 및 5'-GCTCTAGAGCTCTTCAGTGCATAGGC-3' (SEQ ID NO: 8)를 사용하여 PCR-증폭됨으로써, 단편의 단부 상에 인위적인 XbaI 및 KpnI 절단 부위 (cutting sites)를 도입하였다. PCR 증폭 과정 중 오차율 (error rate)을 감소시키기 위하여 Phusion™ 고충실도(high-fidelity) PCR Kit (Finnzymes)를 사용하였다. 후속적으로, 상기 단편은 XbaI 및 KpnI으로 소화 (digestion)되었고, 동일한 제한 엔도뉴클레아제 (pSKHLAMB2 plasmid)를 사용하여 소화된 pSK 벡터로 서브클론되었다. 서열의 일체성 (integrity)를 확인하기 위하여, 몇 가지 pSKHLAMB2 플라스미드 (plasmid)의 클론이 서열화되었다. 서열화 (sequencing)는 ABI PRISM®BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems)를 사용하여 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) 상에서 수행되었다. NCBI 데이터베이스 인간 라미닌 $\beta 2$ 서열과 완전히 일치되는 것만이 추가 클로닝을 위하여 선택되었다.
- [0156] 발현 구조체 (Expression Constructs)
- [0157] 인간 라미닌 (laminin) $\beta 2$ 사슬 (chain)의 발현을 위하여 pSKHLAMB2 플라스미드는 XbaI 및 KpnI으로 소화되었고, XbaI-KpnI 처리된 pcDNA 3.1(+) 벡터 (Invitrogen)으로 서브클론되었다.
- [0158] 인간 라미닌 $\alpha 5$ (HLN5Full.pcDNA 구조체) 및 $\gamma 1$ (HG1 구조체)의 발현에 사용된 구조체는 앞서 기술된바 있다 (Doi, M. et al., J. Biol. Chem. 277(15), 12741-8 (2002)).
- [0159] 항체 (Antibodies)
- [0160] 항-라미닌 $\beta 2$ (MAB2066) 단일 클론 (monoclonal) 항체 (mAb)를 R@D Systems으로부터 구입하였다. 항-라미닌 $\alpha 5$ mAb (2F7)는 Abnova로부터 구입하였다. 항-라미닌 $\beta 1$ mAb (MAB1921)은 Chemicon으로부터 구입하였다. 항-라미닌 $\gamma 1$ (H-190) 토끼 다중 클론 (rabbit polyclonal) 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.으로부터 구입하였다.
- [0161] 재조합 라미닌-521의 제조 및 정제
- [0162] r-라미닌-521은 37°C 및 가습(humidified) 5% CO₂ 분위기(atmosphere) 하, 10% FCS DMEM에서 배양된 인간 배아 신장 세포 (HEK293, ATCC CRL-1573) 내에서 생산되었다. 야생형 세포 (wild-type cells)는 HG1 구조체를 사용한 표준 칼슘-포스페이트법을 이용하여 형질 감염되었고, 100 mg/ml 하이그로마이신 (hygromycin; Cayla)을 이용하여 안정한 클로니가 선택되었다. 관련 선택 항생제 (relevant selection antibiotics)의 연속적 존재 하에서 모든 추가 세포 배양 및 클론 확장 (clonal expansion)이 수행되었다. 그 다음, 고발현 (highly expressing) 클론이 인간 라미닌 $\beta 2$ 구조체로 형질 감염되었고, 안정한 클론이 500 mg/ml G418 (Life Technologies)를 사용하여 선택되었다. 라미닌 $\gamma 1$ 및 라미닌 $\beta 2$ 모두에 대하여 고발현성을 갖는 클론이 최종적으로 HLN5Full.pcDNA 구조체로 형질 감염되었으며, 200 mg/ml zeocin (Cayla)을 사용하여 안정한 콜로니가 선택되었다. 가장 높은 분비 (secretion)를 나타내는 클론은 추가적으로 확장되었다.
- [0163] r-라미닌-521의 생산을 위하여, 합류 세포 (confluent cells)가 5일까지의 기간 동안 DMEM 내에서 배양되었다. r-라미닌-521은 항-FLAG M2 매트릭스 (Sigma)를 이용하여 친화성 정제되었다. 수집된 배지는 교반 조건 및 4°C 에서 하룻밤 동안 매트릭스를 이용하여 배치 모드로 인큐베이션 (incubation)되었다. 결합된 r-라미닌-521은 상온에서 FLAG 펩타이드(Sigma)의 TBS/E 용액(FLAG peptide in TBS/E) 50 mg/ml (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 이용하여 경쟁적으로 용리되었다. 30 kD 컷-오프(cut-off) 한외여과 (ultrafiltration; Millipore)를 이용하여 용리물 (elute)을 농축하였고 완충액 (buffer)은 PBS로 대체하였다. 최종적으로, 자기-응집된 (self-aggregated) 고분자를 제거하기 위하여 농축된 용액을 0.2 mm 필터에 통과시켰다.
- [0164] 재조합 라미닌-521의 특성화(Characterization of Recombinant Laminin-521)
- [0165] 배지 내 분비되어 정제된 라미닌은 3-8% 구배 (gradient)의 SDS-PAGE를 이용하여 특성화되었다. 단백질은 Sypro 염색 (Bio-Rad)을 이용하여 시각화되거나 PVDF 상으로 옮겨졌다 (도 3). 멤브레인은 상술한 항체로 프로브되었다. 세척 후, 멤브레인은 HRP-접합된 염소 항체 (HRP-conjugated goat antibodies)를 이용하여 인큐베이션되었다. 면역 반응성 (immunoreactivity)은 제조사 지시에 따라 화학발광 (chemiluminescent) 키트 (Life Science Products)에 의하여 검출되었다.

- [0166] 방법 (Methods)
- [0167] 인간 ES 세포 배양 (Human ES cell cultures)
- [0168] 인간 ES 세포는 37℃ 및 5% CO₂에서 합성 O3 배지(chemically defined O3 medium) 내에 r-라미닌-521-코팅된 실험실 디쉬 상에서 배양되었다 (Rodin et al., *Nature Biotechnol.*, vol. 28, pp. 611-615 (2010)). 세포는 10-12일마다 1회씩 37℃에서 Trypsin-EDTA 용액 (GIBCO Invitrogen)에 5분 동안 노출됨으로써 정기적으로 계대 (passage)되었다. 이후, 이것들을 부드럽게 피펫하여 단일-세포 현탁으로 분할하였으며 정의된 트립신 억제제 (defined trypsin inhibitor; GIBCO Invitrogen)가 첨가되었다. 상기 세포 현탁은 4분 동안 원심분리되었고, 상층액 (supernatant)을 폐기되었으며, 세포 펠렛은 미리 데워진 (prewarmed) O3 배지 내에서 재현탁되었고, 그리고 세포를 이후 40 μ m 체 (sieve)에 통과시켰다. 그 다음, 세포는 30 Kcells/cm² (1:25-1:30 분할 비 (split ratio))의 농도에서 신규 r-라미닌-521-코팅된 디쉬 상에 도포되었다. 세포는 약간의 신규 배지 액적 (drop)이 첨가될 때, 인큐베이터 내에서 1시간 동안 데워진 신규 배지가 하루에 1회 공급되었다 (계대 (passage) 후 첫 번째 날을 제외함). 동일 라인의 대조구 세포가 Rodin et al., *Nature Biotechnol.*, vol. 28, pp. 611-615 (2010)에 기재된 바와 같이, O3 배지 내 매트릭셀 (BD Biosciences) 상에서 배양되었다. 대조구 세포는 조각으로 계대 (passage)되었다.
- [0169] 세포 배양 디쉬 코팅 (Cell culture dish coating)
- [0170] 96개의 웰 (well)의 조직 세포 배양 플레이트가 ECM 단백질 마우스 LN-111(Invitrogen), 인간 재조합 LN-511 및 인간 재조합 LN-521의 멸균 (sterile) 용액 (모두 30 μ g/ml (5 μ g/cm²)의 농도임)으로 4℃에서 하룻밤 동안 코팅되었다. 대조구 세포의 경우, 제조사 지시에 따라 BD Matrigel™ hESC qualified (BD Biosciences)이 사용되었다.
- [0171] 세포 부착 검정 (Cell adhesion assay)
- [0172] 검정은 기술된 바와 같이 수행되었다 (Extracellular Matrix Protocols, 2000). 간략하게 설명하면, 96-웰 플레이트를 전술한 세포외 기질 (extracellular matrix) 단백질로 코팅하였으며, 소 혈청 알부민을 함유하는 O3 배지로 블로킹하였다. ES 세포는 세포외 기질-코팅 플레이트 상에서 600 cell / mm² 세포 밀도로 도포되었으며, 세포 인큐베이터에서 1 시간 또는 1일 동안 부착되도록 두었다. 비-부착 세포는 세척하여 제거하였고, 부착 (adherent) 세포는 5% 글루타랄데히드 (glutaraldehyde)에 의하여 20분 동안 고정되었고 0.1% 크리스탈 바이올렛 (Crystal Violet)에 의하여 염색되었다.
- [0173] mRNA의 실시간 PCR 정량화 (Real-time PCR quantification of mRNAs)
- [0174] 전체 RNA가 단리 (isolation)되었고, Rodin et al., *Nature Biotechnol.*, vol. 28, pp. 611-615 (2010)에 기재된 바와 같이 cDNA가 합성되었다. Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR 시스템을 이용하여 실시간 정량 RT-PCR Taqman 검정 (assay)가 수행되었다. 모든 반응은 프라이머 및 관심 대상인 mRNA에 대한 프로브를 함유하는, 미리 전개된 (predeveloped) 유전자 발현 검정 믹스 (Applied Biosystems)를 사용하여 4회에 걸쳐 수행되었다. 각각의 실험에 대한 추가 반응들은 RNA 인풋을 표준화하는 데 사용되는, *GAPDH*에 대하여 미리 전개된 유전자 발현 검정 믹스를 포함하였다. 모든 데이터는 7300 System SDS Software version 1.4로 분석되었다.
- [0175] FACS 분석
- [0176] OCT4 발현은 Ludwig, T.E. et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24, 185-187 (2006)에 기재된 바와 같이 분석되었다. 세포는 FACSCalibur 플로우 사이토메터 (Becton Dickinson) 상에서 처리되었다. 데이터는 CellQuest software (Becton Dickinson)로 분석되었다.
- [0177] 실시 예 1에 대한 결과
- [0178] 상이한 세포 배양 (culture) 코팅이 첨가제 없는 O3 배지 내에서 인간 ES 세포의 단일 세포 생존에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 HS181 세포를 완전히 해리시켰고, 매트릭셀, 마우스 라미닌-111, 인간 r-라미닌-511, 인간 r-라미닌-521, 또는 r-라미닌-511과 r-라미닌-521의 혼합물 상에 이것들을 도포시켰다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 기대된 바와 같이, 세포는 도포 후 24시간까지 매트릭셀 및 마우스 라미닌-111에 거의 부착되지 않은 상태로 남아 있었다. 반면, 인간 r-라미닌-521, 혼합물 상의 세포 상의 세포 및 인간 r-라미닌-511 상의 세포 (보다 적은 정도이기는 하지만)는 생존하였다.
- [0179] ROCK 억제제 Y-27632로 처리된 O3 배지 내에서 인간 ES 세포에 대하여 실험을 반복하였다. 그 결과를 도 5에

나타내었다. 줄기 세포는 5개 코팅 모두에 부착된 상태로 남아 있었다.

- [0180] 상술한 효과를 정량화하기 위하여, 본 발명자들은 상술한 코팅 전부에 대하여 플레팅 후 1시간 및 1일 경과 시점에서 세포 부착 실험을 수행하였다 (즉, 5개 코팅 각각에 대하여 Y-27632 존재 또는 부재 하에서). 도 6은 Y-27632가 없는 LN-521, LN-511, 및 매트릭젤 (MG)에 대한 1-시간 실험과 관련한 결과를 나타낸다. 첨가제가 함유되지 않은 O3 배지 내 인간 ES 세포의 부착은 이러한 시점에서 대략적으로 같았다.
- [0181] 도 7은 코팅 모두에 대한 1-일 실험에 대한 결과를 나타낸다. Y-27632 억제제를 함유하는 플레이트는 코팅과 함께 "Ink"로 라벨링하였다. 도포 후 1일 시점에서 줄기 세포는 첨가제 없는 매트릭젤보다 첨가제 없는 LN-521에 20배 양호하게 부착되었다. 또한, 상기 결과는 첨가제 없이 LN-521에 세포를 부착하는 것이 ROCK 억제제를 함유하는 모든 디쉬 상에 세포를 부착하는 것과 유사하였음을 보여주었다. 즉, ROCK 억제제를 함유하는 코팅과 유사한 결과를 얻기 위하여, LN-532 코팅에서는 ROCK 억제제가 필수적이지는 않다는 것이다.
- [0182] 본 발명자들은 인간 r-라미닌-521 상에 인간 ES 세포를 배양하였으며, 단일 세포 현탁으로 완전히 해리 후에 이들을 10-12일에 한 번씩 1:25 내지 1:30 비율로 계대배양하였다. 적어도 9회의 계대(3개월) 동안 세포는 안정적이고 높은 속도로 증식하였다. 더욱이, 3번의 계대(1 개월) 후, 세포들은 통상의 방법을 사용하여 배양된 20 회 계대 후의 줄기 세포와 동일한 수의 세포 분열 (cell doublings)을 거쳤다. 이는 도 8에 도시되어 있는바, 상기 도면은 시간에 따른 세포 수 증가를 나타낸다. LN-521 상의 세포는 매트릭젤 상에서보다 훨씬 빠른 속도로 증가하였다. 이처럼, 신규 r-라미닌-521 hES 세포 배양법은 시간 및 노동 투입 면에서 유리하였다.
- [0183] 첨가제 없는 O3 배지 내에서 인간 r-라미닌-521에 대한 수개의 단일 세포 현탁이 계대된 후, hES의 동질성 (identity)을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 전분화능 마커 (marker of pluripotency)인 Oct4에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 도 9는 r-LN-521 상에서 성장된 세포에 대한 결과를 나타내는 한편, 도 10은 매트릭젤 상에서 성장된 세포에 대한 결과를 나타낸다. 양성 세포의 백분율은 괄호 내에 기재되었다. R-LN-521은 훨씬 높은 백분율의 전분화능의 세포를 갖고 있다.
- [0184] 또한, 전분화능 마커 Oct4 및 Nanog의 mRNA 전사(transcripts) 수를 정량화하였다. 도 11은 이러한 결과를 나타낸다. 2개의 마커 모두에 대하여, LN-521 상의 세포들은 보다 높은 전사 수를 나타내었다.
- [0185] 2가지 방법은 신규 방법이 현재의 방식(세포 배양 디쉬 코팅 물질로서 매트릭젤을 사용하고, 작은 응집물 (clump) 형태로 세포를 계대함)보다 동등 이상의 품질의 hES 세포를 제공하고 있음을 보여주었다.
- [0186] 실시 예 2
- [0187] 실시 예 2에 있어서, 발현되고 정제된 재조합 LN-521(또한, 전분화능의 hES 세포로 발현됨)이 배양된 hES 및 iPS 세포에 미치는 영향에 대하여 연구되었다. 그 결과는 LN-521 단독으로도 전분화능의 hES 및 iPS 세포가 자기 재생되는 것을 강력하게 뒷받침하고, 중요하게는 트립신화된 줄기 세포의 도포 이후 높은 희석율의 LN-521에 대한 단일 세포 현탁 내에서 전분화능의 줄기 세포가 생존할 수 있도록 함을 보여준다. LN-521의 효과는 hES 세포 이동의 유도 및 PI3K/Akt 경로 활성화를 통하여 $\alpha 6 \beta 1$ 인테그린 (integrin)을 경유한 시그널에 의하여 매개되는 것으로 나타났다. 상기 결과는 전분화능 줄기 세포의 자기 재생에 대한 신규 배지 배합의 개발뿐만 아니라 전분화능 hES 및 iPS 세포의 대규모 생산을 위한 효과적이면서도 심지어 자동화된 확장법에 적용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 신규 hES/hiPS 세포 배양법은 표준 세포 배양법 (예를 들면, 섬유모세포 배양에 사용되는 방법)과 유사하기 때문에 특별한 기술을 요하지 않는다. 또한 상기 방법은 단일 세포 분할 (division) 당 세포 코팅 물질의 소비량을 현저히 감소시키고, 시간 효율적이므로 hES/hiPS 세포의 배양을 위한 종래의 절차와 대비하면 현저한 경제적 이익을 제공한다.
- [0188] 인간 재조합 LN-521 (종래에는 순수 형태로 입수된 바 없음)은 최대 길이(full-length)의 라미닌 $\beta 2$ cDNA를 클로닝하고 인간 라미닌 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬으로 HEK293 세포를 3중 형질 감염 (triple-transfection)시킴으로써 제조되었다. 인간 재조합 LN-111 및 LN-121은 최대 길이의 $\alpha 1$ 및 $\beta 2$ 사슬 cDNA의 클로닝 및 인간 $\alpha 1$, $\beta 1$ 및 $\gamma 1$, 그리고 $\alpha 1$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬 cDNA 각각을 이용한 HEK293 세포의 3중 형질 감염 이후 유사하게 생성되었다. 정제된 LN-521, LN-111 및 LN-121 단백질 각각은 단백질 염색 (staining) 및 웨스턴 블롯 분석에 의하여 확인된 바와 같이 $\alpha 1$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬뿐만 아니라, 순수한 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬 및 $\alpha 1$, $\beta 1$ 및 $\gamma 1$ 사슬을 함유하는 것으로 나타났다.
- [0189] 방법
- [0190] 인간 ES 및 iPS 세포 배양 (Human ES and iPS cell cultures)

- [0191] HS181 및 HS401 인간 ES 세포는 37℃, 5% CO₂에서 O3 배지 (Rodin et al., *Nature Biotechnol.*, vol. 28, pp. 611-615 (2010)에 기재되었으며, 이때 pH는 7.35로 조절되었음), mTeSR1 (STEMCELL Technologies) 및 합성의 제노-프리(xeno-free) TeSR2 (STEMCELL Technologies) 내에서 LN-521-코팅된 배양 디쉬 상에 배양되었다. 초기에, 세포 라인은 후속 트립신화와 함께 멸균 나이프(sterile knife)를 사용하여 조심스럽게 스크래칭함으로써 인간 지지 세포층으로부터 LN-521 코팅 상으로 옮겨지거나, 또는 상기 세포들은 LN-521 코팅으로부터 단일 세포 현탁으로 트립신화되었다. 약간의 신규 배지 액적(drop)이 첨가될 때, 1 시간 동안 인큐베이터 내에서 미리 데워진 신규 배지가 1일에 1회 세포에 공급되었다(도포 후 첫 번째 날을 제외함). 세포는 37℃, 5% CO₂에서 5 분 동안 Trypsin/EDTA (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland)에 노출됨으로써 10-12일에 1회 주기적으로 계대배양되었다. 이후, 이것들은 부드럽게 피펫하여 단일-세포 현탁으로 분할하였으며 한정된 (defined) 트립신 억제제 (GIBCO Invitrogen)가 첨가되었다. 세포 현탁은 4분 동안 25 rcf로 원심분리되었고, 상층액은 폐기하였으며, 세포 펠렛은 미리 데워진 O3 배지 내에서 재현탁되었고, 그리고 상기 세포를 이후 40 mm 체(sieve)에 통과시켰다. 후속적으로, 상기 세포들은 30,000 cells/cm²의 농도 및 1:25-1:30의 분할(split) 비율로 신규 LN-521-코팅된 디쉬 상에 도포되었다. 전술한 바와 같이, O3 배지 내에서 동일 라인의 대조구 세포는 매트릭셀 (STEMCELL Technologies) 및 LN-511상에서 배양되었다.
- [0192] 한정된(defined) 제노-프리 배양을 위하여, 동물 유래 성분이 없도록 한정된TeSR2 (STEMCELL Technologies) 배지 및 TrypLE™Select (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland) 효소가 사용되었다. 상기 세포들은 37℃, 5% CO₂에서 4-5분 동안 TrypLE™ Select에 노출됨으로써 10-14일에 한 번씩 계대배양되었다. 이후, 효소는 조심스럽게 흡인 (aspiration)되었으며, 미리 데워진 TeSR2 배지가 첨가되었다. 그 다음, 세포들은 부드럽게 피펫되어 단일-세포 현탁으로 분할되었고, 원심분리되었으며, 상층액은 폐기되었고, 그리고 세포 펠렛은 미리 데워진 TeSR2 내에서 재현탁되었다. 이후, 상기 세포들을 40 μm 체에 통과시켰고 신규 LN-521-코팅된 디쉬 상에 도포하였다.
- [0193] 조직 세포 배양 플레이트들은 인간 LN-521와 같은 재조합 ECM 단백질의 멸균 용액을 사용하여 모두 30 μg/ml (5 μg/cm²)의 농도로 4℃에서 하룻밤에 걸쳐 코팅되었다. 대조구 플레이트들은 STEMCELL Technologies사의 지시에 따라 매트릭셀로 코팅되었다. 사용에 앞서, 디쉬들은 추가 세척 없이 미리 데워진 O3 배지가 첨가된 후 1 시간 동안 인큐베이터 내에서 미리 데워졌다. 신규 디쉬에 신규 LN-521 용액을 도포한 후, 잔여 LN-521 용액은 적어도 1회 이상 사용될 수 있었다. 부착, 생존 및 생존 억제 (inhibition) 실험 모두가 신규 코팅 물질을 사용하여 수행되었다.
- [0194] 인간 iPS 세포, ChiPSW 라인은 OCT-4/SOX2/NANOG/LIN28 리프로그래밍 유전자를 이용한 렌티바이러스 변형된 (lentivirally transduced) 인간 포피 섬유모세포 (human foreskin fibroblasts; HFF)로부터 유도되었다. ChiPSW 라인은 상이한 계대(passage)의 반복 테스트에서 정상 남성 핵형(karyotype), 46 XY를 갖고 있다. 세포 배양 및 계대 실험에 앞서, 상기 세포들은 먼저 전분화능 마커의 발현을 위하여 체외에서 특성화되었다. Oct3/4 (SC-5279), Nanog (SC-33759), TRA-1-60 (SC-21705) 및 SSEA4 (sc-21704)에 대한 항체를 이용한 면역형광 (immunofluorescence) 연구는 상기 세포들이 이러한 모든 전분화능 마커를 발현하였음을 보여주었다. ChiPSW 세포의 전분화능은 체외 (배상체(embryoid bodies) 형성 및 면역 형광 연구) 및 체내 (SCID 베이지 마우스 내로 피하조직 주입) 실험에 의하여 확인되었다. ChiSW 라인의 세포는 비팅 심근세포 (beating cardiomyocytes)로 추가 분화될 수 있었으며, 또한 조혈적 분화 (hematopoietic differentiation)를 거칠 수 있었다.
- [0195] 지지세포가 없는 배양에 앞서, iPS 세포는 유지되었고 조사된 인간 포피 섬유모세포 상으로 확장되었다. 녹-아웃(knock-out) 혈청 (KSR, Invitrogen)-보충된 배지가 증식에 사용되었고, 8 ng/ml의 기본 섬유모세포 성장 인자(bFGF, R&D Systems)로 보충되었다. 세포는 일 기준으로 공급되었고, 1주 마다 콜라게나아제 IV(1 mg/ml, Roche)를 사용하거나 필요 시 손으로 박리 (dissection)하여 계대배양되었다.
- [0196] 이러한 실험에 앞서, CutB1.2 세포는 전분화능 마커 Oct4/Nanog/Sox2/TRA-1-60/TRA-1-81를 발현하고, 바이러스성 트랜스유전자의 발현은 결핍되는 것으로 확인되었고, 셀의 전분화능은 체내 및 체외 분화 연구에 의하여 확인되었다.
- [0197] 라미닌-521 및 기타 코팅질 (Laminin-521 and other coating materials)
- [0198] 인간 재조합 LN-521(BioLamina, AB, Stockholm (www.biolamina.com)로부터 입수 가능함)은 실질적으로 앞서 기재된 바와 같이 최대 길이의 라미닌 γ1, β2 및 α5 구조체를 사용하여 순차적으로 형질 감염된 (sequentially

transfected) 인간 배아 신장 세포 (HEK293; ATCC CRL-1573)에서 생성되었다. 단백질 생성을 위하여, HEK293 세포는 GlutaMax I로 보충된, Dulbecco의 개질된 Eagle 배지(DMEM) 내에서 6일까지 배양되었다. LN-521 분자는 항-FLAG 매트릭스 (Sigma)를 이용하여 친화성 정제되었고, 이후 환원 (reducing) 및 비환원 (nonreducing) 조건 하에서 3-8% 및 4-15% 구배 SDS-PAGE를 이용하여 특성화되었다. 단백질은 Sypro Ruby (Bio-Rad) 단백질 염색 (protein staining) 및 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인 상의 사슬의 면역염색 (immunostaining)을 이용하여 시각화되었다. 단백질을 추가적으로 특성화하기 위하여, 라미닌 $\alpha 5$, $\beta 2$ 및 $\gamma 1$ 사슬에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석이 수행되었다. 인간 재조합 라미닌-111 및 라미닌-121은 LN-521과 유사하게 제조되었으며, 웨스턴 및 SDS-PAGE에 의하여 예측된 분자 사이즈의 정확한 사슬을 함유하는 것으로 나타났다. 달리 기재하지 않는 한, 대응되는 마우스 라미닌-111 (Invitrogen)은 LN-111로 기재하기로 한다.

[0199] 시약 및 항체 (Reagents and antibodies)

[0200] InSolution™ LY 294002 (특정 Akt 억제제), InSolution™ Wortmannin (특정 PI3K 억제제), 및 InSolution™ 98059 (특정 MEK1/Erk 억제제)는 Calbiochem으로부터 구입하였다. phospho-Akt (#4060), total-Akt (#9272), phospho-Erk (#9101), 및 total-Erk (#9102)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다. PathScan Phospho-Akt1 샌드위치 ELISA kit (#7160), PathScan total Akt1 샌드위치 ELISA kit (#7170), PathScan Phospho-Akt2 샌드위치ELISA kit (#7048), 및 PathScan total Akt2 샌드위치 LISA kit (#7046)는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다. Calnexin (#ab10286)에 대한 항체는 Abcam으로부터 입수하였다. 다양한 인테그린 서브유닛(subunits)에 대한 기능 억제 항체(Function blocking antibodies), 마우스 이소형 항체 (isotype antibodies) 및 α -dystroglycan은 Millipore로부터 구입하였다. αV (MAB1980) 및 $\alpha 6$ (MAB1378)에 대한 기능 억제 항체는 소듐 아자이드를 함유하는 용액으로 제공되었기 때문에, 생존 억제 실험에 앞서, 모든 알파 인테그린 서브유닛에 대한 항체는 매번 2시간 동안 0.3 배지에 대하여 3회 투석되었다. 랫(rat) 이소형 대조구 항체뿐만 아니라 Lutheran 수용체 및 α -fetoprotein에 대한 항체 역시 R&D Systems로부터 입수하였다. Oct4, Nanog, SSEA-4, 평활근 액틴 (smooth muscle actin) 및 MAP-2에 대한 항체는 Millipore로부터 구입하였다.

[0201] 면역 형광 (Immunofluorescence)

[0202] 면역 형광 연구를 위하여, ES 세포가 배양되었고, 그리고 8-웰 슬라이드 챔버 (BD Biosciences) 또는 96-웰 플레이트 웰에 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)에 의하여 고정되었고, 0.1 % Triton-X에 의하여 투과성을 갖게 되었으며, 그리고 1시간 동안 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>)를 함유하는 10 % 우태아 혈청(bovine fetal serum) PBS에 의하여 블로킹되었다. 1차 항체를 이용한 인큐베이션은 상온에서 1.5 시간 동안 수행되었다. 2차 항체 및 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes)을 이용한 인큐베이션은 40분 동안 수행되었다. 인큐베이션 사이에, 시편(specimens)은 0.1% Tween-20 PBS 완충액으로 3-5회 세척되었다. 시편은 형광 구비 배지(fluorescence mounting medium; Dako, Glostrup, Denmark, <http://www.dako.com>) 내에 보존되었고, 형광 현미경(Leica, Heerbrugg, Switzerland, <http://www.leica.com>) 하에서 관찰되었다.

[0203] 상이한 mRNA의 실시간 PCR 정량화 (Real-time PCR quantification of different mRNAs)

[0204] 전체 RNA는 제조사의 지시에 따라 Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene, La Jolla CA, www.stratagene.com)을 사용하여 단리되었다. cDNA는 제조사 지시에 따라, 올리고(dT)12-18 프라이머 및 Superscript II 역전사효소(reverse transcriptase; GIBCO Invitrogen Corporation)를 함유하는, 전체 RNA 0.2 μ g의 20 μ l 반응 혼합물(0.2 μ g of total RNA in 20 μ l reaction mixture)을 이용하여 합성되었다. Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 실시간 정량화 RT-PCR Taqman 검정을 수행하였다. 모든 반응은 관심 대상 mRNA에 대한 프라이머 및 프로브를 함유하는 미리 전개된 유전자 발현 검정 믹스 (Applied Biosystems)를 사용하여 4회 수행되었다. 각각의 실험에 대한 추가 반응은 RNA 인풋을 표준화하기 위하여, GAPDH에 대한 예비-전개된(pre-developed) 유전자 발현 검정 믹스를 포함하였다. 모든 데이터는 7300 System SDS Software v 1.4를 이용하여 분석되었다.

[0205] FACS 분석 (FACS analysis)

[0206] 세포는 Trypsin/EDTA를 이용하여 배양 디쉬로부터 제거되었고, 단일 세포 현탁으로 해리되었고, 얼음으로 냉각된(ice-cold) FACS 완충액(2 % 우태아 혈청, 0.1 % 소듐 아자이드 농도의 행크(Hank) 완충액) 내에서 재현탁되었다. SSEA-4에 대한 1차 항체(Millipore, Billerica, MA, <http://www.millipore.com>)를 사용한 인큐베이션

은 얼음 상에서 1시간 동안 수행되었다. 이후, 세포들은 얼음-냉각된 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 후속적으로, 세포는 암실 조건에서 30분 동안 Alexa Fluor 항-마우스2차 항체(GIBCO Invitrogen Corporation)의 1:400 희석된 FACS 완충액 내에서 프로빙되었고, 4회 세척되었다. 대조구 세포는 마우스 면역글로불린으로 인큐베이션되었고, 이후 전술한 2차 항체로 인큐베이션되었다. FACSCalibur 플로우 사이토미터(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 이용하여 세포들을 분석하였다. 데이터는 the CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석되었다.

[0207] 핵형분석 (Karyotyping)

[0208] 세포 라인의 핵형 분석은 표준 Q-브랜딩 테크닉(Q-banding techniques)을 이용하여 수행되었다. 세포 샘플은 콜세미드(colcemid) KaryoMAX (0.1 μ g/ml; Gibco Invitrogen Corporation)로 4시간까지 처리되었고, 이후 Trypsin/EDTA 용액 (Gibco Invitrogen Corporation)으로 해리되었다. 세포들은 원심분리를 통하여 펠렛화되었고, 미리 데워진 0.0375 M KCl 저장액(hypotonic solution) 내에서 재현탁되었으며, 그리고 10분 동안 인큐베이션되었다. 원심분리 후에, 세포는 고정화제(fixative; 3:1 메탄올:아세트산) 내에서 재현탁되었다. 메타상스프레드(metaphase spreads)가 유리 마이크로스코프 슬라이드 상에서 제조되었고, 트립신에 짧게 노출시킴으로써 G-밴드(G-band)되었으며, 4:1 Gurr's/Leishmann 염색액 (Sigma-Aldrich Co.)으로 염색되었다. 10개의 메타베이스 스프레드 중 최소값이 분석되었고, 추가적인 20개가 카운팅되었다.

[0209] 테라토마 형성 (Teratoma formation)

[0210] 어린 (출생 후 7주 경과한) SCID(severe combined immunodeficiency) 마우스의 고환피막(testicular capsule) 아래에 약 10^6 세포를 주입(implantation)함으로써 테라토마 형성 실험을 수행하였다. 각각의 세포 라인 당 3마리의 동물이 사용되었다. 테라토마 성장은 1주 촉진법(weekly palpation)에 의하여 관찰되었고, 마우스는 주입 후 8주 경과 시 희생되었다. 테라토마는 고정되었고, 부위(sections)는 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin; HE)으로, 또는 헤마톡실린, 에오신 및 PAS (HE-PAS)로 염색되었다. 염색 부위로부터 분석된 바에 따라, 3가지 배아의 생식선(germ line) 층 모두의 조직 성분의 존재가 확인되었다. 모든 동물 실험은 윤리 위원회 승인에 따라 캐롤린스카 대학병원의 감염방지 동물 시설에서 수행되었다.

[0211] 배상체 형성 (Embryoid body formation)

[0212] LN-521 코팅된 세포 배양 디쉬로부터의 ES 세포는 37°C, 5% CO₂에서 1분 동안 TrypLE™Select에 노출되었고, 배지로 2회 세척되었으며, 큰 조각으로 분할되었으며, 그리고 낮은 부착 플레이트 내 현탁에서 배양되었다. 이에 사용된 배지는 2 mM L-글루타민, 20% 태아 아혈청(fetal calf serum; GIBCO Invitrogen Corporation), 0.1 mM β -머캅토에탄올 (GIBCO Invitrogen Corporation) 및 1% 비필수 아미노산(non-essential amino acids; GIBCO Invitrogen Corporation)으로 보충된 닉-아웃 DMEM (GIBCO Invitrogen Corporation)이었다. 현탁으로 1-2주 경과 후, 배상체는 젤라틴-코팅된 조직 세포 배양 96-웰 플레이트 (Sarstedt)로 옮겨지고, 1-2 주 동안 배양된 다음, 고정되었고, 모두 3개의 배아 생식 선 층(평활근 액틴, MAP-2 및 α -fetoprotein)의 마커에 대한 항체로 염색되었으며, 그리고 면역 형광을 위하여 전술한 바와 분석되었다.

[0213] 세포 부착 검정 (Cell adhesion assay)

[0214] 간략하게 설명하면, 97-웰 플레이트는 전술한 바와 같이 세포의 기질(extracellular matrix) 단백질로 코팅되었고, 소혈청 알부민을 함유하는 O3 배지에 의하여 블로킹되었다. ES 세포는 세포의 매트릭스-코팅된 플레이트 상에 50,000 cells/cm²의 세포 밀도로 도포되었고, 세포 인큐베이터 내에서 1 시간 동안 부착되도록 남겨졌다. 이후, 상기 플레이트는 배지로 3회 세척되어 비-부착 세포를 제거하였고, 그 다음 부착 세포는 5% 글루타르알데히드에 의하여 20분 동안 고정되었으며, 0.1% Crystal Violet. (Kebo Lab, Spanga, Sweden, <http://www.kebolab.se>)에 의하여 염색되었다. 1 시간 경과 및 3회의 수 세척 후, Crystal Violet은 10% 아세트산으로 추출되었고, 570 nm에서의 광 밀도를 측정함으로써 정량화되었다. 모든 실험은 4회에 걸쳐 수행되었다.

[0215] 세포 생존 및 생존 억제 검정 (Cell survival and inhibition of survival assays)

[0216] 세포가 24시간 동안 세포 인큐베이터 내에 남겨진 것을 제외하고는, 세포 부착 검정과 관련하여 앞서 기재된 바와 같이 생존 검정을 수행하였다. 생존 억제 검정을 위하여, 세포들은 제조사에 의하여 추천된 농도의 기능 억제 항체(function blocking antibodies)를 갖거나 본 명세서에서 기재된 농도의 경로 저해제(pathway inhibitors)를 갖는 배지 내에서 30분 동안 유지되었으며, 이후 코팅된 디쉬 상에 도포되었다. 모든 실험은 4

회 실시되었다.

[0217] 웨스턴 블롯팅 및 ELISA (Western blotting and ELISA)

[0218] HS 181 세포는 전술한 바와 같이 단일 세포 현탁으로 트립신화되었다. 억제 실험을 위하여, 세포는 블록킹 항체 또는 경로 저해제를 갖는 O3 배지 내에서 30분 동안 유지되었고, 이후 450K 세포가 적절한 매트릭스(matrix) 코팅으로 미리 코팅된 35 mm 디쉬 상에서 도포되었다. 다른 실험을 위하여, 동일 개수의 세포가 트립신화 이후 직접 도포되었다. 모든 경우에서, 세포는 37℃, 5% CO₂에서 1 시간 동안 스프레드되도록 하였다. 얼음-냉각된 PBS 내에서의 2회 세척 후, 세포를 갖는 플레이트는 액체 질소 내에서 스냅(snap) 동결되었고, -80℃에서 저장되었다. 웨스턴 블롯 및 ELISA용 샘플을 제조하기 위하여, 플레이트는 서서히 해동되었고 가장 위에 100-150 ml의 리시스 완충액(lysis buffer; 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% 디옥시콜레이트, 0.5% SDS, 1% Triton X-100, 1% Igepal, Complete™ (Roche) 및 Phospho-Stop™ (Roche))을 사용하여 얼음 상에 유지되었다. 그 다음, 세포는 스크랩되었고, 피펫팅되었으며, 27G ¾" 바늘(needle)을 통하여 전단화(shear)되었다. 이후, 세포 펠렛은 4℃에서 15분 동안 16,100 rcf로 원심분리됨으로써 투명화되었다. 웨스턴 블롯을 위하여 4-12% 구배 겔이 SDS 전기 영동(electrophoresis)에 사용되었고, 단백질은 PVDF 멤브레인에 이송되었다. 멤브레인은 제조사 지시에 따라 관심 대상 항체로 혼성화되었다. Amersham Biosciences에서 시판 중인 화학발광 HRP-기질(substrate)이 시각화를 위하여 사용되었다. 밀도계(densitometry) 분석을 위하여 필름은 2,400 dpi로 스캐닝되었고, ChemiImager5500 프로그램 (1D-Multi Line densitometry mode)에 의하여 분석되었다. ELISA를 위하여, 샘플은 제조사 지시에 따라 웰에 도포되었다.

[0219] 체내 영상화 및 이동 검정 (*In vivo* imaging and migration assay)

[0220] 24-웰 플레이트가 세포외 기질 (extracellular matrix) 단백질로 코팅되었고, 소혈청 알부민을 함유하는 O3 배지에 의하여 블로킹되었다. ES 세포는 세포외 매트릭스-코팅된 플레이트 상에 30,000-40,000 cells/cm²의 세포 밀도로 도포되었고, 세포 인큐베이터 내에서 0.5 시간 동안 부착되도록 남겨졌다. 이후, 상기 플레이트는 분위기 제어 유닛이 구비된 고품량 영상화 시스템 Operetta (PerkinElmer) 내로 옮겨졌고, 37℃, 5% CO₂를 유지하도록 하였다. 생성된 2개의 영상에 대하여, Harmony software (PerkinElmer)를 이용하여 도포한 후 24시간 동안 15분에 1회씩 비추어진(brightfield) 부분의 이미지를 촬영하였고, 내보냈으며, ImageJ software (NIH, the US)를 이용하여 분석하였다. 이동 검정(migration assay)을 위하여, 도포 후 18시간 동안 7분마다 촬영하였다. 도포 후 5시간 및 7시간 사이에 얻어진 이미지를 MTrackJ plug-in (University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands)를 이용하여 분석하였다. 각각의 코팅 상에 100개 부착된 세포를 추적하였고 현재부터 그 앞의 트랙 지점까지의 평균 거리를 계산하였다. 에러 바 (Error bars)는 평균 s.e.m. (n=100)의 표준 오차를 나타낸다.

[0221] 통계 (Statistics)

[0222] 통계적 유의값 (statistical significance)은 불균등 변화량 (unequal variances)에 대한 스튜던트 양측 t-테스트(Student's two-tailed t-test)에 의하여 결정되었다.

[0223] 실시 예 2의 결과 고찰

[0224] 다능성 hES 세포는 α1, α5, β1, β2 및 γ1 라미닌 사슬을 발현한다. 단일 세포 현탁액으로부터 도포된 hES 세포의 부착 및 클론 생존을 다른 코팅 기저층 (coating substrata)과 비교하기 위하여, LN-511 상에서 단일층으로 또는 지지층 (feeder layer) 상에서 다발 (clusters)로 성장하는 hES 세포를 O3 배지에서 트립신 처리하여 단일 세포 현탁액으로 만들었고, ROCK 억제제 (Y-27632)의 부재 또는 존재하에서 매트릭셀 (Matrigel), LN-111, LN-511, LN-521 또는 LN-511 및 LN-521의 혼합물로 코팅된 세포 배양 접시 상에 도포하였으며, 24시간 후에 분석하였다.

[0225] 상기 세포는 매트릭셀 또는 LN-111 상에서는 생존하지 못했으나, 인간 재조합 LN-511 및 LN-521에서만 아니라 이 둘의 혼합물 상에서도 단일 세포로 생존하였다. 그러나, 상기 LN-521에서의 세포의 생존은 LN-511에서보다 매우 높았다 (아래 숫자로 비교). 인간 재조합 LN-111 또는 LN-121상에 도포된 세포는 24시간 후에 생존하지 못하였으며 (데이터 나타나지 않음), 이는 라미닌 삼량체 (trimer)에 β2 사슬의 존재가 엄밀하게는 그러한 효과를 지지하기에 충분하지 않음을 증명한다. ROCK 억제제 Y-27632의 존재하에서, 상기 hES 세포는 모든 표면상에서 생존했다.

[0226] 그러나, 도포하고 24 시간 후에 ROCK 억제제의 부재 또는 존재하에 LN-521에서 성장하는 세포들 간에는 세포 형

태 면에서 뚜렷한 차이가 있었다. 분주하고 24시간 후에 ROCK 억제제의 부재 하에서, LN-521 상에서 성장하는 세포는 원형이었고, 반면 ROCK 억제제의 존재 하에서 성장하는 세포는 액틴 세포골격 (actin cytoskeleton)의 재배열에 의해 기인 되었을 가능성이 있는 방추형 또는 초승달 같은 모양을 나타내었다.

[0227] LN-521이 인간 다능성 세포의 장기간 자가 재생을 위한 세포 코팅 물질로 사용될 수 있는지를 테스트하기 위하여, HS181, HS401, H1 세포 및 인간 iPS ChiPSW 및 CutB1.2 세포들은 O3, mTeSR1 또는 TeSR2 배지에서 상기 단 백질 상에서 배양되었다. O3 또는 TeSR1 배지에서 성장하는 세포는 단일 세포 현탁액에 매 10-14일 마다 1:20-1:30의 비율로 통과시켰다. 다능성 hES 세포는 작은 클럼프 (clumps)를 통과하는 경우, LN-511 또는 매트릭셀 상에서 성장한 세포와 유사하거나 더 높은 안정적인 비율로 증식했다. 따라서, LN-521 상에서의 1 계대 (passage)는 클럼프에서 두 번 계대된 (passed) 대조구 세포와 동일하거나 또는 더 많은 수의 세포분열을 산출 하였다. HS181, HS401, 및 H1 세포는 O3 배지에서 적어도 24, 5 및 15 계대 동안, 각각 (9, 2 및 6 개월) 증 식하였다. CutB1.2 iPS 및 ChiPSW 세포는 mTeSR1에서 각각 5 및 3 계대 동안 배양되었다. 흥미롭게도, 해리 된 hES 세포는 TeSR2 배지 및 TrypLE Select 효소를 이용하여 완전히 한정 (defined)되고, 외래물질이 없는 (xeno-free) 조건 하에서 LN-521 상에서 배양될 수 있었다. 한 계대 후의 도포 효율은 O3 또는 mTeSR1 배지의 세포의 효율보다 약간 낮았으며, 상기 해리된 세포는 매 10-14일 마다 1:15-1:20의 비율로 정상적으로 계대 되었다. H1 및 HS401 세포는 TeSR2에서 12 및 4 계대 동안, 각각 (5 및 1.5 개월) 배양되었다.

[0228] 상기 hES는 일반적으로 단일 세포 현탁액에 LN-521로 코팅된 배양 접시의 1 cm² 당 30,000 세포로 도포 되었으며, 그 후에 개별 세포는 서로 어떤 직접적인 접촉이 없었다. 도포 8시간 후에, 상기 hES 세포는 다능성 마커 Oct4, Nanog, 및 Sox2를 발현하는 단일 세포로 관찰되었다. 도포 24시간 후에, 상기 세포는 결국 웰의 대부분을 덮고 있는 단층의 큰 섬 (large islands)로 결합되는 작은 단층 콜로니를 형성하였다.

[0229] LN-521 상에서 성장한 세포는 다능성 마커 Oct4, Nanog, 및 SSEA4의 안정적인 발현 수준을 나타내었으며, 이는 매트릭셀 상에 도포되고 작은 클럼프로 계대된 세포의 발현 수준과 유사했다. LN-521 및 매트릭셀 배양에서의 자발적 분화의 수준을 비교하기 위하여, 매트릭셀 배양 및 LN-521 배양에서 발현된 분화 마커 PAX6, SOX17 및 SOX7에 대한 mRNAs의 양은 1 (10일) 및 10 계대 (4개월)후에 비교하였다. 정량적 RT-PCR은 계대 수 (passage number)에 독립적으로, LN-521 배양에서 모든 세 개의 분화 마커의 유사하거나 또는 더 낮은 발현 수준을 나타 내었다.

[0230] 핵형 (Karyotypes)이 O3 배지에서 LN-521 상에, hES 세포주 HS181 및 H1에 대하여 각각 12 및 10 계대 후, 및 H1에 대하여 TeSR2 배지에서 7 계대 후에 정상인 것으로 확인되었다. O3 배지의 LN-521 상에서 각각 13 및 12 계대 동안 배양된 HS181 및 H1 세포 및 TeSR2의 LN-521 상에서 7 계대 동안 배양된 H1 세포를 주입한 후에, SCID 마우스에 형성된 테라토마 (teratomas)의 조직학적 검사는 인간 배아의 모든 세 종류의 세포 계통 (germ lineages)을 함유하는 조직의 발달을 나타내었다. 생체 외에서의 분화는 또한, 모든 세 경우의 세포들이 중배엽 (연 근육 액틴), 외배엽 (MAP-2) 및 내배엽 (α -태아단백질)의 마커를 발현하는 배상체 (embryoid bodies)를 형성하는 능력을 보유한다는 것을 나타내었다.

[0231] 코팅 기저층 (substrata)의 효율성을 정량화하기 위하여, 매트릭셀, LN-111, LN-511, LN-521, 및 LN-511 및 LN-521의 동일한 혼합물상에서 해리된 hES 세포의 1 시간 후의 부착 및 24 시간 후의 생존을 연구하였다. 흥미 롭게도, 상기 세포의 확산 (spreading)이 매트릭셀 또는 LN-111에서 보다 LN-521 및 LN-511에서 뚜렷하게 더 나 았음에도 불구하고, 약 1 시간 후에 동일한 75-80%의 세포가 상기 코팅에 부착되었다 (도시되지 않음). 24 시 간 후에, 거의 모든 세포가 매트릭셀 또는 LN-111 상에서 생존하지 못하였고, 매우 소수만이 LN-511 상에서 생 존하였다. 대조적으로, LN-521 상에서 hES 세포의 생존은 매트릭셀 상에서보다 대략 20배 높았으며, LN-511 상 에서보다는 세배 높았다.

[0232] LN-521 및 ROCK 억제제 (Y-27632)의 영향을 정성적으로 비교하기 위하여, 본 발명자들은 동일한 도포 밀도 (1 cm² 당 40,000 세포)의 동일한 단일 세포 현탁액으로부터의 세포를 10 mM의 Y-27632를 함유하는 배지에서 도포하 였고, 서로 다른 코팅에서의 그들의 생존을 연구하였다. LN-521 상의 미처리 세포 및 매트릭셀 상의 Y-27632 처리 세포는 도포한 후 24시간 후에 유사한 생존율을 나타내었다. 흥미롭게도, Y-27632 처리된 인간 ES 세포조 차도 매트릭셀 상에서보다 LN-521상에서 더욱 잘 생존하였다.

[0233] 외인성 (exogenous) bFGF가 O3 배지에서 제거된다면, 상기 세포는 여전히 매트릭셀 상에서보다 LN-521상에서 20 배 높은 생존을 나타내었다. 더욱이, hES 세포는 TeSR1 제제 (bFGF, LiCl, γ -아미노부티릭산 (γ -aminobutyric acid, GABA), 피페콜린산 (pipecolic acid) 및 TGFb)¹⁶의 모든 성장인자가 결여된 배지에서조차

LN-521상에서 도포 후에 24시간 동안 생존했으며, 이는 생존 기작이 상기 인자에 의해 유도되는 신호에 독립적이라는 점을 제한한다.

[0234] 원형질막 상에서 LN-521에 대한 잠재적인 수용체에 대해 기능-차단 항체를 이용한 세포 생존 억제에 대한 분석은 인테그린 $\alpha 6$ 에 대한 항체가 LN-521 상에서 인간 ES 세포의 생존을 저해하였고, $\beta 1$ 에 대한 항체는 다소 적은 정도로 저해하였음을 나타내었다. 루테란 (Lutheran) 수용체 및 α -디스트로글리칸 (α -dystroglycan)에 대한 것뿐만 아니라, 다른 테스트된 인테그린 서브유닛에 대한 기능-차단 항체는 LN-521 상에서의 인간 ES 세포 생존에 대한 어떠한 영향도 거의 나타내지 못하였다.

[0235] 최근에, ROCK 억제제 및 블레비스타틴 (blebbistatin)이 미오신 경쇄 (myosin light chain, MLC)의 인산화에 의해 매개된 액틴-미오신 수축 (contractility)의 폐기 (abrogation)를 통하여 작용한다는 점이 나타났다. LN-521이 유사한 활성을 갖는지를 테스트하기 위하여, 인산화된 MLC의 수준은 도포 1시간 및 6 시간 후에 마트리젤, N-111, LN-511, 및 LN-521상에서 해리된 세포들 사이에서 비교되었다 (도 12 및 13). 흥미롭게도, 웨스턴 블롯 (western blot)은 마트리젤 및 LN-111 상의 세포에서의 인산화보다 LN-511 및 LN-521상의 세포에서 MLC의 인산화가 심지어 더 높았다는 점을 나타내었다. 액틴-미오신 재배열은 수축을 위해서뿐만 아니라 세포 운동성을 위해서도 필수적이기 때문에 우리는 세포 이동은 LN-521 및 그의 인테그린 수용체 $\alpha 6 \beta 1$ 간의 상호작용에 의해 유발될 수 있다고 추측했다. 마트리젤 및 LN-521상의 세포의 생체 내 영상화 (*In vivo* imaging)는 후자에서 훨씬 빠르게 이동하였으며, 작고 빨리 움직이는 콜로니에 응집함으로써 생존하였다는 것을 나타내었다. 또한 hES 세포의 상기 네 개의 코팅 상에서의 이동이 상기 세포가 여전히 모든 경우에서 부착된 경우 도포한 지 5 시간 및 7 시간 사이에서 비교되었다 (도 14). LN-521 상에서의 상기 hES세포의 운동성은 다른 코팅 상에서의 세포의 운동성보다 높았으며, 그들 상에서 생존하는 능력과 연관되었다. 인테그린 $\beta 1$ 에 대한 기능 차단 항체 처리는 운동성 (도 15) 및 LN-521 상의 세포의 부착 (데이터 나타내지 않음)을 현저히 감소시켰다.

[0236] 방대한 양의 데이터는 인테그린에 의한 MEK1/Erk 또는 I3-kinase/Akt 경로의 활성화가 아노이키스 (anoikis)를 차단할 수 있다는 점을 나타내었다. LN-521 상의 hES 세포 생존에 있어서, 이러한 경로들의 잠재적인 역할을 탐사하기 위하여 각각 Akt 및 MEK1의 특이적 억제제인 LY 294002 및 PD 98059의 효과를 검사하였다. LY 294002에 의한 Akt 활성화의 차단이 분리 (detachment) 및 hES 세포 사멸을 촉진시키고 LN-521 상에 도포한 지 24시간 후에 어떠한 세포도 생존하지 못하는 것으로 확인되었다 (도 16). 대조적으로, PD 98059로 처리는 생존에 심각하게 영향을 주지는 못하였다. 다른 PI3K/Akt 특이적인 억제제인 Wortmannin으로 처리된 hES 세포 또한 LN-521 상에 도포 된지 24시간 후에 생존하지 못하였으며, 이는 PI3K/Akt의 활성화가 LN-521 상에서의 세포 생존에 필요하다는 점을 확증한다.

[0237] 그 영향이 PD 98059에 의해 완전히 억제되지 않는 bFGF는 MEK1/Erk 경로의 잠재적인 활성 인자로 알려져 있기 때문에, 발명자는 외인성 bFGF가 없는 O3 배지에서 동일한 결과를 갖는 동일한 실험을 수행하였다 (도 17). LY 294002 및 PD 98059 처리의 효율이 LN-521 상에 도포 된지 1 시간 후에 수집된 처리구 및 대조구 세포의 웨스턴 블롯 분석에 의하여 확인되었다 (도 18 및 도 19).

[0238] 인-Akt (phospho-Akt)에 대한 항체로 마트리젤 및 LN-521 상에서 성장하는 세포의 추출물의 웨스턴 블로팅 분석은 두 경우 모두에서 PI3K/Akt 경로가 활성화되었다는 점을 나타내었다 (데이터 나타내지 않음). 서로 다른 코팅 상의 세포에서의 Akt 활성화의 수준을 결정하기 위하여, 상기 세포가 서로 간에 여전히 직접적인 접촉을 갖지않는 경우, ELISA은 마트리젤, LN-111, LN-511 및 LN-521 상에 도포한 지 1 시간 후에 수집된 세포 용해물 (cell lysates) 상에서 수행되었다 (도 20 및 도 21). 서로 다른 코팅 상의 세포에서의 Akt2 인산화의 수준은 이들 상에서의 생존성과 연관되었다.

[0239] $\alpha 6$ 및 $\beta 1$ 인테그린이 각각 알파 및 베타 서브유닛 가운데 인간 ES 세포에서 가장 풍부하게 발현된 인테그린 동종체 (isoforms)라는 점이 입증되었다. 인테그린 $\alpha 6 \beta 1$ 은 다른 라미닌에 대한 특이성의 넓은 스펙트럼을 나타내지만, LN-521 또는 LN-511에 대한 결합 친화도 (binding affinity)는 LN-111에 대한 친화도보다 더 높다. 최근에, $\beta 2$ 라미닌이 $\beta 1$ 라미닌보다 인테그린에 대하여 더 높은 친화도를 갖는다는 점이 확립되었다. 따라서, 인테그린에 대하여 가장 높은 친화도를 가지므로, 예를 들어, LN-511 또한 덜한 정도로 가능하기는 하나, LN-521은 이동을 위한 최상의 앵커리지 (anchorage)를 제공할 수 있고, $\alpha 6 \beta 1$ 인테그린을 통하여 가장 높은 신호를 전달할 수 있으며, 이로 인하여 해리된 다능성 hES 세포의 최상의 생존성이 나타난다.

[0240] 이러한 작업의 결과는 일반적으로 다능성 인간 줄기 세포의 배양 및 팽창 (expansion)을 촉진시킬 수 있을 것이며, 심지어 임상 적용 목적의 세포를 포함하는 그러한 세포의 자동화된 팽창이 가능하게 할 것이다. LN-521 상에서 해리된 hES 세포의 생존은 이동 (migration)에 의존하는 것으로 나타나며, 따라서 상기 세포는 초저밀도

로 도포된 후에 생존하지 못한다. 본 발명에서 기술된 새로운 hES 세포 배양 방법은 ROCK 억제제 또는 블레비스타틴 처리가 그러한 것처럼 세포골격을 해하지 않는 단지 자연적으로 발생하는 LN-521 부착 단백질만을 이용한다. 따라서, LN-521은 상기 세포 표면에서의 정확한 인테그린 프로파일을 가질 때 상기 세포의 생존에 가장 이롭다. 이러한 결과는 또한 1 cm² 당 20,000-30,000 세포의 상대적으로 낮은 밀도로 LN-521 상에 도포된 hES 세포가 생존할 수 있으며, 적어도 다른 hES 배양 시스템에서 효율적인 것과 같이 증식할 수 있었다는 점을 나타낸다. 상기 새로운 방법은 예를 들어 섬유아세포 (fibroblasts)의 배양과 같은 표준 세포 배양 절차와 밀접하게 유사하고, 따라서 LN-521 상에서의 hES 세포 배양은, hES 세포의 배양이 기술적 장애가 되었기 때문에 예전의 주요한 문제점이었던 특수하게 훈련된 인력을 요구하지 않는다.

[0241] 광범위하게 사용되는 인간 다능성 줄기 세포 자가 재생을 위한 TeSR1 제제는 매트릭셀을 이용한 용도로 초기에 개발되었으며, 이는 대부분 다능성 hES 세포에 대한 유익한 효과를 갖는 것으로 널리 인식되지 않은 MEK1/Erk 경로를 목표로 하는 높은 양의 bFGF를 함유한다. 이러한 결과는 코팅 물질로서 LN-521의 이점을 이용하며 특이적으로 인간 ES 세포 자가 재생에 중요한 경로를 목표로 하는 새로운 배지 제제의 개발을 유도할 수 있다.

[0242] 요약하자면, 본 연구는 다능성 hES에 의하여 정상적으로 분비되는 LN-521이, 단독의 코팅질로서 LN-511과 유사하게 배양에서 인간 다능성 줄기 세포의 자가 재생을 지지할 수 있다는 것을 입증하였다. 두 라미닌 모두 생체 외에서 균질한 단일층으로 세포의 성장을 촉진시켰다. 그러나, 두 라미닌의 중요한 차이점은 hES/hiPS 세포가 단일 세포 현탁액으로 트립신처리될 수 있었고, 세포 클러스터의 수동 분리 (splitting)와 반대로, 매트릭셀 또는 지지 세포 상에서 성장한 hES/iPS 세포의 팽창에 요구된다는 점이다. 이러한 연구의 결과는 다능성 인간 줄기 세포의 배양을 촉진시키고 그러한 세포의 자동화된 팽창을 촉진시킬 수 있을 것이다.

[0243] 실시 예 3

[0244] 인간 배아 줄기 세포가 두 개의 다른 세포 배양 배지에서 라미닌-521 기질 상에서 배양되었다. 상기 두 개의 세포 배양 배지는 3.9 ng/ml 및 100 ng/ml로 bFGF의 양이 서로 다르다.

[0245] 도 22는 라미닌-521을 갖는 3.9 ng/mL의 bFGF를 포함하는 O3 배지에서 배양된 5 계대 (40일) 후의 HS181 hES 세포의 성장 곡선을 단일 흑색 (solid black)으로 나타낸다. 상기 O3 배지는 유일한 동물 유래의 성분으로서 소혈청 알부민 (bovine serum albumin)을 가지며 상업적으로 구입가능하고 화학적으로 정의된 (defined) mTeSR1 배지의 변형물이다. 라미닌-521 기질을 가지며 100 ng/mL의 bFGF를 포함하는 O3 배지에서 배양된 HS181 hES 세포의 성장 곡선을 점선 (dashes)으로 나타내었다. 계대배양 (passaging)을 위하여 단일 세포 현탁액으로 세포를 해리시켰다. 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이, 낮은 bFGF 함량에 대한 성장 곡선이 더 높은 bFGF 함량에 대한 것보다 같거나 더 우수했다.

[0246] 도 23은 실시간 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석을 이용하여 얻은, 양 배지에 대한 5 계대 (40일) 후의 다능성 마커 Oct4 및 나노그 (Nanog)에 대한 mRNA 전사체 (transcripts)의 상대적인 양을 나타낸다. 양 세포 배양 배지에서 다시 비슷한 양이 얻어졌으며, 이는 낮은 함량의 bFGF에서 상기 줄기 세포가 다능성을 유지했다는 것을 시사한다. 따라서, 특히 라미닌-521 기질과의 조합으로 낮은 함량의 bFGF를 사용하여 여전히 우수한 결과를 얻을 수 있다.

[0247] 실시 예 4

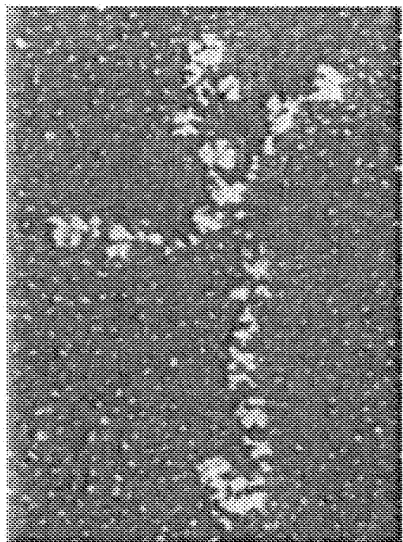
[0248] 실시 예 1 및 2에서, 해리된 줄기 세포는 대부분 LN-521 상에서 활동적인 운동성 및 작고 효율적으로 성장하며 이동하는 단일층 섬 (islands)으로의 병합 (association)을 통하여 생존하였다. 매우 낮은 클로닝 밀도로 도포된 세포는 예정 세포사 (programmed cell death)로부터 전문화된 (specialized), 아노이키스 (anoikis)를 통하여 사멸하였다. 정상적으로, 예를 들어 라미닌과 같은 세포외 기질 (extracellular matrix) 분자로부터의 인테그린-관련 신호화 (integrin-related signaling) 및 카드헤린-관련 세포-세포 신호화 (cadherin-related cell-cell signaling)는 아노이키스를 방지할 수 있다. 인간 ES 세포 표면에 가장 풍부한 카드헤린 이소폼은 상피-카드헤린 (epithelial-cadherin, E-Cadherin)이다. 실시 예 3에서의 실험은 LN-521 및 E-카드헤린의 조합이 인간 ES세포를 아노이키스로부터 보호할 수 있는지 및 세포의 클론 생존을 가능하게 하는지 여부를 알아내기 위하여 수행되었다.

[0249] hES 세포가 cm² 당 250 세포의 밀도로 서로 다른 코팅 상에서 mTeSR1 배지에서 도포되었으며, 알칼리포스파타제 (alkaline phosphatase) 염색 키트를 이용하여 배양에서 5일 후에 관찰되었다. 라미닌-521 및 E-카드헤린은 어느 것도 단독으로 개별화된 (individualized) hES 세포의 효율적인 클론 생존을 허용하지 않았다.

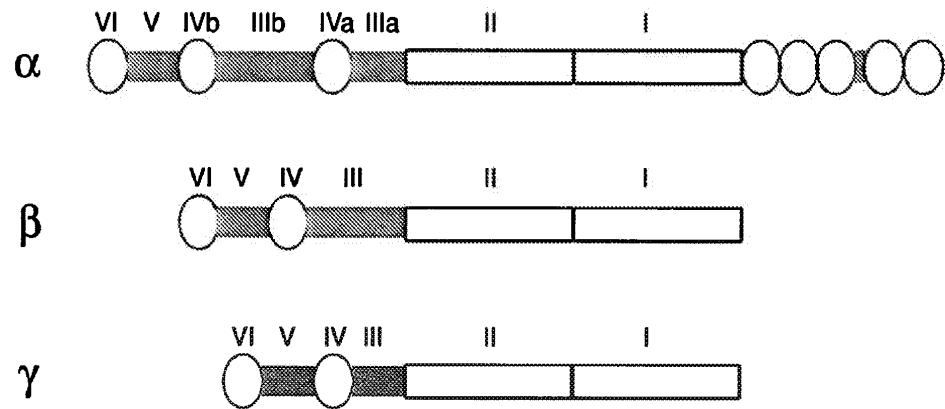
- [0250] 다음으로, 라미닌-521 및 E-카드헤린의 조합이 세포의 클론 생존을 유지시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위하여 이들 조합을 테스트하였다. 라미닌-521의 고정된 함량이 적정된 (titrated) E-카드헤린과의 조합으로 세포 배양 접시 코팅을 위하여 사용되었다. 세포의 클론 생존이 약 1:10 w/w 내지 약 1:5 w/w를 포함하는 E-카드헤린 대 라미닌-521의 서로 다른 비율로 달성되었다.
- [0251] mTeSR1 배지에 대한 다양한 변형의 효과를 시험하기 위하여 부가적인 실험을 수행하였다. 약 1:10 w/w 비율의 E-카드헤린 대 라미닌-521 혼합물이 플레이트를 코팅하기 위하여 사용되었다. 예상치 못하게, 알부민 농도의 두 배 (2x) 증가가 라미닌-521/E-카드헤린 기질 상에서 hES 세포의 클론 생존을 현저하게 개선시켰다는 점을 발견하였다. 이러한 조건 하에서 개별화된 hES 세포 생존의 비율은 10 내지 15%였고, mTeSR1 배지 및 부가적인 알부민을 갖는 mTeSR1 배지 모두에서 매트릭셀, 라미닌-521, 또는 E-카드헤린 단독 상에서의 생존보다 적어도 약 10배 (one order of magnitude) 높았다. 세포의 저속도 촬영 (Time-lapse photography)은 라미닌-521/E-카드헤린 코팅이 서로 다른 세포의 응집을 통해서가 아니라, 단일 세포의 증식을 통하여 세포 생존을 촉진시켰다는 점을 확인하였다. 라미닌-521/E-카드헤린은 재조합 인간 혈청 알부민 (rHSA)이 부가되고 완벽하게 화학적으로 정의되며 외래 물질이 없는 TeSR2 배지에서 세포의 클론 생존을 비슷하게 유지시켰다.
- [0252] 부가적인 테스트에서, hES 세포주가 유도되었다. 24-웰 조직 세포 배양 접시 플레이트를 Dulbecco's 인산완충 용액 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 두 번 세척하였다. 다음으로, 라미닌/카드헤린 기질을 생산하기 위하여 상기 접시 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 100 µg/mL 라미닌-521 (BioLamina AB, Stockholm) 48 µl; 82 µg/mL E-카드헤린 (R@DSystems) 6 µl; 및 칼슘 및 마그네슘을 포함하는 DPBS (GIBCO) 300 µl를 함유하는 살균 용액 (sterile solution)으로 코팅하였다.
- [0253] hES 세포주를 유도하기 위하여 사용된 기증된 배아는 양쪽 부모의 동의 후에 공인된 인공수정 클리닉으로부터 얻었으며 윤리 승인을 얻었다. 불임치료에 사용될 수 없는 신선하거나 또는 냉동된 배아만이 유도 절차 (derivation procedures)에 사용되었다. 본 목적을 위하여 설계된 레이저 기구로 투명대 (zona pellucida)에 작은 개구부를 만든 후에 마이크로피펫을 이용하여 하나 또는 두 개의 세포를 8-세포기 배아로부터 단리 (isolated)하였다. 이러한 절차는 착상전 유전자 진단 (pre-implantation genetic diagnostics, PGD)에서의 임상적 사용을 위하여 공인되었다. 부가적인 rHSA를 갖는 TeSR2 배지에서 라미닌-521/E-카드헤린 기질 상에 세포를 위치시켰다. 상기 세포는 성공적으로 부착했으며, 증식하기 시작하였다. 부모 배아 (parental embryos)가 배반포 (blastocyst) 단계로 성장하도록 하였으며 냉동되었다. 배아 배양은 37°C 및 5% O₂/10% CO₂에서 기름 아래에 방울 (drops)로 놓인 외래 물질이 없는 표준화된 인공수정 배양 배지를 이용하여 수행되었다. 투명대를 제거한 후에, 다섯 개의 인간 배반포의 내부세포괴 (inner cell masses)가 기계적으로 단리되었으며, 상기 라미닌-521/E-카드헤린 기질 상으로 4-웰 배양 플레이트 (Nunc)에서 도포되었다. 초기 48 시간의 배양 후에, 상기 배양 배지는 매일 다시 위치되었다. 10 내지 14일 후에, 성장물 (outgrowths)을 기계적으로 단리하였으며, 라미닌-521/E-카드헤린 기질 상으로 재도포하였다. 기계적인 계대배양이 연속적인 2 내지 3 계대를 위하여 사용되었으며, 그 후 TrypLE Select (GIBCO)를 이용하여 콜로니를 계대 배양하였다.
- [0254] 부가적인 소혈청을 포함하는 mTeSR1 배지와 전술된 라미닌-521/E-카드헤린 기질을 이용하여, 여섯 개의 배양된 배반포로부터 세 개의 새로운 hES 세포주가 유도되었다. 도포한 지 4일 후에, 내부세포괴는 줄기세포 같은 성장물을 나타내었다. 도 24는 라미닌-521/카드헤린 기질 상의 새로운 인간 배아 줄기 HS841 세포주의 초기 단계 유도를 나타낸다. 내부세포괴의 기계적 단리 및 라미닌-521/E-카드헤린 기질 상의 도포 한지 4일 후에 6일 차 배반포의 내부세포괴로부터 성장하는 형태학적으로 전형적인 인간 배아 줄기 세포를 나타내었다.
- [0255] 예상치 못하게, 상기 세포 배양 시스템 및 방법은 6 개의 배아 중 3개의 hES 세포주에서 (50%) 표준 방법보다도 더욱 안정적인 유도율을 나타내었다.
- [0256] 완벽하게 화학적으로 정의되고 외래 물질이 없는 환경인 부가적인 rHSA와 함께 라미닌-521/E-카드헤린 기질 및 TeSR2 배지의 사용은 새로운 hES 세포주의 유도에서 유사한 결과를 산출했다.
- [0257] 상기 개시된 내용의 변형 및 다른 특징 및 기능, 또는 이들의 대체물이 수많은 기타 다른 시스템 또는 응용에 결합 될 수 있는 것으로 이해되어야 할 것이다. 다음의 청구범위에 의하여 명백해지는 것이 의도되며, 현재 발견되지 않았거나 예기치 못한 다양한 대체물, 변경, 변형, 또는 이들의 개량이 당 업자에 의해 계속 만들어질 수 있을 것이다.

도면

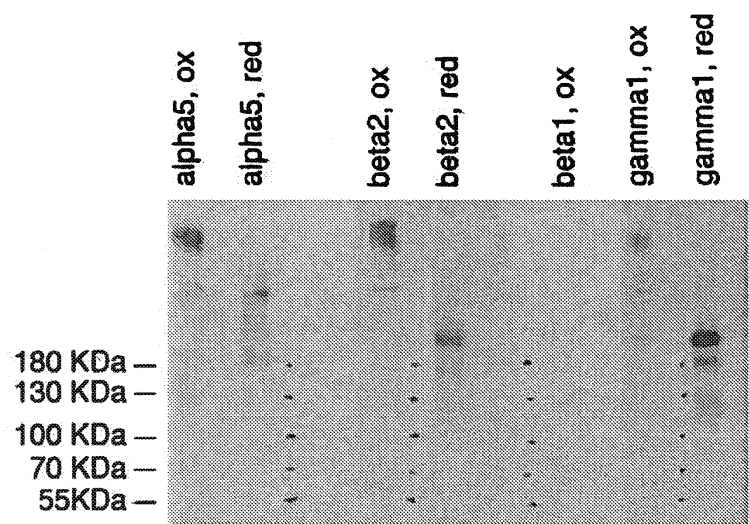
도면1



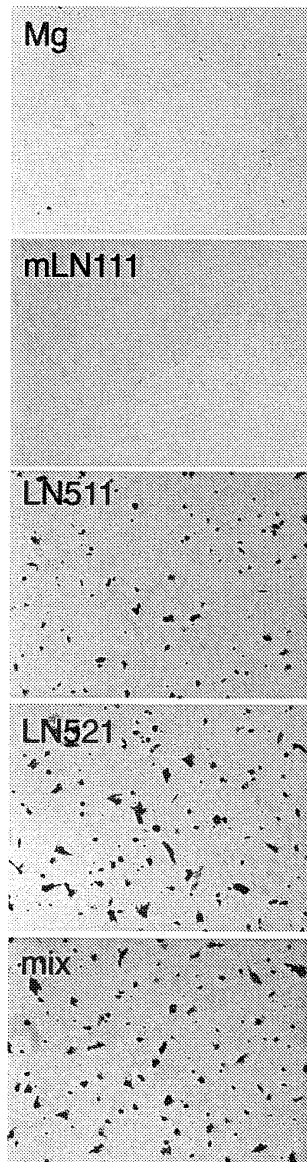
도면2



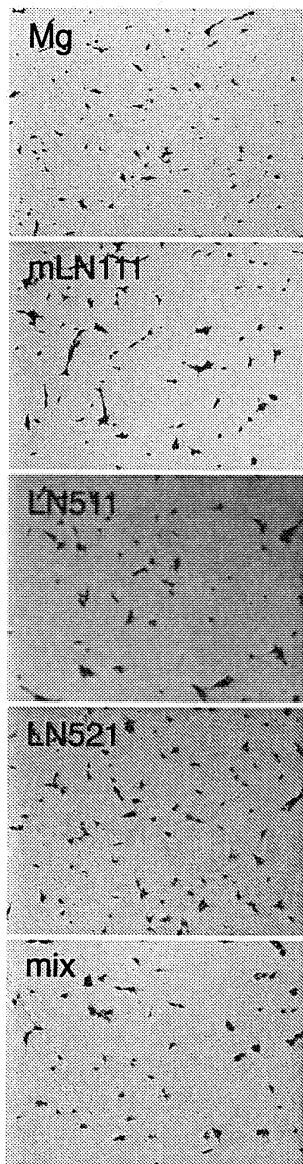
도면3



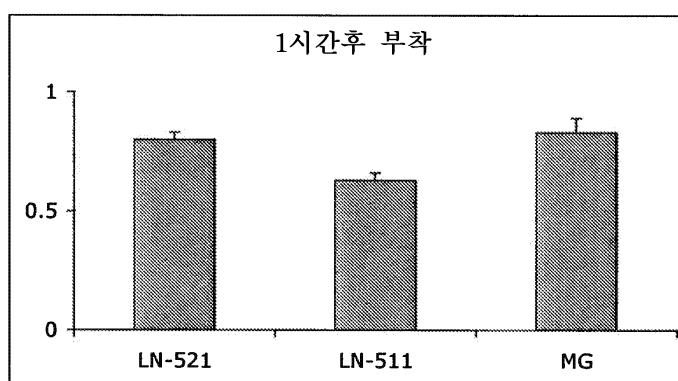
도면4



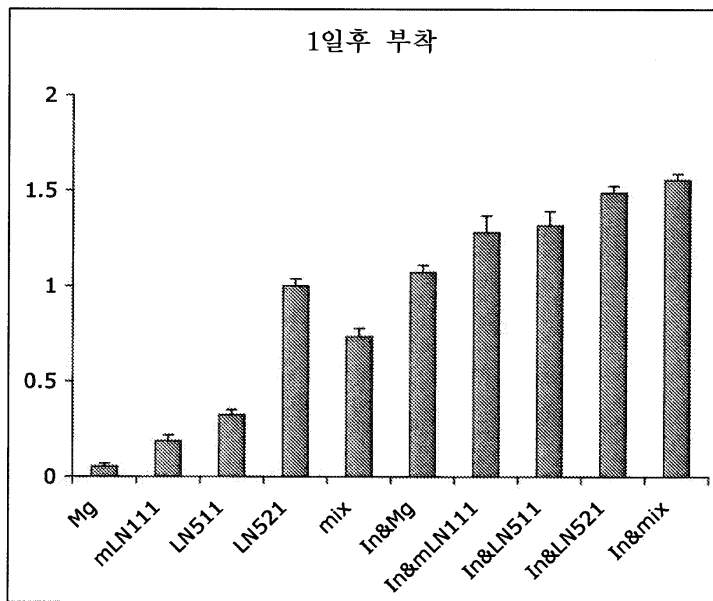
도면5



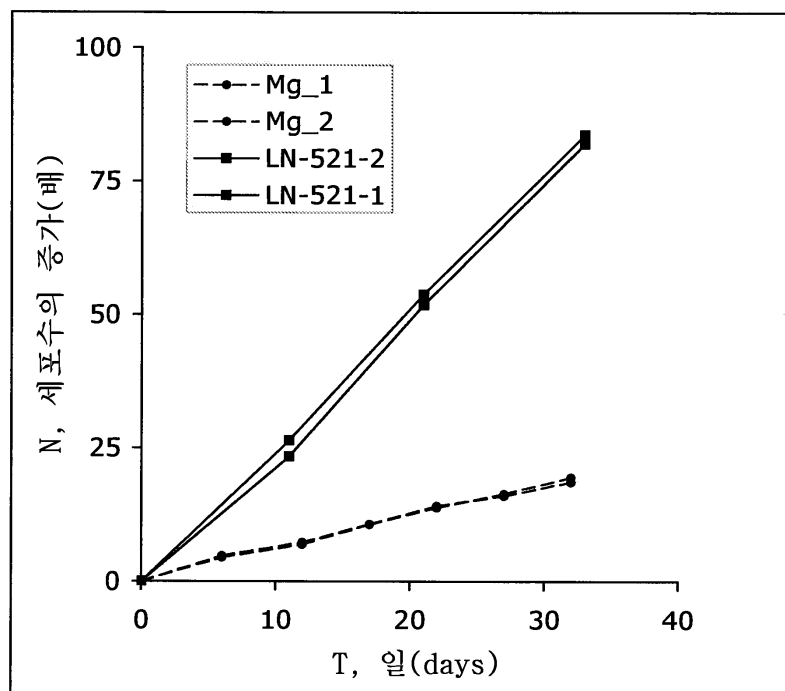
도면6



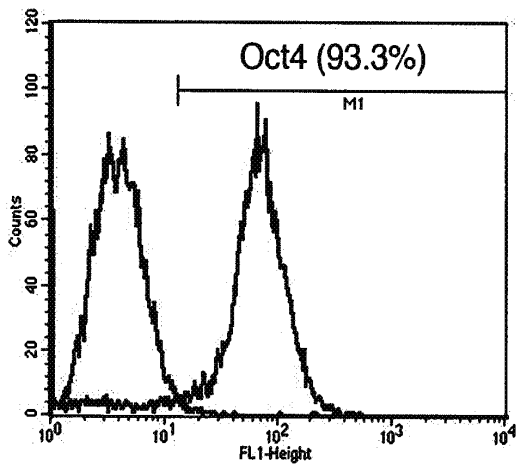
도면7



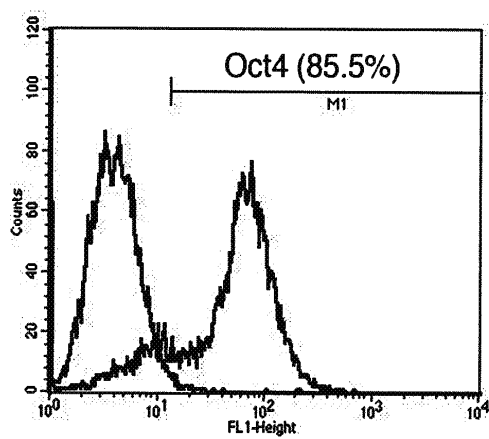
도면8



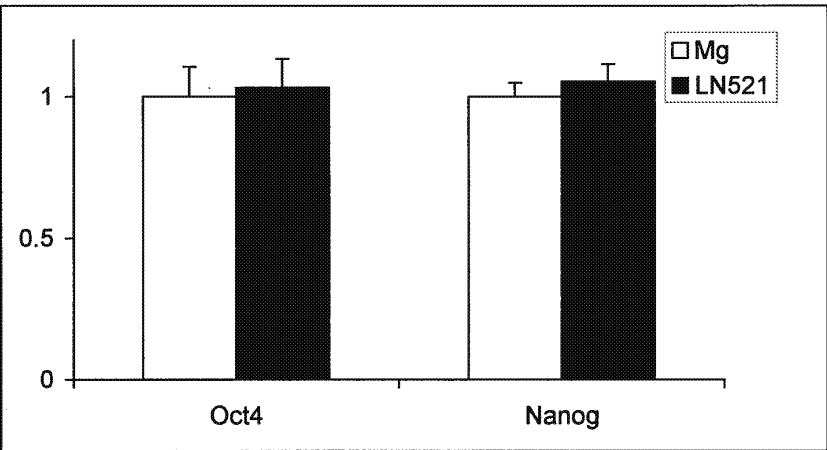
도면9



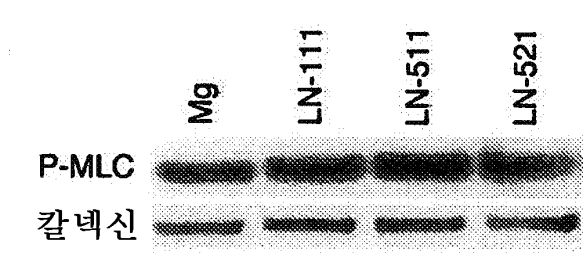
도면10



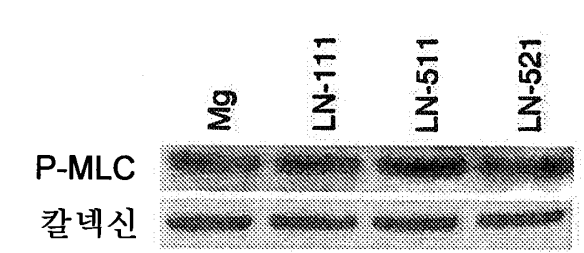
도면11



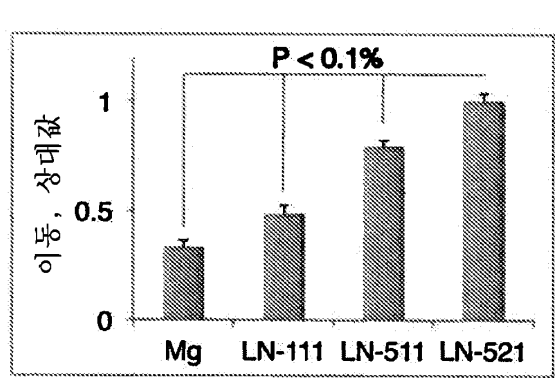
도면12



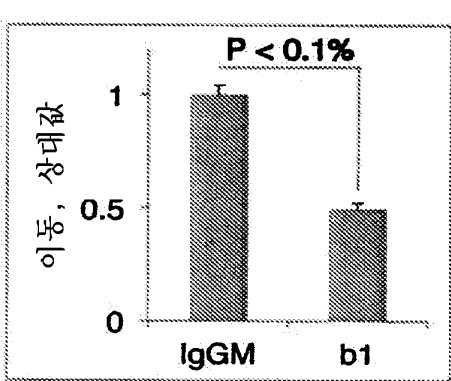
도면13



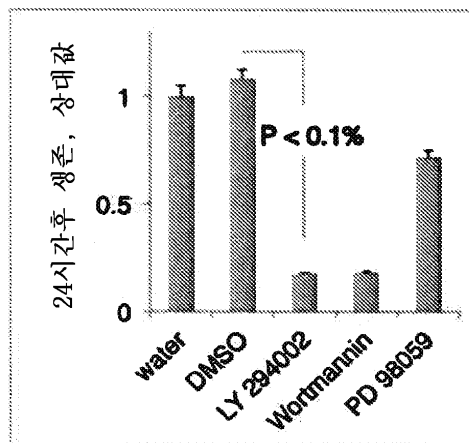
도면14



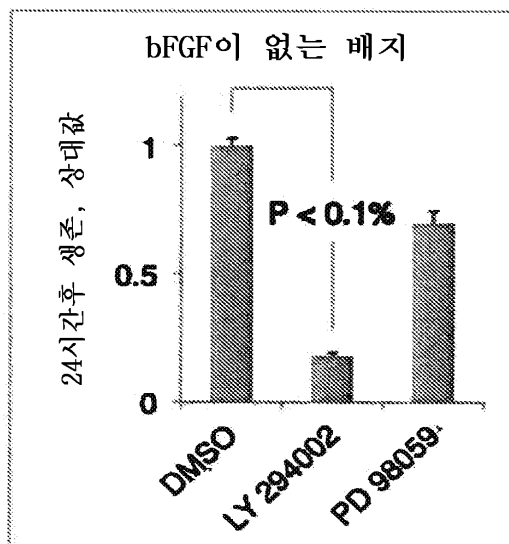
도면15



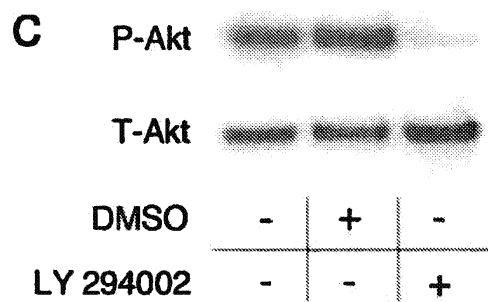
도면16



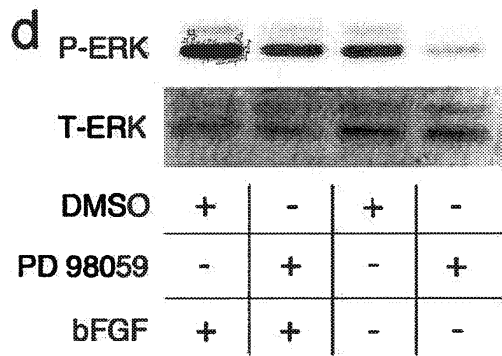
도면17



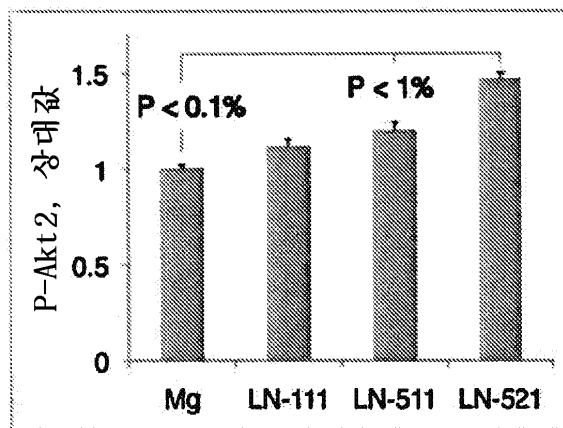
도면18



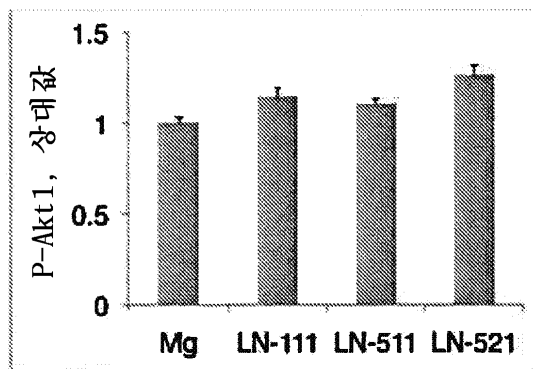
도면19



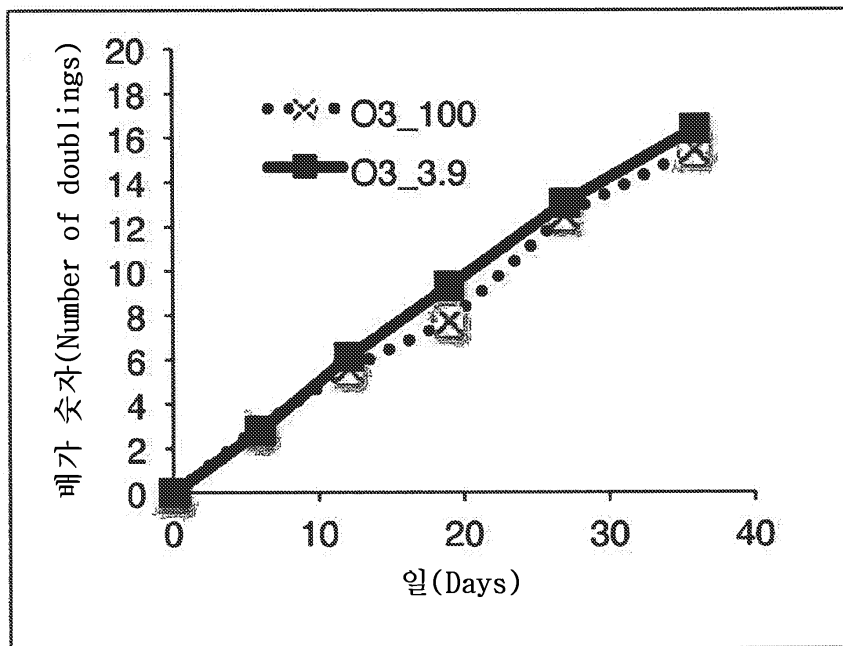
도면20



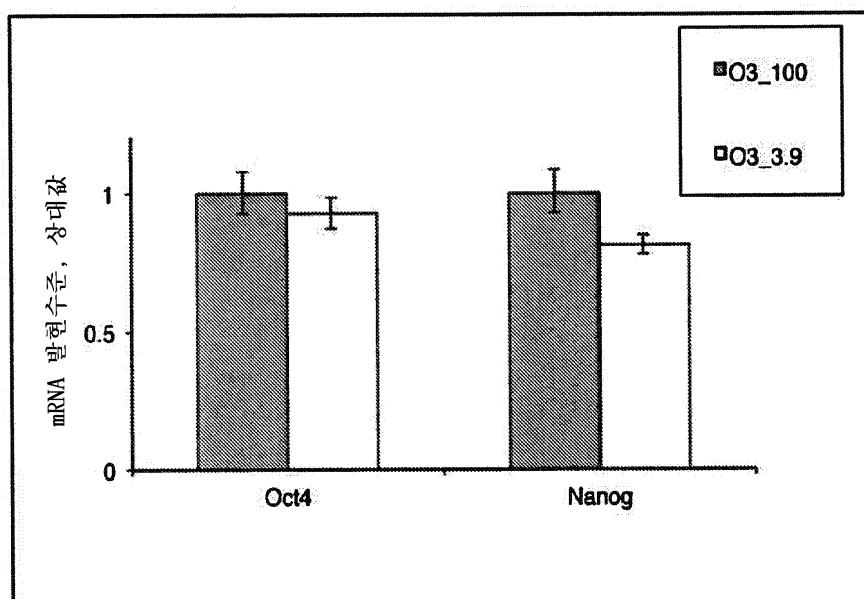
도면21



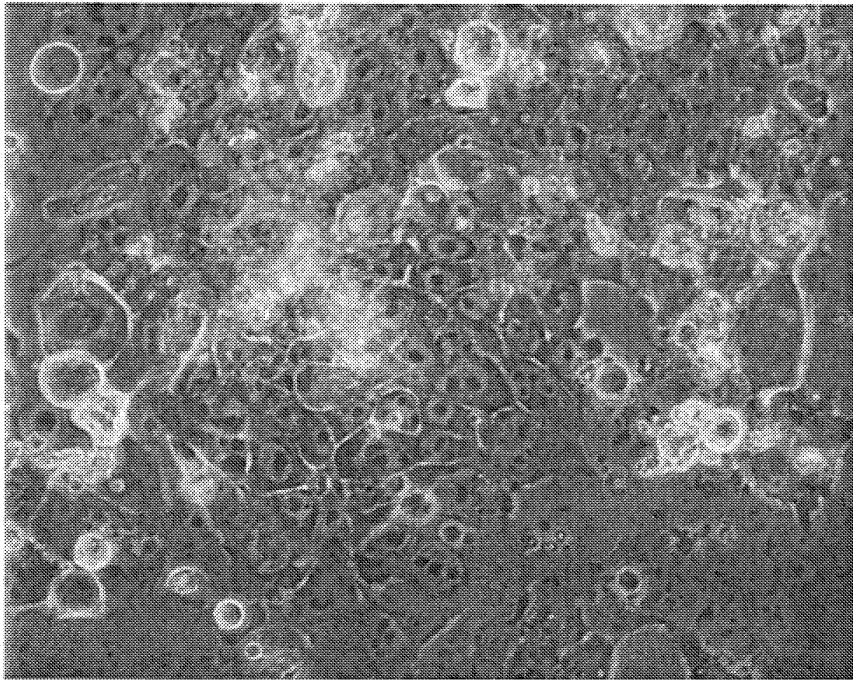
도면22



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Tryggvason, Karl

Sergey, Rodin

<120> Cell Culture Medium

<130> LCTI-200006W002

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3695

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Arg Gly Pro Ala Pro Leu Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala

20 25 30

Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Pro Pro

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

Tyr Ser Ile Lys Asp Ile Ser Ile Gly Gly Arg Cys Val Cys His Gly
 290 295 300
 His Ala Asp Ala Cys Asp Ala Lys Asp Pro Thr Asp Pro Phe Arg Leu
 305 310 315 320
 Gln Cys Thr Cys Gln His Asn Thr Cys Gly Gly Thr Cys Asp Arg Cys
 325 330 335
 Cys Pro Gly Phe Asn Gln Gln Pro Trp Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser
 340 345 350

 Ala Asn Glu Cys Gln Ser Cys Asn Cys Tyr Gly His Ala Thr Asp Cys
 355 360 365
 Tyr Tyr Asp Pro Glu Val Asp Arg Arg Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asp
 370 375 380
 Gly Thr Tyr Gln Gly Gly Gly Val Cys Ile Asp Cys Gln His His Thr
 385 390 395 400
 Thr Gly Val Asn Cys Glu Arg Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Ser Pro
 405 410 415

 Asn His Pro Leu Asp Ser Pro His Val Cys Arg Arg Cys Asn Cys Glu
 420 425 430
 Ser Asp Phe Thr Asp Gly Thr Cys Glu Asp Leu Thr Gly Arg Cys Tyr
 435 440 445
 Cys Arg Pro Asn Phe Ser Gly Glu Arg Cys Asp Val Cys Ala Glu Gly
 450 455 460
 Phe Thr Gly Phe Pro Ser Cys Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Ser Asn Asp
 465 470 475 480

 Thr Arg Glu Gln Val Leu Pro Ala Gly Gln Ile Val Asn Cys Asp Cys
 485 490 495
 Ser Ala Ala Gly Thr Gln Gly Asn Ala Cys Arg Lys Asp Pro Arg Val
 500 505 510
 Gly Arg Cys Leu Cys Lys Pro Asn Phe Gln Gly Thr His Cys Glu Leu
 515 520 525
 Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Gly Cys Gln Pro Cys Gln Cys Ser

530 535 540

 Ser Pro Gly Val Ala Asp Asp Arg Cys Asp Pro Asp Thr Gly Gln Cys
 545 550 555 560
 Arg Cys Arg Val Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Asp Arg Cys Ala Pro
 565 570 575
 Gly Tyr Phe His Phe Pro Leu Cys Gln Leu Cys Gly Cys Ser Pro Ala
 580 585 590
 Gly Thr Leu Pro Glu Gly Cys Asp Glu Ala Gly Arg Cys Leu Cys Gln
 595 600 605

 Pro Glu Phe Ala Gly Pro His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Tyr His
 610 615 620
 Gly Phe Pro Asn Cys Gln Ala Cys Thr Cys Asp Pro Arg Gly Ala Leu
 625 630 635 640
 Asp Gln Leu Cys Gly Ala Gly Gly Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Thr Ala Cys Gln Glu Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Phe Pro
 660 665 670

 Ser Cys Val Pro Cys His Cys Ser Ala Glu Gly Ser Leu His Ala Ala
 675 680 685
 Cys Asp Pro Arg Ser Gly Gln Cys Ser Cys Arg Pro Arg Val Thr Gly
 690 695 700
 Leu Arg Cys Asp Thr Cys Val Pro Gly Ala Tyr Asn Phe Pro Tyr Cys
 705 710 715 720
 Glu Ala Gly Ser Cys His Pro Ala Gly Leu Ala Pro Val Asp Pro Ala
 725 730 735

 Leu Pro Glu Ala Gln Val Pro Cys Met Cys Arg Ala His Val Glu Gly
 740 745 750
 Pro Ser Cys Asp Arg Cys Lys Pro Gly Phe Trp Gly Leu Ser Pro Ser
 755 760 765
 Asn Pro Glu Gly Cys Thr Arg Cys Ser Cys Asp Leu Arg Gly Thr Leu
 770 775 780

Gly Gly Val Ala Glu Cys Gln Pro Gly Thr Gly Gln Cys Phe Cys Lys
785 790 795 800

Pro His Val Cys Gly Gln Ala Cys Ala Ser Cys Lys Asp Gly Phe Phe
805 810 815

Gly Leu Asp Gln Ala Asp Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Cys Arg Cys Asp
820 825 830

Ile Gly Gly Ala Leu Gly Gln Ser Cys Glu Pro Arg Thr Gly Val Cys
835 840 845

Arg Cys Arg Pro Asn Thr Gln Gly Pro Thr Cys Ser Glu Pro Ala Arg
850 855 860

Asp His Tyr Leu Pro Asp Leu His His Leu Arg Leu Glu Leu Glu Glu
865 870 875 880

Ala Ala Thr Pro Glu Gly His Ala Val Arg Phe Gly Phe Asn Pro Leu
885 890 895

Glu Phe Glu Asn Phe Ser Trp Arg Gly Tyr Ala Gln Met Ala Pro Val
900 905 910

Gln Pro Arg Ile Val Ala Arg Leu Asn Leu Thr Ser Pro Asp Leu Phe
915 920 925

Trp Leu Val Phe Arg Tyr Val Asn Arg Gly Ala Met Ser Val Ser Gly
930 935 940

Arg Val Ser Val Arg Glu Glu Gly Arg Ser Ala Thr Cys Ala Asn Cys
945 950 955 960

Thr Ala Gln Ser Gln Pro Val Ala Phe Pro Pro Ser Thr Glu Pro Ala
965 970 975

Phe Ile Thr Val Pro Gln Arg Gly Phe Gly Glu Pro Phe Val Leu Asn
980 985 990

Pro Gly Thr Trp Ala Leu Arg Val Glu Ala Glu Gly Val Leu Leu Asp
995 1000 1005

Tyr Val Val Leu Leu Pro Ser Ala Tyr Tyr Glu Ala Ala Leu Leu
1010 1015 1020

Gln Leu Arg Val Thr Glu Ala Cys Thr Tyr Arg Pro Ser Ala Gln

1025	1030	1035
Gln Ser Gly Asp Asn Cys Leu	Leu Tyr Thr His Leu	Pro Leu Asp
1040	1045	1050
Gly Phe Pro Ser Ala Ala Gly	Leu Glu Ala Leu Cys	Arg Gln Asp
1055	1060	1065
Asn Ser Leu Pro Arg Pro Cys	Pro Thr Glu Gln Leu	Ser Pro Ser
1070	1075	1080
His Pro Pro Leu Ile Thr Cys	Thr Gly Ser Asp Val	Asp Val Gln
1085	1090	1095
Leu Gln Val Ala Val Pro Gln	Pro Gly Arg Tyr Ala	Leu Val Val
1100	1105	1110
Glu Tyr Ala Asn Glu Asp Ala	Arg Gln Glu Val Gly	Val Ala Val
1115	1120	1125
His Thr Pro Gln Arg Ala Pro	Gln Gln Gly Leu Leu	Ser Leu His
1130	1135	1140
Pro Cys Leu Tyr Ser Thr Leu	Cys Arg Gly Thr Ala	Arg Asp Thr
1145	1150	1155
Gln Asp His Leu Ala Val Phe	His Leu Asp Ser Glu	Ala Ser Val
1160	1165	1170
Arg Leu Thr Ala Glu Gln Ala	Arg Phe Phe Leu His	Gly Val Thr
1175	1180	1185
Leu Val Pro Ile Glu Glu Phe	Ser Pro Glu Phe Val	Glu Pro Arg
1190	1195	1200
Val Ser Cys Ile Ser Ser His	Gly Ala Phe Gly Pro	Asn Ser Ala
1205	1210	1215
Ala Cys Leu Pro Ser Arg Phe	Pro Lys Pro Pro Gln	Pro Ile Ile
1220	1225	1230
Leu Arg Asp Cys Gln Val Ile	Pro Leu Pro Pro Gly	Leu Pro Leu
1235	1240	1245
Thr His Ala Gln Asp Leu Thr	Pro Ala Met Ser Pro	Ala Gly Pro
1250	1255	1260

Arg Pro	Arg Pro Pro Thr	Ala Val Asp Pro Asp Ala	Glu Pro Thr
1265	1270	1275	
Leu Leu	Arg Glu Pro Gln Ala	Thr Val Val Phe Thr	Thr His Val
1280	1285	1290	
Pro Thr	Leu Gly Arg Tyr Ala	Phe Leu Leu His Gly	Tyr Gln Pro
1295	1300	1305	
Ala His	Pro Thr Phe Pro Val	Glu Val Leu Ile Asn	Ala Gly Arg
1310	1315	1320	
Val Trp	Gln Gly His Ala Asn	Ala Ser Phe Cys Pro	His Gly Tyr
1325	1330	1335	
Gly Cys	Arg Thr Leu Val Val	Cys Glu Gly Gln Ala	Leu Leu Asp
1340	1345	1350	
Val Thr	His Ser Glu Leu Thr	Val Thr Val Arg Val	Pro Lys Gly
1355	1360	1365	
Arg Trp	Leu Trp Leu Asp Tyr	Val Leu Val Val Pro	Glu Asn Val
1370	1375	1380	
Tyr Ser	Phe Gly Tyr Leu Arg	Glu Glu Pro Leu Asp	Lys Ser Tyr
1385	1390	1395	
Asp Phe	Ile Ser His Cys Ala	Ala Gln Gly Tyr His	Ile Ser Pro
1400	1405	1410	
Ser Ser	Ser Ser Leu Phe Cys	Arg Asn Ala Ala Ala	Ser Leu Ser
1415	1420	1425	
Leu Phe	Tyr Asn Asn Gly Ala	Arg Pro Cys Gly Cys	His Glu Val
1430	1435	1440	
Gly Ala	Thr Gly Pro Thr Cys	Glu Pro Phe Gly Gly	Gln Cys Pro
1445	1450	1455	
Cys His	Ala His Val Ile Gly	Arg Asp Cys Ser Arg	Cys Ala Thr
1460	1465	1470	
Gly Tyr	Trp Gly Phe Pro Asn	Cys Arg Pro Cys Asp	Cys Gly Ala
1475	1480	1485	
Arg Leu	Cys Asp Glu Leu Thr	Gly Gln Cys Ile Cys	Pro Pro Arg

1490	1495	1500
Thr Ile Pro Pro Asp Cys Leu	Leu Cys Gln Pro Gln	Thr Phe Gly
1505	1510	1515
Cys His Pro Leu Val Gly Cys	Glu Glu Cys Asn Cys	Ser Gly Pro
1520	1525	1530
Gly Ile Gln Glu Leu Thr Asp	Pro Thr Cys Asp Thr	Asp Ser Gly
1535	1540	1545
Gln Cys Lys Cys Arg Pro Asn	Val Thr Gly Arg Arg	Cys Asp Thr
1550	1555	1560
Cys Ser Pro Gly Phe His Gly	Tyr Pro Arg Cys Arg	Pro Cys Asp
1565	1570	1575
Cys His Glu Ala Gly Thr Ala	Pro Gly Val Cys Asp	Pro Leu Thr
1580	1585	1590
Gly Gln Cys Tyr Cys Lys Glu	Asn Val Gln Gly Pro	Lys Cys Asp
1595	1600	1605
Gln Cys Ser Leu Gly Thr Phe	Ser Leu Asp Ala Ala	Asn Pro Lys
1610	1615	1620
Gly Cys Thr Arg Cys Phe Cys	Phe Gly Ala Thr Glu	Arg Cys Arg
1625	1630	1635
Ser Ser Ser Tyr Thr Arg Gln	Glu Phe Val Asp Met	Glu Gly Trp
1640	1645	1650
Val Leu Leu Ser Thr Asp Arg	Gln Val Val Pro His	Glu Arg Gln
1655	1660	1665
Pro Gly Thr Glu Met Leu Arg	Ala Asp Leu Arg His	Val Pro Glu
1670	1675	1680
Ala Val Pro Glu Ala Phe Pro	Glu Leu Tyr Trp Gln	Ala Pro Pro
1685	1690	1695
Ser Tyr Leu Gly Asp Arg Val	Ser Ser Tyr Gly Gly	Thr Leu Arg
1700	1705	1710
Tyr Glu Leu His Ser Glu Thr	Gln Arg Gly Asp Val	Phe Val Pro
1715	1720	1725

Met Glu Ser Arg Pro Asp Val	Val Leu Gln Gly Asn Gln Met Ser
1730	1735 1740
Ile Thr Phe Leu Glu Pro Ala Tyr Pro Thr Pro Gly His Val His	
1745	1750 1755
Arg Gly Gln Leu Gln Leu Val Glu Gly Asn Phe Arg His Thr Glu	
1760	1765 1770
Thr Arg Asn Thr Val Ser Arg Glu Glu Leu Met Met Val Leu Ala	
1775	1780 1785
Ser Leu Glu Gln Leu Gln Ile Arg Ala Leu Phe Ser Gln Ile Ser	
1790	1795 1800
Ser Ala Val Phe Leu Arg Arg Val Ala Leu Glu Val Ala Ser Pro	
1805	1810 1815
Ala Gly Gln Gly Ala Leu Ala Ser Asn Val Glu Leu Cys Leu Cys	
1820	1825 1830
Pro Ala Ser Tyr Arg Gly Asp Ser Cys Gln Glu Cys Ala Pro Gly	
1835	1840 1845
Phe Tyr Arg Asp Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Arg Cys Val Pro	
1850	1855 1860
Cys Gln Cys His Gly His Ser Asp Arg Cys Leu Pro Gly Ser Gly	
1865	1870 1875
Val Cys Val Asp Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Ala His Cys Glu	
1880	1885 1890
Arg Cys Gln Ala Gly Phe Val Ser Ser Arg Asp Asp Pro Ser Ala	
1895	1900 1905
Pro Cys Val Ser Cys Pro Cys Pro Leu Ser Val Pro Ser Asn Asn	
1910	1915 1920
Phe Ala Glu Gly Cys Val Leu Arg Gly Gly Arg Thr Gln Cys Leu	
1925	1930 1935
Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Cys Glu Arg Cys Ala Pro	
1940	1945 1950
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Ser Cys Gln Pro	

1955	1960	1965
Cys Asp Cys Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Leu Leu Phe Ser Asp		
1970	1975	1980
Cys Asp Pro Leu Thr Gly Ala Cys Arg Gly Cys Leu Arg His Thr		
1985	1990	1995
Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Asn		
2000	2005	2010
Ala Leu Leu Pro Gly Asn Cys Thr Arg Cys Asp Cys Thr Pro Cys		
2015	2020	2025
Gly Thr Glu Ala Cys Asp Pro His Ser Gly His Cys Leu Cys Lys		
2030	2035	2040
Ala Gly Val Thr Gly Arg Arg Cys Asp Arg Cys Gln Glu Gly His		
2045	2050	2055
Phe Gly Phe Asp Gly Cys Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Gly		
2060	2065	2070
Pro Ala Ala Glu Gly Ser Glu Cys His Pro Gln Ser Gly Gln Cys		
2075	2080	2085
His Cys Arg Pro Gly Thr Met Gly Pro Gln Cys Arg Glu Cys Ala		
2090	2095	2100
Pro Gly Tyr Trp Gly Leu Pro Glu Gln Gly Cys Arg Arg Cys Gln		
2105	2110	2115
Cys Pro Gly Gly Arg Cys Asp Pro His Thr Gly Arg Cys Asn Cys		
2120	2125	2130
Pro Pro Gly Leu Ser Gly Glu Arg Cys Asp Thr Cys Ser Gln Gln		
2135	2140	2145
His Gln Val Pro Val Pro Gly Gly Pro Val Gly His Ser Ile His		
2150	2155	2160
Cys Glu Val Cys Asp His Cys Val Val Leu Leu Leu Asp Asp Leu		
2165	2170	2175
Glu Arg Ala Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile His Glu Gln Leu Arg		
2180	2185	2190

Gly Ile	Asn Ala Ser Ser Met	Ala Trp Ala Arg Leu	His Arg Leu
2195	2200	2205	
Asn Ala	Ser Ile Ala Asp Leu	Gln Ser Gln Leu Arg	Ser Pro Leu
2210	2215	2220	
Gly Pro	Arg His Glu Thr Ala	Gln Gln Leu Glu Val	Leu Glu Gln
2225	2230	2235	
Gln Ser	Thr Ser Leu Gly Gln	Asp Ala Arg Arg Leu	Gly Gly Gln
2240	2245	2250	
Ala Val	Gly Thr Arg Asp Gln	Ala Ser Gln Leu Leu	Ala Gly Thr
2255	2260	2265	
Glu Ala	Thr Leu Gly His Ala	Lys Thr Leu Leu Ala	Ala Ile Arg
2270	2275	2280	
Ala Val	Asp Arg Thr Leu Ser	Glu Leu Met Ser Gln	Thr Gly His
2285	2290	2295	
Leu Gly	Leu Ala Asn Ala Ser	Ala Pro Ser Gly Glu	Gln Leu Leu
2300	2305	2310	
Arg Thr	Leu Ala Glu Val Glu	Arg Leu Leu Trp Glu	Met Arg Ala
2315	2320	2325	
Arg Asp	Leu Gly Ala Pro Gln	Ala Ala Ala Glu Ala	Glu Leu Ala
2330	2335	2340	
Ala Ala	Gln Arg Leu Leu Ala	Arg Val Gln Glu Gln	Leu Ser Ser
2345	2350	2355	
Leu Trp	Glu Glu Asn Gln Ala	Leu Ala Thr Gln Thr	Arg Asp Arg
2360	2365	2370	
Leu Ala	Gln His Glu Ala Gly	Leu Met Asp Leu Arg	Glu Ala Leu
2375	2380	2385	
Asn Arg	Ala Val Asp Ala Thr	Arg Glu Ala Gln Glu	Leu Asn Ser
2390	2395	2400	
Arg Asn	Gln Glu Arg Leu Glu	Glu Ala Leu Gln Arg	Lys Gln Glu
2405	2410	2415	
Leu Ser	Arg Asp Asn Ala Thr	Leu Gln Ala Thr Leu	His Ala Ala

2420	2425	2430
Arg Asp Thr Leu Ala Ser Val Phe Arg Leu Leu His Ser Leu Asp		
2435	2440	2445
Gln Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser Leu Asp Gly		
2450	2455	2460
Ala Arg Thr Pro Leu Leu Gln Arg Met Gln Thr Phe Ser Pro Ala		
2465	2470	2475
Gly Ser Lys Leu Arg Leu Val Glu Ala Ala Glu Ala His Ala Gln		
2480	2485	2490
Gln Leu Gly Gln Leu Ala Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ile Leu Asp		
2495	2500	2505
Val Asn Gln Asp Arg Leu Thr Gln Arg Ala Ile Glu Ala Ser Asn		
2510	2515	2520
Ala Tyr Ser Arg Ile Leu Gln Ala Val Gln Ala Ala Glu Asp Ala		
2525	2530	2535
Ala Gly Gln Ala Leu Gln Gln Ala Asp His Thr Trp Ala Thr Val		
2540	2545	2550
Val Arg Gln Gly Leu Val Asp Arg Ala Gln Gln Leu Leu Ala Asn		
2555	2560	2565
Ser Thr Ala Leu Glu Glu Ala Met Leu Gln Glu Gln Gln Arg Leu		
2570	2575	2580
Gly Leu Val Trp Ala Ala Leu Gln Gly Ala Arg Thr Gln Leu Arg		
2585	2590	2595
Asp Val Arg Ala Lys Lys Asp Gln Leu Glu Ala His Ile Gln Ala		
2600	2605	2610
Ala Gln Ala Met Leu Ala Met Asp Thr Asp Glu Thr Ser Lys Lys		
2615	2620	2625
Ile Ala His Ala Lys Ala Val Ala Ala Glu Ala Gln Asp Thr Ala		
2630	2635	2640
Thr Arg Val Gln Ser Gln Leu Gln Ala Met Gln Glu Asn Val Glu		
2645	2650	2655

Arg Trp	Gln Gly Gln Tyr	Glu Gly Leu Arg Gly Gln	Asp Leu Gly
2660		2665	2670

Gln Ala	Val Leu Asp Ala Gly	His Ser Val Ser Thr	Leu Glu Lys
2675		2680	2685

Thr Leu	Pro Gln Leu Leu Ala	Lys Leu Ser Ile Leu	Glu Asn Arg
2690		2695	2700

Gly Val	His Asn Ala Ser Leu	Ala Leu Ser Ala Ser	Ile Gly Arg
2705		2710	2715

Val Arg	Glu Leu Ile Ala Gln	Ala Arg Gly Ala Ala	Ser Lys Val
2720		2725	2730

Lys Val	Pro Met Lys Phe Asn	Gly Arg Ser Gly Val	Gln Leu Arg
2735		2740	2745

Thr Pro	Arg Asp Leu Ala Asp	Leu Ala Ala Tyr Thr	Ala Leu Lys
2750		2755	2760

Phe Tyr	Leu Gln Gly Pro Glu	Pro Glu Pro Gly Gln	Gly Thr Glu
2765		2770	2775

Asp Arg	Phe Val Met Tyr Met	Gly Ser Arg Gln Ala	Thr Gly Asp
2780		2785	2790

Tyr Met	Gly Val Ser Leu Arg	Asp Lys Lys Val His	Trp Val Tyr
2795		2800	2805

Gln Leu	Gly Glu Ala Gly Pro	Ala Val Leu Ser Ile	Asp Glu Asp
2810		2815	2820

Ile Gly	Glu Gln Phe Ala Ala	Val Ser Leu Asp Arg	Thr Leu Gln
2825		2830	2835

Phe Gly	His Met Ser Val Thr	Val Glu Arg Gln Met	Ile Gln Glu
2840		2845	2850

Thr Lys	Gly Asp Thr Val Ala	Pro Gly Ala Glu Gly	Leu Leu Asn
2855		2860	2865

Leu Arg	Pro Asp Asp Phe Val	Phe Tyr Val Gly Gly	Tyr Pro Ser
2870		2875	2880

Thr Phe	Thr Pro Pro Pro Leu	Leu Arg Phe Pro Gly	Tyr Arg Gly
---------	---------------------	---------------------	-------------

2885	2890	2895
Cys Ile Glu Met Asp Thr	Leu Asn Glu Glu Val Val	Ser Leu Tyr
2900	2905	2910
Asn Phe Glu Arg Thr Phe Gln	Leu Asp Thr Ala Val	Asp Arg Pro
2915	2920	2925
Cys Ala Arg Ser Lys Ser Thr	Gly Asp Pro Trp Leu	Thr Asp Gly
2930	2935	2940
Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Gly	Phe Ala Arg Ile Ser	Phe Asp Ser
2945	2950	2955
Gln Ile Ser Thr Thr Lys Arg	Phe Glu Gln Glu Leu	Arg Leu Val
2960	2965	2970
Ser Tyr Ser Gly Val Leu Phe	Phe Leu Lys Gln Gln	Ser Gln Phe
2975	2980	2985
Leu Cys Leu Ala Val Gln Glu	Gly Ser Leu Val Leu	Leu Tyr Asp
2990	2995	3000
Phe Gly Ala Gly Leu Lys Lys	Ala Val Pro Leu Gln	Pro Pro Pro
3005	3010	3015
Pro Leu Thr Ser Ala Ser Lys	Ala Ile Gln Val Phe	Leu Leu Gly
3020	3025	3030
Gly Ser Arg Lys Arg Val Leu	Val Arg Val Glu Arg	Ala Thr Val
3035	3040	3045
Tyr Ser Val Glu Gln Asp Asn	Asp Leu Glu Leu Ala	Asp Ala Tyr
3050	3055	3060
Tyr Leu Gly Gly Val Pro Pro	Asp Gln Leu Pro Pro	Ser Leu Arg
3065	3070	3075
Arg Leu Phe Pro Thr Gly Gly	Ser Val Arg Gly Cys	Val Lys Gly
3080	3085	3090
Ile Lys Ala Leu Gly Lys Tyr	Val Asp Leu Lys Arg	Leu Asn Thr
3095	3100	3105
Thr Gly Val Ser Ala Gly Cys	Thr Ala Asp Leu Leu	Val Gly Arg
3110	3115	3120

Ala Met	Thr Phe His Gly His	Gly Phe Leu Arg Leu	Ala Leu Ser
3125	3130	3135	
Asn Val	Ala Pro Leu Thr Gly	Asn Val Tyr Ser Gly	Phe Gly Phe
3140	3145	3150	
His Ser	Ala Gln Asp Ser Ala	Leu Leu Tyr Tyr Arg	Ala Ser Pro
3155	3160	3165	
Asp Gly	Leu Cys Gln Val Ser	Leu Gln Gln Gly Arg	Val Ser Leu
3170	3175	3180	
Gln Leu	Leu Arg Thr Glu Val	Lys Thr Gln Ala Gly	Phe Ala Asp
3185	3190	3195	
Gly Ala	Pro His Tyr Val Ala	Phe Tyr Ser Asn Ala	Thr Gly Val
3200	3205	3210	
Trp Leu	Tyr Val Asp Asp Gln	Leu Gln Gln Met Lys	Pro His Arg
3215	3220	3225	
Gly Pro	Pro Pro Glu Leu Gln	Pro Gln Pro Glu Gly	Pro Pro Arg
3230	3235	3240	
Leu Leu	Leu Gly Gly Leu Pro	Glu Ser Gly Thr Ile	Tyr Asn Phe
3245	3250	3255	
Ser Gly	Cys Ile Ser Asn Val	Phe Val Gln Arg Leu	Leu Gly Pro
3260	3265	3270	
Gln Arg	Val Phe Asp Leu Gln	Gln Asn Leu Gly Ser	Val Asn Val
3275	3280	3285	
Ser Thr	Gly Cys Ala Pro Ala	Leu Gln Ala Gln Thr	Pro Gly Leu
3290	3295	3300	
Gly Pro	Arg Gly Leu Gln Ala	Thr Ala Arg Lys Ala	Ser Arg Arg
3305	3310	3315	
Ser Arg	Gln Pro Ala Arg His	Pro Ala Cys Met Leu	Pro Pro His
3320	3325	3330	
Leu Arg	Thr Thr Arg Asp Ser	Tyr Gln Phe Gly Gly	Ser Leu Ser
3335	3340	3345	
Ser His	Leu Glu Phe Val Gly	Ile Leu Ala Arg His	Arg Asn Trp

3350	3355	3360
Pro Ser Leu Ser Met His Val	Leu Pro Arg Ser Ser	Arg Gly Leu
3365	3370	3375
Leu Leu Phe Thr Ala Arg Leu	Arg Pro Gly Ser Pro	Ser Leu Ala
3380	3385	3390
Leu Phe Leu Ser Asn Gly His	Phe Val Ala Gln Met	Glu Gly Leu
3395	3400	3405
Gly Thr Arg Leu Arg Ala Gln	Ser Arg Gln Arg Ser	Arg Pro Gly
3410	3415	3420
Arg Trp His Lys Val Ser Val	Arg Trp Glu Lys Asn	Arg Ile Leu
3425	3430	3435
Leu Val Thr Asp Gly Ala Arg	Ala Trp Ser Gln Glu	Gly Pro His
3440	3445	3450
Arg Gln His Gln Gly Ala Glu	His Pro Gln Pro His	Thr Leu Phe
3455	3460	3465
Val Gly Gly Leu Pro Ala Ser	Ser His Ser Ser Lys	Leu Pro Val
3470	3475	3480
Thr Val Gly Phe Ser Gly Cys	Val Lys Arg Leu Arg	Leu His Gly
3485	3490	3495
Arg Pro Leu Gly Ala Pro Thr	Arg Met Ala Gly Val	Thr Pro Cys
3500	3505	3510
Ile Leu Gly Pro Leu Glu Ala	Gly Leu Phe Phe Pro	Gly Ser Gly
3515	3520	3525
Gly Val Ile Thr Leu Asp Leu	Pro Gly Ala Thr Leu	Pro Asp Val
3530	3535	3540
Gly Leu Glu Leu Glu Val Arg	Pro Leu Ala Val Thr	Gly Leu Ile
3545	3550	3555
Phe His Leu Gly Gln Ala Arg	Thr Pro Pro Tyr Leu	Gln Leu Gln
3560	3565	3570
Val Thr Glu Lys Gln Val Leu	Leu Arg Ala Asp Asp	Gly Ala Gly
3575	3580	3585

Glu Phe Ser Thr Ser Val Thr Arg Pro Ser Val Leu Cys Asp Gly
 3590 3595 3600
 Gln Trp His Arg Leu Ala Val Met Lys Ser Gly Asn Val Leu Arg
 3605 3610 3615
 Leu Glu Val Asp Ala Gln Ser Asn His Thr Val Gly Pro Leu Leu
 3620 3625 3630

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
 3635 3640 3645
 Pro Glu Pro Met Ala Val Gln Pro Trp Pro Pro Ala Tyr Cys Gly
 3650 3655 3660
 Cys Met Arg Arg Leu Ala Val Asn Arg Ser Pro Val Ala Met Thr
 3665 3670 3675
 Arg Ser Val Glu Val His Gly Ala Val Gly Ala Ser Gly Cys Pro
 3680 3685 3690

Ala Ala

3695

<210> 2

<211> 1811

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Leu Thr Ser Arg Glu Arg Gly Arg Gly Gln Pro Leu Pro Trp
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala
 20 25 30
 Gln Ala Pro Ala Pro Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr
 35 40 45
 Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg Leu Thr Ala
 50 55 60
 Ser Ser Thr Cys Gly Leu Asn Gly Pro Gln Pro Tyr Cys Ile Val Ser
 65 70 75 80
 His Leu Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser Arg Arg Pro

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

Glu Asp Gly His Ser His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys His Gly His
 340 345 350
 Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn
 355 360 365
 Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg
 370 375 380
 His Cys Glu Leu Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp
 385 390 395 400
 Leu Arg Asp Pro Ala Val Cys Arg Ser Cys Asp Cys Asp Pro Met Gly
 405 410 415
 Ser Gln Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro Ala Leu Gly
 420 425 430
 Leu Val Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg
 435 440 445
 Cys Gln Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ile Ser Asp Arg
 450 455 460
 Leu Gly Cys Arg Arg Cys Gln Cys Asn Ala Arg Gly Thr Val Pro Gly
 465 470 475 480
 Ser Thr Pro Cys Asp Pro Asn Ser Gly Ser Cys Tyr Cys Lys Arg Leu
 485 490 495
 Val Thr Gly Arg Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Leu
 500 505 510
 Ser His Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly
 515 520 525
 Ala Leu Asp Pro Gln Cys Asp Glu Gly Thr Gly Gln Cys His Cys Arg
 530 535 540
 Gln His Met Val Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro Gly Tyr Phe
 545 550 555 560
 Arg Pro Phe Leu Asp His Leu Ile Trp Glu Ala Glu Asp Thr Arg Gly
 565 570 575
 Gln Val Leu Asp Val Val Glu Arg Leu Val Thr Pro Gly Glu Thr Pro

580 585 590
 Ser Trp Thr Gly Ser Gly Phe Val Arg Leu Gln Glu Gly Gln Thr Leu
 595 600 605
 Glu Phe Leu Val Ala Ser Val Pro Lys Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu
 610 615 620
 Leu Arg Leu Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu

 625 630 635 640
 Ile Val Gln Arg Pro Gly Pro Val Pro Ala His Ser Leu Cys Gly His
 645 650 655
 Leu Val Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Thr Leu Gln Pro His Ala
 660 665 670
 Arg Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser
 675 680 685
 Tyr Lys Leu His Leu Lys Leu Val Arg Thr Gly Gly Ser Ala Gln Pro

 690 695 700
 Glu Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu
 705 710 715 720
 Leu Pro Arg Val Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala
 725 730 735
 Ala Leu Glu Arg Gln Ala Thr Phe Glu Arg Tyr Gln Cys His Glu Glu
 740 745 750
 Gly Leu Val Pro Ser Lys Thr Ser Pro Ser Glu Ala Cys Ala Pro Leu

 755 760 765
 Leu Ile Ser Leu Ser Thr Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln
 770 775 780
 Cys Asn Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Asn Pro His Gly Gly
 785 790 795 800
 Gln Cys Leu Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Leu Cys
 805 810 815
 Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Thr Gly Cys Gln Ala Cys Gln

 820 825 830

Cys Ser His Glu Gly Ala Leu Ser Ser Leu Cys Glu Lys Thr Ser Gly
 835 840 845
 Gln Cys Leu Cys Arg Thr Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp Arg Cys
 850 855 860
 Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Ser Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn
 865 870 875 880
 Gly His Ala Asp Glu Cys Asn Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys
 885 890 895
 Arg Asp His Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe
 900 905 910
 His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro
 915 920 925
 Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His
 930 935 940
 Gln Asp Glu Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys His Cys Arg Ala Gly Tyr
 945 950 955 960
 Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro
 965 970 975
 Ser Arg Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile
 980 985 990
 Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu
 995 1000 1005
 Arg Cys Leu His His Thr Glu Gly Pro His Cys Ala His Cys Lys
 1010 1015 1020
 Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys
 1025 1030 1035
 Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asn Pro Gln Gln Cys Pro Ser Pro
 1040 1045 1050
 Asp Gln Cys His Cys Asp Pro Ser Ser Gly Gln Cys Pro Cys Leu
 1055 1060 1065
 Pro Asn Val Gln Gly Pro Ser Cys Asp Arg Cys Ala Pro Asn Phe

1070	1075	1080
Trp Asn Leu Thr Ser Gly His	Gly Cys Gln Pro Cys	Ala Cys His
1085	1090	1095
Pro Ser Arg Ala Arg Gly Pro	Thr Cys Asn Glu Phe	Thr Gly Gln
1100	1105	1110
Cys His Cys Arg Ala Gly Phe	Gly Gly Arg Thr Cys	Ser Glu Cys
1115	1120	1125
Gln Glu Leu His Trp Gly Asp	Pro Gly Leu Gln Cys	His Ala Cys

1130	1135	1140
Asp Cys Asp Ser Arg Gly Ile	Asp Thr Pro Gln Cys	His Arg Phe
1145	1150	1155
Thr Gly His Cys Ser Cys Arg	Pro Gly Val Ser Gly	Val Arg Cys
1160	1165	1170
Asp Gln Cys Ala Arg Gly Phe	Ser Gly Ile Phe Pro	Ala Cys His
1175	1180	1185
Pro Cys His Ala Cys Phe Gly	Asp Trp Asp Arg Val	Val Gln Asp

1190	1195	1200
Leu Ala Ala Arg Thr Gln Arg	Leu Glu Gln Arg Ala	Gln Glu Leu
1205	1210	1215
Gln Gln Thr Gly Val Leu Gly	Ala Phe Glu Ser Ser	Phe Trp His
1220	1225	1230
Met Gln Glu Lys Leu Gly Ile	Val Gln Gly Ile Val	Gly Ala Arg
1235	1240	1245
Asn Thr Ser Ala Ala Ser Thr	Ala Gln Leu Val Glu	Ala Thr Glu

1250	1255	1260
Glu Leu Arg Arg Glu Ile Gly	Glu Ala Thr Glu His	Leu Thr Gln
1265	1270	1275
Leu Glu Ala Asp Leu Thr Asp	Val Gln Asp Glu Asn	Phe Asn Ala
1280	1285	1290
Asn His Ala Leu Ser Gly Leu	Glu Arg Asp Arg Leu	Ala Leu Asn
1295	1300	1305

Leu Thr Leu Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Asp Leu Leu Lys His

1310 1315 1320

Ser Asn Phe Leu Gly Ala Tyr Asp Ser Ile Arg His Ala His Ser

1325 1330 1335

Gln Ser Ala Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Thr Ser Ala Leu Ala

1340 1345 1350

Val Pro Ser Pro Val Ser Asn Ser Ala Ser Ala Arg His Arg Thr

1355 1360 1365

Glu Ala Leu Met Asp Ala Gln Lys Glu Asp Phe Asn Ser Lys His

1370 1375 1380

Met Ala Asn Gln Arg Ala Leu Gly Lys Leu Ser Ala His Thr His

1385 1390 1395

Thr Leu Ser Leu Thr Asp Ile Asn Glu Leu Val Cys Gly Ala Pro

1400 1405 1410

Gly Asp Ala Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly Gly Ala Gly Cys

1415 1420 1425

Arg Asp Glu Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly Leu Ser Cys Asn

1430 1435 1440

Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly Arg Ala Arg His

1445 1450 1455

Thr Gln Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ala Glu Gly Gly Ser Ile

1460 1465 1470

Leu Ser Arg Val Ala Glu Thr Arg Arg Gln Ala Ser Glu Ala Gln

1475 1480 1485

Gln Arg Ala Gln Ala Ala Leu Asp Lys Ala Asn Ala Ser Arg Gly

1490 1495 1500

Gln Val Glu Gln Ala Asn Gln Glu Leu Gln Glu Leu Ile Gln Ser

1505 1510 1515

Val Lys Asp Phe Leu Asn Gln Glu Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ile

1520 1525 1530

Glu Met Val Ala Thr Arg Val Leu Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ser

1535 1540 1545
Ala Glu Gln Ile Gln His Leu Ala Gly Ala Ile Ala Glu Arg Val

1550 1555 1560
Arg Ser Leu Ala Asp Val Asp Ala Ile Leu Ala Arg Thr Val Gly

1565 1570 1575
Asp Val Arg Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Arg Ala

1580 1585 1590
Arg Ser Trp Ala Glu Asp Glu Lys Gln Lys Ala Glu Thr Val Gln

1595 1600 1605
Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ile Ala Gln Gly

1610 1615 1620
Ala Ile Arg Gly Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Thr Glu Gln Thr

1625 1630 1635
Leu Tyr Gln Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Arg Ala Leu

1640 1645 1650
Ser Ser Ala Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu Glu

1655 1660 1665
Ala Leu Lys Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser Thr

1670 1675 1680
Ala Glu Glu Thr Ala Gly Ser Ala Gln Gly Arg Ala Gln Glu Ala

1685 1690 1695
Glu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Leu Gly Asp Gln Tyr Gln Thr Val

1700 1705 1710
Lys Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Gly Val Leu Ala Ala Gln

1715 1720 1725
Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu Gln

1730 1735 1740
Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr

1745 1750 1755
Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Ser Lys Ala Ala Gln Leu

1760 1765 1770

Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn
 1775 1780 1785
 Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln Lys Ser Ser Trp Pro
 1790 1795 1800
 Gly Arg Ala Pro Asn Lys Pro Val
 1805 1810
 <210> 3
 <211> 1609
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Arg Gly Ser His Arg Ala Ala Pro Ala Leu Arg Pro Arg Gly Arg
 1 5 10 15
 Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys
 20 25 30
 Ala Gln Ala Ala Met Asp Glu Cys Thr Asp Glu Gly Gly Arg Pro Gln
 35 40 45
 Arg Cys Met Pro Glu Phe Val Asn Ala Ala Phe Asn Val Thr Val Val
 50 55 60
 Ala Thr Asn Thr Cys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Tyr Cys Val Gln Thr
 65 70 75 80
 Gly Val Thr Gly Val Thr Lys Ser Cys His Leu Cys Asp Ala Gly Gln
 85 90 95
 Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Tyr Asn Asn Gln
 100 105 110
 Ala Asp Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln
 115 120 125
 Tyr Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp
 130 135 140
 Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Arg Thr Arg Glu Asp Gly Pro Trp Ile Pro Tyr Gln

165 170 175
Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Glu Asn Thr Tyr Ser Lys Ala Asn Arg Gly

180 185 190
Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Glu Gln Gln Ala Leu Cys Thr Asp Glu

195 200 205
Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr

210 215 220
Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ala Tyr Asn Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu

225 230 235 240
Gln Glu Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Thr Leu Asn Arg Leu

245 250 255
Asn Thr Phe Gly Asp Glu Val Phe Asn Asp Pro Lys Val Leu Lys Ser

260 265 270
Tyr Tyr Tyr Ala Ile Ser Asp Phe Ala Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys

275 280 285
Asn Gly His Ala Ser Glu Cys Met Lys Asn Glu Phe Asp Lys Leu Val

290 295 300
Cys Asn Cys Lys His Asn Thr Tyr Gly Val Asp Cys Glu Lys Cys Leu

305 310 315 320
Pro Phe Phe Asn Asp Arg Pro Trp Arg Arg Ala Thr Ala Glu Ser Ala

325 330 335
Ser Glu Cys Leu Pro Cys Asp Cys Asn Gly Arg Ser Gln Glu Cys Tyr

340 345 350
Phe Asp Pro Glu Leu Tyr Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Thr

355 360 365
Asn Cys Gln Asp Asn Thr Asp Gly Ala His Cys Glu Arg Cys Arg Glu

370 375 380
Asn Phe Phe Arg Leu Gly Asn Asn Glu Ala Cys Ser Ser Cys His Cys

385 390 395 400
Ser Pro Val Gly Ser Leu Ser Thr Gln Cys Asp Ser Tyr Gly Arg Cys

405 410 415
Ser Cys Lys Pro Gly Val Met Gly Asp Lys Cys Asp Arg Cys Gln Pro

420 425 430
Gly Phe His Ser Leu Thr Glu Ala Gly Cys Arg Pro Cys Ser Cys Asp

435 440 445
Pro Ser Gly Ser Ile Asp Glu Cys Asn Ile Glu Thr Gly Arg Cys Val

450 455 460
Cys Lys Asp Asn Val Glu Gly Phe Asn Cys Glu Arg Cys Lys Pro Gly

465 470 475 480
Phe Phe Asn Leu Glu Ser Ser Asn Pro Arg Gly Cys Thr Pro Cys Phe

485 490 495
Cys Phe Gly His Ser Ser Val Cys Thr Asn Ala Val Gly Tyr Ser Val

500 505 510
Tyr Ser Ile Ser Ser Thr Phe Gln Ile Asp Glu Asp Gly Trp Arg Ala

515 520 525
Glu Gln Arg Asp Gly Ser Glu Ala Ser Leu Glu Trp Ser Ser Glu Arg

530 535 540
Gln Asp Ile Ala Val Ile Ser Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Tyr Phe Ile

545 550 555 560
Ala Pro Ala Lys Phe Leu Gly Lys Gln Val Leu Ser Tyr Gly Gln Asn

565 570 575
Leu Ser Phe Ser Phe Arg Val Asp Arg Arg Asp Thr Arg Leu Ser Ala

580 585 590
Glu Asp Leu Val Leu Glu Gly Ala Gly Leu Arg Val Ser Val Pro Leu

595 600 605
Ile Ala Gln Gly Asn Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Thr Val Lys Tyr Val

610 615 620
Phe Arg Leu His Glu Ala Thr Asp Tyr Pro Trp Arg Pro Ala Leu Thr

625 630 635 640
Pro Phe Glu Phe Gln Lys Leu Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Lys Ile

645 650 655

Arg Gly Thr Tyr Ser Glu Arg Ser Ala Gly Tyr Leu Asp Asp Val Thr
660 665 670

Leu Ala Ser Ala Arg Pro Gly Pro Gly Val Pro Ala Thr Trp Val Glu
675 680 685

Ser Cys Thr Cys Pro Val Gly Tyr Gly Gly Gln Phe Cys Glu Met Cys
690 695 700

Leu Ser Gly Tyr Arg Arg Glu Thr Pro Asn Leu Gly Pro Tyr Ser Pro
705 710 715 720

Cys Val Leu Cys Ala Cys Asn Gly His Ser Glu Thr Cys Asp Pro Glu
725 730 735

Thr Gly Val Cys Asn Cys Arg Asp Asn Thr Ala Gly Pro His Cys Glu
740 745 750

Lys Cys Ser Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Thr Ala Gly Thr Ser Ser
755 760 765

Asp Cys Gln Pro Cys Pro Cys Pro Gly Gly Ser Ser Cys Ala Val Val
770 775 780

Pro Lys Thr Lys Glu Val Val Cys Thr Asn Cys Pro Thr Gly Thr Thr
785 790 795 800

Gly Lys Arg Cys Glu Leu Cys Asp Asp Gly Tyr Phe Gly Asp Pro Leu
805 810 815

Gly Arg Asn Gly Pro Val Arg Leu Cys Arg Leu Cys Gln Cys Ser Asp
820 825 830

Asn Ile Asp Pro Asn Ala Val Gly Asn Cys Asn Arg Leu Thr Gly Glu
835 840 845

Cys Leu Lys Cys Ile Tyr Asn Thr Ala Gly Phe Tyr Cys Asp Arg Cys
850 855 860

Lys Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ala Asp Lys
865 870 875 880

Cys Lys Ala Cys Asn Cys Asn Leu Tyr Gly Thr Met Lys Gln Gln Ser
885 890 895

Ser Cys Asn Pro Val Thr Gly Gln Cys Glu Cys Leu Pro His Val Thr

900	905	910	
Gly Gln Asp Cys Gly Ala Cys Asp Pro Gly Phe Tyr Asn Leu Gln Ser			
915	920	925	
Gly Gln Gly Cys Glu Arg Cys Asp Cys His Ala Leu Gly Ser Thr Asn			
930	935	940	
Gly Gln Cys Asp Ile Arg Thr Gly Gln Cys Glu Cys Gln Pro Gly Ile			
945	950	955	960
Thr Gly Gln His Cys Glu Arg Cys Glu Val Asn His Phe Gly Phe Gly			
965	970	975	
Pro Glu Gly Cys Lys Pro Cys Asp Cys His Pro Glu Gly Ser Leu Ser			
980	985	990	
Leu Gln Cys Lys Asp Asp Gly Arg Cys Glu Cys Arg Glu Gly Phe Val			
995	1000	1005	
Gly Asn Arg Cys Asp Gln Cys Glu Glu Asn Tyr Phe Tyr Asn Arg			
1010	1015	1020	
Ser Trp Pro Gly Cys Gln Glu Cys Pro Ala Cys Tyr Arg Leu Val			
1025	1030	1035	
Lys Asp Lys Val Ala Asp His Arg Val Lys Leu Gln Glu Leu Glu			
1040	1045	1050	
Ser Leu Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Asp Glu Met Val Thr Asp			
1055	1060	1065	
Gln Ala Phe Glu Asp Arg Leu Lys Glu Ala Glu Arg Glu Val Met			
1070	1075	1080	
Asp Leu Leu Arg Glu Ala Gln Asp Val Lys Asp Val Asp Gln Asn			
1085	1090	1095	
Leu Met Asp Arg Leu Gln Arg Val Asn Asn Thr Leu Ser Ser Gln			
1100	1105	1110	
Ile Ser Arg Leu Gln Asn Ile Arg Asn Thr Ile Glu Glu Thr Gly			
1115	1120	1125	
Asn Leu Ala Glu Gln Ala Arg Ala His Val Glu Asn Thr Glu Arg			
1130	1135	1140	

Leu Ile	Glu Ile	Ala Ser	Arg	Glu Leu	Glu Lys	Ala	Lys Val	Ala
1145			1150			1155		
Ala Ala	Asn Val	Ser Val	Thr	Gln Pro	Glu Ser	Thr	Gly Asp	Pro
1160			1165			1170		
Asn Asn	Met Thr	Leu Leu	Ala	Glu Glu	Ala Arg	Lys	Leu Ala	Glu
1175			1180			1185		
Arg His	Lys Gln	Glu Ala	Asp	Asp Ile	Val Arg	Val	Ala Lys	Thr
1190			1195			1200		
Ala Asn	Asp Thr	Ser Thr	Glu	Ala Tyr	Asn Leu	Leu	Leu Arg	Thr
1205			1210			1215		
Leu Ala	Gly Glu	Asn Gln	Thr	Ala Phe	Glu Ile	Glu	Glu Leu	Asn
1220			1225			1230		
Arg Lys	Tyr Glu	Gln Ala	Lys	Asn Ile	Ser Gln	Asp	Leu Glu	Lys
1235			1240			1245		
Gln Ala	Ala Arg	Val His	Glu	Glu Ala	Lys Arg	Ala	Gly Asp	Lys
1250			1255			1260		
Ala Val	Glu Ile	Tyr Ala	Ser	Val Ala	Gln Leu	Ser	Pro Leu	Asp
1265			1270			1275		
Ser Glu	Thr Leu	Glu Asn	Glu	Ala Asn	Asn Ile	Lys	Met Glu	Ala
1280			1285			1290		
Glu Asn	Leu Glu	Gln Leu	Ile	Asp Gln	Lys Leu	Lys	Asp Tyr	Glu
1295			1300			1305		
Asp Leu	Arg Glu	Asp Met	Arg	Gly Lys	Glu Leu	Glu	Val Lys	Asn
1310			1315			1320		
Leu Leu	Glu Lys	Gly Lys	Thr	Glu Gln	Gln Thr	Ala	Asp Gln	Leu
1325			1330			1335		
Leu Ala	Arg Ala	Asp Ala	Ala	Lys Ala	Leu Ala	Glu	Glu Ala	Ala
1340			1345			1350		
Lys Lys	Gly Arg	Asp Thr	Leu	Gln Glu	Ala Asn	Asp	Ile Leu	Asn
1355			1360			1365		
Asn Leu	Lys Asp	Phe Asp	Arg	Arg Val	Asn Asp	Asn	Lys Thr	Ala

1370	1375	1380
Ala Glu Glu Ala Leu Arg Lys	Ile Pro Ala Ile Asn	Gln Thr Ile
1385	1390	1395
Thr Glu Ala Asn Glu Lys Thr	Arg Glu Ala Gln Gln	Ala Leu Gly
1400	1405	1410
Ser Ala Ala Ala Asp Ala Thr	Glu Ala Lys Asn Lys	Ala His Glu
1415	1420	1425
Ala Glu Arg Ile Ala Ser Ala	Val Gln Lys Asn Ala	Thr Ser Thr
1430	1435	1440
Lys Ala Glu Ala Glu Arg Thr	Phe Ala Glu Val Thr	Asp Leu Asp
1445	1450	1455
Asn Glu Val Asn Asn Met Leu	Lys Gln Leu Gln Glu	Ala Glu Lys
1460	1465	1470
Glu Leu Lys Arg Lys Gln Asp	Asp Ala Asp Gln Asp	Met Met Met
1475	1480	1485
Ala Gly Met Ala Ser Gln Ala	Ala Gln Glu Ala Glu	Ile Asn Ala
1490	1495	1500
Arg Lys Ala Lys Asn Ser Val	Thr Ser Leu Leu Ser	Ile Ile Asn
1505	1510	1515
Asp Leu Leu Glu Gln Leu Gly	Gln Leu Asp Thr Val	Asp Leu Asn
1520	1525	1530
Lys Leu Asn Glu Ile Glu Gly	Thr Leu Asn Lys Ala	Lys Asp Glu
1535	1540	1545
Met Lys Val Ser Asp Leu Asp	Arg Lys Val Ser Asp	Leu Glu Asn
1550	1555	1560
Glu Ala Lys Lys Gln Glu Ala	Ala Ile Met Asp Tyr	Asn Arg Asp
1565	1570	1575
Ile Glu Glu Ile Met Lys Asp	Ile Arg Asn Leu Glu	Asp Ile Arg
1580	1585	1590
Lys Thr Leu Pro Ser Gly Cys	Phe Asn Thr Pro Ser	Ile Glu Lys
1595	1600	1605

Pro

<210> 4

<211> 5518

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggagctga cctcaaggga aagaggagg ggacagcctc tgccttgga acttcgactg	60
ggcctactgc taagcgtgct ggctgccaca ctggcacagg cccctgcccc ggatgtgcct	120
ggctgttcca ggggaagctg ctaccccgcc acgggcgacc tgcctgggg ccgagctgac	180
agactgactg cctcatccac ttgtggcctg aatggcccc agccctactg catcgtcagt	240
cacctgcagg acgaaaagaa gtgcttcctt tgtgactccc ggcgccccctt ctctgctaga	300
gacaaccac acagccatcg catccagaat gtagtcacca gctttgcacc acagcggcgg	360
gcagcctggt ggcagtcaga gaatggtatc cctgcggtca ccatccagct ggacctggag	420
gctgagtttc atttcacaca cctcattatg accttcaaga catttcgccc tgcctgcatg	480
ctggtggaac gctcagcaga ctttggccgc acctggcatg tgtaccgata tttctcctat	540
gactgtgggg ctgacttccc aggagtccca ctagcacccc cacggcactg ggatgatgta	600
gtctgtgagt cccgctactc agagattgag ccatccactg aaggcgaggt catctatcgt	660
gtgctggacc ctgccatccc tatccagac ccctacagct cacggattca gaacctgttg	720
aagatcacca acctacgggt gaacctgact cgtctacaca cgttgggaga caacctactc	780
gaccacgga gggagatccg agagaagtac tactatgccc tctatgagct ggttgtacgt	840
ggcaactgct tctgctacgg acacgcctca gagtgtgcac ccgccccagg ggcaccagcc	900
catgctgagg gcatggtgca cggagcttgc atctgcaaac acaacacacg tggcctcaac	960
tgcgagcagt gtcaggattt ctatctgac ctgccctggc gtccggctga ggacggccat	1020
agtcatgcct gtaggaagtg tgagtgccat gggcacaccc acagctgcca cttcgacatg	1080
gccgtatacc tggcatctgg caatgtgagt ggagggtgtgt gtgatggatg tcagcataac	1140
acagctgggc gccactgtga gctctgtcgg cctttcttct accgtgaccc aaccaaggac	1200
ctgcgggatc cggtctgttg ccgtcctgt gattgtgacc ccatgggttc tcaagacggt	1260
ggtcgctgtg attcccatga tgacctgca ctgggactgg tctccggcca gtgtcgtgc	1320
aaagaacatg tggtagggac tcgctgccag caatgccgtg atggcttctt tgggctcagc	1380
atcagtgacc gtctgggctg ccggcgatgt caatgtaatg cacggggcac agtgcctggg	1440
agcactcctt gtgaccccaa cagtggatcc tgttactgca aacgtctagt gactggacgt	1500

ggatgtgacc gctgcctgcc tggccactgg ggcctgagcc acgacctgct cggctgccgc 1560

ccctgtgact gcgacgtggg tgggtctttg gatccccagt gtgatgaggg cacaggtcaa 1620

tgccactgcc gccagcacat gggtgggcga cgtgtgagc aggtgcaacc tggctacttc 1680

cggcccttcc tggaccacct aatttgggag gctgaggaca cccgagggca ggtgctcgat 1740

gtggtggagc gcctggtgac ccccggggaa actccatcct ggactggctc aggttcctg 1800

cggctacagg aaggtcagac cctggagttc ctggtggcct ctgtgccgaa ggctatggac 1860

tatgacctgc tgctgcgtt agagccccag gtccctgagc aatgggcaga gttggaactg 1920

attgtgcagc gtccagggcc tgtgcctgcc cacagcctgt gtgggcattt ggtgccaag 1980

gatgatcgca tccaagggac tctgcaacca catgccaggt actigatatt tcctaactct 2040

gtctgccttg agcctggtat ctctacaag ctgcatctga agctggtacg gacaggggga 2100

agtgccacgc ctgagactcc ctactctgga cctggcctgc tcattgactc gctggtgctg 2160

ctgccccgtg tcttggtgct agagatgttt agtgggggtg atgctgctgc cctggagcgc 2220

caggccacct ttgaacgcta ccaatgccat gaggagggtc tggtgccag caagacttct 2280

ccctctgagg cctgcgcacc cctctcatc agcctgtcca cctcatcta caatggtgcc 2340

ctgccatgct agtgcaacc tcaaggttca ctgagtctg agtgcaacc tcattggtgt 2400

cagtgcctgt gcaagcctgg agtggttggg cgcgctgtg acctctgtgc ccctggtac 2460

tatggctttg gcccacagg ctgtcaagcc tgccagtga gccacgaggg ggcactcagc 2520

agtctctgtg aaaagaccag tgggcaatgt ctctgtcgaa ctggtgcctt tgggttcgc 2580

tgtgaccgt gccagcgtgg ccagtgggga ttccctagct gccggccatg tgtctgcaat 2640

gggcatgcag atgagtga caccacaca ggcgcttgcc tgggctgccg tgatcacaca 2700

gggggtgagc actgtgaaag gtgcattgct ggtttccacg gggaccacg gctgccatat 2760

gggggccagt gccggccctg tcctgtcct gaaggccctg ggagccaacg gcactttgt 2820

acttcttgcc accaggatga atattcccag cagatttgtt gccactgccg ggcaggctat 2880

acggggctgc gatgtgaagc ttgtgccctt gggcactttg gggaccatc aaggccaggt 2940

ggccggtgcc aactgtgtga gtgcagtggg aacattgacc caatggatcc tgatgcctgt 3000

gacccccaca cggggcaatg cctgcgctgt ttacaccaca cagagggtcc aactgtgcc 3060

cactgcaagc ctggcttcca tgggcaggct gcccgacaga gctgtcacg ctgcacatgc 3120

aacctgctgg gcacaaatcc gcagcagtgc ccatctcctg accagtgcc ctgtgatcca 3180

agcagtgggc agtgcccatg cctccccaat gtccagggcc ctagctgtga ccgctgtgcc 3240

cccaacttct ggaacctcac cagtggccat ggttgccagc cttgtgcctg ccaccaagc 3300
 cgggccagag gccccacctg caacaggttc acagggcagt gccactgccg tgcggcttt 3360
 ggaggcgga cttgttctga gtgccaagag ctccactggg gagacctgg gttgcagtgc 3420
 catgcctgtg attgtgactc tcgtggaata gatacacctc agtgtcacg cttcacaggt 3480
 cactgcagct gccgcccagg ggtgtctggt gtgcgctgtg accagtgtgc ccgtggcttc 3540
 tcaggaatct ttctgcctg ccatccctgc catgcatgct tcggggattg ggaccgagtg 3600
 gtgcaggact tggcagcccg tacacagcgc ctagagcagc gggcgcagga gttgcaacag 3660

 acgggtgtgc tgggtgcctt tgagagcagc ttctggcaca tgcaggagaa gctgggcatt 3720
 gtgcagggca tcgtagggtc ccgcaacacc tcagccgctt ccactgcaca gcttgtggag 3780
 gccacagagg agctgcggcg tgaaattggg gaggccactg agcacctgac tcagctcgag 3840
 gcagacctga catagtgtga agatgagaac ttcaatgcca accatgcact aagtgtgtg 3900
 gagcgagata ggcttgact taatctcaca ctgcggcagc tcgaccagca tcttgacttg 3960
 ctcaaacatt caaacttctt ggggtgcctat gacagcatcc ggcatgcca tagccagtct 4020
 gcagaggcag aacgtcgtgc caatacctca gccctggcag tacctagccc tgtgagcaac 4080

 tcggcaagtg ctcgcatcg gacagaggca ctgatggatg ctcagaagga ggacttcaac 4140
 agcaaacaca tggccaacca gcgggcactt ggcaagctct ctgccatac ccacaccctg 4200
 agcctgacag acataaatga gctggtgtgt ggggcaccag gggatgcacc ctgtgtctaca 4260
 agcccttgtg ggggtgccgg ctgtcgagat gaggatgggc agccgcgctg tgggggcctc 4320
 agctgcaatg gggcagcggc tacagcagac ctagcactgg gccgggccg gcacacacag 4380
 gcagagctgc agcgggcact ggcagaaggt ggtagcatcc tcagcagagt ggctgagact 4440
 cgtcggcagg caagcgaggc acagcagcgg gcccaggcag ccctggacaa ggctaagtct 4500

 tcagggggac aggtggaaca ggccaaccag gaacttcaag aacttatcca gagtgtgaag 4560
 gacttctca accaggaggg ggctgacct gatagcattg aaatggtggc cacacgggtg 4620
 ctagagctct ccatcccagc ttcagctgag cagatccagc acctggcggg tgcgattgca 4680
 gagcgagtcc ggagcctggc agatgtggat gcgatcctgg cacgtactgt aggagatgtg 4740
 cgtcgtgccg agcagctact gcaggatgca cggcgggcaa ggagctgggc tgaggatgag 4800
 aaacagaagg cagagacagt acaggcagca ctggaggagg ccagcgggc acagggtatt 4860
 gccagggtg ccatccgggg ggcagtggct gacacacggg acacagagca gaccctgtac 4920

 caggtacagg agaggatggc aggtgcagag cgggcactga gctctgcagg tgaaagggt 4980
 cggcagttag atgtctctct ggaggctctg aaattgaaac gggcaggaaa tagtctggca 5040
 gcctctacag cagaagaaac ggcaggcagt gcccagggtc gtgccagga ggctgagcag 5100

ctgctacgcg gtctctctggg tgatcagtag cagacggtga aggccctagc tgagcgcaag	5160
gcccgaagtg tgctggctgc acaggcaagg gcagaacaac tgcgggatga ggctcgggac	5220
ctgttgcaag ccgctcagga caagctgcag cggctacagg aattggaagg cacctatgag	5280
gaaaatgagc gggcactgga gagtaaggca gcccagttgg acgggttgga ggccaggatg	5340
cgcagcgtgc ttcaagccat caacttgcag gtgcagatct acaacacctg ccagtgacct	5400
ctgcccgaagg cctacccag ttcctagcac tgcccacat gcatgtctgc ctatgcactg	5460
aagagctctt ggcccggcag ggcccccaat aaaccagtgt gaacccccaa aaaaaaaa	5518
<210> 5	
<211> 11426	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
agaccgcgcg ggctcccgcc gcgcgcgctg tccttgagc tcggggacgc ggcccggagc	60
cgggaagatg gcgaagcgcc tctgcgcggg gagcgcaactg tgtgttcgcg gccccgggg	120
ccccgcgccc ctgctgctgg tcgggctggc gctgctgggc gcggcgcggg cgccgggagga	180
ggcggcgggc ggcttcagcc tgcaccgcc ctacttcaac ctggccgagg gcgcccgcct	240
cgccgcctcc gcgacctgcg gagaggaggc ccggcgcgcg ggctccccgc gccccaccga	300
ggacctttac tgcaagctgg tagggggccc cgtggccggc ggcgaccca accagacat	360
ccggggccag tactgtgaca tctgcacggc tgccaacagc aacaaggcac accccgcgag	420
caatgccatc gatggcacgg agcgctggtg gcagagtcca ccgctgtccc gcggcctgga	480
gtacaacgag gtcaacgtca ccctggacct ggccaggctc ttccacgtgg cctacgtcct	540
catcaagttt gccaaactcac cccggccgga cctctgggtg ctggagcggc ccatggactt	600
cggccgcacc taccagccct ggcagttctt tgctctctcc aagagggact gtctggagcg	660
gttcggggcca cagacgctgg agcgcatcac acgggacgac gcggccatct gcaccaccga	720
gtactcacgc atcggtcccc tggagaacgg agagatcgtg gtgtccctgg tgaacggacg	780
tccgggcgcc atgaatttct cctactcgcc gctgctacgt gagttacca aggccaccaa	840
cgtcgcctg cgcttctgc gtaccaacac gctgctgggc catctcatgg ggaaggcgt	900
gcgggacccc acggtcaccc gccgtattia ttacagcatc aaggatatca gcatcgagg	960
ccgctgtgtc tgccacggcc acgcggatgc ctgcgatgcc aaagaccca cggaccggtt	1020
caggtgcag tgcaacctgcc agcacaacac ctgcgggggc acctgcgacc gctgctgccc	1080
cggcttcaat cagcagccgt ggaagcctgc gactgccaac agtgccaacg agtgccagtc	1140

ctgtaactgc tacggccatg ccaccgactg ttactacgac cctgaggtgg accggcgccg	1200
cgccagccag agcctggatg gcacctatca gggtaggggt gtctgtatcg actgccagca	1260
ccacaccacc ggcgtcaact gtgagcgctg cctgccccgc ttctaccgct ctcccaacca	1320
ccctctcgac tcgccccacg tctgccgccc ctgcaactgc gagtccgact tcacggatgg	1380
cacctgcgag gacctgacgg gtcgatgcta ctgccggccc aacttctctg gggagcggtg	1440
tgacgtgtgt gccgagggtt tcacgggctt cccaagctgc taccgacgc ctcgtcctc	1500
caatgacacc agggagcagg tgctgccagc cgccagatt gtgaattgtg actgcagcgc	1560
ggcagggacc cagggaacg cctgccggaa ggaccaagg gtgggacgct gtctgtgcaa	1620
acccaacttc caaggacccc attgtgagct ctgcgcgcca gggttctacg gccccgctg	1680
ccagccctgc cagtgttcca gccctggagt ggccgatgac cgctgtgacc ctgacacagg	1740
ccagtgcagg tgccgagtgg gcttcgaggg ggccacatgt gatcgctgtg cccccgcta	1800
ctttcacttc ccctctgcc agttgtgtgg ctgcagccct gcaggaacct tgcccagagg	1860
ctgcgatgag gccggccgct gcctatgcca gcctgagttt gctggacctc attgtgaccg	1920
gtgccccctt ggctaccatg gtttcccaaa ctgccaagca tgcacctgcg accctcgggg	1980
agccctggac cagctctgtg gggcgggagg ttgtgcccgc tgccgccccg gctacacagg	2040
cactgcctgc caggaatgca gccccggctt tcacggcttc cccagctgtg tccccgcca	2100
ctgctctgct gaaggtccc tgacgcgacg ctgtgacccc cggagtgggc agtgcagctg	2160
ccggccccgt gtgacggggc tgcggtgtga cacatgtgtg cccggtgcct acaacttccc	2220
ctactcgaa gctggctctt gccaccctgc cggcttgccc ccagtggatc ctgcccttc	2280
tgaggcacag gticccctgta tgtgccgggc tcacgtggag gggccgagct gtgaccgctg	2340
caaacctggg ttctggggac tgagccccag caaccccgag ggctgtaccc gctgcagctg	2400
cgacctcagg ggcacactgg gtggagtgtc tgagtgccag ccgggcaccg gccagtgtt	2460
ctgaagccc cactgtgtcg gccaggcctg cgcgtcctgc aaggatggct tctttggact	2520
ggatcaggct gactattttg gctgccgacg ctgccggtgt gacattggcg gtgactggg	2580
ccagagctgt gaaccgagga cgggcgtctg ccggtgccgc cccaacaccc agggccccac	2640
ctgcagcgag cctgcgaggg accactacct cccggacctg caccacctgc gcctggagct	2700
ggaggaggct gccacacctg aggggtcacgc cgtgcgcttt ggcttcaacc cctcgagtt	2760
cgagaacttc agctggaggg gctacgcgca gatggcacct gtccagcca ggatcgtggc	2820
caggctgaac ctgacctccc ctgacctttt ctggctcgtc ttccgatacg tcaaccgggg	2880
ggcatgagt gtgagcgggc gggctctgtg gcgagaggag ggcaggtcgg ccacctgcgc	2940
caactgcaca gcacagatc agcccgtggc ctccccaccc agcacggagc ctgccttcat	3000

caccgtgccc cagaggggct tcggagagcc ctttgtctg aacctggca cctgggccct 3060
gcgtgtggag gccgaagggg tgctcctgga ctacgtggtt ctgctgccta gcgcatacta 3120

cgaggcggcg ctctgcagc tgcgggtgac tgaggcctgc acataccgtc cctctgccc 3180
gcagtctggc gacaactgcc tctctacac acacctcccc ctggatggct tcccccggc 3240
cgccgggctg gaggccctgt gtgccagga caacagcctg ccccgccct gccccacgga 3300
gcagctcagc ccgtgcacc cgccactgat cacctgcacg ggagtgatg tggacgtcca 3360
gcttcaagtg gcagtggcac agccaggccg ctatgcccta gtgtggagt acgccaatga 3420
ggatgcccg caggaggtgg gcgtggccgt gcacaccca cagcgggccc cccagcaggg 3480
gtgtctctcc ctgcaccct gcctgtacag caccctgtgc cggggcactg cccgggatac 3540

ccaggaccac ctggctgtct tccacctgga ctggaggcc agcgtgagc tcacagccga 3600
acaggcacgc ttcttctgc acggggteac tctgtgccc attgaggagt tcagcccga 3660
gttcgtggag ccccggtca gctgcatcag cagccacggc gcctttggc ccaacagtgc 3720
cgctgtctg ccttcgcgt tccaaagcc gcccagccc atcctctca gggactgcca 3780
ggtgatcccg ctgcccgcc gcctccgct gaccacggc caggatctca ctccagccat 3840
gtccccagct ggaccccgac ctggccccc caccgtgtg gacctgatg cagagccac 3900
cctgtgcgt gagccccagg ccacgtggt cttaccacc catgtgcca cgtgggccc 3960

ctatgccttc ctgtgcacg gctaccagc agccacccc acctccccg tggagtcct 4020
catcaagcc gccgcgtgt ggcaggcca cgccaagcc agcttctgt cacatggcta 4080
cggtgccgc accttggtg tgtgtgagg ccaggccctg ctggacgtga cccacagca 4140
gtcactgtg accgtgcgtg tgccaaggc ccggtggctc tggctggatt atgtactgt 4200
ggtccctgag aacgtctaca gctttggcta cctccgggag gagccctgg ataaatccta 4260
tgacttcac agccactgc cagccaggc ctaccacac agcccagca gctcatcct 4320
gttctgccga aacgtgctg ctccctctc cctctctat aacaacggag cccgtccatg 4380

tggtgccac gaagtaggtg ctacaggccc cactgtgag ccttcgggg gccagtgtcc 4440
ctgcatgcc catgtattg gccgtgactg ctcccgtgt gccaccgat actgggctt 4500
ccccactgc agccctgtg actgcggtg ccgctctgt gacgactca cgggccagtg 4560
catctgccc ccacgacca tccgcccga ctgctgctg tgccagccc agacatttg 4620
ctgccacccc ctggtcggt gtgaggagt taactgtca gggcccgga tccaggagt 4680
cacagacct acctgtgaca cagacagcg ccagtgaag tgcagacca acgtgactgg 4740

gcgccgctgt gatacctgct ctccgggctt ccatggctac ccccgtgcc gccctgtga 4800

ctgtcacgag gcgggcactg cgcctggcgt gtgtgacccc ctcacagggc agtgctactg 4860

taaggagaac gtgcagggcc ccaaatgtga ccagtgcagc cttgggacct tctcaactgga 4920

tgctgccaac cccaaagggt gcaccgcctg cttctgcttt gggggccacgg agcgctgccg 4980

gagctcgtec tacaccgcc aggagtctgt ggatatggag ggatgggtgc tgctgagcac 5040

tgaccggcag gtggtgcccc acgagcggca gccagggacg gagatgctcc gtgcagacct 5100

gcggcacgtg cctgaggctg tgcccagggc tttccccgag ctgtactggc aggccccacc 5160

ctcctacctg ggggaccggg tgctaccta cggtagggacc ctccgttatg aactgcactc 5220

agagaccag cggggagatg tctttgtccc catggagagc aggccgatg tgggtgctgca 5280

gggcaaccag atgagcatca cattcctgga gccggcatac cccacgcctg gccacgttca 5340

ccgtgggcag ctgcagctgg tggaggggaa ctccggcat acggagacgc gcaaacactgt 5400

gtcccgcgag gagctcatga tgggtgctggc cagcctggag cagctgcaga tccgtgccct 5460

cttctcacag atctcctcgg ctgtcttctt gcgcagggtg gcactggagg tggccagccc 5520

agcaggccag ggggccttgg ccagcaatgt ggagctgtgc ctgtgccccg ccagctaccg 5580

gggggactca tgccaggaat gtgcccccg cttctatcgg gacgtcaaag gtctcttctt 5640

gggccgatgt gtcccttgtc agtgccatgg aactcagac cgctgcctcc ctggctctgg 5700

cgctctgtgt gactgccagc acaacaccga aggggcccac tgtgagcgct gccaggctgg 5760

cttcgtgagc agcagggacg acccagcgc ccctgtgtc agctgccctt gccccctctc 5820

agtgccctcc aacaacttcg ccgagggtg tgtctgcga ggccggccga cccagtgcct 5880

ctgcaaacct ggatatgcag gtgcctcctg cgagcggtgt gcgcccggat tctttgggaa 5940

cccactggtg ctgggcagct cctgccagcc atgcactgc agcgccaacg gtgaccccaa 6000

cttgctcttc agcgactgcg acccctgac gggcgctgc cgtggctgcc tgcgccacac 6060

cactgggccc cgctgcgaga tctgtgcccc cgcttctac ggcaacgccc tgctgcccgg 6120

caactgcacc cggtagcact gtaccccatg tgggacagag gcctgcgacc cccacagcgg 6180

gcactgcctg tgcaaggcgg gcgtgactgg gcggcgctgt gaccgctgcc aggagggaca 6240

ttttggtttc gatggctgcg ggggctgccg ccctgtgtct tgtggaccgg ccgccgaggg 6300

ctccgagtgc cccccaga gcggacagt ccaactgccga ccagggacca tgggacccca 6360

gtgccgcgag tgtgcccctg gctactgggg gctccctgag cagggtgca ggcgctgcca 6420

gtgcctggg gcccgctgtg accctcacac gggccgctgc aactgcccc cggggctcag 6480

cggggagcgc tgcgacacct gcagccagca gcatcaggtg cctgttccag gcgggcctgt	6540
ggggcacagc atccactgtg aagtgtgtga ccactgtgtg gtcctgtctc tggatgacct	6600
ggaacgggccc ggcgccctcc tccccgccat tcacgagcaa ctgcgtggca tcaatgccag	6660
ctccatggcc tgggcccgtc tgcacaggct gaacgcctcc atcgtgacc tgcagagcca	6720
gctccggagc cccctgggccc cccgccatga gacggcacag cagctggagg tgctggagca	6780
gcagagcaca agcctcgggc aggacgcacg gcggctaggc ggccaggccg tggggacccg	6840
agaccaggcg agccaattgc tggccggcac cgaggccaca ctgggccatg cgaagacgct	6900
gttggcgccc atccgggctg tggaccgcac cctgagcgag ctcatgtccc agacgggcca	6960
cctggggctg gccaatgcct cggtccatc aggtgagcag ctgctccgga cactggccga	7020
ggtggagcgg ctgctctggg agatgcgggc ccgggacctg ggggccccgc aggcagcagc	7080
tgagctgag ttggctgcag cacagagatt gctggcccgg gtgcaggagc agctgagcag	7140
cctctgggag gagaaccagg cactggccac aaaaaccgc gaccggctgg cccagcacga	7200
ggccgcctc atggacctgc gagaggcttt gaaccgggca gtggacgcca cacgggaggc	7260
ccaggagctc aacagccgca accaggagcg cctggaggaa gccctgcaaa ggaagcagga	7320
gctgtcccgg gacaatgcca ccctgcaggc cactctgcat gcggctaggg acaccctggc	7380
cagcgtcttc agattgtgc acagcctgga ccaggctaag gaggagctgg agcgcctcgc	7440
cgccagcctg gatggggctc ggaccccaact gctgcagagg atgcagacct tctccccggc	7500
gggcagcaag ctgcgtctag tggaggccgc cgaggccac gcacagcagc tgggccagct	7560
ggcactcaat ctgtccagca tcatcctgga cgtcaaccag gaccgcctca cccagagggc	7620
catcagggcc tccaacgct acagccgcat cctgcaggcc gtgcaggctg ccgaggatgc	7680
tgctggccag gccctgcagc aggcggacca cacgtgggcg acggtggtgc ggcagggcct	7740
ggtggaccga gcccagcagc tcctggccaa cagcactgca ctagaagagg ccatgtctca	7800
ggaacagcag aggctgggccc ttgtgtgggc tgccctccag ggtgccagga cccagctccg	7860
agatgtccgg gccaaagaagg accagctgga ggcgcacatc caggcggcgc aggccatgct	7920
tgccatggac acagacgaga caagcaagaa gatcgacat gccaaaggctg tggctgctga	7980
agcccaggac accgccacc gtgtgcagtc ccagctgcag gccatgcagg agaattgtga	8040
gcggtggcag ggccagtacg agggcctgcg gggccaggac ctgggccagg cagtgttga	8100
cgcaggccac tcagtgtcca ccctggagaa gacgtgccc cagctgctgg ccaagctgag	8160
catcctggag aaccgtgggg tgcacaacgc cagcctggcc ctgtccgcca gcattggccg	8220
cgtgcgagag ctcatgtccc aggcccgggg ggtgccagt aaggtcaagg tgcccatgaa	8280
gttcaacggg cgctcagggg tgcagctgcg caccacacgg gatcttgccg accttgctgc	8340

ctacactgcc ctcaagttct acctgcaggg ccagagcct gagcctgggc aggggtaccga	8400
ggatcgcttt gtgatgtaca tgggcagccg ccaggccact ggggactaca tgggtgtgtc	8460
tctgcgtgac aagaaggtgc actgggtgta tcagctgggt gaggcgggcc ctgcagtctt	8520
aagcatcgat gaggacattg gggagcagtt cgcagctgtc agcctggaca ggactctcca	8580
gtttggccac atgtccgtca cagtggagag acagatgac caggaaacca aggggtgacac	8640
ggtggccctt ggggcagagg ggctgctcaa cctgcggcca gacgacttcg tcttctacgt	8700
cgggggggtac ccagtagctt tcacgcccc tccctgtctt cgcttcccc gctaccgggg	8760
ctgcatcgag atggacacgc tgaatgagga ggtggtcagc ctctacaact tcgagaggac	8820
cttccagctg gacacggctg tggacaggcc ttgtgcccgc tccaagtcga ccggggaccc	8880
gtggctcacg gacggctcct acctggacgg caccggcttc gcccgcatca gcttcgacag	8940
tcagatcagc accaccaagc gcttcgagca ggagctgcgg ctctgtctct acagcggggt	9000
gctcttcttc ctgaagcagc agagccagtt cctgtgcttg gccgtgcaag aaggcagcct	9060
cgtgctgttg tatgactttg gggctggcct gaaaaaggcc gtccactgc agccccacc	9120
gccccgacc tcggccagca aggcgateca ggtgttcttg ctggggggca gccgcaagcg	9180
tgtgctggtg cgtgtggagc gggccacggt gtacagcgtg gagcaggaca atgatctgga	9240
gctggccgac gcctactacc tggggggcgt gccgcccagc cagctgcccc cgagcctgcg	9300
acggctcttc ccacccgag gctcagtcg tggctgcgtc aaaggcatca aggcctggg	9360
caagtatgtg gacctcaagc ggctgaacac gacaggcgtg agcgccggct gcaccgccga	9420
cctgctggtg gggcgcgcca tgactttcca tggccacggc ttcttctgcc tggcgtctc	9480
gaacgtggca ccgtcactg gcaacgtcta ctccggcttc ggcttccaca gcgccagga	9540
cagtgcctg ctctactacc gggcgtcccc ggatgggcta tgccaggtgt ccctgcagca	9600
gggcccgtgt agcctacagc tcctgaggac tgaagtgaat actcaagcgg gcttcgccga	9660
tgggtcccc cattactcg cttctacag caatgccacg ggagtcctggc tgtatgtcga	9720
tgaccagctc cagcagatga agccccaccg gggaccaccc cccgagctcc agccgcagcc	9780
tgaggggccc ccgaggtccc tcctgggagg cctgcctgag tctggcacca tttaaacctt	9840
cagtggctgc atcagcaacg tcttcgtgca gcggctcctg ggcccacagc gcgtatttga	9900
tctgcagcag aacctgggca gcgtcaatgt gagcacgggc tgtgcaccg ccctgcaagc	9960
ccagaccccc ggcttggggc ctagaggact gcaggccacc gcccggaagg cctcccgcg	10020
cagccgtcag cccgcccggc atcctgcctg catgctgccc ccacacctca ggaccacccg	10080
agactcctac cagtttgggg gtccctgtc cagtcacctg gagtttgtgg gcatcctggc	10140
ccgacatagg aactggccca gtctctccat gcacgtctc ccgcaagct cccgagcct	10200

cctcctcttc actgcccgtc tgaggccccg cagccccctc ctggcgctct tcctgagcaa 10260

 tggccacttc gttgcacaga tggaaaggcct cgggactcgg ctccgcgccc agagccgcca 10320
 gcgctcccgg cctggccgct ggcacaaggt ctccgtgcgc tgggagaaga accggatcct 10380
 gctggtgacg gacggggccc gggcctggag ccaggagggg ccgcaccggc agcaccaggg 10440
 ggagagcac cccagcccc acacctctt tgtgggcggc ctcccgcca gcagccacag 10500
 ctccaaactt ccggtgaccg tcgggttcag cggctgtgtg aagagactga ggctgcacgg 10560
 gaggccccctg ggggccccca cacgatggc aggggtcaca ccctgcatct tgggccccct 10620
 ggaggcgggc ctgttcttcc caggcagcgg gggagttatc actttagacc tcccaggagc 10680

 tacactgcct gatgtgggcc tggaaactgga ggtgcggccc ctggcagtca ccggactgat 10740
 ctccacttg ggcaggccc ggacgcccc ctacttcag ttgcaggtga ccgagaagca 10800
 agtctctgtg cgggcggatg accgagcagg ggagttctcc acgtcagtga cccgccctc 10860
 agtgctgtgt gatggccagt ggcaccggct agcggatgat aaaagcggga atgtgtccg 10920
 gctggaggtg gacgcgcaga gcaaccacac cgtgggcccc ttgctggcgg ctgcagctgg 10980
 tgccccagcc cctctgtacc tcgggggcct gcctgagccc atggccgtgc agccctggcc 11040
 cccgcctac tgcggctgca tgaggaggct ggcggtgaac cggcccccg tcgcatgac 11100

 tcgctctgtg gaggtccacg gggcagtggg ggccagtggc tgcccagccg cctaggacac 11160
 agccaacccc ggccccctgt caggccccctg cagctgcctc acaccgccc ttgtgtcgc 11220
 ctcataggtg tctatttga ctctaagctc tacgggtgac agatcttgtt tctgaagatg 11280
 gttaagtta tagcttctta aacgaagaa taaaatactg caaaatgttt ttatatattg 11340
 cccttcacc catttttaa tgtgagagat ttgtcaccaa tcatcactgg ttcctcctta 11400
 aaaattaaaa agtaacttct gtgtaa 11426

 <210> 6
 <211> 7632
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 atgagaggga gccatcgggc cgcgcgggcc ctgcggcccc gggggcggct ctggcccgtg 60
 ctggccgtgc tggcggcggc cgcccgggcg ggctgtgccc aggcagccat ggacgagtgc 120
 acggacgagg gcgggcggcc gcagcgctgc atgcccagat tcgtcaacgc cgccttcaac 180
 gtgactgtgg tggccacaa cacgtgtggg actccgccc aggaatactg tgtgcagacc 240
 ggggtgaccg gggtcacaa gtctgtcac ctgtgcgacg ccgggcagcc ccacctgcag 300

cacggggcag ccttcctgac cgactacaac aaccaggccg acaccacgtg gtggcaaagc	360
cagaccatgc tggccggggg gcagtacccc agctccatca acctcacgt gcacctggga	420
aaagcttttg acatcaccta tgtgcgtctc aagtccaca ccagccgcc ggagagcttt	480
gccatttaca agcgcacacg ggaagacggg ccttggttc cttaccagta ctacagtgg	540
tcctgtgaga acacctact caaggcaaac cgcggcttca tcaggacagg aggggacgag	600
cagcaggcct tgtgtactga tgaattcagt gacatttctc ccctcactgg gggcaacgtg	660
gccttttcta ccctggaagg aaggcccagc gcctataact ttgacaatag ccctgtgctg	720
caggaatggg taactgccac tgacatcaga gtaactctta atcgctgaa cacttttggg	780
gatgaagtgt ttaacgatcc caaagtctc aagtcctatt attatgcat ctctgatttt	840
gctgtagggt gcagatgtaa atgtaatgga cagcaagcg agtgtatgaa gaacgaattt	900
gataagctgg tgtgtaattg caaacataac acatatggag tagactgtga aaagtgtctt	960
cctttcttca atgaccggcc gtggaggagg gcaactgcgg aaagtgccag tgaatgcctg	1020
ccctgtgatt gcaatggctg atcccaggaa tgctacttcg accctgaact ctatcgttcc	1080
actggccatg ggggccactg taccaactgc caggataaca cagatggcgc ccactgtgag	1140
aggtgccgag agaacttctt ccgccttggc aacaatgaag cctgctcttc atgccactgt	1200
agtcctgtgg gctctctaag cacacagtgt gatagttacg gcagatgcag ctgtaagcca	1260
ggagtgatgg gggacaaatg tgaccgttgc cagcctggat tccattctct cactgaagca	1320
ggatgcagcg catgctcttg tgatccctct ggcagcatag atgaatgtaa tattgaacaa	1380
ggaagatgtg ttgcaaaga caatgtcgaa ggttcaatt gtgaaagatg caaacctgga	1440
ttttttaatc tggaatcatc taatcctcgg ggttgccac cctgcttctg ctttggcat	1500
tcttctgtct gtacaaacgc tgttggctac agtgtttatt ctatctctc tacctttcag	1560
attgatgagg atgggtggcg tgcggaacag agagatggct ctgaagcatc tctcgagtgg	1620
tcctctgaga ggcaagatat cgccgtgatc tcagacagct acttctctg gtacttcatt	1680
gctctgcaa agttcttggg caagcaggtg ttgagttatg gtcagaacct ctcttctcc	1740
tttcgagtgg acaggcgaga tactcgctc tctgcagaag accttgtgct tgaggagct	1800
ggcttaagag tatctgtacc cttgatcgt cagggaatt cctatccaag tgagaccact	1860
gtgaagtatg tttcaggct ccatgaagca acagattacc cttggaggcc tgctcttacc	1920
ccttttgaat ttcagaagct cctaacaac ttgacctcta tcaagatacg tgggacatac	1980
agtgaagaaa gtgctggata tttggatgat gtcacctgg caagtgtcg tcctgggcct	2040

ggagtccttg caacttgggt ggagtcctgc acctgtcctg tgggatatgg agggcagttt	2100
tgtgagatgt gcctctcagg ttacagaaga gaaactccta atcttggacc atacagtcca	2160
tgtgtgcttt gcgcctgcaa tggacacagc gagacctgtg atcctgagac aggtgtttgt	2220
aactgcagag acaatacggc tggcccgac tgtgagaagt gcagtgatgg gtactatgga	2280
gattcaactg caggcacctc ctccgattgc caacctgtc cgtgtcctgg aggttcaagt	2340
tgtgctgttg ttcccaagac aaaggagggtg gtgtgcacca actgtcctac tggcaccact	2400
ggtaagagat gtgagctctg tgatgatggc tactttggag accccctggg tagaaacggc	2460
cctgtgagac tttccgcct gtgccagtgc agtgacaaca tcgatccaa tgcagttgga	2520
aattgcaatc gcttgacggg agaatgcctg aagtgcattt ataacactgc tggcttctat	2580
tgtgaccggt gcaaagacgg attttttgga aatccctgg ctcccaatcc agcagacaaa	2640
tgcaaagcct gcaattgcaa tctgtatggg accatgaagc agcagagcag ctgtaacccc	2700
gtgacggggc agtgtgaatg tttgcctcac gtgactggcc aggactgtgg tgctttgac	2760
cctggattct acaatctgca gagtgggcaa ggctgtgaga ggtgtgactg ccatgccttg	2820
ggctccacca atgggcagtg tgacatccgc accggccagt gtgagtgcc gcccggcatc	2880
actggtcagc actgtgagcg ctgtgaggtc aaccactttg ggtttggacc tgaaggctgc	2940
aaacctgtg actgtcatcc tgagggatct ctttacttc agtgcaaaga tgatggtcgc	3000
tgtgaatgca gagaaggctt tgtgggaaat cgctgtgacc agtgtgaaga aaactatttc	3060
tacaatcggt ctggcctgg ctgccaggaa tgtccagctt gttaccggct ggtaaaggat	3120
aaggttgctg atcatagagt gaagctccag gaattagaga gtctcatagc aaaccttgga	3180
actggggatg agatggtgac agatcaagcc ttcgaggata gactaaagga agcagagagg	3240
gaagtatttg acctccttcg tgaggcccag gatgtcaaag atgttgacca gaatttgatg	3300
gatcgctac agagagtga taacactctg tccagccaaa ttagccgttt acagaatatc	3360
cggaatacca ttgaagagac tggaaacttg gctgaacaag cgcgtgccca ttagagaac	3420
acagagcggg tgattgaaat cgcattccaga gaacttgaga aagcaaaagt cgctgctgcc	3480
aatgtgtcag tcactcagcc agaattctaca ggggacccaa acaacatgac tcttttggca	3540
gaagaggctc gaaagcttgc tgaacgtcat aaacaggaag ctgatgacat tgttcgagtg	3600
gcaaagacag ccaatgatac gtcaactgag gcatacaacc tgcttctgag gacactggca	3660
ggagaaaatc aaacagcatt tgagattgaa gagcttaata ggaagtatga acaagcgaag	3720
aacatctcac aggatctgga aaaacaagct gcccgagtac atgaggaggc caaaagggcc	3780

ggtgacaaag ctgtggagat ctatgccagc gtggctcagc tgagcccttt ggactctgag 3840
 acactggaga atgaagcaaa taacataaag atggaagctg agaatctgga acaactgatt 3900
 gaccagaaat taaaagatta tgaggacctc agagaagata tgagagggaa ggaacttgaa 3960
 gtcaagaacc ttctggagaa aggcaagact gaacagcaga ccgcagacca actcctagcc 4020
 cgagctgatg ctgccaaggc cctcgtgaa gaagctgcaa agaagggacg ggatacctta 4080
 caagaagcta atgacattct caacaacctg aaagattttg ataggcgtgt gaacgataac 4140
 aagacggcgg cagaggaggc actaaggaag attcctgcca tcaaccagac catcactgaa 4200

 gccaatgaaa agaccagaga agcccagcag gccctgggca gtgctgcggc ggatgccaca 4260
 gaggccaaga acaaggccca tgaggcggag aggatcgga gcgctgtcca aaagaatgcc 4320
 accagcacca aggcagaagc tgaaagaact ttgacagaag ttacagatct ggataatgag 4380
 gtgaacaata tgttgaagca actgcaggaa gcagaaaaag agctaaagag aaaacaagat 4440
 gacgctgacc aggacatgat gatggcaggg atggcttcac aggctgtca agaagccgag 4500
 atcaatgcca gaaaagccaa aaactctgtt actagcctcc tcagcattat taatgacctc 4560
 ttggagcagc tggggcagct ggatacagtg gacctgaata agctaaacga gattgaaggc 4620

 accctaaca aagccaaaga tgaaatgaag gtcagcgatc ttgataggaa agtgtctgac 4680
 ctggagaatg aagccaagaa gcaggaggct gccatcatgg actataaccg agatatcgag 4740
 gagatcatga aggacattcg caatctggag gacatcagga agaccttacc atctggctgc 4800
 ttcaacaccc cgtccattga aaagccctag tgcctttagg gctggaaggc agcatccctc 4860
 tgacaggggg gcagttgtga ggccacagag tgccttgaca caaagattac atttttcaga 4920
 cccccactcc tctgctgtg tccatgactg tccttttgaa ccaggaaaag tcacagagtt 4980
 taaagagaag caaattaac atcctgaatc gggaacaaag ggttttatct aataaagtgt 5040

 ctcttccatt cacgttgeta ccttaccac actttccctt ctgatttgcg tgaggacgtg 5100
 gcatcctacg ttactgtaca gtggcataag cacatcgtgt gagcccatgt atgctggggt 5160
 agagcaagta gccctccct gtctcatcga taccagcaga acctcctcag tctcagtact 5220
 ctgttttcta tgaaggaaaa gtttggctac taacagtagc attgtgatgg ccagtatata 5280
 cagtccatgg ataaagaaaa tgcactgca tctctaccc ctcttcttc taagcaaaag 5340
 gaaataaaca tctgtgcca aaggtattgg tcatttagaa tgtcggtagc catccatcag 5400
 tgcttttagt taitatgagt gtaggacact gagccatccg tgggtcagga tgcaattatt 5460

 tataaaagtc tccaggtgaa catggctgaa gatttttcta gtatattaat aattgactag 5520
 gaagatgaac ttttttcag atctttgggc agctgataat ttaaactctg atgggcagct 5580
 tgcactcacc aatagaccaa aagacatctt ttgatattct tataaatgga acttacacag 5640

aagaaatagg gatatgataa ccactaaaat ttgtttttca aaatcaaact aattctttaca 5700
gctttttttat tagtttagtct tggaactagt gtttaagtatc tggcagagaa cagttaatcc 5760
ctaaggtctt gacaaaacag aagaaaaaca agcctcctcg tcttagtctt ttctagcaaa 5820
gggataaaac ttagatggca gcttgtactg tcagaatccc gtgtatccat ttgtttcttct 5880

gttggagaga tgagacattt gacccttagc tccagttttc ttctgatgtt tccatcttcc 5940
agaatccctc aaaaaacatt gtttgccaaa tcttggtggc aaatacttgc actcagtatt 6000
tcacacagct gccaacgcta tcgagttcct gcactttgtg atttaaatcc actctaaacc 6060
ttccctctaa gtgtagaggg aagaccctta cgtggagttt cctagtgggc ttctcaactt 6120
ttgatcctca gcctgtggtt ttttaagacca cagtgtgaca gttccctgcc acacaccccc 6180
ttcctcctac caaccacct ttgagattca tatatagcct ttaacactat gcaactttgt 6240
actttgcgta gcaggggagg ggtgggggga aagaaactat tatctgacac actggtgcta 6300

ttaattatit caaatitata tttttgtgtg aatgttttgt gttttgttta tcatgattat 6360
agaataagga atttatgtaa atatacttag tctattttct agaatgacac tctgttctact 6420
ttgtcaatt ttctctcttc actggcacia tgtatctgaa tacctcttc cctcccttct 6480
agaattcttt ggattgtact ccaaagaatt gtgccttgtg ttgcagcat ctccattctc 6540
taaaattaat ataattgctt tctccacac ccagccactg taaagaggta acttgggtcc 6600
tcttcattg cagtcctgat gatcctaacc tgcagcacgg tggttttaca atgttccaga 6660
gcaggaacgc caggttgaca agctatggta ggattaggaa agtttgctga agaggatctt 6720

tgacgccaca gtgggactag ccaggaatga gggagaaatg ccttttctgg caattgttgg 6780
agctggatag gtaagtttta taaggagtia cattttgact gagcacttag ggcatcagga 6840
acagtgtac ttactgatgg gtagactggg agaggtgggt taacttagtt cttagatgac 6900
ccacttctg ttccatctg ctggggatat accagagttt accacaagtg ttttgacgat 6960
atactctga gctttcactc tgcgtcttct ccaggcctc ttctactatg gcaggagatg 7020
tggcgtgctg ttgcaaagtt ttacgtcat tgtttcctgg ctagttcatt tcattaagtg 7080
gtacatcct aacatatgca ttgtgtcaag gttgcagaag aggactgaag attgactgcc 7140

aagctagttt gggigaagtt cactccagca agtctcaggc cacaatgggg tggtttggtt 7200
tggtttctt ttaactttct tttgttatt tgcctttctc ctccacctgt gtggtatatt 7260
ttttaagcag aattttatit tttaaaataa aaggttcttt acaagatgat accttaatta 7320
cactcccgca acacagccat tattttattg tctagctcca gttatctgta ttttatgtaa 7380
tgtaattgac aggatggctg ctgcagaatg ctggttgaca cagggtattat tatactgcta 7440
ttttccctg aattttttt ctttgaattc caactgtgga cttttatat gtgccttcac 7500

tttagctgtt tgccttaatc tctacagcct tgctctccgg ggtgggtaat aaaatgcaac 7560

acttggcatt tttatgtttt aagaaaaaca gtatatttatt tataataaaa tctgaatatt 7620

tgtaaccctt ta 7632

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gtggtaccca caggcagagt tgac 24

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gctctagagc tcttcagtgc ataggc 26