

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/12

(11) 공개번호 특2000-0052796
(43) 공개일자 2000년08월25일

(21) 출원번호	10-1999-7003614	(87) 국제공개번호	WO 1998/18921
(22) 출원일자	1999년04월24일	(87) 국제공개일자	1998년05월07일
번역문제출일자	1999년04월24일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1996/17957		
(86) 국제출원출원일자	1996년10월25일		
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 국내특허 : 오스트레일리아 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 핀란드 그루지아 헝가리 이스라엘 일본 대한민국 리투아니아 라트비아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로베니아 슬로바키아 터어키 우크라이나 미국 우즈베키스탄		
(71) 출원인	휴먼 게놈 사이언시즈, 인코포레이티드 벤슨 로버트 에이치. 미국 메릴랜드주 20850-3338 록크빌 키 웨스트 애비뉴 9410		
(72) 발명자	유구오-리앙 미국메릴랜드주20878다네스타운스트로우베일레인13524 에브너라인하르트 미국메릴랜드주20878게이터스버그첼렌테라스#3169906 니지안 미국메릴랜드주20853록크빌매너필드로드5502		
(74) 대리인	이병호		

심사청구 : 없음

(54) 뉴트로킨 알파

요약

본 발명은 TNF 단백질 계열의 한 구성원인 신규의 뉴트로킨 α 단백질에 관한 것이다. 특히, 가용성 형태의 세포외 도메인을 포함하는 사람 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 뉴트로킨 α 폴리펩타이드, 및 이를 제조하기 위한 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 또한 뉴트로킨 α 활성의 효능제 및 길항제를 동정하기 위한 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 면역 시스템 관련된 장애를 검출하기 위한 진단 방법 및 면역 시스템 관련된 장애를 치료하기 위한 치료 방법을 제공한다.

대표도

도1

색인어

뉴트로킨 α , 세포외 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 세포내 도메인, 재조합 벡터, 재조합 숙주 세포

명세서

기술분야

본 발명은 호중구에 의해 발현되므로, 뉴트로킨(Neutrokin) α 단백질('뉴트로킨 α ')로 명명되는 신규한 사이토키네에 관한 것이다. 특히, 이러한 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공한

다. 뉴트로킨 α 폴리펩타이드, 및 이를 제조하기 위한 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법을 또한 제공한다.

배경기술

사람 종양 괴사 인자(TNF- α) 및 (TNF- β , 또는 림포톡신)은 집합적으로 사이토킨으로 불리우는 인터페론, 인터루킨 및 성장 인자를 포함하는, 광범위한 부류의 폴리펩타이드 매개인자와 관련된 구성원이다[참조: Beutler, B. 및 Cerami, A., Annu. Rev. Immunol., 7:625-655 (1989)]. 사이토킨 수용체의 서열 분석은 막 단백질 (1) Ig 상과(superfamily), (2) 조혈소(사이토킨 수용체 상과) 및 (3) 종양 괴사 인자(TNF)/신경 성장 인자(NGF) 수용체 상과[TNF 상과에 관한 검토는 문헌(Gruss 및 Dower, Blood 85(12):3378-3404(1995), 및 Aggarwal 및 Natarajan, Eur. Cytokine Netw., 7(2):93-124 (1996)을 참조할 수 있다]의 몇몇 아과(subfamily)를 규정하였다. TNF/NGF 수용체 상과는 10가지 이상의 상이한 단백질을 함유한다[Gruss 및 Dower, 상기 문헌 참조]. 이들 수용체에 대한 리간드를 동정한 결과, 이들은 2가지 이상의 사이토킨 상과에 속한다[Gruss 및 Dower, 상기 문헌 참조].

종양 괴사 인자((TNF- α 와 TNF- β 와의 혼합물)는 본래 항-종양 활성을 보유하고 있는 것으로 밝혀졌지만, 현재에는 몇몇 형질전환된 세포주의 아포프토시스(apoptosis), 세포 활성의 매개 및 증식을 포함한 수많은 생물학적 활성을 나타낼 수 있는 다상유전성(pleiotropic) 사이토킨으로 인식되고 있을 뿐만 아니라 면역 조절과 염증 발생에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있다.

현재까지, 공지된 TNF-리간드 상과의 구성원으로는 TNF- α , TNF- β (림포톡신- α), LT- β , OX40L, Fas 리간드, CD30L, CD27L, CD40L 및 4-1BBL이 있다. 이러한 TNF 리간드 상과의 리간드는 세포의 도메인에서의 서열 상동성이 대략 20%(12 내지 36%의 범위)인 산성의 TNF-유사 분자이고, 주로 막-결합된 형태로 존재하며, 여기서 생물학적 활성 형태는 삼량체/다량체성 복합체이다. 가용성 형태의 TNF 리간드 상과는 지금까지 TNF, LT- β 및 Fas 리간드에 대해서만 동정되었다[이에 대한 전반적인 검토는 본원에 참조문헌으로 인용된 문헌(Gruss, H. 및 Dower, S.K., Blood 85(12):3378-3404 (1995))를 참조하다]. 이들 단백질은 아포프토시스 또는 세포독성에 의한 세포 생존 또는 사멸의 조절을 포함하여, 세포 증식, 활성 및 분화의 조절과 관련이 있다[참조: Armitage, R.J., Curr. Opin. Immunol. 6:407(1994) 및 Smith, C.A., Cell 75:959(1994)].

종양 괴사 인자-알파(TNF- α ; 또한 카렉틴(cachectin)으로 지칭됨; 'TNF'로 후술됨)는 주로, 내독소 또는 기타 자극에 응답하여 단핵세포 및 대식세포에 의해 17kD 단백질 아단위의 가용성 동중삼량체(homotrimer)로서 분비된다[참조: Smith, R.A. et al., J. Biol. Chem. 262:6951-6954 (1987)]. 막 결합된 26kD 전구체 형태의 TNF가 또한 문헌[참조: Kriegler, M. et al., Cell 53:45-53 (1988)]에 기술되어 있다.

누적된 증거들은 TNF가 다상유전성 생물학적 활성을 지니고 있는 조절성 사이토킨이라는 것을 나타낸다. 이들 활성으로는 지단백질 리파제 합성 억제('카렉틴' 활성)[참조: Beutler, B. et al., Nature 316:552 (1985)], 다형핵성 백혈구의 활성화[참조: Klebanoff, S.J. et al., J. Immunol. 136:4220 (1986); Perussia, B. et al., J. Immunol. 138:765 (1987)], 세포 성장 억제 또는 세포 성장 자극[참조: Vilcek, J. et al., J. Exp. Med. 163:632 (1986); Sugarman, B.J. et al., Science 230:943 (1985); Lachman, L.B. et al., J. Immunol. 138:2913 (1987)], 형질전환된 특정한 세포 유형에 대한 세포독성 작용[참조: Lachman, L.B. et al., 상기 문헌 참조; Darzynkiewicz, Z. et al., Canc. Res. 44:83 (1984)], 항바이러스 활성[참조: Kohase, M. et al., Cell 45:659 (1986); Wong, G.H.W. et al., Nature 323:819 (1986)], 골 흡수의 자극[참조: Bertolini, D.R. et al., Nature 319:516 (1986); Saklatvala, J., Nature 322:547 (1986)], 콜라게나제 및 프로스타글란딘 E2 생성 자극[참조: Dayer, J. M. et al., J. Exp. Med. 162:2163 (1985)]; 및 T 세포의 활성화[참조: Yokota, S. et al., J. Immunol. 140:531 (1988)], B 세포의 활성화[참조: Kehrli, J.H. et al., J. Exp. Med. 166:786 (1987)], 단핵세포의 활성화[참조: Philip, R. et al., Nature 323:86 (1986)], 흉선세포의 활성화[참조: Ranges, G.E. et al., J. Exp. Med. 167:1472 (1988)] 및 주요 조직적합성 복합체(MHC) 부류 I 및 부류 II 분자의 세포 표면 발현의 자극[참조: Collins, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:446 (1986); Pujol-Borrel, R. et al., Nature 326:304 (1987)]을 포함한 면역조절 작용이 있다.

TNF는 맥관성 내피 세포에 대한 응혈촉진제 활성의 유도[참조: Pober, J.S. et al., J. Immunol. 136:1680 (1986)], 호중구 및 임파구의 유착 증가[참조: Pober, J.S. et al., J. Immunol. 138:3319 (1987)] 및 대식세포, 호중구 및 맥관성 내피 세포로부터의 혈소판 활성화 인자의 방출 자극[참조: Camussi, G. et al., J. Exp. Med. 166:1390 (1987)]과 같은, 조직 손상을 야기시키는 염증 촉진 작용을 지닌 것으로 인지된다.

최근의 증거는, 예를 들어, 몇몇 악성 종양을 수반하는 카렉시(cachexia)[참조: Oliff, A. et al., Cell 50:555 (1987)], 및 자가 면역 병리학과 그래프트 대 숙주 병리학[참조: Piguet, P.F. et al., J. Exp. Med. 166:1280 (1987)]에서의, 수많은 감염증[참조: Cerami, A. et al., Immunol. Today 9:28 (1988)], 면역 장애, 신형성 병리학의 병원론에 TNF를 결부시키고 있다. 이와 같이 암 및 감염성 병리학에 TNF를 연관시키는 것은 종종 숙주의 이화작용 상태와 관련이 있다. 암 환자에서의 주요 문제점은 체중 감소인데, 이는 통상적으로 식욕불량과 관련이 있다. 전반적으로 수척해지는 것이 '카렉시'로서 공지되어 있다[참조: Kern, K. et al., J. Parent. Enter. Nutr. 12:286-298 (1988)]. 카렉시에는 점진적인 체중 감소, 식욕불량, 및 악성 종양 성장에 응답하여 체중의 지속적인 미란(erosion)이 포함된다. 따라서, 이러한 카렉시 상태는 실질적인 질병률과 관련이 있으며 암 사망율의 주요 원인이다. 수많은 연구 결과는 TNF가 암, 감염성 병리학 및 기타 이화대사 상태에 있어서 카렉시의 중요한 매개인자라는 것을 제시하고 있다.

TNF는 발열, 불쾌감, 식욕불량 및 카렉시를 포함한, 그람 음성 패혈증 및 내독성 속의 병리생리학적 결과에 중심적인 역할을 하는 것으로 간주된다[참조: Michie, H.R. et al., Br. J. Surg. 76:670-671 (1989);

Debets, J.M.H. et al., Second Vienna Shock Forum, p.463-466 (1989); Simpson, S.Q. et al., Crit. Care Clin. 5:27-47 (1989)]. 내독소는 TNF의 생성과 분비[참조: Kornbluth, S.K. et al., J. Immunol. 137:2585-2591 (1986)] 및 기타 사이토킨의 생성과 분비를 자극하는 강력한 단핵세포/대식세포 활성화인자이다. TNF는 내독소의 수많은 생물학적 효과를 모사할 수 있기 때문에, 내독소 관련된 장애의 임상적 발현에 책임이 있는 중추적인 매개인자인 것으로 결론지었다. TNF 및 기타 단핵세포-유도된 사이토킨은 내독소에 대한 대사성 및 신경호르몬성 응답을 매개한다[참조: Michie, H.R. et al., N. Eng. J. Med. 318:1481-1486 (1988)]. 사람 지원자에게 내독소를 투여하게 되면, 발열, 빈박증, 대사 속도 및 스트레스 호르몬 방출 증가를 포함한 인플루엔자 유사 증상을 나타내는 급성 질환이 발병된다[참조: Revhaug, A. et al., Arch. Surg. 123:162-170 (1988)]. 그람 음성 패혈증에 걸린 환자에서 순환성 TNF의 수준 상승이 또한 관찰되었다[참조: Waage, A. et al., Lancet 1:355:357 (1987); Hammerle, A.F. et al., Second Vienna Shock Forum p. 715-718 (1989); Debets, J.M.H. et al., Crit. Care Med. 17:489-497 (1989); Calandra, T. et al., J. Infect. Dis. 161:982-987 (1990)].

TNF를 중화시키는 것으로 지시된 수동 면역요법은 앞서 논의된 바와 같이, 그람 음성 패혈증과 내독혈증 병리 상태에서 TNF 생성 증가 및 TNF 수준 상승을 기초로 하여, 상기 그람 음성 패혈증과 내독혈증에 유익한 효과를 나타낼 수 있다. 카핵틴(이후 TNF와 동일한 것으로 밝혀짐)으로 특징화된 '조절인자' 물질에 대한 항체가 세라미(Cerami) 등의 EPO 공개특허공보 제0,212,489호(1987. 3. 4.)에 기술되어 있다. 이러한 항체는 진단적 면역검정 및 세균성 감염시의 속 치료법에 유용한 것으로 언급되어 있다. 루빈(Rubin) 등의 EPO 공개특허공보 제0,218,868호(1987. 4. 22.)에는 사람 TNF에 대한 항체, 이러한 항체를 분비하는 하이브리도마, 이러한 항체의 제조 방법, 및 TNF의 면역검정에서의 상기 항체의 용도가 기술되어 있다. 윤(Yone) 등의 EPO 공개특허공보 제0,288,088호(1988. 10. 26.)에는 mAbs를 포함한 항-TNF 항체, 및 병리학, 특히 가와사키 병리학 및 세균성 감염의 면역검정 진단법에서의 이들의 용도가 기술되어 있다. 가와사키 병리학 상태를 나타내는 환자의 체액[유아 급성 열성 점막피부의 림프절 증상; Kawasaki, T., Allergy 16:178 (1967); Kawasaki, T. Shonika(Pediatrics) 26:935(1985)]이 이러한 병리 상태를 진행시키는 것과 관련이 있는 TNF 수준 상승을 나타내는 것으로 알려져 있다(Yone et al., 상기 문헌 참조).

다른 연구가들은 시험관내에서 중화 활성을 갖는 재조합 사람 TNF에 대해 특이적인 mAbs를 기술하고 있다[참조: Liang, C. M. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854 (1986); Meager, A. et al., Hybridoma 6:305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6:359-369 (1987); Bringman, T.S. et al., Hybridoma 6:489-507 (1987); Hirai, M. et al., J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987); Moller, A. et al. (Cytokine 2:162-169 (1990))]. 이들 mAbs 중 몇몇을 사용하여 사람 TNF의 에피토프를 지도화하고 효소 면역검정을 개발하며[Fendly et al., 상기 문헌 참조; Hirai et al. 상기 문헌 참조; Moller et al., 상기 문헌 참조] 재조합 TNF의 정제를 촉진시킨다[Bringman et al. 상기 문헌 참조]. 그러나, 이들 연구는 면역원성, 특이성 및/또는 약제학적 적합성 결핍으로 인해, 사람에게서 사용된 생체내 진단적 또는 치료학적 용도를 위해 사용될 수 있는 TNF 중화 항체 생성에 관한 기본 개념을 제공하고 있지 않다.

TNF에 대한 중화 항체 또는 mAbs는 사람 이외의 포유동물에서 다양한 생리학적 변화를 없애고 실험상의 내독혈증 및 균혈증에서의 치사적 켈린지 후의 사망을 방지시켜주는 것으로 밝혀졌다. 이러한 효과는, 예를 들어, 설치류 치사율 검정과 영장류 병리학 모델 시스템에서 증명되었다[참조: Mathison, J.C. et al., J. Clin. Invest. 81:1925-1937 (1988); Beutler, B. et al., Science 229:869-871 (1985); Tracey, K.J. et al., Nature 330:662-664 (1987); Shimamoto, Y. et al., Immunol. Lett. 17:311-318 (1988); Silva, A.T. et al., J. Infect. Dis. 162:421-427 (1990); Opal, S.M. et al., J. Infect. Dis. 161:1148-1152 (1990); Hinshaw, L.B. et al., Circ. Shock 30:279-292 (1990)].

현재까지, 항-TNF mAb 치료법이 적용된 사람은 제한되었지만, 예를 들어, 관절염과 패혈증에서 유익한 치료학적 결과를 나타내고 있다[참조: Elliott, M.J. et al., Baillieres Clin. Rheumatol. 9:633-52 (1995); Feldmann M. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 766:272-8(1995); van der Poll, T. et al., Shock 3:1-12 (1995); Wherry et al., Crit. Care. Med. 21:S436-40 (1993); Tracey K.J., et al., Crit Care Med. 21:S415-22 (1993)].

포유동물의 성장은 세포의 증식과 분화 모두에 의존될 뿐만 아니라 아포프토시스를 통하여 일어나는 프로그램된 세포 사멸에 따른다[참조: Walker, et al., Methods Achiev. Exp. Pathol. 13:18 (1988)]. 아포프토시스는 자가 항체를 인식하는 면역 흥선세포의 파괴에 결정적인 역할을 한다. 이러한 정상적인 제거 프로세스의 실패는 자가면역 장애에서 중요한 역할을 할 수 있다[참조: Gammon et al., Immunology Today 12:193 (1991)].

문헌[Itoh et al., Cell 66:233 (1991)]에는 세포 표면 항원, 즉 아포프토시스를 매개하고 T-세포의 클로날 결실과 관련이 있는 Fas/CD230이 기술되어 있다. Fas는 활성화된 T-세포, B-세포, 호중구, 및 흥선, 간, 심장 및 폐 및 성장한 마우스의 난소[참조: Watanabe-Fukunaga et al., J. Immunol. 148:1274 (1992)]에서 발현된다. 모노클로날 Ab를 Fas에 가교결합시킨 실험에서는, 아포프토시스가

유도된다[참조: Yonehara et al., J. Exp. Med. 169:1747 (1989); Trauth et al., Science 245:301 (1989)]. 또한, Fas에 대한 모노클로날 Ab의 결합이 특정 조건하에서 T-세포에 자극적이라는 한 예가 있다[참조: Alderson et al., J. Exp. Med. 178:2231 (1993)].

Fas 항원은 상대 MW가 45kD인 세포 표면 단백질이다. Fas에 대한 사람 및 쥐과 유전자 모두를 문헌[참조: Watanabe-Fukunaga et al., J. Immunol. 148:1274 (1992) 및 Itoh et al., Cell 66:233 (1991)]에 의해 클로닝시킨다. 이들 유전자에 의해 암호화된 단백질은 둘다, 2개의 TNF 수용체를 포함하는 신경 성장 인자/종양 괴사 인자 수용체 상과, 저 친화성 신경 성장 인자 수용체 및 CD40, CD27, CD30 및 OX40에 대한 구조적 상동성을 지니고 있는 트랜스멤브레인 단백질이다.

최근에 Fas 리간드가 문헌에 기술되었다[참조: Suda et al., Cell 75:1169 (1993)]. 아미노산 서열은 Fas 리간드가 TNF 계열에 속하는 유형 II 트랜스멤브레인 단백질이라는 것을 지시하고 있다. 따라서, Fas 리간드 폴리펩타이드는 3가지 주 도메인, 즉 소수성 트랜스멤브레인 도메인에 의해 연결된, 아미노 말단에서의 세포내 도메인 및 카복시 말단에서의 보다 긴 세포외 도메인을 포함한다. Fas 리간드는 비장

세포와 흉선세포에서 발현되는데, 이는 T-세포 매개된 세포독성에 부합된다. 정제된 Fas 리간드는 MW가 40kD이다.

최근에, Fas/Fas 리간드 상호작용이 T-세포의 활성화에 수반되는 아포프토시스에 요구된다는 사실이 입증되었다[참조: Ju et al., Nature 373:444 (1995); Brunner et al., Nature 373:441 (1995)]. T-세포의 활성화로 인해, 세포 표면 상에서 양 단백질이 유도된다. 상기 리간드와 수용체간의 연속적인 상호작용으로 인해, 세포의 아포프토시스가 발생된다. 이는 정상적인 면역 반응 동안 Fas/Fas 리간드 상호작용에 의해 유도된 아포프토시스에 대한 가능한 조절 역할을 뒷받침해준다.

따라서, 병리학적 상태와 관련되는 TNF와 유사한 사이토킨을 제공할 필요가 있다. 이러한 신규의 사이토킨을 사용하여 TNF-유사 사이토킨과 관련된 장애의 치료를 위해 이들 TNF-유사 사이토킨을 결합시키는 신규의 항체 또는 기타 길항제를 제조할 수 있다.

발명의 요약

본 발명은 TNF 및 관련 사이토킨과 구조적으로 유사하고 유사한 생물학적 효과 및 활성을 갖고 있는 것으로 여겨지는 사이토킨을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 이러한 사이토킨은 뉴트로킨 α 로 명명되고 본 발명은 도 1의 아미노산 서열(서열 2) 또는 1996년 10월 22일자 ATCC 기탁물로서 세균성 숙주에 기탁된 cDNA 클론에 의해 암호화된 아미노산 서열의 적어도 한 부분을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 포함한다. 도 1에 도시된, 기탁된 뉴트로킨 α 클론을 서열화함으로써 결정된 뉴클레오타이드 서열(서열 1)은 N-말단 메티오닌, 약 46개 아미노산 잔기의 예정된 세포내 도메인, 약 26개 아미노산의 예정된 트랜스멤브레인 도메인, 약 213개 아미노산의 예정된 세포외 도메인 및 약 31kDa의 완전한 단백질에 대한 추정된 분자량을 포함하는 285개 아미노산 잔기의 완전한 폴리펩타이드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 함유한다. 다른 유형 II 트랜스멤브레인 단백질의 경우처럼, 가용성 형태의 뉴트로킨 α 는 트랜스멤브레인 도메인으로부터 절단된 세포외 도메인의 모든 부분 또는 일부분과, 트랜스멤브레인 도메인이 결여된, 즉 세포외 도메인이 세포내 도메인에 연결된 완전한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

따라서, 본 발명의 한 국면은 (a) 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 완전한 길이의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 도 1에서 위치 73 내지 285번의 아미노산 서열(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 예정된 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (c) 도 1에서 약 1번에서부터 약 46번까지의 아미노산 잔기(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 세포내 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (d) 도 1에서 약 47번에서부터 약 72번까지의 아미노산 잔기(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 트랜스멤브레인 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (e) 세포외 및 세포내 도메인을 지니고 있지만 트랜스멤브레인 도메인이 결여된 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (f) 상기 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에서의 뉴클레오타이드 서열 중의 어느 하나와 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다.

본 발명의 추가의 양태는 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)에서의 뉴클레오타이드 서열 중의 어느 하나와 90% 이상, 보다 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 또는 엄격한 하이브리드화 조건하에서 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)에서의 폴리뉴클레오타이드로 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함한다. 이와 같이 하이브리드화한 폴리뉴클레오타이드는 엄격한 하이브리드화 조건하에서 A 잔기만으로 이루어지거나 T 잔기만으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드로 하이브리드화하지 않는다. 본 발명의 부가의 핵산 양태는 상기 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에서의 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다.

본 발명은 본 발명의 분리된 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 및 이러한 재조합 벡터를 함유하는 숙주 세포에 관한 것이고, 또한, 이러한 벡터 및 숙주 세포의 제조 방법 및 이들을 재조합 기술에 의한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 생성에 사용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 추가로, (a) 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 완전한 길이의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 아미노산 서열; (b) 도 1에서 73번에서부터 285번까지의 아미노산 서열(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 예정된 세포외 도메인의 아미노산 서열; (c) 도 1에서 약 1번에서부터 약 46번까지의 아미노산 잔기(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 세포내 도메인의 아미노산 서열; (d) 도 1에서 약 47번에서부터 약 72번까지의 아미노산 잔기(서열 2) 또는 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 트랜스멤브레인 도메인의 아미노산 서열; 및 (e) 세포외 및 세포내 도메인을 지니고 있지만 트랜스멤브레인 도메인이 결여된 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 아미노산 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분리된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 제공한다.

본 발명의 폴리펩타이드는 또한 위에서 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에 기술된 것과 90% 이상의 유사성, 보다 바람직하게는 95% 이상 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드뿐만 아니라 위에서 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에 기술된 것과 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 더 바람직하게는 95%,

96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포괄한다.

이러한 본 발명의 국면의 부가 양태는 위에서 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에 기술된 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 발명의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드에는 6개 또는 7개 이상, 바람직하게는 9개 이상, 보다 바람직하게는 약 30개 이상 내지 약 50개의 아미노산을 갖는 폴리펩타이드의 일부분이 포함되지만, 상기한 본 발명의 폴리펩타이드의 전체 아미노산 서열을 포함하는 어떠한 길이의 에피토프-보유 폴리펩타이드도 본 발명에 포함된다. 또 다른 양태에서는, 본 발명이 위에서 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)에 기술된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합되는 분리된 항체를 제공한다.

본 발명은 추가로, 본원에 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드에 특이적으로 결합되는 항체의 분리 방법을 제공한다. 이러한 항체는 다음에 기술된 바와 같이 진단적으로 또는 치료적으로 유용하다.

본 발명은 또한, 예를 들어, 종양 및 종양 전이, 세균, 바이러스 및 기타 기생충에 의한 감염, 면역결핍증, 염증성 질환, 임파선증, 자가면역 질환, 그래프트 대 숙주 질환을 치료하고 말초 내성을 자극하며 몇몇 형질전환된 세포주를 파괴하고 세포 활성화 및 증식을 매개하는데 사용할 수 있고, 면역 조절 및 염증성 반응의 1차적인 매개인자로서 작용적으로 연결되어 있는 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드, 특히 사람 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 추가로, 시험관내 세포, 생체외 세포 및 생체내 세포, 또는 다중세포 유기체에 투여하기 위해 뉴트로킨 α 폴리뉴클레오티드 또는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 본 발명의 국면의 특히 바람직한 양태에서는, 상기 조성물이 질병 치료를 위해 숙주 유기체에서 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 뉴트로킨 α 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이와 관련하여 특히 바람직한 것은 뉴트로킨 α 유전자의 이상한 내인성 활성화와 연관이 있는 이상 기능을 치료하기 위해 환자에서 발현되는 것이다.

본 발명은 또한, 뉴트로킨 α 를 발현시키는 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계; 세포성 반응을 검정하는 단계; 및 이러한 세포성 반응을 표준 세포성 반응과 비교하는 단계를 포함하는, 뉴트로킨 α 에 의해 유도된 세포성 반응을 증진 또는 억제시킬 수 있는 화합물을 동정하기 위한 스크리닝 방법을 제공하며, 여기서, 상기 표준 세포성 반응은 후보 화합물의 부재하에 접촉이 이루어지기 때문에, 표준 반응에 비해 증가된 세포성 반응은 상기 화합물이 효능제라는 것을 지시해주고, 표준 세포성 반응에 비해 감소된 세포성 반응은 상기 화합물이 길항제라는 것을 지시해준다.

또 다른 국면에서는, 뉴트로킨 α 수용체를 동정하는 방법뿐만 아니라 이러한 수용체를 사용하여 효능제 및 길항제를 스크리닝하는 검정법을 제공한다. 이러한 검정법은 후보 화합물이 지니고 있는 효과가 뉴트로킨 α 수용체에 대한 뉴트로킨 α 의 결합에 대한 것인지를 측정하는 것을 포함한다. 특히, 상기 방법은 뉴트로킨 α 수용체를 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 및 후보 화합물과 접촉시키는 단계; 및 이러한 뉴트로킨 α 수용체에 대한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 결합이 상기 후보 화합물의 존재로 인해 증가되었는지 감소되었는지를 측정하는 단계를 포함한다. 상기 길항제를 사용하여 패혈증성 속, 염증, 뇌성 말라리아, HIV 바이러스의 활성화, 그래프트 대 숙주 거부반응, 골 흡수, 류마티스성 관절염 및 카핵시(쇠약 또는 영양실조증)를 예방할 수 있다.

본 발명자들은 뉴트로킨 α 가 호중구에서 발현될 뿐만 아니라, 신장, 폐, 말초 백혈구, 골수, T 세포 임파종, B 세포 임파종, 활성화된 T 세포, 위암, 평활근, 대식세포, 제대 혈액 조직에서 발현된다는 사실을 밝혀내었다. 종양 및 종양 전이, 세균, 바이러스 및 기타 기생충에 의한 감염, 면역결핍증, 패혈증성 속, 염증, 뇌성 말라리아, HIV 바이러스의 활성화, 그래프트 대 숙주 거부반응, 뼈 흡수, 류마티스성 관절염 및 카핵시(쇠약 또는 영양실조증) 등과 같은, 이들 조직 및 세포에 대한 수많은 장애의 경우에는, '표준' 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준, 즉 상기 장애를 갖지 않는 개인으로부터의 조직 또는 체액에서의 뉴트로킨 α 발현 수준에 비해 상당히 더 높거나 낮은 수준의 뉴트로킨 α 유전자 발현이 상기 장애를 갖는 개인으로부터 취한 특정 조직(예: 골수) 또는 체액(예: 혈청, 혈장, 뇨, 활액 또는 수액)에서 탐지될 수 있다. 따라서, 본 발명은 (a) 특정 개인의 세포 또는 체액에서 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준을 검정하는 단계 및 (b) 이러한 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준을 표준 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준과 비교하는 단계를 포함함으로써, 표준 발현 수준과 비교하여 상기와 같이 검정된 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소가 장애의 발생 여부를 지시해주는, 특정 장애의 진단 동안 유용한 진단 방법을 제공해준다.

본 발명의 부가의 국면은 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 분리된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 또는 이의 효능제를 포함하는 조성물을, 뉴트로킨 α 활성 수준을 증가시킬 필요가 있는 개인에게 투여함을 포함하여, 신체내에서의 뉴트로킨 α 활성 수준을 증가시킬 필요가 있는 상기 개인을 치료하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 추가의 국면은 치료학적으로 유효한 양의 뉴트로킨 α 길항제를 포함하는 조성물을, 뉴트로킨 α 활성 수준을 감소시킬 필요가 있는 개인에게 투여함을 포함하여, 신체내에서의 뉴트로킨 α 활성 수준을 감소시킬 필요가 있는 상기 개인을 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 뉴트로킨 α 단백질의 뉴클레오티드 서열(서열 1) 및 추론된 아미노산 서열(서열 2)을 제시한 것이다. 아미노산 1번 내지 46번은 세포내 도메인을 나타내고, 아미노산 47번 내지 72번은 트랜스멤브레인 도메인(밀줄친 서열)을 나타내며 아미노산 73번 내지 285번은 세포외 도메인(나머지 서열)을 나타낸다.

도 2는 'DNASar'로 명명된 컴퓨터 프로그램의 일부인 '메갈라인(Megalign)' 루틴에 의해 측정된, 뉴트로

킨 α 단백질의 아미노산 서열과 TNF- α (서열 3), TNF- β (림포톡신)(서열 4) 및 FAS 리간드(서열 5)의 서열간의 동일성 영역을 도시한 것이다.

도 3은 뉴트로킨 α 아미노산 서열의 분석 결과를 도시한 것이다. 알파, 베타, 턴 및 코일 영역; 친수성 및 소수성; 양극성 영역; 가요성 영역; 항원성 지수 및 표면 확률이 제시되어 있다. '항원성 지수-제임슨-울프(antigenic index-Jameson-Wolf)' 그래프에서, 뉴트로킨 α 단백질의 고도의 항원성 영역, 즉, 본 발명의 에피토프-보유 펩타이드가 수득될 수 있는 영역의 위치가 표시된다.

도 4는 HSOAD55R(서열 7), HSLAH84R(서열 8) 및 HLTBM08R(서열 9)로 명명된 본 발명의 관련된 사람 cDNA 클론과, 1996년 10월 22일자 ATCC 기탁물에 기탁된 사람 cDNA로부터 결정된 뉴트로킨 α 뉴클레오타이드 서열과의 선열(alignment)을 제시한 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 클로닝된 cDNA 뉴트로킨 α 를 서열화함으로써 결정되는, 도 1에 도시된 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 도 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1)은 1996년 10월 22일자로 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection; 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland)에 기탁된 HNEDU15 클론을 서열화함으로써 수득한다. 이와 같이 기탁된 클론은 pBluescript SK(-) 플라스미드(Stratagene, La Jolla, CA)에 함유되어 있다.

본 발명의 뉴트로킨 α 단백질은 TNF- α , TNF- β 및 Fas 리간드에 대한 사람 mRNA의 해독 생성물과 서열 상동성을 나타낸다(도 2). 앞서 언급한 바와 같이, TNF- α 는 세포독성, 괴사, 아포프토시스, 공자극, 증식, 림프절 형성, 면역글로불린 분류 스위치, 분화, 항바이러스 활성, 유착 분자 및 기타 사이토킨 및 성장 인자의 조절에 중요한 역할을 하는 사이토킨인 것으로 여겨진다.

핵산 분자

달리 지시하지 않을 경우, 본원에서 DNA 분자를 서열화함으로써 결정된 모든 뉴클레오타이드 서열은 자동화 DNA 서열화기(예: Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA 제조의 모델 373)를 사용하여 결정하였고 본원에서 결정된 DNA 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 모든 아미노산 서열은 상기와 같이 결정된 DNA 서열의 해독에 의해 추정된다. 따라서, 이러한 자동화 방법에 의해 결정된 DNA 서열에 대해 당해 분야에 공지된 바와 같이, 본원에서 결정된 어떠한 뉴클레오타이드 서열도 몇가지 오차를 포함할 수 있다. 자동화 분석기로 결정된 뉴클레오타이드 서열은 이와 같이 서열화된 DNA 분자의 실제적인 뉴클레오타이드 서열과 전형적으로는 약 90% 이상, 보다 전형적으로는 약 95% 이상 내지 약 99.9% 이상 동일하다. 실제적인 서열은 당해 분야에 널리 공지된 수동 DNA 서열화 방법을 포함한 기타 접근법에 의해 보다 정확하게 결정할 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 결정된 뉴클레오타이드 서열에서 실제적인 서열에 비해 1개의 삽입 또는 결실 서열은 이러한 뉴클레오타이드 서열의 해독에서 프레임 이동을 유발시키기 때문에, 예정된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 추정된 아미노산 서열이 상기 삽입 또는 결실 지점에서 시작하여, 상기와 같이 서열화된 DNA 분자에 의해 실제적으로 암호화된 아미노산 서열과 완전히 상이할 것이다.

핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드의 '뉴클레오타이드 서열'이란, DNA 분자 또는 폴리뉴클레오타이드의 경우에는, 데옥시리보뉴클레오타이드의 서열을 의미하고, RNA 분자 또는 폴리뉴클레오타이드의 경우에는, 상응하는 리보뉴클레오타이드 서열(A, G, C 및 U)을 의미하는데, 여기서 특정한 데옥시리보뉴클레오타이드 서열에서의 각각의 티미딘 데옥시리보뉴클레오타이드(T)가 리보뉴클레오타이드 단위(U)로 대체된다.

도 1에서의 뉴클레오타이드 서열과 같은 본원에 제공된 정보를 사용하여, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 본 발명의 핵산 분자를 표준 클로닝 및 스크리닝 과정, 예를 들어, 출발 물질로서 mRNA를 이용하여 cDNA를 클로닝하기 위한 과정을 사용하여 수득할 수 있다. 본 발명의 예시적인, 도 1에 도시된 핵산 분자(서열 1)가 호중구로부터 유도된 cDNA 라이브러리에서 발견되었다. 뉴트로킨 α cDNA의 일부분에 상응하는 발현된 서열 태그가 또한 호중구에서 발견되었다.

뉴트로킨 α 유전자는 약 46개 아미노산[도 1(서열 2)에서 약 1번에서부터 약 46번까지의 아미노산 잔기]의 세포내 도메인, 약 26개 아미노산[도 1(서열 2)에서 약 47번에서부터 약 72번까지의 아미노산 잔기]의 트랜스멤브레인 도메인, 약 213개 아미노산[도 1(서열 2)에서 약 73번에서부터 약 285번까지의 아미노산 잔기]의 세포외 도메인 및 약 31kDa의 추정된 분자량을 포함하는, 약 285개 아미노산 잔기의 단백질을 암호화하는 개방 판독 프레임을 함유한다. 도 1(서열 2)에 도시된 뉴트로킨 α 단백질은 GenBank에서 접수 번호 제339764호로서 접수될 수 있는 사람 TNF- α 와 약 20% 유사성을 나타내고 약 10%의 동일성을 나타낸다.

당해 분야의 숙련인이 인지할 수 있는 바와 같이, 앞서 논의된 서열화 오차 가능성으로 인해, 약 285개 아미노산을 포함하는, 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 실제적으로 완전한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 다소 짧을 수 있다. 특히, 상기와 같이 결정된 뉴트로킨 α 암호화 서열은 도 1(서열 2)에서 210번 내지 213번의 뉴클레오타이드 위치에, 개방 판독 프레임의 해독을 위한 대체 출발 코돈으로서 작용할 수 있는 두번째 메티오닌 코돈을 함유한다. 보다 일반적으로, 실제적인 개방 판독 프레임은 도 1(서열 1)에 도시된 N-말단으로부터의 첫번째 또는 두번째 메티오닌 코돈으로부터 추정되는 아미노산 ± 20 개 아미노산, 보다 전형적으로는 ± 10 개 아미노산의 범위일 수 있다. 각종 작용성 도메인을 동정하기 위해 사용된 분석 기준에 따라서, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 세포외, 세포내 및 트랜스멤브레인 도메인의 정확한 '주소'가 약간 상이할 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다. 예를 들어, 도 1(서열 2)에서 뉴트로킨 α 세포외 도메인의 정확한 위치는 이러한 도메인을 규정하기 위해 사용된 기준에 따라서 약간 다양할 수 있다(예를 들어, 상기 주소는 약 1 내지 약 20개 잔기, 보다 전형적으로는 약 1 내지 약 5개 잔기로 '이동'될 수 있다). 이러한 경우, 트랜스멤브레인 영역의 종결부와 세포외 도메인의 시작부는 도 3에 도시된 바와 같

이, 상기 지시된 위치에서의 소수성 아미노산 서열의 동정을 근거로 하여 추정된다. 어떠한 경우에서든, 다음에 논의되는 바와 같이, 본 발명은 추가로, 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 영역의 가용성 형태를 구성하는, 본원에 기술된 세포외 도메인의 N-말단으로부터의 하나 이상의 아미노산이 걸여된 폴리펩타이드를 포함하여, 완전한 폴리펩타이드의 N-말단으로부터 각종 잔기가 제거된 폴리펩타이드를 제공한다.

지시된 바와 같이, 본 발명의 핵산 분자는 mRNA 등의 RNA의 형태로 존재하거나, 예를 들어, 클로닝에 의해 수득되거나 합성적으로 생성된 게놈 DNA 및 cDNA를 포함한 DNA의 형태로 존재할 수 있다. 이러한 DNA는 이본체 또는 일본체일 수 있다. 일본체 DNA 또는 RNA는 센스 채로서 공지되기도 하는 암호화 채이거나, 또는 안티센스 채로서 지칭되기도 하는 비-암호화 채일 수 있다.

'분리된' 핵산 분자(들)란 이의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, 즉 DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 특정 벡터에 함유된 재조합 DNA 분자는 본 발명의 목적을 위해 분리된 것으로 간주된다. 분리된 DNA 분자의 추가의 예로는 이중 숙주 세포에 보유된 재조합 DNA 분자 또는 용액 중에 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) DNA 분자가 있다. 분리된 RNA 분자로는 본 발명의 DNA 분자의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체가 있다. 본 발명에 따르는 추가의 분리된 핵산 분자로는 합성적으로 생성된 상기 분자가 있다.

본 발명의 분리된 핵산 분자로는 도 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1) 147번에서부터 149번까지의 개시 코돈을 갖는 개방 판독 프레임(ORF)을 포함하는 DNA 분자가 있다. 또한, 본 발명의 분리된 핵산 분자로는 상기한 것과는 실질적으로 상이하지만, 유전적 암호의 변성으로 인해 여전히 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 분자가 있다. 물론, 이러한 유전적 암호는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 당해 분야의 숙련인은 통상적으로 위에서 언급한 변성 변이체를 생성시킬 수 있을 것이다. 또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 1996년 10월 22일자로 기탁된 플라스미드에 함유된 cDNA에 의해 암호화된 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 바람직하게는, 이러한 핵산 분자는 상기 언급된 기탁된 cDNA 클론에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 서열을 포함할 것이다.

본 발명은 추가로, 도 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1) 또는 상기 언급된 기탁된 클론에 함유된 뉴트로킨 α cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 분리된 핵산 분자, 또는 상기 서열 중의 어느 하나에 상보적인 서열을 갖는 핵산 분자를 제공한다. 이러한 분리된 분자, 특히 DNA 분자는 염색체로 동일계에서 하이브리드화함으로써 유전자 지도화하기 위한 프로브 및 예를 들어, 노던 블롯 분석에 의해 사람 조직에서 뉴트로킨 α 유전자의 발현을 탐지하기 위한 프로브로서 유용하다.

본 발명은 추가로, 본원에 기술된 뉴클레오타이드 서열의 일부분을 암호화하는 핵산 분자뿐만 아니라 본원에 기술된 분리된 핵산 분자의 단편에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 서열 1의 1번 내지 1001번으로 이루어진 서열 1의 일부분을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

추가로, 본 발명은 도 1에서 1번 내지 809번의 뉴클레오타이드 서열 중의 약 30개 이상의 연속되는 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 50개 이상의 연속되는 뉴클레오타이드의 어떠한 부분과도 95% 이상의 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

보다 일반적으로, 상기 기탁된 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 또는 도 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1)을 갖는 분리된 핵산 분자의 단편이란 본원에 논의된 바와 같은 진단 프로브 및 프라이머로서 유용한, 약 15개 이상의 nt, 보다 바람직하게는 약 20개 이상의 nt, 보다 더 바람직하게는 약 30개 이상의 nt, 가장 바람직하게는 약 40개 이상의 nt 길이의 단편을 의미한다. 물론, 50 내지 300개 nt 길이보다 큰 단편도 또한 본 발명에 유용한데, 전부는 아니지만 대부분의 기탁된 cDNA 또는 도 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1)에 상응하는 단편에 대해서도 마찬가지이다. 예를 들어, 20개 이상의 nt 길이의 단편이란, 상기 기탁된 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 또는 도 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열(서열 1)로부터의 20개 이상의 연속되는 염기를 포함하는 단편을 의미한다. 본 발명의 바람직한 핵산 단편은 도 1에서 확인되고 다음에 보다 상세히 기술되는 바와 같은 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 엄격한 하이브리드화 조건하에서 상기 언급된 본 발명의 핵산 분자, 예를 들어, 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론 중의 폴리뉴클레오타이드의 일부분으로 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. '엄격한 하이브리드화 조건'이란, 50% 포름아미드, 5xSSC(150mM NaCl, 15mM 시트르산삼나트륨), 50mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x 덴하르트 용액, 10% 덱스트란 설페이트, 및 변성되고 전단된 살모넬라 정액 DNA 20 μ g/ml를 함유하는 용액에서 42°C하에 밤새 배양한 다음, 약 65°C에서 0.1xSSC에서 상기 필터를 세척함을 의미한다.

폴리뉴클레오타이드의 '일부분'으로 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드란, 참조 폴리뉴클레오타이드의 약 15개 이상의 뉴클레오타이드(nt), 바람직하게는 약 20개 이상의 nt, 보다 바람직하게는 약 30개 이상의 nt, 가장 바람직하게는 약 30 내지 70개(예를 들어, 50개) nt로 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드(DNA 또는 RNA)를 의미한다. 이들은 상기 논의되고 다음에 상세히 기술되는 바와 같이 진단용 프로브 및 프라이머로서 유용하다.

'20개 이상의 nt 길이'의 폴리뉴클레오타이드의 일부분이란, 예를 들어, 참조 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열[예를 들어, 상기 기탁된 cDNA 또는 도 1(서열 1)에 도시된 뉴클레오타이드 서열]로부터 20개 이상의 연속되는 뉴클레오타이드를 의미한다. 물론, 폴리 A 서열(예를 들어, 도 1(서열 1)에 도시된 뉴트로킨 α cDNA의 3' 말단 폴리(A) 트랙)로만 하이브리드화하거나 T(또는 U) 잔기의 상보적 연장물만 하이브리드화하는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 핵산의 일부분으로 하이브리드화하기 위해 사용된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 포함되지 않을 것인데, 이는 이러한 폴리뉴클레오타이드가 폴리(A) 연장물 또는 이의 보체를 함유하는 어떠한 핵산 분자(예를 들어, 실제로 모든 이본체 cDNA 클론)으로도 하이브리드화할 수도 있기 때문이다.

지시된 바와 같이, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 본 발명의 핵산 분자에는 스스로 상기 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 아미노산 서열을 암호화하는 것; 및 상기 폴리펩타이드의 세포외 영역 및 부가

의 서열, 예를 들어, 세포내 및 트랜스멤브레인 도메인 서열을 암호화하는 것에 대한 암호화 서열, 또는 프리-, 프로- 또는 프리프로-단백질 서열; 앞서 언급된 부가의 암호화 서열을 갖거나 갖지않는, 상기 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 암호화 서열이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

또한, 본 발명의 핵산에 의해 암호화되는 것은 인트론 및 비-암호화 5' 및 3' 서열, 예를 들어, 전사, mRNA 프로세싱(스플라이싱 포함) 및 mRNA의 폴리아데닐화 시그널, 예를 들어, 리보솜 결합 및 안정성에 중요한 역할을 하는 전사된 비-해독된 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않은 부가의 비-암호화 서열; 및 부가의 작용기를 제공해주는 것과 같은 부가의 아미노산을 암호화하는 부가의 암호화 서열과 함께 상기 단백질 서열이다.

따라서, 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 마커 서열, 예를 들어, 융합된 폴리펩타이드의 정제를 촉진시키는 펩타이드를 암호화하는 서열과 융합시킬 수 있다. 이러한 본 발명의 국면의 특징한 바람직한 양태에서는, 마커 아미노산 서열이 수많은 시판품 중에서 핵사-히스티딘 펩타이드, 예를 들어, pQE 벡터 (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)에 제공된 태그이다. 문헌[참조: Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)]에 기술된 바와 같이, 핵사-히스티딘은 상기 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 'HA' 태그는 문헌[참조: Wilson et al., Cell 37:767 (1984)]에 기술된 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유도된 에피토프에 상응하는, 정제에 유용한 또 다른 펩타이드이다. 다음에 논의되는 바와 같이, 이러한 기타 융합 단백질에는 N- 또는 C-말단에서 Fc에 융합된 뉴트로킨 α 가 포함된다.

변이체 및 돌연변이체 폴리뉴클레오티드

본 발명은 추가로, 뉴트로킨 α 단백질의 일부분, 동족체 또는 유도체를 암호화하는, 본 발명의 핵산 분자의 변이체에 관한 것이다. 변이체는 천연적으로 생성될 수 있는데, 예를 들어, 천연의 대립유전자성 변이체이다. '대립유전자성 변이체'란, 특정 유기체의 염색체 상의 소정의 영역을 점유하고 있는 유전자의 몇몇 대체 형태 중의 하나를 의미한다[참조: Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)]. 비-천연 발생 변이체는 당해 분야에 공지된 돌연변이 기술을 이용하여 생성시킬 수 있다.

이러한 변이체로는 뉴클레오티드 치환, 결실 또는 부가에 의해 생성된 변이체가 있다. 이러한 치환, 결실 또는 부가는 하나 이상의 뉴클레오티드와 관련이 있을 수 있다. 이 변이체들을 암호화 영역, 비-암호화 영역 또는 둘 다에서 변형시킬 수 있다. 암호화 영역에서의 변형은 보존적이거나 비-보존적인 아미노산 치환, 결실 또는 부가물을 생성시킬 수 있다. 이들 중에서 특히 바람직한 것은 뉴트로킨 α 단백질 또는 이의 부분의 성질과 활성을 변형시키지 않는, 무중후성 치환, 부가 및 결실이다. 또한, 이와 관련하여 특히 바람직한 것은 보존적 치환이다.

가장 바람직한 것은 도 1에 도시된 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 단백질의 세포외 도메인 또는 기탁된 cDNA 클론에 의해 암호화된 뉴트로킨 α 아미노산 서열의 세포외 도메인을 암호화하는 핵산 분자이다. 추가의 양태는 (a) 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; (b) 도 1에서 73번 내지 285번의 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 추정된 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; (c) 상기 1996년 10월 22일자 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA에 의해 암호화된 완전한 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; (d) 상기 1996년 10월 22일자 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA에 의해 암호화된 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및 (e) 상기 (a), (b), (c) 또는 (d)에서의 뉴클레오티드 서열 중의 어느 것과도 상보적인 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드와 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자를 포함한다.

뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 참조 뉴클레오티드 서열과, 예를 들어, 95% 이상의 '동일성'을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드란, 폴리뉴클레오티드 서열이 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 참조 뉴클레오티드 서열의 각 100개 뉴클레오티드당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 제외하고는 상기 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 참조 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 달리 말하면, 참조 뉴클레오티드 서열과 95% 이상의 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서는, 참조 서열 중의 뉴클레오티드의 5% 이하를 결실시키거나 또 다른 뉴클레오티드로 치환시키거나, 참조 서열 중의 총 뉴클레오티드의 5% 이하의 뉴클레오티드 수가 참조 서열에 삽입할 수 있다. 이들 참조 서열의 돌연변이는 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 발생되거나, 또는 이들 말단 위치 사이 어느 곳에서도 발생할 수 있는데, 이는 참조 서열의 뉴클레오티드 내에 개별적으로 산재되어 있거나 참조 서열 내에서 하나 이상의 연속 그룹으로 산재되어 있다.

실제적인 사항으로서, 특정한 핵산 분자가 도 1에 도시된 뉴클레오티드 서열 또는 기탁된 cDNA 클론의 뉴클레오티드 서열과 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는지의 여부는 베스트피트(Bestfit) 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)과 같은 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 편리하게 결정할 수 있다. 베스트피트는 문헌[참조: Smith 및 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)]의 국소적 동종성 알고리즘을 이용하여 두 서열간의 가장 유사한 절편을 발견한다. 특정 서열이, 예를 들어, 본 발명에 따르는 참조 서열과 95%의 동일성을 나타내는지를 측정하기 위해 베스트비트 또는 기타 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 물론, 동일성 비율이 참조 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 대해 산정되고 참조 서열 중의 뉴클레오티드 총 수의 5% 이내의 상동성 값을 허용하도록 파라미터를 설정한다.

본 출원은 뉴트로킨 α 활성을 지닌 폴리펩타이드를 암호화하는지의 여부와는 상관없이, 도 1에 도시된 핵산 서열(서열 1) 또는 기탁된 cDNA의 핵산 서열과 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는 핵산 분자에 관한 것이다. 이는 특정한 핵산 분자가 심지어 뉴트로킨 α 활성을 지닌 폴리펩타이드를 암호화하지 않는 경우일지라도 당해 분야의 숙련인에게는 이러한 핵산 분자를, 예를 들어, 하이브

리드화 프로브 또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 프라이머로서 사용하는 방법이 여전히 공지되어 있기 때문이다. 뉴트로킨 α 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하지 않는 본 발명의 핵산 분자의 용도로는 특히, (1) cDNA 라이브러리에서 뉴트로킨 α 유전자 또는 이의 대립유전자성 변이체의 분리; (2) 문헌[참조: Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)]에 기술된 바와 같이 뉴트로킨 α 유전자의 정확한 염색체 위치를 제공하기 위한 중기 염색체성 확장물로의 동일계 하이브리드화(예: 'FISH'); 특이적 조직에서의 뉴트로킨 α mRNA 발현을 탐지하기 위한 노던 블롯 분석이 있다.

그러나, 실제로, 뉴트로킨 α 단백질 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는, 도 1에 도시된 핵산 서열(서열 1) 또는 기탁된 cDNA의 핵산 서열과 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는 핵산 분자가 바람직하다. '뉴트로킨 α 활성을 갖는 폴리펩타이드'란, 특정한 생물학적 검정에서 측정된 바와 같이, 본 발명의 세포외 도메인 또는 완전한 길이의 뉴트로킨 α 단백질의 활성과 유사하지만, 반드시 동일하지는 않는 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 뉴트로킨 α 단백질은 세포 증식, 세포독성 및 세포 사멸을 조절한다. 특정 세포에 대한 단백질의 효과를 측정하기 위한 시험관내 세포 증식, 세포독성 및 세포 사멸 검정은 세포 복제 및/또는 사멸을 탐지하는 것으로 당해 분야에 널리 공지되고 시판중인 시약을 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, TNF-관련된 단백질 활성에 대한 이러한 수많은 검정법이 상기 본원의 배경 기술에서의 각종 참조문헌에 기술되어 있다. 간략하게는, 이러한 검정법은 사람 또는 동물(예: 마우스) 세포를 수집하는 단계; 이를 (1) 뉴트로킨 α 단백질(또는 후보 폴리펩타이드)을 함유하는 형질감염된 숙주 세포-상등액 또는 (2) 형질감염되지 않은 숙주 세포-상등액 조절군과 혼합하는 단계; 및 특정 시간 동안 배양 후 세포 수 또는 생존성에 대한 효과를 측정하는 단계를 포함한다. 이러한 유형의 검정법에서 측정할 수 있는 상기 세포 증식 조절 활성은 중앙, 중앙 전이, 감염, 자가면역 질환, 염증 및 기타 면역 관련 질환을 치료하는데 유용하다.

뉴트로킨 α 는 상기한 검정법에서 용량 의존적 방식으로 세포 증식과 분화를 조절한다. 따라서, '뉴트로킨 α 단백질 활성을 갖는 폴리펩타이드'에는 상기한 검정법에서 용량 의존적 방식으로 동일한 세포 조절(특히, 면역조절) 활성 중의 어느 한 활성을 나타내는 폴리펩타이드가 포함된다. 용량 의존적 활성도가 뉴트로킨 α 단백질의 활성도와 동일할 필요는 없지만, 바람직하게는, '뉴트로킨 α 단백질 활성을 갖는 폴리펩타이드'는 뉴트로킨 α 단백질과 비교해서 소정의 활성에서 실질적으로 유사한 용량 의존성을 나타낼 것이다(즉, 후보 폴리펩타이드는 참조 뉴트로킨 α 단백질에 비해 보다 큰 활성 또는 약 25배 이하, 바람직하게는 약 10배 이하의 활성을 나타낼 것이다).

TNF 계열의 다른 구성원처럼, 뉴트로킨 α 는 예를 들어, 단핵세포, 임파구 및 호중구를 포함한 백혈구에 대한 활성을 나타낸다. 이러한 이유로 인해, 뉴트로킨 α 는 이들 세포 유형의 증식, 분화 및 이동을 지시하는데 있어서 활성을 나타낸다. 이러한 활성은 면역 증강 또는 억제, 골수보호, 간 세포 고정화, 급성 및 만성 염증 제어 및 백혈병 치료에 유용하다. 이러한 활성을 측정하는 검정법이 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Peters et al., Immun. Today 17:273 (1996); Young et al., J. Exp. Med. 182:1111 (1995); Caux et al., Nature 390:258 (1992); 및 Santiago-Schwarz et al., Adv. Exp. Med. Biol. 378:7 (1995)].

물론, 유전적 암호의 변성으로 인해, 당해 분야의 숙련인은 기탁된 cDNA의 핵산 서열 또는 도 1에 도시된 핵산 서열(서열 1)과 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는 서열을 갖는 핵산 분자의 상당수가 '뉴트로킨 α 단백질 활성을 갖는' 폴리펩타이드를 암호화할 것이라는 것을 즉시 인식할 것이다. 사실상, 이들 뉴클레오타이드 서열의 변성 변이체는 모두 동일한 폴리펩타이드를 암호화하기 때문에, 상기 언급된 비교 검정법을 수행하지 않는 경우일지라도 당해 분야의 숙련인은 이러한 사실을 명백히 인식할 것이다. 변성 변이체가 아닌 핵산 분자의 경우, 상당수가 뉴트로킨 α 단백질 활성을 지닌 폴리펩타이드를 암호화할 것이라는 것도 또한 당해 분야에 인식될 것이다. 이는 다음에 추가로 기술되는 바와 같이, 당해 분야의 숙련인은 단백질 기능에 실질적인 영향을 덜 미치거나 전혀 미치지 않는 아미노산 치환(예를 들어, 하나의 치환측 아미노산을 제2의 치환측 아미노산으로 대체시킴)을 충분히 인지하고 있기 때문이다.

벡터 및 숙주 세포

본 발명은 또한 본 발명의 분리된 DNA 분자를 포함하는 벡터, 재조합 벡터로 유전공학적으로 처리된 숙주 세포, 및 재조합 기술에 의해 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 생성시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 벡터는, 예를 들어, 파지, 플라스미드, 바이러스성 또는 레트로바이러스성 벡터일 수 있다. 레트로바이러스성 벡터는 복제 수용성 또는 복제 결핍성일 수 있다. 후자의 경우, 바이러스성 증식은 일반적으로 보충성 숙주 세포에서만 발생될 것이다. 당해 폴리뉴클레오타이드를 특정 숙주에서의 증식을 위한 선별성 마커를 함유하는 벡터에 연결할 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물, 예를 들어, 인산칼슘 침전물로 도입되거나 전하를 띤 지질과의 복합체로 도입된다. 이러한 벡터가 바이러스인 경우, 적당한 패키징 세포주를 사용하여 시험관내에서 패키징한 다음, 숙주 세포 내로 형질도입할 수 있다.

DNA 삽입체를 적절한 프로모터, 예를 들어, 파지 람다 PL 프로모터, 이. 콜라이 lac, trp, phoA 및 tac 프로모터, SV 어얼리 및 레이트 프로모터 및 레트로바이러스성 LTRs의 프로모터에 작동적으로 연결시켜야 한다. 기타 적합한 프로모터는 당해 분야의 숙련인에게 공지되어 있을 것이다. 발현 작제물은 전사 개시 부위, 종결 부위, 및 전사된 영역에서 해독을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 상기 작제물에 의해 발현된 전사체의 세포외 도메인의 암호화 부분은 바람직하게는 해독될 폴리펩타이드의 말단에 적절하게 위치한 도입부에서의 해독 개시 및 종결 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 것이다.

지시한 바와 같이, 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선별성 마커를 포함할 것이다. 이러한 마커로는 디하이드로폴레이트 리덕타제, G418, 또는 진핵성 세포 배양을 위한 네오마이신 내성 및 이. 콜라이 및 기타 세균에서의 배양을 위한 테트라사이클린, 카나마이신 또는 앰피실린 내성을 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예로는 세균성 세포, 예를 들어, 이. 콜라이, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 및 살모넬라 티피무름(*Salmonella typhimurium*) 세포; 진균성 세포, 예를 들어, 효모 세포; 곤충 세포, 예를 들어

어, 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도프테라(Spodoptera) Sf9 세포; 동물 세포, 예를 들어, CHO, COS, 293 및 보웬스(Bowes) 흑색종 세포; 및 식물 세포가 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 언급된 숙주 세포에 적절한 배양 배지 및 조건은 당해 분야에 공지되어 있다.

세균에서 사용하기에 바람직한 벡터로는 pQE70, pQE60 및 pQE-9(공급원: QIAGEN, Inc., 상기 참조); pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A(공급원: Stratagene); 및 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5(공급원: Pharmacia)이 있다. 바람직한 진핵성 벡터는 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG(공급원: Stratagene); 및 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL(공급원: Pharmacia)가 있다. 기타 적합한 벡터가 당해 분야의 숙련인에게는 용이하게 명백할 것이다.

작제물의 숙주 세포로의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 양이온성 지질 매개된 형질감염, 전기천공(electroporation), 형질도입, 감염 또는 기타 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 실험 매뉴얼, 예를 들어, 문헌[참조: Davis, et al., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)]에 기술되어 있다.

당해 폴리펩타이드는 용합 단백질과 같이 변형된 형태로 발현시킬 수 있으며, 분비 시그널 뿐만 아니라 부가의 이중 작용성 영역도 포함할 수 있다. 예를 들어, 부가의 아미노산, 특히 전하를 띤 아미노산의 특정 영역을 당해 폴리펩타이드의 N-말단에 가하여 정제 동안 또는 연속적인 조작 및 저장 동안 숙주 세포에서의 안정성과 내구성을 증진시킬 수 있다. 또한, 펩타이드 잔기를 상기 폴리펩타이드에 가하여 정제를 촉진시킬 수 있다. 이러한 영역은 폴리펩타이드를 최종적으로 제조하기 이전에 제거할 수 있다. 분비 또는 배출을 야기시키고, 안정성을 증진시키며 정제를 촉진시키기 위해 폴리펩타이드에 펩타이드 잔기를 가하는 것은 당해 분야에 잘 알려진 통상적인 기술이다. 바람직한 용합 단백질은 단백질을 안정화시키고 정제시키는데 유용한 면역글로불린으로부터의 이중 영역을 포함한다. 예를 들어, EP-A-0 464 533(캐나다 대상공보 제2045869호)에는 면역글로불린 분자의 불변 영역의 각종 부분을 또 다른 사람 단백질 또는 이의 일부와 함께 포함하는 용합 단백질이 기술되어 있다. 많은 경우에 있어서, 용합 단백질에 서의 Fc 부분은 치료 및 진단에 사용하기에 상당히 유리하므로, 예를 들어, 약리학적 성질이 개선된다(EP-A 0232 262). 한편, 몇몇 용도의 경우에는, 용합 단백질을 기술된 유리한 방식으로 발현시키고, 탐지하고 정제시킨 후에, Fc 부분을 제거할 수 있는 것이 바람직할 것이다. 이는 Fc 부분이 치료 및 진단에 사용하기 위해 방해된 것으로 입증되는 경우, 예를 들어, 용합 단백질을 면역화하기 위한 항원으로서 사용해야 하는 경우에 해당된다. 약물 개발에 있어서는, 예를 들어, hIL-5 등의 사람 단백질을 고-처리량 스크리닝 검정을 위해 Fc 부분과 융합시켜 hIL-5의 길항제를 동정하였다[참조: D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995) 및 K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995)].

뉴트로킨 α 단백질은 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로즈 크로마토그래피, 소수성 상호반응 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 액틴 크로마토그래피를 포함한 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제할 수 있다. 가장 바람직하게는, 고성능 액체 크로마토그래피('HPLC')가 정제에 이용된다. 본 발명의 폴리펩타이드는 천연의 정제 생성물, 화학적 합성 과정의 생성물, 및 세균, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함한 원핵성 및 진핵성 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물을 포함한다. 재조합 생산 과정에 이용된 숙주에 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 당화되거나 비-당화될 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 몇몇 경우에는 숙주 매개된 프로세스의 결과로서, 초기 변형된 메티오닌 잔기를 포함할 수도 있다.

뉴트로킨 α 폴리펩타이드 및 단편

본 발명은 추가로, 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 아미노산 서열 또는 도 1에서의 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드, 또는 이러한 폴리펩타이드의 일부분을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제공한다.

변이체 및 돌연변이체 폴리펩타이드

뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 특성을 개선시키거나 변형시키기 위해서, 단백질 유전 공학적으로 조작할 수 있다. 당해 분야의 숙련인에게 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여, 단일 또는 다중 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 용합 단백질을 포함한 신규의 돌연변이체 단백질 또는 '유테인'을 생성시킬 수 있다. 이와 같이 변형된 폴리펩타이드는, 예를 들어, 증진된 활성 또는 증가된 안정성을 나타낼 수 있다. 또한, 이들을 고수율로 정제할 수 있으며, 적어도 특성의 정제 및 저장 조건하에서는 상응하는 천연 폴리펩타이드보다 우수한 용해도를 나타낸다.

N-말단 및 C-말단 결실 돌연변이체

예를 들어, 세포외 도메인 또는 성숙한 형태의 분비된 단백질을 포함한 많은 단백질의 경우, 하나 이상의 아미노산이 실질적인 생물학적 기능의 손실 없이도 N-말단 또는 C-말단으로부터 제거될 수 있다는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[참조: Ron et al., J.Biol. Chem., 268:2984-2988 (1993)]에는 3, 8 또는 27 아미노-말단 아미노산 잔기가 생략된 경우에도 헤파린 결합 활성을 나타내는 변형된 KGF 단백질이 보고되었다.

본 발명의 경우에는, 본 발명의 단백질이 TNF 폴리펩타이드 계열의 한 구성원이기 때문에, 도 1(서열 2)에서 191번 위치의 Gly(G)까지의 N-말단 아미노산의 결실도 몇몇 생물학적 활성, 예를 들어, 적절한 표적 세포에 대한 세포독성을 유지할 수 있다. Gly(G) 잔기를 포함한 추가의 N-말단 결실을 갖는 폴리펩타이드는 이러한 생물학적 활성을 유지하지 않는 것으로 예상되는데, 이는 TNF-관련 폴리펩타이드에서의 상기 잔기가 생물학적 활성에 필요한 보존 도메인의 시작 지점이기 때문인 것으로 공지되어 있다. 그러나,

특정 단백질의 N-말단으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실로 인해 상기 단백질의 하나 이상의 생물학적 기능 상실의 변형이 야기되는 경우일지라도, 다른 생물학적 활성은 유지시킬 수 있다. 따라서, 단축된 단백질의 완전한 또는 세포와 도메인을 인식하는 항체를 유도하여 이에 결합되는 상기 단백질의 능력은 일반적으로, 상기 단백질의 완전한 또는 세포와 도메인의 대다수의 잔기가 N-말단으로부터 제거되는 것이 아닌 경우에는 유지될 것이다. 완전한 단백질의 N-말단 잔기가 결여된 특정한 폴리펩타이드가 이러한 면역학적 활성을 유지하고 있는지의 여부는 본원에 기술된 통상의 방법 및 당해 분야에 공지된 기타 방법에 의해 용이하게 측정할 수 있다.

따라서, 본 발명은 추가로, 아미노 말단으로부터의 Gly 191 잔기까지, 도 1(서열 2)에 도시된 뉴트로킨 α 의 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터의 하나 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드, 및 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특히, 본 발명은 서열 2의 잔기 n-190(여기서, n은 2 내지 190의 범위내의 정수이다)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 191은 뉴트로킨 α 단백질의 활성에 필요한 것으로 여겨지는 완전한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드(서열 2에 제시됨)의 N-말단으로부터 첫번째 잔기의 위치이다. 보다 특히, 본 발명은 서열 2의 잔기 2-285, 3-285, 4-285, 5-285, 6-285, 7-285, 8-285, 9-285, 10-285, 11-285, 12-285, 13-285, 14-285, 15-285, 16-285, 17-285, 18-285, 19-285, 20-285, 21-285, 22-285, 23-285, 24-285, 25-285, 26-285, 27-285, 28-285, 29-285, 30-285, 31-285, 32-285, 33-285, 34-285, 35-285, 36-285, 37-285, 38-285, 39-285, 40-285, 41-285, 42-285, 43-285, 44-285, 45-285, 46-285, 47-285, 48-285, 49-285, 50-285, 51-285, 52-285, 53-285, 54-285, 55-285, 56-285, 57-285, 58-285, 59-285, 60-285, 61-285, 62-285, 63-285, 64-285, 65-285, 66-285, 67-285, 68-285, 69-285, 70-285, 71-285, 72-285, 73-285, 74-285, 75-285, 76-285, 77-285, 78-285, 79-285, 80-285, 81-285, 82-285, 83-285, 84-285, 85-285, 86-285, 87-285, 88-285, 89-285, 90-285, 91-285, 92-285, 93-285, 94-285, 95-285, 96-285, 97-285, 98-285, 99-285, 100-285, 101-285, 102-285, 103-285, 104-285, 105-285, 106-285, 107-285, 108-285, 109-285, 110-285, 111-285, 112-285, 113-285, 114-285, 115-285, 116-285, 117-285, 118-285, 119-285, 120-285, 121-285, 122-285, 123-285, 124-285, 125-285, 126-285, 127-285, 128-285, 129-285, 130-285, 131-285, 132-285, 133-285, 134-285, 135-285, 136-285, 137-285, 138-285, 139-285, 140-285, 141-285, 142-285, 143-285, 144-285, 145-285, 146-285, 147-285, 148-285, 149-285, 150-285, 151-285, 152-285, 153-285, 154-285, 155-285, 156-285, 157-285, 158-285, 159-285, 160-285, 161-285, 162-285, 163-285, 164-285, 165-285, 166-285, 167-285, 168-285, 169-285, 170-285, 171-285, 172-285, 173-285, 174-285, 175-285, 176-285, 177-285, 178-285, 179-285, 180-285, 181-285, 182-285, 183-285, 184-285, 185-285, 186-285, 187-285, 188-285, 189-285, 190-285의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 이들 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

유사하게, 생물학적으로 작용성인 C-말단 결실 유테인의 많은 예가 공지되어 있다. 예를 들어, 인터페론 감마는 이러한 단백질의 카복시 말단으로부터의 8 내지 10개의 아미노산 잔기를 결실시킴으로써 10배 이하의 보다 높은 활성을 나타낸다[참조: Döbeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)]. 본 발명의 단백질이 TNF 폴리펩타이드 계열의 한 구성원이기 때문에, 284번 위치의 Leu까지의 C-말단 아미노산의 결실도 전부는 아니지만 대부분의 생물학적 활성, 예를 들어, 수용체 결합 및 세포 복제의 조절을 유지하는 것으로 예상된다. 약 10개 이하의 부가의 C-말단 잔기(즉, 273번 위치의 Gly까지)의 결실을 갖는 폴리펩타이드가 또한 수용체 결합과 같은 몇몇 활성을 보유할 수 있긴 하지만, 이러한 폴리펩타이드는 약 Leu284에서 시작하는 보존된 TNF 도메인의 일부분이 결여될 수도 있다. 그러나, 특정 단백질의 C-말단으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실로 인해 상기 단백질의 하나 이상의 생물학적 기능 상실의 변형이 야기되는 경우일지라도, 다른 생물학적 활성은 유지될 수 있다. 따라서, 완전한 또는 성숙한 단백질을 인식하는 항체를 유도하여 이에 결합되는 단축된 단백질의 능력은 일반적으로 상기 완전한 또는 성숙한 단백질의 대다수의 잔기가 C-말단으로부터 제거되는 것이 아닌 경우에는 유지될 것이다. 완전한 단백질의 C-말단 잔기가 결여된 특정한 폴리펩타이드가 이러한 면역학적 활성을 유지하고 있는지의 여부는 본원에 기술된 통상의 방법 및 당해 분야에 공지된 기타 방법에 의해 용이하게 측정할 수 있다.

따라서, 본 발명은 추가로 카복시 말단으로부터의 Gly274 잔기까지, 도 1(서열 2)에 도시된 뉴트로킨 α 의 아미노산 서열의 카복시 말단으로부터의 하나 이상의 잔기를 갖는 폴리펩타이드, 및 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특히, 본 발명은 서열 2에서의 아미노산 서열의 잔기 1-m(여기서, m은 274 내지 284의 범위 내의 정수이다)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 보다 특히, 본 발명은 서열 2의 잔기 1-274, 1-275, 1-276, 1-277, 1-278, 1-279, 1-280, 1-281, 1-282, 1-283 및 1-284의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 또한 제공한다.

또한, 일반적으로 서열 2의 잔기 n-m(여기서, n 및 m은 위에서 언급한 바와 같은 정수이다)를 갖는 것으로 기술될 수 있는, 아미노 말단과 카복시 말단 모두로부터 결실된 하나 이상의 아미노산을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 이에는 또한 상기 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 완전한 뉴트로킨 α 아미노산 서열의 일부분으로 구성되는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 포함되며, 여기서, 상기 부분은 상기 기탁된 클론 중의 cDNA 클론에 의해 암호화된 완전한 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터의 1에서 190번까지의 아미노산 또는 C-말단으로부터의 1에서 11번까지의 아미노산(또는 이들 N-말단과 C-말단 결실의 조합)은 배제한다. 이들 결실 폴리펩타이드의 모두를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 또한 제공한다.

기타 돌연변이체

상기 논의된 단백질의 말단 결실 형태 이외에, 당해 분야의 숙련인은 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 몇몇 아미노산 서열을 이러한 단백질의 구조 또는 기능에 상당한 영향을 미치지 않고서도 변화시킬 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이러한 서열 상의 차이가 고려되는 경우에는, 활성을 결정하는 단백질 상의 중요한 영역이 있다는 것을 기억해야 한다.

따라서, 본 발명은 추가로 실질적인 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 활성을 나타내거나 다음에 논의된 단백질

부분과 같이 뉴트로킨 α 단백질 영역을 포함하는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 변이체를 포함한다. 이러한 돌연변이체로는 결실, 삽입, 반전, 반복, 및 활성화에 대해 거의 영향을 미치지 않는 것으로 당해 분야에 공지된 일반적인 원칙에 따라서 선택된 유형의 치환 변이체가 있다. 예를 들어, 표현형적으로 잠재성 아미노산 치환 변이체를 만드는 방법에 관한 지침이 문헌[참조: Bowie, J.U. et al., 'Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions', Science 247:1306-1310 (1990)]에 제시되어 있으며, 상기 문헌에서 저자는 아미노산 서열 변화 내성을 연구하기 위한 두가지 주요 접근법이 있다는 것을 지시하고 있다. 첫 번째 방법은 돌연변이가 자연적인 선택에 의해 수용되거나 거부되는 진화 과정에 따른다. 두 번째 접근법은 유전공학을 이용하여 클로닝된 유전자의 특정 위치에 아미노산 변화 또는 선택을 도입하거나 작용성을 유지하는 서열을 동정하기 위해 스크리닝한다.

상기 저자가 언급한 바와 같이, 이들 연구 결과는, 단백질이 놀랍게도 아미노산 치환에 내성인 것으로 밝혀졌다. 또한, 저자는 아미노산 변화는 아마도 상기 단백질의 특정 위치에서 허용 가능하다는 것을 지시하고 있다. 예를 들어, 대부분의 아미노산 잔기는 비극성 측쇄를 필요로 하는 반면, 표면 측쇄의 극소수의 양상은 일반적으로 보존된다. 이러한 기타 표현형적 잠재성 치환이 문헌[Bowie, J. U. et al., 상기 문헌 참조] 및 본원에서 인용된 기타 참조문헌에 기술되어 있다. 전형적으로 보존적 치환으로 볼 수 있는 것은 지방족 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile의 서로간의 대체; 하이드록실 잔기 Ser 및 Thr의 상호교환; 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환; 아미드 잔기 Asn 및 Gln간의 치환; 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환; 및 방향족 잔기 Phe, Tyr간의 대체이다.

따라서, 도 1(서열 2)의 폴리펩타이드 또는 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 단편, 유도체 또는 동족체는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존되거나 보존되지 않는 아미노산 잔기(바람직하게는 보존된 아미노산 잔기)로 치환되고 이와 같이 치환된 아미노산 잔기가 유전자 암호에 의해 암호화된 것이거나 아닐 수 있는 것, (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환체 그룹을 포함하는 것, (iii) 폴리펩타이드의 세포외 도메인이 또다른 화합물, 예를 들어, 폴리펩타이드의 반감기를 증가시키는 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)과 융합되는 것, 또는 (iv) IgG Fc 융합 영역 펩타이드, 리더 또는 분비성 서열, 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 정제를 위해 사용되는 서열, 또는 프로단백질 서열과 같은 부가의 아미노산이 성숙한 폴리펩타이드와 융합되는 것일 수 있다. 본 명세서의 교시로부터 당해 기술 분야의 숙련인은 상기 단편, 유도체 및 동족체가 본 발명의 범주내에 있다고 간주할 수 있다.

따라서, 본 발명의 뉴트로킨 α 은 천연 돌연변이 또는 사람에 의한 조작으로부터의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가물을 포함할 수 있다. 지시된 바와 같이, 변화는 바람직하게는 단백질의 폴딩이나 활성화에 실질적인 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환과 같은 부차적 특성이다(표 1 참조).

[표 1]

보존적 아미노산 치환

방향족	페닐알라닌
	트립토판
	티로신
소수성	루이신
	이소루이신
	발린
극성	글루타민
	아스파라긴
염기성	아르기닌
	리신
	히스티딘
산성	아스파르트산
	글루탐산
소량	알라닌
	세린
	트레오닌
	메티오닌
	글리신

기능에 필수적인 본 발명의 뉴트로킨 α 단백질에서의 아미노산은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어, 부위 지시된 돌연변이 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이[참조: Cunningham 및 Wells, Science 244:1081-1085 (1989)]에 의해 동정할 수 있다. 후자 방법은 상기 분자에서 각각의 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입시킨다. 이어서, 이로써 생성된 돌연변이체 분자를 대상으로 하여, 수용체 결합 또는 생체내 또는 시험관내 증식 활성화와 같은 생물학적 활성을 시험한다.

특히 관심있는 것은, 고도로 바람직한 개선된 특징, 예를 들어, 덜 응집되는 특징을 지닌 단백질을 생성

시킬 수 있는, 전하를 띤 아미노산을 전하를 띠거나 중성인 기타 아미노산으로 치환하는 것이다. 응집은 활성을 저하시킬 뿐만 아니라 약제학적 제형을 제조할 때 문제를 일으키는데, 이는 응집체가 면역원성일 수 있기 때문이다[참조: 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)].

아미노산의 대체는 세포 표면 수용체에 대한 리간드의 결합 선택성을 변화시킬 수도 있다. 예를 들어, 문헌[참조: Ostade et al., Nature 361:266-268 (1993)]에는 2가지의 공지된 유형의 TNF 수용체 중의 어느 하나에 대한 TNF- α 의 선택적인 결합을 가져오는 특정한 돌연변이가 기술되어 있다. 뉴트로킨 α 는 TNF 폴리펩타이드 계열의 구성원이기 때문에, TNF- α 에서와 유사한 돌연변이가 아마도 뉴트로킨 α 에서 유사한 효과를 나타내는 것으로 보인다.

결정화, 핵 자기 공명 또는 광선화성 표지화 등의 구조적 분석에 의해 리간드-수용체 결합에 중요한 부위를 결정할 수도 있다[참조: Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) 및 de Vos et al., Science 255:306-312 (1992)]. 뉴트로킨 α 는 TNF-관련 단백질 계열의 구성원이기 때문에, 뉴트로킨 α 의 생물학적 활성을 완전히 제거하기 보다는 조절시키기 위해서는, TNF 보존된 도메인 중의 아미노산을 암호화하는 서열, 즉 도 1(서열 2)의 191번 내지 284번의 서열, 보다 바람직하게는 TNF 계열의 모든 구성원에 보존되지 않은 영역 내의 잔기에서 돌연변이를 발생시키는 것이 바람직하다. 이러한 보존된 아미노산이 전형적으로 관련된 TNF에서 발견되는 위치의 뉴트로킨 α 에서 특이적 돌연변이를 발생시킴으로써, 뉴트로킨 α 는 길항제로서 작용하므로 항원성 활성을 보유했을 것이다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 뉴트로킨 α 돌연변이체를 포함한다. 이러한 뉴트로킨 α 돌연변이체는 도 1에 제시된 완전한 길이의 뉴트로킨 α 아미노산 서열(서열 2) 또는 바람직하게는 이러한 서열의 세포외 도메인으로 구성된다. 또한, 이러한 뉴트로킨 α 돌연변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드가 본 발명의 일부를 형성한다.

본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 분리된 형태로 제공되며, 실질적으로 정제된 형태가 바람직하다. 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 재조합적으로 생성된 버전은 문헌[참조: Smith and Johnson, Gene 67:31-40 (1988)]에 기술된 1-단계 방법에 의해 실질적으로 정제될 수 있다.

본 발명의 폴리펩타이드는 상기 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 세포내, 트랜스멤브레인 또는 세포외 도메인; 단백질의 세포외 도메인 마이너스 세포내 및 트랜스멤브레인 영역; 도 1(서열 2)의 완전한 폴리펩타이드; 도 1(서열 2)의 세포외 도메인 마이너스 세포내 및 트랜스멤브레인 도메인을 포함한, 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 완전한 폴리펩타이드, 뿐만 아니라 상기 기술된 것과 90% 이상의 유사성, 보다 바람직하게는 95% 이상의 유사성, 보다 더 바람직하게는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 유사성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

추가로, 본 발명의 폴리펩타이드는 기탁된 cDNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드 또는 도 1(서열 2)의 폴리펩타이드와 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 또는 95% 이상, 보다 더 바람직하게는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 폴리펩타이드를 포함하고, 또한 30개 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 50개 이상의 아미노산을 갖는 상기 폴리펩타이드의 일부분을 포함한다.

2개의 폴리펩타이드에 대한 '% 유사성'이란, 베스트피트 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 사용하여 두 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 비교한 다음 유사성을 측정하기 위해 데이터를 설정함으로써 수득된 유사성 점수를 의미한다. 베스트피트는 문헌[참조: Smith 및 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)]의 국소적 동종성 알고리즘을 이용하여 두 서열간의 가장 유사한 절편을 발견한다.

뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 참조 아미노산 서열과, 예를 들어, 95% 이상의 '동일성'을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드란, 이러한 폴리펩타이드 서열이 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 참조 아미노산 서열의 각 100개 아미노산당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 제외하고는 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 참조 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 달리 말하면, 참조 아미노산 서열과 95% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 수득하기 위해서는, 참조 서열 중의 아미노산 잔기의 5% 이하를 결실시키거나 또 다른 아미노산으로 치환시킬 수 있거나, 참조 서열 중의 총 아미노산 잔기의 5% 이하의 아미노산 수를 참조 서열에 삽입할 수 있다. 이들 참조 서열의 돌연변이는 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카복시 말단 위치에서 발생되거나, 또는 이들 말단 위치 사이 어느 곳에서도 발생할 수 있는데, 이는 참조 서열 내에 개별적으로 산재되어 있거나 참조 서열 내에서 하나 이상의 연속 그룹으로 산재되어 있다.

실제적인 사항으로서, 특정한 폴리펩타이드가 도 1에 도시된 아미노산 서열(서열 2) 또는 기탁된 cDNA 클론에 의해 암호화된 아미노산 서열과 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 나타내는지의 여부는 베스트피트 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)과 같은 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 편리하게 측정할 수 있다. 특정 서열이, 예를 들어, 본 발명에 따르는 참조 서열과 95%의 동일성을 나타내는지를 측정하기 위해 베스트피트 또는 기타 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 물론, 동일성 비율이 참조 아미노산 서열의 전체 길이에 대해 산정되고 참조 서열 중의 아미노산 잔기 총 수의 5% 이내의 상동성 갭을 허용하도록 파라미터를 설정한다.

본 발명의 폴리펩타이드는 당해 분야의 숙련인에게 널리 공지된 방법을 이용하여 SDS-PAGE 겔 또는 분자 체 겔 여과 컬럼 상의 분자량 마커로서 사용될 수 있다.

다음에 상세히 기술되는 바와 같이, 본 발명의 폴리펩타이드를 사용하여, 다음에 기술한 바와 같은 뉴트로킨 α 단백질 발현을 탐지하기 위한 검정에 유용하거나 뉴트로킨 α 단백질 기능을 증진시키거나 억제시킬 수 있는 효능제 또는 길항제로서 유용한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 일으킬 수 있다. 추가로, 이러한 폴리펩타이드는 본 발명에 따르는 후보 효능제 및 길항제이기도 한 뉴트로킨 α 단백질 결합성 단백질을 '포획'하기 위한 효모 2-하이브리드 시스템에 사용할 수 있다. 이러한 효모 2-하이브리드

시스템은 문헌[참조: Fields 및 Song, Nature 340:245-246 (1989)]에 기술되어 있다.

에피토프-보유 부분

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제공한다. 이러한 폴리펩타이드 부분의 에피토프는 본 발명의 폴리펩타이드의 면역원성 또는 항원성 에피토프이다. '면역원성 에피토프'는 전 단백질이 면역원인 경우에 항체 반응을 유발시키는 단백질의 특정 부분으로서 정의된다. 한편, 항체가 결합될 수 있는 단백질 분자의 특정 영역은 '항원성 에피토프'로서 정의된다. 특정 단백질의 면역원성 에피토프의 수는 항원성 에피토프의 수보다 적다[참조: Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)].

항원성 에피토프를 보유하는(즉, 항체가 결합될 수 있는 단백질 분자의 특정 영역을 함유하는) 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 선별에 관해서는, 단백질 서열의 일부분을 모사하는 비교적 짧은 합성 펩타이드가 통상적으로 부분적으로 모사된 단백질과 반응되는 항형성을 유발시킬 수 있는 것으로 당해 분야에 널리 공지되어 있다[참조: Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M., Green, N. 및 Learner, R.A. (1983) 'Antibiotics that react with predetermined sites on proteins', Science, 219:660-666]. 단백질 반응성 형성을 유발시킬 수 있는 펩타이드는 종종 단백질의 1차 서열에서 나타나며, 일정 세트의 간단한 화학적 규칙에 의해 특성화시킬 수 있으며 본래의 단백질의 면역원성 영역(즉, 면역원성 에피토프)뿐만 아니라 아미노 또는 카복실 말단으로 규정되지도 않는다. 따라서, 본 발명의 항원성 에피토프-보유 펩타이드 및 폴리펩타이드는 본 발명의 폴리펩타이드와 특이적으로 결합되는 모노클로날 항체를 포함한 항체를 증가시키는데 유용하다[참조: Wilson et al., Cell 37 767-778 (1984) 777에서].

본 발명의 항원성 에피토프-보유 펩타이드 및 폴리펩타이드는 바람직하게는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 서열 내에 함유된 7개 이상의 아미노산 서열, 보다 바람직하게는 9개 이상의 아미노산 서열, 가장 바람직하게는 약 15개 내지 약 30개의 아미노산 서열을 함유한다. 뉴트로킨 특이적 항체를 발생시키는 데 사용할 수 있는 항원성 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 비제한적인 예로는 도 1(서열 2)에서 약 Phe 115에서 약 Leu 147까지의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드; 도 1(서열 2)에서 약 Ile 150에서 약 Tyr 163까지의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드; 도 1(서열 2)에서 약 Ser 171에서 약 Phe 194까지의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드; 도 1(서열 2)에서 약 Glu 223에서 약 Tyr 247까지의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드; 도 1(서열 2)에서 약 Ser 271에서 약 Phe 278까지의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드가 있다. 이들 폴리펩타이드 단편은 도 3에 도시된 바와 같이 상기 제임스-울프 항원성 지수의 분석에 의해 뉴트로킨 α 단백질의 항원성 에피토프를 보유하고 있는 것으로 측정되었다.

본 발명의 에피토프-보유 펩타이드 및 폴리펩타이드는 통상적인 방법에 의해 제조할 수 있다[참조: Houghten, R.A. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135]; 이러한 '동시 다발성 펩타이드 합성(SMPS)' 방법은 미국 특허 제 4,631,211호(Houghten et al.)에 추가로 기술되어 있다.

본 발명의 에피토프-보유 펩타이드 및 폴리펩타이드를 사용하여 당해 분야에 널리 공지된 방법에 따라서 항체를 유도한다[참조: Sutcliffe et al., 상기 문헌 참조; Wilson et al., 상기 문헌 참조; Chow, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; 및 Bittle, F.J. et al., J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985)]. 본 발명의 면역원성 에피토프-보유 펩타이드, 즉, 전체 단백질이 면역원인 경우에 항체 반응을 유발시키는 단백질의 부분을 당해 분야에 공지된 방법[참조: Geysen et al., 상기 문헌 참조]에 따라서 동정한다. 추가로, 미국 특허 제5,194,392호(Geysen, 1990)에는 관심있는 항체의 특정한 파라토프(paratope)(항원 결합 부위)에 상보적인 에피토프(즉, '미노토프(minotope)')의 형태학적 등가물인 단량체(아미노산 또는 기타 화합물)의 서열을 탐지 또는 결정하기 위한 일반적인 방법이 기술되어 있다. 보다 일반적으로, 미국 특허 제4,433,092호(Geysen, 1989)에는 관심있는 특정한 수용체의 리간드 결합 부위에 상보적인 리간드의 형태학적 등가물인 단량체의 서열을 탐지 또는 결정하는 방법이 기술되어 있다. 유사하게, 퍼알킬화 올리고펩타이드 혼합물에 관한 미국 특허 제5,480,971호(Houghten, R.A. et al., 1990)에는 C1-C7 알킬 퍼알킬화 올리고펩타이드 및 이러한 펩타이드의 세트 및 라이브러리 뿐만 아니라 관심있는 수용체 분자에 우선적으로 결합되는 퍼알킬화 올리고펩타이드의 서열을 결정하기 위해 이러한 올리고펩타이드 세트 및 라이브러리를 사용하는 방법이 기술되어 있다. 따라서, 본 발명의 에피토프-보유 펩타이드의 비-펩타이드 동족체를 이들 방법에 의해 통상적으로 제조할 수 있다.

융합 단백질

당해 분야의 숙련인이 인지하는 바와 같이, 상기 언급된 본 발명의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 및 이의 에피토프-보유 단편을 면역글로불린의 불변 도메인의 일부와 결합하여 키메라 폴리펩타이드를 생성시킬 수 있다. 이들 융합 단백질은 정제를 촉진시키고 생체내 반감기를 증가시킨다. 이는, 예를 들어, 사람 CD4-폴리펩타이드의 첫번째 두 도메인 및 포유류 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 각종 도메인으로 구성된 키메라 단백질에 대해서도 나타났다[참조: EP A 394,827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)]. IgG 부분으로 인해 디설파이드 결합된 이량체 구조를 갖는 융합 단백질이 단량체성 뉴트로킨 α 단백질 또는 단백질 단편보다 기타 분자를 결합 및 중합시키는데 있어서 보다 더 효과적일 수 있다[참조: Fountoulakis et al., J.Biochem. 270:3958-3964 (1995)].

면역 시스템-관련 장애 진단법

본 발명자들은 뉴트로킨 α 가 각종 조직, 특히 호중구에서 발현된다는 사실을 발견하였다. 수많은 면역 시스템-관련 장애의 경우, '표준' 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준, 즉 상기 면역 시스템 장애를 갖지 않는

개인으로부터의 면역 시스템 조직 또는 체액에서의 뉴트로킨 α 발현 수준에 비해 상당히 변형된(증가되거나 감소된) 수준의 뉴트로킨 α 유전자 발현이, 상기 장애를 갖는 개인으로부터 취한 면역 시스템 또는 기타 세포 또는 체액(예: 혈청, 혈장, 뇨, 활액 또는 수액)에서 탐지될 수 있다. 따라서, 본 발명은 특정 개인의 면역 시스템 조직 또는 기타 세포 또는 체액에서 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계 및 이와 같이 측정된 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준을 표준 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준과 비교하는 단계를 포함함으로써, 표준 발현 수준과 비교하여 상기와 같이 측정된 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소가 면역 시스템 장애의 발생 여부를 지시해 주는, 특정 시스템 장애의 진단시 유용한 진단 방법을 제공한다.

특히, 암이 발생된 포유류에서 면역 시스템의 특정 조직은 상응하는 '표준'수준과 비교할 때 상당히 증가되거나 감소된 수준의 뉴트로킨 α 단백질 및 이러한 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 mRNA를 발현시키는 것으로 간주된다. 추가로, 암이 발생되지 않은 동일한 종의 포유류로부터의 혈청과 비교할 때 증가되거나 감소된 수준의 뉴트로킨 α 단백질이 이러한 암 발생된 포유류로부터의 특정 체액(예: 혈청, 혈장, 뇨 및 수액)에서 탐지될 수 있는 것으로 여겨진다.

따라서, 본 발명은 특정 개인의 면역 시스템 조직 또는 기타 세포 또는 체액에서 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계 및 이와 같이 측정된 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준을 표준 뉴트로킨 α 유전자 발현 수준과 비교하는 단계를 포함함으로써, 표준 발현 수준과 비교하여 상기와 같이 측정된 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소가 면역 시스템 장애의 발생 여부를 지시해 주는, 특정 면역 시스템의 암을 포함한 이러한 면역 시스템 장애의 진단시 유용한 진단 방법을 제공한다.

종양 진단법을 포함한, 면역 시스템의 장애 진단법이 통상적인 방법에 따라서 이미 만들어진 경우, 본 발명은 예후 지시제로서 유용하기 때문에, 증가되거나 저하된 뉴트로킨 α 유전자 발현을 나타내는 환자는 표준 수준에 근접한 수준으로 유전자를 발현하는 환자보다 악화된 임상 결과를 경험하게 될 것이다.

'뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 검정한다'는 것은 제1 생물학적 샘플 중의 뉴트로킨 α 단백질의 수준 또는 이러한 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 mRNA의 수준을 직접적으로(예를 들어, 절대적인 단백질 수준 또는 mRNA 수준을 결정 또는 평가함으로써) 또는 상대적으로(예를 들어, 제2 생물학적 샘플 중의 뉴트로킨 α 단백질 수준 또는 mRNA 수준과 비교함으로써) 정성적 또는 정량적으로 측정 또는 평가하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 제1 생물학적 샘플 중의 뉴트로킨 α 단백질 수준 또는 mRNA 수준을 측정 또는 평가하고 이를 표준 뉴트로킨 α 단백질 수준 또는 mRNA 수준과 비교하는데, 이러한 표준치는 상기 장애를 갖지 않은 개인으로부터 수득된 제2 생물학적 샘플로부터 취하거나 면역 시스템 장애가 없는 개인 집단으로부터의 수준치를 평균내어 측정하는 것이다. 당해 분야에 숙지되는 바와 같이, 일단 표준 뉴트로킨 α 단백질 수준 또는 mRNA 수준을 알 경우, 이를 비교용 표준물로서 반복적으로 사용할 수 있다.

'생물학적 샘플'이란, 특정 개인, 체액, 세포주, 조직 배양물, 또는 뉴트로킨 α 단백질 또는 mRNA를 함유하는 기타 공급원으로부터 수득된 모든 생물학적 샘플을 의미한다. 지시된 바와 같이, 생물학적 샘플에는 뉴트로킨 α 단백질의 자유 세포외 도메인을 함유하는 체액(예를 들어, 혈청, 혈장, 뇨, 활액 및 수액), 면역 시스템 조직, 및 뉴트로킨 α 또는 뉴트로킨 α 수용체의 완전한 또는 자유 세포외 도메인을 발현하는 것으로 밝혀진 기타 조직 공급원이 포함된다. 포유동물로부터 조직 생검 및 체액을 수득하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 생물학적 샘플이 mRNA를 포함해야 하는 경우에는, 조직 생검이 바람직한 공급원이다.

본 발명은 표유동물, 바람직하게는 사람에게서 각종 면역 시스템 관련 장애를 진단 또는 치료하는데 유용하다. 이러한 장애로는 종양 및 종양 전이, 세균, 바이러스 및 기타 기생충에 의한 감염, 면역결핍증, 염증성 질환, 임파선증, 자가면역 질환 및 그래프트 대 숙주 질환이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

문헌[참조: Chomczynski 및 Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)]에 기술된 1-단계 구아니디늄-티오시아네이트-페놀-클로로포름 방법 등의 적합한 모든 기술을 이용하여 생물학적 샘플로부터 전체 세포성 RNA를 분리할 수 있다. 이어서, 적절한 방법을 사용하여 뉴트로킨 α 단백질을 암호화하는 mRNA의 수준을 검정한다. 이들에는 노던 블롯 분석, S1 뉴클레아제 지도화, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR), 폴리머라제 연쇄 반응과 연합된 역전사(RT-PCR), 및 리가제 연쇄 반응과 연계된 역전사(RT-LCR)가 포함된다.

생물학적 샘플 중에서의 뉴트로킨 α 단백질 수준을 검정하는 것은 항체 기준 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 조직에서의 뉴트로킨 α 단백질 발현은 전통적인 면역조직학적 방법을 이용하여 연구할 수 있다[참조: Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)]. 뉴트로킨 α 단백질 유전자 발현을 탐지하는데 유용한 기타 항체 기준 방법으로는 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA) 및 방사선 면역검정(RIA) 등의 면역검정이 있다. 적합한 항체 검정 표지는 당해 분야에 공지되어 있고, 이의 예로는 글루코즈 옥시다제 등의 효소 표지; 요오드(^{125}I , ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 삼중수소(^3H), 인듐(^{112}In) 및 테크네튬($^{99\text{m}}\text{Tc}$) 등의 방사성 동위원소; 플루오레신 및 로다민 등의 형광성 표지; 및 바이오틴이 있다.

특정 개인으로부터 수득된 생물학적 샘플 중에서의 뉴트로킨 α 단백질 수준을 검정하는 것 이외에도, 뉴트로킨 α 단백질을 또한 영상화에 의해 생체내에서 탐지할 수 있다. 뉴트로킨 α 단백질을 생체내에서 영상화하기 위한 항체 표지 또는 마커에는 X-방사선사진법, NMR 또는 ESR에 의해 탐지할 수 있는 것이 포함된다. X-방사선사진법의 경우에 적합한 표지로는 탐지가능한 방사선은 방출시키지만 피검자에게 명백하게 해롭지 않은, 바륨 또는 세슘 등의 방사성 동위원소가 있다. NMR 및 ESR에 적합한 마커로는 관련 하이브리도마에 대한 영양분을 표지시킴으로써 항체내로 삽입할 수 있는, 중수소 등의 탐지가능한 특징적 스핀을 갖는 것이 있다.

적절한 탐지 가능한 영상화 잔기, 예를 들어, 방사성 동위원소(예를 들어, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 방사선-불투과성 물질, 또는 핵 자기공명에 의해 탐지가능한 물질로 표지시킨 뉴트로킨 α 단백질-특이적 항체 또는 항체 단편을 면역 시스템 장애에 대해 조사할 포유동물에게 도입한다(예를 들어, 비경구, 피하 또는 복강내). 피검자의 크기 및 사용된 영상화 시스템이 진단 영상을 생성시키는데 필요한 영상화 잔기의 양

을 결정할 것이라는 것은 당해 분야에서는 당연하다. 방사선 동위원소 잔기의 경우, 사람 피검자에 대해서는 주입된 방사능의 양이 통상적으로 ^{99m}Tc 약 5 내지 20밀리큐리의 범위일 것이다. 이어서, 상기와 같이 표시된 항체 또는 항체 단편은 뉴트로킨 α 단백질을 함유하는 세포의 부위에 우선적으로 축적될 것이다. 생체내 종양 영상화가 문헌[참조: S.W. Burchiel et al., 'Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments'(Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel 및 B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))].

항체

본 발명에 사용하기 위한 뉴트로킨 α 단백질 특이적 항체를 알부민 등의 캐리어 단백질과 함께 동물 시스템(예: 래빗 또는 마우스)에 제시될 수 있거나 충분히 긴(약 25개 이상의 아미노산) 경우에는 캐리어없이 제시될 수 있는, 무상(intact) 뉴트로킨 α 단백질 또는 이의 항원성 폴리펩타이드 단편에 대해 상송시킬 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같은, 용어 '항체'(Ab) 또는 '모노클로날 항체'(Mab)는 무상 분자뿐만 아니라 뉴트로킨 α 단백질에 특이적으로 결합될 수 있는 항체 단편(예: Fab 및 F(ab')₂ 단편)을 포함하는 것을 의미한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편은 무상 항체의 Fc 단편이 결여되어 있으며, 이는 상기 순환으로부터 보다 신속하게 명백하며, 상기 단편은 무상 항체의 덜 비-특이적 조직 결합을 가질 수 있다[참조: Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)]. 따라서, 이들 단편이 바람직하다.

본 발명의 항체는 각종 방법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 폴리클로날 항체를 함유하는 혈정의 생성을 유도하기 위해서, 뉴트로킨 α 단백질 또는 이의 항원성 단편을 발현하는 세포를 동물에게 투여할 수 있다. 바람직한 방법에서는, 뉴트로킨 α 단백질의 제제를 제조하고 정제시켜 천연 오염물이 거의 없게 만든다. 이어서, 이러한 제제를 동물에게 도입하여 특이적 활성이 보다 큰 폴리클로날 항혈청을 생성시킨다.

가장 바람직한 방법에서는, 본 발명의 항체가 모노클로날 항체(또는 이의 뉴트로킨 α 단백질 결합 단편)이다. 이러한 모노클로날 항체는 하이브리도마 기술을 이용하여 제조할 수 있다[참조: Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., (1981) pp.563-681]. 일반적으로, 이러한 과정은 특정 동물(바람직하게는 마우스)를 뉴트로킨 α 단백질 항원 또는 보다 바람직하게는 뉴트로킨 α 단백질-발현 세포로 면역시키는 것을 포함한다. 적합한 세포는 이들이 항-뉴트로킨 α 단백질 항체에 결합하는 능력에 의해 인식될 수 있다. 이러한 세포를 적합한 어떠한 조직 배양 배지에서 배양할 수 있지만, 세포를 10% 태아 송아지 혈청(약 56°C에서 불활성화됨)으로 보충하고 약 10g/l의 비필수 아미노산, 약 1,000U/ml의 페니실린 및 약 100μg/ml의 스트렙토마이신으로 보충한 에를레 변형된 이글즈 배지에서 배양하는 것이 바람직하다. 이러한 마우스의 비장 세포를 추출하고 적합한 골수종 세포주와 융합시킨다. 본 발명에 따라서 적합한 어떠한 골수종 세포주도 사용할 수 있지만, 모 골수종 세포주(SP20; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland로부터 입수가능함)를 이용하는 것이 바람직하다. 융합 후, 생성된 하이브리도마 세포를 HAT 배지에 선별적으로 유지시킨 다음, 문헌[참조: Wands et al., Gastroenterology 80:225-232 (1981)]에 기술된 바와 같이 제한 희석에 의해 클로닝한다. 이러한 선별을 통해 수득된 하이브리도마 세포를 검정하여 뉴트로킨 α 단백질 항원과 결합할 수 있는 항체를 분비하는 클론을 동정한다.

또 다른 방법으로는, 뉴트로킨 α 단백질 항원에 결합될 수 있는 항체를 항-유전형 항체의 사용을 통하여 2-단계 과정으로 생성시킬 수 있다. 이러한 방법은 항체 그 자체가 항원이므로 제2 항체에 결합되는 항체를 수득하는 것이 가능하다는 사실을 이용한 것이다. 이러한 방법에 따라서, 뉴트로킨 α 단백질 특이적 항체를 이용하여 특정 동물, 바람직하게는 마우스를 면역시킬 수 있다. 이러한 동물의 비장 세포를 이용하여 하이브리도마 세포를 생성시키고, 이러한 하이브리도마 세포를 스크리닝하여 뉴트로킨 α 단백질 특이적 항체와 결합될 수 있는 능력이 뉴트로킨 α 단백질 항원에 의해 차단될 수 있는 항체를 생성시키는 클론을 동정한다. 이러한 항체는 뉴트로킨 α 단백질 특이적 항체에 대한 항-유전형 항체를 포함하고 이를 사용하여 특정 동물을 면역화시켜 추가의 뉴트로킨 α 단백질 특이적 항체의 형성을 유도할 수 있다.

본 발명의 항체의 Fab 및 F(ab')₂ 및 기타 단편을 본원에 기술된 방법에 따라서 사용할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이러한 단편은 전형적으로, 파파인(Fab 단편을 생성시키기 위함) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 생성시키기 위함) 등의 효소를 사용하여 단백질 분해적 절단에 의해 생성시킨다. 또 다른 방법으로는, 재조합 DNA 기술의 적용 또는 합성 화학을 통하여 뉴트로킨 α 단백질 결합성 단편을 제조할 수 있다.

사람에게서 진단하기 위하여 생체내 영상화를 이용하여 증가된 수준의 뉴트로킨 α 단백질을 탐지하는 경우에는, '사람화된' 키메라 모노클로날 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 위에서 언급한 모노클로날 항체를 생성시키는 하이브리도마 세포로부터 유도된 유전적 작제물을 사용하여 상기 항체를 생성시킬 수 있다. 키메라 항체의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., 미국 특허 제4,816,567호; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985)].

면역 시스템 관련 장애의 치료

앞서 언급한 바와 같이, 뉴트로킨 α 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩타이드는 뉴트로킨 α 활성을 비정상적으로 높게 또는 낮게 발현시키는 것과 관련된 상태의 진단에 유용하다. 뉴트로킨 α 가 발현되고 또한 이의 활성이 뉴트로킨 α 에 의해 조절되는 세포 및 조직을 경우에도, 표준 또는 '정상적인' 수준과 비교해

서 특정 개인에게서의 상당히 변형된(증가되거나 감소된) 뉴트로킨 α 발현 수준으로 인해, 뉴트로킨 α 가 발현되고/되거나 활성을 나타내는 신체 시스템과 관련된 병리학적 상태를 야기시킨다는 것은 용이하게 명백하다.

또한, 본 발명의 뉴트로킨 α 단백질이 TNF 계열의 한 구성원이기 때문에, 이러한 단백질의 세포외 도메인은 단백질분해적 절단에 의해 뉴트로킨 α 를 발현시키는 세포로부터 가용성 형태로 방출될 수 있으므로, 뉴트로킨 α 단백질(특히 세포외 도메인의 가용성 형태)이 외인성 공급원으로부터 특정 개인의 세포, 조직 또는 체내에 가해지는 경우에는 상기 단백질이 상기 개인의 표적 세포 중의 어느 것에 대해서 조절 활성을 나타낼 것이라는 것을 당해 분야의 숙련인은 인지할 것이다. 또한, 이러한 유형 II 트랜스멤브레인 단백질을 발현시키는 세포를 특정 개인의 세포, 조직 또는 체내에 가함으로써 이와 같이 부가된 세포가 뉴트로킨 α 에 대한 수용체를 발현하는 세포와 결합되어, 뉴트로킨 α 를 발현하는 세포가 수용체-보유 표적 세포에 대한 작용(예: 세포독성)을 야기시킬 수 있다.

따라서, 특정 개인에게서 표준 또는 정상적인 뉴트로킨 α 활성 수준 감소로 인해 야기된 상태, 특히 면역 시스템의 장애는 뉴트로킨 α 단백질(가용성 세포외 도메인의 형태 또는 완전한 단백질을 암호화하는 세포 형태)을 투여함으로써 치료할 수 있다는 것이 인지될 것이다. 따라서, 본 발명은 뉴트로킨 α 활성 수준을 증가시킬 필요가 있는 개인에게서 이러한 뉴트로킨 α 활성 수준을 증가시키기에 유효한 양의 본 발명의 분리된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 상기 개인에게 투여함을 포함하여, 뉴트로킨 α 활성 수준을 증가시킬 필요가 있는 개인을 치료하는 방법을 제공한다.

뉴트로킨 α 는 TNF 상과에 속하기 때문에, 이는 혈관형성을 조절해야 한다. 또한, 뉴트로킨 α 는 면역 세포 기능을 억제하기 때문에, 광범위한 소염 활성을 지닐 것이다. 뉴트로킨 α 는 항-신생혈관화제로서 이용되어, 숙주 방어 세포, 예를 들어, 세포독성 T 세포 및 대식세포의 침입과 활성화를 자극하고 종양의 혈관형성을 억제함으로써 종양성 종양을 치료할 수 있다. 당해 분야의 숙련인은 혈관 증식이 요구되지 않는 기타 비-암 징후들을 인식할 것이다. 이들은 또한 미생물성 백혈구의 유인 및 활성화를 통한 근육 세균성 감염 등의 내성이 있는 만성 및 급성 감염에 대한 숙주 방어를 증진시킬 수 있다. 뉴트로킨 α 는 또한 T-세포 매개된 자가 면역 질환 및 임파구성 백혈병 치료를 위해 IL-2 생합성을 억제함으로써 T-세포 증식을 억제시키는데 사용할 수 있다. 뉴트로킨 α 는 또한, 데브리시 명화 및 염증성 세포를 촉진시키는 연결 조직의 검증원을 통하여, 외상 치유를 자극하는데 사용할 수 있다. 이와 동일한 방식으로, 뉴트로킨 α 는 또한, 간경변, 골관절염 및 폐동맥 섬유증을 포함한 기타 섬유증 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 뉴트로킨 α 는 또한, 주혈흡충증, 선모충증 및 회충병에서와 같이, 조직을 침입하는 기생충의 유충을 사멸시키는 독특한 기능을 갖는 호산구의 존재를 증가시킨다. 이는 또한, 예를 들어, 화학요법 후에 골수로부터 성숙한 백혈구를 방출하기 위해, 즉, 간 세포 고정화에 있어서 각종 조절성 프로게니터 세포의 활성화 및 분화를 조절함으로써 조절 작용을 조절하는데 사용할 수 있다. 뉴트로킨 α 는 또한 패혈증을 치료하는데 사용할 수 있다.

제형화

뉴트로킨 α 폴리펩타이드 조성물(바람직하게는 세포외 도메인의 가용성 형태인 폴리펩타이드를 함유함)을 제형화하여, 개개 환자의 임상적 상태(특히 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 단독 치료시의 부작용), 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 조성물의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 전문의에게 공지된 기타 요인을 고려하여, 우수한 의학적 시행이 지속되는 방식으로 투여한다. 따라서, 본 발명의 목적을 위한 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 '유효한 양'은 이러한 조건들에 의해 결정한다.

일반적인 제안으로서, 1회 투여시 비경구적으로 투여된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 약제학적으로 유효한 총량은 1일 환자 체중당 약 1 μ g 내지 10mg의 범위일 것이지만, 앞서 언급한 바와 같이, 이는 치료학적 판단에 따를 것이다. 보다 바람직하게는, 상기 투여량은 0.01mg/kg/일 이상이고, 가장 바람직하게는 사람의 경우 약 0.01 내지 1mg/kg/일이다. 연속적으로 제공할 경우, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 전형적으로 약 1 μ g/kg/시간 내지 약 50 μ g/kg/시간의 투여 속도로 1일 1 내지 4회 주사하거나 미니 펌프를 사용하여 연속적으로 피하 주사함으로써 투여한다. 정맥내 백 용체를 사용할 수도 있다. 변화를 관찰하는데 필요한 치료 기간 및 발생하는 반응에 대한 치료 후 간격은 목적하는 효과에 따라서 변화시킬 수 있는 것으로 보인다.

본 발명의 뉴트로킨 α 를 함유하는 약제학적 조성물은 경구, 직장, 비경구, 지맥하조내, 질내, 복강내, 국부(산재, 연고, 점안제 또는 경피용 패치에 의함), 볼내 또는 경구 또는 비내 분무 투여할 수 있다. '약제학적으로 허용되는 담체'란, 모든 유형의 무독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제형 보조제를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 '비경구'는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 피하 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 지칭한다.

당해 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 또한 서방형 시스템에 의해 적절하게 투여한다. 서방형 조성물의 적합한 예에는 필름 및 미소캡슐 형태로 성형된 제품 형태의 반-투과성 중합체 매트릭스가 포함된다. 서방형 매트릭스로는 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919, EP 58,481), L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman, U. et al., Biopolymer 22:547-556 (1983)), 폴리(2-하이드록시메틸 메타크릴레이트)(R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981) 및 R. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), 에틸렌 비닐 아세테이트(R. Langer et al., Id.) 또는 폴리-D-(-)-3-하이드록시 시부티르산(EP 133,988)이 있다. 서방형 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 조성물로는 또한 리포솜에 의해 포획된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드가 있다. 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 함유하는 리포솜은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 제조한다[참조: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제 4,544,545호; 및 EP 102,324]. 통상적으로, 이러한 리포솜은 지질 성분의 약 30몰% 이상(선택되는 비율은 최적의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 치료법에 대해 조정한다)이 콜레스테롤인 작은(약 200 내지 800 Å) 단층형이다.

비경구 투여의 경우, 한 양태에서는, 주사가 가능한 단위 투여형(용제, 현탁제 또는 유제)의 목적하는 순도의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 약제학적으로 허용되는 담체, 즉, 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고 제형의 다른 성분과 상용성인 담체와 혼합함으로써, 상기 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 제형화한다. 예를 들어, 이러한 제형은 바람직하게는 폴리펩타이드에 해로운 것으로 공지된 기타 화합물 및 산화제를 포함하지 않는다.

일반적으로, 이러한 제형은 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 이들 둘 다와 균질하고도 친밀하게 접촉시킴으로써 제조한다. 이어서, 필요한 경우, 이러한 생성물을 목적하는 제형으로 성형시킨다. 바람직하게는, 상기 담체는 비경구용 담체, 보다 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장성인 용액이다. 이러한 담체 비히클의 예로는 물, 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액이 있다. 경화유 및 에틸 올레에이트 등의 비수성 비히클, 및 리포솜이 또한 본 발명에 유용하다.

이러한 담체는 적합하게는 소량의 부가제, 예를 들어, 등장성 및 화학적 안정성을 증진시키는 물질을 함유한다. 이러한 물질은 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고 이의 예로는 인산염, 시트레이트, 석시네이트, 아세트산 및 기타 유기 산 또는 염 등의 완충제; 아스코르브산 등의 산화방지제; 자방지방(약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드, 예를 들어, 폴리아르기닌 또는 트리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린 등의 단백질; 폴리비닐피롤리돈 등의 친수성 중합체; 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌 등의 아미노산; 셀룰로즈 또는 이의 유도체, 글루코즈, 만노즈 또는 덱스트린을 포함하는, 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물; EDTA 등의 킬레이트제; 만니톨 또는 솔비톨 등의 당 알콜; 나트륨 등의 역이온; 및/또는 폴리솔베이트, 폴리옥사머 또는 PEG 등의 비이온성 계면활성제가 있다.

당해 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 전형적으로, 약 3 내지 8의 pH에서, 이러한 비히클 중에 약 0.1 내지 100mg/ml, 바람직하게는 1 내지 10mg/ml의 농도로 제형화한다. 특정의 상기 부형제, 담체 또는 안정화제를 사용하여 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 염을 형성할 수 있다.

치료학적 투여를 위해 사용하는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 멸균성이어야 한다. 멸균은 멸균성 여과막(예를 들어, 0.2마이크론 막)을 통하여 여과시킴으로써 용이하게 수행한다. 치료학적 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 조성물은 일반적으로 멸균성 액체 포트를 갖는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘에 의해 구멍을 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 놓아둔다.

뉴트로킨 α 폴리펩타이드는 통상적으로 단위 또는 수회분 용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 또는 바이알에 재구성을 위한 수용액 또는 동결건조된 제형으로서 저장될 것이다. 동결건조된 제형의 한 예로서, 10ml 바이알에 멸균성-여과된 1%(w/v) 수성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 용액 5ml를 충전시키고, 이로써 생성된 혼합물을 동결건조시킨다. 제균성 주사용수를 사용하여 동결건조된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 재구성함으로써 주입 용액을 제조한다.

본 발명은 또한, 본 발명의 약제학적 조성물의 하나 이상의 성분들로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 이러한 용기에는 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 용도 또는 판매를 규정하는 정부 기관에 의해 작성된 형태의 통지서가 부착되어 있으며, 이러한 통지서는 정부 기관에 의해 사람 투여용으로 제조, 사용 또는 판매 승인된 것을 반영하고 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 다른 치료학적 화합물과 함께 사용할 수 있다.

효능제 및 길항제 - 검정 및 분자

본 발명은 또한 세포에 대한 뉴트로킨 α 의 작용, 예를 들어, 뉴트로킨 α 와 뉴트로킨 α 결합성 분자(예: 수용체 분자)와의 상호작용을 증진시키거나 차단시키는 것을 동정하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 효능제는 뉴트로킨 α 의 천연 생물학적 기능을 증진시키거나 뉴트로킨과 유사한 방식으로 작용되는 화합물인 반면, 길항제는 이러한 기능을 감소시키거나 억제시킨다.

이러한 본 발명의 양태의 또 다른 국면에서는, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드와 특이적으로 결합되는 수용체 단백질 또는 기타 리간드-결합 단백질을 동정하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 세포성 구획, 예를 들어, 막 또는 이의 제제를 뉴트로킨 α 를 결합시키는 분자를 발현하는 세포로부터 제조할 수 있다. 이러한 제제를 표지된 뉴트로킨 α 와 배양하고 상기 수용체 또는 기타 결합성 단백질에 결합된 뉴트로킨 α 의 복합체를 분리한 다음, 당해 분야에 공지된 통상적인 방법에 따라서 특성화시킨다. 또 다른 방법으로는, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 고체 지지체에 결합시켜, 세포로부터 가용화된 결합성 분자를 컬럼에 결합시킨 다음, 용출시키고 통상적인 방법에 따라서 특성화시킬 수 있다.

효능제 또는 길항제에 대한 본 발명의 검정법에서는, 세포성 구획, 예를 들어, 막 또는 이의 제제를 뉴트로킨 α 를 결합시키는 분자, 예를 들어, 뉴트로킨 α 에 의해 조절된 시그널링 또는 조절성 경로의 분자를 발현하는 세포로부터 제조할 수 있다. 이러한 제제를 뉴트로킨 α 효능제 또는 길항제일 수 있는 후보 분자의 부재하 또는 존재하에서 표지된 뉴트로킨 α 와 배양한다. 상기 결합성 분자와 결합되는 후보 분자의 능력은 상기 표지된 리간드의 결합 감소로 반영된다. 이유없이, 즉, 뉴트로킨 α 결합 분자를 결합시키는 것에 대한 뉴트로킨 α 의 효과를 유도시키지 않고 결합하는 분자가 아마도 가장 우수한 길항제일 것이다. 뉴트로킨 α 와 동일하거나 밀접하게 관련된 효과를 유발시키면서 잘 결합되는 분자가 효능제이다.

잠재적인 효능제 및 길항제의 뉴트로킨 α -유사 효과는, 예를 들어, 후보 분자를 세포 또는 적절한 세포 제제와 상호작용시킨 후에 제2의 메신저 시스템의 활성을 측정하고, 이러한 효과를 뉴트로킨 α 또는 뉴트로킨 α 와 동일한 효과를 유발시키는 분자의 것과 비교함으로써 측정할 수 있다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 제2의 메신저 시스템으로는 AMP 구아닐레이트 사이클라제, 이온 채널 또는 포스포이노시타이드 가수분해 제2 메신저 시스템이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

뉴트로킨 α 길항제에 대한 검정의 또 다른 예는 뉴트로킨 α 및 강력한 길항제를 경쟁적 억제 검정에 적절한 조건하에서 막 결합된 수용체 분자 또는 재조합 뉴트로킨 α 수용체 분자와 결합시키는 경쟁적 검정

법이다. 수용체 분자에 결합된 뉴트로킨 α 분자의 수를 측정하여 잠재적인 길항제의 효능을 정확하게 평가할 수 있도록, 뉴트로킨 α 를 방사능 등에 의해 표시시킬 수 있다.

잠재적인 길항제로는 본 발명의 폴리펩타이드에 결합함으로써 이의 활성을 억제시키거나 소멸시키는 작은 유기 분자, 펩타이드, 폴리펩타이드 및 항체가 있다. 잠재적인 길항제는 또한 뉴트로킨 α 유도된 활성을 유도시키지 않음으로써 뉴트로킨 α 가 결합하지 못하게 하여 뉴트로킨 α 의 작용을 억제시키면서, 결합 분자, 예를 들어, 수용체 분자 상의 동일한 부위를 결합시키는 밀접하게 관련된 단백질 또는 항체 등의 작은 유기 분자, 펩타이드, 폴리펩타이드일 수 있다.

기타 잠재적인 길항제로는 안티센스 분자가 있다. 안티센스 기술을 사용하여 안티센스 DNA 또는 RNA를 통하여 유전자 발현을 조절하거나 삼중-나선 구조 형성을 통하여 유전자 발현을 조절한다. 안티센스 기술은, 예를 들어, 문헌[참조: Okano, J. Neurochem., 56:560(1991); 'Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)]에 기술되어 있다. 삼중 나선 형성은, 예를 들어, 문헌[참조: Lee et al., Nucleic Acids Research, 6:3073(1979); Cooney et al, Science, 241:456(1988); 및 Dervan et al., Science, 251: 1360(1991)]에 기술되어 있다. 이들 방법 모두는 폴리뉴클레오티드를 상보적 DNA 또는 RNA에 결합시키는 것을 기초로 한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 5' 암호화 부분을 사용하여 약 10 내지 40개의 염기쌍 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 고안할 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드를 전사에 관계된 유전자 영역에 상보적이라도 고안함으로써, 뉴트로킨 α 의 전사 및 생성을 억제한다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드가 생체 내에서 mRNA로 하이브리드화하고 mRNA 분자의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드로의 해독을 차단한다. 또한 상기 언급한 올리고뉴클레오티드를 세포로 전달하여, 안티센스 RNA 또는 DNA가 생체 내에서 발현되어 뉴트로킨 α 의 생성을 억제할 수 있도록 한다.

효능제 및 길항제를 위에서 언급한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 조성물에 사용할 수 있다.

상기 길항제를, 예를 들어, 특정한 자가 면역 및 만성 염증성 및 감염성 질환에 있어서, 뉴트로킨 α 를 억제하여 대식세포 및 이들의 전구체 및 호중구, 호염구, B 임파구 및 몇몇 T 세포 서브세트, 예를 들어, 활성화된 및 CD8 세포독성 T 세포 및 천연의 킬러 세포의 화학주성 및 활성화를 억제시키는데 사용할 수 있다. 자가 면역 질환의 예로는 다발성 동맥경화증 및 인슐린 의존성 당뇨병이 있다. 당해 길항제는 단핵 식세포의 점증원 및 활성화를 억제시킴으로써 류분증, 유육종증, 특발성 폐동맥 섬유증을 포함한 감염성 질환을 치료하는데 사용할 수도 있다. 이들은 또한, 호산구 생성 및 이동을 억제함으로써 특발성의 과다-호산구 증상을 치료하는데 사용할 수 있다. 대식세포의 이동 및 이들의 생성을 억제함으로써, 본 발명의 사람 케모킨 폴리펩타이드의 길항제에 의해 내독성 속을 치료할 수도 있다. 이러한 길항제는 또한, 동맥 벽에서의 단핵세포 침윤을 방지함으로써, 아테롬성동맥경화증을 치료하는데 사용할 수 있다. 당해 길항제는 또한, 케모카인 유도된 비만 세포 및 호염구 분해 및 히스타민 방출을 억제함으로써 알레르기성 반응, 만성 위궤양, 및 아토피성 피부염을 포함한 히스타민 매개된 알레르기성 반응 및 면역학적 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 알레르기성 천식, 비염 및 습진 등의 IgE 매개된 알레르기성 반응을 치료할 수도 있다. 당해 길항제는 또한, 단핵세포가 상처 부위로 유인되는 것을 방지함으로써, 만성 및 급성 염증을 치료하는데 사용할 수 있다. 이들은 또한, 정상적인 폐동맥 대식세포 집단을 조절하는데 사용할 수 있는데, 이는 만성 및 급성 염증성 폐동맥 질환이 폐에서의 단핵성 식세포의 격리와 연관이 있기 때문이다. 길항제는 단핵세포가 환자 관절의 활액내로 유인되는 것을 방지함으로써 류마티스관절염을 치료하는데 사용할 수 있다. 단핵세포 유입 및 활성화는 퇴행성 및 염증성 관절증 모두의 병원론에 상당한 역할을 한다. 당해 길항제는 기타 염증성 사이토킨의 생합성을 억제시키는, IL-1 및 TNF에 1차적으로 기인된 열악한 케스케이드를 방해하는데 사용할 수 있다. 이러한 방식으로, 당해 길항제는 염증을 예방하는데 이용될 수 있다. 당해 길항제는 케모카인에 의해 유도된 프로스타글란딘 독립적인 발열을 억제시키는데 사용할 수 있다. 당해 길항제는 또한, 골수 부전증, 예를 들어, 재생불량성 빈혈 및 적수이형성 증상을 치료하는데 사용할 수 있다. 당해 길항제는 또한, 폐에서의 호산구 축적을 방지함으로써 천식 및 알레르기를 치료하는데 사용할 수 있다. 당해 길항제는 또한, 천식성 폐의 두드러진 특징인 상피하의 기저막 섬유증을 치료하는데 사용할 수 있다.

뉴트로킨 α 에 대한 항체를 사용하여 뉴트로킨 α 와 결합하고 이의 활성을 억제시켜, 상처 후에 호중구가 폐에 침윤되는 것을 방지함으로써 AIDS를 치료할 수 있다. 당해 길항제를 앞서 기술된 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 조성물에 사용할 수 있다.

염색체 검정

본 발명의 핵산 서열은 또한 염색체 동정에도 유용하다. 상기 서열은 개개의 사람 염색체 상의 특정한 위치에 대해 특이적으로 표적화시키고 이와 하이브리드화할 수 있다. 더욱이, 현재에는 염색체 상의 특정 부위를 동정해야 할 필요가 있다. 염색체 위치를 표식하기 위한, 실제 서열 데이터(반복 다형성)를 기초로 하는 염색체 표식화 시약을 현재 거의 입수할 수 없다. 본 발명에 따른 염색체에 대한 DNA의 지도화는 이들 서열을 질환과 관련된 유전자와 상호연관시키는데 있어서 중요한 제1 단계이다.

이와 관련하여 특정한 바람직한 양태에서는, 본원에 기술된 cDNA를 사용하여 뉴트로킨 α 단백질 유전자의 게놈 DNA를 클로닝할 수 있다. 이는 일반적으로 시판되고 있는, 널리 공지된 각종 기술 및 라이브러리를 사용하여 수행할 수 있다. 이어서, 상기 게놈성 DNA를 널리 공지된 기술을 이용하여 동일계 염색체 지도화에 사용한다.

또한, 몇몇 경우에는, cDNA로부터 PCR 프라이머(바람직하게는 15 내지 25bp)를 제조함으로써 서열을 염색체에 대해 지도화할 수 있다. 상기 유전자의 3' 비해독 영역의 컴퓨터 분석을 사용하여 게놈 DNA 내에 하나 이상의 엑손에 걸치지 않는 프라이머를 신속하게 선별하여, 증폭 과정을 복잡하게 만든다. 다음, 상기 프라이머를 개개의 사람 염색체를 함유하는 체강 세포 하이브리드의 PCR 스크리닝에 사용한다. cDNA 클론을 중기 염색체 확산 배양물로 동일계내에서 형광성 하이브리드화(FISH)시켜 1 단계로 정확한 염색체의 위치를 제공할 수 있다. 이러한 기술은 50 또는 60bp 정도로 짧은 cDNA로부터의 프로브를 사용

할 수 있다. 이러한 기술에 관한 검토는 문헌[Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)]을 참조할 수 있다.

서열이 정확한 염색체 위치로 지도화되면, 염색체 상의 서열의 물리적 위치를 유전자 지도 데이터와 상호 연관시킬 수 있다. 이러한 데이터는, 예를 들어, V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man(Johns Hopkins University Welch Medical Library를 통해 온 라인으로 구입할 수 있다)에서 발견된다. 이어서, 동일한 염색체 영역에 지도화시킨 유전자와 질환간의 관계를 결합 분석(물리적으로 인접한 유전자의 공동 유전형질)을 통해 동정한다.

다음, 감염자 및 비감염자간의 cDNA 또는 게놈 서열 차이를 측정하는 것이 필요하다. 돌연변이가 몇몇 감염자 또는 모든 감염자에서 관찰되나 정상인에게서는 관찰되지 않을 경우, 이러한 돌연변이가 아마도 상기 질환의 유발 원인제일 것이다.

본 발명이 일반적으로 기술되긴 하였지만, 이는 예시 목적으로 제공되고 이로써 제한되지 않은 다음 실시예를 참조로 하여 보다 용이하게 이해될 수 있다.

실시예

실시예 1a: 이. 콜라이에서 'His-태그된' 뉴트로킨 α 의 발현 및 정제

세균성 발현 벡터 pQE9(pD10; QIAGEN, Inc., 상기 참조)를 본 실시예에서 세균성 발현을 위해 사용한다. pQE9는 앰피실린 항생제 내성('Amp^r')을 암호화하고, 세균성 복제 기점('ori'), IPTG 유도성 프로모터, 리보솜 결합 부위('RBS'), QIAGEN, Inc.에 의해 시판된 니켈-니트릴로-트리-아세트산('Ni-NTA') 친화성 수지를 사용하여 친화성 정제를 허용하는 히스티딘 잔기를 암호화하는 6개의 코돈, 및 적합한 단일 제한 효소 절단 부위를 함유한다. 이들 성분들은, 특정 폴리펩타이드를 암호화하는 삽입된 DNA 단편이 상기 폴리펩타이드의 아미노 말단에 공유적으로 연결된 6개의 His 잔기(즉, '6X His 태그')를 갖는 폴리펩타이드를 암호화하도록 배열한다.

세포외 도메인 서열을 포함하는 뉴트로킨 α 단백질의 목적하는 부위를 암호화하는 DNA 서열을, 뉴트로킨 α 단백질의 목적하는 부분의 아미노 말단 서열 및 상기 기탁된 cDNA 서열에 대해 3'에 위치한 기탁된 작제물의 서열에 어닐링된 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 상기 기탁된 cDNA로부터 증폭시킨다. pQE9 벡터에서의 클로닝을 촉진시키기 위한 제한 부위를 함유하는 부가의 뉴클레오타이드를 5' 및 3' 프라이머에 각각 가한다.

상기 단백질의 세포외 도메인을 클로닝하기 위해서, 5' 프라이머는 밀줄쳐진 BamHI 제한 부위에 이어서, 도 1에서 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인의 아미노 말단 암호화 서열의 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 서열 5' GTGGGATCCAGCCTCCGGGCAGAGCTG 3'(서열 10)을 갖는다. 당해 분야의 숙련인은 물론, 5' 프라이머가 시작되는 상기 단백질 암호화 서열 시점이 다양하여 상기 형태의 세포외 도메인보다 짧거나 긴 완전한 뉴트로킨 α 단백질의 목적하는 부위를 암호화하는 DNA 절편을 증폭시킬 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 3' 프라이머는 밀줄쳐진 HindIII 제한 부위에 이어서, 2개의 정지 코돈 및 도 1에서의 뉴트로킨 α DNA 서열의 암호화 서열의 3' 말단에 상보적인 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 서열 5' GTGAAGCTTTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'(서열 11)을 갖는다.

이와 같이 증폭된 뉴트로킨 α DNA 단편 및 벡터 pQE9를 BamHI 및 HindIII로 분해한 다음, 분해된 DNA를 함께 연결시킨다. 뉴트로킨 α DNA를 제한된 pQE9 벡터에 삽입하여, 뉴트로킨 α 단백질 암호화 영역을 IPTG 유도성 프로모터의 하부 및 개시 AUG 및 6개 히스티딘 코돈과 동일한 프레임 내에 위치시킨다.

이러한 연결 혼합물을 문헌[참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, NY (1989)]에 기술된 방법과 같은 표준 과정을 이용하여 적격한 이. 콜라이 세포로 형질전환시킨다. lacI 억제인자를 발현시키고 또한 카나마이신 내성('Kan^r')을 부여하는 플라스미드 pREP4의 다중 복사물을 함유하는 이. 콜라이 균주 M15/rep4가 본원에 기술된 예시적 예를 수행하는데 사용한다. 뉴트로킨 α 단백질을 발현시키는데 적합한 수많은 균주 중의 하나인 이러한 균주는 다음 공급원[QIAGEN, Inc., 상기 참조]으로부터 시판되고 있다. 앰피실린 및 카나마이신의 존재하에서 LB 판 상에서 성장하는 이의 능력에 의해 형질전환체를 동정한다. 플라스미드 DNA를 내성 콜로니로부터 분리시키고 클로닝된 DNA를 제한 분석, PCR 및 DNA 서열화에 의해 확인한다. 목적하는 작제물을 함유하는 클론을 앰피실린(100ug/ml)과 카나마이신(25ug/ml) 모두가 보충된 LB 배지 중의 액체 배양물에서 밤새(0/N) 성장시킨다. 0/N 배양물을 사용하여 1:25 내지 1:250의 비로 대형 배양물에 접종시킨다. 세포를 0.4 내지 0.6의 광밀도 600('OD600')으로 성장시킨다. 다음, 이소프로필- β -D-티오갈락토 피라노사이드('IPTG')를 가하여 최종 농도가 1mM이 되도록 하여, lacI 억제인자를 불활성화시킴으로써 lac 억제인자 민감성 프로모터로부터 전사를 유도한다. 세포를 3 내지 4시간 더 배양한다. 다음, 세포를 원심분리시켜 수거한다.

이어서, 세포를 pH 8에서 6M 구아니딘-HCl 중에서 4°C하에 3 내지 4시간 동안 교반시킨다. 세포 debris를 원심분리시켜 제거하고, 뉴트로킨 α 를 함유하는 상등액을 니켈-니트릴로-트리-아세트산('Ni-NTA') 친화성 수지 칼럼(공급원: QIAGEN, Inc., 상기 참조) 상에 부하한다. 6xHis 태그를 갖는 단백질은 Ni-NTA 수지에 고친화적으로 결합되고 샘플 1-단계 과정으로 정제할 수 있다[상세한 사항은 The QIA expressionist, 1995, QIAGEN, Inc., 상기 참조]. 간략하게는, 상등액을 6M 구아니딘-HCl, pH 8 중의 컬럼에 부하하고, 이 컬럼을 먼저 6M 구아니딘-HCl, pH 8, 10용적으로 세척한 다음, 6M 구아니딘-HCl, pH 6, 10용적으로 세척하고, 최종적으로 뉴트로킨 α 를 6M 구아니딘-HCl, pH 5로 용출시킨다.

이어서, 상기과 같이 정제된 단백질을 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 50mM Na-아세테이트, pH 6 완충액 플러스 200mM NaCl에 대해 투석함으로써 이를 재생시킨다. 또한, 상기 단백질을 Ni-NTA 컬럼 상에서 고정화시키는 동안 성공적으로 재폴딩시킬 수 있다. 권장되는 조건은 다음과 같다: 프로테아제 억제인자를 함유하는, 500mM NaCl, 20% 글리세롤, 20mM 트리스/HCl pH 7.4 중의 선형 6M-1M 우레아 구배를 이용하여

재생시킴. 이러한 재생은 1.5시간 이상 동안 수행하여야 한다. 재생 후, 250mM 이미다졸을 가함으로써 상기 단백질을 용출시킬 수 있다. PBS 또는 50mM 나트륨 아세테이트 pH 6 완충액 플러스 200mM NaCl에 대한 최종 투석 단계에 의해 이미다졸을 제거한다. 이와 같이 정제된 단백질을 4°C에서 저장하거나 -80°C에서 동결시킨다.

실시예 1b: 이. 콜라이에서의 뉴트로킨 α 의 발현 및 정제

세균성 발현 벡터 pQE60(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)를 본 실시예에서 세균성 발현을 위해 사용한다. pQE60은 앰피실린 항생제 내성('Amp^r')을 암호화하고, 세균성 복제 기점('ori'), IPTG 유도성 프로모터, 리보솜 결합 부위('RBS'), QIAGEN, Inc.에 의해 시판된 닉켈-니트릴로-트리-아세트산('Ni-NTA') 친화성 수지를 사용하여 친화성 정제를 허용하는 히스티딘 잔기를 암호화하는 6개의 코돈, 및 적합한 단일 제한 효소 절단 부위를 함유한다. 이들 요소들은, 특정 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 단편이 상기와 같은 방식으로 삽입되어 상기 폴리펩타이드의 카복실 말단에 공유적으로 연결된 6개의 His 잔기(즉, '6X His 태그')를 갖는 폴리펩타이드를 생성시킬 수 있다. 그러나, 본 실시예에서는, 6개의 His 코돈의 해독이 억제되므로 6X His 태그를 갖지 않는 폴리펩타이드를 생성시키도록, 상기 폴리펩타이드 암호화 서열을 삽입한다.

세포외 도메인 서열을 포함하는 뉴트로킨 α 단백질의 목적하는 부위를 암호화하는 DNA 서열을, 뉴트로킨 α 단백질의 목적하는 부분의 아미노 말단 서열 및 상기 기탁된 cDNA 암호화 서열에 대해 3'에 위치한 기탁된 작제물의 서열에 어닐링된 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 상기 기탁된 cDNA 클론으로부터 증폭시킨다. pQE60 벡터에서의 클로닝을 촉진시키기 위한 제한 부위를 함유하는 부가의 뉴클레오타이드를 5' 및 3' 프라이머에 각각 가한다.

상기 단백질의 세포외 도메인을 클로닝하기 위해서, 5' 프라이머는 밀줄쳐진 BspHI 제한 부위에 이어서, 도 1에서 뉴트로킨 α 서열의 세포외 도메인의 아미노 말단 암호화 서열의 17개 뉴클레오타이드를 함유하는 서열 5' GTGTCATGAGCCTCCGGGCGAGCTG 3'(서열 12)을 갖는다. 당해 분야의 숙련인은 물론, 5' 프라이머가 시작되는 상기 단백질 암호화 서열 시점이 다양하여 상기 형태의 세포외 도메인보다 짧거나 긴 완전한 단백질의 목적하는 부위를 증폭시킬 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 3' 프라이머는 밀줄쳐진 HindIII 제한 부위에 이어서, 2개의 정지 코돈 및 도 1에서의 뉴트로킨 α DNA 서열의 암호화 서열의 3' 말단에 상보적인 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 서열 5' GTGAAGCTTTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'(서열 13)을 갖는다.

이와 같이 증폭된 뉴트로킨 α DNA 단편 및 벡터 pQE60을 BspHI 및 HindIII로 분해한 다음 분해된 DNA를 함께 연결시킨다. 뉴트로킨 α DNA를 제한된 pQE60 벡터에 삽입하여, 뉴트로킨 α 단백질 암호화 영역(이의 연결된 정지 코돈을 포함함)을 IPTG 유도성 프로모터의 하부 및 개시 AUG와 동일한 프레임 내에 위치시킨다.

이러한 연결 혼합물을 문헌[참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, NY (1989)]에 기술된 방법과 같은 표준 과정을 이용하여 적격한 이. 콜라이 세포로 형질전환시킨다. lacI 억제인자를 발현시키고 또한 카나마이신 내성('Kan^r')을 부여하는 플라스미드 pREP4의 다중 복사물을 함유하는 이. 콜라이 균주 M15/rep4가 본원에 기술된 예시적 예를 수행하는데 사용된다. 뉴트로킨 α 단백질을 발현시키는데 적합한 수많은 균주 중의 하나인 이러한 균주는 다음 공급원[QIAGEN, Inc., 상기 참조]으로부터 시판되고 있다. 앰피실린 및 카나마이신의 존재하에서 LB 판 상에서 성장하는 이의 능력에 의해 형질전환체를 동정한다. 플라스미드 DNA를 내성 콜로니로부터 분리시키고 클로닝된 DNA를 제한 분석, PCR 및 DNA 서열화에 의해 확인한다.

목적하는 작제물을 함유하는 클론을 앰피실린(100ug/ml)과 카나마이신(25ug/ml) 모두가 보충된 LB 배지 중의 액체 배양물에서 밤새(0/N) 성장시킨다. 0/N 배양물을 사용하여 대략 1:25 내지 1:250의 희석비로 대형 배양물에 접종시킨다. 세포를 0.4 내지 0.6의 광밀도 600('OD₆₀₀')으로 성장시킨다. 다음, 이소프로필- β -D-티오갈락토 피라노사이드('IPTG')를 가하여 최종 농도가 1mM이 되도록 하여, lacI 억제인자를 불활성화시킴으로써 lac 억제인자 민감성 프로모터로부터 전사를 유도한다. 세포를 3 내지 4시간 더 배양한다. 다음, 세포를 원심분리시켜 수거한다.

이어서, 세포를 pH 8에서 6M 구아니딘-HCl 중에서 4°C하에 3 내지 4시간 동안 교반시킨다. 세포 debris를 원심분리시켜 제거하고, 뉴트로킨 α 를 함유하는 상등액을 200mM NaCl이 보충된 50mM Na-아세테이트 완충액 pH 6에 대해 투석시킨다. 또한, 단백질을 프로테아제 억제인자를 함유하는, 500mM NaCl, 20% 글리세롤, 25mM 트리스/HCl pH 7.4에 대해 투석시킴으로써 이를 성공적으로 재폴딩할 수 있다. 재생 후, 상기 단백질을 이온 교환, 소수성 상호작용 및 크기 분별 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 또한, 항체 컬럼 등의 친화성 크로마토그래피 단계를 사용하여 순수한 뉴트로킨 α 단백질을 수득할 수 있다. 이와 같이 정제된 단백질을 4°C에서 저장하거나 -80°C에서 동결시킨다.

실시예 2: 바쿨로바이러스 발현 시스템에서 뉴트로킨 α 단백질의 클로닝 및 발현

이러한 예시적 예에서는, 플라스미드 서클 벡터 pA2 GP를 사용하여, 천연적으로 연결된 세포내 및 트랜스 멤브레인 서열이 결합된 상기 단백질의 세포외 도메인을 암호화하는 클로닝된 DNA를, 문헌[참조: Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987)]에 기술된 바와 같은 바쿨로바이러스 리더 및 표준 방법을 사용하여 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인을 발현시키는 바쿨로바이러스로 도입시킨다. 이러한 발현 벡터는 오토그라파 칼리포니카(Autographa californica) 핵 폴리헤드로시스 바이러스(AcMNPV)의 강력한 폴리헤드린 프로모터에 이어, 바쿨로바이러스 gp67 단백질의 분비성 시그널 펩타이드(리더) 및 BamHI, XbaI 및 Asp718 등의 편리한 제한 부위를 함유한다. 원숭이 바이러스 40('SV 40')의 폴리아데닐화 부위를 효율적인 폴리아데닐화를 위해 사용한다. 재조합 바이러스의 용이한 선별을 위해,

이러한 플라스미드는 동일한 배향의 약한 드로포필라(*Drosophila*) 프로모터의 조절하의 이. 콜라이로부터의 베타-갈락토시다제 유전자를 폴리헤드린 프로모터에 이어 폴리헤드린 유전자의 폴리아데닐화 시그널을 함유한다. 상기와 같이 삽입된 유전자를, 야생형 바이러스성 DNA와의 세포-매개된 동종 재조합을 위한 바이러스성 서열에 의해 양측에 플랭킹하여 상기 클로닝된 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 생존하고 있는 바이러스를 발생시킨다.

작제물이 필요에 따라 시그널 펩타이드 및 동일 프레임 내의 AUG를 포함한, 전사, 해독, 분비 등을 위해 적절하게 위치된 시그널을 제공해 주는 한, 당해 분야의 숙련인에게 용이하게 인지되는 바와 같이, 상기 벡터 대신 pAc373, pVL941 및 pAcIM1과 같은 수많은 기타 바쿨로바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 벡터는 예를 들어, 문헌[참조: Luckow et al., Virology, 170:31-39 (1989)]에 기술되어 있다.

도 1(서열 2)에 제시된 천연적으로 연결된 세포내 및 트랜스멤브레인 서열과 AUG 개시 코돈이 걸여된, 상기 기탁된 클론에서의 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 상기 유전자의 5' 및 3' 서열에 상응하는 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 5' 프라이머는 밀줄쳐진 BamHI 제한 효소 부위에 이어서, 상기 단백질의 세포외 도메인의 지시된 N-말단으로 시작하는, 도 1에 제시된 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인 서열의 18개 뉴클레오티드를 함유하는 서열 5' GTGGGATCCCCGGGCGAGAGCTGCAGGGC 3'(서열 14)을 갖는다. 3' 프라이머는 밀줄쳐진 BamHI 제한 부위에 이어서 2개의 정지 코돈 및 도 1에서의 3' 암호화 서열에 상보적인 18개 뉴클레오티드를 함유하는 서열 5' GTGGGATCCTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'(서열 15)을 갖는다.

이와 같이 증폭된 단편을 시판용 키트('Geneclean', B10 101 Inc., La Jolla, Ca)를 사용하여 1% 아가로스 겔로부터 분리시킨다. 이어서, 상기 단편을 BamHI로 분해하고 다시 1% 아가로스 겔 상에서 정제한다. 이 단편을 F1로서 명명한다.

상기 플라스미드를 상기 제한 효소 BamHI를 사용하여 분해한 다음, 임의로 송아지 장의 포스파타제를 사용하여 당해 기술 분야에 공지된 방법으로 탈포스포릴화한다. 다음, DNA를 시판용 키트('Geneclean', B10 101 Inc., La Jolla, Ca)를 사용하여 1% 아가로스 겔로부터 분리시킨다. 이러한 벡터 DNA를 본원에서 'V1'로서 명명한다.

단편 F1과 탈포스포릴화 플라스미드 V1을 T4 DNA 리가제를 사용하여 함께 연결시킨다. 그 다음, 이. 콜라이 HB101 세포 또는 기타 적합한 이. 콜라이 숙주, 예를 들어, XL-1 Blue(Statagene Cloning Systems, La Jolla, CA)를 상기 연결 혼합물로 형질전환시키고 배양 플레이트 위에 도말한다. BamHI를 사용하여 개개의 콜로니로부터 DNA를 분해하고 분해 생성물을 겔 전기영동에 의해 분석함으로써 사람 뉴트로킨 α 유전자를 갖는 플라스미드를 함유하는 세균을 동정하였다. 이와 같이 클로닝된 단편의 서열은 DNA 서열화에 의해 확인한다. 이 플라스미드를 본원에서 pA2GP 뉴트로킨 α 로 명명한다.

플라스미드 pA2GP 뉴트로킨 α 5 μ g을 리포펙션(lipofection) 방법[참조: Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417(1987)]을 사용하여 시판용의 선형화된 바쿨로바이러스[상표: '바쿨로골드(BaculoGold™)' 바쿨로바이러스 DNA', 공급원: Pharmingen, San Diego, CA.] 1.0 μ g으로 공동형질감염시킨다. 바쿨로골드™ 바이러스 DNA 1 μ g 및 상기 플라스미드 pA2GP 뉴트로킨 α 5 μ g을 무혈청 그레이스 배지(공급원: Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) 50 μ l를 함유하는 미세역가판의 멸균 웰에서 혼합한다. 리포펙틴 10 μ l와 그레이스 배지 90 μ l를 가한 후에, 혼합하고 실온에서 15분 동안 배양한다. 다음, 형질감염 혼합물을 무혈청 그레이스 배지 1ml와 함께 35mm 조직 배양 플레이트에 접종된 Sf9 곤충 세포(ATCC CRL 1711)에 적가한다. 그 다음, 상기 플레이트를 27°C에서 5시간 동안 배양한다. 형질감염 용액을 상기 플레이트로부터 제거하고 10% 태아 송아지 혈청이 보충된 그레이스 곤충 배지 1ml를 가한다. 그 다음, 4일 동안 27°C에서 계속 배양한다.

4일 후에 상등액을 수집하고 플라크 분석을 상기 섬머즈(Summers)와 스미스(Smith)에 의해 기술된 바와 수행한다. 블루 염색된 플라크를 생성시키는, gal-발현성 클론을 용이하게 동정하고 분리시키도록 하기 위해 'Blue Gal'(Life Technologies Inc., Gaithersburg)이 함유된 아가로스 겔을 사용한다. ('플라크 분석'의 상세한 설명은 공급자(Life Technologies Inc., Gaithersburg)에 의해 배포된 곤충 세포 배양 및 바쿨로바이러스학에 관한 사용자 지침서 제9면 내지 제10면에서 참조할 수 있다). 적절히 배양한 후에, 블루 염색된 플라크를 에펜도르프 피펫 팁으로 굴라낸다. 그 다음, 재조합 바이러스를 함유하는 한천을 그레이스 배지 200 μ l를 함유하는 미소원심분리용 튜브 내에서 재현탁시키고 재조합 바쿨로바이러스를 함유하는 상등액을 사용하여 35mm 디쉬에 접종된 Sf9 세포를 감염시킨다. 4일 후에 상기 배양 디쉬의 상등액을 수거한 다음 4°C에서 저장한다. 이러한 재조합 바이러스는 V-뉴트로킨 α 로서 명명한다.

뉴트로킨 α 유전자의 발현을 확인하기 위하여, Sf9 세포를 10% 열-불활성화된 FBS로 보충된 그레이스 배지에서 성장시킨다. 이 세포를 감염 다중도(multiplicity of infection('MOI')) 약 2에서 재조합 바쿨로바이러스 V-뉴트로킨 α 로 감염시킨다. 방사선 표지된 단백질을 목적하는 경우에는, 6시간 후에 배지를 제거하고 메티오닌 및 시스테인 부재의 SF900 II 배지[Life Technologies Inc., Rockville, MD]로 대체한다. 42시간 후에, ³⁵S-메티오닌 5 μ Ci 및 ³⁵S-시스테인 5 μ Ci(공급원: Amersham)를 가한다. 세포를 원심분리에 의해 수거하기 전에 16시간 동안 추가로 배양한다. 상등액 중의 상기 단백질 및 세포내 단백질을 SDS-PAGE 및 자가방사성사진(방사선 표지된 경우)에 의해 분석한다.

정제된 단백질의 아미노 말단의 아미노산 서열의 미소서열화를 이용하여 상기 단백질의 세포외 도메인의 아미노 말단 서열을 결정할 수 있으므로 분비성 시그널 펩타이드의 절단 지점과 길이를 결정할 수 있다.

실시예 3: 포유류 세포에서 뉴트로킨 α 의 클로닝 및 발현

전형적인 포유류 발현 벡터는 mRNA의 전사 개시를 매개하는 프로모터 요소, 단백질 암호화 서열, 및 전사 종결 및 상기 전사체의 아데닐화에 요구되는 시그널을 함유한다. 부가의 요소에는 인핸서(enhancer), 코작 서열, 및 RNA 스플라이싱을 위해 공여자와 수용자에 의해 플랭킹된 중재 서열이 포함된다. 고도로 효

올적인 전사는 SV40으로부터의 어얼리 및 레이트 프로모터, 레트로바이러스, 예를 들어, RSV, HTLV1, HIV1로부터의 장 말단 반복체(LTR), 및 사이토갈로바이러스(CMV)의 초기 프로모터를 사용하여 달성할 수 있다. 그러나, 세포성 성분을 사용할 수도 있다(예를 들어, 사람 액틴 프로모터). 본 발명을 실시하는 데 사용하기에 적합한 발현 벡터로는, 예를 들어, pSVL 및 pMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146) 및 pBC12M(ATCC 67109) 등의 벡터가 있다. 사용할 수 있는 포유류 숙주 세포로는 사람 Hela, 293, H9 및 Jurcat 세포, 마우스 NIH3T3 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV1, 쿠알리 QC1-3 세포, 마우스 L 세포 및 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포가 있다.

또는, 상기 유전자를 염색체로 통합된 유전자를 함유하는 안정한 세포주에서 발현시킬 수 있다. dhfr, gpt, 네오마이신, 하이그로마이신 등의 선별성 마커로 공동 형질감염시켜, 형질감염된 세포를 동정 및 분리할 수 있다.

형질감염된 유전자를 증폭시켜 다량의 암호화된 단백질을 발현시킬 수도 있다. DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제) 마커가 관심있는 유전자의 수백 또는 심지어는 수천 복사물을 수반하는 세포주를 발생시키는 데 유용하다. 또 다른 유용한 선별성 마커는 효소 글루타민 신타제(GS)이다[참조: Murphy et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)]. 이들 마커를 사용하여, 포유류 세포를 선택적인 배지에서 성장시키고 가장 높은 내성을 지니고 있는 세포를 선택한다. 이들 세포주는 염색체로 통합된 증폭된 유전자(들)를 함유한다. 중국산 햄스터 난소(CHO) 및 NSO 세포를 종종 단백질 생성에 사용한다.

발현 벡터 pC1 및 pC4는 라우스 육종 바이러스[참조: Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447(1985. 3.)]의 강력한 프로모터(LTR) 플러스 CMV 인핸서[참조: Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985)]의 단편을 함유한다. 예를 들어, 제한 효소 절단 부위 BamHI, XbaI 및 Asp718을 갖는 다중 클로닝 부위는 관심있는 유전자의 클로닝을 촉진시킨다. 이러한 벡터는 3' 인트론 이외에, 프리프로인솔린 유전자의 폴리아데닐화 및 종결 시그널을 함유한다.

실시예 3(a): COS 세포에서의 클로닝 및 발현

발현 플라스미드 pNeurokine α HA는 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인을 암호화하는 기탁된 cDNA의 일부분을 발현 벡터 pcDNA1/Amp 또는 pcDNA111(이는 Invitrogen, Inc.로부터 취득할 수 있다)에 클로닝 시킴으로써 제조한다. 가용성의 분비된 형태의 폴리펩타이드를 발현시키기 위해, 상기 세포외 도메인을 사람 IL-6 유전자의 분비성 리더 서열에 융합시킨다.

발현 벡터 pcDNA1/Amp는 (1) 이. 콜라이 및 기타 원핵성 세포에서의 증식에 효과적인 이. 콜라이 복제 기점; (2) 플라스미드 함유 원핵성 세포의 선별을 위한 앰피실린 내성 유전자; (3) 진핵성 세포에서의 증식을 위한 SV 복제 기점; (4) CMV 프로모터, 폴리링커, SV40 인트론; (5) 혈구 응집소 단편(즉, 정제를 촉진시키기 위한 'HA' 태그)을 암호화하는 몇몇 코돈에 이어, cDNA가 CMV 프로모터의 발현 조절하에 편리하게 위치시키고 폴리링커에서의 제한 부위를 통하여 SV 인트론 및 폴리아데닐화 시그널에 작동적으로 연결되도록 배열된 종결 코돈 및 폴리아데닐화 시그널을 함유한다. HA 태그는 문헌[참조: Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)]에 기술된 바와 같이 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유도된 에피토프에 상응한다. 표적 단백질과의 HA 태그의 융합은 HA 에피토프를 인식하는 항체를 사용하여 상기 재조합 단백질을 용이하게 탐지하도록 한다. pcDNA111은 또한 선별성 네오마이신 마커를 함유한다.

뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 단편을 상기 벡터의 폴리링커 영역에 클로닝시켜, 재조합 단백질 발현이 CMV 프로모터에 의해 지시되도록 한다. 플라스미드 작제 방법은 다음과 같다. 기탁된 클론의 뉴트로킨 α cDNA를, 이. 콜라이에서 뉴트로킨 α 발현용 벡터의 작제를 위해 상기 기술된 바와 같은, 편리한 제한 부위를 함유하는 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 적합한 프라이머로는 본 실시예에서 사용되는, 다음과 같은 것이 포함된다. 밀줄쳐진 BamHI 부위, 코작 서열, AUG 출발 코돈, 사람 IL-6 유전자로부터의 분비성 리더 펩타이드를 암호화하는 서열, 및 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인의 5' 암호화 영역의 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 5' 프라이머는 다음 서열을 갖는다:

5' GCGGGATCCGCCACCATGAACCTCTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTGCCTTCCCTGCCCGAGTTGTGAGACAAGGGGACCTGGCCAGC 3' (서열 16). 밀줄쳐진 BamHI 제한 부위, 및 정지 코돈 바로 앞에 3' 암호화 서열에 상보적인 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 3' 프라이머는 다음 서열을 갖는다: 5' GTGGGATCCTTACAGCAGTTTCAATGCACC 3' (서열 17).

PCR 증폭된 DNA 단편 및 벡터 pcDNA1/Amp를 BamHI로 분해하고 연결시킨다. 연결 혼합물을 이. 콜라이 균주 SURE(공급원: Stratagene Cloning System, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037)내로 형질전환시키고, 형질전환된 배양물을 앰피실린 배지판 위에 도말한 다음 앰피실린 내성 콜로니가 성장할 수 있도록 이를 배양한다. 플라스미드 DNA를 내성 콜로니로부터 분리시키고 뉴트로킨 α 세포외 도메인을 암호화하는 단편의 존재를 알아보기 위하여 제한 분석 또는 기타 방법에 의해 조사한다.

재조합 뉴트로킨 α 를 발현시키기 위해, COS 세포를 예를 들어, 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, New York (1989)]에 기술된 바와 같이, DEAE-DEXTRAN 방법에 의해 앞서 기술된 바와 같이 발현 벡터로 형질감염시킨다. 상기 벡터에 의한 뉴트로킨 α 의 발현에 대한 조건하에서 상기 세포를 배양한다.

뉴트로킨 α HA 융합 단백질의 발현을 문헌[참조: Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]에 기술된 방법을 사용하여 방사성표지 및 면역침전법으로 탐지한다. 이를 위하여, 형질감염시킨지 2일 후에, 세포를 ³⁵S-시스테인을 함유하는 배지에서 8시간 동안 배양함으로써 표지시킨다. 이어서, 상기 세포와 배지를 수집하고 세포를 상기 인용된 문헌[Wilson et al.]에 기술된 바와 같이, 세척하고 세정제 함유 RIPA 완충액(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50mM 트리스, pH 7.5)(참조: Wilson, I. et al., Id. 37:767(1984))로 용융시킨다. HA 특이적 모노클로날 항체를 사용하여 세포 용융물과 배양 배지 모두로부터 단백질을 침전시킨다. 이어

서, 침전된 단백질을 SDS-PAGE 및 자가방사선 사진으로 분석한다. 예상되는 크기의 발현 생성물이 세포 용출물에서 관찰되는데, 이는 음성 대조군에서는 발견되지 않는다.

실시에 3(b): CHO 세포에서의 클로닝 및 발현

벡터 pC4를 뉴트로킨 α 단백질의 발현에 사용한다. 플라스미드 pC4는 플라스미드 pSV2-dhfr(ATCC 기탁번호 제37146호)의 유도체이다. 가용성의 분비된 형태의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 생성시키기 위해, 상기 세포의 도메인을 암호화하는 기탁된 cDNA의 일부분을 사람 IL-6 유전자의 분비성 리더 서열에 융합시킨다. 상기 벡터 플라스미드는 SV40 초기 프로모터의 조절하에 마우스 DHFR 유전자를 함유한다. 이들 플라스미드로 형질감염시킨, 디하이드로폴레이트 활성이 결여된 중국산 햄스터 난소- 또는 기타 세포를 화학치료요법제 메토틱렉세이트가 보충된 선별용 배지(alpha minus MEM, Life Technologies)에서 성장시킴으로써 상기 세포를 선별할 수 있다. 메토틱렉세이트(MTX)에 대해 내성이 있는 세포에서 DHFR 유전자를 증폭시키는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있다[참조: Alt, F.W., Kellems, R.M., Bertino, J.R., 및 Schimke, R.T., 1978, J. Biol. Chem. 253:1357-1370, Hamlin, J. L. 및 Ma, C. 1990, Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143, Page, M.J. 및 Sydenham, M.A. 1991, Biotechnology 9:64-68]. MTX의 증가 농도에서 성장시킨 세포는 DHFR 유전자의 증폭 결과로서 표적 효소인 DHFR을 과생성시킴으로써 약물에 대한 내성을 발생시킨다. 제2 유전자가 이러한 DHFR 유전자에 연결되는 경우, 이는 통상적으로 공동 증폭되어 과발현된다. 이러한 접근법을 이용하여 1,000복사수 이상의 증폭된 유전자(들)를 수반하는 세포주를 발생시킬 수 있다는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 연속적으로, 메토틱렉세이트의 투여가 중지된 경우에는, 숙주 세포의 하나 이상의 염색체(들)에 통합된 증폭된 유전자를 함유하는 세포주가 수득된다.

플라스미드 pC4는 관심있는 유전자를 발현시키기 위해, 라우스 육종 바이러스[참조: Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447]의 장 말단 반복체(LTR)의 강력한 프로모터 플러스 사람 메갈로바이러스(CMV)[참조: Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985)]의 이미디어트 어얼리 유전자의 인핸서로부터 분리된 단편을 함유한다. 이러한 프로모터의 하부는 유전자의 통합을 허용하는 다음의 단일 제한 효소 절단 부위이다: BamHI, XbaI 및 Asp718. 이들 클로닝 부위 뒤에, 플라스미드는 3' 인트론과 rat 프리프로인슐린 유전자의 폴리아데닐화 부위를 함유한다. 기타 고효율적인 프로모터, 예를 들어, 사람 β -액틴 프로모터, SV40 어얼리 또는 레이트 프로모터, 또는 기타 레트로바이러스, 예를 들어, HIV 및 HTLV I로부터의 장 말단 반복체를 상기 발현에 사용할 수도 있다. 클론테크의 테트-오프 및 테트-온(Clontech's Tet-Off and Tet-On) 유전자 발현 시스템 및 유사한 시스템을 사용하여 뉴트로킨 α 를 포유류 세포에서 조절된 방식으로 발현시킬 수 있다[참조: Gossen, M., & Bujard, H. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551]. mRNA의 폴리아데닐화를 위해, 예를 들어, 사람 성장 호르몬 또는 글로빈 유전자로부터의 기타 시그널을 또한 사용할 수 있다. 염색체내로 통합된 관심있는 유전자를 수반하는 안정한 세포주를 또한, gpt, G418 또는 하이그로마이신 등의 선별성 마커로 공동 형질감염시 선별할 수 있다. 개시부에서 하나 이상의 선별용 마커, 예를 들어, G418 플러스 메토틱렉세이트를 사용하는 것이 유리하다.

플라스미드 pC4를 제한 효소 BamHI로 분해한 다음 당해 분야에 공지된 과정에 의해 송아지 장의 포스페이트를 사용하여 탈포스포릴화한다. 이어서, 상기 벡터를 1% 아가로즈 겔로부터 분리한다.

뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 단편을 상기 유전자의 5' 및 3' 서열에 상응하는 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 밀줄쳐진 BamHI 부위, 코작 서열, AUG 출발 코돈, 사람 IL-6 유전자로부터의 분비성 리더 펩타이드를 암호화하는 서열, 및 뉴트로킨 α 단백질의 세포외 도메인의 5' 암호화 영역의 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 5' 프라이머는 다음 서열을 갖는다:

5' GCGGGATCGGCCACCATGAACCTCTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTGCCTTCCCTGCCAGTTGTGAGACAAGGGGACCTGGCCAGC 3' (서열 16). 밀줄쳐진 BamHI 제한 부위, 및 정지 코돈 바로 앞에 3' 암호화 서열에 상보적인 18개 뉴클레오타이드를 함유하는 3' 프라이머는 다음 서열을 갖는다: 5' GTGGGATCCTTACAGCAGTTTCAATGCACC 3' (서열 17).

상기와 같이 증폭된 단편을 엔도뉴클레아제 BamHI로 분해한 다음, 1% 아가로즈 겔 상에서 다시 정제한다. 분리된 단편 및 탈포스포릴화 벡터를 T4 DNA 리가제를 사용하여 연결시킨다. 이어서, 이. 콜라이 HB101 또는 XL-1 Blue 세포를 형질전환시키고, 예를 들어, 제한 효소 분석을 이용하여 플라스미드 pC4에 삽입된 단편을 함유하는 세균을 동정한다.

활성 DHFR이 결여된 중국산 햄스터 난소 세포를 형질감염에 사용한다. 발현 플라스미드 5 μ g을 리포펙션 방법[Felgner et al., 상기 문헌 참조]을 사용하여 플라스미드 pSV-neo 0.5 μ g으로 공동형질감염시킨다. 이러한 플라스미드 pSV-neo는 공여체 선별성 마커, G418을 포함한 항생제 그룹에 대한 내성을 부여해주는 효소를 암호화하는 Tn5로부터의 neo 유전자를 함유한다. 상기 세포를 1mg/ml G418이 보충된 alpha minus MEM에 접종한다. 2일 후, 상기 세포를 트립신 처리하고 메토틱렉세이트 10, 25 또는 50ng/ml 플러스 1mg/ml G418이 보충된 알파 마이너스 MEM 중의 하이브리도마 클로닝 플레이트(Greiner, Germany)에 접종한다. 약 10일 내지 14일 후에, 단일 클론을 트립신 처리한 다음, 상이한 농도의 메토틱렉세이트(50nM, 100nM, 200nM, 400nM, 800nM)를 사용하여 6-웰 페트리 디쉬 또는 10ml 플라스크에 접종한다. 이어서, 가장 고농도의 메토틱렉세이트에서 성장하는 클론을 보다 고농도의 메토틱렉세이트(1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10mM, 20mM)를 함유하는 새로운 6-웰 플레이트에 옮긴다. 100 내지 200 μ M의 농도에서 성장하는 클론이 수득될 때까지 동일한 과정을 반복한다. 목적하는 유전자 생성물의 발현을 예를 들어, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 또는 역상 HPLC 분석에 의해 분석한다.

실시에 4: 뉴트로킨 α mRNA 발현의 조직 분포

문헌[Sambrook et al. 상기 문헌 참조]에 기술된 방법을 사용하여, 노던 블롯 분석을 수행하여 사람 조직에서의 뉴트로킨 α 유전자 발현을 조사한다. 뉴트로킨 α 단백질의 전체 뉴클레오타이드 서열(서열 1)을 함유하는 cDNA 프로브를 제조업자의 지시에 따라서 rediprimeTM DNA 표지화 시스템(Amersham Life

Science)을 사용하여 32 P로 표지시킨다. 표지 후, 상기 프로브를 제조업자의 프로토콜 제PT1200-1호에 따라서, CHROMA SPIN-100^{MT} 컬럼(Clontech Laboratories, Inc.)을 사용하여 정제한다. 이와 같이 정제되고 표지된 프로브를 사용하여 뉴트로킨 α mRNA에 대해 각종 사람 조직을 조사한다.

각종 사람 조직(H) 또는 사람 면역 시스템 조직(IM)을 함유하는 다중 조직 노던(MTN) 블롯을 클로테크(Clontech)로부터 수득하고 제조업자의 프로토콜 제PT1190-1호에 따라서, ExpressHybTM 하이브리드화 용액(Clontech)을 사용하여 표지된 프로브로 조사한다. 하이브리드화 및 세척을 수행한 후, 상기 블롯을 올려 놓고 -70°C 하에서 필름에 방출 노출시키고 필름을 표준 공정에 따라서 현상한다.

본 발명이 앞서의 기술 내용 및 실시예에 특정하게 기술된 것 이외에도 실시할 수 있다는 것은 명백할 것이다. 본 발명의 수많은 변형 및 변화가 상기 교시 측면에서 가능하므로, 이들 역시 첨부된 청구의 범위 내에 속한다.

본원에 인용된 모든 공개문헌(특허, 특허원, 저널, 실험용 매뉴얼, 서적 또는 기타 인쇄물을 포함함)의 전문이 본원에 참조문헌으로 인용한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

- (a) 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (b) 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 완전한 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (c) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (d) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 트랜스멤브레인 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (e) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 세포내 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (f) 세포외 및 세포내 도메인은 포함하지만 트랜스멤브레인 도메인이 결여된 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및
- (g) 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)에서의 뉴클레오티드 서열 중의 어느 하나에 상보적인 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 도 1에서의 완전한 뉴클레오티드 서열(서열 1)을 갖는 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 도 1에서의 뉴클레오티드 서열(서열 1)을 갖는 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 도 1에 도시된 세포외 도메인을 포함하는 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(서열 2)을 갖는 핵산 분자.

청구항 5

- (a) 서열 2의 잔기 n-285(여기서, n은 2 내지 190 범위내의 정수이다)로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (b) 서열 2의 잔기 1-m(여기서, m은 274 내지 284 범위내의 정수이다)로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- (c) 서열 2의 잔기 n-m(여기서, n 및 m은 상기 (a) 및 (b)에서 각각 정의된 바와 같은 정수이다)로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및
- (d) 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 완전한 뉴트로킨 α 아미노산 서열의 일부분으로 구성된 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(여기서, 상기 부분은 완전한 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터의 1 내지 190개 아미노산 및 C-말단으로부터의 1 내지 11개 아미노산을 제외한다)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론의 완전한 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호

화된 완전한 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 세포외 도메인을 포함하는 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자.

청구항 9

엄격한 하이브리드화 조건하에 제1항의 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)에서의 뉴클레오티드 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 하이브리드화하며, 여기서, 하이브리드화한 폴리뉴클레오티드는 엄격한 하이브리드화 조건하에 A 잔기만으로 이루어지거나 T 잔기만으로 이루어진 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 하이브리드화하지 않는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 10

제1항의 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)에서의 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 약 Phe 115에서 약 Leu 147까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Ile 150에서 약 Tyr 163까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Ser 171에서 약 Phe 194까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Glu 223에서 약 Tyr 247까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 및 약 Ser 271에서 약 Phe 278까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 에피토프-보유 부분을 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 12

제1항의 분리된 핵산 분자를 특정 벡터에 삽입함을 포함하여, 재조합 벡터를 제조하는 방법.

청구항 13

제12항의 방법에 의해 제조된 재조합 벡터.

청구항 14

제13항의 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입함을 포함하여, 재조합 숙주 세포를 제조하는 방법.

청구항 15

제14항의 방법에 의해 제조된 재조합 숙주 세포.

청구항 16

뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 발현시켜 이를 회수하도록 하는 조건하에서 제15항의 재조합 숙주 세포를 배양함을 포함하여, 뉴트로킨 α 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 17

- (a) 도 1에서의 완전한 아미노산 서열(서열 2)을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 아미노산 서열;
- (b) 1996년 10월 22일자의 ATCC 기탁물에 함유된 cDNA 클론에 의해 암호화된 완전한 아미노산 서열을 갖는 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 아미노산 서열;
- (c) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 세포외 도메인의 아미노산 서열;
- (d) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 트랜스멤브레인 도메인의 아미노산 서열;
- (e) 뉴트로킨 α 폴리펩타이드 세포내 도메인의 아미노산 서열;
- (f) 상기 도메인을 포함하는 가용성 뉴트로킨 α 폴리펩타이드의 아미노산 서열; 및
- (g) 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 폴리펩타이드 중의 어느 하나의 에피토프-보유 부분의 아미노산 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 분리된 뉴트로킨 α 폴리펩타이드.

청구항 18

제17항에 있어서, 약 Phe 115에서 약 Leu 147까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Ile 150에서 약 Tyr 163까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Ser 171에서 약 Phe 194까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 약 Glu 223에서 약 Tyr 247까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드; 및 약 Ser 271에서 약 Phe 278까지의 아미노산 잔기(서열 2)를 포함하는 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴트로킨 α 단백질의 에피토프-보유 부분을 포함하는 분리된 폴리펩타이드.

청구항 19

제17항의 뉴트로킨 α 폴리펩타이드에 특이적으로 결합되는 분리된 항체.

청구항 20

제17항의 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 21

- (a) 클론 HS0AD55R의 뉴클레오티드 서열(서열 7);
 (b) 클론 HSLAH84R의 뉴클레오티드 서열(서열 8);
 (c) 클론 HLTBM08R의 뉴클레오티드 서열(서열 9);
 (d) 뉴클레오티드 1 내지 뉴클레오티드 809의 연속되는 30개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 도 1에 도시된 서열(서열 1)의 일부분의 뉴클레오티드 서열; 및
 (e) 상기 (a), (b), (c) 또는 (d)에서의 뉴클레오티드 서열 중의 어느 하나에 상보적인 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 95% 이상 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자.

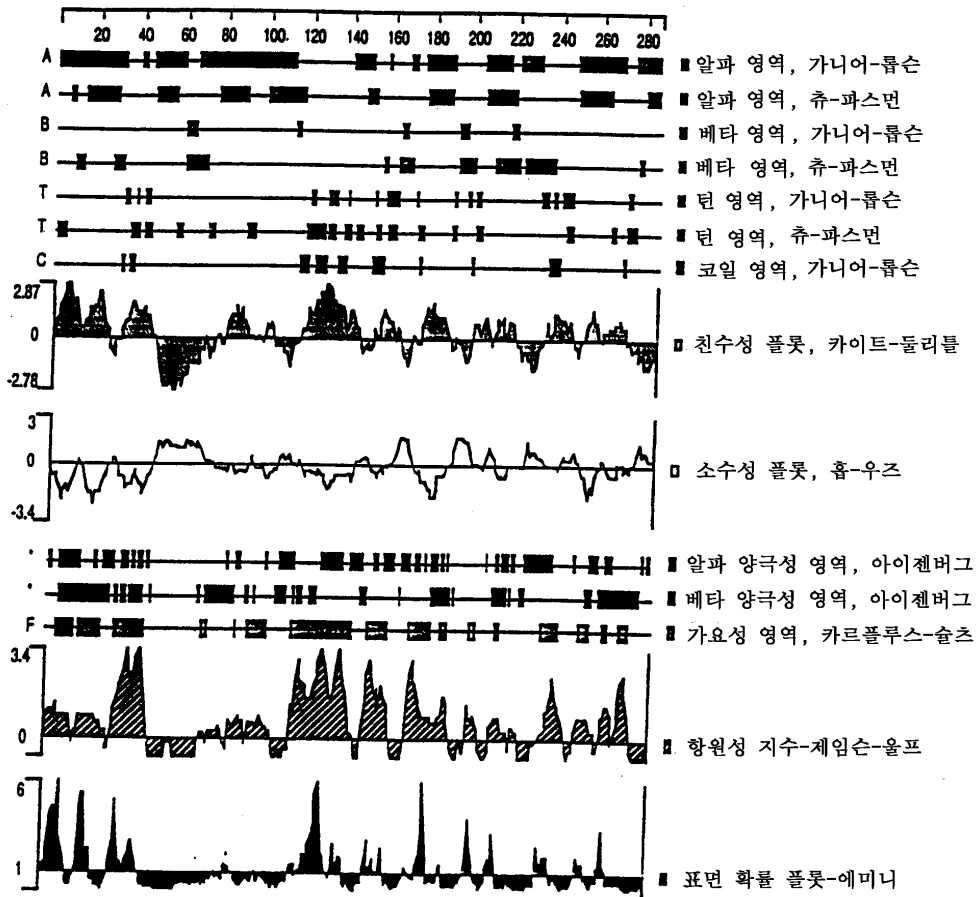
도면

도면1

```

1  AAATTGAGGATACTCTCTGAGGGGTGAGCCAGCCCTGCCATGTAGTGCACGCAGGAC
61  ATCAACAACACAGATAACAGGAAATGATCCATTCCCTGTGGTCACTTATCTAAAGGCC
121 CCAACCTTCAAAGTTCAGTAGTGATATGGATGACTCCACAGAAAGGGAGCAGTCACGCC
1  M D D S T E R E Q S R L
181 TTACTTCTTGCCCTAAGAAAAGAGAAGAAATGAACTGAAGGAGTGTGTTCCATCTCTCC
13  T S C L K K R E E M K L K E C V S I L P
241 CAAGGAAGGAAAGCCCTCTGTCCGATCCCTCAAAGAAGGAAAGCTGCTGGCTGCAACCT
33  R K E S P S V R S S K D G K L L A A T L
301 TGCTGCTGGCACTGCTGCTCTGCTGCCCTCAGGTGGTGTCTTTCTACAGGTGGCCGCC
53  L L A L L S C C L T V V S F Y O V A A L
361 TGCAAGGGGACCTGGCCAGCCTCCGGGAGAGCTGCAGGGCCACCCGCGAGAAAGCTGC
73  Q G D L A S L R A E L Q G H H A E K L P
421 CAGCAGGAGCAGGAGCCCCCAAGGCCGCCCTGGAGGAAGCTCCAGCTGTACCCGGGGAC
93  A G A G A P K A G L E E A P A V T A G L
481 TGAAATCTTTGAACCAACAGCTCCAGGAGAAGGCACTCCAGTCAGAACAGCAGAAATA
113 K I F E P P A P G E G N S S Q N S R N K
541 AGCGTGCCGTTCAGGGTCCAGAAGAACAGTCACTCAAGACTGCTTGCAACTGATTCAG
133 R A V Q G P E E T V T Q D C L Q L I A D
601 ACAGTGAAACCAACTATACAAAAAGGATCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCT
153 S E T P T I Q K G S Y T F V P W L L S F
661 TTAAAAGGGGAAGTGCCTAGAAGAAAAGAGAATAAAATATTGGTCAAAGAAACTGGTT
173 K R G S A L E E K E N K I L V K E T G Y
721 ACTTTTATATATATGGTCAAGTTTATATACTGATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAA
193 F F I Y G Q V L Y T D K T Y A M G H L I
781 TTCAGAGGAAGAGGTCCATGCTTTGGGGATGAATGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGAT
213 Q R K K V H V F G D E L S L V T L F R C
841 GTATTCAAATATGCCTGAAACACTACCCAATAATTCCTGCTATTACAGCTGGCATTGCAA
233 I Q N M P E T L P N N S C Y S A G I A K
901 AACTGGAAGAAGGAGATGAACCTCAACTTGCAATACCAAGAGAAAAATGCACAAATATCAC
253 L E E G D E L Q L A I P R E N A Q I S L
961 TGGATGGAGATGTCACATTTTGGTGCAATTGAAACTGCTGTGACCTACTTACACCATGT
273 D G D V T F F G A L K L L
1021 CTGTAGCTATTTTCTCCCTTTCTCTGTACCTCTAAGAAGAAAGAAATCTAACTGAAATA
1081 CCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```


도면3



도면4a

```

1                                     50
HSOAD55R .....A GGNTAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA
HNEDU15X ...AAATTCA GGATAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA
HSLAH84R .AATTCGGCA NAGNAACTG GTTACTTTT TATATATGGT CAGGTTTTAT
HLTBM08R AATTCGGCAC GAGCAAGGCC GGCCTGGAGG AAGCTCCAGC TGTCACCGCG

51                                     100
HSOAD55R GTGCACGCAG GACATCANCA A..ACACANN NNNCAGGAAA TAATCCATTTC
HNEDU15X GTGCACGCAG GACATCAACA A..ACACAGA TAACAGGAAA TGATCCATTTC
HSLAH84R ATACTGATAA GACCTACGCC ATGGGACATC TAGTTCAGAG GAAGAAGGTC
HLTBM08R GGACTGAAAA TCTTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAAGGCA ACTCCAGTCA

101                                    150
HSOAD55R CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA
HNEDU15X CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA
HSLAH84R CATGTCTTTT GGGATGAATT GAGTCTGGTG ACTTTGTTTC GATGTATTCA
HLTBM08R GAACAGCAGA AATAAGCGTG CCGTTCAGGG TCCAGAAGAA ACAGTCACTC

151                                    200
HSOAD55R TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTGTCCTTA
HNEDU15X TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTGTCCTTA
HSLAH84R AAATATGCCT GAAACACTAC CCAATAATTC CTGCTATTCA GCTGGCATTG
HLTBM08R AAGACTGCTT GCAACTGNTT GCAGACAGTG AAACACCAAC TATACAAAAA

201                                    250
HSOAD55R AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CTGNAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCACG
HNEDU15X AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CT.GAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCACG
HSLAH84R CAAAACTGNN AGGAAGGA...GATGAAC TCCAAGTTC AATACCAGGG
HLTBM08R GGCTCCCTTC TGNTGCCACA TTTGGGCCAA GGAATGGAGA GATTTCTTCG

251                                    300
HSOAD55R GAAGGAAAGC CCCTCTNTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG
HNEDU15X GAAGGAAAGC CCCTCTGTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG
HSLAH84R GAAAATGCAC AATTATCACT GGGATGGAGA TGTTACATT TTTTGGGTGC
HLTBM08R TCTGGAAACA TTTTGCCAAA CTCTTCAGAT ACTCTTTNCT CTCTGGGAAT

301                                    350
HSOAD55R CAACCTTGNT GNTGGCATTG TGTCTTGCT GNCTCAAGGT GGTGTTNTT.
HNEDU15X CAACCTTGCT GCTGGCACTG CTGTCTTGCT GCCTCACGGT GGTGTCCTTC
HSLAH84R CATTGAAACT GCTGTGACCT NCTTACANCA NGTGCTGTN GCTATTTTNC
HLTBM08R CAAAGGAAAA TCTCTACTTA GATTNACACA TTTGTTCCCA TGGGTNTCTT

351                                    400
HSOAD55R .....
HNEDU15X TACCAGGTGG CCGCCCTGCA AGGGGACCTG GCCAGCCTCC GGGCAGAGCT
HSLAH84R CTNCTNTTTC TNTGGTAACC TCTTAGGAAG GAAGGATTCT TAACTGGGAA
HLTBM08R AAGTTTTAAA AGGGGAGTGC CCTTAGGAGG AAAAGGGGAT AAATATTGGC

```

도면4b

	401		450
HSOADS55R			
HNEDU15X	GCAGGGCCAC	CACGCGGAGA	AGCTGCCAGC AGGAGCAGGA GCCCCCAAGG
HSLAH84R	ATAACCCAAA	AAAAANNTTAA	ANGGGTANGN GNNANANGNG GGGNNGTTNN
HLTBM08R	CAAGGNACTG	GTTANTTTNT	AAATATGGTC AGGTTTNTAT ANCTGGTAGG
	451		500
HSOADS55R			
HNEDU15X	CCGGCCTGGA	GGAAGCTCCA	GCTGTCACCG CGGGACTGAA AATCTTTGAA
HSLAH84R	CNNGNNGNNT	TTTNGGNNTA	TNTTNTNNTN GGGNNNNGTA AAAATGGGGC
HLTBM08R	CCTCGCCATG	GGCATTNATT	CANGGNGAGG NCNNTCTTTT GGGNTGA...
	501		550
HSOADS55R			
HNEDU15X	CCACCAGCTC	CAGGAGAAGG	CAACTCCAGT CAGAACAGCA GAAATAAGCG
HSLAH84R	CNANGGGGGN	TTTTT.....	
HLTBM08R			
	551		600
HSOADS55R			
HNEDU15X	TGCCGTTTCTAG	GGTCCAGAAG	AAACAGTCAC TCAAGACTGC TTGCAACTGA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	601		650
HSOADS55R			
HNEDU15X	TTGCAGACAG	TGAAACACCA	ACTATACAAA AAGGATCTTA CACATTTGTT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	651		700
HSOADS55R			
HNEDU15X	CCATGGCTTC	TCAGCTTTAA	AAGGGGAAGT GCCCTAGAAG AAAAAGAGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	701		750
HSOADS55R			
HNEDU15X	TAAAATATTG	GTCAAAGAAA	CTGGTTACTT TTTTATATAT GGTCAGGTTT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	751		800
HSOADS55R			
HNEDU15X	TATATACTGA	TAAGACCTAC	GCCATGGGAC ATCTAATTCA GAGGAAGAAG
HSLAH84R			
HLTBM08R			

도면4c

	801		850
HSOAD55R			
HNEDU15X	GTCCATGTCT	TTGGGGATGA	ATTGAGTCTG GTGACTTTGT TTCGATGTAT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	851		900
HSOAD55R			
HNEDU15X	TCAAAATATG	CCTGAAACAC	TACCCAATAA TTCCTGCTAT TCAGCTGGCA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	901		950
HSOAD55R			
HNEDU15X	TTGCAAAACT	GGAAGAAGGA	GATGAACTCC AACTTGCAAT ACCAAGAGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	951		1000
HSOAD55R			
HNEDU15X	AATGCACAAA	TATCACTGGA	TGGAGATGTC ACATTTTGTG GTGCATTGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1001		1050
HSOAD55R			
HNEDU15X	ACTGCTGTGA	CCTACTTACA	CCATGTCTGT AGCTATTTTC CTCCCTTTCT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1051		1100
HSOAD55R			
HNEDU15X	CTGTACCTCT	AAGAAGAAAG	AATCTAACTG AAAATACCAA AAAAAAAAAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1101		
HSOAD55R			
HNEDU15X	AAAAAA		
HSLAH84R			
HLTBM08R			