(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014154
(43) 공개일자 2015년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0089471
(22) 출원일자 2013년07월29일
심사청구일자 2013년07월29일

(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)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포 활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 면역억제제**

(57) 요 약

본 발명은 Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포(Nature Killer T Cell) 활성 억제용 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 면역억제제를 제공하는 것이다. 본 발명에 의하면, Phc2 단백질의 발현을 조절함으로써 생체 내 면역계에 중요한 작용을 하는 NKT 세포의 분화 및 활성을 제어할 수 있어, 본 발명은 자가면역질환 등의 치료 및/또는 예방 분야에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

SEQUENCE

```
   1 atggagaatg agctgccagt cccccacaca tccaaccggg ccagtgtcac caccaacacc
  61 agtgggacca atagtagcag tggctgcatc agcagcagcg gcggtggtgg tggcagcggt
 121 ggccgcccca ctgcacccca gatttctgtg tacagtggga ttcctgaccg gcagactgtg
 181 caggtgatcc agcaggccct gcacaggcag cccagcacgg cggcgcagta cctgcagcag
 241 atgtatgctg cccagcaaca acacctcatg ctgcagacag cggccttaca gcagcagcac
 301 ctcagcagcg cgcagctcca gagcctggca gcagtgcagc aggcaagcct ggtggccaac
 361 agacaaggaa gtactcccgg tagcagtgtg tcctcacagg ctcctgccca gtcttcttca
 421 ctcaatctgg cagcctcccc ggcagcagcc cagcttatca accgggcaca gagtgtcaat
 481 tcagccgcag cctcgggcct tgcccagcag gccgtgctct tgggcaacac gtcctccctt
 541 gccctgactg ccagccaagc acagatgtac ctcagggcgc agatgctcat cttcacgccc
 601 acggccaccg tcgctactgt tcagcctgag ctctgcactg gttcccctgc tcggcccctt
 661 acccctgccc aggtacagaa cctgacgctt cgcacccagc agacaccagc agcagcagcc
 721 tcgggccctc cccccaccca gcctgtcctg cccagcttgg ccctgaaacc cacacccagc
 781 agtagccagc ctctgcctgc cccaccacag ggcaggacca tggctcaggg ttcccctgcg
 841 ggtgccaagc ctagtgggac tgacaatgcg ccagagacac tcaaggcagg agatggtaac
 901 tgcaacatgg agggccggcc agggcctggc cgggcagttc ctgctgtggc tactcacccg
 961 ctcattgcac cagcttatgc tcacctgcag tcacaccagc tcctcccaca gccgccagcg
1021 aagcacccac agccccagtt tgtggcccaa cagcaaccac agccaccacg acctgcaccc
1081 caagtccagt cccaacccca gcttgcctca gtctccccaa gcctggccct acagtccagt
1141 ccagaagacc atgccctgcc tctaggctca gtgacacagg ccctgcctct ccagtgctct
1201 accacgcatg tccacaagcc agggaacagc cagcagtgtc accttcccac actagacacc
1261 gggtctcaga atggacatcc tgaggggtggg tcccatcccc cccagccgaag gttccagcac
1321 acctcagctg tgatcttaca ggtgcagccc gcttctccag ttacgccccа gcagtgtgct
1381 cccgatgact ggaaggaagt ggtgccagcg gagaagagtg tgcctgtggc tcggccaggc
1441 ccgtccccac accagcaagc catcatccct gccatacccg gtggcttgcc tggacccaag
1501 agtcccaaca tccagcagtg cccagctcac gagacagggc agggcattgt tcatgcactg
1561 accgacctca gcagcccccgg catgacctca gggaacggaa actctgcctc cagcatcgcc
1621 ggcactgccc cccagaatgg tgaggaataaa ccaccacagg ccattgtgaa accccaaatc
1681 ctgacgcatg ttatcgaagg gtttgtgatc caggaggggg cggagccttt cccggtggga
1741 cgctcgtccc tgctggtagg gaatctcaaa aagaagtatg cacaggggtt cttgcctgag
1801 aagcctccac agcaggacca caccaccacc accgactcag agatggagga gccctacctg
1861 caagaatcca aagaggaggg cactcccctc aaactcaagt gtgagctctg tggacgggtg
1921 gactttgcct acaagttcaa gcgttccaag cgcttctgtt ccatggcttg tgcaaagagg
1981 tataatgtgg gatgcaccaa acgagtggga ctttttcact caggccgaag caagctgcag
2041 aaggcagggа ccacaaccca caaccgccga cgggccagca aggccagtct gcccacactc
2101 accaaggaca ccaagaagca gccctcaggc actgtacccc tttcagttac tgccgccttg
2161 cagctggcgc acagccagga ggactccagc cggtgctcag ataactccag ctatgaggag
2221 cccttgtcac ccatctcagc cagctcgtcc acctcgcgac ggcgccaagg ccagaggggac
2281 ctggatctcc ctgacatgca catgagggac cttgtgggcg tgggacacca cttcctgccg
2341 agcgagccca caaaatggaa tgtagaggat gtctatgagt tcatccgctc tctgccaggc
2401 tgccaggaga tcgcggagga gttccgtgcg caggagattg atgggcaagc cttgctgctg
2461 ctcaaggagg accacctaat gagcgccatg aacatcaagc tagggcccgc cctgaagatc
2521 tacgcacgca tcagcatgct caaggactcc tag
```

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120006904
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)일반연구자-기본(유형I)
연구과제명 Phc2 유전자 적중 생쥐를 이용한 Phc2가 T림프구 발달 및 활성에 미치는 기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포(Nature Killer T Cell) 활성 억제용 조성물.

청구항 2

제1항 기재의 NKT 세포 활성 억제용 조성물을 유효성분으로 함유하는 면역억제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 면역억제제는 자가면역질환 또는 장기 이식 거부 반응에 대한 예방 또는 치료를 위해 제공되는 것을 특징으로 하는 면역억제제.

청구항 4

인간외 동물에서, Phc2 유전자의 발현을 조절함으로써 NKT 세포의 발달 또는 활성을 조절하는 방법.

청구항 5

Phc2 발현을 억제하는 Phc2의 siRNA를 유효성분으로 함유하는 면역억제제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포(Nature Killer T Cell) 활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 면역억제제에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 Phc2 발현을 억제하여 NKT 세포의 분화와 발달을 제어하여 NKT에 의해 매개되는 자가면역질환 및 장기이식 거부 반응 등의 예방 또는 치료에 유용한 NKT 세포 활성 억제용 조성물, 이를 이용한 면역억제제 및 NKT 세포 활성 조절 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] NKT 세포는 자연살해세포(nature killer cell)의 특징과 T 세포의 특징을 동시에 가지는 세포로서, 자연살해세포나 T 세포와는 다른 독립적인 기능을 수행한다. NKT 세포는 내재면역계에 포함되는 세포로서 대표적인 기능으로서는 암세포에 대한 면역, 바이러스나 박테리아에 의한 감염에 대한 저항, 그리고 자가면역질환을 예방하는 기능을 수행하고 있다 (Wu and Van Kaer, 2011).

[0003] 흉선에서의 T 세포의 발달 동안 T 세포 수용체 유전자의 재조합과 T 세포 수용체 알파 사슬과 베타사슬의 무작위 조합에 의해서 흉선 세포의 다양성이 나타난다. 그러한 세포들로부터 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절 T 세포로 분화되는데, Va14-Ja18 T 세포 수용체를 가진 세포는 iNKT 세포로 발달하도록 선택된다. T 세포가 발달하는 과정 중에서 CD4/CD8 이중양성 세포단계에서 NKT 세포로의 발달이 진행된다(Egawa et al., 2005).

[0004] NKT 세포는 다른 T 세포들과는 다르게 MHC class I 과 유사한 분자인 CD1d 로부터 제시된 당지질 항원에 대한 반응을 수행한다. NKT 세포의 활성이 T 세포 매개의 면역반응보다 먼저 일어날 수 있기 때문에, 초기면역반응의 개시에 중요한 역할을 수행한다 (Ranson et al., 2005).

[0005] 최근의 몇몇 보고들에서 NKT 세포의 발달과 성숙에 영향을 주는 새롭고 흥미로운 사실들이 보고되고 있다. 그 중 하나로 작은 아답터 단백질 중 하나인 SAP를 들 수 있다. SAP는 T 세포와 NK 세포에서 발현되는 단백질로서, X-연관림프세포증식성증후군 (X-linked lymphoproliferative syndrome)에서 돌연변이가 나타난다. 인간과 생쥐에게서 SAP 가 결핍된 경우에 NKT 세포의 발달에 현저한 장애가 나타난다(Nichols et al., 2005).

[0006] 세포가 발달 및 분화하는 과정에서 다양한 기작에 의하여 많은 유전자의 발현이 억제 또는 개시된다. 이처럼 세포의 발달 상태에 따라 유전자의 발현이 조절되고 유지되는 것을 후성유전이라 한다. 후성유전을 조절하는 기작으로는 대표적으로 DNA 메틸화 및 아세틸화를 들 수 있다. 추가로 유전자에 단단히 결합하여 유전자의 전사를

막음으로써 유전자의 침묵 (gene silencing)을 유도하는 단백질군이 있는데, 이를 폴리콤 그룹 (polycomb group)이라고 한다(Sauvageau and Sauvageau, 2010). Phc2 유전자는 다른 폴리콤 그룹 단백질들과 복합체를 이루면서 목적 유전자의 발현을 억제하는데, Phc2가 억제된 생쥐에서 면역세포의 증식이 억제됨으로써 파이어스패치(Peyer's patch)의 발달에 장애가 발생한다(Sato et al., 2006).

[0007] 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.

[0008] 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 등록특허 10-0833542(2008.05.29)에는 PACSIN-3의 유전자 억제를 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이를 포함하는 NKT 림프구 활성억제용 조성물이 공개되어 있고, 대한민국 등록특허 10-1263103(2015.05.09)에는 CD1d 발현을 감소조절하는 US2 단백질 유전자를 포함하는 자연 살해 T 세포활성 억제용 조성물 및 이를 이용한 자연 살해 T 세포 활성 억제 방법이 공개되어 있다. 조규원 학위논문(석사)(고려대학교 대학원 : 생명산업과학과(2009.02))에는 마우스 NKT cell line인 DN32D3에 α-gal을 stimulation 했을 때, phc2의 발현과 phc2 과발현(overexpression) 시에 DN32D3 활성에 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구가 개시되어 있다.

[0009] 그러나, Phc2 발현을 억제하여 NKT 세포의 발달과 활성을 조절하여 면역억제에 활용하는 것에 대해 알려진 바는 없다.

[0010] 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

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0833542(2008.05.29)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 10-1263103(2015.05.09)

(특허문헌 0003) 조규원 학위논문(석사) 고려대학교 대학원 : 생명산업과학과(2009.02)

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A, Littman DR. Genetic evidence supporting selection of the Va14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. Immunity. 2005 Jun;22(6):705-16.

(비특허문헌 0002) Nichols KE, Hom J, Gong SY, Ganguly A, Ma CS, Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL, Koretzky GA, Stein PL. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. Nat Med. 2005 Mar;11(3):340-5.

(비특허문헌 0003) Ranson T, Bregenholt S, Lehuen A, Gaillot O, Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Berche P, Di Santo JP. Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric Listeria monocytogenes infection. J Immunol. 2005 Jul;175(2):1137-44.

(비특허문헌 0004) Sato T, Endoh M, Yoshida H, Yasuo S, Katsuno T, Saito Y, Isono K, Koseki H.

Mammalian Polycomb complexes are required for Peyer's patch development by regulating lymphoid cell proliferation. Gene. 2006 Sep;379:166-74.

(비특허문헌 0005) Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. Cell Stem Cell. 2010 Sep;7(3):299-313.

(비특허문헌 0006) Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. Front Biosci (Schol Ed). 2011 Jan;1(3):236-51.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] NKT 세포의 발달에 영향을 주는 인자에 대한 연구는 계속 진행되고 있는 가운데, 본 발명자들은 폴리콤 그룹 단백질 중 하나인 Phc2 단백질의 발현이 유전적으로 억제된 생쥐에서는 말초 면역기관에서 존재하는 NKT 세포의 수가 야생형의 생쥐에 비해서 감소하며 흉선에서 일어나는 NKT 세포의 발생이 제한되어, Phc2 유전자가 NKT 세포의 분화 및 발달에 중요한 인자임을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 본 발명자들은 Phc2의 억제에 의해 NKT 세포의 발달 장애가 발생하며, 후성유전에 의한 NKT 세포 발달 기전에 대한 방향을 제시하였다.

[0014] 따라서 본 발명은 Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포(Nature Killer T Cell) 활성 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 또는 장기이식 거부 반응의 예방 및 치료를 위한 면역억제제를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 Phc2 유전자의 발현을 조절함으로써 NKT 세포의 발달과 활성을 조절할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 Phc2 발현을 억제하는 유전자를 포함하는 NKT 세포(Nature Killer T Cell) 활성 억제용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 의해, Phc2의 억제에 의해 NKT 세포의 발달 장애가 발생하는 것이 확인되었다. 이에 기초하여 후성유전에 의한 NKT 세포의 발달의 기전이 제시되고 이를 이용하여 NKT 세포 활성 억제용 조성물이 제공될 수 있다.

[0020] 본 발명에서, 상기 Phc2 발현을 억제하는 유전자는 발현벡터로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 발현벡터는 상기 Phc2 발현을 억제하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 한 특별한 제한이 없다. 상기 발현벡터는 숙주세포로 도입될 수 있다. 본 발명은 Phc2의 siRNA의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어, 'siRNA'는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있어 타겟이 되는 유전자의 발현을 특이적으로 억제할 수 있는 핵산분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619 등). 본 발명의 siRNA는 직접 화학적으로 합성하거나(Sui G 등, (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5515-5520), 인비트로 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR 등, (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian celss, Science 296: 550-553) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 상기 NKT 세포 활성 억제용 조성물을 유효성분으로 함유하는 면역억제제를 제공한다.

[0023] 본 발명에 있어, 면역억제제가 적용 가능한 면역질환은 NKT 세포들의 활성화로 인해 발생하는 어떠한 질환도 될 수 있으며, 구체적으로 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 신염(nephritis), 골 관절염(osteoarthritis) 및 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus)와 같은 자가면역 질환, 염증성 장

질환(inflammatory bowel)과 같은 급성 염증성 질환, 및 천식(asthma) 및 피부염(dermatitis)과 같은 알레르기성 질환에 대한 치료제로서 광범위하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 면역억제제는 장기 이식 거부 반응과 같은 분야에서도 효과적으로 이용될 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어, 자가면역질환은 숙주조직에 반응하는 항체 및 내인성의 자기 펩타이드에 스스로 반응하는 면역세포들이 유도되는 질환으로, 자기 면역반응을 조절하는 시스템에 이상이 생겨 나타나는 것으로, 자가 항체나 자가 항원에 반응하는 NKT 세포들의 활성화로 인해 발생하는 질환을 통칭한다.

[0025] 바람직하게 본 발명의 면역억제제는 자가면역질환 또는 장기 이식 거부 반응에 대한 예방 또는 치료를 위해 제공되는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 Phc2 발현을 억제하는 Phc2의 siRNA를 유효성분으로 함유하는 면역억제제를 제공한다.

[0027] 본 발명에 있어 면역억제제인 약학적 조성물(이하, 약학적 조성물이라고 함)은 본 발명의 Phc2 발현 억제 유전자와 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 함유하는 것을 포함하며, 상기 Phc2 발현 억제 유전자는 적절한 벡터, 예컨대 동물세포 발현용 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 등에 삽입된 형태로 포함하는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명의 Phc2 발현 억제 유전자를 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물은 임상투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0029] 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우 주사제 등 당업계에서 약제학적으로 잘 알려진 방법을 사용하여 제제화할 수 있다. 다양한 형태로 가공된 본 발명의 약학적 조성물은 인체에 부작용이 없으면서 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물의 유효용량은 0.1 ~ 5 mg/kg 이고, 바람직하게는 1 ~ 2 mg/kg 이며, 하루 1 ~ 3회 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 조성물은 본 발명의 유효성분인 상기 Phc2 발현 억제 유전자를 포함하는 바이러스 클론 또는 그 발현 단백질 외에 생물제제에 통상 사용되는 안정화제 및 담체, 보조 활성성분 등을 더 포함할 수 있으며, 면역활성 억제를 위해 주사제 형태로 인체에 투여될 수 있다. 이때 환자에게 투여될 바이러스 클론 입자의 적정 수는 환자의 중한 상태에 따라 다르나 바람직하게는 체중 kg당 100 ~2000 MOI 정도이고, 발현 단백질의 경우는 성인 기준 일당 100 μg ~ 1000 mg 정도이다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 인간외 동물에서, Phc2 유전자의 발현을 조절함으로써 NKT 세포의 발달 또는 활성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명은 Phc2 유전자의 인위적인 조작을 통하여 흉선에서의 NKT 세포 발생을 제한하여 NKT 세포의 분화와 활성 정도를 조절할 수 있는 유전자 치료법을 제공할 수 있다.

[0034] 본 발명의 NKT 세포의 발달 또는 활성을 억제하는 방법은 Phc2 발현 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 유전자 억제(gene silencing)가 되는 것을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 Phc2 단백질의 발현이 유전적으로 억제되면, 말초 면역기관에서 존재하는 NKT 세포의 수가 감소하고, 흉선에서 일어나는 NKT 세포의 발생이 제한되므로, Phc2 유전자는 NKT 세포의 분화 및 발달에 중요한 인자임을 확인하였다. 따라서 본 발명은 Phc2 단백질의 발현을 조절함으로써 생체 내 면역계에 중요한 작용을 하는 NKT 세포의 분화 및 활성을 제어할 수 있어, 자가면역질환 등의 치료 및/또는 예방 분야에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 발명에 의한 Phc2 유전자의 염기서열(서열번호 1)을 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명에 의한 Phc2 단백질의 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타내는 도면이다.

도 3은 야생형 생쥐의 phc2 유전자좌와 phc2 넉아웃을 위한 적중 벡터의 모식도 및 phc2 유전자가 적중된 상태를 나타내는 도면이다.

도 4a와 도 4b은 Phc2 넉아웃 생쥐와 야생형 생쥐의 비장과 간에서의 NKT 세포의 비율과 숫자를 비교한 결과를 보여주는 도면이다.

도 5는 Phc2 넉아웃 생쥐와 야생형 생쥐에서의 NKT 세포의 분화단계를 비교한 결과를 보여주는 도면이다.

도 6a는 Phc2 넉아웃 생쥐와 야생형 생쥐에서의 NKT 세포 분화단계별 세포분열을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 6b는 Phc2 넉아웃 생쥐와 야생형 생쥐에서의 NKT 세포 분화단계별 세포사멸을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 7은 Phc2 넉아웃 생쥐와 야생형 생쥐에서 NKT 세포분화 중의 CD24 항원의 발현을 비교한 결과를 보여주는 도면이다.

도 8a는 NKT 세포의 양성선택과 음성선택에서 관련된 세포의 CD1d 발현을 비교한 결과를 보여주는 도면이다.

도 8b는 생쥐 흉선세포의 iNKT 세포에 항원신호를 전달함으로써 iNKT 세포를 활성화하는 능력을 비교한 결과를 보여주는 도면이다.

도 9는 골수세포 이식을 통한 수여자 세포에서의 NKT 세포의 재구성 결과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0038] **실시예 1: 유세포분석법을 통한 Phc2 넉아웃 생쥐가 가지는 조직별 NKT 세포의 비율과 수 확인 및 흉선 NKT 세포의 분화단계 비교**

[0039] B6 백그라운드의 8주령의 야생형 및 Phc2 넉아웃 생쥐에서 비장, 흉선, 간으로부터 면역세포를 분리하였다. 흉선세포를 분리한 후 바로 사용하였고, 간의 경우는 조직세포와 면역세포를 분리하기 위해 40% percoll을 이용하여 세포 밀도 차이로 분리를 하였다. 비장세포와 간세포로부터 적혈구 세포를 제거하기 위하여 게이즈솔루션(Gey's solution)을 처리하였다. 조직으로 분리한 면역세포를 2.4G2 하이브리도마 배양액을 사용하여 Fc 수용체를 막고 (blocking) FITC 형광이 결합되어 있는 항-생쥐 TCR-β 항체와 PE 형광이 결합되어 있는 항-생쥐 NK1.1 항체를 공동염색하고, 추가로 위의 항-생쥐 TCR-β 항체와 PE 형광이 결합되어 있는 α-Galcer가 결합된 생쥐 CD1d-tetramer을 공동염색하여 NKT 세포의 비율과 세포수를 측정하였다. 유세포분석을 위한 기기로는 BD FACSCalibur를 사용하였고, 분석프로그램으로 CellQuest pro를 사용하였다. 도 4a와 도 4b에 나타난 바와 같이, 비장과 간의 NKT 세포의 비율과 숫자를 비교해 보았을 때, Phc2 넉아웃 생쥐에서 야생형의 생쥐보다 낮은 비율과 적은 수의 NKT 세포분포를 보여준다.

[0040] 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐로부터 흉선세포를 분리한 뒤, 2.4G2 하이브리도마 배양액을 이용하여 Fc 수용체를 막았다. 이 후, APC-항-생쥐 NK1.1 항체와 PE-Cy5-항-생쥐 CD44 항체를 이용하여 NKT 세포의 분화단계를 구분하였다. 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이 Phc2 넉아웃 생쥐의 경우 야생형 생쥐에 비해서 stage 1에 위치하는 세포가 더 많이 발견되는 반면, stage 2, stage 3에서는 더 적은 비율을 보여준다. 따라서 Phc2 넉아웃 생쥐의 경우 NKT 세포의 분화가 stage 1에서 지연됨을 알 수 있다.

[0041] **실시예 2: Phc2 넉아웃 생쥐의 NKT 세포 분화단계별 세포분열 확인**

[0042] NKT 세포의 분화단계별로 세포증식이 얼마나 일어나는지를 알아보기 위하여, 6주령 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃

생쥐에 10 mg/ml의 BrdU solution을 복강주사 하였다. BrdU 복강주사 3일 후, 생쥐를 희생하여 흉선세포를 분리한 뒤, 위의 실시 예와 동일한 방법으로 Fc 수용체를 막고, PE-생쥐 CD1d-tetramer, PE-Cy5-항-생쥐 CD44, APC-항-생쥐 NK1.1 항체를 이용하여 세포표면 단백질을 염색하였다.

[0043] 이 후, BD pharmingen사의 BrdU assay kit (559619)를 이용하여, 공급업체에서 제공한 프로토콜대로 실험을 실시하였다. 구체적으로 설명하면, 세포표면을 항체로 염색 후, Fix/Perm 용액으로 상온에서 30분간 처리하여 세포를 고정화하였다. 이후 고정화와 침투화를 효율적으로 일으키기 위해 Fix/Cytoperm plus 용액으로 얼음에서 10분간 배양 후, 다시 Fix/Perm 용액으로 상온에서 5분간 재고정화하였다. 고정화한 후, DNase를 37℃에서 1시간 처리하여 BrdU 항원을 노출시킨 후, FITC-항-BrdU 항체로 세포내염색을 진행한 후, 유세포분석기로 분석을 실시하였다. 실시예 2의 결과 stage 1에서 분열 중인 세포의 수가 Phc2 넉아웃 생쥐의 경우 더 많이 관찰됨을 보여준다. (도 6a)

[0044] **실시예 3: Phc2 넉아웃 생쥐의 NKT 세포 분화단계별 세포사멸 확인**

[0045] NKT 세포의 분화단계별로 세포사멸이 얼마나 일어나는지를 알아보기 위하여, 6주령 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐의 흉선세포를 분석하였다. 분리된 흉선세포를 2.4G2 배양액으로 Fc 수용체를 막은 후, FITC-항-AnnenxinV, PE-생쥐 CD1d-tetramer, PE-Cy5-항-생쥐 CD44, APC-항-생쥐 NK1.1 항체를 이용하여 공동염색을 실시하였다. 염색 후, 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 실시예 3의 세포사멸 분석 결과 Phc2 넉아웃 생쥐의 경우 stage 2 단계의 세포들에서 세포자멸사가 일어나는 경우의 수가 더 많이 나타남을 관찰할 수 있었다. (도 6b)

[0046] **실시예 4: NKT 세포분화 중의 CD24 항원의 발현 비교**

[0047] NKT 세포의 분화단계 중의, 미성숙한 NKT 세포의 비율이 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐에서 차이가 나는지 알아보기 위하여, 6주령 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐의 흉선세포를 분석하였다. 분리된 흉선세포를 2.4G2 배양액으로 Fc 수용체를 막은 후, FITC-항-생쥐 CD24, PE-생쥐 CD1d-tetramer, PE-Cy5-항-생쥐 CD4, APC-항-생쥐 CD8a 항체를 이용하여 공동염색을 실시하였다. 염색 후, 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 도 7에 나타난 바와 같이 CD4과 CD8을 낮게 발현하는 흉선세포에 위치한 CD1d-tetramer 양성의 세포의 미성숙 흉선세포의 마커인 CD24의 발현을 비교해 보았을 때, Phc2 넉아웃 생쥐의 경우 더 많은 미성숙 흉선세포가 나타난다.

[0048] **실시예 5: NKT 세포의 양성선택과 음성선택에서 관련된 세포의 CD1d 발현 비교**

[0049] 6주령 생쥐로부터 흉선을 분리하여 분석을 실시하였다. 총 흉선세포와 CD4+/CD8+ 세포의 실험의 경우 Fc 수용체를 막은 후, FITC-항-생쥐 CD4a, PE-항-생쥐 CD1d (5C6), APC-항-생쥐 CD8a 항체를 사용하여 공동염색 후, 유세포분석을 실시하였다.

[0050] CD11c+ 세포의 실험의 경우 자성세포분리 체계(MACS)를 이용하였다. 구체적으로 설명하면, 분리된 흉선세포를 2.4G2 하이브리도마 배양액으로 Fc 수용체를 막은 후, 자성입자가 결합한 항-생쥐-CD11c 항체를 결합시켰다. 자성입자를 결합시킨 후, 세포가 MACS 필터와 자석에 단단히 결합한 MACS 컬럼을 통과하도록 하였다. 세포를 MACS 컬럼에 흘려준 후, 3회 MACS 버퍼를 더 흘려주어 비특이적인 세포들을 내려주고, 이 후에 MACS 컬럼을 자석에서 떼어내고 피스톤으로 MACS 컬럼에 부착되어 있던 CD11c 양성의 세포들을 분리해냈다. 분리된 CD11c+ 세포를 PE-항-생쥐 CD1d (5C6)로 염색을 한 뒤, 유세포 분석기로 분석하였다.

[0051] 도 8a에 나타난 바와 같이, NKT 세포의 양성선택에 관련된 CD4, CD8 이중양성세포와 NKT 세포의 음성선택에 관련된 CD1d 양성의 세포에 발현되는 CD1d 분자의 발현 정도는 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐에서 차이가 나타나지 않았다.

[0052] **실시예 6: 생쥐 흉선세포의 iNKT 세포에 항원신호를 전달함으로써 iNKT 세포를 활성화하는 능력 비교**

[0053] 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐로부터 흉선세포를 분리하였다. 분리한 흉선세포 5 X 10^5 개와 5 X 10^4 개의 iNKT 하이브리도마 세포인 DN32D3 세포주를 1 ug/ml의 α-Galcer를 포함한 200ul의 세포배양액에 3일간 인큐베이터에서 배양하였다. 3일간의 배양 후, 세포배양 상층액을 얻어서 면역효소측정법 (ELISA)을 통해 활성화 된

iNKT 세포에서 분비된 싸이토카인의 농도를 측정하였다.

[0054] 면역효소측정법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 일차항체가 결합되어있는 96-well 플레이트에 스탠다드 또는 세포배양액을 바이오틴이 결합된 싸이토카인에 대한 항체와 함께 섞어서 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 워싱해 준 다음 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 HRP를 넣고 인큐베이션하였다. 최종적으로 마이크로플레이트를 워싱한 후에 HRP 기질용액을 넣고 30분 기다린 후, 정지용액을 넣어서 발생반응을 정지시켰다. 발색한 마이크로플레이트를 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 실시예 5의 결과, 도 8b에 나타난 바와 같이, Phc2 넉아웃 생쥐의 표본에서 더 낮은 싸이토카인이 분비되었음을 볼 때, 야생형의 생쥐에 비해서 Phc2 넉아웃 생쥐에서 얻은 흉선세포가 iNKT 하이브리도마 세포주에 항원자극을 주는 능력이 떨어짐을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 7: 골수세포 이식을 통한 수여자 세포에서의 NKT 세포의 재구성**

[0056] CD45.1를 발현하는 8주령 콘제닉 생쥐(congenic mouse)를 7일 이상 항생제 (800 mg 설파메톡사졸 + 160 mg 트리메토프림 / 1L)가 들어있는 음용수를 먹였다. 980R로 수여자인 콘제닉 생쥐를 방사선조사를 한 후, 4시간 내에 야생형 생쥐와 Phc2 넉아웃 생쥐로부터 분리한 골수세포를 수여자 생쥐 한 마리당 1 X 10^7 개의 골수세포를 꼬리정맥주사하였다. 골수세포 이식한 지 6주 뒤에 수여자 생쥐의 비장, 흉선, 간으로부터 면역세포를 분리하여 NKT 세포를 분석하였다. 공여자 골수기인한 세포를 수여자의 세포와 구분하기 위해서 PerCP-Cy5가 결합된 항-생쥐 CD45.2 항체를 공동염색하여 구별하였다.

[0057] NKT 세포를 유세포분석하기 위해 FITC-항-생쥐 TCR-β, PE-항-생쥐 NK1.1, PerCP-항-생쥐 CD45.2 항체를 사용하고, CD1d-tetramer를 사용한 분석을 위해, FITC-항-생쥐 TCR-β, PE-생쥐 CD1d-tetramer, PerCP-항-생쥐 CD45.2 항체를 사용하였다. 실시예 7의 결과, Phc2 넉아웃 생쥐의 조직 내의 NKT 세포가 줄어들어 들었던 사실과 마찬가지로, Phc2 넉아웃 생쥐의 골수세포를 이식한 경우에도 더 적은 수의 NKT 세포가 재구성됨을 발견할 수 있었고, 또한 NKT 세포의 감소의 현상은 생체내의 미세환경의 차이보다 골수로부터 기인한 세포 자체의 문제라는 것을 확인할 수 있었다(도 9).

[0058] 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

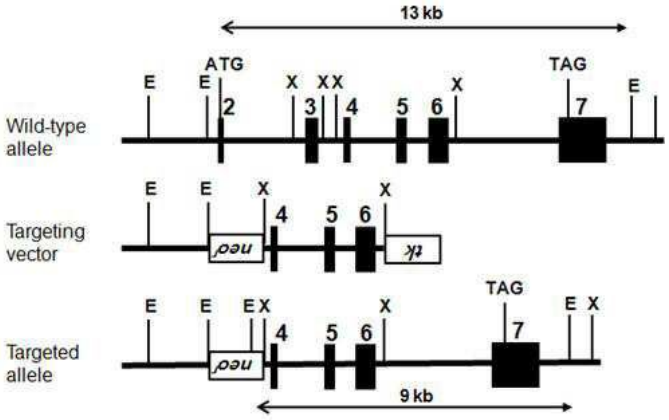
도면1

```
SEQUENCE
       1 atggagaatg agctgccagt cccccacaca tccaaccggg ccagtgtcac caccaacacc
      61 agtgggacca atagtagcag tggctgcatc agcagcagcg gcggtggtgg tggcagcggt
     121 ggccgcccca ctgcacccca gatttctgtg tacagtggga ttcctgaccg gcagactgtg
     181 caggtgatcc agcaggccct gcacaggcag cccagcacgg cggcgcagta cctgcagcag
     241 atgtatgctg cccagcaaca acacctcatg ctgcagacag cggccttaca gcagcagcac
     301 ctcagcagcg cgcagctcca gagcctggca gcagtgcagc aggcaagcct ggtggccaac
     361 agacaaggaa gtactcccgg tagcagtgtg tcctcacagg ctcctgccca gtcttcttca
     421 ctcaatctgg cagcctcccc ggcagcagcc cagcttatca accgggcaca gagtgtcaat
     481 tcagccgcag cctcgggcct tgcccagcag gccgtgctct tgggcaacac gtcctccct
     541 gccctgactg ccagccaagc acagatgtac ctcagggcgc agatgctcat cttcacgccc
     601 acggccaccg tcgctactgt tcagcctgag ctctgcactg gttcccctgc tcggccccct
     661 acccctgccc aggtacagaa cctgacgctt cgcacccagc agacaccagc agcagcagcc
     721 tcgggccctc cccccaccca gcctgtcctg cccagcttgg ccctgaaacc cacacccagc
     781 agtagccagc ctctgcctgc cccaccacag ggcaggacca tggctcaggg ttcccctgcg
     841 ggtgccaagc ctagtgggac tgacaatgcg ccagagacac tcaaggcagg agatggtaac
     901 tgcaacatgg agggccggcc agggcctggc cgggcagttc ctgctgtggc tactcacccg
     961 ctcattgcac cagcttatgc tcacctgcag tcacaccagc tcctcccaca gccgccagcg
    1021 aagcacccac agccccagtt tgtggcccaa cagcaaccac agccaccacg acctgcaccc
    1081 caagtccagt cccaacccca gcttgcctca gtctccccaa gcctggccct acagtccagt
    1141 ccagaagacc atgccctgcc tctaggctca gtgacacagg ccctgcctct ccagtgctct
    1201 accacgcatg tccacaagcc agggaacagc cagcagtgtc accttcccac actagacacc
    1261 gggtctcaga atggacatcc tgagggtggg tcccatcccc cccagcgaag gttccagcac
    1321 acctcagctg tgatcttaca ggtgcagccc gcttctccag ttacgcccca gcagtgtgct
    1381 cccgatgact ggaaggaagt ggtgccagcg gagaagagtg tgcctgtggc tcggccaggc
    1441 ccgtccccac accagcaagc catcatccct gccatacccg gtggcttgcc tggacccaag
    1501 agtcccaaca tccagcagtg cccagctcac gagacagggc agggcattgt tcatgcactg
    1561 accgacctca gcagccccgg catgacctca gggaacggaa actctgcctc cagcatcgcc
    1621 ggcactgccc cccagaatgg tgagaataaa ccaccacagg ccattgtgaa accccaaatc
    1681 ctgacgcatg ttatcgaagg gtttgtgatc caggaggggg cggagccttt cccggtggga
    1741 cgctcgtccc tgctggtagg gaatctcaaa aagaagtatg cacaggggtt cttgcctgag
    1801 aagcctccac agcaggacca caccaccacc accgactcag agatggagga gccctacctg
    1861 caagaatcca aagaggaggg cactcccctc aaactcaagt gtgagctctg tggacgggtg
    1921 gactttgcct acaagttcaa gcgttccaag cgcttctgtt ccatggcttg tgcaaagagg
    1981 tataatgtgg gatgcaccaa acgagtggga ctttttcact cagaccgaag caagctgcag
    2041 aaggcaggga ccacaaccca caaccgccga cgggccagca aggccagtct gcccacactc
    2101 accaaggaca ccaagaagca gcctcaggc actgtacccc tttcagttac tgccgccttg
    2161 cagctggcgc acagccagga ggactccagc cggtgctcag ataactccag ctatgaggag
    2221 cccttgtcac ccatctcagc cagctcgtcc acctcgcgac ggcgccaagg ccagagggac
    2281 ctggatctcc ctgacatgca catgagggac cttgtgggcg tgggacacca cttcctgccg
    2341 agcgagccca caaaatggaa tgtagaggat gtctatgagt tcatccgctc tctgccaggc
    2401 tgccaggaga tcgcggagga gttccgtgcg caggagattg atgggcaagc cttgctgctg
    2461 ctcaaggagg accacctaat gagcgccatg aacatcaagc tagggcccgc cctgaagatc
    2521 tacgcacgca tcagcatgct caaggactcc tag
```

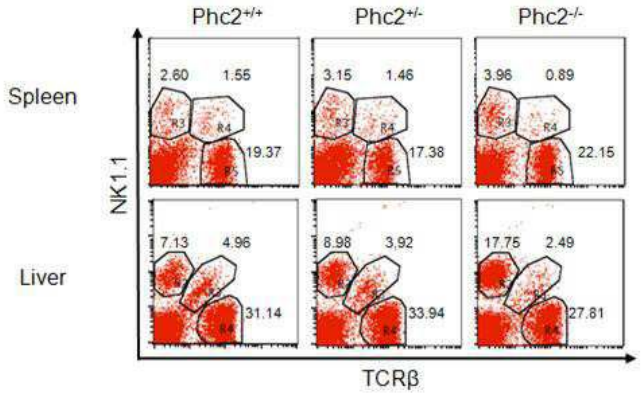
도면2

```
MENELPVPHT SNRASVTTNT SGTNSSSGCI SSSGGGGGSG GRPTAPQISV YSGIPDRQTV  60
QVIQQALHRQ PSTAAQYLQQ MVAAQQQHLM LQTAALQQQH LSSAQLQSLA AVQQASLVAN 120
RQGSTPGSSV SSQAPAQSSS LNLAASPAAA QLINRAQSVN SAAASGLAQQ AVLLGNTSSP 180
ALTASQAQMY LRAQMLIFTP TATVATVQPE LCTGSPARPP TPAQVQNLTL RTQQTPAAAA 240
SGPPPTQPVL PSLALKPTPS SSQPLPAPPQ GRTMAQGSPA GAKPSGTDNA PETLKAGDGN 300
CNMEGRPGPG RAVPAVATHP LIAPAYAHLQ SHQLLPQPPA KHPQPQFVAQ QQPQPPRPAP 360
QVQSQPQLAS VSPSLALQSS PEDHALPLGS VTQALPLQCS TTHVHKPGNS QQCHLPTLDT 420
GSQNGHPEGG SHPPQRRFQH TSAVILQVQP ASPVTPQQCA PDDWKEVVPA EKSVPVARPG 480
PSPHQQAIIP AIPGGLPGPK SPNIQQCPAH ETGQGIVHAL TDLSSPGMTS GNGNSASSIA 540
GTAPQNGENK PPQAIVKPQI LTHVIEGFVI QEGAEPFPVG RSSLLVGNLK KKVAQGFLPE 600
KPPQQQDHTTT TDSEMEEPYL QESKEEGTPL KLKCELCGRV DFAYKFKRSK RFCSMACAKR 660
YNVGCTKRVG LFHSDRSKLQ KAGTTTHNRR RASKASLPTL TKDTKKQPSG TVPLSVTAAL 720
QLAHSQEDSS RCSDNSSVEE PLSPISASSS TSRRRQGQRD LDLPDMHMRD LVGVGHHFLP 780
SEPTKWNVED VYEFIRSLPG CQEIAEEFRA QEIDGQALLL LKEDHLMSAM NIKLGPALKI 840
YARISMLKDS * 850
```

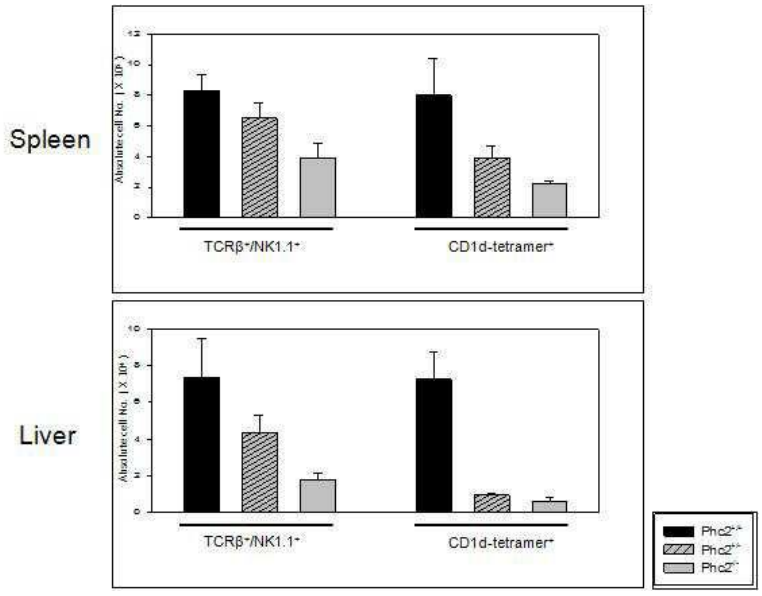
도면3



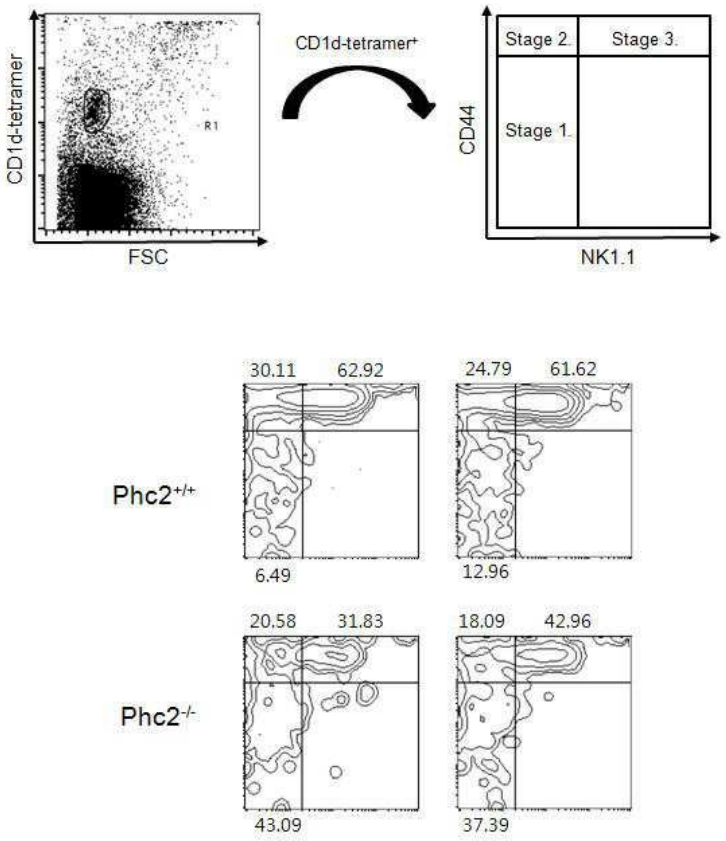
도면4a



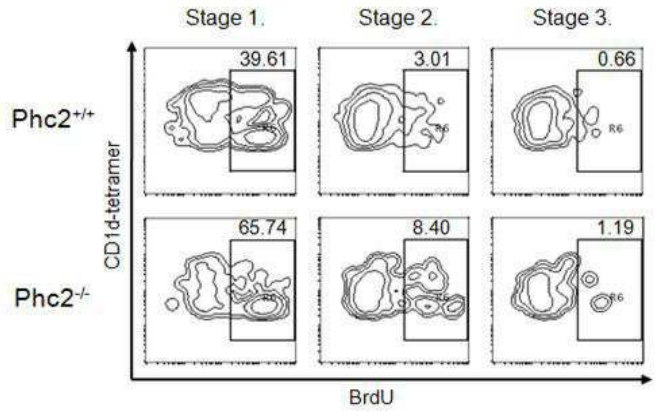
도면4b



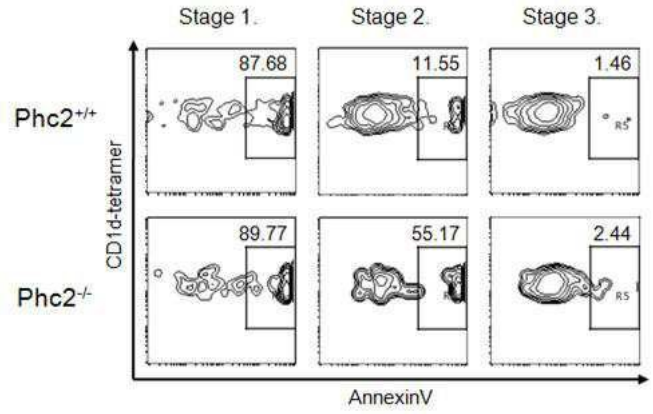
도면5


CD1d-tetramer
FSC
R1
CD1d-tetramer+
CD44
NK1.1
Stage 2.
Stage 3.
Stage 1.
Phc2+/+
30.11
62.92
6.49
24.79
61.62
12.96
Phc2-/-
20.58
31.83
43.09
18.09
42.96
37.39

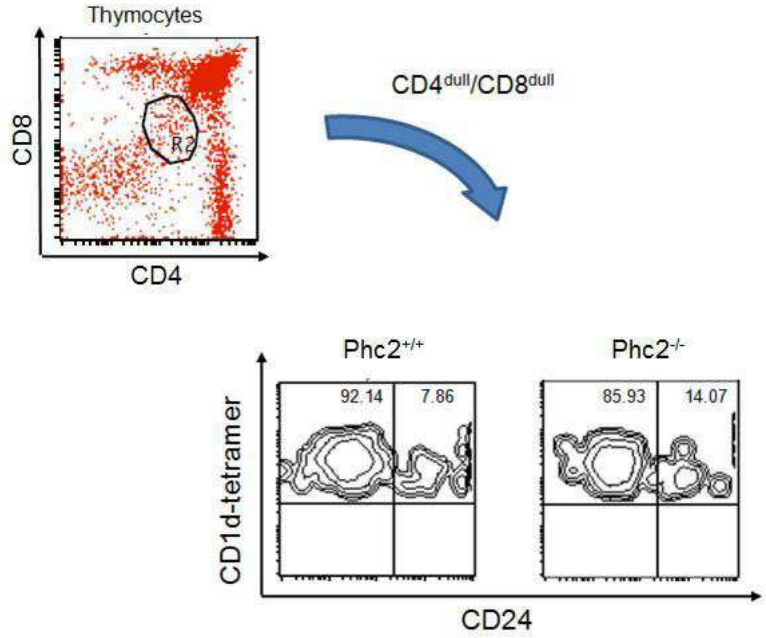
도면6a


Stage 1.
Stage 2.
Stage 3.
Phc2+/+
Phc2-/-
CD1d-tetramer
BrdU
39.61
3.01
0.66
65.74
8.40
1.19
R6

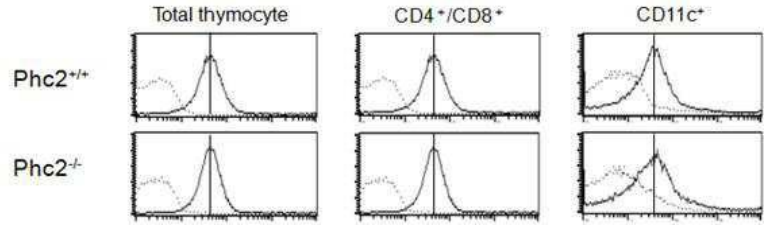
도면6b



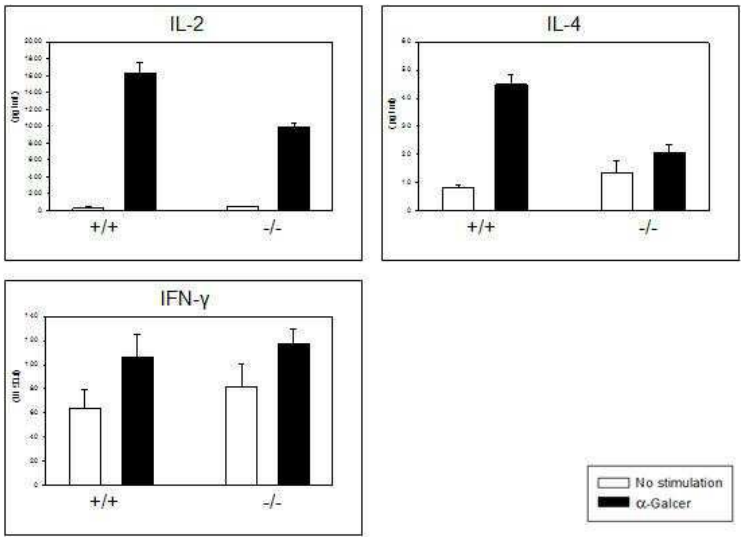
도면7



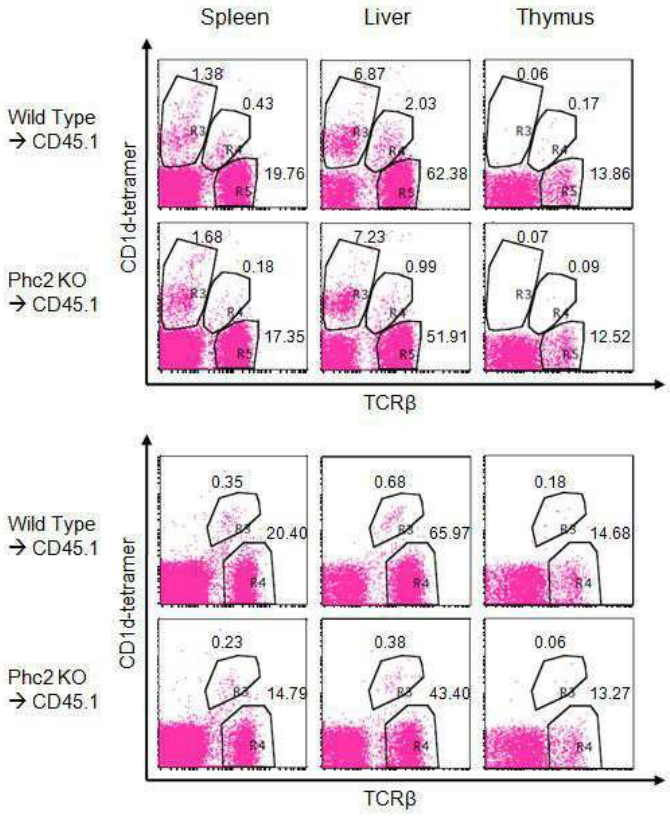
도면8a



도면8b



도면9



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Composition comprising gene downregulating Phc2 expression for suppressing NKT cell activity and Immunosuppressant using the same

<130> P11-130708-01

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2553

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atggagaatg agctgccagt cccccacaca tccaaccggg ccagtgtcac caccaacacc 60

agtgggacca atagtagcag tggctgcatc agcagcagcg gcggtggtgg tggcagcggt 120

ggccgcccca ctgcacccca gatttctgtg tacagtggga ttcctgaccg gcagactgtg 180

caggtgatcc agcaggccct gcacaggcag cccagcacgg cggcgcagta cctgcagcag 240

atgtatgctg cccagcaaca acacctcatg ctgcagacag cggccttaca gcagcagcac 300

ctcagcagcg cgcagctcca gagcctggca gcagtgcagc aggcaagcct ggtggccaac 360

agacaaggaa gtactcccgg tagcagtgtg tcctcacagg ctcctgccca gtcttcttca 420

ctcaatctgg cagcctcccc ggcagcagcc cagcttatca accgggcaca gagtgtcaat 480

tcagccgcag cctcgggcct tgcccagcag gccgtgctct tgggcaacac gtcctccct 540

gccctgactg ccagccaagc acagatgtac ctcagggcgc agatgctcat cttcacgccc 600

acggccaccg tcgctactgt tcagcctgag ctctgcactg gttcccctgc tcggccccct 660

acccctgccc aggtacagaa cctgacgctt cgcacccagc agacaccagc agcagcagcc 720

tcgggccctc cccccaccca gcctgtcctg cccagcttgg ccctgaaacc cacacccagc 780

agtagccagc ctctgcctgc cccaccacag ggcaggacca tggctcaggg ttcccctgcg 840

ggtgccaagc ctagtgggac tgacaatgcg ccagagacac tcaaggcagg agatggtaac 900

tgcaacatgg agggccggcc agggcctggc cgggcagttc ctgctgtggc tactcacccg 960

ctcattgcac cagcttatgc tcacctgcag tcacaccagc tcctcccaca gccgccagcg 1020

aagcacccac agccccagtt tgtggcccaa cagcaaccac agccaccacg acctgcaccc 1080

caagtccagt cccaacccca gcttgcctca gtctccccaa gcctggccct acagtccagt 1140

ccagaagacc atgccctgcc tctaggctca gtgacacagg ccctgcctct ccagtgctct 1200

accacgcatg tccacaagcc agggaacagc cagcagtgtc accttcccac actagacacc 1260

gggtctcaga atggacatcc tgagggtggg tcccatcccc cccagcgaag gttccagcac 1320

acctcagctg tgatcttaca ggtgcagccc gcttctccag ttacgcccca gcagtgtgct 1380

cccgatgact ggaaggaagt ggtgccagcg gagaagagtg tgcctgtggc tcggccaggc 1440

ccgtccccac accagcaagc catcatccct gccatacccg gtggcttgcc tggacccaag 1500

agtcccaaca tccagcagtg cccagctcac gagacagggc agggcattgt tcatgcactg 1560

accgacctca gcagccccgg catgacctca gggaacggaa actctgcctc cagcatcgcc 1620

ggcactgccc cccagaatgg tgagaataaa ccaccacagg ccattgtgaa accccaaatc 1680

ctgacgcatg ttatcgaagg gtttgtgatc caggaggggg cggagccttt cccggtggga 1740

cgctcgtccc tgctggtagg gaatctcaaa aagaagtatg cacaggggtt cttgcctgag 1800

aagcctccac agcaggacca caccaccacc accgactcag agatggagga gccctacctg 1860

caagaatcca aagaggaggg cactcccctc aaactcaagt gtgagctctg tggacgggtg 1920

gactttgcct acaagttcaa gcgttccaag cgcttctgtt ccatggcttg tgcaaagagg 1980

tataatgtgg gatgcaccaa acgagtggga ctttttcact cagaccgaag caagctgcag 2040

aaggcaggga ccacaaccca caaccgccga cgggccagca aggccagtct gcccacactc 2100

accaaggaca ccaagaagca gccctcaggc actgtacccc tttcagttac tgccgccttg 2160

cagctggcgc acagccagga ggactccagc cggtgctcag ataactccag ctatgaggag 2220

cccttgtcac ccatctcagc cagctcgtcc acctcgcgac ggcgccaagg ccagagggac 2280

ctggatctcc ctgacatgca catgagggac cttgtgggcg tgggacacca cttcctgccg 2340

agcgagccca caaaatggaa tgtagaggat gtctatgagt tcatccgctc tctgccaggc 2400

tgccaggaga tcgcggagga gttccgtgcg caggagattg atgggcaagc cttgctgctg 2460

ctcaaggagg accacctaat gagcgccatg aacatcaagc tagggcccgc cctgaagatc 2520

tacgcacgca tcagcatgct caaggactcc tag 2553

<210> 2

<211> 850

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Asn Glu Leu Pro Val Pro His Thr Ser Asn Arg Ala Ser Val
1 5 10 15

Thr Thr Asn Thr Ser Gly Thr Asn Ser Ser Ser Gly Cys Ile Ser Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Pro Thr Ala Pro Gln Ile
35 40 45

Ser Val Tyr Ser Gly Ile Pro Asp Arg Gln Thr Val Gln Val Ile Gln

50 55 60

Gln Ala Leu His Arg Gln Pro Ser Thr Ala Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
65 70 75 80
Met Tyr Ala Ala Gln Gln Gln His Leu Met Leu Gln Thr Ala Ala Leu
85 90 95
Gln Gln Gln His Leu Ser Ser Ala Gln Leu Gln Ser Leu Ala Ala Val
100 105 110
Gln Gln Ala Ser Leu Val Ala Asn Arg Gln Gly Ser Thr Pro Gly Ser
115 120 125
Ser Val Ser Ser Gln Ala Pro Ala Gln Ser Ser Ser Leu Asn Leu Ala

130 135 140
Ala Ser Pro Ala Ala Ala Gln Leu Ile Asn Arg Ala Gln Ser Val Asn
145 150 155 160
Ser Ala Ala Ala Ser Gly Leu Ala Gln Gln Ala Val Leu Leu Gly Asn
165 170 175
Thr Ser Ser Pro Ala Leu Thr Ala Ser Gln Ala Gln Met Tyr Leu Arg
180 185 190
Ala Gln Met Leu Ile Phe Thr Pro Thr Ala Thr Val Ala Thr Val Gln
195 200 205

Pro Glu Leu Cys Thr Gly Ser Pro Ala Arg Pro Pro Thr Pro Ala Gln
210 215 220
Val Gln Asn Leu Thr Leu Arg Thr Gln Gln Thr Pro Ala Ala Ala Ala
225 230 235 240
Ser Gly Pro Pro Pro Thr Gln Pro Val Leu Pro Ser Leu Ala Leu Lys
245 250 255
Pro Thr Pro Ser Ser Ser Gln Pro Leu Pro Ala Pro Pro Gln Gly Arg
260 265 270
Thr Met Ala Gln Gly Ser Pro Ala Gly Ala Lys Pro Ser Gly Thr Asp

275 280 285
Asn Ala Pro Glu Thr Leu Lys Ala Gly Asp Gly Asn Cys Asn Met Glu
290 295 300

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

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

420 425 430
Pro Pro Gln Arg Arg Phe Gln His Thr Ser Ala Val Ile Leu Gln Val
435 440 445
Gln Pro Ala Ser Pro Val Thr Pro Gln Gln Cys Ala Pro Asp Asp Trp
450 455 460
Lys Glu Val Val Pro Ala Glu Lys Ser Val Pro Val Ala Arg Pro Gly
465 470 475 480
Pro Ser Pro His Gln Gln Ala Ile Ile Pro Ala Ile Pro Gly Gly Leu
485 490 495

Pro Gly Pro Lys Ser Pro Asn Ile Gln Gln Cys Pro Ala His Glu Thr
500 505 510
Gly Gln Gly Ile Val His Ala Leu Thr Asp Leu Ser Ser Pro Gly Met
515 520 525
Thr Ser Gly Asn Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ile Ala Gly Thr Ala Pro
530 535 540
Gln Asn Gly Glu Asn Lys Pro Pro Gln Ala Ile Val Lys Pro Gln Ile
545 550 555 560

Leu Thr His Val Ile Glu Gly Phe Val Ile Gln Glu Gly Ala Glu Pro

565 570 575

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

580 585 590

Tyr Ala Gln Gly Phe Leu Pro Glu Lys Pro Pro Gln Gln Asp His Thr

595 600 605

Thr Thr Thr Asp Ser Glu Met Glu Glu Pro Tyr Leu Gln Glu Ser Lys

610 615 620

Glu Glu Gly Thr Pro Leu Lys Leu Lys Cys Glu Leu Cys Gly Arg Val

625 630 635 640

Asp Phe Ala Tyr Lys Phe Lys Arg Ser Lys Arg Phe Cys Ser Met Ala

645 650 655

Cys Ala Lys Arg Tyr Asn Val Gly Cys Thr Lys Arg Val Gly Leu Phe

660 665 670

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

675 680 685

Arg Arg Arg Ala Ser Lys Ala Ser Leu Pro Thr Leu Thr Lys Asp Thr

690 695 700

Lys Lys Gln Pro Ser Gly Thr Val Pro Leu Ser Val Thr Ala Ala Leu

705 710 715 720

Gln Leu Ala His Ser Gln Glu Asp Ser Ser Arg Cys Ser Asp Asn Ser

725 730 735

Ser Tyr Glu Glu Pro Leu Ser Pro Ile Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ser

740 745 750

Arg Arg Arg Gln Gly Gln Arg Asp Leu Asp Leu Pro Asp Met His Met

755 760 765

Arg Asp Leu Val Gly Val Gly His His Phe Leu Pro Ser Glu Pro Thr

770 775 780

Lys Trp Asn Val Glu Asp Val Tyr Glu Phe Ile Arg Ser Leu Pro Gly

785 790 795 800

Cys Gln Glu Ile Ala Glu Glu Phe Arg Ala Gln Glu Ile Asp Gly Gln

805 810 815

Ala Leu Leu Leu Leu Lys Glu Asp His Leu Met Ser Ala Met Asn Ile

820 825 830

Lys Leu Gly Pro Ala Leu Lys Ile Tyr Ala Arg Ile Ser Met Leu Lys

835 840 845

Asp Ser

850