



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월07일

(11) 등록번호 10-1637613

(24) 등록일자 2016년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)*C12N 5/16* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7015367

(22) 출원일자(국제) 2008년12월12일

심사청구일자 2013년11월20일

(85) 번역문제출일자 2010년07월12일

(65) 공개번호 10-2010-0110818

(43) 공개일자 2010년10월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/086674

(87) 국제공개번호 WO 2009/076632

국제공개일자 2009년06월18일

(30) 우선권주장

61/013,603 2007년12월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Theriogenology. Vol. 63, pp. 1481-1503

(2005)*

US20050100975 A1

US20070166773 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

몬산토 테크놀로지 엘엘씨

미합중국 미주리주 63167 세인트 루이스시 메일

존 이 1 엔에이 노쓰 린드버그 부라바드 800

더 큐레이터스 오브 더 유니버시티 오브 미주리

미국, 65211 미주리, 콜럼비아, 유니버시티 홀
316

(72) 발명자

마티아라간, 나갑판

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 엔. 린드베르
그 블러바드 800

로베르츠, 알., 마이클

미국 65201 미주리주 콜롬비아 호미니 브랜치 코
트 2213

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 조기 임신 진단을 위한 조성물 및 방법

(57) 요 약

개시되는 것은 동물에서 임신을 검출하기 위한 항체 및 방법이다. 특정 양태에서, 사용되는 항체는 PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 및 PAG21에서 선택되는 2종 이상의 PAG에 면역학적으로 결합한다. 항체 코딩 핵산 역시 제공되며, 키트, 사용 방법, 및 추가적인 항체 관련 조성물도 제공된다.

(72) 발명자

맥그拉斯, 마이클, 에프.

미국 63167 미주리주 세인트 루이스 엔. 린드베르
그 블러바드 800

그린, 조나단

미국 65203 미주리주 콜롬비아 라임스톤 2107

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 경사를 가변 영역 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 중사를 가변 영역을 포함하는, PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 및 PAG21에 면역학적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

ATCC 접근 번호 PTA-8566으로 기탁된 하이브리도마에 의해 제조되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

ATCC 접근 번호 PTA-8566하에 기탁된 단리 세포 또는 그의 자손 세포.

청구항 4

SEQ ID NO:1의 폴리펩티드 서열을 갖는 항체 경사를 도메인 및 SEQ ID NO:2의 폴리펩티드 서열을 갖는 항체 중사를 도메인을 코딩하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 있어서, SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 것으로 추가적으로 정의되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제4항에 있어서, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

- a) 소과(bovine) 동물로부터 샘플을 수득하는 것;
- b) 샘플을 제1항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것; 및
- c) 샘플이 적어도 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 의해 면역학적으로 결합될 수 있는 제1 임신 관련 항원(PAG)를 함유하는지 여부를 측정하는 것

을 포함하며, 여기서 샘플 중 PAG의 존재는 임신을 표시하는 것인, 소과 동물에서의 임신 검출 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

- i) 샘플이 적어도 제1 임신 관련 항원을 함유하는지 여부를 측정하는 것이 ELISA 또는 웨스턴 블러팅을 포함하거나;
- ii) 샘플이 적어도 제1 임신 관련 항원을 함유하는지 여부를 측정하는 것이 기질에 고정된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 효소로 표지화된 제2 항체 조제물에 대한 PAG의 결합을 포함하는 샌드위치 ELISA를 포함하거나;
- iii) PAG가 PAG4, PAG6, PAG9, PAG16, PAG17, PAG19, PAG20 및 PAG21로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는
- iv) PAG가 PAG6인 방법.

청구항 9

- (a) 제1항에 따른 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 및
- (b) 항체 또는 그의 항원-결합 단편용 용기

를 포함하는 키트.

청구항 10

제9항에 있어서,

- i) 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 적어도 제1 임신 관련 항원 (PAG) 사이의 면역학적 결합을 검출하기 위한 수단을 함유하는 것으로 추가 정의되거나;
- ii) 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 지지체에 부착되거나;
- iii) 상기 지지체가 폴리스티렌 플레이트, 시험관 또는 침지막대이거나;
- iv) 검출가능한 표지를 추가로 포함하거나;
- v) 형광성 또는 화학발광성 태그인 검출가능한 표지를 추가로 포함하거나;
- vi) 효소인 검출가능한 표지를 추가로 포함하거나; 또는
- vii) 알칼리성 포스파타제 또는 양고추냉이 퍼옥시다제인 검출가능한 표지를 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 11

- a) 적어도 제1 임신 관련 항원 (PAG)을 포함하는 샘플을 수득하는 것; 및
- b) 제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 대한 PAG의 친화성을 바탕으로, 샘플로부터 PAG를 정제하는 것 을 포함하는, 적어도 제1 임신 관련 항원 (PAG)의 정제 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

- i) 샘플이 50 내지 250일차 소 태반으로부터 수득되거나;
- ii) 샘플이 61 내지 250일차 소 태반으로부터 수득되거나; 또는
- iii) PAG의 친화성을 바탕으로 샘플로부터 PAG를 정제하는 것이 면역침전, 웨스턴 블러트, 또는 면역 친화성 크로마토그래피를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

<관련 출원의 상호 참조>

[0002]

본 출원은 그 전체 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 가출원 제61/013,603호 (2007년 12월 13일 출원)의 우선권을 주장하는 바이다.

[0003]

<기술 분야>

[0004]

본 발명은 일반적으로는 수의학, 생식 생물학 및 진단학의 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 발명은 초기 단계 임신을 검출하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

임신 진단은 낙농 및 육우 산업에서 철저한 생식 관리를 가능케 하여 준다. 일반적으로, 인공 수정은 회수의 50 % 미만으로 성공적이기 때문에, 생산자들은 발정기로의 복귀에 대한 명백한 신호 (이것은 놓치기 쉬움)에 의존하거나, 또는 상기한 방법들 중 하나에 의해 임신 실패가 확인될 때까지 재번식을 연기해야 한다. 그와 같은 연기는 극히 고비용이며, 업계에 커다란 경제적 손실을 준다.

[0006]

조기에 수행될 수 있으며, 낮은 가양성(false positive)을 가지는 정밀한 축우용 임신 테스트는 오래전부터 탐색되어 왔다. 우유 프로게스테론 분석 (문헌 [Oltenacu *et al.*, 1990]; [Markusfeld *et al.*, 1990]), 에스트론 슬레이트 분석 (문헌 [Holdsworth *et al.*, 1982]; [Warnick *et al.*, 1995]), 직장 촉진 (문헌 [Hatzidakis *et al.*, 1993]), 초음파 (문헌 [Beal *et al.*, 1992]; [Cameron and Malmo, 1993]), 및 임신-특이적 항원에 대한 혈액 검사를 포함하여, 수종의 임신 테스트가 사용하다.

[0007]

이러한 절차들 각각은 농장에서 사용시 그의 실행 면에 있어서 기대에 미치지 못한다. 예를 들어, 18-22일차 경의 우유 또는 혈청 프로게스테론의 측정은 허용불가능하게 높은 비율의 가양성을 산출한다 (문헌 [Oltenacu *et al.*, 1990]; [Markusfeld *et al.*, 1990]). 직장 촉진은 35일차 정도로 조기에 임신을 검출하는 데에 사용될 수 있으나, 이 절차는 5-10 % 또는 그 이상의 배아 치사율로 이어질 수 있다 (문헌 [Oltenacu *et al.*, 1990]; [Hatzidakis *et al.*, 1993]). 50일차의 직장 촉진은 배아에 손상을 덜 야기하기는 하나, 너무 늦기 때문에 최저의 경제적 가치만을 가진다 (문헌 [Oltenacu *et al.*, 1990]). 초음파검사는 특히 45일차 이전에는 정밀도에서 직장 촉진에 비해 장점을 가지나 (문헌 [Beal *et al.*, 1992]; [Cameron and Malmo, 1993]), 기기가 비싸고, 그의 사용에 상당한 훈련이 요구되며, 동물에 대하여 소정의 위험성이 존재한다. 관련 절차인 도플러 초음파검사는 직장 촉진에 비해 더 정밀하기는 하나 (문헌 [Cameron and Malmo, 1993]), 역시 잘 훈련된 요원을 필요로 한다. 소변 또는 혈청 중 에스트론 슬레이트의 존재는 또 다른 테스트를 제공하나, 농도가 상승하는 100일차 이후에만 유용하다 (문헌 [Holdsworth *et al.*, 1982]; [Warnick *et al.*, 1995]).

[0008]

임신-특이적 단백질 B (PSP-B)의 발견 (문헌 [Butler *et al.*, 1982])은, 그것이 임신 4주차까지의 임신한 소의 혈액에서 검출될 수 있었기 때문에, 임신 진단에 대한 새로운 접근법을 제공하였다 (문헌 [Sasser *et al.*, 1986; Humblot *et al.*, 1988]). 다른 이들이 이와 동일하거나 면역학적으로 유사한 항원을 기반으로 할 수 있는 면역분석법을 개발한 바도 있다 (문헌 [Zoli *et al.*, 1992a]; [Mialon *et al.*, 1993]; [Mialon *et al.*, 1994]). 한 가지 경우에서, 상기 항원 (Mr ~67 kDa)은 소 임신-관련 당단백질 (boPAG; 현재는 boPAG-1) (문헌 [Zoli *et al.*, 1992a])로 지칭되었으며; 두 번째 경우에서, 그것은 임신 혈청 단백질 60 (PSP60) (문헌 [Mialon *et al.*, 1993]; [Mialon *et al.*, 1994])으로 지칭되었다. PSP-B/boPAG1/PSP60에 대한 면역분석법은 소정의 단점들을 가지고 있다. 첫 번째로, 혈액 중 항원 농도가 낮고 약간 변동성이어서 임신 4주차에서의 양성 진단이 여전히 어느 정도까지 불확실하다. 두 번째로, boPAG1 농도는 기간이 다 되어서야 현저하게 상승하며 (문헌 [Sasser *et al.*, 1986]; [Zoli *et al.*, 1992a]; [Mialon *et al.*, 1993]), 오래 순환되는 분자의 반감기 (문헌 [Kiracofe *et al.*, 1993])로 인하여 산후 80-100일차에도 여전히 항원이 검출될 수 있기 때문에 (문헌 [Zoli *et al.*, 1992a]; [Mialon *et al.*, 1993]; [Mialon *et al.*, 1994]; [Kiracofe *et al.*, 1993]), 산후 초

기 기간 내에 번식된 소에서의 임신 진단을 훼손한다. 따라서, 산후 70일 또는 그 이후에 인공 수정 ("AI")이 수행된 경우에만 30일차에 낙농우에서 테스트가 수행될 수 있다.

[0009] 임신-관련 당단백질 (PAG)은 구조적으로 웨신과 관련된다. 그것은 발굽 (우제) 포유동물에 제한되는 것으로 여겨지며, 태반의 외부 상피 세포 층 (융모막/영양세포층)에서 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 한다 (문헌 [Green *et al.*, 2000]; [Hughes *et al.*, 2003]; [Xie *et al.*, 1997]). 적어도 일부의 PAG는 단백질분해효소로서 촉매적으로 불활성화지만, 각각은 웨티드에 결합할 수 있는 틈새(cleft)를 가지고 있는 것으로 보인다 (문헌 [Guruprasad *et al.*, 1996]). 축우, 양, 및 아마도 모든 반추 우제류는 수십종의 PAG 유전자를 가지고 있는 것으로 추정된다. 상기 PAG들은 서열이 매우 다양한데, 대부분 표면-노출 루프(loop)에 제한된 과변이 영역을 가진다.

[0010] 소 임신-관련 당단백질 (boPAGs/PSPB/PSP60)은 가축용 임신 테스트를 개발하기 위한 시도에서 발견되었다 (문헌 [Butler *et al.*, 1982]; [Sasser *et al.*, 1986]; [Zoli *et al.*, 1991]; [Zoli *et al.*, 1992a]). 각 시도에서는, 토끼에 태반 태반엽의 추출물을 주사하고, 태반 항원에 대하여 유도된 것이 아닌 항체는 비-임신 동물로부터의 조직 추출물을 사용한 흡착에 의해 제거하였다. 생성되는 항혈청은 수정 1개월 후 정도까지 조기의 정밀한 축우 및 양의 임신 테스트의 기반을 제공하였다.

[0011] 초기의 연구 (문헌 [Butler *et al.*, 1982]; [Zoli *et al.*, 1991]; [Xie *et al.*, 1991]; [Xie *et al.*, 1994]; [Xie *et al.*, 1996])에서도, boPAG들이 분자량 및 전하에서 불균일하다는 것은 명백하였으며, 더 많은 동형들이 정제되면서 그들이 그의 아미노 말단 서열에서 상이하다는 것이 분명해졌다 (문헌 [Atkinson *et al.*, 1993]; [Xie *et al.*, 1997a]). 추가적인 라이브리리 스크리닝은 반추동물에서의 추가적인 전사체들 (문헌 [Xie *et al.*, 1994]; [Xie *et al.*, 1995]; [Xie *et al.*, 1997b]), 및 돼지와 같은 비-반추동물 종에서의 PAG의 존재 (문헌 [Szafranska *et al.*, 1995])를 밝혀내었다. PAG-유사 단백질 ('펩시노겐 F' 또는 '펩신 F'로도 알려져 있음)이 말 및 고양이에서 기술된 바도 있다 (문헌 [Green *et al.*, 1999; Guruprasad *et al.*, 1996]). 기술되어 있는 소 PAG로는 boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v; boPAG9v; boPAG15; boPAG16; boPAG17; boPAG18; boPAG19; boPAG20 및 boPAG21이 있다 (U.S. 특허 6,869,770호). 이와 같은 PAG에 대하여 분석함으로써 조기에 임신을 진단하기 위한 방법에 관한 정보는 예를 들면 U.S. 특허 6,869,770호 및 U.S. 특허 출원 공제 제20050100975호에서 찾아볼 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 축우에서의 대부분의 가용한 임신 검출용 테스트들은 번식 후 30일 이전에는 덜 정밀하다. 또한, 기존의 테스트들 중 많은 것들이 숙련된 요원을 필요로 한다. 따라서, 번식 후 30일 이전에 신속하고 용이하게 수행될 수 있는 축우에서의 정밀하고 민감한 임신 테스트에 대한 필요성이 존재한다.

과제의 해결 수단

[0013] 따라서, 본 발명의 일 양태는 민감하며 정밀한 조기 임신용 테스트를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 임신 4주차가 종료되기 전에 PAG에 대하여 고도로 특이적인 도메인을 포함하는 특이적 폴리웨티드가 고도의 민감성 및 특이성으로 검출될 수 있는 조기 임신 테스트를 제공한다. 그와 같은 조기 단계에 임신을 진단하는 능력은 동물들이 보통 하루 중 적어도 일부분 동안 가두어지며, 집중 관리가 실행되는 낙농 산업에서 특히 유용하다. 또한, 본 발명의 구현예는 기타 동물들을 위한 번식 프로그램에서도 사용될 것이다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 동물에서의 임신 검출 방법을 제공한다: (a) 동물로부터 샘플을 수득하는 것; (b) 상기 샘플을 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 것 (여기서 상기 항체 또는 항체 단편은 2D9 항체, 또는 그의 단편 또는 변형체를 포함하는 것임); 및 (c) 상기 항체 또는 항체 단편의 샘플 중 1종 이상의 임신 관련 항원 (PAG)과의 접촉을 검출하는 것 (여기서 PAG의 검출은 동물이 임신하였음을 표시하는 것임). 일 구현예에서, 사용되는 항체는 SEQ ID NO:1과 97 %를 초과하는 서열 동일성을 가지거나, 또는 SEQ ID NO:2와 92 %를 초과하는 서열 동일성을 가지는 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 동물은 반추동물 아목의 구성원이다. 특정 구현예에서, 상기 반추동물은 소과의 구성원이다. 다른 구현예에서, 상기 동물은 염소, 양, 기제목 (perissodactyla)의 구성원, 말, 코뿔소, 개, 고양이 종, 인간 또는 판다이다.

[0015] 2D9를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포주는 2007년 8월 2일자로 베지니아 20110-2209 마나사스 소재 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection)(ATCC)의 특허 기탁소에 기탁되었으며, 특히 기

탁 번호 PTA-8566 (식별 참조번호 MON-PAG-2D9)을 할당받았다. 상기 기탁은 특히 절차 목적 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약의 조건하에 유지될 것이다. 이와 같은 기탁은 단순히 업계 숙련자의 편의를 위하여 이루어진 것으로써, 35 U.S.C. § 112 하에서 기탁이 필요함을 자인하는 것은 아니다.

- [0016] 소정 구현예에서, 상기 도메인은 SEQ ID NO:1에 대한 99 % 이상의 서열 동일성을 포함하여, SEQ ID NO:1과 98 % 이상의 서열 동일성을 가진다. 다른 구현예에서, 상기 도메인은 SEQ ID NO:1을 포함한다.
- [0017] 일부 구현예에서, 상기 도메인은 SEQ ID NO:2에 대한 적어도 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 및 99 % 이상의 서열 동일성을 포함하여, SEQ ID NO:2와 92 % 이상의 서열 동일성을 가진다. 일부 특정 구현예에서, 상기 도메인은 SEQ ID NO:2를 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 추가적으로 하나 이상의 경사슬 및 하나 이상의 중사슬을 포함하는 항체로서 정의된다. 특정 구현예에서, 상기 경사슬은 SEQ ID NO:1과 97 %를 초과하는 서열 동일성을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 중사슬은 SEQ ID NO:2와 95 %를 초과하는 서열 동일성을 가진다. 더 특별한 구현예에서, 상기 중사슬은 SEQ ID NO:2와 98 %를 초과하는 서열 동일성을 가진다. 다른 구현예에서, 상기 중사슬은 SEQ ID NO:2를 포함한다.
- [0019] 일부 다른 특정 구현예에서, 상기 항체는 SEQ ID NO:3을 포함하는 경사슬 및 SEQ ID NO:4를 포함하는 중사슬을 포함한다.
- [0020] 상기 항체는 단일클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 항체는 단일클론 항체 2D9이다.
- [0021] 검출되는 PAG는 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20, 및 boPAG21과 같은 임의의 PAG일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 PAG는 boPAG6이다.
- [0022] 다른 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 소과 동물에서의 임신 검출 방법에 관한 것이다: (a) 동물로부터 샘플을 수득하는 것; (b) 상기 샘플을 2D9 단일클론 항체와 접촉시키는 것; 및 (c) 상기 항체의 샘플 내 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 또는 boPAG21 중 1종 이상과의 접촉을 검출하는 것 (여기서 PAG(들)의 검출은 동물이 임신하였음을 표시하는 것임). 상기 임신 검출 방법은 예를 들면 인공 수정 후 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30일차, 또는 그 이상 일차에 수행될 수 있다.
- [0023] 샘플은 PAG를 함유하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 임의의 샘플일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 침, 혈청, 혈장, 혈액, 우유 또는 소변이다. 어떠한 유효량의 샘플도 동물로부터 수득될 수 있다. 예를 들면, 상기 양은 약 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, 60 µl, 70 µl, 80 µl, 90 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 350 µl, 400 µl, 450 µl, 500 µl, 550 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, 1 ml, 1.5 ml, 2.0 ml, 2.5 ml, 3.0 ml, 3.5 ml, 4.0 ml, 4.5 ml, 5.0 ml, 또는 그 이상일 수 있다.
- [0024] 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 항체 또는 항체 단편의 PAG와의 접촉의 검출 방법도 본 발명의 방법에 의해 고려된다. 예를 들면, 상기 방법은 ELISA 또는 웨스턴 븍릿을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 검출되는 PAG는 boPAG2, boPAG4, boPAG5, boPAG6, boPAG7, boPAG9, boPAG7v, boPAG9v, boPAG15, boPAG16, boPAG17, boPAG18, boPAG19, boPAG20, 또는 boPAG21이다. 특정 구현예에서, PAG는 boPAG6이다. 본 방법의 일부 구현예에서는, 1종을 초과하는 각 샘플 중 PAG가 검출된다. 축우가 아닌 다른 종에 적용되는 경우, 본 발명은 영양막 (예비-태반)이 모체의 자궁 벽에 부착 또는 착상되기 시작하는 시점에 생산되는 다른 PAG의 검출을 가능케 할 것이다. 이러한 종의 "초기" PAG들은 축우에서의 초기 임신 검출에 유용한 PAG와 면역학적으로 교차-반응할 수 있다.
- [0025] 특정 구현예에서, 상기 ELISA는 기질에 고정된 항체 또는 항체 단편 및 효소로 표지화된 제2 항체 조제물에 대한 PAG의 결합을 포함하는 샌드위치 ELISA이다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편이 고정되는 상기 기질은 튜브, 웰, 바이알, 띠(strip), 침지막대(dipstick), 또는 바이오센서일 수 있다. 상기 효소는 예를 들면 알칼리성 포스파타제 또는 양고추냉이 페옥시다제, 또는 임의의 효소 표지일 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 일반적으로 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 도메인에 의해 코딩되는, 단리 및 정제된 폴리펩티드에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 상기 도메인은 98 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성을 포함한다. 더욱 특별한 구현예에서, 상기 도메인은 SEQ ID NO:1을 포함한다. 상기 도메인의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 것에는, 거기에 결

합된 하나 이상의 추가적인 아미노산 잔기가 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1이다. 일부 구현예에서, 상기 도메인은 95 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 포함한다. 더 특별한 구현예에서, 상기 도메인은 98 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 포함한다. 더욱 특별한 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2이다. 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:4를 포함한다.

[0027] 본 발명에는 또한 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 도메인을 가지는 폴리펩티드를 코딩하고 있는, 단리 및 정제된 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1과 98 %를 초과하는 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드를 코딩한다. 특정 구현예에서는, 폴리뉴클레오티드가 SEQ ID NO:1을 코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:2와 95 %를 초과하는 서열 동일성을 가지는 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 더욱 특별한 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:2와 98 %를 초과하는 서열 동일성을 가지는 도메인을 가지는 폴리펩티드를 코딩한다. 더욱 특별한 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:2를 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 98 %를 초과하는 SEQ ID NO:5에 대한 동일성 또는 95 %를 초과하는 SEQ ID NO:6에 대한 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:5이며; 다른 특정 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:6이다.

[0028] 본 발명은 또한 일반적으로 단일클론 항체 2D9를 분비하는 하이브리도마 세포에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한 동물에서 PAG의 존재를 검출하기 위한 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO:3을 포함하는 경사슬을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 SEQ ID NO:4를 포함하는 중사슬을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 지지체에 결합된다. 예를 들면, 상기 지지체는 폴리스티렌 플레이트, 시험관, 띠, 침지 막대, 또는 바이오센서일 수 있다.

[0030] 일부 구현예에서, 상기 키트는 추가적으로 검출가능한 표지를 포함한다. 예를 들면, 상기 검출가능한 표지는 항체 또는 항체 단편에 결합된 형광성 태그일 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 검출가능한 표지는 화학발광성 태그이다. 다른 구현예에서, 상기 검출가능한 표지는 알칼리성 포스파타제 또는 양고추냉이 페옥시다제와 같은 효소이다. 상기 키트는 추가적으로 효소에 대한 기질을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 키트는 베퍼 또는 희석제를 포함한다. 상기 키트는 또한 임의로 1회용 피펫을 포함할 수 있다. 시약 용기, 지침 등을 포함한 기타 키트 구성요소들에 대해서는 업계 숙련자에게 잘 알려져 있으며, 역시 본원에서 기술되는 키트에 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 일반적으로 하기를 포함하는 동물에서의 임신 검출 방법에 관한 것이다: (a) 동물로부터 샘플을 수득하는 것; (b) 상기 샘플을 본 발명에 의해 제공되는 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 것; 및 (c) 샘플을 항체 또는 항체 단편과 접촉시킴으로써, 샘플 중 PAG를 검출하는 것 (여기서 그들의 모든 가능한 조합을 포함하여 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG16, boPAG17, boPAG19, boPAG20 또는 boPAG21 중 1종 이상의 검출은 동물이 임신하였음을 표시하는 것임).

[0032] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 장점들은 하기의 상세한 기술에서 분명해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 실시예는, 그것이 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내기는 하지만, 예시로써만 제시된다는 것이 이해되어야 하는데, 업계 숙련자라면 이와 같은 상세한 설명으로부터 본 발명의 기술사상 및 영역 내에서의 다양한 변화 및 변형들이 분명해질 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 하기의 도면들은 본 명세서의 일부를 형성하는 것으로서, 본 발명의 소정 양태를 추가적으로 나타내기 위하여 포함된다. 본원에서 제공되는 특정 구현예들의 상세한 설명과 조합하여 이러한 도면 하나 이상을 참조하게 되면, 본 발명이 더 잘 이해될 것이다.

도 1. 2D9 경사슬의 핵산 서열 (SEQ ID NO:5). 프로세싱된 형태의 개시 코돈 (N-말단 아미노산) 및 중지 코돈은 굵게 표시하였다.

도 2. 2D9 중사슬의 핵산 서열 (SEQ ID NO:6). 프로세싱된 형태의 개시 코돈 (N-말단 아미노산) 및 중지 코돈은 굵게 표시하였다.

도 3a, 3b. 도 3a - boPAG6의 웨티드 서열 (상부 패널) 및 LC-MS-MS 분석에서 확인된 웨티드 서열 (저부 패널) (SEQ ID NO: 7-18)은 PAG 강화 조제물의 면역침전 후 2D9 코팅된 자석 비드로부터 용리된 PAG가 주로 boPAG6에 상응한다는 것을 보여준다. 모든 2D9-결합 성분들을 확인하기 위하여, PAG 강화 조제물의 면역-친화성 크로마토그래피 정제를 수행하였다. 상기 면역-친화성 컬럼 정제된 물질을 LC-MS-MS 분석에 적용하였다. 이와 같은 분석은 boPAG6이 주 2D9 결합 PAG이며, boPAG-4, boPAG-9, boPAG-20 및 boPAG21은 부차적인 2D9 결합 PAG라는 것을 밝혔다. 도 3b - 55일차 소 태반으로부터 제조된 조직 추출물의 2D9-면역 친화성 크로마토그래피로부터 정제된 PAG의 변성 젤 전기영동 (SDS-PAGE) 및 웨스턴 블릿 분석. 쿠마시 염색된 젤 및 PAG 다클론 항체를 사용한 웨스턴 블릿 분석 모두가 2D9-결합 PAG로서 67 kD, 55 kD 및 50 kD에서 3개의 단백질 랜드를 나타내었다. "Mz" = 질량 대 전하 비: 웨티드 질량 대 이온화된 웨티드의 전하, 마이너스 뮬; "전하" = 이온 전하 상태; "Mr (계산치)" = 웨티드의 계산된 분자량; "개시" = 웨티드를 구성하는 단백질의 개시 아미노산; "종료" = 웨티드를 구성하는 단백질의 중지 아미노산; "점수" = 웨티드 서열 신뢰도의 측정치.

도 4. 소구 (자궁내막) 및 태반엽 (태반) 조직추출물의 면역-친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 2D9 결합 PAG를 나타내는 쿠마시 블루 염색 SDS-PAGE. 단백질 랜드 1 내지 7을 절단하여, 트립신 분해 및 이어지는 LC-MS-MS 분석 (SEQ ID NO: 7-18)에 적용하였다.

도 5. 2D9-항체 코팅된 ELISA 플레이트 및 표준으로서의 면역-친화성 정제 PAG를 사용하여 전개되는 PAG ELISA 표준 곡선의 Log-로짓 변형. 상기 분석은 0.5 ng/ml 내지 50 ng/ml의 선형 응답을 보여준다.

도 6. 제시된 표는 2개 연구 장소인 위스콘신과 캘리포니아에서의 28일차 초음파 임신 진단과 비교한, 실험실-기반 ELISA를 사용하는 것에 의한 28일차 임신 진단의 정밀도를 나타낸다. 본 베타 연구에서는 낙농우 번식 관리에서의 28일차 임신테스트의 경제성을 조사하였다. 다클론 항체를 사용한 실험실-기반의 PAG ELISA를 임신 진단에 사용하였다. 위스콘신 장소는 업격한 동기화 번식을 사용한 반면, 캘리포니아 장소는 동기화 번식 더하기 발정 번식을 사용하였다. 대략 1000 마리의 소를 장소 당 연구에 사용하였다. 28일차에 혈액 샘플을 수집하고, 임신 테스트를 위하여 실험실로 수송하였다. 번식 결정이 가능하도록, 결과를 24시간 이내에 농장으로 답신하였다. 28일차의 혈액 수집 시점에, 초음파에 의해서도 임신 상태를 측정하였다.

도 7. 위스콘신 장소 시험에서의 번식 파라미터의 분석 결과. 상기 장소는 28일차 임신 테스트에 의해 (조기 재동기화 군), 또는 45일차 축진에 의해 (대조 군, 만기 재동기화) 업격하게 동기화된 번식 프로그램을 사용하였다. 결과는 만기 재동기화 군 (대조 군)에 비해 조기 재동기화 군 (28일차 임신 테스트)에서 수정 사이 일수 및 공백 일수의 상당한 감소를 보여준다.

도 8. 캘리포니아 장소 시험에서의 번식 파라미터의 분석 결과. 상기 장소는 28일차 임신 테스트에 의해 (조기 재동기화 군), 그리고 그것 없이 (만기 재동기화 군) 동기화 번식 더하기 발정 번식을 사용하였다. 결과는 만기 재동기화 군에 비해 수정 사이의 일수, 수정 수 및 공백 일수의 상당한 감소를 보여준다.

도 9. 색상 테스트 기초. 포획 항체로서 2D9 단일클론 항체를, 그리고 제2 항체로서 바이오틴-표지화 토키 다클론 항체를 사용하여 개발된 PAG 면역분석의 결과. 임신 28일차 및 55일차에 수집된 혈장 테스트 패널 (20 공백 및 20 임신) 샘플은 임신한 소 (분홍색)에 비교하여 공백중인 소 (청색)의 완전한 분리를 나타내었다. 공백 중인 소에 대하여 수득된 0에 가까운 PAG 값은 테스트 혈장에서의 면역반응성 PAG의 정성적인 검출에 PAG 표준이 필요치 않을 수 있음을 암시하였다.

도 10. 색상 테스트에서 전혈 샘플을 사용하여 수행된 소 임신 진단의 결과. 결과는 시각적으로 해독하였다. 청색 색상의 반응 용액을 나타내는 튜브 (튜브 1, 3, 6, 9, 10, 14 및 15)는 임신 상태에 대하여 양성의 결과이며, 투명한 바탕을 나타내는 튜브 (튜브 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 및 16)는 임신 상태에 대하여 음성 (비-임신)이다. 분광광도계에서의 해독을 위하여, 동일 부피 (0.4 ml)의 중지 용액 (1 N HCl)이 각 튜브에 첨가될 수 있다. 중지 용액의 첨가는 색상을 황색으로 전환시키게 된다. 다음에, 각 샘플의 광학 밀도 (OD)가 분광광도계에서 630 nm로 측정될 수 있다.

도 11a, 11b. 2D9-코팅된 플라스틱 튜브를 사용하여 수행된 색상 테스트의 결과. 도 11a - 28일차 혈장 패널. 도 11b - 55일차 혈장 패널. 28일차 및 55일차 테스트 패널에서의 모든 공백 소 샘플은 0.2 OD 이하의 색상 강도를 산출한 반면, 임신 혈장 샘플은 1.0 OD 단위 정도로 높은 색상 강도를 산출하였다. 본 분석에서, 28일차 혈장 샘플은 0.2 OD의 색상 강도가 컷-오프로 설정되었을 때 100 % 감도 및 100 % 특이성을 나타내었다. 동일한 색상 강도 컷-오프에서, 55일차 혈장 샘플은 플라스틱 튜브 분석에서 95 % 감도 및 100 % 특이성을 나타내었다.

도 12. 다클론 항체들 (다클론:다클론, 상부 패널), 및 2D9 단일클론 항체와 다클론 항체 (단일클론:다클론, 저부 패널)를 사용하여 수행된 PAG 샌드위치 ELISA에 의한 새로운 혈장 샘플의 임신 테스트 비교. 0.2 OD 컷-오프 색상 강도를 사용함으로써 용이하게 구별되는 공백 소 샘플의 투명한 분리를 주목하라. 모든 임신 소 샘플을 > 0.2 OD 단위의 색상 강도를 가졌다. 본 실험에서, 상기 단일클론:다클론 분석은 100 %의 감도 및 100 %의 특이성을 가졌다.

도 13. 혈액 샘플을 사용한 색상 테스트의 포장 테스트. 번식 후 33-34일차에 수집된 54개의 혈액 샘플을 시험하였으며, 색상은 3 명의 요원에 의해 시각적으로 해독하였다. 3 명의 요원들 사이에서 결과의 시각적 채점에 불일치는 관찰되지 않았다.

도 14. 54개 샘플의 초음파 결과에 비교한 색상 테스트의 포장 테스트 결과. 본 테스트는 초음파 결과에 비교할 때, 하나의 가양성 결과와 함께 모든 임신 소 (100 % 감도)를 확인하였다. 색상 테스트에는 결론불가 결과를 가지는 2개의 샘플이 존재하였는데, 나중에 '공백' 소인 것으로 밝혀졌다. 그러나, 상기 색상테스트는 초음파와 비교하여 40개 중 37개의 공백 소 (92.5 % 특이성)를 확인하였다.

도 15. 바이오에디트(BioEdit) (v. 7.0.5.3; www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html; Hall, 1999) 중 프로트디스트 (v. 3.5c)의 인접 계통수 분석 패키지에 의해 생성된 PAG 동형 단백질 서열 군집.

도 16. PAG 동형 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20, 및 21의 직접 정렬. PAG 동형 및 변형에 대한 단백질 서열들을 유니프로트(UniProt) 접근번호 Q29432, 046492, 046494, A5PJW4, 046497, A4FV16, Q9TTV8, Q9TTV7, A7MBA4, Q9TTV5, Q9TTV4, 및 Q9TTV3으로부터 유래하는 SEQ ID NO:51-62에 제시하였다.

도 17. 50 및 75 kD 사이에 3개의 PAG 밴드 (상부, 중간, 및 저부 밴드)를 나타내는, 쿠마시 블루로 염색된 정제 PAG 배치 (각각 5 µg)의 SDS-PAGE 겔. 1) 단백질 표준 (바이오-래드(Bio-Rad) 사 Cat. # 161-0374); 2) 55 일차 소구; 3) 55일차 태반엽; 4) 55일차 소구 및 태반엽 조합; 5) 215일차 소구; 6) 215일차 태반엽; 7) 215 일차 소구 및 태반엽 조합; 8) 단백질 표준 (바이오-래드 사 Cat. # 161-0374).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

임신을 검출하는 몇 가지 분석법들이 가용함에도 불구하고, 특히 산후 2 내지 3개월 이내, 또는 그 이전에 번식된 축우에서의 임신의 정밀한 조기의 검출을 위한 개선된 분석법을 제공할 필요성이 남아 있다. 본 발명의 특정 구현에는 동물로부터 수득된 샘플 중 PAG의, 소 임신을 표시하는 PAG에 결합하는 항체인 단일클론 항체 2D9 와 같은 폴리펩티드와의 결합을 측정하는 색상 테스트를 수행하는 것에 의한, 소 임신 상태의 측정 방법에 관한 것이다. 상기 색상 테스트는 수정 후 26일차와 같이 조기에 수행될 수 있다. 상기 색상 테스트는 시험관 또는 ELISA 플레이트를 사용하는 것과 같은 어떠한 다양한 체제에서도 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 테스트는 제2의 항체를 사용하는 샌드위치 면역분석 원리를 이용한다. 청색 색상과 같은 색상은 양성의 테스트를 표시하는 반면, 투명한 튜브는 음성의 테스트를 표시한다. 본 방법의 구현예들은 인공 수정 후 30일 이전에 용이하게 수행될 수 있으며, 고도로 민감하고 특이적이다. 또한, 다수의 샘플이 용이하고 신속하게 동시에 분석될 수 있는데, 이는 본 방법의 가치를 더욱 향상시킨다.

[0035]

역시 제공되는 것은 주제가 되는 임신 검출 방법에 적용될 수 있는 소정의 신규 PAG-결합 폴리펩티드, 및 본원에서 제시되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 나머지 개시내용은 본 발명 및 그 실행의 다양한 특징들을 기술한다.

[0036]

I. 폴리펩티드

[0037]

본원에서 제시되는 본 발명의 일부 구현예는 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 PAG 결합 도메인을 포함하는, 단리 및 정제된 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 PAG 결합 도메인은 SEQ ID NO:1에 대하여 97.1 %, 97.3 %, 97.5 %, 97.7 %, 97.9 %, 98.1 %, 98.3 %, 98.5 %, 98.7 %, 98.9 %, 99.1 %, 99.3 %, 99.5 %, 99.7 %, 99.9 %, 또는 100 %를 초과하는 서열 동일성을 가진다. 일부 구현예에서, 상기 PAG 결합 도메인은 SEQ ID NO:2에 대하여 92.2 %, 92.6 %, 93.0 %, 93.4 %, 93.8 %, 94.2 %, 94.6 %, 95.0 %, 95.4 %, 95.8 %, 96.2 %, 96.6 %, 97.0 %, 97.4 %, 97.8 %, 98.2 %, 98.6 %, 99.0 %, 99.4 %, 99.8 %, 또는 100 %를 초과하는 서열 동일성을 가진다.

[0038]

본원에서 사용될 때의 "폴리펩티드"는 임의 길이의 연속적인 아미노산 분절을 지칭한다. 본 방법의 일부 구현 예에서, 거기에 사용되는 폴리펩티드는 그의 서열 내에 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 연속적인 아미노산이다.

업계 일반의 숙련자라면, 업계 숙련자에게 잘 알려져 있는 수많은 실험 방법들 중 어느 것을 사용하여 본원에서 제시되는 개시내용의 관점에서 그와 같은 폴리펩티드를 생성시키는 방법을 이해하고 있을 것이다.

[0039] 업계에 알려져 있는 바와 같이, "% 서열 동일성"이라는 용어는 서열을 비교함으로써 측정하였을 때의 2종 이상 폴리펩티드 서열 사이, 또는 2종 이상 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 관계이다. 업계에서, "동일성"은 또한, 경우에 따라서 해당 서열의 일련들 사이의 일치로 측정되는 바와 같은, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열들 사이의 서열 관계성의 정도를 의미한다. "동일성" 및 "유사성"은 비제한적으로 하기에 기술되어 있는 것들을 포함한 공지의 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다: 문헌 [Computational Molecular Biology (1988)]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects (1993)]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part I (1994)]; [Sequence Analysis in Molecular Biology (1987)]; 및 [Sequence Analysis Primer (1991)]. 동일성을 측정하는 바람직한 방법은 시험되는 서열들 사이의 최고의 일치를 산출하도록 설계된다. 동일성 및 유사성을 측정하는 방법은 공적으로 가용한 컴퓨터 프로그램으로 제한된다. 서열 정렬 및 % 동일성 계산은 레이저진(LASERGENE) 생물정보학 컴퓨팅 세트(위스콘신 매디슨 소재 DNASTAR Inc. 사)의 메갈라인(Megalign) 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 서열의 다중 정렬은 내정값 파라미터(default parameter) (간극 감점(GAP PENALTY)=10, 간극 길이 감점(GAP LENGTH PENALTY)=10)를 사용하는 군집 정렬법(Clustal method of alignment)을 사용하여 수행될 수 있다 (문헌 [Higgins and Sharp (1989)]). 군집법을 사용한 쌍방식(pairwise) 정렬을 위한 내정값 파라미터는 KTUPLE 1, 간극 감점=3, 윈도(WINDOW)=5 및 사선 보존(DIAGONALS SAVED)=5이다.

[0040] 숙련 기술자라면, 원래 "폴리펩티드"의 정의상, 분자의 한정된 비율 내에서 이루어지면서 여전히 허용가능한 수준의 서열 동일성 또는 기능, 예컨대 PAG에 결합하는 능력을 가지는 분자를 형성할 수 있는 변화의 수에 한계가 존재한다는 개념이 있다는 것을 잘 알고 있다.

[0041] 폴리펩티드가 언급된 서열 동일성을 유지하는 한, 어떠한 길이의 아미노산 서열도 본원에서 제시되는 바와 같은 폴리펩티드의 정의에 속하는 것으로 간주된다. 본원에서 제시되는 폴리펩티드의 PAG 결합 도메인은 C-말단 또는 N-말단 단부 중 어느 것에 추가적인 아미노산을 가질 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드 등가물은 PAG 결합 도메인의 C-말단 단부 또는 N-말단 단부 중 어느 것에 결합된 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 이상의 추가적인 핵산을 포함할 수 있다.

[0042] 물론, 상이한 치환을 가지는 다수의 서로 다른 폴리펩티드들이 용이하게 제조되어 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명은 천연 공급원 또는 재조합-제조 재료로부터 정제되는 폴리펩티드를 이용할 수 있다. 업계 일반의 숙련자라면, 재조합-제조 재료로부터 이러한 폴리펩티드를 제조하는 방법을 알고 있을 것이다. 이와 같은 재료는 천연적으로 합성되는 단백질 중의 20 종 공통 아미노산, 또는 1종 이상의 변형 또는 비공통 아미노산을 사용할 수 있다. 일반적으로, "정제된"은 다양한 다른 단백질, 폴리펩티드, 또는 웨프티드를 제거하기 위한 분별에 적용되고, 해당 조성물이 실질적으로 그의 활성을 유지하는 폴리펩티드 조성물을 지칭하게 된다. 정제는 실질적이어서 폴리펩티드가 우세한 종이거나, 또는 균질성이어서 정제 수준이 정밀한 분해적 서열분석을 가능케 하게 되는 것일 수 있다.

[0044] 아미노산 서열 돌연변이는 본 발명에 포함되며, "폴리펩티드"의 정의 내에 포함된다. 폴리펩티드의 아미노산 서열 돌연변이는 치환 돌연변이 또는 삽입 돌연변이일 수 있다. 삽입 돌연변이는 통상적으로 웨프티드 중 비-말단 지점에서의 물질의 첨가를 수반한다. 여기에는 수 개의 잔기; 면역반응성 항원결정인자; 또는 단순히 하나의 잔기의 삽입이 포함될 수 있다. 첨가된 물질은 메틸화, 아세틸화 등에 의한 것과 같이 변형될 수 있다. 다르게는, 웨프티드의 N-말단 또는 C-말단 단부에 추가적인 잔기가 첨가될 수 있다.

[0045] 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적인 유사성, 예를 들면 그의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기반으로 한다. 아미노산 측쇄 치환체의 크기, 형상 및 유형의 분석에 따르면, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘은 모두 양으로 하전된 잔기이며; 알라닌, 글리신 및 세린은 모두 유사한 크기이고; 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 모두 일반적으로 유사한 형상을 가지는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이를 고려할 때, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘; 알라닌, 글리신 및 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 본원에서 생물학적으로 기능적인 등가물로써 정의된다.

[0046] 변화를 야기함에 있어서는, 아미노산의 히드로페틱 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각 아미노산에는 그의 소수성 및 전하 특성을 기반으로 히드로페틱 지수가 할당되어 있으며, 다음과 같다: 이소류신 (+4.5);

발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).

[0047] 단백질에 상호작용성 생물학적 기능을 부여함에 있어서의 히드로페틱 아미노산 지수의 중요성에 대해서는 일반적으로 업계에 알려져 있다 (본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 소정의 아미노산이 유사한 히드로페틱 지수 또는 점수를 가지는 다른 아미노산을 치환하게 되면, 여전히 유사한 생물학적 활성을 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다. 히드로페틱 지수를 바탕으로 변화를 야기함에 있어서는, 히드로페틱 지수가 +2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하며, +1 이내인 것들이 특히 바람직하고, +0.5 이내인 것들이 한층 더 특히 바람직하다.

[0048] 아미노산이 유사한 친수성 값을 가지는 또 다른 것을 치환하게 되면, 여전히 생물학적으로 등가인 단백질을 수득할 수 있는 것으로 알려져 있다. U.S. 특히 4,554,101호에 상술되어 있는 바와 같이, 아미노산 잔기에는 하기의 친수성 값이 할당되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파테이트 (+3.0 + 1); 글루타메이트 (+3.0 + 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 + 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 류신 (-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).

[0049] 유사한 친수성 값을 바탕으로 변화를 야기함에 있어서는, 친수성 값이 +2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하며, +1 이내인 것들이 특히 바람직하고, +0.5 이내인 것들이 한층 더 특히 바람직하다.

II. 폴리뉴클레오티드

[0051] 본 발명의 여러 양태들이 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에서 제시되는 다른 구현예들은 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 도메인을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는, 단리 및 정제된 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한 개시되는 것은 98 %를 초과하는 SEQ ID NO:5에 대한 서열 동일성 또는 95 %를 초과하는 SEQ ID NO:6에 대한 서열 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다. SEQ ID NO:5는 2D9의 경사슬을 코딩하는 cDNA의 핵산 서열을 지칭하며, SEQ ID NO:6은 2D9의 중사슬을 코딩하는 cDNA의 핵산 서열을 지칭한다.

[0052] 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:5에 대하여 98.1 %, 98.2 %, 98.3 %, 98.4 %, 98.5 %, 98.6 %, 98.7 %, 98.8 %, 98.9 %, 99.0 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 %, 99.9 %, 또는 100 %의 서열 동일성을 가진다. 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:6에 대하여 95.2 %, 95.4 %, 95.6 %, 95.8 %, 96.0 %, 96.2 %, 96.4 %, 96.6 %, 96.8 %, 97.0 %, 97.2 %, 97.4 %, 97.6 %, 97.8 %, 98.0 %, 98.2 %, 98.4 %, 98.6 %, 98.8 %, 99.0 %, 99.2 %, 99.4 %, 99.6 %, 99.8 %, 또는 100 %를 초과하는 서열 동일성을 가진다.

[0053] 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 공급원으로부터 수득되거나, 또는 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 임의의 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 본 발명은 이러한 서열의 화학적으로 합성되는 돌연변이 역시 포함한다.

[0054] 소정 구현예에서는, 다른 요소를 포함하는 구성물, 예를 들면 C-5 프로핀 피리미딘을 포함하는 것들을 사용하고자 할 수도 있다. 우리딘 및 시티딘의 C-5 프로핀 유사체를 함유하는 올리고뉴클레오티드는 높은 친화도로 RNA에 결합하는 것으로 밝혀져 있다 (문헌 [Wagner et al., 1993]). 일부 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 PAG에 결합할 수 있는 1종 이상의 추가적인 아미노산 분절을 코딩한다.

III. 항체 및 항체 단편

[0056] 본 발명의 특정 구현예는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다. "항체"라는 용어는 항원 결합 영역을 가지는 모든 항체-유사 분자를 지칭하는 데에 사용되며, 여기에는 Fab', Fab, F(ab')₂, 단일 도메인 항체 (DAB), Fv, scFv (단일 사슬 Fv) 등과 같은 항체 단편들이 포함된다. 다양한 항체-기반의 구성물 및 단편들을 제조 및 사용하는 기술에 대해서는 업계에 잘 알려져 있다. 항체를 제조 및 특성화하는 수단 역시 업계에 잘 알려져 있다 (예를 들면 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, 1988] 참조).

[0057] "미니-항체(Mini-antibodies)" 또는 "미니항체(minibodies)" 역시 본 발명에서의 사용이 시도된다. 미니항체는 그의 C-말단에 힌지 영역에 의해 sFv로부터 분리되어 있는 올리고머화 도메인을 포함하는 sFv 폴리펩티드 사슬이다 (문헌 [Pack *et al.*, (1992)]). 상기 올리고머화 도메인은 추가적인 디슬피드 결합에 의해 추가 안정화될 수 있는 자가-조립 알파-나선, 예컨대 류신 지퍼(leucine zipper)를 포함한다. 상기 올리고머화 도메인은 폴리펩티드의 기능성 결합 단백질로의 생체 내 접힘을 촉진하는 것으로 여겨지는 과정인, 막 횡단 방향성 접힘(vectorial folding)에 부합하도록 설계된다. 일반적으로, 미니항체는 업계에 잘 알려져 있는 재조합 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들면 문헌 [Pack *et al.*, (1992)]; [Cumber *et al.*, (1992)]을 참조하라.

[0058] 항체-유사 결합 웹티드모방체(peptidomimetics) 역시 본 발명에서 시도된다. 문헌 [Liu *et al.*, 2003]은 쌍형 성-침강 항체로서 작용하며, 더 긴 혈청 반감기는 물론 덜 복잡한 합성 방법의 소정 장점을 가지는 웹티드인 "항체 유사 결합 웹티드모방체" (ABiP)에 대해 기술하고 있다.

[0059] 단일클론 항체 (Mab)는 재현성 및 대규모 제조와 같은 소정의 장점을 가지는 것으로 알려져 있기 때문에, 그것을 사용하는 것이 일반적으로 바람직하다. 따라서, 본 발명은 인간, 쥐, 원숭이, 래트, 햄스터, 토끼 및 심지어는 닭 기원의 단일클론 항체를 제공한다. 제조의 용이성 및 시약의 즉시 가용성으로 인하여, 종종 쥐 단일클론 항체가 바람직하게 된다.

[0060] 그러나, "인간화된" 항체 역시 시도되며, 인간 불변 및/또는 가변 영역 도메인을 가지는 마우스, 래트, 또는 기타 종들로부터의 키메라 항체, 2특이성 항체, 재조합 및 조작된 항체 및 이들의 단편도 마찬가지이다. 본원에서 사용될 때, "인간화된" 면역글로불린이라는 용어는 인간 골격 영역, 및 비-인간 (보통 마우스 또는 래트) 면역글로불린으로부터의 1종 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 면역글로불린을 지칭한다. CDR을 제공하는 상기 비-인간 면역글로불린은 "공여체"로 지칭되며, 골격을 제공하는 상기 인간 면역글로불린은 "수용체"로 지칭된다. "인간화된 항체"는 인간화된 경사슬 및 인간화된 중사슬 면역글로불린을 포함하는 항체이다.

[0061] "항체"라는 용어에는 다클론 항체, 단일클론 항체 (mAb), 키메라 항체, 가용성 또는 결합 형태로 표기화될 수 있는 항체에 대한 항-개별특이형(anti-idiotypic) (anti-Id) 항체는 물론, 이들의 단편, 영역 또는 유도체가 포함되며, 비제한적으로 효소적 절단, 웹티드 합성 또는 재조합 기술과 같은 임의의 공지 기술에 의해 제공된다. 본원에서 제시되는 항체들은 PAG에 결합할 수 있다.

[0062] 본원에서 "다클론 항체"는 항원을 사용하여 면역화된 동물의 혈청으로부터 유도되는 항체 분자들의 불균일 군집을 지칭하는 것으로 정의된다. 이러한 상이한 항체들은 동일 항원 상의 수종의 항원결정인자를 인식할 수 있다. "단일클론 항체"는 항원에 특이적인 항체의 실질적으로 균일한 군집을 함유하며, 상기 군집은 실질적으로 유사한 항원결정인자 결합 부위를 함유한다. MAb는 업계 숙련자에게 알려져 있는 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들면, 그 내용이 각각 구체적으로 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Kohler and Milstein, 1975]; U.S. 특허 제4,376,110호; 문헌 [Ausubel *et al.*, (1992)]; [Harlow and Lane 1988]; [Colligan *et al.*, 1993]을 참조하라. 그와 같은 항체들은 IgG, IgM, IgE, IgA, GILD을 포함하는 임의의 면역글로불린 류, 및 이들의 임의의 아류의 것일 수 있다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마는 시험관 내에서, 제자리에서 또는 생체 내에서 배양될 수 있다. 생체 내 또는 제자리에서의 고역가 mAb의 생산은 이것을 현재 바람직한 생산 방법이 되게 하고 있다.

[0063] "키메라 항체"는 쥐 mAb로부터 유래하는 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 것들과 같이 서로 다른 부분이 서로 다른 동물 종으로부터 유래하는 분자로서, 주로 적용시 면역원성을 감소시키고 제조시 산출을 증가시키기 위하여 사용된다. 키메라 항체 및 그의 제조 방법에 대해서는 업계에 알려져 있다. 대표적인 제조 방법은 그 각각이 전체적으로 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Cabilly *et al.*, 1984]; [Boulianane *et al.*, 1984]; 및 [Neuberger *et al.*, 1985]에 기술되어 있다.

[0064] "항-개별특이형 항체" (항-Id)는 일반적으로 항체의 항원-결합 부위와 관련되어 있는 독특한 결정인자 (determinant)를 인식하는 항체이다. Id 항체는 mAb의 공급원과 동일한 종 및 유전형의 동물 (예컨대 마우스 주)을 항-Id가 제조될 mAb로 면역화함으로써 제조될 수 있다. 면역화된 동물은 면역화 항체의 개별특이형 결정인자를 인식하고, 해당 개별특이형 결정인자에 대한 항체 (항-Id 항체)를 생산함으로써 거기에 반응하게 된다. 그와 같은 항체의 대표적인 제조 방법은 전체적으로 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 제4,699,880호에서 찾을 수 있다.

[0065] 본 발명의 항체는 하나 이상의 중사슬, 하나 이상의 경사슬, 중사슬 불변 영역, 중사슬 가변 영역, 경사슬 가변

영역 및/또는 경사를 불변 영역을 포함할 수 있으며, 다클론 Ab, 단일클론 Ab, 이들의 단편 및/또는 영역은 PAG의 일부에 결합하는 하나 이상의 중사를 가변 영역 또는 경사를 가변 영역을 포함한다.

[0066] 본 발명의 소정 구현에는 동물로부터 샘플을 수득하는 것, 및 상기 샘플을 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 것 (여기서 상기 항체 또는 항체 단편은 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 및/또는 boPAG21 중 1종 이상에 결합하는 도메인을 포함하는 것임), 및 상기 항체 또는 항체 단편의 샘플 중 PAG(들)와의 접촉을 검출하는 것 (여기서 PAG(들)의 검출은 동물이 임신하였음을 표시하는 것임)을 포함하는, 동물에서의 임신 검출 방법에 관한 것이다. 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 방법도 PAG에 결합하는 항체를 확인하는 데에 사용될 수 있다. IgG의 가변 영역을 한정하는 방법을 언급하고 있는 참조문헌의 예에는 구체적으로 본원에 참조로써 개재되는 문헌 [Mo *et al.*, (1993)] 및 [Leibiger *et al.*, (1999)]이 포함된다.

IV. 검출 방법 및 분석 체재

[0068] 본 발명의 소정 구현에는 동물로부터 수득된 샘플을 본원에서 제공되는 항체와 접촉시키는 것, 및 샘플 중 1종 이상의 임신 관련 항원을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 PAG의 검출은 동물이 임신하였음을 표시하는, 동물에서의 임신 검출 방법에 관한 것이다. 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 방법도 샘플 중 PAG에 결합된 항체 또는 항체 단편을 검출하는 데에 사용될 수 있다.

[0069] 따라서, 본 발명은 항체의, PAG의 면역학적 검출에서의 용도를 제공한다. 여러 유용한 면역검출 방법들이 예를 들면 문헌 [Nakamura *et al.*, (1987)]와 같은 과학 문헌에 기술되어 있다. 면역분석은 그의 가장 단순하고 직접적인 의미에서 결합 분석이다. 소정의 면역분석으로 효소 연관 면역흡착 분석 (ELISA) 및 방사성면역분석 (RIA)이 있다. 조직 단편을 사용하는 면역조직화학적 검출 역시 특히 유용하다. 그러나, 그와 같은 기술들로 검출이 제한되는 것은 아니며, 웨스턴 블러팅, 도트(dot) 블러팅, FACS 분석 등 역시 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다는 것은 쉽게 알 수 있을 것이다.

[0070] 일반적으로, 면역결합 방법은 단백질, 웨스턴 블러팅 또는 항체를 함유할 것으로 추정되는 샘플을 수득하는 것, 및 경우에 따라 면역복합체의 형성을 가능케 하는 데에 효과적인 조건하에서 상기 샘플을 본 발명에 따른 항체 또는 단백질 또는 웨스턴 블러팅, 도트(dot) 블러팅, FACS 분석 등 역시 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다는 것은 쉽게 알 수 있을 것이다.

[0071] 특정 구현예에서는, 항체가 튜브 또는 웰의 내부 벽과 같은 고체 지지체에 연결되며, PAG를 함유할 것으로 추정되는 샘플이 고정된 항체에 적용되게 된다.

[0072] 항체-코팅된 튜브 시스템에 대해서는 그 각각이 구체적으로 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 3,646,346호 및 WO 98/16832호에 기술되어 있다. PAG-항체 복합체의 존재는 이후 특정 조건하에서 검출될 수 있다. 임의로, 상기 면역 복합체가 정량될 수 있다.

[0073] 선택된 생물학적 샘플을 면역 복합체 (1차 면역 복합체)의 형성을 가능케 하기에 충분한 효과적인 조건하에서 그리고 시간 기간 동안 항체와 접촉시키는 것은 일반적으로 단순히 항체 조성물을 샘플에 첨가하고, 항체가 샘플에 존재하는 임의의 PAG와 면역 복합체를 형성하기에 (즉, 거기에 결합하기에) 충분히 긴 시간 기간 동안 혼합물을 배양하는 것의 문제이다. 이와 같은 시간 후, 샘플-항체 조성물은 일반적으로 임의의 비-특이적으로 결합된 항체 종을 제거하기 위하여 세척됨으로써, 1차 면역 복합체 내의 특이적으로 결합된 항체만이 검출되는 것을 가능케 하게 된다.

[0074] 일반적으로, 면역복합체 형성의 검출에 대해서는 업계에 잘 알려져 있으며, 여러 접근법의 적용을 통하여 달성될 수 있다. 이러한 방법들은 일반적으로 방사성, 형광성, 생물학적 및 효소적 표지 중 어느 것과 같은 표지 또는 마커(marker)의 검출을 기반으로 한다. 그와 같은 표지의 사용과 관련한 U.S. 특허에는 각각 본원에 참조로써 개재되는 3,817,837호; 3,850,752호; 3,939,350호; 3,996,345호; 4,277,437호; 4,275,149호 및 4,366,241호가 포함된다. 방법을 수행하기 위한 단백질 및 키트의 면역학적 결정 방법은 구체적으로 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 5,721,105호에서 찾을 수 있다.

[0075] 특정 구현예에서, 본 방법은 업계에 알려져 있는 바와 같은 2차 결합 리간드, 예컨대 제2 항체 및/또는 바이오틴/아비딘 리간드 결합 배열의 사용을 포함한다. 검출에 사용되는 2차 항체는 그 자체가 검출가능한 표지에 연결될 수 있어서, 이후 단순하게 해당 표지를 검출하게 됨으로써, 조성물 중 1차 면역 복합체의 양이 측정되는 것을 가능케 한다. 면역포획, 바이오틴/아비딘 증폭, 및 양고추냉이 페옥시다제 색상 발현을 사용한 시험 샘플 중 생체분자의 검출 방법들을 U.S. 특허 출원 공개 제2003/508381호에서 찾아볼 수 있다.

- [0076] 보통, 1차 면역 복합체는 PAG 또는 PAG-특이적 제1 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 제2 결합 리간드에 의해 검출될 수 있다. 이러한 경우, 상기 제2 결합 리간드는 검출가능한 표지에 연결될 수 있다. 상기 제2 결합 리간드는 그 자체가 종종 항체로서, 그에 따라 "2차" 항체로 명명될 수 있다. 1차 면역 복합체는 제2 면역 복합체의 형성을 가능케 하기에 충분한 효과적인 조건하에서 그리고 시간 기간 동안 표지화된 제2 결합 리간드 또는 항체와 접촉된다. 다음에, 상기 제2 면역 복합체는 일반적으로 임의의 비-특이적으로 결합된 표지화 제2 항체 또는 리간드를 제거하기 위하여 세척된 다음, 제2 면역 복합체 중의 나머지 표지가 검출된다.
- [0077] 다른 방법에는 2단계 접근법에 의한 1차 면역 복합체의 검출이 포함된다. PAG 또는 항-PAG 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 항체와 같은 제2 결합 리간드가 사용되어 상기한 바와 같이 제2 면역 복합체를 형성한다. 상기 제2 결합 리간드는 기질을 검출가능한 생성물로 처리함으로써 시간이 지나면서 신호를 증폭할 수 있는 효소를 함유한다. 세척 후, 제2 면역 복합체는 기질과 접촉됨으로써, 검출을 가능케 한다.
- [0078] 본 발명의 일 구현예에서는, 효소-연관 면역분석 (ELISA)이 사용될 수 있다. 예를 들면 문헌 [Engvall, 1980]; [Engvall, 1976]; [Engvall, 1977]; [Gripenberg *et al.*, 1978]; [Makler *et al.*, 1981]; [Sarangadharan *et al.*, 1984]을 참조하라. ELISA는 기질이 수동적으로 플라스틱과 같은 고체 지지체에 흡착되는 것을 가능케 함으로써, 실험실 조건하에서의 손쉬운 조작을 가능케 한다. 숙련 기술자라면, ELISA에 대한 포괄적인 논문으로써 문헌 ["ELISA; Theory and Practise" (Crowther, 1995)]을 참조한다.
- [0079] ELISA 법의 감도는 사용되는 효소의 전환율 및 효소 반응 생성물의 검출 용이성에 따라 달라진다. 이러한 분석 시스템의 감도 증강은 효소에 대한 형광성 및 방사성 기질의 사용에 의해 달성될 수 있다. 본 발명에 포함되는 면역분석에는 U.S. 특허 4,367,110호 (이중 단일클론 항체 샌드위치 분석) 및 U.S. 특허 4,452,901호 (웨스턴 블릿)에 기술되어 있는 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 분석에는 표지화된 리간드의 면역 침전, 및 시험판 내 및 생체 내 모두에서의 면역세포화학이 포함된다.
- [0080] 일 구현예에서, 본 발명은 "샌드위치" ELISA를 포함하며, 여기서 본 발명의 항-PAG 항체는 선택된 표면, 예컨대 폴리스티렌 마이크로타이터(microtiter) 플레이트의 웰, 튜브, 또는 침지막대 상에 고정된다. 다음에, PAG를 함유할 것으로 추정되는 시험 조성물, 예컨대 임상 샘플이 상기 표면과 접촉된다. 결합, 및 비-특이적으로 결합된 면역복합체를 제거하기 위한 세척 후, PAG에 대한 제2 항체에 의해 결합된 항원이 검출될 수 있다.
- [0081] 또 다른 대표적인 ELISA에서는, 샘플로부터의 폴리펩티드가 표면 상에 고정된 다음, 항-PAG 항체와 접촉된다. 결합, 및 비-특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 후, 결합된 항체가 검출된다. 처음의 항체가 검출가능한 표지에 연결되어 있는 경우에는, 1차 면역 복합체가 바로 검출될 수 있다. 아니면, 제1 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 제2 항체를 사용하여 면역 복합체가 검출될 수 있는데, 상기 제2 항체는 검출가능한 표지에 연결되어 있다.
- [0082] PAG가 고정되는 또 다른 ELISA는 검출에 항체 경쟁의 사용을 포함한다. 이와 같은 ELISA에서는, 표지화된 항체가 웰에 첨가되고, PAG에 결합되도록 방치된 후, 그의 표지에 의해 검출된다. 샘플 중 PAG의 양은 코팅된 웰을 사용한 배양 전 또는 동안에 샘플을 표지화된 항체와 혼합하는 것에 의해 측정된다. 샘플 중 PAG의 존재는 웰에 대한 결합에 가용한 항체의 양을 감소시키는 작용을 하며, 그에 따라 최종 신호를 감소시킨다.
- [0083] 사용되는 체제에 관계없이, ELISA는 코팅, 배양 또는 결합, 비-특이적으로 결합된 종을 제거하기 위한 세척, 및 결합된 면역 복합체의 검출과 같은 소정의 공통적인 특징들을 가진다. 항원 또는 항체 중 어느 것을 가지는 플레이트를 코팅함에 있어서는, 일반적으로 상기 항원 또는 항체의 용액을 사용하여 밤새 또는 특정 시간 기간 동안 플레이트의 웰을 배양하게 된다. 다음에, 플레이트의 웰은 불완전하게 흡착된 물질을 제거하기 위하여 세척될 것이다. 이후, 웰의 모든 나머지 가용 표면이 시험 항혈청과 관련하여 항원적으로 중성인 비특이적 단백질을 사용하여 "코팅"된다. 여기에는 소 혈청 알부민 (BSA), 카세인, 우유 분말의 용액, 또는 기타 항원적으로 중성인 단백질들이 포함될 수 있다. 상기 코팅은 고정 표면 상 비특이적 흡착 부위의 차단을 가능케 함으로써, 표면에 대한 항혈청의 비특이적 결합에 의해 야기되는 바탕(backgroun)를 감소시킨다.
- [0084] "면역 복합체 (항원/항체) 형성을 가능케 하는 데에 효과적인 조건하에서"는 상기 조건이 바람직하게는 BSA, 소 칼마 글로불린 (BGG), 중발 또는 분말화된 우유, 및 포스페이트 버퍼링된 식염수 (PBS)/TWEEN과 같은 용액을 사용하여 항원 및 항체를 희석하는 것을 포함함을 의미한다. 이렇게 첨가된 체제들은 비특이적 바탕의 감소를 돋는 경향도 있다.
- [0085] "적합한"조건은 또한 배양이 효과적인 결합을 가능케 하기에 충분한 온도에서, 그리고 시간 기간 동안임을 의미한다. 배양 단계는 통상적으로 바람직하게는 25 °C 내지 27 °C 수준의 온도에서 약 1시간 내지 2시간 내지 4시

간 동안이거나, 또는 약 4 °C 정도에서 밤새일 수 있다.

[0086] 검출 수단을 제공하기 위해서는, 제2 또는 제3 항체가 검출을 가능케 하는 결합 표지를 가지게 된다. 종종, 이것은 적절한 발색성 기질을 사용한 배양시 색상 발현을 야기하게 되는 효소일 것이다. 따라서, 예를 들면 경우에 따라, 제1 또는 제2 면역 복합체를 추가적인 면역복합체 형성의 전개를 선호하는 시간 기간 동안 및 조건화에서 (예컨대, PBS-TWEEN과 같은 PBS-함유 용액 중에서 실온으로 2시간 동안 배양) 우레아체, 글루코스 옥시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 히드로젠 퍼옥시다제-접합된 항체와 접촉 및 배양하게 된다.

[0087] 표지화된 항체를 사용한 배양, 및 이후의 비결합 물질을 제거하기 위한 세척 후에는, 예를 들면 요소 및 브로모크레졸 퍼플, 또는 효소 표지가 퍼옥시다제인 경우에는 2,2'-아지도-디-(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산 [ABTS] 및 H₂O₂와 같은 발색성 기질을 사용한 배양에 의해, 표지의 양이 정량된다. 다음에, 예를 들면 가시 스펙트럼 분광광도계를 사용하여 색상 생성의 정도를 측정함으로써, 정량이 달성된다.

[0088] ELISA의 변형으로는 범용 검출 시스템으로서의 효소 RVV-XA를 표지화하는 것과 조합된 응집 단계반응을 사용하는 효소-연관 응집 분석, 또는 ELCA (U.S. 특허 4,668,621호)가 있다. 본 발명에 있어서의 이와 같은 시스템의 장점은 응집 반응이 매우 다양한 버퍼의 존재하에 생리학적 pH에서 수행될 수 있다는 것이다. 이에 따라, 복합체 분석물의 완전성을 유지하는 것이 가능하다.

[0089] 면역조직화학 (IHC) 역시 본 발명에 따라 PAG의 확인에 사용될 수 있다. 여기에는 IHC에 의한 연구로부터 제조되는 신선-냉동 및 포르말린-고정 모두, 파라핀-삽입 조직 블록을 시험하는 것이 포함된다. 예를 들면, 각 조직 블록은 50 mg의 잔류 "분쇄" 태반 조직으로 구성된다. 이러한 미립자 표본으로부터 조직 블록을 제조하는 방법은 예컨대 유방의 다양한 예후 인자에 대한 이전의 IHC 연구에서 성공적으로 사용되어 왔으며, 업계 숙련자에게 잘 알려져 있다 (문헌 [Brown *et al.*, 1990]; [Abbondanzo *et al.*, 1990]; [Allred *et al.*, 1990]).

[0090] 간단하게, 냉동-단편은 소형 플라스틱 캡슐 내에서 50 mg의 냉동된 "분쇄" 태반 조직을 포스페이트 버퍼링된 식염수 (PBS) 중에 실온으로 재수화하는 것; 원심분리에 의해 입자를 펠렛화하는 것; 그것을 점성의 삽입 매체 (OCT) 중에 재현탁하는 것; 캡슐을 뒤집어 원심분리에 의해 다시 펠렛화하는 것; -70 °C 이소펜탄 중에서 급속-냉동시키는 것; 플라스틱 캡슐을 절단하고, 냉동된 조직 원통을 제거하는 것; 상기 조직 원통을 저온유지장치 마이크로토름 척 상에 고정시키는 것; 및 평균 약 500개의 현저하게 그대로인 태반 세포를 함유하는 25-50개의 일련의 단편들을 절단하는 것에 의해 제조될 수 있다.

[0091] 영구-단편은 플라스틱 마이크로퓨지 튜브 중에서의 50 mg 샘플의 재수화; 펠렛화; 10 % 포르말린 중에서의 4시간 고정 동안의 재현탁; 세척/펠렛화; 가온 2.5 % 아가 중에서의 재현탁; 펠렛화; 아가를 경화시키기 위한 빙수 중에서의 냉각; 튜브로부터의 조직/아가 블록의 제거; 파라핀 중에서의 블록의 침윤 및 삽입; 및 50개 이하의 일련의 영구 단편들의 절단을 포함하는 유사한 방법에 의해 제조될 수 있다.

V. 단백질의 정제

[0092] 소정 구현예는 단리 또는 정제된 폴리펩티드, 또는 단리 또는 정제된 폴리펩티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 단백질 정제 기술에 대해서는 업계 숙련자에게 잘 알려져 있다. 이러한 기술들은 일단계로 세포성 환경의 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로의 조분별을 포함한다. 폴리펩티드를 다른 단백질들로부터 분리함으로써, 문제의 폴리펩티드가 부분적이거나 완전한 정제 (또는 균일한 정제)를 달성하기 위한 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 사용하여 추가적으로 정제될 수 있다. 순수 웨티드의 제조에 특히 적합한 분석 방법은 이온-교환 크로마토그래피; 배제 크로마토그래피; 폴리아크릴아미드 겔 전기영동; 등전 집중(isoelectric focusing)이다. 특히 효율적인 웨티드 정제 방법은 속성 단백질 액체 크로마토그래피 또는 심지어는 HPLC이다.

[0093] 본 발명의 소정 양태는 정제에 관한 것으로서, 특정 구현예에서는, 코딩된 단백질 또는 폴리펩티드의 실질적인 정제에 관한 것이다. 본원에서 사용될 때의 "정제된 폴리펩티드, 단백질 또는 웨티드"라는 용어는 다른 성분들로부터 단리 가능한 조성물을 지칭하고자 하는 것으로서, 여기서 단백질 또는 웨티드는 그의 천연적으로 수득 가능한 상태와 비교하여 임의의 정도까지 정제된다. 따라서, 정제된 단백질 또는 웨티드 역시 그것이 천연적으로 발생할 수 있는 환경으로부터 벗어난 단백질 또는 웨티드를 지칭한다.

[0094] 일반적으로, "정제된"은 다양한 다른 성분들을 제거하기 위한 분별에 적용된 단백질 또는 웨티드 조성물을 지칭하게 되며, 상기 조성물은 그의 발현되는 생물학적 활성을 실질적으로 유지한다. "실질적으로 정제된"이라는 용어가 사용되는 경우, 이와 같은 지정은 단백질 또는 웨티드가, 조성물 중 단백질의 약 50 %, 약 60 %, 약 70 %, 약 80 %, 약 90 %, 약 95 % 또는 그 이상을 구성하는 것과 같이, 조성물의 주 성분을 형성하는 조성물을 지

칭하게 된다.

[0096] 단백질 정제에 사용하기에 적합한 다양한 기술들이 업계 숙련자에게 잘 알려져 있을 것이다. 여기에는 예를 들면 암모늄 슬레이트, PEG, 항체 등을 사용하거나, 오염 단백질의 열 또는 산 pH 변성에 의한 침전에 이어지는 원심분리; 이온 교환, 겔 여과, 역상, 히드록실아파타이트 및 친화성 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 단계; 등전 집중; 겔 전기영동; 및 이들 및 기타 기술들의 조합이 포함된다. 일반적으로 업계에 알려져 있는 바와 같이, 다양한 정제 단계들을 수행하는 순서는 변화될 수 있거나, 또는 소정 단계가 생략될 수 있으며, 그래도 실질적으로 정제된 단백질 또는 펩티드의 적합한 제조 방법이 얻어지는 것으로 여겨진다.

[0097] 폴리펩티드가 항상 그의 가장 정제된 상태로 제공되는 일반적인 요건은 존재하지 않는다. 실제로, 소정 구현예에서는 덜 실질적으로 정제된 생성물이 효용을 가질 것으로 생각된다. 부분적인 정제는 더 적은 정제 단계를 조합하여 사용함으로써, 또는 동일한 일반적 정제 체계의 상이한 형태들을 활용함으로써 성취될 수 있다. 예를 들면, HPLC 장치를 이용하여 수행되는 양이온-교환 컬럼 크로마토그래피는 일반적으로 저압 크로마토그래피 시스템을 이용하는 동일 기술에 비해 더 큰 "-배수"의 정제를 하게 되는 것으로 평가된다. 더 낮은 정도의 상대적 정제를 나타내는 방법은 단백질 생성물의 총 회수에서, 또는 발현된 단백질의 활성을 유지함에 있어서 장점을 가질 수 있다.

VII. 키트

[0099] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 PAG의 검출에 대하여 상기한 면역검출 방법들과 함께 사용하기 위한 키트, 예컨대 소에서 임신을 진단하는 면역검출 키트를 제공한다. 특정 구현예에서는, 97 %를 초과하는 SEQ ID NO:1에 대한 서열 동일성 또는 92 %를 초과하는 SEQ ID NO:2에 대한 서열 동일성을 가지는 도메인을 포함하는 항체가 키트에 포함된다. 상기 키트는 하나 이상의 용기 수단을 포함할 수 있다. 상기 용기는 예를 들면 바이알, 튜브, 플라스크, 바이알, 또는 주사기일 수 있다.

[0100] 특정 구현예에서, 상기 항체는 단일클론 항체 2D9이다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 사전결합된 항체를 가지는 하나 이상의 튜브 또는 마이크로타이터 플레이트의 웰을 포함한다. 다르게는, 상기 키트는 컬럼 매트릭스에 사전결합된 항체를 포함할 수 있다. 상기 키트는 단일 샘플, 또는 하나를 초과하는 샘플의 분석을 가능케 할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 동시에 또는 연속적으로 수많은 샘플들의 면역검출을 가능케 하는, 항체로 코팅된 다수의 마이크로타이터 플레이트 또는 튜브를 포함한다.

[0101] 키트의 면역검출 시약은 제공된 항체와 결합되거나 및/또는 거기에 연결된 검출가능 표지를 포함하여 다양한 형태들 중 어느 하나를 취할 수 있다. 제2 결합 리간드와 결합되거나 및/또는 거기에 부착된 검출가능 표지 역시 시도된다. 예시적인 제2 리간드는 제1 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 제2 항체이다.

[0102] 일부 구현예에서, 상기 키트는 제1 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 제2 항체를 포함한다. 상기 제2 항체는 검출가능한 표지에 연결될 수 있거나, 또는 연결되지 않을 수 있다. 일부 추가 구현예에서, 상기 키트는 제2 항체에 대하여 결합 친화성을 가지는 제3 항체를 포함하며, 상기 제3 항체는 검출가능한 표지에 연결되어 있다. 상기에 언급된 바와 같이, 수많은 대표적인 표지들이 업계에 알려져 있거나, 및/또는 본 발명과 함께 모든 그와 같은 표지들이 사용될 수 있다.

[0103] 상기 키트는 임의로 양성 대조를 제공하기 위하여, PAG의 적합하게 분취된 조성물을 포함할 수 있다. 키트의 상기 구성요소는 수성 매체 내에, 및/또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다.

[실시예]

VII. 실시예

[0106] 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위하여, 하기의 실시예들이 포함되었다. 업계 숙련자라면, 하기의 실시예에서 개시되는 기술들이 본 발명의 실행에 잘 맞는 것으로 발견자들에 의해 발견된 기술들을 나타내며, 그에 따라 그의 실행을 위한 바람직한 양태를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 그러나 본 개시에 비추어, 업계 숙련자라면, 개시되는 구체적인 구현예에서 많은 변화가 이루어질 수 있으며, 본 발명의 기술사상 및 영역으로부터 벗어나지 않고도 여전히 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 알아야 할 것이다.

실시예 1

2D9 결합 PAG의 확인

- [0109] 2D9에 결합하는 단백질을 확인하고, 2D9항체를 특성화 및 서열분석하며, 2D9에 대한 PAG의 결합 부위를 지도화하기 위하여 연구가 수행되었다. 이를 수행하기 위하여, 두 가지 접근법 (하기함)을 사용하였다.
- [0110] **재료 및 방법**
- [0111] 2D9-코팅된 자석 비드를 사용한 PAG의 면역침전. 정제된 2D9를 제조자의 지침 (디날(Dynal) 사)에 따라 토실(Tosyl)-활성화된 디날 자석 비드에 결합시켰다. 항체 코팅된 자석 비드를 1× PBS 중에서 100 마이크로그램의 PAG 강화 조제물 (55일차 태반으로부터 수득)을 사용하여 30분 동안 배양한 후, 동일한 버퍼로 광범위하게 세척하였다. pH 3.0의 아세트산을 사용함으로써 결합된 단백질을 용리하고, 겔 및 웨스턴 블럿 분석에 적용하였다. 웨스턴 블럿은 토끼 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개하였다. SDS-PAGE로부터 면역-반응성 단백질 밴드를 절단하여, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용하였다 (도 3).
- [0112] 소 입신 55일차로부터의 소구 (자궁내막) 및 태반엽 (태반) 조직으로부터 제조된 조직 추출물의 면역-친화성 크로마토그래피. 간단하게, 정제된 2D9 (10 mg)를 제조자의 지침 (세인트루이스 소재 시그마(Sigma) 사)에 따라 1 그램의 CNBr-활성화된 세파로스에 결합시켰다. 결합을 위하여, 상기 2D9-친화성 수지 (대략 5.0 ml)를 25 ml의 조직 추출물과 함께 pH 7.0에서 밤새 배양하였다. 다음날, 상기 수지를 컬럼에 충진하고, 1× PBS로 세척하여 비결합 물질을 제거한 후, pH 3.0의 아세트산으로 용리하였다. 용리 직후, 1 M 트리스를 사용하여 용리된 물질의 pH를 pH 7.0으로 중화하였다. 용리된 물질을 겔 및 웨스턴 블럿 분석에 적용하였다. 웨스턴 블럿은 토끼 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개하였다. SDS-PAGE로부터 단백질 밴드 1 내지 7을 절단하여, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용하였다 (도 4). 웨프티드 서열의 확인은 BLAST 분석을 사용함으로써 측정하였다.
- [0113] 2D9에 대한 PAG의 결합 친화도는 PAG 표준으로서 2D9-결합 항원 (면역-친화성 크로마토그래피에 의해 정제)을 사용하여 전개된 ELISA 데이터의 log-log 변형 (도 5)에 의해 측정하였다. 상기 분석은 0.05 ng/ml 내지 50 ng/ml (0.083 nM 내지 8.3 nM) 범위 일련의 PAG 표준을 사용하여 수행하였다. 상기 ELISA 분석을 8회 반복하였다. 데이터는 소프트맥스(SoftMax)™ (캘리포니아 서니베일 소재 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices), Inc. 사)를 사용하여 분석하였다.
- [0114] **결과**
- [0115] 2D9-결합된 자석 비드를 사용한 PAG의 면역침전. 자석 비드 용리된 물질의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블럿 분석은 67 kD에서 단일 단백질 밴드를 나타내었다. 웨프티드 지문법 및 LC-MS-MS 분석은 상기 단백질 밴드를 boPAG6으로 확인하였다 (도 3). 그러나, 이와 같은 분석이 2D9에 결합하는 모든 PAG를 밝혀내지는 못하였는데, 상기 분석이 면역침전 실험을 위한 100 마이크로그램의 PAG 강화 조제물을 사용하였기 때문이다. 이와 같은 물질은 pH 5.0에서의 태반 조직 추출물의 웨프스타틴-친화성 크로마토그래피에 이어지는 pH 9.5에서의 용리에 의해 단리하였다. 상기 조제물은 초기 PAG 항원의 강화 조제물인 '산성-PAG'로도 지칭되었다. 2D9에 결합하는 모든 PAG를 확인하기 위하여, 조직 추출물을 사용한 면역-친화성 크로마토그래피를 수행하였다 (하기 참조).
- [0116] 2D9-면역-친화성 크로마토그래피를 사용한 조직 추출물로부터 정제된 PAG의 분석. 면역-친화성 컬럼 용리된 물질의 쿠마시 블루 염색은 67 kD, 55 kD 및 50 kD의 분자량을 가지는 3개의 단백질 밴드를 나타내었다. 또한, 3 개의 단백질 밴드 모두가 토끼 항-PAG 항체를 사용한 웨스턴 블럿 분석에서 면역-반응성인 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과를 바탕으로, SDS-PAGE (도 4) 후 모든 단백질 밴드를 절단하여, 웨프티드 지문법 및 LC-MS-MS에 적용하였다. 결과적인 웨프티드 서열의 동일성을 BLAST 분석에 의해 측정하였다. 표 1은 BLAST 분석에 의한 웨프티드 서열 결과의 요약, 및 boPAG-4, boPAG-6, boPAG-9, boPAG-20 및 boPAG21 서열에 상응하는 PAG로서의 그의 확인을 보여준다. 표 1 파라미터들의 의미에 대해서는 도 3의 설명을 참조하라.

표 1

펩티드 서열 결과의 요약

단백질 밴드 번호: 밴드 3, 5, 6 & 7에 존재						
보스 타우루스 (gi28603710) 임신-관련 당단백질 4						
Mz	전하	Mr (계산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
494.7897	2	969.5647	323	331	97.72%	VPGQAYILK (SEQ ID NO:19)
523.7799	2	1027.5127	362	369	99.00%	LYFSVFDR (SEQ ID NO:20)
544.7657	2	1069.5193	127	136	98.95%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:21)
608.8262	2	1197.6216	232	241	94.10%	GELNWIPLMK (SEQ ID NO:22)
671.695	3	1994.0513	195	212	99.00%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:23)
820.4574	3	2440.2678	172	194	87.95%	FDGVVLGLSYTNISPSGAIPIFYK (SEQ ID NO:24)

단백질 밴드 번호: 밴드 1, 2, 4 & 5에 존재						
보스 타우루스 (gi28603714) 임신-관련 당단백질 6						
Mz	전하	Mr (계산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
886.4235	2	1752.8722	196	211	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:25)
881.9394	2	1743.8865	147	162	95.46%	IGDLVSTDQPFGCLK (SEQ ID NO:26)
809.7131	3	2408.1736	231	250	91.77%	GELNWVPLIQVGDWFVHMDR (SEQ ID NO:27)
671.6718	3	1994.0513	194	211	97.94%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:28)
615.3026	2	1210.6022	183	193	98.74%	TFSGAIFDK (SEQ ID NO:29)
592.9321	3	1757.8154	212	227	99.00%	DKQECSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:30)
511.9066	3	1514.6936	214	227	90.49%	QECSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:31)
467.2242	2	914.4286	362	368	91.26%	YFSVFDR (SEQ ID NO:32)

단백질 밴드 번호: 밴드 2 & 5에 존재						
보스 타우루스 (gi28603720) 임신-관련 당단백질 9						
Mz	전하	Mr (계산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
467.2146	2	914.4286	362	368	99.00%	YFSVFDR (SEQ ID NO:33)
521.2636	2	1022.5185	138	146	99.00%	GFLAYDTVR (SEQ ID NO:34)
653.9534	3	1940.8727	214	230	96.15%	QECSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO:35)
654.80054	2	1289.5962	126	137	97.70%	TFTITYGSGSMK (SEQ ID NO:36)
660.8375	2	1301.6768	350	360	94.72%	ETWILGDAFLR (SEQ ID NO:37)
734.6413	3	2183.0105	212	230	87.19%	NKQECSVVMFGGVDHQYYK (SEQ ID NO:38)
739.9147	2	1459.8439	307	319	99.00%	YLPSITFIINGIK (SEQ ID NO:39)
817.7423	3	2432.2222	147	169	99.00%	IGDLVSTDQPFGLSVVEYGLEGR (SEQ ID NO:40)
875.3999	3	2605.2012	256	280	83.62%	TVIACSDGCEALVHTGTSHIEGPGR (SEQ ID NO:41)

단백질 밴드 번호: 밴드 1 & 4에 존재						
보스 타우루스 (gi28603736) 임신-관련 당단백질 20						
Mz	전하	Mr (계산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
671.6718	3	1994.0513	195	212	97.94%	LKNEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:42)
758.8157	2	1497.7511	215	228	80.98%	QKGCSVVMFGGVDHR (SEQ ID NO:43)
886.4235	2	1752.8722	197	212	88.08%	NEGAISEPVFAFYLSK (SEQ ID NO:44)

[0117]

단백질 밴드 번호: 밴드 3, 5 & 7에 존재						
보스 타우루스 (gi28603738) 임신-관련 당단백질 21						
Mz	전하	Mr (계산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
516.7575	2	1013.497	362	369	99.00%	VYFSVFDR (SEQ ID NO:45)
544.7657	2	1069.5193	127	136	98.95%	TFSITYGSGR (SEQ ID NO:46)
694.3238	3	2061.9712	258	277	98.47%	VVACSDGCEAVVDTGTSLIK (SEQ ID NO:47)
753.6964	3	2240.1	148	168	99.00%	IGDLVSTDQPFGLSVSEYGFK (SEQ ID NO:48)
892.1082	3	2655.2744	171	194	99.00%	AYDGILGLNYPDEFSEAIPIFDK (SEQ ID NO:49)
915.4483	2	1810.8889	346	361	81.37%	FSSSTETWLLGDAFLR (SEQ ID NO:50)

[0118]

[0119] 이와 같은 분석은 3개의 단백질 랜드 각각이 1종을 초과하는 PAG를 가지고 있음을 나타낸다 (표 1). 67 kD 랜드는 boPAG6 및 boPAG20에 상응하는 웨티드를 함유하였다. 55 kD 단백질 랜드는 boPAG6 및 boPAG9에 속하는 웨티드를 함유하였다. 50 kD 단백질 랜드는 미량 성분으로서의 boPAG9와 함께, boPAG4 및 boPAG21에 상응하였다. 이러한 결과는 2D9 단일클론 항체가 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 및 boPAG21에 결합한다는 것을 나타낸다. 상기 단일클론 항체는 5종의 PAG 모두에 공통되는 항원결정인자에 결합한다. 서열 비교는 이들 PAG들 간에 고도의 서열 동일성을 나타내었다.

[0120] 2D9-결합 PAG를 표준으로 사용함으로써 수득된 PAG ELISA 결과 (도 5)를 소프트맥스™를 사용하여 Kd 값을 계산하는 데에 사용하였다. 2D9의 Kd 값은 0.9 nM인 것으로 측정되었다 (도 5). 따라서, 2D9는 PAG에 대한 고도 친화성의 단일클론 항체이다. 이러한 결과는 PAG 단일클론 항체인 2D9가 55일차 태반 조직 추출물로부터의 boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 및 boPAG21에 결합한다는 것을 나타낸다. LC-MS-MS에 의해 수득된 웨티드 서열의 동일성은 이들 5종 PAG (boPAG4, boPAG6, boPAG9, boPAG20 및 boPAG21)의 앞서 특성화된 서열과 상응하였다.

[0121] 실시예 2

[0122] 단백질 및 mRNA 서열분석

[0123] 정제된 2D9의 단백질 서열분석. 2D9의 PAG-항원 결합 서열을 확인하기 위하여, 2D9의 서열분석을 수행하였다. 2D9의 상기 서열분석은 단백질 및 DNA 서열분석법에 의해 실행되었다. 먼저, 변성 겔 전기영동에 의해 2D9 항체의 중사슬과 경사슬을 분리하였다. 겔 랜드를 절개하여, 트립신 및 키모트립신 효소 분해에 별도로 적용하였다. 생성되는 웨티드를 분리하여, LC-MS-MS 법 (액체 크로마토그래피-질량 분광측정법-질량 분광측정법)에 의해 서열분석하였다. 질량 및 서열 분석에서 > 90 %의 신뢰도 점수를 가지는 웨티드를 선택하였다. 결과적인 웨티드 서열을 사용하여 ~80 %의 경사슬을 서열 및 ~50 %의 중사슬을 조합하였다.

[0124] 2D9 중사슬 및 경사슬 mRNA의 서열분석. 두 번째 접근법에서는, 2D9 PAG 하이브리도마 세포로부터 제조된 총 RNA로 역전사-폴리머라제 연쇄 반응 (RT-PCR) 기술을 사용함으로써, 2D9 중사슬 및 경사슬에 상응하는 mRNA를 서열분석하였다.

[0125] 간단하게, 무-혈청 조직 배양 매체에서 PAG 단일클론 항체 생산 하이브리도마 세포를 성장시켜, 1×10^6 세포를 생산하였다. 상기 세포를 원심분리하고, 생성되는 세포 펠렛을 액체 질소 중에서 금속 냉동시켰다. 상기 세포 펠렛을 사용시까지 -80 °C에서 저장하였다. 텍사스 오스틴 소재 암비온(Ambion), Inc. 사로부터 구입한 세포-대-cDNA 키트 II를 사용하여, 제1 가닥 상보성 DNA (cDNA)를 제조하였다. 하이브리도마 세포 내의 RNA를 역전사하여, 별도의 RNA 추출 단계 없이 cDNA를 제조하였다. 생성된 cDNA 주형을, 마우스 중사슬 및 경사슬의 모든 하위군을 증폭하도록 설계된 프라이머 세트를 이용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 경사슬 및 중사슬을 증폭하는 데에 사용하였다 (문헌 [Chardes et al., 1999]). 생성되는 PCR 생성물을 서열분석하였다. DNA STAR™ 소프트웨어 패키지를 사용하여, 상기 서열 데이터를 조합하였다. 전체 연구를 반복하여 서열 정밀도를 확보하였다. PCR 증폭 및 서열분석의 두 번째 반복은 적용범위를 증가시키기 위한 추가적인 프라이머를 포함하였다.

[0126] 서열 분석은 2D9 중사슬이 마우스 IgG1 감마 하위군으로부터 유래하였으며, 경사슬이 카파 유형으로부터 유래하였음을 나타내었다. 중사슬은 448개의 아미노산 잔기로 구성되었으며, 경사슬은 219개의 아미노산 잔기로 구성되었다. 2D9 경사슬의 아미노산 서열을 SEQ ID NO:3으로 제시하였다. 2D9 중사슬의 아미노산 서열을 SEQ ID NO:4로 제시하였다. 2D9 경사슬의 핵산 서열을 SEQ ID NO:5로 제시하였다 (도 1). 2D9 중사슬의 핵산 서열을 SEQ ID NO:6으로 제시하였다 (도 2).

[0127] 실시예 3

[0128] 축우에서의 면역분석-기반 임신 테스트의 실행가능성 연구

[0129] 낙농 축우 번식 관리에서의 28일차 조기 임신 테스트의 경제성을 평가하기 위하여, 대규모 연구를 수행하였다. 연구 동물들을 하나는 캘리포니아에 있으며, 하나는 위스콘신에 있는 2개의 서로 다른 장소에 위치시켰다. 장소 당 1,050 마리의 동물들을 할당하였다. 최초의 번식 후, 하기하는 바와 같은 면역분석 기반 임신 테스트의 수행, 또는 표준 촉진 중 어느 것이 이어졌다. 샘플을 밤새 실험실로 수송하였다. 연구에는 토끼 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 최적화된 샌드위치 ELISA가 사용되었다. PAG ELISA에 사용되는 컷 오프(cut off)는 시험적인 연구를 기준으로 1.7 ng/ml이었다. 28일차에 혈액 샘플을 수집하여, 임신 테스트를 위해 실험실로 수송하였

다. 임신 진단은 PAG ELISA에 의해 수행하였으며, 결과 보고서를 작성하였고, 24시간 이내에 농장 요원에게 사용하도록 하였다. 번식 결정은 조기 재동기화(resynch) 군에 대한 PAG 시험으로부터의 임신진단 결과를 기준으로 이루어졌다. 늦은 재동기화 군 (대조)에 대한 번식 결정은 35일차 내지 45일차의 촉진을 기준으로 이루어졌다. 2개 장소로부터의 결과를 도 6-8에 나타내었다.

[0130] 도 6은 초음파 기반 임신 진단과 비교한 PAG ELISA를 사용한 실험실-기반 임신 진단의 정밀도를 나타낸다. 도 6은, 두 연구 장소인 위스콘신과 캘리포니아에서의, 28일차 초음파에서의 임신 진단과 비교한 실험실-기반 ELISA를 사용하는 것에 의한 28일차 임신 진단의 정밀도를 나타낸다. 이와 같은 베타 연구로써, 낙농우 번식 관리에서의 28일차 임신 테스트의 경제성을 조사하였다. 임신 진단에는 다클론 항체를 사용한 실험실-기반 PAG ELISA를 사용하였다. 위스콘신 장소는 엄격하게 동기화된 번식을 사용한 반면, 캘리포니아 장소는 동기화된 번식 플러스 발정 번식(Breeding to heat)을 사용하였다. 장소 당 연구에서, 대략 1000 마리의 소를 사용하였다. 28일차에 혈액 샘플을 수집하여, 임신 테스트를 위해 실험실로 수송하였다. 결과는, 번식 결정을 가능케 하도록, 24시간 이내에 농장으로 답신되었다. 28일차의 혈액 수집 시점에, 초음파에 의한 임신 상태 역시 측정하였다.

[0131] 도 7 및 도 8은 2개의 서로 다른 번식 체계의 낙농우 번식 관리에서의 조기 임신 검출의 경제성을 측정하는 데에 사용된 번식 파라미터들의 결과를 나타낸다. 상기 결과는 대조에 비하여 조기 재동기화 군에서 공백 일수의 10 내지 15일까지의 상당한 감소가 존재함을 명백하게 보여준다. 또한, 양 장소에서, 수정 사이 일수의 감소가 관찰되었다.

[0132] 이러한 결과는 수정 27-30일 후의 PAG ELISA를 사용한 조기 임신 테스트가 촉진에 비해 더 조기의 번식을 가능케 한다는 것을 보여준다. 조기 임신 테스트는 소의 재-번식에서 '공백 일수(days open)'를 상당히 감소시킨다. 또한, 조기 임신 테스트는 수정 사이의 일수를 상당히 감소시킨다. 조기 임신 테스트를 사용한 발정 번식 전략은 수태 당 수정의 수를 감소시키는 것으로 나타났다.

실시예 4

농장용 테스트 구상: 소 임신 테스트 (띠)

[0135] 테스트 띠를 사용한 '농장용' 임신 테스트를 개발함에 있어서의 2D9 사용의 실행가능성을 평가하기 위하여, 추가적인 연구를 수행하였다. 상기 시험 띠는 가정용 임신 테스트에서 사용되는 동일한 기술인 측면 유동 기술을 사용하였다. 측면 유동 테스트 띠는 샘플 적용 단부에 콜로이드성 금과 접합된 항체, 및 띠 중간에 테스트 선으로서 위치하는 포획 항체를 가진다. 샘플에 테스트 항원 (PAG)이 존재하는 경우라면, 금 접합 항체가 항원에 결합하고, 생성되는 복합체는 테스트 선 쪽으로 이동할 것이다. 테스트 선에서는, 포획 항체 (역시 PAG에 대하여 야기된 것임)가 이와 같은 복합체에 결합함으로써, 선에 놓축시킬 것이다. 충분한 복합체가 테스트 선에 항체 샌드위치로서 유지되는 경우에는, 테스트 항원에 결합된 콜로이드성 금 표지화 항체로 인하여 눈에 보이는 자주색 선이 나타나게 된다. 40종을 초과하는 항체의 조합을 가지는 측면 유동 띠 (포획 항체로서 2D9 포함)를 제조하여 시험하였다. 시험된 측면 유동 띠 조합 중 아무것도 허용가능한 감도 및 특이성을 나타내지 않았다. 결과적으로, '농장용' 테스트를 개발하기 위하여, 다른 속성 진단 테스트 체재들을 평가하였다. 평가된 체재들 중, 내장 편을 가지는 플라스틱 튜브가 가능성 있는 결과를 나타내었다. 이때문에, 색상 테스트로서의 추가적인 최적화에는 튜브 체재가 선택되었다.

실시예 5

농장용 테스트 구상: 소 임신 테스트 (다중-웰 플레이트)

[0138] 추가 연구에서는, 28일차의 임신 확인된 소로부터 수집된 혈장 샘플을 사용하여 색상 테스트의 감도 및 특이성을 측정하였다. 색상 강도는 샘플 용액을 2D9로 코팅된 다중-웰 플레이트로 전달하는 것에 의해 측정하였다. 상기 플레이트를 플레이트 해독기 (캘리포니아 소재 스펙트라맥스, 몰레큘라 디바이스(SpectraMax, Molecular Devices), Inc. 사)에서 해독하였다. 혈장 패널은 20개의 임신 샘플 및 20개의 공백 (비-임신) 샘플로 구성되었다. 각 샘플을 2반복으로 분석하였다. 바탕 색상으로서 0.2 OD 단위 컷 오프를 사용하여 40개의 샘플로부터 수득된 색상 강도의 광학 밀도를 기준으로, 상기 시험은 100 %의 감도 및 100 %의 특이성을 나타내었다 (도 9).

실시예 6

농장용 테스트 구상: 소 색상 임신 테스트 (플라스틱 튜브)

[0141] 재료 및 방법. 하기의 프로토콜은 2D9-코팅된 플라스틱 튜브를 사용한 임신 테스트를 위한 최적화된 절차에 대

해 기술한다. 상기 테스트는 K3EDTA 혈액 수집튜브를 사용하여 수집된 전혈 샘플, 또는 혈장 샘플을 사용하여 수행될 수 있다.

[0142] 재료. 캘리포니아 로스 앤젤레스 소재 에버그린 사이언티픽 컴퍼니(Evergreen Scientific Company) 사로부터 내장 리브(rib)를 가지는 튜브 (#214-2131-010)를 구입하였다. PAG 단일클론 항체 2D9 및 토끼 다클론 항체를 단백질 G 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 제조자의 지침에 따라 로체(Roche) 바이오틴-표지화 키트 (#1-418-165, 인디아나 인디아나폴리스 소재 로체 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science) 사)를 사용하여 토끼 다클론 항체의 바이오틴-표지화를 수행하였다. 매사추세츠 콩코드 소재 리서치 디아그노스틱스(Research Diagnostics), Inc 사로부터 스트렙타비딘(Streptavidin)-PolyHRP20® (#RDI-PHRP20-SA)를 구입하였다. 슈어블루 리저브(Sure Blue Reserve)® (#53-00-03)는 메릴랜드 가이터스버그 소재 KPL, Inc 사로부터 입수하였다. 일리노이 록포드 소재 피어스 바이오텍(Pierce Biotech) 사로부터 TWEEN20®을 가지는 수퍼블록(SuperBlock) (# 37516)을 입수하였다. 알려져 있는 농도의 포스페이트 버퍼링된 식염수 (pH 7.4) 중 정제된 2D9 단일클론 항체; 코팅 버퍼: 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.3; 세척 버퍼: 0.05 % Tween20을 가지는 1× PBS; 희석 버퍼: 세척 버퍼 중 10 % 수퍼블록™.

[0143] 다클론 항체의 바이오틴-표지화. 키트 제조자 (로체 사)에 의해 권장되는 절차에 따라, 정제된 토끼 다클론 항체 (1 mg)를 바이오틴 표지화에 사용하였다. 간단하게, 1.5 ml 튜브 내에서, 7.6 μl의 활성화된 DMSO 중 바이오틴 시약을 1.0 ml의 PBS 용액 중 1 mg의 항체에 첨가하였다. 상기 튜브를 45 rpm으로 설정된 회전 진탕기에 실온에서 2시간 동안 위치시켰다. 이와 같은 단계 후, 내용물을 투석 슬라이드-A-라이저(slide-A-lyzer)™ (피어스 바이오텍 사, #63380)로 옮기고, 버퍼를 2회 교환하면서 4 °C에서 16시간 동안 1× PBS에 대하여 투석하였다. 슬라이드-A-라이저로부터 바이오틴 표지화된 IgG를 회수하여, PBS 중의 1 % BSA를 가지는 1:100 희석 모액으로서 저장하였다. 사용 전에 임신 테스트용 희석 퍼버를 사용하여 이 용액을 1:2000으로 희석하였다.

[0144] 튜브의 항체 코팅. 튜브를 코팅하기 위하여, 정제된 단일클론 항체 2D9를 0.1 M 탄산 나트륨 버퍼 (pH 9.3) 중에 1.25 μg/ml의 농도로 희석하였다. 코팅을 위하여, 0.4 ml의 탄산 나트륨 버퍼 중 0.5 μg의 항체를 사용하여 4 °C에서 16 내지 18시간 동안 튜브를 코팅하였다. 배양을 위하여, 견고하게 폐쇄된 기밀 뚜껑에 더하여 습도 용 습윤 종이 타월이 구비된 플라스틱 용기 내부에 튜브를 위치시키고, 4 °C에서 유지하였다. 배양 후, 항체 용액을 제거하고, 세척 버퍼를 사용하여 튜브를 2회 세척하였다. 다음에, 0.4 ml의 수퍼블록-TWEEN20을 사용하여 37 °C에서 1시간 동안 튜브를 블로킹하였다. 배양 후, 수퍼블록을 제거하고, 건조 챔버에 실온에서 2시간 동안 그것을 위치시킴으로써, 튜브를 건조하였다. 이와 같은 단계 후, 튜브를 밀봉하고, 사용시까지 무습 플라스틱 용기에서 4 °C로 저장하였다. 상기 코팅 튜브는 테스트 성능의 최소한의 손실로 6개월 동안 사용가능하였다.

[0145] 샘플 수집. 배란동기화(OvSynch)의 동기화 프로토콜을 사용하여 소를 동기화 발정 번식시켰다. 각 동기화 번식을 위하여, 대략 200 마리의 소를 사용하였다. 총 815 마리의 소를 인공 수정 (AI)에 의해 번식시켰으며, AI 당일은 0일차였다. 26일차 및 28일차 소로부터, 항응집제 K3EDTA (BD #366643)을 가지는 튜브에, 800 마리 소로부터의 혈액 샘플을 수집하여, 밤샘 수송에 의해 얼음 중에서 실험실로 수송하였다. 상기 혈액 샘플을 수령 시 바로 색상 테스트에 사용하였다. ~29일차에 초음파에 의해 소의 임신 상태를 점검하고, ~60일차에 직장 축진에 의해 재확인하였다. 연구 종료시에 가용하였던 797 마리 소의 임신 진단 데이터를 테스트 정밀도 분석에 사용하였다.

[0146] 색상 테스트 절차:

[0147] 용이한 샘플 이동을 촉진하기 위하여, 혈액 샘플을 10회 이하로 뒤집어 혼합하였다. 400 마이크로리터 (0.4 ml)의 혈액을 각 튜브로 이동시키고, 튜브를 37 °C 워터 배스에서 15분 동안 배양하였다. 이와 같은 배양 후, 혈액 샘플을 흡인하고, 튜브를 세척 버퍼 (0.05 % Tween20을 가지는 1× PBS)로 충전하였다. 상기 세척 버퍼를 흡인한 후, 세척 버퍼를 사용하여 튜브를 추가적으로 2회 세척하였다. 세 번째 세척 후, 0.4 ml의 희석 버퍼 (세척 버퍼 중 10 % 수퍼블록T20™) 중 1:2000 희석 바이오틴-표지화 항-PAG 다클론 항체를 각 튜브에 첨가하고, 워터 배스에서 37 °C로 15분 동안 배양하였다. 배양 후, 튜브를 흡인하고, 세척 버퍼로 2회 세척하였다. 다음에, 0.4 ml의 희석 버퍼 중 스트렙타비딘-PolyHRP20 (1:30,000)을 각 튜브에 첨가하고, 워터 배스에서 37 °C로 15분 동안 배양하였다. 세 번째 배양 후, 각 튜브의 내용물을 흡인하고, 튜브를 세척 버퍼로 2회 세척하였다. 다음에, 0.4 ml의 HRP 기질인 슈어블루리저브™를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 배양하였다. 배양 후, 임신한 소로부터 샘플을 수령한 튜브에서 짙은 청색 색상이 관찰되었다 (도 10). 비-임신 동물로부터 샘플을 수령한 튜브는 투명하게 유지되었다 (도 10). 색상은 시각적으로도 해독되어 임신 상태를 암시할 수 있

었다. 그러나, 실험실에서 색상을 정량하기 위하여, 동일 부피 (0.4 ml)의 중지 용액 (1 N HCl)을 각 투브에 첨가하여 청색 색상을 황색으로 전환시켰다. 다음에, 각 샘플로부터의 분취량 (0.2 ml)을 ELISA 플레이트로 이동시키고, 430 nm에서 광학 밀도를 기록하였다. 0.2 이상의 OD 값을 '임신'으로 간주하였으며, 그 미만의 값은 '공백'으로 간주하였다. 앞서 혈장 테스트 패널 샘플에서 확립되었던 0.2 OD의 색상 강도 컷 오프가 임신 진단에 사용되었다.

[0148] 하기는 투브 테스트 절차를 위한 단계들의 간략한 요약이다:

[0149] 1. 400 μl의 샘플 첨가, 37 °C에서 15분

[0150] 2. 혈액의 경우 3×, 혈장의 경우 2× 세척

[0151] 3. 400 μl의 바이오틴 표지 첨가, 37 °C에서 15분

[0152] 4. 2× 세척

[0153] 5. 400 μl의 Poly-HRP20 첨가, 37 °C에서 15분

[0154] 6. 2× 세척

[0155] 7. 400 μl의 슈어블루 리저브™ 첨가

[0156] 8. 해독 - 5분 - 15분 (청색 = 임신; 투명 = 공백 (비임신))

테스트 분석 파라미터들의 정의:

[0158] **감도:** 임신중인 소를 임신으로 확인하는 혈액 테스트의 능력.

[0159] **특이성:** 공백중인 (비-임신) 소를 공백중인 소로 확인하는 혈액 테스트의 능력.

[0160] **색상 테스트의 장점:** 테스트 공급품에는 혈액 수집을 위한 자주색 캡의 혈액 투브 (K_2EDTA 를 가지는 3.0 ml), 사전-코팅된 투브, 시약, 분출 병, 및 이동용 피펫이 포함된다. 37 °C 배양기/비등수탱크/블록을 필요로 한다. 플레이트 ELISA와는 달리, 이와 같은 테스트는 전혈이 직접 테스트에 사용될 수 있기 때문에, 혈장을 분리하기 위한 원심분리를 필요로 하지 않는다. 상기 테스트는 또한 플레이트 진탕기와 같은 장비, 세척 (플레이트 세척기) 또는 해독 (플레이트 해독기)을 위한 장비를 필요로 하지 않는다. 세척은 분출 병을 사용하여 수행될 수 있으며, 이동용 피펫은 세척 사이의 세척 버퍼 용액의 제거에 사용된다. 색상은 시각적으로 해독될 수 있다. 그러나, 실험실에서는, 색상 시험 종료시에 (단계 8 후), 0.4 ml의 중지 용액인 1 N HCl이 모든 투브에 첨가되고, 분취량 (0.2 ml)이 ELISA 플레이트로 이동된 후, 플레이트 해독기에서 색상 강도가 기록된다. 총 분석 시간은 통상적인 플레이트 ELISA (4시간)과 비견되는 대략 2시간이다. 이와 같은 색상 분석은 임의로 96-웰, 48-웰 또는 24-웰 플레이트를 사용하는 것과 같이 다중화될 수 있다.

[0161] **결과:** 28일차 혈장 테스트 패널을 사용한 색상 시험의 결과 (20개의 공백 샘플 및 20개의 임신 샘플)를 도 11a에 나타내었으며, 55일차 혈장 테스트 패널을 사용한 시험의 결과 (20개의 공백 샘플 및 20개의 임신 샘플)를 도 11b에 나타내었다. 모든 공백 샘플들은 ≤ 0.2 OD의 색상 강도 값을 가지는 반면, 임신 샘플들은 > 0.2 OD의 색상 강도를 나타내었다. 이와 같은 컷-오프 값을 사용할 때, 양 테스트 패널 (도 11a 및 11b)은 > 95 %의 감도 및 특이성을 나타내었다. 일 세트의 새로운 혈장 샘플들을 역시 이와 같은 시스템으로 테스트하였는데, 공백 소와 임신 소의 명백한 분리를 제공하는 것으로 나타났다 (도 12).

실시예 7

농장용 테스트 구상: 소 색상 임신 테스트 (플라스틱 투브)

[0164] 추가적인 장비 없이 37 °C의 워터 배스를 사용하여 기술되는 바와 같이 '농장용으로' 테스트를 수행하였다. 이와 같은 포장 테스트에서는, 58개의 혈액 샘플을 테스트하였다. 0.4 ml의 혈액 샘플을 사용하여 색상 테스트를 수행하고 (도 13), 초음파에 의해 임신 확인을 수행하였다 (도 14). 3 명의 요원이 색상을 해독하였는데, 테스트 결과의 시각적 채점에 불일치는 존재하지 않았다. 상기 색상 테스트는 14 마리의 임신한 소 모두를 확인할 수 있었다. 2개의 샘플에 대하여 3 명의 요원 모두가 '결론불가'로 채점하였는데, 청색의 바탕으로 인한 것이었으며, 상기 샘플들은 '공백'인 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 포장 테스트는 초음파에 비교할 때 100 %의 감도 및 92.5 %의 특이성 (37/40)을 나타내었다.

실시예 8

[0166] 샌드위치 면역분석-기반 색상 임신 테스트 (플라스틱 튜브)

[0167] 재료 및 방법. 포획 항체로서 PAG 단일클론 항체 2D9를, 그리고 제2 항체로서 바이오틴-표지화 토끼 다클론 항체를 사용함으로써, 샌드위치 면역분석 기반의 테스트를 개발하였다. PAG 단일클론 항체를 투명 플라스틱 튜브 또는 웰의 내부에 코팅하여 트랩(trap)으로 사용하였다. 사용되는 상기 튜브는 항체 코팅을 위한 표면적을 증가시키기 위하여 리브가 내장된 튜브 (캘리포니아 로스 앤젤레스 소재 에버그린 사이언티픽 사)였다. 복합체는 스트렙타비딘-HRP (양고추냉이 페옥시다제)/HRP 기질 시스템을 사용하여 검출하였다. 스트렙타비딘 Poly-HRP20은 매사추세츠 콩코드 소재 리서치 디아그노스틱스, Inc. 사로부터 입수하였으며, 양고추냉이 페옥시다제는 메릴랜드 가이터스버그 소재 KPL, Inc 사로부터 입수하였다. 복합체의 검출이 튜브 또는 웰의 색상 (청색 또는 황색)으로 표시됨으로써, 샘플 중 PAG의 존재를 나타내었다. 임신한 소 및 암소의 혈청에서의 PAG의 검출을 위한 ELISA의 일반적인 확립에 관한 정보는 문헌 [Green et al., 2005]에서 찾을 수 있다. 분석 표준은 0.5 ng 내지 6.0 ng이었다. 상기 테스트는 완료까지 약 4시간이 소요되었다.

[0168] 상기 테스트는 간단한 실험실 공급품을 사용하여 농장 또는 유사한 장소에서 수행될 수 있다. 본 실시예에서는, 37 °C 배양기 및 페펫이 시약 공급품 이외에 요구되는 유일한 구성요소이다. 상기 색상 테스트 구상은 축우용 번식 관리 도구의 일부로서 배란동기화, 재동기화 및 정기 인공 수정(Timed Artificial Insemination) (TAI)와 조합될 수 있다. 상기 테스트 구상은 또한 진단의 정밀도를 증가시키기 위하여, 또는 26 일차 이전으로 임신 검출을 앞당기기 위하여 다른 분석물 예컨대 프로게스테론 및 기타 임신 항원으로 연장될 수 있다. 다중화는 예를 들면 96-웰 또는 48-웰 트레이를 사용함으로써, 또는 다중 튜브를 사용함으로써, 수행될 수 있다.

표 2

분석 시약, 공급품 및 공급자 정보			
항목	분석 시약/공급품	목적	공급자 정보
1	2D9 단일클론 항체	항체 코팅	
2	토끼 다클론 항체	바이오틴-표지화 제2 항체	
3	스트렙타비딘-폴리 양고추냉이 페옥시다제 (HRP)20	신호 증폭	매사추세츠 콩코드 소재 리서치 디아그노스틱스 인크. 사
4	슈어 블루 리저브™	HRP용 색상 기질	메릴랜드 가이터스버그 소재 KPL, 인크. 사
5	수퍼 블록	블로킹 버퍼, 세척 버퍼 및 희석 버퍼에 사용	일리노이 록포드 소재 피어스 바이오테크놀로지 인크. 사
6	리브가 내장된 튜브, 12×75 mm 튜브, 6개의 저부 리브를 가지는 폴리스티렌	테스트에 사용되는 튜브	캘리포니아 로스 앤젤레스 소재 에버그린 사이언티픽 사
7	포스페이트 버퍼링된 염수	바이오틴-IgG, HRP 시약의 코팅, 블로킹, 세척 & 희석을 위한 버퍼 매체	로체 사
8	바이오틴 표지화 키트 (5 반응) 및 투석 키트, 슬라이드-A-라이저™	바이오틴-표지화 IgG의 제조	로체 사
9	Tween20	0.05 % 농도에서 바이오틴-IgG, HRP 시약의 코팅, 블로킹, 세척 & 희석을 위한 버퍼에 사용되는 계면활성제	미주리 세인트 루이스 소재 시그마 알드리치 사
10	탄산 나트륨	항체 코팅 버퍼	미주리 세인트 루이스 소재 시그마 알드리치 사

[0170] 결과 26일차 및 28일차 동물로부터 수집된 797개 혈액 샘플의 임신 테스트를 29일차 초음파 및 60일차 직장 촉진 결과에 비교함으로써, 감도 및 특이성에 대하여 평가하였다. 혈장 샘플을 수득하였다. 임신 진단의 컷-오프는 0.2 OD 단위였다. 표 3은 29일차 초음파 기반 임신 진단 및 60일차 직장 촉진에 비교한 혈액 테스트의 정밀도를 나타낸다.

표 3

29일차 초음파 (US) 및 60일차 직장 촉진에 비교한 혈액 테스트 정밀도의 분석

혈액 테스트 일자	26일차		28일차	
시험된 소의 수	357	357	797	797
임신 점검	29일차 US	60일차 촉진	29일차 US	60일차 촉진
감도	97.4%	97.5%	99.3%	99.3%
특이성	90.1%	91.2%	90.9%	91.2%

[0171]

[0172] 이러한 결과는 PAG 단일클론 항체 2D9를 사용하여 개발된 소 임신 테스트가 낮은 가-음성 결과와 함께 상업적으로 허용가능한 정밀도를 제공한다는 것을 나타낸다. 이와 같은 항체는 높은 감도 및 특이성을 가지는, 번식 후 26일차 정도로 조기에 소의 임신 상태를 검출하기 위한 속성 테스트 체재를 개발하는 데에 적용될 수 있다. 추가적인 분석은 컷-오프 값을 0.35 OD 단위로 조정하는 것에 의해 테스트 정밀도가 99 %의 감도 및 94 %의 특이성까지 향상될 수 있다는 것을 보여주었다.

[0173] 실시예 9

[0174] 소 임신 테스트를 개발하는 데에 적합한 초기 PAG 단백질 하위군의 단리

[0175] 조직 수집. 수정 후 50 내지 60일의 초기 임신 소로부터 태아 태반엽 조직을 수집하였다. 임신 50 내지 60일 차는 임신 중 바람직한 기간인데, 이와 같은 임신 단계 또는 그 부근에서는 초기 PAG 단백질의 하위군이 총 PAG 단백질의 높은 %를 나타내기 때문이다. 그러나, 수정 후 약 50일 내지 60일 또는 그 부근에서는 바람직한 초기 PAG 단백질의 %는 높기는 하지만, 총 단백질 및 가용한 조직의 양이 적다. 수정 후 약 61 내지 250일 또는 그 부근에서는, 총 PAG 단백질, 및 태아 태반엽 및 소구 조직의 양이 훨씬 더 많다.

[0176] 2D9에 결합하는 단백질을 확인하고, 2D9에 대한 PAG의 결합 부위를 지도화하기 위하여 사용될 수 있는 방법. 2D9에 결합하는 단백질의 확인하고, 2D9 항체를 특성화 및 서열분석하며, 2D9에 대한 PAG의 결합 부위를 지도화하기 위하여 사용될 수 있는 4가지 접근법이 존재한다. 하기의 연구를 수행하였다:

[0177] 1. 2D9-코팅된 자석 비드를 사용한 PAG (55일차 태반으로부터 수득)의 면역침전. 정제된 2D9를 제조자의 지침 (디날 사)에 따라 토실-활성화 디날 자석 비드에 결합시켰다. 항체 코팅된 자석 비드를 1× PBS 중에서 30분 동안 100 마이크로그램의 PAG 강화 조제물을 사용하여 배양한 후, 동일한 버퍼로 광범위하게 세척하였다. pH 3.0의 아세트산을 사용함으로써 결합된 단백질을 용리하고, 겔 및 웨스턴 블럿 분석에 적용하였다. 웨스턴 블렛은 토키 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개하였다. SDS-PAGE로부터 면역-반응성 단백질 밴드를 절단하여, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용하였다.

[0178] 하기의 방법은 대안적인 면역침전 방법으로서, 하기와 같이 수행될 수 있다:

[0179] 2. 2D9-코팅된 자석 비드를 사용한 PAG (61 내지 250일차 태반으로부터 수득)의 면역침전. 정제된 2D9는 제조자의 지침 (디날 사)에 따라 토실-활성화 디날 자석 비드에 결합될 수 있다. 항체 코팅된 자석 비드는 1× PBS 중에서 30분 동안 100 마이크로그램의 PAG 조제물을 사용하여 배양된 후, 동일한 버퍼로 광범위하게 세척될 수 있다. pH 3.0의 아세트산을 사용함으로써 결합된 단백질이 용리되고, 겔 및 웨스턴 블럿 분석에 적용될 수 있다. 웨스턴 블렛은 토키 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개될 수 있다. 다음에, SDS-PAGE로부터 면역-반응성 단백질 밴드가 절단되어, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용될 수 있다. 이와 같은 절차를 사용하여, 초

기 PAG 단백질의 하위군 (특히 PAG 4, 6, 9, 20 및 21)의 고도로 정제된 조제물이 정제될 수 있다.

[0180] 하기의 연구를 수행하였다:

3. 소 임신 55일차로부터의, 소구 (자궁내막) 및 태반엽 (태반) 조직으로부터 제조된 조직 추출물의 면역-친화성 크로마토그래피. 간단하게, 정제된 2D9 (10 mg)를 제조자의 지침 (세인트루이스 소재 시그마 사)에 따라 1 그램의 CNBr-활성화된 세파로스에 결합시켰다. 결합을 위하여, 상기 2D9-친화성 수지 (대략 5.0 ml)를 25 ml의 조직 추출물과 함께 pH 7.0에서 밤새 배양하였다. 다음날, 상기 수지를 컬럼에 충진하고, 1× PBS로 세척하여 비결합 물질을 제거한 후, pH 3.0의 아세트산으로 용리하였다. 용리 직후, 1 M 트리스를 사용하여 용리된 물질의 pH를 pH 7.0으로 중화하였다. 용리된 물질을 겔 및 웨스턴 븍릿 분석에 적용하였다. 웨스턴 븍릿은 토끼 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개하였다. SDS-PAGE로부터 단백질 밴드 1 내지 7을 절단하여, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용하였다. 웨프티드 서열의 확인은 BLAST 분석을 사용함으로써 측정하였다.

하기는 대안적인 크로마토그래피 절차로서, 하기와 같이 수행될 수 있다:

4. 소 임신 61 내지 250일차로부터의, 소구 (자궁내막) 및 태반엽 (태반) 조직으로부터 제조된 조직 추출물의 면역-친화성 크로마토그래피. 간단하게, 정제된 2D9 (10 mg)는 제조자의 지침 (세인트루이스 소재 시그마 사)에 따라 1 그램의 CNBr-활성화된 세파로스에 결합될 수 있다. 결합을 위하여, 상기 2D9-친화성 수지 (대략 5.0 ml)는 25 ml의 조직 추출물과 함께 pH 7.0에서 밤새 배양될 수 있다. 다음날, 상기 수지가 컬럼에 충진되고, 1 × PBS로 세척되어 비결합 물질이 제거된 후, pH 3.0의 아세트산으로 용리될 수 있다. 용리 직후, 1 M 트리스를 사용하여 용리된 물질의 pH가 pH 7.0으로 중화될 수 있다. 용리된 물질이 겔 및 웨스턴 븍릿 분석에 적용될 수 있다. 웨스턴 븍릿은 토끼 항-PAG 다클론 항체를 사용하여 전개될 수 있다. SDS-PAGE로부터 단백질 밴드 1 내지 7이 절단되어, 트립신 분해 후 LC-MS-MS 분석에 적용될 수 있다. 다음에, 웨프티드 서열의 확인은 BLAST 분석을 사용함으로써 측정될 수 있다. 이와 같은 절차를 사용하여, 초기 PAG 단백질의 하위군 (특히 PAG 4, 6, 9, 20 및 21)의 고도로 정제된 조제물이 정제될 수 있다.

실시예 10

추가적인 2D9 결합 PAG의 확인

실시예 1에 요약되어 있는 바와 같이, MAb 2D9가 5종의 PAG 동형 (4, 6, 9, 20 및 21)을 인식하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 동형들은 번식 55일 후에 수확된 태반 조직으로부터 수득된 정제 PAG 샘플의 LC/MS/MS 웨프티드 서열분석에 의해 확인하였다. CNBr-활성화 수지에 항체를 결합시켜 면역-친화성 컬럼을 생성시키는 것에 의한 PAG의 정제 및 확인을 위하여, MAb 2D9를 추가적으로 이용하였다. 정제된 샘플 중에 존재하는 PAG는 2D9에 의해 결합 (인식)될 수 있다. 유사한 방식으로, PAG ELISA에서의 소 전혈 또는 혈장 샘플 중에 존재하는 PAG는 2D9에 의해 결합되어 양성 ELISA 응답을 도출함으로써, 임신을 표시할 수 있다. 면역-정제 절차 동안의 정제된 PAG의 용리는 3.0 내지 2.5의 pH를 용리액 수집 동안 즉각적인 중화에 의해 pH 7.0으로 조정하는 것에 의해 변형되었다. 상기한 바와 같이 (예컨대 실시예 1), 필수적으로 정제된 샘플을 사용한 SDS-PAGE에 의한 정제 PAG의 가시화를 수행하였다. 50 및 75 kDa 사이에 3개의 주 밴드를 가지는 유사한 밴드화 패턴이 관찰되었다.

[0187] 번식 55일 후의 소로부터 수확된 태반 조직 이외에도, 번식 215일 후의 소로부터 수확된 태반 조직으로부터도 PAG를 정제하였다. PAG 단백질 족 (동형)의 소정 구성원은 다른 것에 비해 더 임신 초기에 발현된다. 더 임신 초기에 발현되는 일련의 PAG들은 공통적으로 초기 PAG로 지칭되며, 더 늦은 임신 기간에 발현되는 일련의 PAG들은 공통적으로 만기(late) PAG로 지칭된다. 번식 55일 후로부터의 태반 조직은 초기 PAG를 발현하는 임신 단계의 대표적인 것인 반면, 번식 215일 후로부터의 태반 조직은 만기 PAG 발현을 포함하는 임신 단계의 대표적인 것이다. 55일차 및 215일차 태반 조직으로부터의 SDS-PAGE에 의한 정제 PAG의 가시화는 양자에 대하여 50 및 75 kDa 사이에 동일한 3개의 밴드를 나타내었으나, 더 고분자량 밴드의 비율 (강도)가 215일차 태반 조직에서 더 컸다.

[0188] 2D9 면역친화성 컬럼을 사용하여 55일차 및 215일차 태반 조직 모두로부터의 PAG 샘플 중 웨프티드를 정제한 후, LC/MS/MS 웨프티드 서열분석에 의해 분석하여 샘플 중에 존재하는 PAG 동형(들)을 확인하였다. 웨프티드 서열은 표 4에 열거되어 있는 바와 같은 유니프로트(UniProt) 데이터베이스 (www.uniprot.org)로부터 입수되는 PAG 동형 서열과 비교하였다. 표 5는 웨프티드 서열 결과의 요약, 및 BLAST 분석에 의한 boPAG-16, boPAG-17, 및 boPAG-19 서열에 상응하는 PAG로서의 그의 확인을 나타낸다. 표 5에서 언급되는 "레인" 및 "밴드" (저부, 중간)는 도 17에 나타내었다. 정제된 PAG 샘플에서 특성화된 PAG 동형의 요약을 표 6에 나타내었다.

표 4

유니프로트 접근 번호에 따른 PAG 동형들 (SEQ ID NO:51-62)

PAG 동형	접근 번호
1	Q29432
4	O46492
6	O46494, A5PJW4
9	O46497, A4FV16
16	Q9TTV8
17	Q9TTV7, A7MBA4
19	Q9TTV5
20	Q9TTV4
21	Q9TTV3

[0189]

표 5

펩티드 서열 결과의 요약 (SEQ ID NO:63-74 포함).
 "MH+" = 펩티드 질량 대 전하 더하기 몫; "전하" = 이온 전하 상태;
 "P(pep)" = 펩티드 서열의 가능성; "개시" = 펩티드를 구성하는 단백질의 개시 아미노산;
 "종료" = 펩티드를 구성하는 단백질의 중지 아미노산.

단백질 밴드 번호: 밴드 레인 2 (저부), 레인 3 (중간), 레인 6 (중간), 레인 7 (중간 및 저부)에 존재
보스 타우루스 (gi 75074836) 임신-관련 당단백질 16
MH+ 전하 개시 종료 P(pep) 펩티드 서열

[0190]

1389.65796	2	215	229	2.54E-05	REGSVVMFGGVVDHRY (SEQ ID NO:63)
1046.53052	2	361	370	6.28E-04	RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:64)
1770.90613	2	197	212	7.51E-06	NQGAISDPIFAFYLSK (SEQ ID NO:65)

단백질 밴드 번호: 밴드 레인 2 (저부), 레인 3 (저부), 레인 4 (저부), 레인 5 (저부), 레인 6 (저부), 레인 7 (저부)에 존재
보스 타우루스 (gi 75074835) 임신-관련 당단백질 17
MH+ 전하 개시 종료 P(pep) 펩티드 서열
1389.65796 2 215 229 2.54E-05 REGSVVMFGGVVDHRY (SEQ ID NO:66)
1035.58337 2 138 148 1.69E-05 KGLLVYDTRI (SEQ ID NO:67)
1046.53052 2 361 370 6.28E-04 RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:68)
1771.89014 2 196 213 7.53E-07 KNEGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:69)

단백질 밴드 번호: 밴드 레인 3 (중간), 레인 4 (중간), 레인 5 (중간), 레인 6 (중간)에 존재
보스 타우루스 (gi 75051662) 임신-관련 당단백질 19
MH+ 전하 개시 종료 P(pep) 펩티드 서열
1760.83850 3 212 229 1.00E-06 KDKQEGRSVMFGGVVDHRY (SEQ ID NO:70)
1088.53711 2 126 137 4.36E-06 KTFSITYGSGRI (SEQ ID NO:71)
2243.06616 3 213 231 1.32E-03 DKQEGSVMFGGVVDHRYR (SEQ ID NO:72)
1046.53052 2 361 370 9.55E-04 RLYFSVFDRG (SEQ ID NO:73)
1770.90613 2 196 213 6.03E-09 KNQGAISEPVFAFYLSKD (SEQ ID NO:74)

[0191]

표 6

55일차 및 215일차 태반 조직에서 특성화된 PAG 동형

55일차 조직 유형	PAG 동형	215일차 조직 유형	PAG 동형
소구	4, 6, 9, 16, 17, 21	소구	4, 6, 9, 17, 19, 21
태반엽	4, 6, 9, 16, 17, 19, 21	태반엽	4, 6, 9, 16, 17, 19, 21
소구/태반엽	4, 6, 9, 17, 19	소구/태반엽	4, 6, 9, 16, 17, 21

[0192]

표 4에 나타낸 폴리펩티드 서열은 예컨대 PHYLIP 패키지 (문헌 [Felsenstein, 1989])로부터의 PROTDIST v.

3.5c를 사용하여 정렬하였다. 정렬된 서열에 대하여 PROTDIST의 인접 계통수 분석 패키지를 사용하여, 도 15에 나타낸 계통수를 생성시켰다. PAG의 정렬은 도 16에 나타내었다. 이와 같은 PAG 동형 1, 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20, 및 21의 분석은 그의 유사성 및 차이의 영역을 기준으로 동형들의 관계성을 가시화하기 위하여 수행되었다. 분석에 따르면, PAG 4, 6, 9, 16, 17, 19, 20, 및 21은 PAG1으로부터 떨어져 함께 군집을 이룬다.

[0194] 본원에서 개시되고 청구되는 모든 조성물 및 방법은 과도한 실험 없이도 본 개시내용에 비추어 제조 및 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 견지에서 기술되었다 할지라도, 업계 숙련자라면, 본 발명의 개념, 기술사상 및 영역에서 벗어나지 않고도 본원에서 기술되는 조성물, 그리고 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형이 적용될 수 있다는 것을 잘 알고 있을 것이다. 더 구체적으로, 화학적 및 생리학적인 것 모두로 관련되어 있는 소정의 제제가 본원에서 기술되는 제제를 대체하면서도 동일하거나 유사한 결과를 달성하게 될 수 있다는 것은 명백할 것이다. 업계 숙련자에게 명백한 그와 같은 모든 유사한 대체 및 변형들은 첨부된 청구항에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 기술사상, 영역 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

[참조문헌]

[0196] 하기의 참조문헌들은, 그것이 본원에서 제시되는 것들을 보완하는 대표적인 절차 또는 기타 세부사항을 제공한다는 점에서, 구체적으로 본원에 참조로써 개재된다.

- U.S. Patent 3,646,346
- U.S. Patent 3,817,837
- U.S. Patent 3,850,752
- U.S. Patent 3,939,350
- U.S. Patent 3,996,345
- U.S. Patent 4,275,149
- U.S. Patent 4,277,437
- U.S. Patent 4,366,241
- U.S. Patent 4,367,110
- U.S. Patent 4,376,110
- U.S. Patent 4,452,901
- U.S. Patent 4,668,621
- U.S. Patent 4,699,880
- U.S. Patent 5,721,105
- U.S. Patent 6,869,770
- U.S. Patent Publn. 2003/508381
- U.S. Patent Pubn. 20050100975
- Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.
- Allred *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(149), 1990.
- Atkinson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268(35):26679-26685, 1993.
- Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994; 1992.
- Beal *et al.*, *J. Anim. Sci.*, 70:924-929, 1992.
- Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Smith (Ed.), Academic Press, NY, 1993.

[0197]

- Boulianne *et al.*, *Nature*, 312:643-646, 1984.
- Brown *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16: 192(#191), 1990.
- Butler *et al.*, *Biol. Reprod.*, 26:925-933, 1982.
- Cabilly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3273-3277, 1984.
- Cameron and Malmo, *Austr. Vet. J.*, 70:109-111, 1993.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Chardes *et al.*, *FEBS Lett.*, 452(3):386-394, 1999.
- Colligan *et al.*, In: *Current Protocols in Immunology*, Greene Publ. Assoc. Wiley Interscien, NY, 1993.
- Computational Molecular Biology, Lesk (Ed.), Oxford University Press, NY, 1988.
- Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin and Griffin (Eds.), Humana Press, NJ, 1994.
- Cumber *et al.*, *J. Immunology*, 149B:120-126, 1992.
- Engvall, *Lancet*, 2(8000):1410, 1976.
- Engvall, *Med Biol.*, 55(4):193-200, 1977.
- Engvall, *Methods Enzymol.*, 70(A):419-39, 1980.
- Felsenstein, *Cladistics* 5:164–166, 1989.
- Green *et al.*, *Theriogenology*, 63(5):1481-1503, 2005.
- Green *et al.*, *Biol Reprod* 62:1624-1631, 2000.
- Green *et al.*, *Biol Reprod* 60:1069-1077, 1999.
- Gripenberg *et al.*, *Scand J Immunol.*, 7(2):151-7, 1978.
- Guruprasad *et al.*, *Protein Eng* 9:849-856, 1996.
- Hall, *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.
- Harlow and Lane, In: *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 139-281, 1988.
- Hatzidakis *et al.*, *J. Reprod. Fertil.*, 98:235-240, 1993.
- Higgins and Sharp CABIOS. 5:151-153 (1989)
- Holdsworth *et al.*, *J. Endocrin.*, 95:7-12, 1982.
- Hughes *et al.*, *Mol Biol Evol*. 20:1940-1945, 2003.
- Humblot *et al.*, *Theriogenol.*, 30:257-268, 1988.

[0198]

- Kiracofe *et al.*, *J. Anim. Sci.*, 71:2199-2205, 1993.
 Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
 Leibiger *et al.*, *Biochem J.*, 338:529-538, 1999.
 Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.
 Makler *et al.*, *Transfusion*, 21(3):303-312, 1981.
 Markusfeld *et al.*, *Br. Vet. J.*, 146: 504-508, 1990.
 Mialon *et al.*, *Reprod. Nutr. Dev.*, 33:269-282, 1993.
 Mialon *et al.*, *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:65-72, 1994.
 Mo *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23:2503-2510, 1993.
 Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir *et al.* (Eds.), 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
 Neuberger *et al.*, *Nature*, 314:268-270, 1985.
 Oltenacu *et al.*, *J. Dairy Sci.*, 73:2826-2831, 1990.
 Pack *et al.*, *Biochem.*, 31:1579-1584, 1992.
 PCT Appln. WO 98/16832
 Sarngadharan *et al.*, *Princess Takamatsu Symp.*, 15:301-8, 1984.
 Sasser *et al.*, *Biol. Reprod.*, 35:936-942, 1986.
 Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje (Ed.), Academic Press, 1987.
 Sequence Analysis Primer, Gribskov and Devereux (Eds.), Stockton Press, NY, 1991.
 Szafranska *et al.*, *Biol. Reprod.*, 53:21-28, 1995.
 Wagner *et al.*, *Science*, 260(5113):1510-1513, 1993
 Warnick *et al.*, *Theriogenol.*, 44:811-825, 1995.
 Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 51:1145-1153, 1994.
 Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 54: 122-129, 1996.
 Xie *et al.*, *Biol. Reprod.*, 57:1384-1393, 1997.
 Xie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10247-10251, 1991.
 Xie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12809-12816, 1997.
 Zoli *et al.*, *Biol. Reprod.*, 45:1-10, 1991.
 Zoli *et al.*, *Biol. Reprod.*, 46:83-92, 1992.

[0199]

수탁번호

[0200]

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-8566

수탁일자 : 20070802

도면

도면1

>2D9 경사슬

```
CGGTTCTGCCTCAGCAGTGATGTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCGTCAGTCTT
GGAGATCAAGCCTCCATTCTTGAGATCTAGGCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTAG
AATGGTTCTGCAGAAACCAGGCCAGTCCTCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTTCCTGG
GGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
GAGGATCTGGAGTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCCTCACGTTGGTGTGGACCAAGC
TGGAGCTGAAACGGGCTGATCTGCACCAACTGTATCCATTTCCCACCATCCAGTGAGCACTTAACATC
TGGAGCTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCACTCCAAAGACATCAATGTCACTGGAAGATT
GATGGCAGTGAACGACAAATGCCGTCTAACAGTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA
GCATGAGCACCACCCATTACGTTGACCAAGGAGACTGAACACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCAC
TCACAAGACATCTACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGACACAAAGGTCTGA
```

도면2

>2D9 종사슬

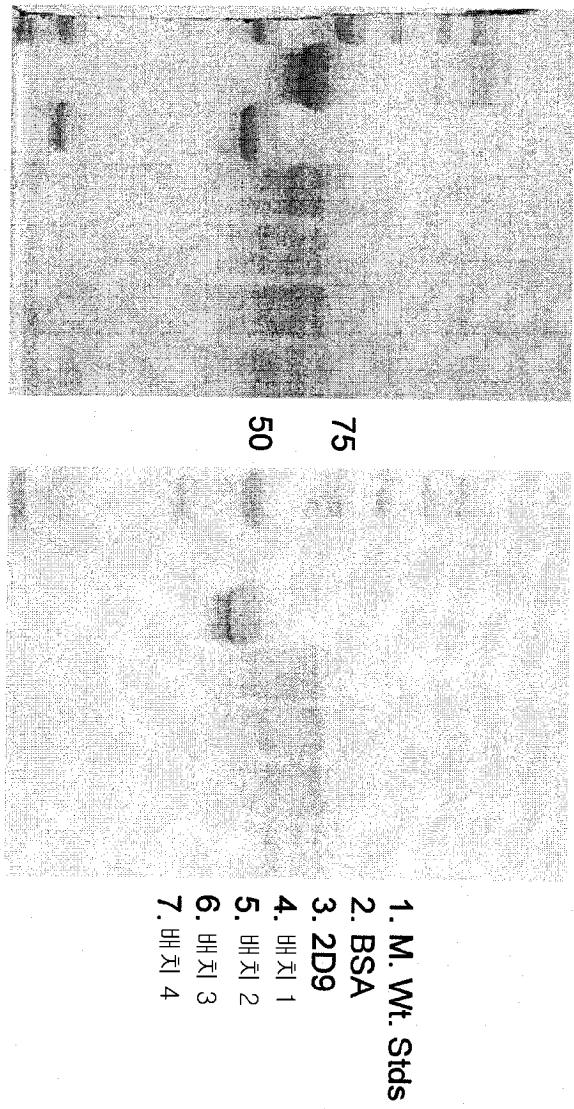
GCTACAGGTGTCACCTCCAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGCCTCAG
 TGAAGATACTCTGCAAGGCTACTGGCTACATATTAGCTAACTACTGGATGGACTGGTAAAGCAGAGGCC
 TGGACATGGCCTTGACTGGATTGGAGAGATTTACCTGGAAGTGATATTACTAACTACAATGAGAAGTCA
 AAGGACAAGGCCACATTCACTGCAGATTCACTCCTAACACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACAT
 CTGAGGACTCTGCCCTCTATTACTGTCCAAGAGCTGGAGTGTTACTACGGGTATATTACTATGCTAT
 GGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCCAAAACGACCCCCATCTGTCTATCCA
 CTGGCCCTGGAATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGTCACCTGGATGGCTGGTCAAGGGCTATTCC
 CTGAGGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCAGCGGTGTCACACCTTCCAGCTCT
 GCAGTCTGACCTCACACTCTGAGCACCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCAGCAGCACCAAGGTGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTT
 GTAAGCCTTGATATGTAAGTGCTCCAGAAGTATCATCTCTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGT
 GCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTGACGTGTTGAGCATCAGCAAGGATGATCCCAGGGTCA
 CAGTCAGCTGGTTGAGATGATGTTGAGGTGACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCACTTC
 ACACCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCCACAGGACTGGCTCAATGCCAAGGAGTTCAA
 ATGCCAGGGTCAACAGTGAGCTTCCCTGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAACCAAGGCCAGACCG
 AAGGCTCCACAGGTGACACCATTCCACCTCCAAAGGACAGATGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCT
 GCATGATAACAGACTCTCCCTGAAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGCAGCCAGGGAGAA
 CTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTTACTCGTCTACCCAACCTCAATGTGCA
 AACAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTCACCTGCTCTGTTACATGAGGGCTGACAACCCACATA
 CTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCTGGTAATGATCCAAAGTCCTGGAGGCCCTCTGGCCTACAGGA
 CTACTCCAGGTGTCACCTCCCTCAAACA

도면3a

2D9 결합 PAG 헝원 LC-MS-MS 분석의 확인

보스 타우루스 (NM176617) 임신-관련 당단백질 6		Mr (예산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
MZ	전하					
853.4334	2	1686.865	147	162	94.87%	IGDLVSTDQPFGLCLK (SEQ ID No:7)
615.2964	2	1210.602	183	193	95.45%	TFSGAAPPFDK (SEQ ID No:8)
886.4468	2	1752.872	196	211	98.95%	NEGAISEPVAFAVLSK (SEQ ID No:9)
592.9523	3	1757.815	212	227	89.57%	DKQEGSWMFGWDHR (SEQ ID No:10)
767.3938	3	2281.195	266	287	90.78%	ALVDITGSDWGPSTLVNNWK (SEQ ID No:11)
467.2134	2	914.4286	362	368	99%	YFSVFDR (SEQ ID No:12)
2D9 결합 PAG 헝원		Mr (예산치)	개시	종료	점수	펩티드 서열
MZ	전하					
881.9511	2	1743.886	147	162	99.00%	IGDVSTDQPFGLCLK (SEQ ID No:13)
615.311	2	1210.602	183	193	99.00%	TFSGAAPPFDK (SEQ ID No:14)
886.4475	2	1752.872	196	211	99.00%	NEGAISEPVAFAVLSK (SEQ ID No:15)
592.966	3	1757.815	212	227	95.84%	DKQEGSWMFGWDHR (SEQ ID No:16)
767.404	3	2281.195	266	287	97.54%	ALVDITGSDWGPSTLVNNWK (SEQ ID No:17)
467.235	2	914.4286	362	368	84.44%	YFSVFDR (SEQ ID No:18)

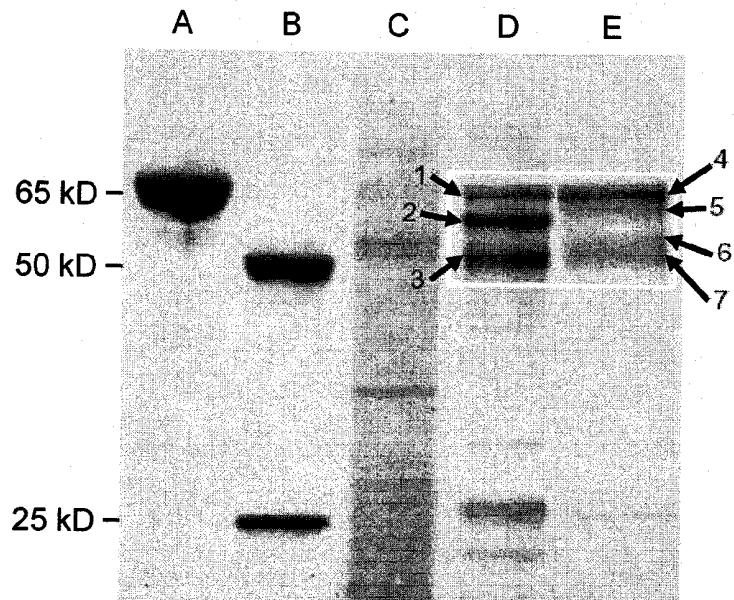
도면3b



2D9 단일클론 항체를 사용한 PAG의 면역-친화성 정제

도면4

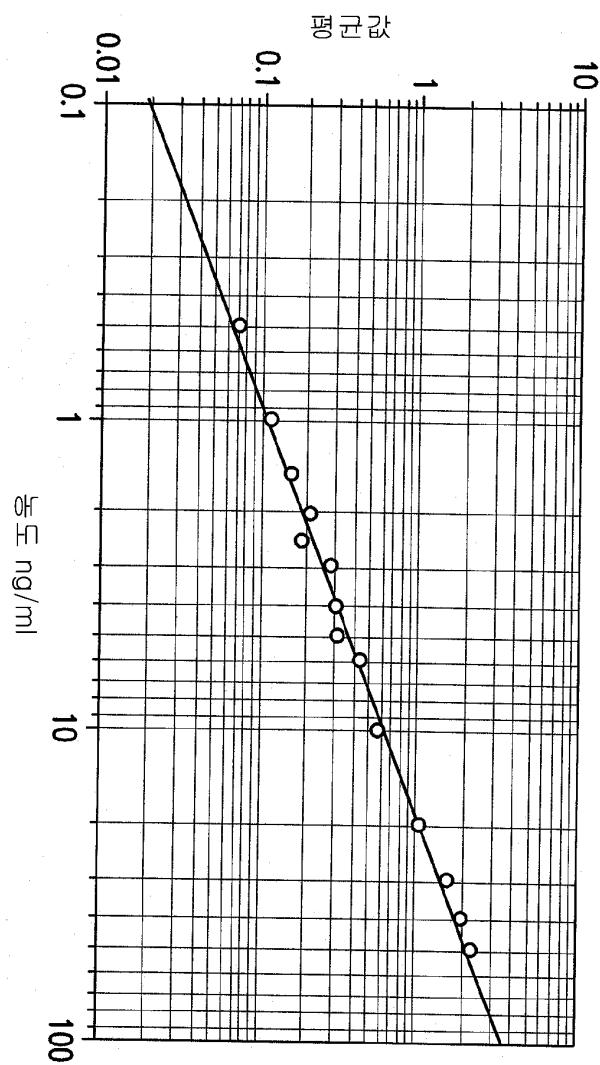
2D9 결합 PAG의 확인



- A. 소 혈청 알부민
- B. 2D9-중사슬 및 경사슬
- C. PAG 강화 분획
- D. 소구로부터의 2D9-친화성 정제된 PAG
- E. 태반엽으로부터의 2D9-친화성 정제된 PAG

밴드 1 내지 7을 절단하여, 트립신 분해 및 LC-MS-MS에 적용하였다.

도면5



도면6

β - 연구 결과
28일차 PAG 및 US 데이터

위스콘신 장소

PAGs			%
US	임신	공백	일치
358	11	369	97.0
44	464	508	91.3
402	475	877	

캘리포니아 장소

PAGs			%
US	임신	공백	일치
391	18	409	95.6
41	419	460	91.1
432	437	869	

도면7

β -연구 결과: 위스콘신-동기화 번식			
특성	조기 제동기호	만기 제동기호	유의성
첫 번째 TAI 후 기용한 수	228	226	
첫 번째 수정에 대한 % 임신	46.3	47.9	NS
수정 시 0일 일수	35.1	42.0	P<0.05
수정 수 (M)	2.60	2.65	NS
N/임신	2.29	2.37	NS
임신까지의 일수 (첫 번째 TAI 제외)	45.2	58.3	P<0.05
% 임신 (첫 번째 TAI 제외)	46.1	51.4	NS

#30 미리소에 대한 데이터 해석

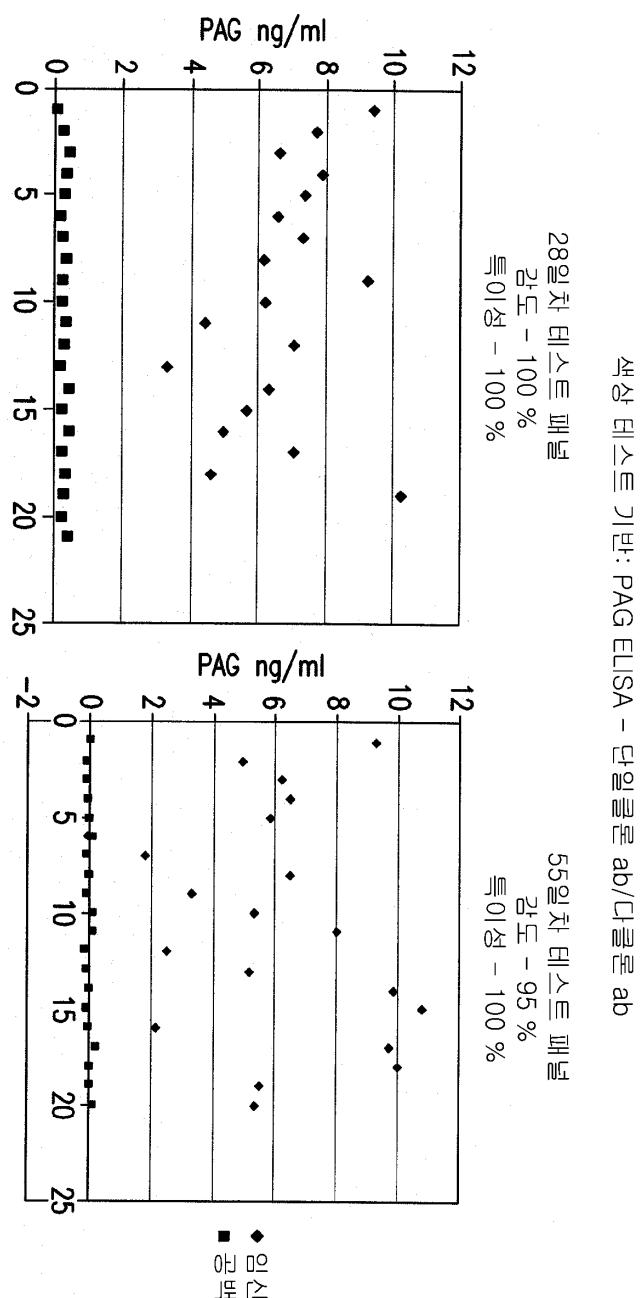
도면8

특성	조기 재동기화	만기 재동기화	유의성
첫 번째 TAI 후 가용한 수	321	335	
첫 번째 수정에 대한 % 임신	27.7	28.7	NS
수정 사이의 일수	28.9	32.3	P<0.05
수정 수 (N)	2.86	3.05	P<0.05
N/임신	2.49	2.77	P<0.05
임신까지의 일수 (첫 번째 TAI 제외)	37.9	48.0	P<0.05
% 임신 (첫 번째 TAI 제외)	36.6	36.2	NS

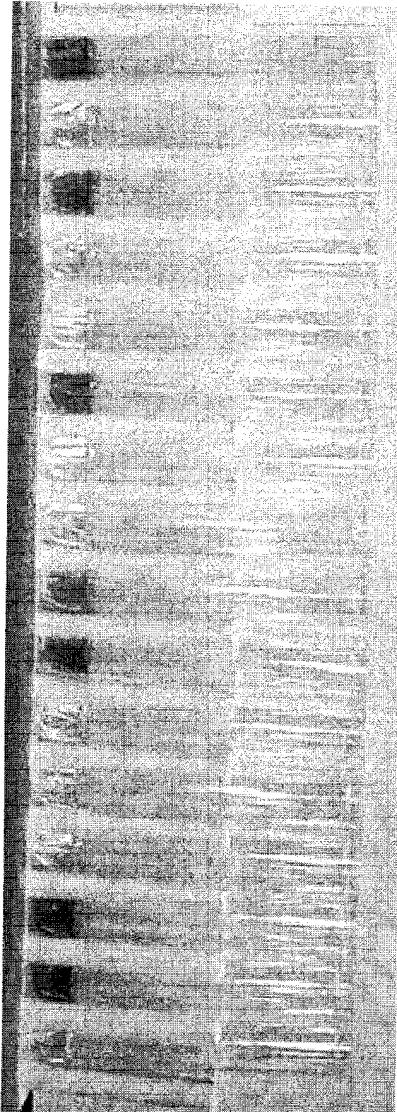
* 42 마리 소에 대한 데이터 해석

β - 연구 결과:
 캘리포니아-TAI+발정 번식

도면9

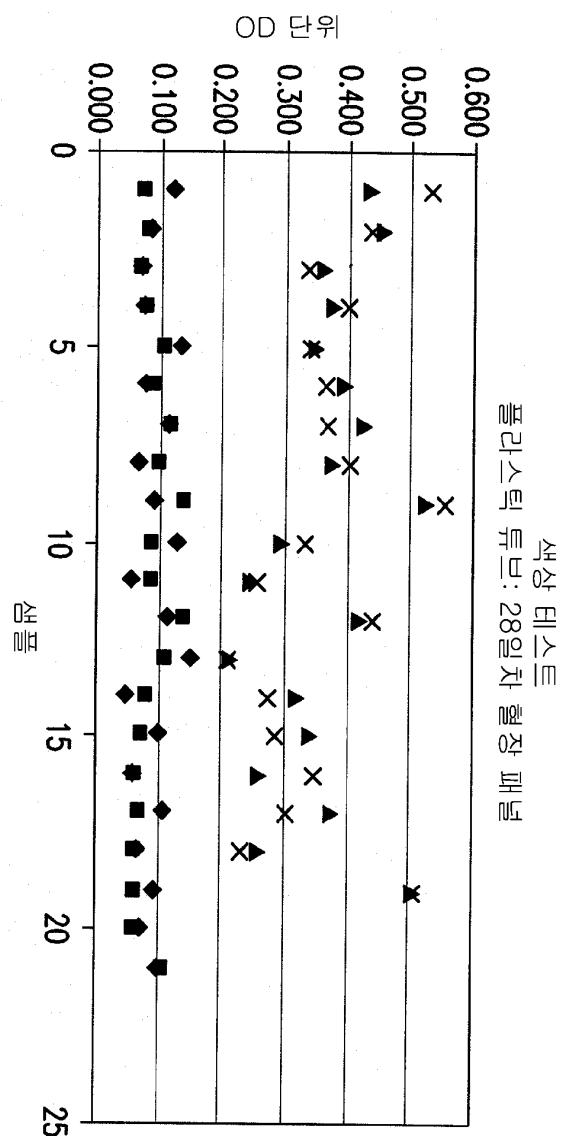


도면10

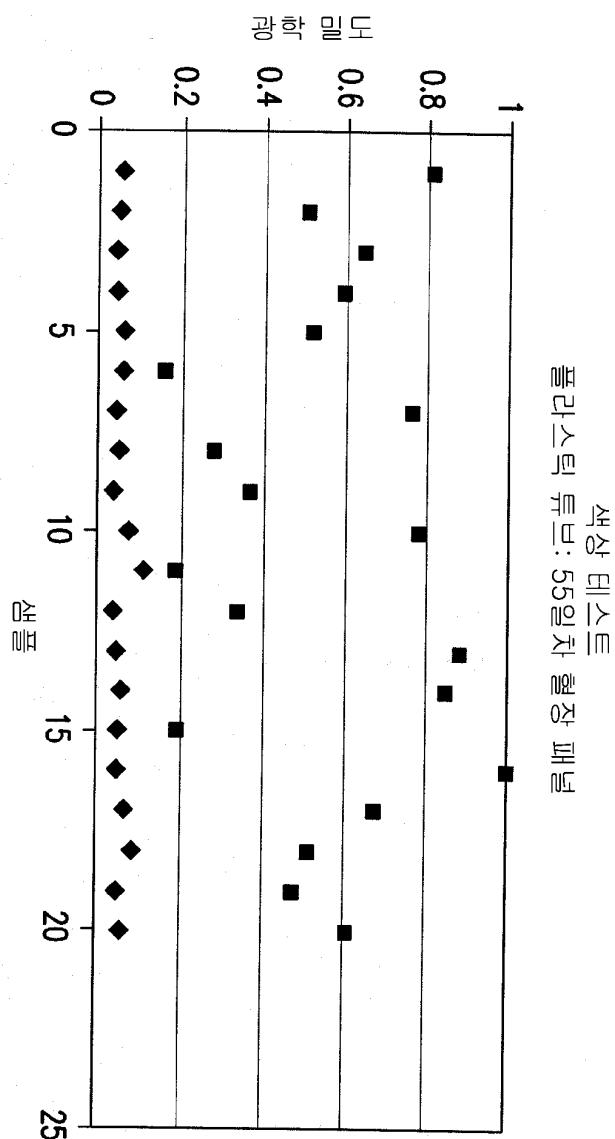


색상 테스트를 사용한 소 임신 진단

도면11a

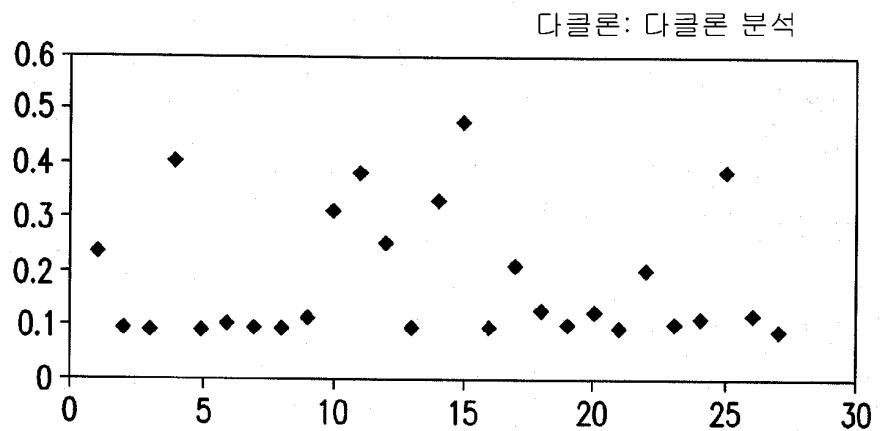


도면11b

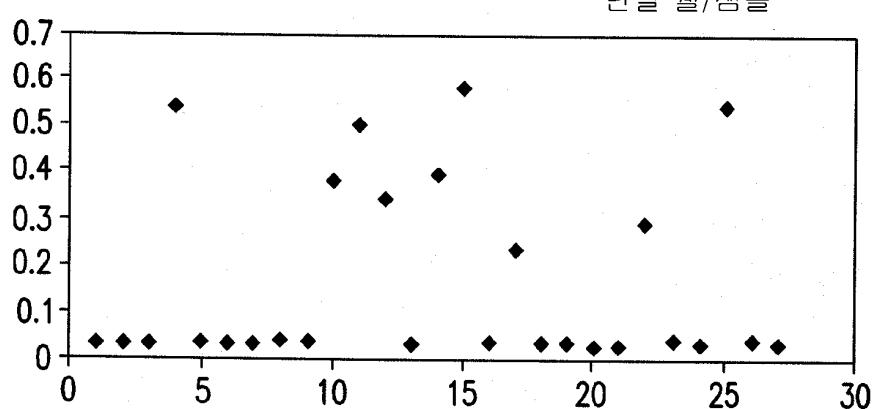


도면12

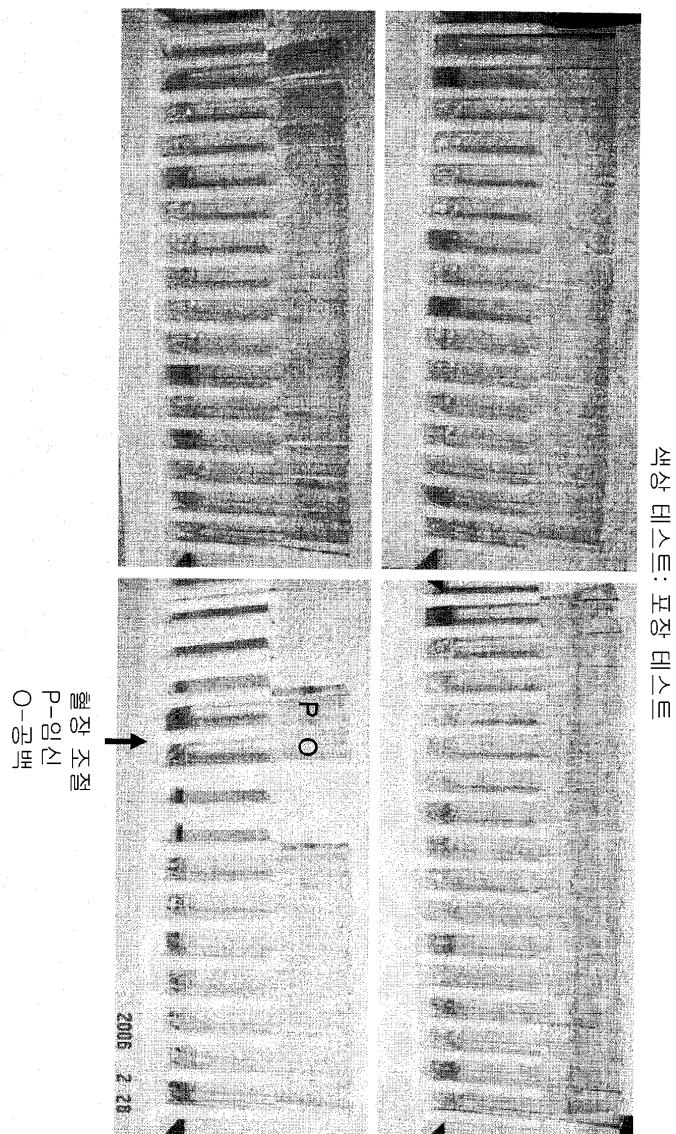
PAG 색상 분석
새로운 혈장 샘플



2D9: 다클론 분석
단일 웨일/샘플



도면13



도면14

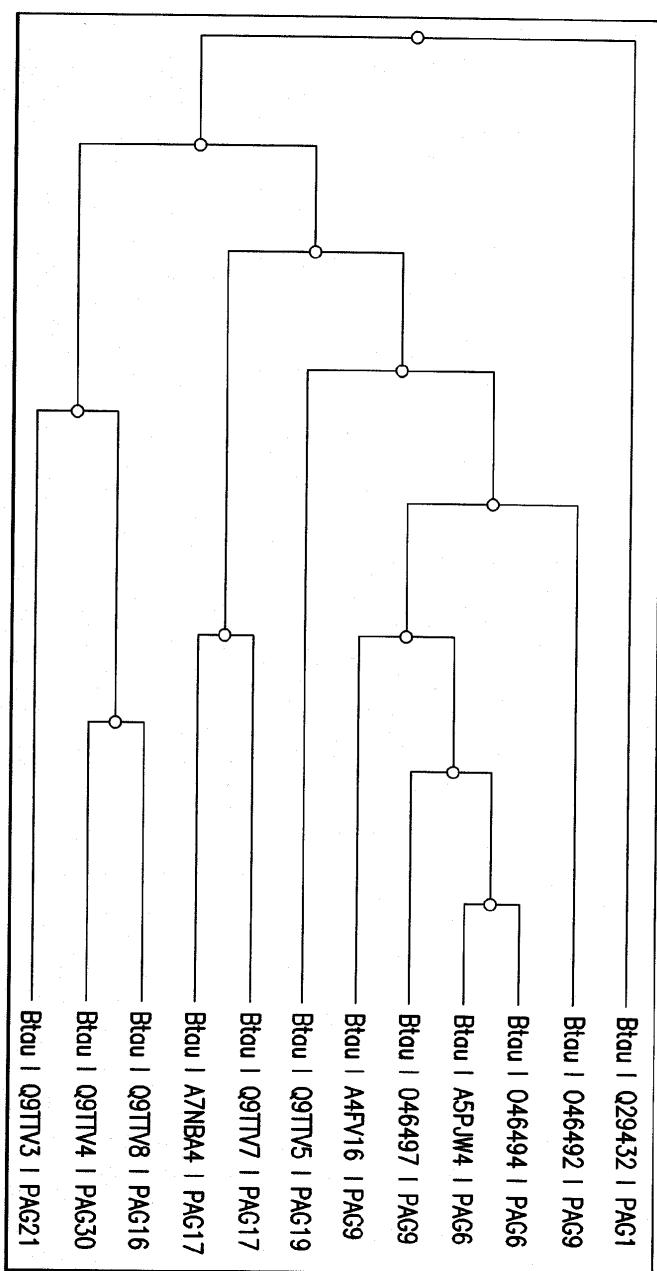
색상 테스트: 표장 테스트

테스트된 샘플의 총 수: 54
번식 후 33 내지 34일차

	임신	공백	재정검
PACs	15	37	2
US	14	40	
일자	14	36	

3 명의 요원이 테스트 해독
튜브 테스트에서 1 가-양성

도면15



도면16

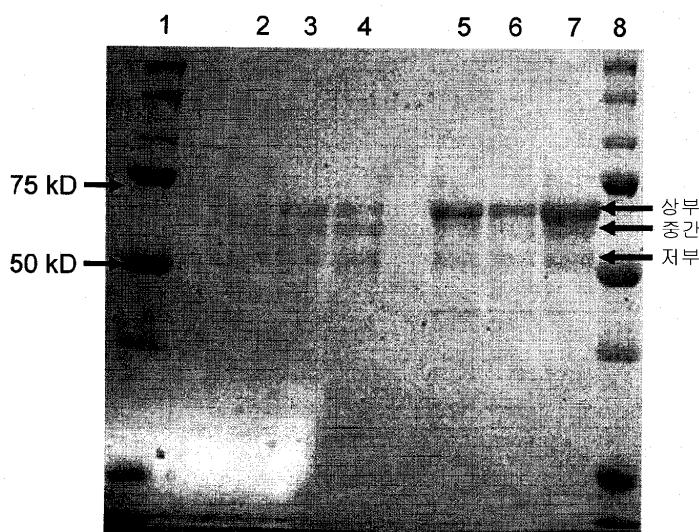
		10	20	30	40	50	60
Btau 029432 PAG1		I	I	I	I	I	I
Btau 046492 PAG4		M	K	M	L	S	N
Btau 046494 PAG6		V	T	K	T	R	I
Btau A5PJW4 PAG6		V	A	I	T	R	H
Btau A4PV16 PAG9		I	QV	A	T	R	H
Btau 046497 PAG9		I	QV	T	K	P.R.	I
Btau 09TTV8 PAG16		V	KT	L	K	P.R.	I
Btau 09TTV7 PAG17		W	KT	L	T	P.R. H	
Btau A7MBA4 PAG17		W	QV	KT	T	S	
Btau Q9TTV5 PAG19		V	KA	L	T	S	I
Btau Q9TTV4 PAG20		F	KT	L	R	S	
Btau Q9TTV3 PAG21		V	KT	L	P.K.		
		70	80	90	100	110	120
Btau 029432 PAG1	IIIIII
Btau 046492 PAG4		HPLRNKDLV	YMGNITIGTP	PQBFQVNFDT	ASSDLWPSD	FCSTSPACSTTH	VRFRHLQSST
Btau 046494 PAG6	R	FF	VI	G.E.	I
Btau A5PJW4 PAG6		PLRNIRDLY	VGNITIGTP	QBHQVIFDTG	S.DLWASIF	CNS.SCAAHV	RFRH.QS.TF
Btau A4PV16 PAG9	MN	V	QBHQVIFDTG	S.DLWASIF	CNS.SCAAHV	RFRH.QS.TF
Btau 046497 PAG9	
Btau 09TTV8 PAG16		L	R.M.	V	G	F	
Btau 09TTV7 PAG17		M.M.	V	G	V	Q.L.A.K	M.I.H
Btau A7MBA4 PAG17		M.M.	V	G	V	Q.L.A.K	M.I.Y
Btau Q9TTV5 PAG19		LA	FL	G	G	G.K.	
Btau Q9TTV4 PAG20		W.F	I.T	I	I.N.S.T.	R.	
Btau Q9TTV3 PAG21		B.M	V	G.F	D.I.	Q.H.	

도면16a

도면16b

Btau 029432 PAG1	QAGDSVHMD	RISIBRKIIA	CSDGCKALVD	TGTSIDIVGPR	RIVNNIHLI	GAIPRGSEHY		250
Btau 046492 PAG4	K.....MK..	V.....	G.....	S.....	S.T.....	W.K.....T.Q.
Btau 046494 PAG6	YGDWVHMDR	TIMKRV.AC	SDGCKALVD	GTSIDIVGPR	LWN.IWKLIR	ARPLGPQYFV		260
Btau A5P JW4 PAG6	VGDWVHMDR	IMKRV.AC	SDGCKALVD	GTSIDIVGPR	LWN.IWKLIR	ARPLGPQYFV		270
Btau A4PV16 PAG9	AGEIRVHMDR	ISMKRTV.AC	SDGCEALVHT	GTSIIEGPG.	LWN.IHRLIR	TRPFDSKHV		280
Btau 046497 PAG9	AGEIRVHMDR	ISMKRTV.AC	SDGCEALVHT	GTSIIEGPG.	LWN.IHRLIR	TRPFDSKHV		290
Btau 09TTV8 PAG16	R.....	I.....V.	TMK.BV.....	A.....	L.Q.....	G.VID.....	K.....	300
Btau 09TTV7 PAG17	...C.T.	V.....	MK.....	G.E.....	A.L.K.....OK.	TT.....	K.....
Btau A7MBA4 PAG17	...G.T.	V.....	MK.....	G.E.....	A.L.K.....OK.	TT.....	K.....
Btau Q9TTV5 PAG19	...N.II.	S.....V.	G.V.F.....	I.A.F.E.K.P.D.MOK.....	R.K.WR.K.....			

도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC

MATHIALAGAN, NAGAPPAN

ROBERTS, R. MICHAEL

McGRATH, MICHAEL F.

GREEN, JONATHAN

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS

<130> MONS:108WO (37-21(54290))

<140> UNKNOWN

<141> 2008-12-12

<150> 61/013,603

<151> 2007-12-13

<160> 74

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Artificial antibody fragment light chain peptide sequence

<400> 1

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Artificial antibody fragment heavy chain peptide sequence

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211

> 193

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Artificial antibody fragment light chain peptide sequence

<400> 3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Ile Val His Ser			
20	25	30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
85	90	95	
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
100	105	110	
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
115	120	125	
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe			
130	135	140	
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg			
145	150	155	160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
165	170	175	
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu			
180	185	190	
Arg			
<210> 4			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Artificial antibody fragment heavy chain peptide sequence			
<400> 4			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala			

1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Trp Met Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp			
100	105	110	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr			
115	120	125	
Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn			
130	135	140	
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro			
145	150	155	160
Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr			
165	170	175	
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val			
180	185	190	
Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val			
195	200	205	
Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg			
210	215	220	
Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser			
225	230	235	240
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu			
245	250	255	

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

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

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

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 420 425 430
 Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 5
 <211> 695
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Nucleic acid sequence encoding 2D9 antibody fragment light chain
 <400> 5
 cggttcctgc ttccagcagt gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca 60

gtcttgaga tcaaggctcc atttcttgc a gatctaggca gagcatgt a catagtaatg	120
gaaacaccta tttagaatgg ttcctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctccgtatct	180
acaaggttc caaccgattt tctgggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga	240
cagatttac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctggagtt tattactgt	300
ttcaaggttc acatgttccg ctcacgttcg gtgctggac caagctggag ctgaaacggg	360
ctgatgtgc accaactgtt cccatcttcc caccatccag tgagcagttt acatctggag	420
gtgcctcagt cgtgtgttcc ttgaacaact tctacccaa agacatcaat gtcaagtgg	480
agattgtatgg cagtgaacga caaaaatggcg tcctgaacag ttggactgtat caggacagca	540
aagacagcac ctacagcatg agcagcaccc tcacgttgc caaggacgag tatgaacgac	600
ataacagcta tacctgttag gccactcaca agacatctac ttccaccatt gtcaagagct	660
tcaacaggaa tgagtgttag agacaaagggt cctga	695
<210> 6	
<211> 1429	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Nucleic acid sequence encoding 2D9 antibody fragment heavy chain	
<400> 6	
gctacaggtt tccactccca ggttcagctg cagcagtcg gagctgagct gatgaaggct	60
ggggcctcag tgaagatatc ctgcaaggct actggctaca tattcagtaa ctactggatg	120
gagtggttaa agcagaggcc tggacatggc cttgagtgg a ttggagagat tttacctgga	180
agtatatta ctaactacaa tgagaaggta aaggacaagg ccacattcac tgca gattca	240
tcctccaaca cggcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgccgtctat	300
tactgtgcaa gagctggag tggtaactac gggtatatt actatgtat ggactactgg	360
ggtaaggaa cctcagtcac cgtctctca gccaaaacga cacccccatc tgtctatcca	420
ctggcccctg gatctgtgc ccaaactaac tccatggta ccctggatg cctggtaag	480
ggctattcc ctgagccagt gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcggtgt	540
cacacccctcc cagctgtcct gcagtcgtac ctctacactc tgagcagctc agtgcgtc	600
ccctccagca cctggccctc cggacccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc	660
accaagggtgg acaagaaaat tggccagg gattgtgg t gtaaggctt catatgtaca	720
gtcccaagaat tatcatctgt cttcatcttc ccccaaaagc ccaaggatgt gtcaccatt	780
actctgactc ctaaggtcac gtgtgttgt gtagacatca gcaaggatga tcccgaggc	840

cagttcagct gggtttaga tggatgtggag gtgcacacag ctccagacgca accccgggag 900
 gagcagttca acagcacattt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 960

ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgcag cttccctgc ccccatcgag 1020
 aaaaccatct ccaaaaaccaa aggccagaccc aaggctccac aggtgtacac cattccacct 1080
 cccaaggagc agatggccaa ggataaaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc 1140
 cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac 1200
 actcagccca tcatggacac agatggctct tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag 1260
 aagagcaact gggaggcagg aaatacttc acctgctctg tgttacatga gggcctgcac 1320
 aaccaccata ctgagaagag cctctccac tctccgtta aatgatccca aagtccctgg 1380

agccctctgg tcctacagga ctactgcagg tgtccactcc cctcaaaca 1429

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 7

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 8

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys

1	5	10
---	---	----

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 9

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 10

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1 5 10 15

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu

1 5 10 15

Val Asn Asn Ile Trp Lys

20

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 12

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 13

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 14

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys

1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 15

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys

1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 16

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1 5 10 15

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 17

Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu

1 5 10 15

Val Asn Asn Ile Trp Lys

20

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 18

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 19

Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 20

Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 21

Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 22

Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met Lys

1 5 10

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 23

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 24

Phe Asp Gly Val Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Ile Pro Ile Phe Tyr Lys

20

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 25

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 26

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys Leu Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 27

Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln Val Gly Asp Trp Phe Val

1	5	10	15
---	---	----	----

His Met Asp Arg

20

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 28

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Lys

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 29

Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp Lys

1

5

10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 30

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1

5

10

15

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400

> 31

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1

5

10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 32

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 33

Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 34

Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr Val Arg

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 35

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr

1 5 10 15

Lys

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 36

Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln Tyr Tyr

1 5 10 15

Lys

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 37

Glu Thr Trp Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg

1 5 10

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 38

Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Gln

1 5 10 15

Tyr Tyr Lys

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 39

Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys

1 5 10

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 40

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser Val Val

1 5 10 15

Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg

20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 41

Thr Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly

1 5 10 15

Thr Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg

20 25

<210> 42

<211> 18

<212>

> PRT

<213> Bos taurus

<400> 42

Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu

1 5 10 15

Ser Lys

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 43

Gln Lys Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1 5 10

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 44

Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys

1 5 10 15

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 45

Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 46

Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg

1 5 10

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 47

Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly Thr

1 5 10 15

Ser Leu Ile Lys

20

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 48

Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser Val Ser

1 5 10 15

Glu Tyr Gly Phe Lys

20

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 49

Ala Tyr Asp Gly Ile Leu Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Ser Phe Ser

1 5 10 15

Glu Ala Ile Pro Ile Phe Asp Lys

20

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 50

Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg

1 5 10 15

<210> 51

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 51

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile

1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Leu Lys Thr Met Arg Asn Val Val Ser

20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Ala Tyr Ser Leu

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr His Pro Leu Arg

50 55 60

Asn Ile Lys Asp Leu Val Tyr Met Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp

85 90 95

Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Ala Cys Ser Thr His Val Arg

100 105 110

Phe Arg His Leu Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe

115 120 125

Arg Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp

130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asn Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu

145 150 155 160

Ser Ile Glu Glu Tyr Gly Phe Glu Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Val Leu

165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly

210 215 220

Val Asp His Arg Tyr Tyr Glu Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile

225 230 235 240

Gln Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Ile Glu Arg

245 250 255

Lys Ile Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly

260 265 270

Thr Ser Asp Ile Val Gly Pro Arg Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg

275 280 285

Leu Ile Gly Ala Ile Pro Arg Gly Ser Glu His Tyr Val Pro Cys Ser

290 295 300

Glu Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Val Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn

305 310 315 320

Tyr Pro Val Pro Gly Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Asp Arg Gly Arg

325 330 335

Cys Tyr Thr Thr Phe Gln Glu Asn Arg Val Ser Ser Ser Thr Glu Thr

340	345	350
-----	-----	-----

Trp Tyr Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp

355	360	365
-----	-----	-----

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val

370	375	380
-----	-----	-----

<210> 52

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 52

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Thr Lys Thr Leu Ser

20	25	30
----	----	----

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Val Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu

35	40	45
----	----	----

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg

50	55	60
----	----	----

Asn Ile Arg Asp Phe Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Glu Leu Trp

85	90	95
----	----	----

Val Pro Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Lys His Asp Arg

100	105	110
-----	-----	-----

Phe Arg His Leu Glu Ser Ser Thr Phe Arg Leu Ser Arg Arg Thr Phe

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile Glu Ala Leu Val Val His Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Gln Phe Gly Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys Leu Glu Glu Ser Gly Phe Glu Gly Met Arg Phe Asp Gly Val Leu

165	170	175
Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Pro Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe		
180	185	190
Tyr Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe		
195	200	205
Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly		
210	215	220
Ala Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Met		
225	230	235
Lys Ala Gly Asp Trp Ser Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg		
245	250	255
Lys Val Ile Ala Cys Ser Gly Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly		
260	265	270
Ser Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys		
275	280	285
Leu Ile Gly Ala Thr Pro Gln Gly Ser Glu His Tyr Val Ser Cys Ser		
290	295	300
Ala Val Asn Ser Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ser Asn Asn		
305	310	315
Tyr Arg Val Pro Gly Gln Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Arg		
325	330	335
Cys Phe Thr Ala Phe Lys Gly His Gln Gln Ser Ser Thr Glu Met		
340	345	350
Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp		
355	360	365
Arg Arg Lys Asp Arg Ile Gly Leu Ala Thr Lys Val		
370	375	380
<210> 53		
<211> 379		
<212> PRT		
<213> Bos taurus		
<400> 53		

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Asn Ala Ile Ser
 20 25 30

Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Ile Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Pro Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr His Pro Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ile Arg Asp Leu Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp Val
 85 90 95

Ala Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Ser Cys Ala Ala His Val Arg Phe
 100 105 110
 Arg His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg
 115 120 125
 Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp Thr
 130 135 140
 Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys
 145 150 155 160

Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Gly Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu Gly
 165 170 175
 Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp
 180 185 190
 Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr
 195 200 205
 Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val
 210 215 220

Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln
 225 230 235 240
 Val Gly Asp Trp Phe Val His Met Asp Arg Thr Thr Met Lys Arg Lys

245	250	255
Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr		
260	265	270
Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys Leu		
275	280	285
Ile Arg Ala Arg Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala		
290	295	300
Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr		
305	310	315
Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys		
325	330	335
Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp		
340	345	350
Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg		
355	360	365
Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val		
370	375	
<210> 54		
<211> 379		
<212> PRT		
<213> Bos taurus		
<400> 54		
Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile		
1	5	10
Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Asn Ala Ile Ser		
20	25	30
Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Ile Leu Lys Glu His Ala Tyr Arg Leu		
35	40	45
Pro Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr His Pro Leu Arg Asn		
50	55	60
Ile Arg Asp Leu Phe Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro Pro		
65	70	75
80		

Gln Glu Phe Gln Val Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp Val

85 90 95

Ala Ser Ile Phe Cys Asn Ser Ser Ser Cys Ala Ala His Val Arg Phe

100 105 110

Arg His His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe Arg

115 120 125

Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Lys Gly Val Val Val His Asp Thr

130 135 140

Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Cys

145 150 155 160

Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Gly Ile Pro Phe Asp Gly Ile Leu Gly

165 170 175

Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr Phe Ser Gly Ala Phe Pro Ile Phe Asp

180 185 190

Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr

195 200 205

Leu Ser Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val

210 215 220

Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile Gln

225 230 235 240

Val Gly Asp Trp Phe Val His Met Asp Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys

245 250 255

Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Lys Ala Leu Val Asp Thr Gly Thr

260 265 270

Ser Asp Ile Val Gly Pro Ser Thr Leu Val Asn Asn Ile Trp Lys Leu

275 280 285

Ile Arg Ala Arg Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Phe Val Ser Cys Ser Ala

290 295 300

Val Asn Thr Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn Tyr

305 310 315 320

Arg Leu Pro Ala Arg Ala Tyr Ile His Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys

325	330	335
Tyr Thr Ala Phe Lys Glu His Arg Phe Ser Ser Pro Ile Glu Thr Trp		
340	345	350
Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg		
355	360	365
Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val		
370	375	
<210> 55		
<211> 379		
<212> PRT		
<213> Bos taurus		
<400> 55		
Met Lys Trp Ile Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile		
1	5	10
Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser		
20	25	30
Gly Lys Asn Met Leu Lys Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu		
35	40	45
Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg		
50	55	60
Asn Ile Met Asn Leu Val Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro		
65	70	75
Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp		
85	90	95
Val Pro Ser Phe Cys Thr Met Pro Ala Cys Ser Ala Pro Val Trp Phe		
100	105	110
Arg Gln Leu Gln Ser Ser Thr Phe Gln Pro Thr Asn Lys Thr Phe Thr		
115	120	125
Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Met Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr		
130	135	140
Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser		

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Val Val Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg Asn Tyr Asp Gly Val Leu Gly

165	170	175
-----	-----	-----

Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

Leu Ser Lys Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val

210	215	220
-----	-----	-----

Asp His Gln Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Ile Glu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ala Gly Glu Trp Arg Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg Thr

245	250	255
-----	-----	-----

Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly Thr

260	265	270
-----	-----	-----

Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg Leu

275	280	285
-----	-----	-----

Ile Arg Thr Arg Pro Phe Asp Ser Lys His Tyr Val Ser Cys Phe Ala

290	295	300
-----	-----	-----

Thr Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Thr Phe Ile Ile Asn Gly Ile Lys Tyr

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Pro Met Thr Ala Arg Ala Tyr Ile Phe Lys Asp Ser Arg Gly Arg Cys

325	330	335
-----	-----	-----

Tyr Ser Ala Phe Lys Glu Asn Thr Val Arg Thr Ser Arg Glu Thr Trp

340	345	350
-----	-----	-----

Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg

355	360	365
-----	-----	-----

Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val

370	375
-----	-----

<210> 56

<211> 379

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 56

Met Lys Trp Ile Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile

1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser

20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Lys Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Arg Leu

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg

50 55 60

Asn Ile Met Asn Leu Val Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp

85 90 95

Val Pro Ser Phe Cys Thr Met Pro Ala Cys Ser Ala Pro Val Trp Phe

100 105 110

Arg Gln Leu Gln Ser Ser Thr Phe Gln Pro Thr Asn Lys Thr Phe Thr

115 120 125

Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Met Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Asp Thr

130 135 140

Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu Ser

145 150 155 160

Val Val Glu Tyr Gly Leu Glu Gly Arg Asn Tyr Asp Gly Val Leu Gly

165 170 175

Leu Asn Tyr Pro Asn Ile Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe Asp

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser Lys Asn Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val

210 215 220

Asp His Gln Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Ile Pro Leu Ile Glu
 225 230 235 240
 Ala Gly Glu Trp Arg Val His Met Asp Arg Ile Ser Met Lys Arg Thr
 245 250 255
 Val Ile Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Leu Val His Thr Gly Thr
 260 265 270
 Ser His Ile Glu Gly Pro Gly Arg Leu Val Asn Asn Ile His Arg Leu
 275 280 285

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

Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Arg Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg
 355 360 365

Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val

370 375

<210> 57

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 57

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30

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

Ser His Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg

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

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

Trp Leu Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp
 355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380

<210> 58

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 58

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Trp Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30

Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Thr Tyr Ser Leu
 35 40 45

Ser Gln Ile Ser Ser Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg
 50 55 60

Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp
 85 90 95

Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met
 100 105 110

Phe Ile His Leu His Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe
 115 120 125

Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp

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

<210> 59

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 59

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Trp Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile

1 5 10 15

Val Lys Ile Pro Leu Arg Gln Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser

20 25 30

Gly Lys Asn Thr Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Thr Tyr Ser Leu

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Ser Arg Gly Ser Asn Leu Thr Ile His Pro Leu Arg

50 55 60

Asn Ile Met Asp Met Leu Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp

85 90 95

Val Pro Ser Val Phe Cys Gln Ser Leu Ala Cys Ala Thr Lys Val Met

100 105 110

Phe Ile His Leu Tyr Ser Ser Thr Phe Arg His Thr Gln Lys Val Phe

115 120 125

Asn Ile Lys Tyr Asn Thr Gly Arg Met Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp

130 135 140

Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Cys Ile

145 150 155 160

Ser Leu Ala Glu Val Gly Phe Asp Gly Ile Pro Phe Asp Gly Val Leu

165 170 175

Gly Leu Asn Tyr Pro Asn Met Ser Phe Ser Gly Ala Ile Pro Ile Phe

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Leu Ser Lys Asp Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly

210	215	220													
Val	Asp	His	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Glu	Leu	Asn	Trp	Val	Pro	Leu	Ile
225															240
Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Val	His	Val	Asp	Arg	Ile	Ser	Met	Lys	Arg
															245
Lys	Ile	Ile	Ala	Cys	Ser	Gly	Gly	Cys	Glu	Ala	Leu	Val	Asp	Thr	Gly
															250
Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Asn	Asn	Ile	Gln	Lys
															255
															260
															265
															270
															275
															280
															285
															290
															295
															300
Val	Val	Asn	Thr	Leu	Pro	Ser	Ile	Ile	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ile	Asn
															305
															310
															315
															320
Tyr	Pro	Val	Pro	Ala	Arg	Ala	Tyr	Ile	Leu	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	His
															325
															330
															335
Cys	Tyr	Thr	Ala	Phe	Lys	Glu	Asn	Thr	Val	Arg	Thr	Ser	Arg	Glu	Thr
															340
															345
															350
															355
															360
															365
Trp	Ile	Leu	Gly	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Phe	Asp
															370
															375
															380
<210>	60														
<211>	380														
<212>	PRT														
<213>	Bos taurus														
<400>	60														
Met	Lys	Trp	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Phe	Ser	Glu	Cys	Ile
1															15
Val	Lys	Ile	Pro	Leu	Arg	Arg	Val	Lys	Thr	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Ser
															20
															25
															30
Gly	Lys	Asn	Met	Leu	Asn	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	His	Ala	Tyr	Arg	Leu

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

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

Trp Met Leu Gly Asp Val Phe Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp

355 360 365

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val

370 375 380

<210> 61

<211> 380

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 61

Met Lys Trp Leu Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile

1 5 10 15

Phe Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser

20 25 30

Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Pro Tyr Lys Leu

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg

50 55 60

Asn Ile Trp Asp Ile Phe Tyr Ile Gly Thr Ile Thr Ile Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Ala Ser Ser Asp Leu Trp

85 90 95

Val Pro Ser Ile Ile Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ser Thr His Val Arg

100 105 110

Phe Arg His Arg Gln Ser Ser Thr Phe Arg Leu Thr Asn Lys Thr Phe

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

Arg Gly Asn Asp Arg Ile Gly Leu Ala Arg Ala Val
 370 375 380
 <210> 62
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 62
 Met Lys Trp Val Val Leu Leu Gly Leu Val Ala Phe Ser Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Pro Leu Arg Arg Val Lys Thr Met Arg Lys Thr Leu Ser
 20 25 30

 Gly Lys Asn Met Leu Asn Asn Phe Leu Lys Glu His Gly Asn Arg Leu
 35 40 45
 Ser Lys Ile Ser Phe Arg Gly Ser Asn Leu Thr Thr Leu Pro Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Glu Asp Leu Met Tyr Val Gly Asn Ile Thr Ile Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Phe Gln Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Phe Trp
 85 90 95

 Val Pro Ser Asp Phe Cys Thr Ser Pro Asp Cys Ile Thr His Val Arg
 100 105 110
 Phe Arg Gln His Gln Ser Ser Thr Phe Arg Pro Thr Asn Lys Thr Phe
 115 120 125
 Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Met Arg Gly Val Val Val His Asp
 130 135 140
 Thr Val Arg Ile Gly Asp Leu Val Ser Thr Asp Gln Pro Phe Gly Leu
 145 150 155 160

 Ser Val Ser Glu Tyr Gly Phe Lys Asp Arg Ala Tyr Asp Gly Ile Leu
 165 170 175
 Gly Leu Asn Tyr Pro Asp Glu Ser Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ile Phe
 180 185 190
 Asp Lys Leu Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Ile Phe Ala Phe

195	200	205
Tyr Leu Ser Lys Lys Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly		
210	215	220
Val Asp His Arg Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu Asn Trp Val Pro Leu Ile		
225	230	235
Glu Glu Gly Asp Trp Ser Val Arg Met Asp Gly Ile Ser Met Lys Thr		
245	250	255
Lys Val Val Ala Cys Ser Asp Gly Cys Glu Ala Val Val Asp Thr Gly		
260	265	270
Thr Ser Leu Ile Lys Gly Pro Arg Lys Leu Val Asn Ile Gln Lys		
275	280	285
Leu Ile Gly Ala Thr Pro Arg Gly Ser Lys His Tyr Val Tyr Cys Ser		
290	295	300
Ala Val Asn Ala Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Ile Asn Gly Ile Asn		
305	310	315
Tyr Pro Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Arg Gly Arg		
325	330	335
Cys Tyr Thr Ala Phe Lys Lys Gln Arg Phe Ser Ser Ser Thr Glu Thr		
340	345	350
Trp Leu Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Val Tyr Phe Ser Val Phe Asp		
365	360	355
Arg Gly Asn Gly Arg Ile Gly Leu Ala Gln Ala Val		
370	375	380
<210> 63		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> Bos taurus		
<400> 63		
Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr		
1	5	10
<210> 64		
<211> 10		

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 64

Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly

1 5 10

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 65

Asn Gln Gly Ala Ile Ser Asp Pro Ile Phe Ala Phe Tyr Leu Ser Lys

1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 66

Arg Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg Tyr

1 5 10 15

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 67

Lys Gly Leu Leu Val Tyr Asp Thr Val Arg Ile

1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 68

Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly

1 5 10

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 69

Lys Asn Glu Gly Ala Ile Ser Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Ser

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 70

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 70

Lys Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His

1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 71

Lys Thr Phe Ser Ile Thr Tyr Gly Ser Gly Arg Ile

1 5 10

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 72

Asp Lys Gln Glu Gly Ser Val Val Met Phe Gly Gly Val Asp His Arg

1 5 10 15

Tyr Tyr Arg

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 73

Arg Leu Tyr Phe Ser Val Phe Asp Arg Gly

1 5 10

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 74

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

1 5 10 15

Lys Asp