(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0044152
(43) 공개일자 2015년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/12 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0123169
(22) 출원일자 2013년10월16일
심사청구일자 2013년10월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
전태훈
서울 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
배준범
경기 광주시 중앙로346번길 45-53, 103동 302호 (송정동, 태영하이츠빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

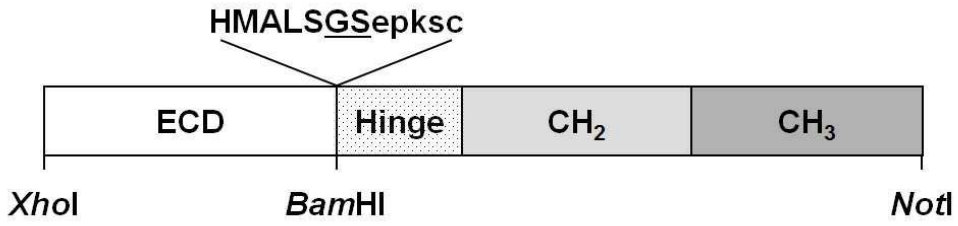
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **돼지 CD7 유전자 및 이를 이용한 CD7 융합 이뮤노글로불린**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 돼지의 CD7 유전자, 및 T 세포나 NK 세포의 활성을 조절할 수 있는 상기 CD7와 인간의 이뮤노글로불린을 융합하여 제조된 새로운 재조합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 의한 이뮤노글로불린은 T 세포나 NK 세포의 활성 및 발달을 조절하고 세포사멸 신호까지 영향을 줄 수 있어, 백신의 면역조절 또는 항암 치료제의 면역조절, 또한 인간 및 돼지간의 장기이식에 따른 이식편대숙주 질환의 치료 또는 예방용으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

최창용

경기 평택시 청북면 안청로1길 75, 105동 503호 (유승한내들)

이주연

서울 노원구 동일로 1373, 3층 혈액수혈연구원 (상계동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008089012013

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 [주관] 돼지 이유후전신소모성증후군(PMWS) 발병 방지를 위한 면역 조절 기전 구명 및 이를 이용한 질병저항성 활용 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가지는 돼지 CD7 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 돼지 CD7 유전자.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 돼지 CD7 단백질.

청구항 4

돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편으로 이루어진 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린.

청구항 5

돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제5항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 7

제4항 기재의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 함유하는 T 림프구 활성 억제용 조성물.

청구항 8

제4항 기재의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 함유하는 면역조절제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 돼지 CD7 유전자 및 이를 이용한 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 신규한 돼지의 CD7 유전자, 및 T 세포나 NK 세포의 활성을 조절할 수 있는 상기 CD7와 인간의 이뮤노글로불린을 융합하여 제조된 새로운 재조합 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역체계의 조절에 있어 중요한 역할을 하는 T 세포는 T 세포 항원 수용체(T cell antigen receptor; TCR)가 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)를 통해 MHC class II 분자에 결합된 항원을 인지하고, 단백질 타이로신 인산화효소(protein tyrosine kinase; PTK)나 다른 adaptor 단백질을 통하여 신호를 전달함으로써 활성화된다. CD7은 PTK를 활성화시키는 물질로 T 세포의 생성단계와 발달단계 전반에 걸쳐 신호전달에 중요한 역할을 한다.

[0003] CD7은 분자량 40kDa의 막단백질로 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리(IgSF)에 속하고, peripheral T 세포와 자연살해세포(Natural Killer cell; NK cell)에서 주로 발현되며(Lazarovits et al., 1994; Rabinowich et al., 1994), 흉선 내의 초기 T 세포 전구체에서도 발현하는 것으로 알려져 있다(Barcena et al., 1993). T 세포가 활성화될

때, CD3 complex의 신호전달을 CD7이 증강시키는 것으로 알려져 있으며(Carrea et al., 1988), CD7의 신호전달은 포스파티딜이노시톨-3 카이네이즈(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3-K)에 의해 유도되는 칼슘의 세포질 유입으로 매개된다(Carrel et al., 1991; Ward et al., 1995; Subrahmanyam et al., 2003). 또한 인간 T 세포에서 anti-CD3 단클론항체의 co-stimulation을 제공함으로써 인터루킨-2(IL-2)의 생산을 유도하고 TNF-a, TNF-b, GM-CSF 그리고 IL-2 수용체(IL-2R)의 발현을 증가시키는 역할도 한다. NK 세포에서 CD7의 cross linking은 인터페론-g의 분비를 자극하고 세포 부착 (cell adhesion)을 향상시킬 수 있는 fibronectin을 증가시킨다(Rabinowich et al., 1994).

[0004] CD7의 특이적인 리간드가 밝혀져 있지 않은 상황에서, 갈렉틴-1(galectin-1)과 갈렉틴-3가 CD7과 결합할 수 있다는 선행연구결과들이 있고, 인간 T 세포에서 갈렉틴-1과 -3 모두 CD7과 결합하여 세포사멸 신호를 전달할 수 있다는 보고가 있다(Pace et al., 1999; Fukumori et al., 2003). 따라서 CD7의 신호전달은 T 세포나 NK 세포의 활성 및 발달뿐만 아니라, T 세포의 세포사멸에도 연관이 있다고 할 수 있다.

[0005] 이러한 중요성에도 불구하고 지금까지 알려진 포유류의 CD7의 cDNA는 사람과 생쥐, 고양이에 국한되어있다.

[0006] 한편, 알려진 바와 같이, 인체는 체내에 침입하는 세균 또는 바이러스 등의 외부물질에 대항하기 위한 복잡한 방어 메커니즘을 가지고 있다. 면역계를 이루는 이러한 메카니즘은 질병을 유발하는 미생물과 생명을 구하는 이식세포를 구별할 수 없어, 양쪽 모두 외부물질로 간주하여 면역계의 공격을 받으므로 인해 이식 거부반응이 유발된다. 항원제시세포에 의한 항원전달 억제 방법, NKT 세포의 신호 전달 과정(CD3, Calcineurin-Ca^{2+}signal) 또는 중간 신호물질의 기능 억제, NKT 세포의 활성에 중요한 사이토카인의 기능 억제, NKT 세포의 세포분열을 통한 증식억제 등 다양한 방법으로 면역을 억제하기 위한 방법이 사용되고 있다. 그러나 현재 면역억제제로 사용되고 있는 물질들은 높은 비용부담과 장기적인 투여로 인한 부작용이 발생하고 있다. 점차 면역억제제가 사용되는 분야인 장기이식과 자가면역질환이 증가하고 있는 현 시점에서 기존의 문제점을 극복할 수 있는 저렴한 비용의 면역억제제의 개발이 필요한 상황이다.

[0007] 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 등록특허 제10-0808925호(2008.02.25)에는 돼지 LAG-3 융합 이뮤노글로불린이 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1193940호(2012.10.17)에는 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 대해 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1153394호(2012.06.07)에는 레서스 원숭이 PDL-1 융합 이뮤노글로불린이 기재되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-0319126호 (2002.05.13)에는 시디40(CD40)을 위한 수용성 리간드에 대해 개시되어 있다. 그러나, 돼지 CD7의 유전자 및 이를 이용한 융합 이뮤노글로불린에 대해 알려진 바는 없다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허가 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0808925호(2008.02.25)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1193940호(2012.10.17)

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1153394호(2012.06.07)

(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허 제10-0319126호 (2002.05.13)

비특허문헌

[0010]

(비특허문헌 0001) Akbar, A.N., Amlot, P.L., Ivory, K., Timms, A., Janossy, G., 1990. Inhibition of alloresponsive naive and memory T cells by CD7 and CD25 antibodies and by cyclosporine. Transplantation 50, 823-829.

(비특허문헌 0002) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

(비특허문헌 0003) Barcena, A., Muench, M.O., Galy, A.H., Cupp, J., Roncarolo, M.G., Phillips, J.H., Spits, H., 1993. Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid cell development. Blood 82, 3401-3414.

(비특허문헌 0004) Carrel, S., Salvi, S., Rafti, F., Favrot, M., Rapin, C., Sekaly, R.P., 1991. Direct involvement of CD7 (gp40) in activation of TcR gamma/delta+ T cells. Eur. J. Immunol. 21, 1995-1200.

(비특허문헌 0005) Carrera, A.C., Rincon, M., Sanchez-Madrid, F., Lopez-Botet, M., de Landazuri, M.O., 1988. Triggering of co-mitogenic signals in T cell proliferation by anti-LFA-1 (CD18, CD11a), LFA-3, and CD7 monoclonal antibodies. J. Immunol. 141, 1919-1924.

(비특허문헌 0006) Chabannon, C., Wood, P., Torok-Storb, B., 1992. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors. J. Immunol. 149, 2110-2113.

(비특허문헌 0007) Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H.R., Hogan, V., Inohara, H., Kagawa, S., Raz, A., 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. Cancer Res. 63, 8302-8311.

(비특허문헌 0008) Grumayer, E.R., Griesinger, F., Hummell, D.S., Brunning, R.D., Kersey, J.H., 1991. Identification of novel B-lineage cells in human fetal bone marrow that coexpress CD7. Blood 77:64-68.

(비특허문헌 0009) Haynes, B.F., Eisenbarth, G.S., Fauci, A.S., 1979. Human lymphocyte antigens: production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 5829-5833.

(비특허문헌 0010) Kaltner, H., Seyrek, K., Heck, A., Sinowatz, F., Gabius, H.J., 2002. Galectin-1 and galectin-3 in fetal development of bovine respiratory and digestive tracts: comparison of cell type-specific expression profiles and subcellular localization. Cell Tissue Res. 307, 35-46.

(비특허문헌 0011) Kim, J.S., Choi, I., Lee, H.H., Lee, S.J., Na, M., Kim, S.H., Han, J., Bae, J., Choi, S.P., Kim, S.J., Park, C.G., Chun, T., 2012. Generation and evaluation of the efficacy of rhesus monkey soluble cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 in the allogeneic mixed lymphocyte reaction. Biotechnol. Lett. 34, 2191-2197.

(비특허문헌 0012) Lazarovits, A.I., Osman, N., Le Feuvre, C.E., Ley, S.C., Crumpton, M.J., 1994. CD7 is associated with CD3 and CD45 on human T cells. J. Immunol. 153, 3956-3966.

(비특허문헌 0013) Lee, D.M., Patel, D.D., Pendergast, A.M., Haynes, B.F., 1996. Functional association of CD7 with phosphatidylinositol 3-kinase: interation via a YEDM motif. Int. Immunol. 8, 1195-1203.

(비특허문헌 0014) Pace, K.E., Lee, C., Stewart, P.L., Baum, L.G., 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. J. Immunol. 163, 3801-3811.

(비특허문헌 0015) Rabinowich, H., Lin, W.C., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., 1994. Signaling via CD7 molecules on human NK cells. Induction of tyrosine phosphorylation and beta 1 integrin-mediated adhesion to fibronectin. J. Immunol. 153, 3504-3513.

(비특허문헌 0016) Schanberg, L.E., Fleenor, D.E., Kurtzberg, J., Haynes, B.F., Kaufman, R.E., 1991. Isolation and characterization of the genomic human CD7 gene: structural similarity with the murine

Thy-1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 603-607.

(비특허문헌 0017) Sempowski, G.D., Lee, D.M., Scearce, R.M., Patel, D.D., Haynes, B.F., 1999. Resistance of CD7-deficient mice to lipopolysaccharide-induced shock syndromes. J. Exp. Med. 189, 1011-1016.

(비특허문헌 0018) Sempowski, G.D., Cross, S.J., Heinly, C.S., Scearce, R.M., Haynes, B.F., 2004. CD7 and CD28 are required for murine CD4+CD25+regulatoryTcellhomeostasisand prevention of thyroiditis. J. Immunol. 172, 787-794.

(비특허문헌 0019) Subrahmanyam, G., Rudd, C.E., Schneider, H., 2003. Association of T cell antigen CD7 with type II phosphatidylinositol-4 kinase, a key component in pathways of inositol phosphate turnover. Eur. J. Immunol. 33, 46-52.

(비특허문헌 0020) Ward, S.G., Parry, R., LeFeuvre, C., Sansom, D.M., Westwick, J., Lazarovits, A.I., 1995. Antibody ligation of CD7 leads to association with phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate formation in T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 25, 502-507.

(비특허문헌 0021) Yoshikawa, K., Seto, M., Ueda, R., Obata, Y., Fukatsu, H., Segawa, A., Takahashi, T., 1993. Isolation and characterization of mouse CD7 cDNA. Immunogenetics 37, 114-119.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 돼지 CD7의 전체 cDNA 서열을 클로닝 하였고 돼지의 각 조직에서 CD7의 mRNA 발현을 확인하였다. 또한 수용성 돼지 CD7 이뮤노글로불린 융합 단백질을 제조하여 돼지 갈렉틴-3 와 결합하는 사실을 밝혀 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 신규 돼지 CD7의 유전자와 단백질을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은, 돼지 CD7의 세포외 도메인 (extracellular domain)을 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편과 융합하여 이루어진 새로운 재조합 단백질을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 단백질을 포함하는 인간 돼지간 면역 반응 시 인간 T 림프구의 활성 저해용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가지는 돼지 CD7 유전자를 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 돼지 CD7 단백질을 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편으로 이루어진 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 제공한다.

[0019] 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 함유하는 T 림프구 활성 억제용 조성물 및 면역조절제를 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명자들은 돼지 비장 세포 mRNA로부터 RT-PCR 방법으로 찾은 CD7 세포외 도메인(extracellular domain)을 인간 이뮤노글로브린 Fc 단편과 융합하여 새로운 재조합 단백질(돼지 CD7 fuison 인간 Ig)을 제조하였으며, 이를 이용하여 인간 돼지간의 면역 반응 시 인간 T 림프구의 활성을 저해하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0024] 따라서 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가지는 돼지 CD7 유전자를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어서, 돼지 CD7 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 어떤 염기서열도 가질 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 돼지 CD7 단백질을 제공한다.

[0027] 본 발명에 의해 제공되는 신규한 CD7 단백질은 208개의 아미노산(서열번호 2)으로 구성되고, 627bp로 이루어진 서열번호 1의 염기서열에 의해 발현될 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편으로 이루어진 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 제공한다.

[0029] 본 발명의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 돼지 CD7의 세포외 도메인은 인간 대식세포의 galectin-3에 결합할 수 있는 어떤 돼지 CD7의 세포외 도메인도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2의 22-149 번째 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편은 인간 이뮤노글로불린의 어떤 Fc 단편도 될 수 있으며, 예컨대 본 발명의 실시예에서는 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 Fc단편을 사용하였다.

[0031] 본 발명의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 돼지 CD7의 세포외 도메인과 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편 사이에는 flexible region인 힌지(hinge)서열이 포함될 수 있다. 상기 힌지 서열은 인간 이뮤노글로불린의 Fc에 연결된 것을 그대로 사용한다. 본 발명에서 발현된 돼지 CP7 융합 이뮤노글로불린은 약 43 킬로달톤이다.

[0032] 본 발명의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린에서 CD7의 대식세포의 galectin-3와 결합하는 부분, 즉 세포외 도메인(extracellular domain)은 대식세포와 친화성이 있어 T 세포와 NK 세포의 활성 및 발달을 억제하고 세포사멸 신호까지 영향을 줄 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0034] 본 발명의 재조합 발현벡터에 있어서, 상기 돼지 CD7의 세포외 도메인 유전자는 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain)을 발현할 수 있는 어떤 염기서열도 가질 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 64-447 번째 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 재조합 발현벡터에 있어서, 상기 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편 유전자는 인간 이뮤노글로글로블린의 Fc 부위를 코딩하는 어떤 염기서열도 가질 수 있으며, 예컨대 본 발명의 실시예에서는 서열번호 12의 염기서열을 갖는 Fc 유전자를 사용하였다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 상기 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 발현시킬 수 있는 복제가능한 어떤 발현벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 상기 재조합 발현벡터는 pCD7-hIgG/pLNCX2인 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 당업자에게 잘 알려진 전기천공 등의 방법을 이용하여 숙주세포에 형질도입될 수 있다. 상기 숙주 세포는 상업적으로 이용할 수 있는 어떤 세포주도 가능하며, 예컨대 박테리아,

이스트, 곤충 세포, 포유류 세포 등을 포함하나 이에 국한되지 않는 원핵 및 진핵 세포가 될 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 함유하는 T 림프구 활성 억제용 조성물 및 면역조절제를 제공한다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 인간 T 림프구 활성 억제용 조성물 및 면역조절제는 은 인간 T 림프구의 활성 억제를 필요로 하는 어떤 질환에도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 백신의 면역조절 또는 항암 치료제의 면역조절, 또한 인간 및 돼지간의 장기이식에 따른 이식편대숙주 질환의 치료 또는 예방용으로 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 조성물은 상기 돼지의 CD7 융합 이뮤노글로불린뿐만 아니라 제약학적으로 수용가능한 운반체로 구성된다. 이와 같은 조성물은 통상의 기술에 따라 조제될 수 있다. 운반체는 선택되는 투여 경로 가령, 구강, 장관 외, 설하, 직장 또는 비강 등의 경로에 따라 다양한 형태로 될 수 있다. 장관 외 투여를 위한 조성물의 경우에, 운반체는 일반적으로 멸균된 물뿐만 아니라 조성물의 용해도를 촉진시키는 다른 가능한 성분 또는 조성물의 저장 능력을 촉진시키는 성분으로 구성된다. 장관 외 투여 경로는 정맥, 근육 내 또는 피하 주사를 포함한다.

[0042] 본 발명에 따른 조성물은 지속적으로 방출되는 타입이 될 수 있는데, 특히 이종간 면역 질환과 같은 장기간 치료를 하는 경우에 이용된다. 투여되는 약량은 치료를 받을 개체, 특히 원하는 보호 정도를 얻기 위한 환자의 면역계 능력에 따라 달라진다. 투여될 활성 성분의 정확한 양은 치료를 시작하는 의사가 결정되나, 바람직하게는 성인기준으로 일당 1ug 내지 1000 ㎎의 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린이 투여될 수 있다.

[0043] 상술한 바와 같이, 본 발명은 돼지 CD7의 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편으로 이루어진 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 제공한다. 또한, 돼지 CD7의 세포외 도메인 유전자와 인간 이뮤노글로불린 Fc 단편 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하고, 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포도 제공한다. 현재까지 CD7은 T 세포와 NK 세포의 활성 및 발달을 조절하고 갈렉틴-1, -3와 결합하여 세포사멸 신호까지 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다. 따라서 상기 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린은 돼지 면역시스템에서의 CD7의 역할 연구와 장기이식 시 중요한 분자적 정보를 제공할 수 있고, 새로운 면역 조절제로서 작용할 수 있는 매우 유용한 발명이다.

[0044] 본 발명이 적용 가능한 질환은 장기이식 시 일어날 수 있는 면역 거부반응을 들 수 있다. 면역 거부반응의 완화에 있어서 가장 중요한 것은 면역세포들의 활성 및 발달을 조절하는 것에 있다. 특히 T 세포의 활성을 조절하는 것이 면역 거부반응을 완화하는데 중요한데, 그러한 이유는 활성화된 T 세포는 스스로 면역 거부반응을 일으킬 뿐만 아니라 다른 면역세포들과의 상호작용을 통해 면역반응을 더 크게 일으킬 수 있기 때문이다. 본 발명은 T 세포가 활성화되는 동안 CD3 complex와 함께 작용하여 신호를 증폭할 수 있는 CD7의 신호전달을 조절할 수 있는 융합 단백질을 제공함으로써 T 세포를 매개로 일어나는 면역반응을 효과적으로 조절할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명은 새롭게 클로닝된 돼지 CD7 유전자 및 이를 이용한 돼지 CD7 융합 이뮤노글로불린을 제공할 수 있다. 본 발명에 의한 이뮤노글로불린은 T 세포나 NK 세포의 활성 및 발달을 조절하고 세포사멸 신호까지 영향을 줄 수 있는 새로운 면역 조절제 조성물을 제조할 수 있다. 따라서 본 발명은 백신의 면역조절 또는 항암 치료제의 면역조절, 또한 이종간 장기이식에 따른 이식편대숙주 질환의 치료 또는 예방용으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명에 의한 돼지 CD7의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타내는 도면이다.

도 2a는 본 발명에 의한 돼지 CD7와 다른 종의 CD7 단백질 간의 아미노산 서열을 비교한 도면이다.

도 2b는 본 발명에 의한 돼지 CD7와 다른 종의 CD7 단백질 간의 아미노산 서열에 따른 각 포유류간의 유연관계

를 보여주는 계통수를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명에 의한 돼지 CD7의 발현을 돼지의 각 조직에서 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 CD7 융합 Ig 발현을 위한 유전자 구축 모식도를 나타낸다.

도 5는 본 발명에 의한 CD7 융합 Ig 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명에 의한 CD7 융합 Ig 단백질을 정제하여 SDD-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 확인한 사진을 나타낸다.

도 7은 본 발명에 의한 CD7 융합 Ig 단백질이 대식세포의 galectin-3와 잘 결합하는 것을 보여주는 도면이다.

도 8은 pCD7-hIgG와 항 galectin-3 항체를 이용하여 소장조직을 염색한 결과, 상피세포에 서로 연관되게 염색이 되는 것을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0048] **실시예 1: pCD7의 cDNA 서열 생성과 유전자 발현 분석**

[0049] 성체 돼지의 비장에서 분리하여 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1㎖당 200㎕의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고 추출한 mRNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자 염기 서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 656bp에 달하는 돼지의 CD7 유전자를 획득하였다. 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이고 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

[0050] 또한, 이렇게 얻어진 CD7 유전자를 확인하기 위해 nested PCR을 실시하였다. 이때 사용한 프라이머는 아래와 같다(표 1). 이상과 같이 연쇄중합반응으로 얻은 돼지 CD7 유전자는 pGEM-T easy 벡터(promega)에 클로닝 하였다. 상기에서 찾아낸 유전자의 염기서열은 자동 DNA서열 분석기(310 automatic sequencer, ABI)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 이 때 모든 서열은 유전자의 양쪽 방향으로 분석 되었으며, 모든 제한효소의 위치도 확인 되었다. 상기 유전자에 의해 발현되는 단백질은 208개의 아미노산으로 구성되고, 이 단백질과 다른 동물들(인간, 소, 생쥐, 흰쥐)의 아미노산 서열을 비교 분석한 결과를 나타내었다(도 2a). 또한 현재까지 밝혀진 아미노산 서열을 통해 각 포유류 간의 유연관계를 알아보기 위해 계통수(phylogenetic tree)를 확인하였다(도 2b).

표 1

[표 1] CD7 유전자 획득에 사용되어진 primer set

[0051]

Gene name	*GenBank Accession No.*	*Primer*	*Sequence (5'-3')*	*Size (bp)*
pCD7	AK346550	Forward	TTCCTGCCACCCAGCGAGATGGC(서열번호 3)	656
		Reverse	GTGCTGCAGGCTCACTGGAACT(서열번호 4)	
pCD7 nested	AK346550	Forward	ATCTACCTGAAGCGAGTACTGCCGA(서열번호 5)	482
		Reverse	GTGCTGCAGGCTCACTGGAACT(서열번호 6)	
GAPDH	NM_001206359.1	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC(서열번호 7)	271
		Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG(서열번호 8)	

[0052] 이후, 돼지의 여러 조직에서의 CD7의 발현을 확인하기 위해 나이와 성별, 종이 같은 세 마리의 돼지의 각 조직에서 전체 RNA를 분리하였다. 그 후, 앞서 설명한 방법대로 RT-PCR을 상기의 프라이머 세트로 진행하여 482bp의 RT-PCR 생성물을 확인하였다. mRNA의 정량을 위한 내적 대조군(internal control)은 GAPDH의 프라이머 세트를 이용하여 271bp의 RT-PCR 생성물을 확인하였다(도 3).

[0053] **실시예 2: 단백질 발현 플라스미드 제조, 단백질 발현 및 정제**

[0054] 돼지 CD7 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해서 돼지 CD7 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자를 포유류의 발현벡터인 pLNCX2(CLONTECH)에 클로닝하였다. 먼저 5' 말단에 제한효소 XhoI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 3' 말단 또한 BamHI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 인간이뮤노글로불린(hIgG)의 Fc region의 cDNA는 인간 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)에서 특이적인 프라이머로 RT-PCR을 수행하여 얻었다. 그 후 인간이뮤노글로불린(hIgG)의 Fc region(서열번호 11)의 cDNA(서열번호 12)를 돼지 CD7 세포외 도메인(extracellular domain)과 유전자의 3' 말단 쪽에 fusion 시켰다. 이때 사용되어진 제한효소 부위는 5' 말단에 제한효소 BamHI, 3' 말단에 제한효소 NotI을 사용하였다. 결국 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린을 발현하는 재조합 벡터 pCD7-hIgG/pLNCX2를 완성하였다. 도 4는 CD7 fusion Ig 발현을 위한 유전자 구축 모식도이다. ECD는 돼지 CD7의 Extracellular domain을 의미하고, Hinge는 돼지 CD7와 인간 이뮤노글로불린의 연결부위를 의미하고, CH2 와 CH3 는 hIgG의 Fc 부위를 의미한다. 그리고 각각 Tetracycline off system의 293GPG세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO세포를 사용하여 형질전환시켰다

표 2

[표 2] CD7 단백질 발현 플라스미드 제조에 사용되어진 primer set

Gene name	*GenBank Accession No.*	*Primer*	*Sequence (5'-3')*	*Size (bp)*
pCD7	AK346550	Forward	CCGCTCGAGATGGCCCGGCTCCTGG(서열번호 9)	465
		Reverse	CGCGGATCCAGAGAGGGCCATGTGTGT(서열번호 10)	

[0055]

[0056] 293GPG 세포를 6-well 조직 배양 플레이트에 well 당 1 X 10^5 세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70-80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 무 혈청 DMEM 배지에서 1-2㎍의 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 발현 벡터 DNA를 6-8㎕의 LIPOFECTAMINE PLUS(Invitrogen)를 사용하여 감염시켰다. 감염시킨 293GPG 세포를 24시간 배양하여 virus(Retro viurs)를 포함하는 배양상층액을 이용 숙주(CHO)세포를 4-5시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 24시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 숙주 세포의 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질 발현 확인을 위해 무 혈청 DMEM 배지에서 숙주 세포를 배양하여 얻은 상층액을 ELISA kit(R&D Systems)을 이용하여 발현량을 확인하였다.

[0057] 또한, 숙주 세포를 배양하여 웨스턴블로팅(Western blotting)을 통해 돼지 CD7 fusion 이뮤노글로불린 단백질이 발현되는 것을 측정하였다. 먼저 돼지 CD7 fusion 이뮤노글로불린 단백질이 과발현된 CHO 세포를 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 cell lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, pH 7.2)로 lysis 시킨 후, 15% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동시켜 Immobilon P membrane (Millipore Corporation)에 transfer하였다. 그 후, 인간 이뮤노글로불린 분자에 특이적으로 결합하는 goat anti-human IgG-HRP 항체(GE healthcare)를 membrane에 처리한 후 ECL system (GE healthcare)을 이용하여 발색시켜 CD7 fusion 이뮤노글로불린 단백질의 발현 정도를 측정하였다. 내적 대조군(internal control)으로서 항 β-actin 항체를 사용하였다(도 5).

[0058] 이상과 같은 방법으로 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질이 포유류 세포에서 과발현된다는 것을 확인한 다음 무 혈청 배지에 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질 과발현 세포를 배양하여 그 배양상층액으로부터 pCD7-hIgG를 정제하기 위하여 Protein A Sepharose (Amersham) 컬럼에 완충액A(20mM sodium-phophate pH7.0)을 통과시킨 다음 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질을 함유한 배양상층액을 통과시켰으며, 흡착되는 단백질들을 완충액B(0.1M Citric acid-NaOH pH3.0)를 이용하여 용출시켜 모았다. 용출된 시료로 SDS-폴리아크릴 아마이드 겔 전기영동을 실시한 다음 쿠마지블루 염색을 하여 발현된 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질을 확인하였다(도 6). 확인된 단백질들을 완충액 A에 투석하여 평형에 이르게 한 후 70℃에 보관하였다가 돼지 galectin-3 와 결합 활성도(binding activity)를 측정하기 위한 실험에 사용하였다.

[0059] **실시예 3: 돼지 galectin-3와의 결합 활성도 측정**

[0060] 돼지 CD7 fuison 이뮤노글로불린 단백질과 돼지의 galectin-3의 결합 활성도(binding activity)를 확인하기 위해, competition assay를 수행하였다. 먼저 항 galectin-3 항체가 galectin-3에 결합하는 것을 막기위해, galectin-3 를 발현하는 세포인 돼지 대식세포(macrophage) 세포주(3D4/31)에 대조군 이뮤노글로불린(human IgG_1)과 정제한 pCD7-hIgG 를 처리하였다. 그 후, 항 galectin-3 항체를 이용해 각 샘플들을 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 그 결과 대조군 이뮤노글로불린에 비해 pCD7-hIgG를 처리한 대식세포에서 항 galectin-3 항체의 발현이 현격하게 감소한 것을 보아 돼지 CD7 fusion 이뮤노글로불린 단백질이 대식세포의 galectin-3와 잘 결합한다는 것을 확인하였다(도 7).

[0061] 이상의 결과를 확인하기 위해 돼지 소장조직을 정제한 pCD7-hIgG로 염색하고 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통해 분석하였다. pCD7-hIgG와 항 galectin-3 항체를 이용하여 소장조직을 염색한 결과, 상피세포에 서로 연관되게 염색이 되는 것을 확인하였다(도 8).

[0062] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

```
  1 - ATGGCCCGGCTCCTGGGGCTCCCGCTGCTCCCCCTGCTCCTTGCCCTCTCTTTCAACCGG - 60
  1 - M  A  R  L  L  G  L  P  L  L  P  L  L  L  A  L  S  F  N  R   - 20

 61 - GCTGCCCAAGAGGTGTGGCAGTCCCCCGGCCATGCCATCGCTTTGGAAGTAGGCTCCATC - 120
 21 - A  A  Q  E  V  W  Q  S  P  G  H  A  I  A  L  E  V  G  S  I   - 40

121 - CACATCACCTGCTCCAGCCGTGGGCCCCTGCTGGGCATCTACCTGAAGCGAGTACTGCCG - 180
 41 - H  I  T  C  S  S  R  G  P  L  L  G  I  Y  L  K  R  V  L  P   - 60

181 - AAGGCCAGCAACGTGATCTACTACGAGGAAGGGAGGGAGGCCACCGTGGACGAGCGCTTC - 240
 61 - K  A  S  N  V  I  Y  Y  E  E  G  R  E  A  T  V  D  E  R  F   - 80

241 - AGGGGCCGCGTCACCTTCTCGGGGCTGCAGCACAACCTGACCATCAGCGTGCACCGCCTG - 300
 81 - R  G  R  V  T  F  S  G  L  Q  H  N  L  T  I  S  V  H  R  L   - 100

301 - CAGCTGCCCGACACGGGGGCCTACGCCTGCCAGGCCATCATGGACAGCGAGGTCTGGGGC - 360
101 - Q  L  P  D  T  G  A  Y  A  C  Q  A  I  M  D  S  E  V  W  G   - 120

361 - CCCGGGACCCTGGTCGTGGTGACAGACAAACTGCCTCAAGCTGCGAACAGCTGCCGGGAG - 420
121 - P  G  T  L  V  V  V  T  D  K  L  P  Q  A  A  N  S  C  R  E   - 140

421 - GCTCAGTGGACACACATGGCCCTCTCTGCAGCCCTGGCTGCGGTCTGCTTCCTCGCCGGG - 480
141 - A  Q  W  T  H  M  A  L  S  A  A  L  A  A  V  C  F  L  A  G   - 160

481 - CTGGGGCTGGGGGCAGTGTGTGCGCGCCGAGGGACACAGATCCGCAGACTCTGCTGTGCG - 540
161 - L  G  L  G  A  V  C  A  R  R  G  T  Q  I  R  R  L  C  C  A   - 180

541 - GGGGGCGAGAGCTCTGTGTGTGTCATCTACGAGGACATGTCCCTCAGCCGCAGCAACACC - 600
181 - G  G  E  S  S  V  C  V  I  Y  E  D  M  S  L  S  R  S  N  T   - 200

601 - GTGTCCCTCCCCAGCCAGTTCCAGTGA - 627
201 - V  S  L  P  S  Q  F  Q  *  X                                 - 220
```

도면2a

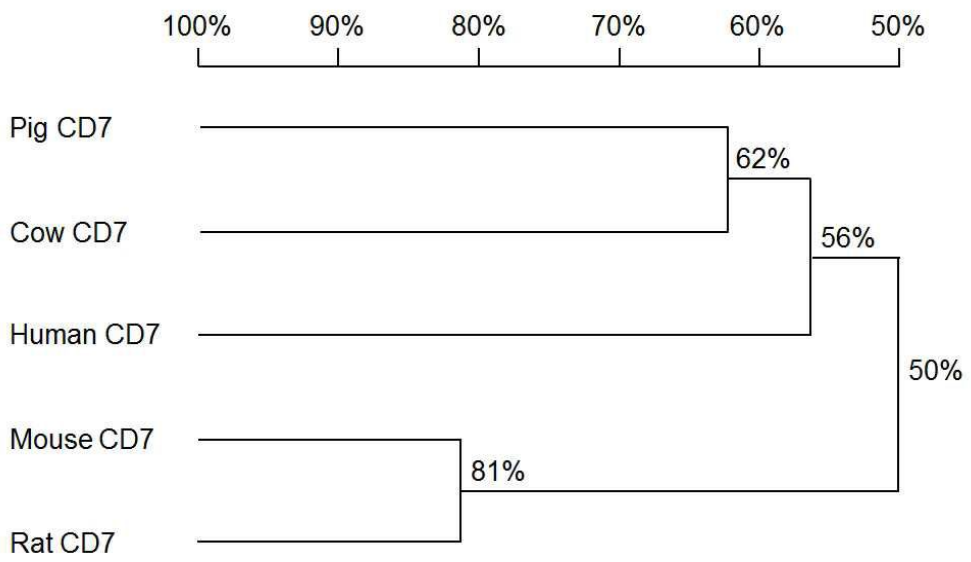
```
                1←——— signal peptide ———→←———————— ECD ———————— 60
Pig CD7         MARLLGLPLL PLLLALSF.. ..NRAAQEVW QSPGHAIALE VGSIHITCSS RGPLLGIYLK
Human CD7       MAGPPRLLLL PLLLALARGL PGALAAQEVQ QSPHCTTVPV GASVNITCST SGGLRGIYLR
Cow CD7         MVGLLGLLLF PLL..... ...QAAGEVW QSPRKTIALE GDSVNITCST PGTLHGIYLK
Mouse CD7       MTQQAVLALL LTLAGILPG. ..PLDAQDVH QSPRLTIASE GDSVNITCST RGHLEGILMK
Rat CD7         MTQALLALLL TLARILPG.. ..PLDAQEVH QSPRVVIASE GESINITCST RGDLEGLIMK

                61 ———————————————— ECD ———————————————— 120
Pig CD7         RVLPKASNVI YYEEGREATV DERFRGRVTF SGLQHNLTIS VHRLQLPDTG AYACQAIMDS
Human CD7       QLGPQPQDII YYEDGVVPTT DRRFRGRIDF SGSQDNLTIT MHRLQLSDTG TYTCQAITEV
Cow CD7         KTWPNNSDVI YYEDGSEPTV DPQFQGRIAY SGLQSNLTIS LYHLQLADTG GYTCVAIMDD
Mouse CD7       KIWPQAYNVI YFEDRQEPTV DRTFSGRINF SGSQKNLTIT ISSLQLADTG DYTCEAVRKV
Rat CD7         RIWPQASNVI YFEDELEPTV DSAFSGRINF SGSQKNLTII MSLLQEADTG AYTCEAVRKV

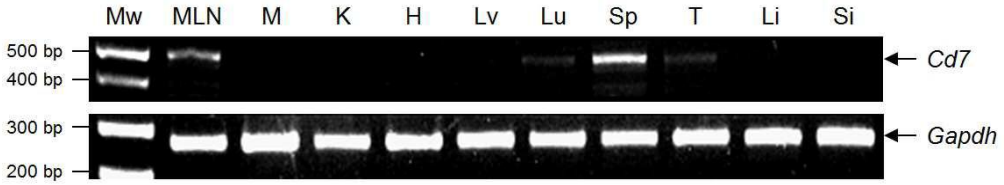
                121———————————————— ECD ———————————————— 180
Pig CD7         EVWGPGTLVV VTDKLPQAAN SCREA..... ..........  .......... ..QWTHMALS
Human CD7       NVYGSGTLVL VTEEQSQGWH RCSDAPPRAS ALPAPPTGSA LPDPQTASAL PDPPAASALP
Cow CD7         KIFGPGTLVM VTDQLPQAAN TCQES..... ..........  .......... ..WPIHFALP
Mouse CD7       SARGLFTTVV VKEKSSQEAY RSQEP..... ..........  .......... ..LQTSFSFP
Rat CD7         SVHGLFTTVV VKEKLSHEAY RSQEP..... ..........  .......... ..LQTSVSLP

                181←——— TM ———→←———————— CY ———————→240
Pig CD7         AALAAVCFLA GLGLGAVCAR RGTQIRRLCC AGGE.SSVCV IYEDMSLSRS NTVSLPSQFQ
Human CD7       AALAVISFLL GLGLGVACVL ARTQIKKLCS WRDKNSAACV VYEDMSHSRC NTLSSPNQYQ
Cow CD7         TALAVGFFLI GLGLGAVCVL IRTQIQKLCC AKDK.SPVFV IYEDMSHSRC NTMSIPNQYQ
Mouse CD7       AAIAVGFFFT GLLLGVVCSM LRKIQIKKLC ASGIKESPCV VYEDMSYSNR KTPCIPNQYQ
Rat CD7         AAIAVSFFLT GLILGVLCSM LRKTQIKKLC ASGNKDSLCV VYEDMSCSNR KIPCTPNQYQ
                                                          ****
```

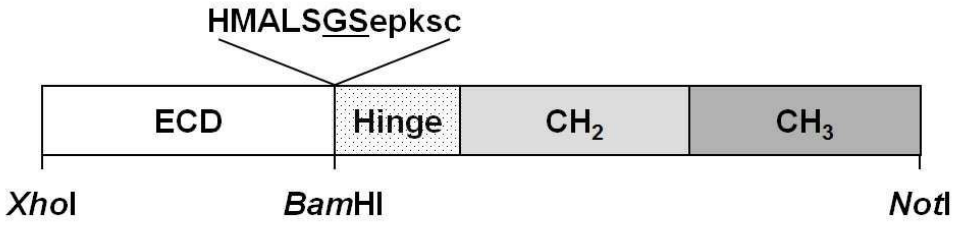
도면2b



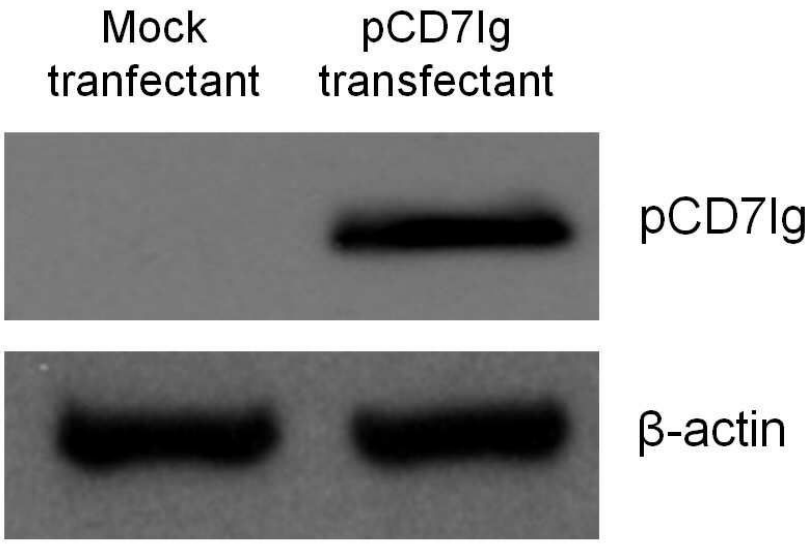
도면3


Mw
MLN
M
K
H
Lv
Lu
Sp
T
Li
Si
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
Cd7
Gapdh

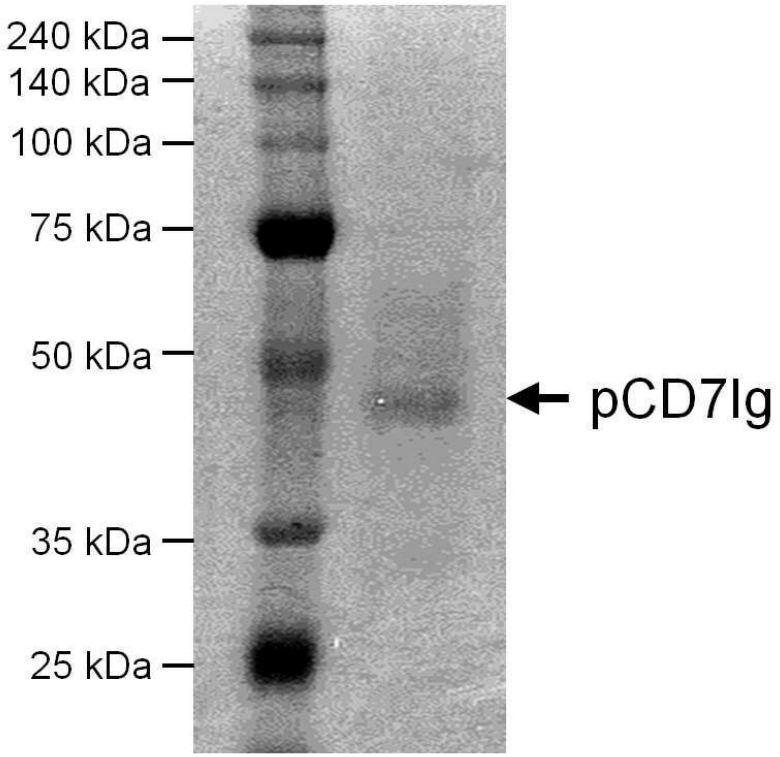
도면4


HMALSGSepksc
ECD
Hinge
CH2
CH3
XhoI
BamHI
NotI

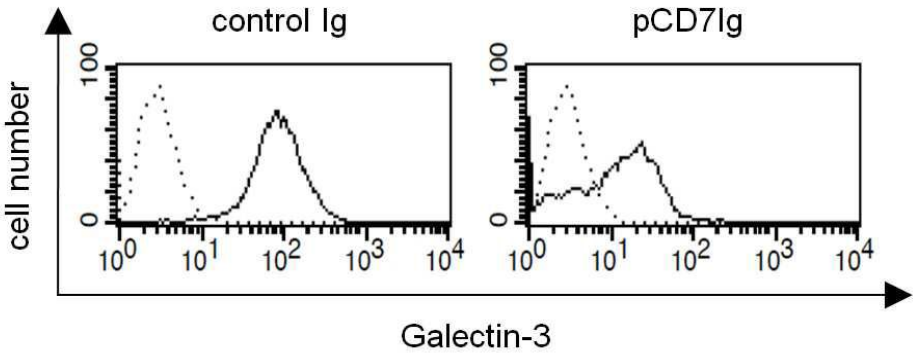
도면5


Mock
tranfectant
pCD7Ig
transfectant
pCD7Ig
β-actin

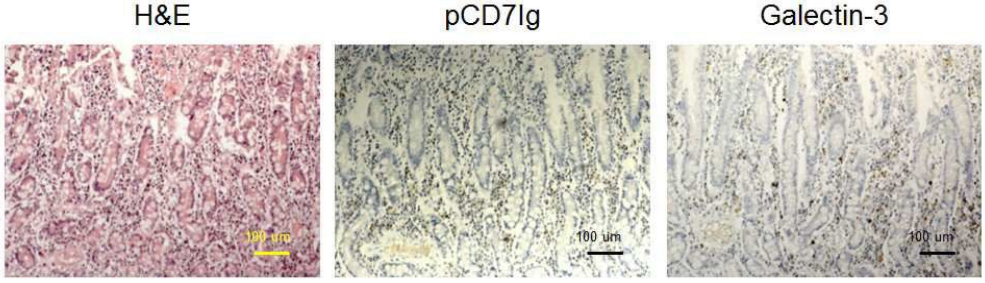
도면6


240 kDa
140 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
35 kDa
25 kDa
pCD7Ig

도면7


control Ig
pCD7Ig
cell number
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Galectin-3

도면8


H&E
pCD7Ig
Galectin-3
100 um
100 um
100 um

서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Pig CD7 gene and CD7 Fusion Immunoglobulin using the same

<130> P11-130925-01

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 627

<212> DNA

<213> Sus scrofa domesticus

<400> 1

atggcccggc tcctggggct cccgctgctc cccctgctcc ttgccctctc tttcaaccgg 60

gctgcccaag aggtgtggca gtcccccggc catgccatcg ctttggaagt aggctccatc 120

cacatcacct gctccagccg tgggcccctg ctgggcatct acctgaagcg agtactgccg 180

aaggccagca acgtgatcta ctacgaggaa gggagggagg ccaccgtgga cgagcgcttc 240

aggggccgcg tcaccttctc ggggctgcag cacaacctga ccatcagcgt gcaccgcctg 300

cagctgcccg acacgggggc ctacgcctgc caggccatca tggacagcga ggtctggggc 360

cccgggaccc tggtcgtggt gacagacaaa ctgcctcaag ctgcgaacag ctgccgggag 420

gctcagtgga cacacatggc cctctctgca gccctggctg cggtctgctt cctcgccggg 480

ctggggctgg gggcagtgtg tgcgcgccga gggacacaga tccgcagact ctgctgtgcg 540

gggggcgaga gctctgtgtg tgtcatctac gaggacatgt ccctcagccg cagcaacacc 600

gtgtccctcc ccagccagtt ccagtga 627

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Sus scrofa domesticus

<400> 2

Met Ala Arg Leu Leu Gly Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Phe Asn Arg Ala Ala Gln Glu Val Trp Gln Ser Pro Gly His Ala
20 25 30

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

35 40 45

Pro Leu Leu Gly Ile Tyr Leu Lys Arg Val Leu Pro Lys Ala Ser Asn
50 55 60

Val Ile Tyr Tyr Glu Glu Gly Arg Glu Ala Thr Val Asp Glu Arg Phe
65 70 75 80

Arg Gly Arg Val Thr Phe Ser Gly Leu Gln His Asn Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Val His Arg Leu Gln Leu Pro Asp Thr Gly Ala Tyr Ala Cys Gln Ala
100 105 110

Ile Met Asp Ser Glu Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Val Val Thr

115 120 125

Asp Lys Leu Pro Gln Ala Ala Asn Ser Cys Arg Glu Ala Gln Trp Thr
130 135 140

His Met Ala Leu Ser Ala Ala Leu Ala Ala Val Cys Phe Leu Ala Gly
145 150 155 160

Leu Gly Leu Gly Ala Val Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gln Ile Arg Arg
165 170 175

Leu Cys Cys Ala Gly Gly Glu Ser Ser Val Cys Val Ile Tyr Glu Asp
180 185 190

Met Ser Leu Ser Arg Ser Asn Thr Val Ser Leu Pro Ser Gln Phe Gln
195 200 205

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 3

ttcctgccac ccagcgagat ggc 23

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 4

gtgctgcagg ctcactggaa ct 22

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

atctacctga agcgagtact gccga 25

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

gtgctgcagg ctcactggaa ct 22

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 7

atgaccacag tccatgccat c 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 8

cctgcttcac caccttcttg 20

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 9

ccgctcgaga tggcccggct cctgg 25

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 10

cgcggatcca gagagggcca tgtgtgt 27

<210> 11

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Cys
225 230

<210> 12
<211> 699
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcacga 420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggttgttga 699