(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년04월28일
(11) 등록번호 10-0509415
(24) 등록일자 2005년08월12일

(21) 출원번호 10-1996-0706870
(22) 출원일자 1996년11월27일
번역문 제출일자 1996년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US1995/006722
국제출원일자 1995년05월30일
(65) 공개번호 10-1997-0703422
(43) 공개일자 1997년07월03일
(87) 국제공개번호 WO 1995/33052
국제공개일자 1995년12월07일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

(30) 우선권주장 08/360144 1994년12월20일 미국(US)
08/250795 1994년05월27일 미국(US)

(73) 특허권자 어리어드 진 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 랜스다운 스트리트 26

(72) 발명자 비비안 버린
미합중국 01827 메사츄세츠 던스터블 메인 스트리트634

마리 이자벨 치우
미합중국 02109 메사츄세츠 보스톤 컴먼웰쓰 애브뉴 288 아파트 먼트 슈트3

귤라움 코타렐
미합중국 02132 메사츄세츠 웨스트 록스베리 릭커힐 로우드 15

베로니크 다막네즈
미합중국 02141 메사츄세츠 캠브리지 슈트3 사이아라파 스트리트119

(74) 대리인 남상선

심사관 : 박정웅

(54) 면역억제표적단백질

요약

본 발명은 FKBP/라파마이신 복합체의 직접 하류 표적인 포유동물 기원의 신규한 단백질의 발견에 관한 것이다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 FKBP/라파마이신 복합체에 대한 직접 하류 표적인 포유 동물 기원의 신규한 단백질의 발견에 관한 것이다.

배경기술

사이클로스포린 A, FK506 및 라파마이신은, 일차적으로, T 림프구 활성화의 선택적 저해에 의해 야기되는 강력한 면역 억제 특성을 가지는 미생물성 생성물이다. 라파마이신은 스트렙토마이세스(*Streptomyces hygroscopicus*)로부터 추출된 항진균성 항생물질로서 처음 기술되었다(Vezina et al. (1975) *J. Antibiot.,* 28:721; Sehgal et al. (1975) *J. Antibiot.* 28:727; and Sehgal et al., U.S. Pat. No. 3,929,992). 그후, 마크로리드(macroride) 약제 라파마이신은 항종양 및 항증식 특성 뿐만 아니라 면역 억제 특성을 나타내는 것으로 제시되었다(Morris (1992) *Transplant Res* 6:39-87).

이러한 화합물 사이클로스포린 A, FK506 및 라파마이신 각각은 통상 면역 세포의 활성화를 개시시키는 명백하게 다른 생화학적 반응을 블로킹함으로써 면역 시스템을 억제한다. 요약하면, 사이클로스포린 A 및 FK506은 Ca^{2+}-의존적 T-세포 활성화후 곧 작용하여 면역 반응의 지속 및 증폭에 중요한 사이토카인의 합성을 억제한다. 라파마이신은 그 다음에 작용하여 면역 세포에 대한 사이토카인의 복합 작용을 블로킹하며, 이는 인터루킨-2 (IL2)-자극 T-세포 증식의 저해를 포함하지만, 이의 항증식 작용은 단지 T 및 B 세포에 제한되는 것은 아니다. 또한, 라파마이신은 성장 인자-의존적 및 성장 인자-비의존적 비면역 세포의 증식을 선택적으로 저해한다. 라피마이신은 일반적으로, 간세포와 같은 비-면역 세포(Francavilla et al. (1992) *Hepatology* 15:871-877; and Price et al. (1992) *Science* 257:973-977) 뿐만 아니라 림프구(Bierer et al. (1990) *PNAS* 87:9231-9235; and Dumont et al. (1990) *J. Immunol* 144:1418-1424)를 포함한 다양한 세포 유형에서 S 단계의 개시에 요구되는 특이적 시그널링 이벤트를 블로킹함으로써 세포 증식을 저해하는 것으로 여겨진다. 몇가지 증거는 세포내 FK506/라파마이신 결합 단백질(FKBP)의 패밀리의 다른 일원과 라파마이신과의 결합은 라파마이신에 의해 매개되는 것으로서 G_1 단계의 진행의 저해에 필수적임을 시사한다. 예를 들어, 라파마이신의 작용은 과량의 구조적 FKBP-리간드 FK506 또는 506BD에 의해 역전된다(Bierer et al. *supra.* ; Dumont et al. *supra.*; and Bierer et al. (1990) *Science* 250:556-559).

사이클로스포린 A가 사이클로필린으로 언급되는 단백질의 클래스에 결합하는 반면에(Walsh et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:13115-13118), 상기한 바와 같이, FK506 및 라파마이신의 일차 표적은 FKBP이다(Harding et al. (1989) *Nature* 341:758-7601; Siekienka et al. (1989) *Nature* 341:755-757; and Soltoff et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:17472-17477). 사이클로필린/사이클로스포린 및 FKBPI2/ FK506 복합체는, IL-2 유전자 특이적 전사 활성인자의 활성을 제어하는 것으로 가정된 특이적 단백질 포스파타제(칼시뉴린(calcineurin))에 결합한다(reviewing: Schreiber (1991) *Cell* 70:365-368). 반대로, 라파마이신-민감성 시그널링 경로에 대한 하류 세포 표적은 FKBP-라파마이신 복합체의 직접적인 표적의 확인에 대해 그다지 잘 규명되지는 않았다.

사카로마이세스 세레비시애(*S. cerevisiae*)의 TOR1 및 TOR2 유전자는 세포를 라파마이신에 대해 내성으로 만드는 돌연변이에 의해 최초로 확인되었고(Heitman et al. (1991) Science 253:905-909), FKBP/라파마이신 복합체가 TOR1 또는 TOR2의 포스포세린 잔기에 직접 결합함으로써 TOR 유전자 생성물의 세포성 기능을 저해할수 있다고 초기에 추측되었다. 그러나, 이후에 TOR 단백질에 대한 FKBP/라파마이신 복합체의 직접 결합과 연관되지 않는 라파마이신 약제 상호작용에 대한 새로운 모델이 제안되었다. 예를 들어, 라파마이신 처리된 세포에서의 시클린-cdk 활성에 대한 실험 데이터를 기준으로 하여 쉐레이버(Schreiber) 연구실은 문헌[참조: Albers et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22825-22829]에서 다음과 같이 기술하였다:

"TOR2 유전자 생성물이 FKBP-라파마이신 복합체의 직접 표적일 수 있다고 하더라도, 보다 더 가능성 있는 설명은 TOR2 유전자 생성물이 라파마이신의 직접 표적의 하류에 존재하고 TOR2 돌연변이가 상기 단백질의 구조적 활성을 야기하였다는 것이다. 후자의 모델이 옳은 경우, TOR2 유전자 생성물은, FKBP-라파마이신 복합체의 직접 표적의 하류에 존재하며, 세포 주기 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 제시된 단백질로서 $p70^{s6k}$, 시클린-의존적 키나제 및 시클린 D1과 결합한다. FKBP-라파마이신 복합체의 직접 표적의 확인은 G1 단계로의 진행을 선도하는 시그널 변환 경로의 상류 구성요소를 밝혀내고, 세포 주기 진행에 요구되는 성장 인자- 매개 시그널링 이벤트 및 시클린-cdk 활성을 연결시키는 시그널 변환 경로를 묘사하는데 도움을 줄 것이다."

마찬가지로, 라파마이신-내성 효모 세포에서의 TOR1 및 TOR2 돌연변이의 역할을 연구한 후, 리비(Livi) 그룹은 문헌 [Cafferkey et al. (1993) *mol. Cell Biol.* 13:6012-6023]에 다음과 같이 기술하였다:

"따라서, 우리가 라파마이신-제거된 DRR1 [TOR1] 단백질에서 확인한 아미노산 변화는 FKBP12-라파마이신 복합체와의 결합을 방지하기 보다는 다른 시그널을 구조적으로 활성화시킴으로써 라파마이신에 의해 저해된 증식 시그널의 손실을 보상하는 것을 가능하게 한다. 키나제 도메인내이지만 PI 3-키나제에 의해 공유되지 않는 영역내에서 돌연변이의 위치는 상기 견해를 지지한다. 그러므로, DRR1이 야생형 효모 세포의 라파마이신-민감성 경로의 구성요소가 아님은 거의 확실하다. 대신에, DRR1의 Ser-1972에서의 미스센스 돌연변이는 정상 활성을 변경시킬 수 있고, 라파마이신의 진정한 표적인 필수 단백질의 기능을 대체하는 것을 허용한다."

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은, FKBP/라파마이신 복합체의 직접적 하류 표적 단백질인 세포성 단백질을 확인하고, 상기 단백질을 엔코딩하는 유전자를 단리하는 것이다.

[발명의 요약]

본 발명은 FKBP/라파마이신 복합체의 하류 표적인 포유류 기원의 신규한 단백질의 발견에 관한 것이다. 본원에서 FK506-결합 단백질/라파마이신 복합체와 상호작용하고, 본원에서 "RAP-결합 단백질" 또는 "RAP-BP"로서 집합적으로 언급되는 많은 단백질을 단리하기 위해 약제-의존적 상호작용 트랩 검정을 사용한다. 특히, 여러 가지의 포유 동물 유전자(오르토로그)가 단백질이 효모 TOR1 및 TOR2 유전자 생성물에 명백하게 관련된 본원에서 "RAPT1"으로서 언급되는 단백질을 위해 클로닝되었다. 또한, 본원에서 "rap-UBC"로서 언급되는 신규한 유비퀴틴-컨쥬게이션된 효소는 FKBP-라파마이신 복합체를 결합시키는 능력을 기초로 하여 클로닝되었다. 또한, RAPT1 유사 단백질을 사람 병원체 칸디다(*Candida*)로부터 클로닝하였다. 그러므로, 본 발명은 유용한 신규 단백질(재조합 형태 및 정제 형태), 재조합 유전자, RAP-결합 단백질에 대한 항체, 및 진단 및 치료학적 사용을 위한 그밖의 신규한 시약 및 검정을 제조하는 것이다.

본 발명은 진핵 세포, 특히 사람 세포에서, 본원에서 "RAP-결합 단백질" 또는 "RAP-BP"로서 언급되는 특정 세포성 단백질 및 FK506-결합 단백질/라파마이신 복합체 사이의 신규한 단백질-단백질 상호작용의 발견에 관한 것이다.

일반적으로, 본 발명은 포유 동물 RAPT1 폴리펩티드, 바람직하게는 RAPT1 폴 리펩티드의 실질적으로 순수한 제조물 또는 재조합 RAPT1 폴리펩티드를 특성화한다. 바람직한 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 라파마이신과의 결합에 관련된 생물학적 활성을 가지며, 예를 들어, 이것이 라파마이신 의존적 복합체의 집합에 효능적으로 작용하거나 길항적으로 작용할 수 있다고 할지라도, FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 능력을 보유한다. 상기 폴리펩티드는 서열번호 2 또는 12 중 하나에 제시된 폴리펩티드와 동일하거나, 또는 단지 상기 번호의 서열에 상동성을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리펩티드는 예를 들어 80%, 90% 또는 95%의 높은 서열 상동성이 또한 고려되며 이것이 일반적으로 바람직하다고 할지라도, 바람직하게는 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열에 70% 이상 상동인 아미노산 서열을 가진다. 상기 폴리펩티드는 전장 단백질 또는 서열번호 2 또는 12에 제시된 RAPT1 폴리펩티드와 같은 전장 단백질의 일부 또는 예를 들어 5, 10, 20, 50, 100 또는 150개 이상의 아미노산 길이일 수 있는 단백질의 더 작은 단편을 포함할 수 있다. 하기에서 설명되는 바와 같이, RAPT1 폴리펩티드는 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 작용제(예를 들어, 모사체) 또는 대안적으로는 길항제일 수 있으며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 세포 주기 조절 단백질 또는 FK506-결합 단백질을 포함하는 복합체와 같은 라파마이신 복합체의 어셈블리를 조절할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 목적 RAPT1 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 가지는 펩티드는 서열번호 2 또는 12의 서열과 아미노산 서열이 다를 수 있으나, 이러한 차이는 고유의 RAPT1 단백질과 동일하거나 유사한 방법으로 기능하거나 고유의 RAPT1 단백질과 동일하거나 유사한 특성을 가지는 변형된 단백질을 유발시킨다. 그러나, 자연 발생 단백질의 정상 세포 역할의 길항제인 자연 발생 단백질의 동족체가 고려된다.

다른 바람직한 구체예에서, RAPT1 단백질은 제2 폴리펩티드 부분, 예를 들어 RAPT1 폴리펩티드 부분에 관련되지 않은 아미노산 서열을 가지는 제2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 융합 단백질이며, 예를 들어 제2 폴리펩티드 부분은 글루타티온-S-트랜스퍼라제이고, 예를 들어 제2 폴리펩티드 부분은 전사 조절 단백질의 DNA 결합 도메인이며, 예를 들어 제2 폴리펩티드 부분은 RNA 중합효소 활성화 도메인이며, 예를 들어 상기 융합 단백질은 2-하이브리드 검정에서 기능한다.

본 발명의 또 다른 일면은 면역원 제조물 중에 RAPT1 펩티드를 포함하는 면역원에 관한 것이고, 상기 면역원은 RAPT1 폴리펩티드에 특이적인 면역 반응; 예를 들어 체액성 반응, 예를 들어 항체 반응; 예를 들어 세포성 반응을 유도할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 면역원은 서열번호 2 및/또는 12에 제시된 단백질로부터의 항원성 결정인자, 예를 들어 유일한 결정인자를 포함한다.

또한, 본 발명은 RAPT1 면역원의 에피토프와 특이적 반응성인 항체 제조물을 특성화한다.

또한, 본 발명은 칸디다 종으로부터의 RAPT1 유사 폴리펩티드(caRAPT1), 바람직하게는 caRAPT1 폴리펩티드의 실질적으로 순수한 제조물 또는 재조합 caRAPT1 폴리펩티드를 특성화한다. 상기에서와 같이, 바람직한 구체예에서 caRPAT1 폴리펩티드는 라파마이신과의 결합에 관련된 생물학적 활성을 가지며, 예를 들어 이것은 FKBP/라파마이신 복합체와 같은 라파마이신 복합체에 결합할 수 있는 능력을 보유 한다. 상기 폴리펩티드는 서열번호 14에 제시된 폴리펩티드와 동일하거나 또는 단지 상기 서열에 상동성을 가질 수 있다. 예를 들어, caRAPT1 폴리펩티드는 바람직하게는, 예를 들어 80%, 90% 또는 95%의 높은 서열 상동성이 또한 고려된다 할지라도, 서열번호 14의 아미노산 서열에 60% 이상 상동인 아미노산 서열을 가진다. caRAPT1 폴리펩티드는 서열번호 14에 제시되는 전체 폴리펩티드를 포함하거나, 또는 단편이, 예를 들어 5, 10, 20, 50 또는 100개 이상의 아미노산 길이일 수 있는 단백질의 단편을 포함할 수 있다. caRAPT1 폴리펩티드는 상기 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 작용제(예를 들어, 모사체) 또는 대안적으로는 길항제일 수 있다.

바람직한 구체예에서, 목적 caRAPT1 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 가지는 펩티드는 서열번호 14의 서열과 아미노산 서열에서 다를 수 있으나, 이러한 차이는 고유의 caRAPT1과 동일하거나 유사한 방법으로 기능하거나 또는 상기 고유의 단백질과 동일하거나 유사한 특성을 가지는 변형된 단백질을 유발시킨다. 그러나, 자연 발생 단백질의 정상 세포성 역할의 길항제인 자연 발생 caRAFT1 단백질의 동족체가 고려된다.

다른 바람직한 구체예에서, caRAPT1 단백질은 제2 폴리펩티드 부분, 예를 들어 caRAPT1 서열에 관련되지 않은 아미노산 서열을 가지는 제2 폴리펩티드를 포함하는 재조합 융합 단백질이며, 예를 들어 상기 제2 폴리펩티드 부분은 글루타티온-S-트랜스퍼라제이고, 예를 들어 상기 제2 폴리펩티드 부분은 전사 조절 단백질의 DNA 결합 도메인이며, 예를 들어 제2 폴리펩티드 부분은 RNA 중합효소 활성화 도메인이고, 예를 들어 상기 융합 단백질은 2-하이브리드 검정에서 기능한다.

또한, 본 발명에서 면역원 제조물 중에 caRAPT1 펩티드를 포함하는 면역원이 고려되고, 상기 면역원은 caRAPT1 폴리펩티드에 특이적인 면역 반응; 예를 들어 체액성 반응, 예를 들어 항체 반응; 예를 들어 세포성 반응을 유도할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 면역원은, 서열번호 14에 제시되는 단백질로부터의 항원성 결정 인자, 예를 들어 유일한 결정 인자를 포함한다.

또한, 본 발명은 caRAPT1 면역원의 에피토프와 특이적 반응성인 항체 제조물을 특성화한다.

또한, 본 발명은 라파마이신 의존적 방법으로 FK-결합 단백질에 결합하는 능력을 보유하는, RAPT1, 예를 들어 hRAPT1 또는 mRAPT1, 또는 그밖의 RAPT1 유사 폴리펩티드, 예를 들어 caRAPT1, TOR1 또는 TOR2의 단편을 특성화한다. 따라서, 본 발명은 RAPT1 유사 단백질의 라파마이신 결합 도메인의 결합을 통하여 작용하는 확인 면역 억제인자, 항진균제 등을 위한 하기 기술되는 것과 같은 약제 스크리닝 검정, 특히 고출력(high throughput) 검정의 발생을 촉진시킨다. 예를 들어, 본 발명은 전장 단백질 보다 조작하기 쉬운 RAPT1 유사 단백질의 일부를 제공한다. 전장 단백질은 그 크기로 인해 라파마이신 결합 활성을 보유하는 재조합 단백질 또는 융합 단백질을 발현시키는데에 더욱 어렵고, 난용성일 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열번호 2의 Val26-Tyrl60 (mRATP1), 서열번호 12의 Val2012-Tyr2l44 (hRAPT1), 서열번호 14의

Val41-Tyr173 (caRAPT1), 서열번호 16의 Val1-Tyr133 (TOR1) 및 서열번호 18의 Val1-Arg133 (TOR2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 라파마이신 결합 도메인과 같은 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 RAPT1 유사 폴리펩티드의 가용성 부분을 포함하는 가용성 폴리펩티드를 제공한다.

또한, 본 발명은 RAPT1 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 가지는 실질적으로 단리된 핵산을 제공한다. 바람직한 구체예에서; 상기 엔코딩된 폴리펩티드는 특이적으로 라파마이신 복합체에 결합하고/하거나 라파마이신-함유 단백질 복합체의 어셈블리에 효능적으로 작용하거나 길항적으로 작용할 수 있다. 상기 누클레오티드의 코딩 서열은, 서열번호 1 또는 11에 제시되는 dDNA와 동일한 RAPT1-코딩 서열을 포함하거나 또는 단지 상기 서열에 상동성을 가질 수 있다. 예를 들어, RAPT1-엔코딩 서열은 예를 들어 80%, 90% 또는 95%의 높은 서열 상동성이 또한 고려된다고 할지라도, 바람직하게는 서열번호 1 또는 11의 누클레오티드 서열에 70% 이상 상동인 서열을 가진다. 상기 핵산은 서열번호 1에 제시되는 누클레오티드 서열을 포함하거나, 이의 단편이 예를 들어 5, 10, 20, 50, 100 또는 133개 이상의 아미노산 길이인 단편을 엔코딩할 수 있는 핵산의 단편을 포함할 수 있다. 상기 핵산에 의해 엔코딩된 폴리펩티드는 RAPT1 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 작용제(예를 들어, 모사체) 또는 대안적으로는 길항제일 수 있으며, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 라파마이신-매개 단백질 복합체를 조절할 수 있다.

또한, 바람직한 특정 구체예에서 목적 RAPT1 핵산은 RAPT1 유전자 서열에 작동하도록 연결된 전사 조절 서열, 예를 들어 하나 이상의 전사 프로모터 또는 전사 인핸서 서열을 포함할 것이다. 상기 조절 서열은 RAPT1 유전자 서열을 발현 벡터로서 사용하기에 적합하도록 만드는 데에 사용될 수 있다.

그밖의 바람직한 구체예에서, 상기 핵산은 엄격한 조건하에 서열번호 1 및/또는 11의 12개 이상의 연속 누클레오티드; 바람직하게는 20개 이상의 연속 누클레오티드, 더욱 바람직하게는 40개 이상의 연속 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로브와 하이브리디화된다. 그밖의 구체예에서, 상기 핵산은 라파마이신의 결합 도메인에 상응하는 사람 또는 마우스 RAPT1 유전자의 영역과 하이브리디화된다.

또한, 본 발명은 caRAPT1 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 가지는 실질적으로 단리된 핵산을 제공한다. 바람직한 구체예에서 상기 엔코딩된 폴리펩티드는 라파마이신 복합체에 특이적으로 결합하고/하거나 라파마이신-함유 단백질 복합체의 어셈블리에 효능적으로 작용하거나 길항적으로 작용할 수 있다. 상기 핵산의 코딩 서열은 서열번호 13에 제시되는 cDNA와 동일한 caRAPT1-엔코딩 서열을 포함하거나 단지 상기 서열에 상동성을 가질 수 있다. 예를 들어, caRAPT1-엔코딩 서열은 예를 들어 80%, 90% 또는 95%의 높은 서열 상동성이 또한 고려된다고 할지라도, 바람직하게는 서열번호 13의 누클레오티드 서열에 60% 이상 상동인 서열을 가진다. 상기 핵산은 서열번호 13에 제시되는 누클레오티드 서열을 포함하거나, 또는 이의 단편이 예를 들어 5, 10, 20, 50, 100 또는 140개 이상의 아미노산 길이인 단편을 엔코딩할 수 있는 상기 핵산의 단편을 포함할 수 있다. 상기 핵산에 의해 엔코딩된 폴리펩티드는, caRAPT1 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 작용제(예를 들어, 모사체) 또는 대안적으로는 길항제일 수 있고, 예를 들어 상기 폴리펩티드는 라파마이신-매개 단백질 복합체를 조절할 수 있다.

더욱이, 바람직한 특정 구체예에서 목적 caRAPT1 핵산은 caRAPT1 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 전사 조절 서열, 예를 들어 하나 이상의 전사 프로모터 또는 전사 인핸서 서열을 포함할 것이다. 상기 조절 서열은 caRAPT1 유전자 서열을 발현 벡터로서 사용하기에 적합하도록 만드는 데에 사용될 수 있다.

그밖의 바람직한 구체예에서, 상기 핵산은 엄격한 조건 하에서 서열번호 13의 12개 이상의 연속 누클레오티드; 바람직하게는 20개 이상의 연속 누클레오티드, 더욱 바람직하게는 40개 이상의 연속 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로브와 하이브리디화된다.

또한, 본 발명은 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 돼지와 같이 이식 유전자를 가지는 사람을 제외한 트랜스제닉 동물로서, 예를 들어 사람으로부터 유래된 유전자와 같이 본원에 기술된 RAP-BP 유전자중 하나의 이종 형태를 포함하거나(및 바람직하게는 발현시키거나), 예를 들어 1종 이상의 목적 RAP-결합 단백질의 발현이 붕괴된 동물과 같은 내인성 RAP-BP 유전자를 오발현시키는 동물을 특성화한다. 이러한 트랜스제닉 동물은 돌연변이되거나 오발현된 RAP-BP 대립 유전자를 포함하는 세포성 질환을 연구하기 위한 동물 모델 또는 약제 스크리닝에서 사용하기 위한 동물 모델로서 역할할 수 있다.

또한, 본 발명은 엄격한 조건에서 서열번호 1, 11 또는 13 중 하나의 센스 또는 안티센스 서열의 10개 이상의 연속 누클레오티드 또는 이들의 자연 발생 돌연변이와 하이브리디화되는 누클레오티드 서열의 영역을 포함하는 실질적으로 정제된 올리고누클레오티드를 포함하는 프로브/프라이머를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 상기 프로브/프라이머는 여기에 연결되는 검출될 수 있는 표지군을 포함한다. 상기 표지군은, 예를 들어 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 효소 및 효소 보조-인

자로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 프로브는 환자로부터 단리된 세포의 샘플에서 목적 RAP-결합 단백질 중 하나를 엔코딩하는 핵산 농도의 검출; 예를 들어 세포에서 RAP-BF mRNA 농도의 측정, 또는 게놈 RAP-BP 유전자에서의 돌연변이의 유발 또는 결실 여부의 측정과 같은, 형질전환된 세포의 확인을 위한 진단 시험용 키트의 일부로서 사용될 수 있다. 상기 올리고누클레오티드는 20, 30, 50, 100 또는 150개의 누클레오티드 길이의 프라이머가 또한 고려된다 할지라도, 바람직하게는 10개 이상의 누클레오티드 길이이다.

또한, 본 발명은 RAP-결합 단백질 및 라파마이신/단백질 복합체 사이의 상호 작용을 유도하는 분자에 대해 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 검정 시스템을 제공한다. 예시적 방법은 (i) 예를 들어 엄격한 조건에서, 시험 화합물이 없는 경우에는 FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질이 상호작용할 수 없는 조건에서 본 발명의 RAP-결합 단백질, FK506-결합 단백질 및 시험 화합물을 조합시키는 단계; 및 (ii) FK506-결합 단백질 및 RAP-결합 단백질을 포함하는 약제-의존적 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함한다. 시험 화합물의 존재하에 상기 복합체의 형성의 증가(시험 화합물의 부재하에서 나타나는 것과 비교하여)와 같은 통계상으로 현저한 변화는, FK506-결합 단백질 및 RAP-결합 단백질 사이의 상호작용의 예를 들어 유도와 같은 조절의 지시이다. 더욱이, FK506-결합 단백질 및 RAP-결합 단백질이 무세포 시스템에서 조합되고, 시험 화합물과 접촉되는 일차 스크린이 제공된다; 즉 무세포 시스템은 세포 용해물 및 재구성 단백질 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그밖의 방법으로, FK506-결합 단백질 및 RAP-결합 단백질은 세포에서, 예를 들어 재조합적으로 동시에 발현되며, 상기 세포는 예를 들어 상호작용 트랩 검정(2 하이브리드 검정)으로서 시험 화합물에 접촉된다.

또한, 본 발명은 하나 이상의 목적 RAP-결합 단백질의 야생형 기능의 손실을 특징으로 하는, 원치않는 세포의 증식을 가지는 동물의 치료방법을 제공한다. 상기 치료방법은 RAP-결합 단백질과 그밖의 세포성 또는 바이러스성 단백질과의 상호작용을 저해할 수 있는 치료학적 유효량의 제제를 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구체예에서, 상기 방법은 서열번호 2 또는 12중 하나에 제시되는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 작제물을 투여하는 단계를 포함하며, 이는 상기 작제물이 RAP-결합 단백질을 결핍한 세포에 의해 혼입되는 엄격한 조건, 및 재조합 유전자가 예를 들어 유전자 치료 기술에 의해 발현되는 조건 하에서 이루어진다. 그밖의 구체예에서, 자연 발생 RAP-결합 단백질의 작용은 예를 들어 라파마이신-매개 복합체 어셈블리의 길항제인 RAP-BP 동족체의 치료학적 발현에 의해, 또는 표적화된 RAP-BP 유전자의 전사 및/또는 번역을 저해하는 안티센스 핵산 분자의 전달에 의해 길항된다.

또한, 본 발명은 피검자, 예를 들어 사람 환자가 바람직하지 않은 세포 증식을 특징으로 하는 질환의 가능성을 가지는 지를 측정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은, 피검자의 조직에서 (i) 서열번호 1 또는 11 중 하나에 의해 표시된 단백질을 엔코딩하는 유전자 또는 이들의 동족체의 돌연변이; (ii) 서열번호 1 또는 11 중 하나로 표시되는 단백질을 엔코딩하는 유전자의 오-발현 (mis-expression); 또는 (iii) 조절 단백질 복합체, 예를 들어 라파마이신-함유 복합체의 RAP-결합 단백질의 오결합 중 하나 이상을 특징으로 하는 유전적 손상의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다. 바람직한 구체예에서: 상기와 같은 유전적 손상을 검출하는 단계는 RAP-BP 유전자로부터의 하나 이상의 누클레오티드의 결실; 상기 유전자로의 하나 이상의 누클레오티드의 첨가, 상기 유전자의 하나 이상의 누클레오티드의 치환, 상기 유전자의 전반적 염색체 재배열; 상기 유전자의 메신저 RNA 전사체 수준의 변화; 상기 유전자의 메신저 RNA 전사체의 비-야생형 스플라이싱 (splicing) 패턴의 존재; 또는 상기 단백질의 비-야생형 수준 중 하나 이상의 존재를 조사하는 단계를 포함한다.

예를 들어, 상기와 같은 유전적 손상을 검출하는 단계는 (i) 서열번호 1 또는 11 또는 이들의 자연 발생 돌연변이 중 하나의 센스 또는 안티센스 서열과 하이브리드화되는 누클레오티드 서열 또는 RAP-BP 유전자에 자연적으로 결합되는 5' 또는 3' 플랭킹 서열의 영역을 함유하는 올리고누클레오티드를 포함하는 프로브/프라이머를 제공하는 단계; (ii) 조직의 핵산에 상기 프로브/프라이머를 노출시키는 단계, 및 (iii) 예를 들어, RAP-BP 유전자 및 임의적으로 플랭킹하는 핵산 서열의 누클레오티드 서열을 결정하기 위해 상기 프로브/프라이머를 사용하는 단계를 포함하는, 상기 핵산으로의 상기 프로브/프라이머의 하이브리드화에 의해 유전적 장애의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 상기 프로브/프라이머는 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 또는 연결 연쇄 반응(LCR)에서 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, RAP-결합 단백질의 수준은 서열번호 1 또는 11 중 하나로 표시되는 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 사용하는 면역검정에서 검출된다.

유사한 유형으로, 칸디다 감염은 RAPT1 유사 단백질을 엔코딩하는 칸디다 유전자와 하이브리드화되는 프로브/프라이머의 사용에 의해 검출가능하다. 예를 들어, 상기 방법은, (i) 서열번호 13 또는 이들의 자연 발생 돌연변이 중 하나의 센스 또는 안티센스 서열과 하이브리드화되는 누클레오티드 서열 또는 caRAPT1 유전자와 자연적으로 결합되는 5' 또는 3' 플랭킹 서열의 영역을 함유하는 올리고누클레오티드를 포함하는 프로브/프라이머를 제공하는 단계; (ii) 생물학적 샘플, 예를 들어 조직 생검, 체액 샘플, 스툴 (stool) 등의 핵산에 상기 프로브/프라이머를 노출시키는 단계; 및 (iii)상기 핵산으로의 상기 프로브/프라이머의 하이브리드화에 의해 칸디다 생물체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명은 "미끼" 단백질/약제 복합체와 물리적으로 상호작용하는 단백질을 엔코딩하는 유전자의 단리를 위한 신규한 생체내 방법에 관한 것이다. 상기 방법은, 약제의 존재하에 전사 활성인자의 재구성을 검출하는 것에 의존적이며, 여기

서 상기 약제는 예를 들어 마크로리드(macrolide)와 같은 비-펩티드의 작은 유기분자(예를 들어, <2500K)이며, 예를 들어 라파마이신, FK506 또는 사이클로스포린이다. 특히, 상기 방법에서, 하이브리드 단백질을 발현시키는 키메라 유전자가 사용된다. 제1 하이브리드는 미끼 단백질에 융합된 전사 활성인자의 DNA-결합 도메인을 포함한다. 제2 하이브리드 단백질은, "물고기" 단백질, 예를 들어 cDNA 라이브러리로부터 유래된 시험 단백질에 융합되는 전사 활성 도메인을 함유한다. 상기 물고기 및 미끼 단백질이 약제-의존적 방법으로 상호작용할 수 있는 경우에, 이들은 전사 활성인자의 2개의 도메인을 근접하게 한다. 이러한 근접은 전사 활성인자에 반응성인 전사 조절 부위에 작동가능하게 연결될 수 있는 리포터 유전자의 전사를 야기하기에 충분하고, 마커 유전자의 발현이 검출될 수 있으며, 미끼 단백질/약제 복합체와 그밖의 단백질과의 상호작용을 측정하는 데에 사용될 수 있다.

본 발명의 수행은 다른 지시가 없는 한, 당업계의 기술범위내에 있는, 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 트랜스제닉 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상의 방법을 사용한다. 이러한 방법은 하기 문헌에 충분히 설명되어 있다[참고 문헌: *Molecular Cloning A Laboratory Manual,* 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning,* Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No : 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridzation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology,* Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.). *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology,* Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo,* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N,Y., 1986)].

본 발명의 그밖의 특성 및 잇점은 하기 설명 및 특허 청구의 범위로부터 분명해질 것이다.

[발명의 상세한 설명]

최근 연구는 진핵 생물 세포주기 조절의 분자적 기초에 대한 약간의 주목할만한 견식을 제공하였다. 세포 주기를 통한 포유동물 세포의 경과는 많은 주요 조절 지점에서 조절된다. 이들중 몇몇은, 휴면기(G_0), 제한 지점, G_1/S 전환기 및 G_2/M 전환기의 진입 및 이탈 지점이다[참고 문헌: Draetta (1990) *Trends Biol Sci* 15:378-383; and Sherr (1993) *Cell* 73:1059-1065]. 궁극적으로, 이러한 체크-지점 조절로부터의 정보는 관련 키나제, 시클린-의존적 키나제 (CDK)의 군의 조절된 활성을 통하여 통합된다. 예를 들어, G_1에서 S로의 단계 전환은 현재, 시클린 및 시클린-의존적 키나제의 다수의 주기적 상호작용을 포함하는 다중 단백질 복합체의 일시적 어셈블리에 의해 정확하게 시간이 조정되는 것으로 이해된다.

이를 설명하면, 세포-결합 항원에 의한 휴면 T 림프구의 자극은, 세포 주기진입(G_0에서 G_1으로의 전환)을 초래하는 복합 활성화 프로그램 및 고친화성의 인터루킨-2(IL-2) 수용체의 발현을 개시시킨다. IL-2의 고친화성 수용체와 IL-2의 차후의 결합은, 후기 G_1,-단계 "제한 지점"을 통하여, 활성화된 T 세포의 진행을 유도하고(Pardee (1989) *Science* 246:603-608), 그후 세포는 DNA 복제의 비교적 자율적인 프로그램 및 궁극적으로 유사 분열을 완료하게 된다.

진핵 생물 세포 주기 조절에 관련된 정보의 중요한 결과 중 하나는, 잠재적인 성장-조절 약제에 대한 신규한 클래스의 분자 표적의 설명이다. 마크로리드 에스테르, 라파마이신은 이의 작용 메커니즘이 사이토카인-의존적 T 세포 증식의 저해와 관련되는 강력한 면역 억제인자이다[참고 문헌: Bierer et al. (1990) *PNAS* 87:9231-9235; Dumont et al. (1990) *J. Immunol* 144:1418-1424; Sigal et al. (1991) *Transplant Proc* 23:1-5; and Sigal et al. (1992) *Annu Rev Immunol* 10:519-560]. 라파마이신은 IL-2 자극 세포의 S-단계로의 진행에 요구되는 후기 G_1-단계 이벤트를 특이적으로 저해한다[참고 문헌: Morice et al. (1993) *J Biol Chem* 268:3734-3738]. 라파마이신에 의해 유도되는 세포 주기 정지 지점의 위치는, 이러한 약제가 특히 림프구에서 G_1에서 S로의 단계 전환을 지배하는 조절 단백질을 저해함을 암시한다.

본원에 기술하는 바와 같이 본 발명은 FKBP/라파마이신 복합체의 직접 하류표적인 포유 동물 기원의 신규 단백질의 발견에 관한 것이다. 하기에서 기술되는 것과 같이 FKBP12/라파마이신 복합체와 결합하고, 본원에서 총괄적으로 "RAP-결합 단백질" 또는 "RAP-BP"로서 언급되는 많은 단백질을 단리하기 위해, 약제-의존적인 상호작용 트랩 검정을 사용한다. 특히, 효모 TOR1 및 TOR2 유전자 생성물에 분명하게 관련된 단백질(본원에서 "RAPT1"으로 언급됨)을 위해, 마우스 및 사람 유전자를 클로닝시켰다. 그리고, 신규한 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소(본원에서 "rap-UBC" 로서 언급됨)를 FKBP/라파

마이신 복합체에 결합하는 능력에 기초하여 클로닝시켰다. 그러므로, 본 발명은 유용한 신규 단백질(재조합 형태 및 정제 형태), 재조합 유전자, RAP-결합 단백질에 대한 항체, 및 진단 및 치료학적 사용을 위한 그밖의 신규한 시약 및 검정을 가능하게 한다. 또한, 하나 이상의 목적 RAP-결합 단백질과 FK506-결합 단백질의 결합을 조절할 수 있는 제제를 확인하기 위한, 약제 발견 검정이 제공된다. 이러한 제제는 세포의 성장 및/또는 분화를 변화시키는 데에 치료학적으로 유용할 수 있다. 그러나, 또한 배양된 세포 및 조직의 증식 및/또는 분화를 조절하기 위한 세포-배양 첨가제로서 시험관내에서 사용될 수 있다. 본 발명의 그밖의 관점은 하기에서 설명되며, 본원의 설명으로 당업자에게 분명할 것이다.

편의를 위해 명세서, 실시예 및 청구항에서 사용되는 특정 용어를 함께 제시한다.

본원의 "핵산"은 데옥시리보핵산(DNA) 및 적당하다면 리보핵산(RNA)과 같은 폴리누클레오티드를 의미한다. 또한 상기 용어는, 동등물로서 누클레오티드 유사체로부터 제조되는 RNA 또는 DNA의 유사체 및 기술된 구체예에 적용되는 것으로서, 단일-가닥(센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리누클레오티드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

"유전자" 또는 "재조합 유전자"는 본 발명의 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산을 의미하며, 엑손 및 (임의적으로) 인트론 서열을 모두 포함한다. "재조합 유전자"는 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 핵산을 의미하며, 임의적으로 염색체 RAP-BP 유전자 또는 비관련 염색체 유전자로부터 유래되는 인트론 서열을 포함할 수 있다고 하더라도, 엑손 서열을 엔코딩하는 RAP-BP를 포함한다. 예시적인 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 재조합 유전자의 한 예는 서열 번호 1, 11, 13 또는 23 중 하나로서 제시되는 핵산 서열을 포함한다. "인트론"은 단백질로 번역되지 않으며, 일반적으로 엑손 사이에서 발견되는 소정의 RAP-BP 유전자에 존재하는 DNA 서열을 의미한다.

본원에서 "트랜스펙션"은 핵산-매개 유전자 전달에 의한 핵산, 예를 들어 발현 벡터의 수용 세포로의 도입을 의미한다. 본원의 "형질전환"은 외인성 DNA 또는 RNA의 세포 유입의 결과로서 세포의 유전자형이 변화되는 경우, 예를 들어 형질전환된 세포가 본 발명의 RAP-결합 단백질의 재조합 형태를 발현시키는 경우, 또는 안티-센스 발현이 형질전환된 유전자로부터 유도되는 경우에, RAP-결합 단백질의 자연-발생 형태의 발현이 중단되는 것을 의미한다.

본원에서 "벡터"는 결합된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 바람직한 벡터의 한 유형은 에피솜, 즉 염색체-외의 복제를 할 수 있는 핵산이다. 바람직한 벡터는 연결된 핵산의 자율적 복제 및/또는 발현이 가능한 것이다. 작동가능하게 결합되어 있는 유전자를 발현시킬 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 언급된다. 통상 재조합 DNA 방법에서 유용한 발현 벡터는 종종, 벡터 형태에서 염색체에 결합되어 있지 않은 환형 이중 가닥 DNA 루프로 언급되는 "플라스미드"의 형태이다. 본원에서는 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로 "플라스미드" 및 "벡터"는 교환가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명은 종래에 공지되어 있고, 동등한 기능을 하는 발현 벡터의 그밖의 형태를 포함한다.

본원에서 사용된 "전사 조절 서열"은 작동가능하게 결합되어 있는 단백질 코딩 서열의 전사를 유도하거나 또는 제어하는, 개시 시그널, 인핸서 및 프로모터와 같은 DNA 서열을 의미하는 것으로서 사용되는 유전학적 용어이다. 바람직한 구체예에서, 재조합 RAP-BP 유전자의 전사는 발현이 의도된 세포-유형에서 상기 재조합 유전자의 발현을 제어하는 프로모터 서열(또는 그밖의 전사 조절 서열)의 제어하에 있다. 또한, 재조합 유전자가 RAP-결합 단백질의 자연-발생 형태의 전사를 제어하는 서열과는 상이하거나 동일한 전사 조절 서열의 조절 하에 있을 수 있음이 이해될 것이다.

본원의 "조직-특이적 프로모터"는 프로모터로서 기능하는, 즉 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 선택된 DNA 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미하며, 림프 계통의 세포, 예를 들어 B 또는 T 림프구 또는 선택적으로, 예를 들어 간 세포와 같은 특이적인 조직 세포에서 선택된 DNA 서열의 발현을 초래하는 DNA 서열을 의미한다. 예시적 구체예에서, 림프성-특이적 프로모터를 사용한 유전자 작제물은 단지 림프 조직에서 RAP-BP의 돌연변이체 형태를 발현시킴으로써 림프 세포가 라파마이신에 대한 내성을 가지게 하는 RAP-결합 단백질의 우성 네가티브 돌연변이 형태를 제공하기 위한 유전자 치료법의 일부로서 사용될 수 있다. 상기 용어는 또한 일차적으로 한 조직에서 선택된 DNA의 발현을 조절하나, 그밖의 조직에서는 발현을 야기하는 "누출성" 프로모터로 언급된다.

본원의 "트랜스제닉 동물"은 어떠한 동물도 포함하지만, 바람직하게는 사람 이외의 동물, 조류 또는 양서류이며, 여기서 하나 이상의 동물세포는 사람이 개입된 방식, 예컨대 당업계에 잘 알려진 트랜스제닉 방법에 의해 도입된 이종 핵산을 함유한다. 상기 핵산은 재조합 바이러스를 사용한 감염 또는 마이크로 주입에 의한 것과 같은 계획적인 유전자 조작에 의해 세포의 전구체로 직접 또는 간접적으로 도입된다. 유전자 조작은 전통적인 교잡(cross-breeding) 또는 시험관내 수정을 포함하지 않으며, 재조합 DNA 분자의 도입을 나타낸다. 상기 분자는 염색체내로 혼입되거나 또는 염색체 외의 복제 DNA일 수 있다. 본원의 일반적 트랜스제닉 동물에서 이식 유전자는 세포가 목적 RAP-결합 단백질의 재조합 형태, 예를 들어 작용제 또는 길항제 형태를 발현시키도록 야기한다. 그러나, 또한 재조합 RAP-BP 유전자가 침묵하는 트랜스제닉 동물이 고려되며, 그 예로써 FLP 또는 CRE 재조합효소(recombinase) 의존 작제물이 하기에서 기술된다. 본 발명의 "사람을 제외한

동물"은, 설치류 동물, 사람을 제외한 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류 등과 같은 척추 동물을 포함한다. 제노푸스(*Xenopus*) 속의 일원과 같은 트랜스제닉 양서류 및 트랜스제닉 닭은, 예를 들어 배의 형성 및 조직 패터닝(patterning)을 이해하기 위한 중요한 수단을 제공할 수 있다고 하더라도, 바람직한 사람을 제외한 동물은 래트 및 마우스를 포함한 설치류로부터 선택되며, 가장 바람직하게는 마우스이다. "키메라 동물"은 재조합 유전자가 존재하거나 재조합체가 동물의 일부 세포에서 발현되는 동물을 의미한다. "조직-특이적 키메라 동물"은 재조합 RAP-BP 유전자가 일부 조직에 존재하고/하거나 발현되며, 그밖의 조직에서는 존재하지 않는 것을 가리킨다.

본원의 "이식 유전자"는 그것이 도입되는 트랜스제닉 동물 또는 세포에 부분적으로 또는 전체적으로 이종인, 즉 외래의 것이거나 또는 그것이 도입되는 트랜스 제닉 동물 또는 세포의 내인성 유전자에 상동성이나, 그것이 삽입되는 세포의 게놈을 변형시키는 방식(예를 들어, 천연 유전자와 다른 위치에 삽입되거나 또는 녹아 웃을 야기하는 방식)으로 동물의 게놈으로 삽입되거나 또는 삽입되도록 고안된 핵산 서열(예를 들어, RAP-결합 단백질을 엔코딩하는)을 의미한다. 이식 유전자는 선택된 핵산의 최적 발현에 필수적인 인트론과 같은 다른 핵산 및 하나 이상의 전사 조절 서열을 포함한다.

공지된 바와 같이 특정 폴리펩티드의 유전자는 개체의 게놈 내에 단일 또는 다수의 복사체로 존재할 수 있다. 이러한 복제 유전자는 동일하거나, 또는 실질적으로 동일한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 누클레오티드 치환, 첨가 또는 결실을 포함하는 일부 변형을 가질 수 있다. 따라서, "RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 DNA 서열"은 특정 개체내의 하나 이상의 유전자를 의미할 수 있다. 또한, 누클레오티드 서열내의 일부 차이는 개별적 생물체 사이에 존재할 수 있고, 대립 형질로 언급된다. 이러한 대립 형질적 차이는 여전히 동일한 생물학적 활성을 가지는 단백질을 엔코딩하는 엔코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 차이를 초래할 수 있거나 그렇지 않다.

"상동성"은 2개의 핵산 분자 사이 또는 2개의 펩티드 사이의 서열 유사성을 의미한다. 상동성은 비교 목적을 위해 정렬되는 각 서열내의 위치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 비교되는 서열내의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유되는 경우에, 상기 분자는 그 위치에서 상동이다. 서열 사이의 상동성의 정도는 서열에 의해 공유되는 매칭 또는 상동 위치의 갯수의 함수이다.

"세포", "숙주 세포" 또는 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 대체가능하게 사용되는 의미이다. 이러한 용어는 특정 목적 세포 및 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 의미하는 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 차후 세대에 일부 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 부모 세포와 동일하지 않을 수 있으나, 여전히 본원에서 사용되는 용어의 범위내에 포함된다.

"키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은, 목적 RAP-결합 단백질의 하나를 엔코딩하는 제1 아미노산 서열과 목적 RAP-BP의 도메인과 실질적으로 상동이 아닌 외래의 도메인을 정의하는 제2 아미노산 서열의 융합체이다. 키메라 단백질은 또한 제1 단백질을 발현시키는 생물체에 존재하는(상이한 단백질이기는 하나) 외래 도메인을 제공하거나, 다른 종류의 생물체에 의해 발현되는 단백질 구조의 "종간(interspecies)", "유전자간(intergeneric)" 등의 융합체일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질은 일반식 Z_1-Z_2-Z_3(Z_2는 RAP-결합 단백질의 폴리펩티드 서열 모두 또는 일부를 나타내고, Z_1 및 Z_3은 각각 RAP-BP 서열에 이종인 폴리펩티드 서열을 나타내며, Z_1과 Z_3 중 적어도 하나는 융합 단백질내에 존재한다)에 의해 제시될 수 있다.

RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 핵산 서열에 관한 "진화론적으로 관련된"은, 자연 발생 돌연변이체를 포함하는 생물체내에서 자연적으로 발생하는 핵산 서열에 관한 것이다. 또한, 상기 용어는 RAP-결합 단백질의 자연발생 이소폼으로부터 초기에 유래되나, 돌연변이유발에 의해 변형된 핵산 서열에 관한 것이다. 예를 들어, 하기에서 기술되는 것과 같은 조합 돌연변이 유발과 같은 돌연변이 유발에 의해 변형된 핵산 서열을 의미하나, FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 폴리펩티드를 엔코딩하거나, 또는 부모 RAP-결합 단백질의 하나 이상의 활성을 보유하거나, 또는 상기 단백질의 활성의 길항제인 핵산 서열에 관한 것이다.

본원에서 DNA 또는 RNA와 같은 핵산에 관한 "단리된"은, 거대 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 DNA 또는 RNA로부터 분리된 분자에 관한 것이다. 예를 들어, 목적 RAP-결합 단백질중 하나를 엔코딩하는 단리된 핵산은 바람직하게는 게놈 DNA에서 특정 RAP-BP 유전자에 자연적으로 즉시 플랭킹(flanking) 하는 핵산 서열의 단지 10킬로베이스(kb) 이하, 보다 더 바람직하게는 그러한 자연발생의 플랭킹 서열의 5kb 이하, 가장 바람직하게는 자연발생 플랭킹 서열의 1.5kb 미만을 포함한다. 또한, 본원의 "단리된"은 화학적으로 합성되는 경우에는 화학적 전구체 또는 그밖의 화학물질이 없으며, 또한 재조합 DNA 방법에 의해 생성되는 경우에는 세포 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지가 없는 핵산 또는 펩티드를 나타낸다. 또한, "단리된 핵산"은 자연 상태에서 발견되지 않으며, 단편으로서 자연적으로 발생하지 않는 핵산 단편을 포함하는 의미이다.

본원의 "라파마이신 결합 도메인"은, FKBP/라파마이신 복합체와 특이적으로 상호작용하는 결합 활성을 부여하는 폴리펩티드 서열을 의미한다. 예시적 라파마이신 결합 도메인은 서열번호 2의 Val26-Tyr160 (mRAPT1), 서열번호 12의 Val2012-Tyr2144 (hRAPT1), 서열번호 14의 Val41-Tyr173 (caRAPT1), 서열번호 16의 Val1-Tyr133 (TOR1) 및 서열번호 18의 Val1-Arg133 (TOR2)에 의해 정의되는 폴리펩티드 내에 제시된다.

"RAPT1 유사 폴리펩티드"는 FKBP/라파마이신 복합체의 직접 결합 표적 단백질이고, 본 발명의 포유동물 RAPT1 단백질과 일부 서열 상동성을 공유하는 진핵 세포성 단백질을 의미한다. 예시적인 RAPT1-유사 폴리펩티드는 효모 TOR1 및 TOR2 단백질을 포함한다.

"가용성 단백질"은, 10μM, 더욱 바람직하게는 10mM의 단백질 농도에서, 예를 들어 0.14M NaCl 또는 수크로오스의 생리학적 등장 조건에서 수성 완충액으로부터 침전되지 않는(예를 들어 약 95%, 더욱 바람직하게는 99%가 상층액내에 존재하는) 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 조건은 특이적으로 유효 농도에서 계면활성제 또는 그밖의 변성제의 부재에 관련된 것이다.

하기에서 설명되는 바와 같이, 본 발명의 한 관점은 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산, 이들의 단편 및/또는 이러한 핵산의 동등물에 관련된다. 본원의 핵산은 이러한 단편 및 동등물을 포함하는 의미이고, 예를 들어 동등물은 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 능력을 보유하며, 본원에서 기술되는 것과 같은 RAP-결합 단백질의 그밖의 활성을 추가적으로 보유하는 기능적으로 동등한 RAP-결합 단백질 또는 기능적으로 동등한 펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 것으로 이해된다. 동등한 누클레오티드 서열은, 대립 형질적 변이체와 같은 하나 이상의 누클레오티드의 치환, 첨가 또는 결실에 의해 다른 서열을 포함하고; 또한, 유전자 코드의 축퇴로 인해 서열번호 1 또는 서열번호 11에 제시되는 포유 동물의 RAPT1 유전자의 누클레오티드 서열 또는 서열번호 13의 균류 RAPT1 단백질의 누클레오티드 서열 또는 서열번호 23에 제시되는 UBC 효소를 엔코딩하는 누클레오티드 서열과 다른 서열을 포함한다. 또한, 동등한 핵산은 엄격한 조건(즉, 약 1M 염에서 형성된 DNA 듀플렉스의 융점(T_m) 이하의 약 20-27℃와 동등한 조건) 하에, 서열번호 2 또는 12에 제시되는 서열을 포함하는 RAPT1 단백질의 누클레오티드 서열 또는 pIC524(ATCC 수탁 번호 제75787호)의 RAPT1 유전자 삽입체의 누클레오티드 서열과 하이브리드화되는 누클레오티드 서열을 포함한다. 유사하게, 목적 rap-UBC 효소의 동족체를 엔코딩하는 동등한 핵산은, 엄격한 조건 하에서 서열번호 23에 제시되는 누클레오티드 서열 또는 SMR4-15(ATCC 수탁 번호 제75786호)의 rap-UBC 유전자 삽입체의 누클레오티드 서열과 하이브리드화되는 누클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 동등물은 서열번호 1 또는 11 또는 13 또는 23에 제시되는 것을 포함하는 누클레오티드 서열에 진화론적으로 관련되고, 이로부터 유도되는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

서열번호 2에 제시되는 아미노산 서열 및 ATCC 클론 75787에 제시되는 단편은 포유 동물의 RAPT1 단백질의 더 큰 전장 형태의 생물학적 활성 부분을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, RAPT1 폴리펩티드는 서열번호 2의 잔기 28-160 또는 서열번호 12의 잔기 2012-2144로 표시되는 rap-결합 도메인과 같은 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 결합 도메인을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 전장 형태로부터 단리된 RAPT1 단백질 부분은 FKBP/라파마이신 복합체, 예를 들어 FKBP12/라파마이신 복합체에 대한 특이적 결합 친화성, 예를 들어, 라파마이신 복합체에 대한 RAPT1의 자연 발생 형태의 결합 친화성의 50% 이상, 더욱 바람직하게는 75% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 친화성을 보유한다. 폴리펩티드가 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 경우에, 상기 폴리펩티드는 RAPT1 단백질의 생물학적 활성을 가지는 것으로 고려된다; FKBP/약제 복합체, 예를 들어 FKBP/마크로리드 복합체, 예를 들어 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 능력; FKBP12/라파마이신 복합체에 결합하는 능력; FKBP/라파마이신-복합체의 조립을 조절하는 능력; 세포 증식을 조절하는 능력, 예를 들어 세포-주기를 조절하는 능력, 예를 들어 G_1 단계를 통한 세포의 진행을 조절하는 능력. 또한, 서열 분석을 기초로 하여 목적 RAPT1 단백질의 생물학적 기능은 PI-3-키나제 활성과 같은, 포스파티딜 이노시톨-키나제 활성을 포함할 수 있다. 또한 단백질이 상기 언급된 특성의 하나 이상에 대한 특이적 작용제(모사체) 또는 길항제인 경우, 상기 단백질은 RAPT1 생활성에 대해 생활성인 것으로 고려된다.

rap-UBC 효소에 있어서, 목적 단백질의 바람직한 구체예는 세포 단백질에 유비퀴틴을 컨쥬게이션시키는 능력 또는 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 능력을 가지거나 또는 두가지 능력 모두를 가지는 서열번호 24(또는 실시예 5에서 기술되는 SMR4-15의 rap-UBC 유전자 삽입체의) 아미노산 서열의 일부를 포함한다. 라파마이신이 G1 단계 동안 세포-주기에서 장애를 야기한다고 지정된 바와 같이, 목적 rap-UBC 효소의 생물학적 활성의 스펙트럼이 특정 세포 주기 조절 단백질, 특히 비교적 수명이 짧은 단백질(예를 들어 30분 내지 2시간의 반감기를 가지는 단백질)의 반감기의 제어를 포함하는 것이 가능하다. 예를 들어, 목적 UBC는, 예를 들어 p53.myc 및/또는 시클린의 유비퀴틴화를 매개하는 능력을 가지

며, 따라서 증식 세포에서 세포-주기 조절 단백질의 세포 반감기에 영향을 줄 수 있다. FKBP/라파마이신 복합체에 대한 rap-UBC의 결합은 기질 단백질로부터의 효소의 격리를 야기할수 있다. 따라서, 라파마이신은 세포성 p53 수준을 증가시켜 G1 단계의 진행을 차례로 저해하는 방식으로 p53의 유비퀴틴-매개 분해를 방해할 수 있다.

또한, 특정 조건 하에서 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 서브 세트만을 저해하거나 또는 촉진시키기 위해, RAP-BP 작용제 또는 RAP-BP 길항제중 하나로서 제한된 범위에서 기능하는 클로닝된 RAP-결합 단백질의 동족체를 제공하는 것이 유리할 수 있다고 일반적으로 이해된다. 따라서, 특이적인 생물학적 효과가 모든 RAP-BP와 관련된 생물학적 활성에 대한 작용제 또는 길항제로 처리하는 것과 관련된 부작용이 거의 없고, 제한된 기능의 동족체를 사용한 처리에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, FKBP/라파마이신 복합체와 실질적으로 결합하지 않으나, 단백질의 천연 형태로 인한 대부분의 다른 생물학적 기능을 보유하는 RAPT1 유사체 및 rap-UBC 유사체가 생성될 수 있다. 예를 들어, RAPT1 동족체는 포스파티딜 이노시톨 키나제 활성과 같은 키나제 활성, 예를 들어 PI-3-키나제 활성을 보유한다. 반대로, RAPT1 동족체는 키나제 활성은 결여되나, FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 능력을 보유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 2 또는 12에 제시되는 라파마이신 결합 도메인과 같은 RAPT1 동족체의 FKBP/라파마이신 결합 부분은, RAPT1의 자연 발생 형태에 의한 라파마이신 복합체로의 결합을 경쟁적으로 저해하는 데에 사용될 수 있다.

목적 RAP-결합 단백질의 동족체는 불연속 점 돌연변이(들) 또는 트렁케이션과 같은 돌연변이 유발에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 유래되는 RAP-BP의 생물학적 활성의 실질적으로 동일한 또는 단지 서브세트를 보유하는 동족체를 유발시킬 수 있다. 다른 방법으로, FKBP/라파마이신 복합체에 경쟁적으로 결합하는 것에 의하는 것과 같이, 단백질의 자연 발생 형태의 기능을 저해할 수 있는 단백질의 길항 형태가 생성될 수 있다.

서열번호 1에 제시되는 누클레오티드 서열은 마우스 RAPT1 단백질의 생물학적으로 활성인 부분을 엔코딩하며, 특히 라파마이신 결합 도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 한 구체예는 서열번호 2에 제시되는 RAPT1 단백질의 일부에 실질적으로 상동인 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 제공한다. 바람직하게, 상기 핵산은 서열번호 1에 제시되는 누클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 분자이다. 본 발명의 그밖의 구체예는 라파마이신 결합 도메인에 상응하는 서열번호 12로 표시되는 RAPT1 단백질 부분, 예를 들어 서열번호 12의 Val2012 내지 Tyr2144에 실질적으로 상동인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 제공한다. 유사하게, 본 발명은 서열번호 14의 칸디다 RAPT1 폴리펩티드의 일부, 예를 들어 라파마이신 결합 부분을 엔코딩하는 핵산을 제공한다.

바람직한 핵산은 서열번호 2, 12 또는 14 중 하나 이상에 제시되는 아미노산 서열과 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩한다. 또한, 펩티드, 특히 RAPT1 단백질의 활성을 가지고, 서열번호 2, 12 또는 14에 제시되는 서열과 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 가장 바람직하게는 약 98-99% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 엔코딩하는 핵산이 본 발명의 범위내에 있고, 상기 언급된 서열 목록과 동일한 단백질이다. 한 구체예에서, 상기 핵산은 목적 RAP-결합 단백질의 하나 이상의 활성을 가지는 펩티드를 엔코딩하는 cDNA이다. 바람직하게, 상기 핵산은 서열번호 2, 12 또는 14 중 하나에 제시되는 누클레오티드 서열의 일부 또는 전부를 포함하는 cDNA 분자이다. 이러한 cDNA 분자의 바람직한 부분은, 유전자의 코딩 영역을 포함한다. 예를 들어, 재조합 RAP-BP 유전자는, ATCC 수탁번호 제75787호의 RAP-BP 클론 중 하나에 대한 코딩 서열을 증폭시킴으로써 생성되는 PCR 단편의 누클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

서열번호 23에 제시되는 누클레오티드 서열은, 생물학적으로 활성인 사람 유비퀴틴 컨쥬게이션 효소를 엔코딩한다. 따라서, 본 발명의 한 구체예에서 상기 핵산은 서열번호 24로 표시되는 rap-UBC 단백질의 라파마이신 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩한다. 바람직하게, 상기 핵산은 서열번호 23에 제시되는 누클레오티드 서열의 적어도 일부를 포함하는 cDNA 분자이다. 바람직한 핵산은, 서열번호 24에 제시되는 아미노산 서열과 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 엔코딩한다. 폴리펩티드, 특히 유비퀴틴 컨쥬게이션 활성을 가지며, 서열번호 24에 제시되는 서열과 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 가장 바람직하게는 약 98-99% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산은 본 발명의 범위내에 있다.

본 발명의 추가의 구체예에서, 재조합 RAP-BP 유전자는, 첨부된 서열 목록에 제시되는 아미노산 서열에 더하여 상기 단백질의 C-말단 및 N-말단에서 아미노산을 엔코딩하는 추가적 누클레오티드 서열을 포함한다. 이 서열목록은 제시되지 않았다. 예를 들어, 재조합 RAPT1 유전자는 실시예 4에 기술되는 것과 같은 프라이머의 세트를 사용하여 pIC524의 RAPT1 코딩 서열을 증폭시킴으로써 생성되는 PCR 단편의 누클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용에 비추어, 단지 통상의 실험을 사용하여, 예를 들어 서열번호 12의 전장 서열을 생성시키기 위해, pIC524 클론의 서열로부터 고안된 프라이머를 사용하여, 예컨대 RACE PCR에 의해, RAPT1의 잔류 5' 서열을, 예를 들어 cDNA 라이브러리로부터 분리시킬 수 있다. 특히, 본 발명에서 전장 RAPT1 단백질을 엔코딩하는 재조합 RAPT1 유전자가 고려된다. 본 발명의 다른 구체예

는, 마우스 또는 사람 RAPT1의 이소폼, 특히 FKBP12/라파마이신 복합체와 결합할 수 있는 이소폼(예를 들어, 스플라이싱 변이체, 대립변이체 등)을 엔코딩하는 핵산을 포함한다. RAP-결합 단백질의 더 큰 패밀리의 다른 일원 뿐만 아니라, 이러한 이소폼은 하기 상세하게 설명되는 약제-의존적 상호작용 트랩 검정을 사용하여 분리될 수 있다.

본 발명의 다른 관점은 고도의 또는 저도의 엄격한 조건에서, 서열번호 2, 12 또는 14중 하나에 제시되는 아미노산 서열의 적어도 일부를 가지는 펩티드를 엔코딩하는 핵산과 하이브리드화되는 핵산을 제공한다. DNA 하이브리드화를 촉진시키는 적절한 엄격 조건, 예를 들어 약 45℃에서 6.0 x 염화 나트륨/시트르산 나트륨(SSC), 그후 50℃에서 약 2.0 x SSC에서의 세척은 당업자에게 공지되어 있고, 또한 하기 문헌에서 발견할 수 있다[참고 문헌: *Current Protocols in Molecular Biology,* John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]. 예를 들어, 세척 단계에서의 염 농도는 50℃에서 약 2.0 x SSC의 저도의 엄격 조건으로부터 50℃에서의 약 0.2 x SSC의 고도의 엄격 조건에서 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는, 실온 약 22℃의 저도의 엄격 조건으로부터 약 65℃의 고도의 엄격 조건으로 증가될 수 있다.

또한, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 서열번호 1, 11 또는 13 중 하나에 제시되는 누클레오티드 서열과 상이한 서열을 가지는 핵산이 본 발명의 범위내에 있다. 상기 핵산은 기능적으로 동등한 펩티드(즉, RAP-결합 단백질의 생물학적 활성을 가지는 펩티드)를 엔코딩하지만, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 첨부된 서열 목록과 상이하다. 예를 들어, 수많은 아미노산들은 하나 이상의 트리플렛(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 지정하는 코돈 또는 유사물 (예를 들어, CAU 및 CAC는 각각 히스티딘을 엔코딩한다)은, RAP-결합 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이를 초래할 수 있다. 그러나, 목적 RAP-결합 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성이 척추 동물들간에 존재하는 것으로 예상된다. 당업자는, RAP-결합 단백질의 활성을 가지는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산의 하나 이상의 누클레오티드(누클레오티드의 약 3-5%까지)에서의 이러한 변화가, 자연적 대립형질 변화로 인한 소정의 종의 개체들간에 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 상기 누클레오티드 변화 및 결과된 아미노산 다형성은 본 발명의 범위내에 있다.

또한, 본 발명은 라파마이신 결합 도메인과 같이 RAPT1 단백질의 단지 일부를 엔코딩하는 핵산을 제공한다. 본원의 RAP-결합 단백질의 일부를 엔코딩하는 핵산의 단편은 전장 RAP-결합 단백질의 전체 아미노산 서열을 엔코딩하는 핵산보다 적은 누클레오티드를 가지나, 여전히 FKBP/라파마이신 복합체에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 엔코딩하는 충분한 코딩 서열을 포함하는 누클레오티드 서열을 의미한다. 또한, 본 발명의 범위내의 핵산 단편은, 고도의 또는 저도의 엄격 조건에서, 다른 척추 동물 종, 특히 다른 포유류의 핵산과 하이브리드화될 수 있는 단편을 포함하며, 목적 RAP-결합 단백질의 동족체를 검출하기 위한 스크리닝 프로토콜에서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 범위내의 핵산은 링커 서열, 변형된 제한 엔도누클레아제 부위 및 RAP-결합 단백질로부터 유래되는 재조합 펩티드의 분자 클로닝, 발현 또는 정제에 유용한 그밖의 서열을 함유할 수 있다.

하기에 제시되는 실시예에서 지적되는 바와 같이, RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 핵산은 척추 동물, 특히 예를 들어 마우스 또는 사람과 같은 포유류 동물로부터의 수많은 세포들중 어느 하나의 세포에 존재하는 mRNA로부터 수득될 수 있다. 또한, 성인 및 배아로부터 수득되는 게놈 DNA로부터 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 핵산을 수득하는 것이 가능하여야 한다. 예를 들어, RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 유전자는 당업자에게 일반적으로 공지되어 있는 것과 같이, 하기에서 설명되는 프로토콜에 따라 cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터 클로닝될 수 있다. 예를 들어, RAPT1 단백질, 특히 다른 이소폼, 예를 들어 서열번호 2 또는 12에 제시되는 RAPT1 단백질의 파라로그(paralog) 또는 오르토로그(ortholog)를 엔코딩하는 cDNA는, 예를 들어 사람의 세포와 같은 포유류 동물 세포로부터 총 mRNA를 단리시키고, 총 mRNA로부터 이중 가닥 cDNA를 생성하고, 적합한 플라스미드 또는 박테리오파아지 벡터내로 상기 cDNA를 클로닝시키고, 예를 들어 올리고누클레오티드 프로브 또는 웨스턴 블롯 분석과 같은 많은 공지된 방법을 사용하여 RAPT1 클론을 단리시킴으로써 수득될 수 있다. 또한 목적 RAP-결합 단백질에 관련된 단백질을 엔코딩하는 유전자는 본 발명에 의해 제공되는 누클레오티드 서열 정보에 따라 확립된 중합 효소 연쇄 반응 기술을 사용하여 클로닝될 수 있다. 본 발명의 핵산은 DNA 또는 RNA일수 있다.

본 발명의 다른 관점은 "안티센스" 치료법에서의 상기 단리된 핵산의 사용에 관한 것이다. 본원의 "안티센스" 치료법은 올리고누클레오티드 프로브 또는 이의 유도체의 투여 또는 동일계내(in situ) 생성에 관한 것이며, 이는 세포성 조건에서 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 하이브리드화되어(예를 들어, 결합하여) 그 결과, 예를 들어 전사 및/또는 번역을 저해하여 그 단백질의 발현을 저해하는 것에 관한 것이다. 상기 결합은 통상의 염기쌍 상보성에 의해, 또는 예를 들어 DNA 듀플렉스에 결합하는 경우에 이중 나선의 메이저 그루브(major groove)에서의 특이적 상호작용을 통해 일어날 수 있다. 일반적으로, "안티센스" 치료법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법을 의미하며, 올리고누클레오티드 서열에 대한 특이적 결합에 의존적인 임의의 치료법을 포함한다.

본 발명의 안티센스 작제물은 예를 들어 세포에서 전사될 경우에 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 세포 mRNA의 하나 이상의 독특한 부분과 상보적인 RNA를 생성시키는 발현 플라스미드로서 전달될 수 있다. 또한, 안티센스 작제물은, 생체외

에서 생성된 올리고누클레오티드 프로브일 수 있으며, 상기 프로브가 세포내로 도입될 경우에 RAP-BP 유전자의 mRNA 및/또는 게놈 서열과 하이브리드화됨으로써 발현의 저해를 야기할 수 있다. 이러한 올리고누클레오티드 프로브는 내인성 누클레아제, 예를 들어 엑소누클레아제 및/또는 엔도누클레아제에 내성인 바람직하게 변형된 올리고누클레오티드이며, 따라서 생체내에서 적합하다. 안티센스 올리고누클레오티드로서 사용하기 위한 예시적 핵산 분자는 DNA의 포스포라미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 유사체이다(참조: 미국 특허 제5,176,996호, 제5,264,564호 및 제5,256,775호). 그외에, 안티센스 치료법에 유용한 올리고머를 작제하기 위한 일반적 접근은, 예를 들어 하기 문헌에 제시되어 있다[참고 문헌: van der Krol et al. (1988) *Biotechniques* 6:958-976; and Stein et al. (1988) *Cancer Res* 48:2659-2668].

따라서, 본 발명의 변형된 올리고머는 치료, 진단 및 연구 환경에서 유용하다. 치료학적 적용에서, 상기 올리고머는 일반적으로 안티센스 치료법에 적당한 방법으로 사용된다. 이러한 치료법에 있어서, 본 발명의 올리고머는, 전신 및 국부 또는 국소 투여를 포함한 다양한 투여용으로 포뮬레이션될 수 있다. 기술 및 포뮬레이션은 일반적으로 하기 문헌에서 발견할 수 있다[참고 문헌: Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA]. 전신 투여에 있어서, 근육내, 정맥내, 복강내 및 피하 주입을 포함한 주입이 바람직하고, 본 발명의 올리고머는, 액상 용액, 바람직하게는 행크 용액 또는 링게르액과 같은 생리학적으로 허용될 수 있는 완충액중에 포뮬레이션될 수 있다. 그외에, 상기 올리고머는 고형으로 포뮬레이션되어, 사용 직전에 재용해되거나 또는 현탁될 수 있다. 또한, 동결건조 형태가 포함된다.

또한, 전신 투여는 경점막 또는 경피적 수단에 의해 이루어지거나 상기 화합물은 경구적으로 투여될 수 있다. 경점막 또는 경피적 투여에 있어서, 상기 포뮬레이션에서 침투되는 배리어에 대해 적당한 침투제가 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여에서 담즙 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 또한, 침투를 촉진시키기 위해 계면활성제를 사용할 수 있다. 경점막 투여는 코 분무를 통하거나 좌제를 사용하여 이루어질 수 있다. 경구적 투여에 있어서, 상기 올리고머는 캡슐, 정제 및 강장제와 같은 통상의 경구적 투여로 포뮬레이션된다. 국소 투여에 있어서, 본 발명의 올리고머는 일반적으로 공지되어 있는 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 포뮬레이션된다.

치료학적 사용 이외에, 본 발명의 올리고머는 특이적으로 결합하는 표적 DNA 또는 RNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 진단학적 시약으로서 사용될 수 있다. 이러한 진단학적 시험은 하기에서 추가로 상세하게 설명된다.

유사하게, 본 발명의 안티센스 작제물은 RAP-결합 단백질의 일반적인 생물학적 활성에 길항적으로 작용함으로써 생체내 및 생체외 조직 배양 시스템의 조직의 조작, 예를 들어 조직 증식 및/또는 분화에서 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 하나 이상의 전사 조절 서열에 작동가능하게 결합되는 본 발명의 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터를 제공한다. "작동가능하게 결합되는"은, 누클레오티드 서열의 발현을 가능하게 하는 방식으로 상기 누클레오티드 서열이 조절 서열에 결합되는 것을 의미한다. 조절 서열은 당업에 인지되어 있고, 재조합 RAP-결합 단백질의 직접 발현을 위해 선택된다. 따라서, "전사 조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 그밖의 발현 제어 요소를 포함한다. 이러한 조절 서열은 하기 문헌에 제시되어 있다[참고 문헌: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]. 예를 들어, 작동가능하게 연결된 경우 DNA 서열의 발현을 제어하는 다양한 발현 제어 서열-서열의 어느 것이라도 벡터내에서 사용되어 본 발명의 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 DNA 서열을 발현시킬 수 있다. 이러한 유용한 발현 제어 서열은 예를 들어 SV40의 전기(early) 및 후기(later) 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 초기(immediate early) 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합 효소에 의해 발현이 진행되는 T7 프로모터, 파아지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 외피 단백질을 위한 제어 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 그밖의 해당 과정 효소를 위한 프로모터, Pho5와 같은 산 포스파타제의 프로모터, 효모 α-메이팅(mating) 인자의 프로모터, 바큘로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및 진핵 또는 원핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 공지되어 있는 그밖의 서열 및 이들의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 디자인은 형질전환되는 숙주 세포 및 발현시킬 단백질의 유형의 선택과 같은 요소에 의존적일 수 있다. 또한, 벡터의 복제 수, 상기 복제 수를 제어하는 능력 및 항생물질 마커와 같은 벡터에 의해 엔코딩되는 그밖의 단백질의 발현이 고려되어야 한다. 한 구체예에서, 발현 벡터는 RAP-결합 단백질의 작용을 모방하거나 그렇지 않으면 효능적으로 작용하는 폴리펩티드를 엔코딩하거나, 진정한 RAP-결합 단백질의 작용에 길항적으로 작용하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 재조합 유전자를 포함한다. 이러한 발현 벡터는, 세포를 트랜스펙션시키고 본원에서 기술되는 핵산에 의해 엔코딩된 융합 단백질을 포함한 폴리펩티드를 생성시키는 데에 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 유전자 작제물은 하나 이상의 목적 RAP-결합 단백질의 작용 형태 또는 길항 형태를 엔코딩하는 핵산을 전달시키기 위한 유전자 치료 프로토콜의 일부로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 관점은, 결합하는 단백질 또는 그밖의 전사 조절 단백질이 오발현되는 세포에서 하나 이상의 목적 RAP-결합 단백질의 기능을 재구성하거나 또는 대안적

으로 폐기하기 위해, 특정 세포 유형에서 RAP-결합 단백질의 발현 및 생체내 트랜스펙션을 위한 발현 벡터를 특성화한다. 예를 들어, 유전자 치료법은, 특정 조직 또는 세포-유형을 라파마이신 유도 세포-주기 정지에 내성이 되게 하기 위해, 라파마이신에 반응하지 않는 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 유전자를 전달하는 데에 사용될 수 있다.

목적 RAP-결합 단백질 및 이의 돌연변이체의 발현 작제물은 생물학적으로 유효한 캐리어, 예를 들어 생체내에서 세포에 RAP-BP 유전자를 효과적으로 전달할 수 있는 포뮬레이션 또는 조성물 중에서 투여될 수 있다. 접근법은 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스-1 또는 재조합 세균성 플라스미드 또는 진핵성 플라스미드를 포함한 바이러스 벡터에 목적 유전자의 삽입을 포함한다. 바이러스 벡터는 세포를 직접 트랜스펙션시킨다; 플라스미드 DNA는, 예를 들어 양이온 리포솜(리포펙틴) 또는 유도체(예를 들어, 컨쥬게이션된 항체), 폴리리신 컨쥬게이트, 그라마시딘 S, 인공 바이러스 외피 또는 그밖의 세포내 캐리어, 및 생체내에서 수행되는 유전자 작제물 또는 $CaPO_4$ 침전물의 직접 주입의 도움으로 전달될 수 있다. 적당한 표적 세포의 형질 도입이 유전자 치료법에서 중요한 제1 단계를 나타내기 때문에, 특정 유전자 전달 시스템의 선택은 의도된 표적의 표현형 및 투여 경로, 예를 들어 국부적 또는 전신 투여와 같은 인자에 의존적임이 이해될 것이다. 또한, RAP-BP 발현의 생체내 형질 도입을 위해 제공되는 특정 유전자 작제물이 진단학적 검정과 같은 세포의 시험관내 형질도입에 유용함이 인지될 것이다.

생체내에서 핵산을 세포에 도입하기 위한 바람직한 접근법은 바람직한 RAP-결합 단백질의 특정 형태를 엔코딩하는 cDNA와 같은 핵산을 함유하는 바이러스 벡터를 사용하는 것이다. 바이러스 벡터를 사용한 세포의 감염은 표적화된 세포의 많은 부분이 상기 핵산을 수용할 수 있다는 장점을 가진다. 또한, 예를 들어 바이러스 벡터내에 함유되는 cDNA에 의해, 바이러스 벡터내에 엔코딩된 분자는 바이러스 벡터 핵산을 수용한 세포에서 효과적으로 발현된다.

레트로바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터는 일반적으로, 특히 사람내로의 생체내 외인성 유전자의 전달을 위해 선택되는 재조합 유전자 전달 시스템으로 이해된다. 이러한 벡터는 세포내로의 유전자의 효과적인 전달을 제공하고, 상기 전달된 핵산은 숙주의 염색체 DNA로 안정적으로 통합된다. 레트로바이러스의 사용을 위한 주요 필요 조건은, 특히, 세포 군집에서 야생형 바이러스의 확산 가능성에 있어서, 이들의 사용의 안정성을 보장하는 것이다. 복제-결함 레트로바이러스만을 제공하는 특화된 세포주("패키징 세포")의 개발은, 유전자 치료법을 위한 레트로바이러스의 사용을 증가시키며, 결함이 있는 레트로바이러스는 유전자 치료 목적을 위한 유전자 전달에서의 사용을 위해 특성화되었다 (참조: Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271). 따라서, 레트로바이러스 코딩 서열 (*gag, pol, env*)의 일부가 레트로바이러스 복제 결함을 야기하는 목적 수용체중 하나를 엔코딩하는 핵산에 의해 대체된 재조합 레트로바이러스가 작제될 수 있다.

다음, 복제 결함 레트로바이러스는 표준 기술에 의한 헬퍼 바이러스의 사용을 통하여 표적 세포를 감염시키는 데에 사용될 수 있는 비리온으로 패키징된다. 재조합 레트로바이러스를 제조하고, 이러한 바이러스로 생체내 또는 시험관내에서 세포를 감염시키기 위한 프로토콜은 하기 문헌에서 발견될 수 있다[참고 문헌: Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 및 그밖의 표준 실험 매뉴얼]. 적합한 레트로바이러스의 예는 종래에 공지되어 있는 pLJ, pZIP, pWE 및 pEM이다. 에코트로픽(ecotropic) 및 암포트로픽(amphotropic) 레트로바이러스 시스템을 제조하기에 적합한 패키징 바이러스 라인의 예는 ΨCrip, ΨCre, Ψ2 및 ΨAm을 포함한다. 레트로바이러스는, 생체내 및/또는 시험관내에서 림프구를 포함한 많은 상이한 세포 유형으로 다양한 유전자를 도입시키는 데에 사용되어 왔다(Eglitis, et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85.6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; 미국 특허 제4,868,116호; 미국 특허 제4,980,286호; PCT 출원 WO 89/07136; PCT 출원 WO 89/02468; PCT 출원 WO 89/05345; 및 PCT 출원 WO 92/07573).

또한, 바이러스 입자의 표면상의 바이러스 패키징 단백질을 변형시킴으로써, 레트로바이러스 및 결과적으로 레트로바이러스-기초 벡터의 감염 스펙트럼을 제한하는 것이 가능함이 공지되어 있다(PCT 출원 WO93/25234 및 WO94/06920). 예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 감염 스펙트럼의 변형을 위한 전략은: 바이러스 *env* 단백질에 세포 표면 항원에 특이적인 항체를 커플링시키거나(Roux et al. (1989) *PNAS* 86:9079-9083; Julan et al. (1992) *J. Gen Virol* 73:3251-3255; 및 Goud et al. (1983) *Virology* 163:251-254); 또는 바이러스 *env* 단백질에 세포 표면 수용체 리간드를 커플링시키는 것(Neda et al. (1991) *J Biol Chem* 266:14143-14146)을 포함한다. 커플링은, 융합 단백질(예를 들어, 단일-사슬 항체/*env* 융합 단백질)을 생성시킴으로써 뿐만 아니라, 단백질 또는 그밖의 것(예를 들어, *env* 단백질을 아시알로당단백질

(asialoglycoprotein)로 전환시키는 락토오스)과의 화학적 가교의 형태로 이루어질 수 있다. 상기 방법은 특정 조직 유형으로 감염을 제한하거나 또는 배향시키는 데에 유용한 반면에, 또한 에코트로픽 벡터를 암포트로픽 벡터로 전환시키는 데에 사용될 수 있다.

더욱이, 레트로바이러스 유전자 전달의 사용은 레트로바이러스 벡터의 RAP-BP 유전자의 발현을 제어하는 조직- 또는 세포-특이적 전사 조절 서열의 사용에 의해 더욱 증진될 수 있다.

본 발명에 유용한 다른 바이러스 유전자 전달 시스템은 아데노바이러스-유래된 벡터를 사용한다. 아데노바이러스의 게놈은 관심있는 유전자 생성물을 엔코딩하고 발현시키나 보통 세포 용해 바이러스 생활 주기에서 복제 능력에 있어서 비활성화되도록 조작될 수 있다(참조: Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; 및 Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). 아데노바이러스 균주 Ad 유형 5 dl324 또는 그밖의 아데노바이러스 균주(예를 들어, Ad2, Ad3, Ad7 등)로부터 유래되는 적합한 아데노바이러스 벡터는 당업자에게 공지되어 있다. 재조합 아데노바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 없고, 다양한 유형의 세포를 감염시키는 데에 사용될 수 있는 특정 조건에서 유리할 수 있다. 더욱이, 바이러스 입자는 비교적 안정하고, 정제 및 농축이 가능하며, 상기한 바와 같이 감염성 스펙트럼에 영향을 주도록 변형될 수 있다. 또한, 도입된 아데노바이러스 DNA(및 내부에 함유된 외래 DNA)는 숙주 세포의 게놈내로 통합되지 않고 에포솜에 잔류하며, 그 결과 도입된 DNA가 숙주 게놈(예를 들어, 레트로바이러스 DNA)내로 통합될 경우, 그 위치에서 삽입 돌연변이 유발의 결과로서 발생할 수 있는 잠재적인 문제를 회피하게 된다. 더욱이, 외래 DNA에 대한 아데노바이러스 게놈의 함유 용량은 다른 유전자 전달 벡터에 비하여 크다(8 킬로베이스 이하)(Berkner et al.cited *supra*; Haj-Ahmand and Graham (1986) J. Virol. 57:267). 현재 사용되고 본 발명에서 선호되는 대부분의 복제-결함 아데노바이러스 벡터는 바이러스 E1 및 E3 유전자의 모두 또는 일부가 결실되며, 아데노바이러스 유전 물질의 80%를 보유한다(참조: Jones et al. (1979) Cell 16:683; Berkner et al., *supra*; and Graham et al. in Methods in Molecular Biology, E.J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. pp. 109-127). 삽입된 RAP-BP 유전자의 발현은, 예를 들어 E1A 프로모터, 주요 후기 프로모터 (MLP) 및 결합된 리더 서열, E3 프로모터 또는 외인성으로 첨가된 프로모터 서열의 제어하에 있다.

목적 RAP-BP 유전자의 전달에 유용한 다른 바이러스 벡터 시스템은 아데노-관련 바이러스(AAV)이다. 아데노-관련 바이러스는 자연 발생 결함 바이러스이며, 효과적인 복제 및 생산적인 생활 주기를 위해 헬퍼 바이러스로서 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 같은 그밖의 바이러스를 필요로 한다 (Muzyczka et al. *Curr, Topics in Micro, and Immunol,* (1992) 158:97-129). 또한, 이는 비분열 세포내로 DNA를 통합시킬 수 있고, 높은 빈도의 안정적인 통합을 나타내는 소수의 바이러스중 하나이다(Flotte et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; and McLaughlin et al. (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). AAV의 300 염기쌍을 함유하는 벡터가 패키징되고 통합될 수 있다. 외인성 DNA를 위한 공간은 약 4.5 kb로 제한된다. 세포로 DNA를 도입시키기 위해, 하기 문헌에 기술되어 있는 것과 같은 AAV 벡터가 사용될 수 있다[참고 문헌: Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260]. 다양한 핵산이, AAV 벡터를 사용하여 상이한 유형의 세포로 도입되어 왔다(참조: Hermonat et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin et al. (1984) *J. Virol.* 51:611-619; and Flotte et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).

상기 기술된 것과 같은, 바이러스 전달 방법 이외에, 비-바이러스 방법이 동물의 조직에서 RAP-결합 단백질의 발현을 일으키기 위해 사용될 수 있다. 대부분의 유전자 전달의 비바이러스 방법은, 거대 분자의 섭취 및 세포내 수송을 위해 포유동물 세포에 의해 사용되는 일반적 메커니즘에 의존한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 비-바이러스 유전자 전달 시스템은 표적화된 세포에 의한 목적 RAP-BP 유전자의 섭취를 위한 엔도사이틱(endocytic) 경로에 의존적이다. 이러한 유형의 예시적 유전자 전달 시스템은 리포솜 유도 시스템, 폴리-리신 컨쥬게이트 및 인공 바이러스 외피를 포함한다.

대표적 구체예에서, 목적 RAP-결합 단백질 중 하나를 엔코딩하는 유전자가 리포솜(예를 들어, 리포펙틴)내에 포획될 수 있으며, 표면이 양 전하를 띄고, (임의적으로) 표적 조직의 세포표면 항원에 대한 항체와 태깅된다(Mizuno et al. (1992) No Shinkei Geka 20:547-551; PCT 출원 WO91,/06309; 일본 특허 출원 제1047381호; 및 유럽 특허 제EP-A-43075호). 예를 들어, 세포의 리포펙션은 예를 들어 T-세포 상에 존재하는 세포 표면 항원에 대한 모노클로날 항체와 태깅된 리포솜을 사용하여 수행될 수 있다.

임상에서, 치료학적 RAP-BP 유전자를 위한 유전자 전달 시스템은, 종래에 공지되어 있는 많은 방법에 의해 환자내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달 시스템의 약제학적 제조물은, 예를 들어 정맥내 주입에 의해 전신적으로 도입될 수 있으며, 표적 세포내의 상기 단백질의 특이적 형질도입은 수용체 유전자의 발현을 조절하는 전사 조절 서열 또는 이들의 조합물로 인해 유전자 전달 비히클, 세포-유형 또는 조직-유형에 의해 제공되는 트랜스펙션의 특이성으로부터 우세하게

발생할 수 있다. 그밖의 구체예에서, 재조합 유전자의 초기 전달은, 국소화된 동물내로의 도입으로 더욱 제한된다. 예를 들어, 상기 유전자 전달 비히클은 카테터(미국 특허 제5,328,470호) 또는 스테레오택틱(stereotactic) 주입(예를 들어, Chen et al. (1994) *PNAS* 91:3054-3057)에 의해 도입될 수 있다.

유전자 치료 작제물의 약제학적 제조물은 기본적으로 허용가능한 희석제 중의 유전자 전달 시스템으로 이루어지거나 유전자 전달 비히클이 임베딩된 서방출 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 시스템이 재조합 세포, 예를 들어 레트로바이러스 벡터로부터 온전하게 생성될 수 있는 경우에, 약제학적 제조물은 유전자 전달 시스템을 생성시키는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 관점은 진핵 생물 세포, 예를 들어 사람, 마우스, 래트, 토끼 또는 돼지로부터의 세포와 같은 포유류 동물 세포로부터 유래되는 유전자에 의해 엔코딩되는 재조합 RAP-결합 단백질에 관한 것이다. "재조합 단백질"은, 일반적으로, 예를 들어 RAPT1 단백질을 엔코딩하는 DNA가 이종 단백질을 생성시키기 위해 숙주 세포를 형질전환시키는 데에 사용되는 적합한 발현 벡터내로 삽입되는 재조합 DNA 기술에 의해 생성되는 본 발명의 단백질을 의미한다. 또한, 재조합 RAP-결합 단백질을 엔코딩하는 재조합 유전자에 있어서 "~로부터 유래된"은 "재조합 단백질"의 의미내에서 천연 RAP-결합 단백질의 아미노산 서열, 또는 생물체의 RAP-결합 단백질의 자연 발생 형태와 비교하여 치환 및/또는 결실을 포함하는 돌연변이에 의해 생성되는, 이와 유사한 아미노산 서열을 가지는 단백질을 포함한다. 천연RAPT1 단백질의 아미노산 서열을 가지는 단백질 이외에, 본 발명에서 바람직한 재조합 RAPT1 단백질은 서열번호 2, 12 또는 14 중 하나에 제시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80%, 가장 바람직하게는 90% 상동인 아미노산 서열을 포함한다. 또한, RAPT1 단백질의 생물학적 활성을 가지고, 서열번호 2, 12 또는 14 중 하나에 제시되는 서열의 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98%, 가장 바람직하게는 동일한 폴리펩티드가 본 발명의 범위내에 있다.

유사하게, 재조합 rap-UBC 단백질의 바람직한 구체예는 서열번호 24에 제시 되는 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80%, 가장 바람직하게는 90% 상동인 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 서열번호 24의 아미노산 서열과 동일한 또는 실질적으로 동일한(예를 들어, 95 내지 98% 상동인) 재조합 rap-UBC 단백질이 본 발명에서 특별히 고려된다.

또한, 본 발명은 실시예 5에 기술되는 ATCC 수탁번호 제75786호로부터 생성되는 재조합 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소 뿐만 아니라, 실시예 4에 기술된 ATCC 기탁클론, 예를 들어 ATCC 수탁번호 제75787호로부터 생성된 재조합 RAPT1 단백질을 분명히 포함한다.

본 발명은 서열번호 2 또는 12 중 하나에 제시되는 RAP-결합 단백질에 진화론적으로 관련되나 동일하지는 않고, RAP-결합 단백질의 하나 이상의 생물학적 활성의 작용제 또는 길항제로서 기능할 수 있는 목적 RAP-결합 단백질의 재조합 형태에 관한 것이다. 재조합 RAP-결합 단백질의 아미노산 서열에 있어서의 "진화론적으로 관련된"은 예를 들어 재조합 돌연변이 유발에 의해 유래되는 돌연변이체 뿐만 아니라, 자연적으로 발생된 아미노산 서열을 가지는 단백질에 관련된 것이다.

본 발명의 다른 관점은, 목적 RAP-결합 단백질을 생성하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 목적 RAPT1 단백질 또는 rap-UBC를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 발현시키는 핵산 벡터로 트랜스펙션된 숙주 세포는 상기 펩티드의 발현이 가능한 적당한 조건에서 배양될 수 있다. 상기 펩티드는 상기 재조합 단백질을 함유하는 배지 및 세포 혼합물로부터 분비되며 단리될 수 있다. 또한, 상기 펩티드는 세포질에 보유되고, 목적 RAP-결합 단백질의 자연 발생 형태로서 존재하는 것으로 간주되며, 세포가 수집되고 용해되며 상기 단백질이 분리될 수 있다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 그밖의 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 공지되어 있다. 재조합 RAP-결합 단백질은 이온-교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동 및 RAP-결합 단백질에 특이적인 항체를 사용한 면역 친화성 정제를 포함하여, 단백질 정제를 위한 공지된 방법을 사용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 한 구체예에서, RAP-결합 단백질은 RAPT1-GST 융합 단백질 또는 rapUBC-GST 융합 단백질과 같은 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.

또한, 본 발명은 RAP-결합 단백질의 재조합 형태를 발현시키기 위한 RAP-BP 유전자로 트랜스펙션된 숙주 세포를 제공한다. 상기 숙주 세포는 진핵 또는 원핵 생물 세포일 수 있다. 따라서, 단백질 모두 또는 선택된 일부를 엔코딩하는 본 발명의 RAP-결합 단백질의 클로닝으로부터 유래되는 누클레오티드 서열은, 미생물 또는 진핵 세포성 프로세싱을 통하여 RAP-BP의 재조합 형태를 제조하는데에 사용될 수 있다. 발현 벡터와 같은 유전자 구성체와 폴리누클레오티드 서열의 연결, 상기 벡터를 사용한 숙주 세포의 형질전환 또는 트랜스펙션은, 그밖의 공지된 단백질, 예를 들어 인슐린, 인터페론, p53, myc, 시클린 등을 제조하는 데에 사용되는 표준 방법이다. 본 발명에 따라 미생물 수단 또는 조직-배양 기술에 의해 재조합 RAP-결합 단백질 또는 이들의 일부를 제조하기 위해, 유사한 공정 또는 이들의 변형이 사용될 수 있다. 재조합 RAP-결합 단백질의 발현에 적합한 숙주 세포는, 예를 들어 진핵(효모, 조류, 곤충 또는 포유 동물) 또는 원핵(세균) 세포 중에서 선택될 수 있다.

재조합 RAP-BP 유전자는 RAP-결합 단백질 또는 이들의 일부를 엔코딩하는 핵산을 진핵 세포 또는 원핵 세포 또는 이들 모두에서의 발현에 적합한 벡터와 연결시킴으로써 제조될 수 있다. RAP-결합 단백질의 재조합 형태의 제조를 위한 발현 벡터는 플라스미드 및 그밖의 벡터를 포함한다. 예를 들어, RAP-BP의 발현에 적합한 벡터는, pBR322-유래 플라스미드, pEMBL-유래 플라스미드, pEX-유래 플라스미드, pBTac-유래 플라스미드 및 대장균(*E. coli*)과 같은 원핵 세포에서의 발현에 적합한 pUC-유래 플라스미드 등의 유형의 플라스미드를 포함한다.

효모에는 재조합 단백질의 발현에 적합한 많은 수의 벡터가 존재한다. 예를 들어, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2 및 YRP17은 사카로마이세스 세레비시애 *(S. cerevisiae)*내로의 유전학적 작제물의 도입에 유용한 클로닝 및 발현 비히클이다(예를 들어, Broach *et al.* (1983), *Experimental Manipulation of Gene Expression,* ed. M. Inouye Academic Press, P. 83, 본원에 참고로 인용됨). 상기 벡터는 대장균에서는 pBR322 ori의 존재로 인해, 사카로마이세스 세레비시애에서는 효모2 미크론 플라스미드의 복제 결정인자 덕택에 복제할 수 있다. 또한, 암피실린과 같은 약제 내성 마커가 사용될 수 있다.

바람직한 포유 동물 발현 벡터는 세균에서의 벡터의 증식을 용이하게 하기 위한 원핵 세포 서열 및 진핵 세포에서 재조합 RAP-BP 유전자의 발현을 야기하는 하나 이상의 진핵 세포의 전사 조절 서열을 함유한다. pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유래된 벡터가 진핵 세포의 트랜스펙션에 적합한 포유 동물 발현 벡터의 예이다. 이러한 벡터의 일부는 원핵 및 진핵 세포 둘 모두에서 복제 및 약제 내성 선택을 용이하게 하기 위해 pBR322와 같은 세균 플라스미드로부터의 서열로 변형된다. 대안적으로, 진핵 세포에서의 단백질의 일시적 발현을 위해, 보바인 파필로마 바이러스(BPV-1) 또는 엡스테인-바르(Epstein-Barr) 바이러스(pHEBo, pREP-유래 및 p205)와 같은 바이러스 유도체가 사용될 수 있다. 그밖의 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 유전자 치료 전달 시스템에 대한 상기 기술에서 발견될 수 있다.

일부 예에서, 바큘로바이러스 발현 시스템을 사용하여 재조합 RAP-결합 단백질을 발현시키는 것이 바람직할 수 있다(참조: *Current Protocols in Molecular Biology,* eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). 이러한 바큘로바이러스 발현 시스템의 예는 pVL-유래된 벡터(예를 들어, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(예를 들어, pAcUW1) 및 pBlueBac-유래된 벡터(예를 들어, β-gal 함유 pBlueBac Ⅲ)를 포함한다.

숙주 생물체의 형질전환 및 플라스미드의 제조에서 사용되는 다양한 방법이 공지되어 있다. 일반적 재조합 방법 뿐만 아니라, 진핵 및 원핵 세포에 적합한 그밖의 발현 시스템에 있어서 하기 문헌을 참조하라[참고 문헌: *Molecular Cloning A Laboratory Manual,* 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapter 16 and 17].

목적 RAP-결합 단백질중 하나, 즉, 서열번호 2, 12 또는 14의 RAPT1 폴리펩티드와 같은 불완전 돌연변이체의 일부의 발현이 바람직한 경우에, 발현되기에 바람직한 서열을 함유하는 올리고누클레오티드 단편에 개시 코돈(ATG)를 첨가시키는 것이 요구될 수 있다. N-말단 위치의 메티오닌이, 효소 메티오닌 아미노펩티다제(MAP)의 사용에 의해 효소에 의해 절단될 수 있음이 공지되어 있다. MAP는 대장균(Ben-Bassat et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:751-757) 및 살모넬라 타이피무리움*(Salmonella typhimurium)*으로부터 클로닝되었고, 이것의 시험관내 활성은 재조합 단백질 상에서 증명되었다(Miller et al. (1987) *PNAS* 84:2718-1722). 그러므로, 원하는 경우, N-말단 메티오닌의 제거가 시험관내에서 정제된 MAP의 사용에 의해 또는 생체내에서 MAP를 생성시키는 숙주(예를 들어, 대장균 또는 CM89 또는 사카로 마이세스 세레비시애)에서 RAP-BP-유래 폴리펩티드를 발현시킴으로써 달성될 수 있다(예를 들어, 상기 밀러(Miller) 등의 문헌에 기재된 방법).

대안적으로, 상기 폴리펩티드의 코딩 서열은, 상이한 폴리펩티드를 엔코딩하는 제2의 누클레오티드 서열과 인-프레임(in-frame)으로 공유적으로 연결되도록 융합 유전자의 일부로서 혼입될 수 있다. 이러한 유형의 발현 시스템은, 예를 들어 이것이 RAP-결합 단백질의 면역원 단편을 생성시키는 것이 바람직한 경우, 유용할수 있다. 예를 들어, 로타바이러스의 VP6 캡시드 단백질은 바이러스 입자의 형태 또는 단량체 형태로 RAPT1 폴리펩티드의 일부를 위한 면역학적 캐리어 단백질로서 사용될 수 있다. 항체가 생성되도록 하는 RAPT1 단백질의 일부에 상응하는 핵산 서열은, 비리온의 일부로서 단백질 RAPT1의 일부를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 재조합 바이러스의 세트를 생성시키기 위해, 후기 우두 바이러스 구조 단백질을 위한 코딩 서열을 포함하는 융합 유전자 작제물내로 혼입될 수 있다. 재조합 B형 간염 비리온이 이러한 역할에 사용될 수 있음이 B형 간염 표면 항원 융합 단백질을 사용하여 면역원 융합 단백질의 사용으로 증명되었다. 유사하게, 폴리펩티드 항원 세트의 면역원성을 강화시키기 위해, 폴리오바이러스 캡시드 단백질 및 RAPT1 단백질의 일부를 함유하

는 융합 단백질을 코딩하는 키메라 작제물이 제조될 수 있다(예를 들어, 유럽 특허 출원 제0259149호; 및 Evans et al. (1989) *Nature* 339:385; Huang et al. (1988) *J. Virol.* 62:3855; 및 Schlienger et al. (1992) *J. Vriol.* 66:2). 목적 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소는 면역원으로서 유사한 방법으로 조작될 수 있다.

또한, RAP-결합 단백질의 요망되는 일부분이 올리고머 측쇄 리신 코어 상으로 상기 펩티드의 유기화학적 합성으로부터 직접 수득되는 경우에 펩티드-기재 면역화를 위한 복합 항원 펩티드 시스템이 사용될 수 있다(참조: Posnett et al. (1988) *JBC* 263:1719 및 Nardelli et al. (1992) *J. Immunol.* 148:914). 또한, RAP-결합 단백질의 항원 결정인자는 세균 세포에 의해 발현되고 제공될 수 있다.

면역원성을 강화시키기 위한 융합 단백질의 사용 이외에, 융합 단백질이 본 발명의 RAP-결합 단백질 중 하나와 같은 단백질의 발현 및 정제를 촉진시킬 수 있음이 광범위하게 이해된다. 예를 들어, RAP-결합 단백질은 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 이러한 GST 융합 단백질은, 예를 들어 글루타티온-유도체화된 매트릭스를 사용한 친화성 정제에 의해 RAP-결합 단백질의 정제를 간략화할 수 있다(참조: *Current Protocols in Molecular Biology,* eds. Ausabel et al. (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)). 다른 구체예에서, 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 서열을 포함하는 펩티드 리더 서열과 같은 정제 리더 서열을 코딩하는 융합 유전자가 Ni^{2+} 금속 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해 폴리(His)-융합 단백질의 정제를 가능하게 하기 위해, RAP-결합 단백질의 바람직한 일부의 N-말단에 첨가될 수 있다. 다음, 상기 정제 리더 서열은 엔테로키나제로 처리함으로써 후속적으로 제거될 수 있다(Hochuli et al. (1987) *J. Chromatography* 411:177; and Janknecht et al. *PNAS* 88:8972).

융합 유전자를 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 통상의 기술에 따라 수행되며 상기 방법은 연결을 위한 평활말단 또는 접착말단, 적절한 말단을 제공하는 제한 효소에 의한 분해, 적절한 경우 접착 말단의 충전, 목적하지 않는 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타제, 및 효소적인 결합을 이용한다. 그밖의 구체예에서, 상기 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함한 통상의 기술에 의해 합성될 수 있다. 또한, 유전자 단편의 PCR 증폭은 키메라 유전자 서열을 생성시키기 위해 차후 어닐링(annealing)되는 2개의 연속 유전자 단편 사이에 상보적 오버행(overhang)을 생성시키는 앵커 프라이머를 사용하여 수행될 수 있다*(Current Protocols in Molecular Biology,* eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons:1992).

또한, 본 발명은 일반적으로 RAP-결합 단백질과 결합될 수 있는 유비퀴틴 및 유비퀴틴-의존적 효소, 시그널 트랜스덕션 및 세포-주기 조절 단백질 뿐만 아니라, 그밖의 세포성 단백질, 특히 FKBP 또는 그밖의 라파마이신 결합 단백질이 실질적으로 없거나 또는 이로부터 단리된 목적 RAP-결합 단백질의 유용한 정제되거나 단리된 형태를 제조한다. "그밖의 세포성 또는 바이러스 단백질이 실질적으로 없는"(또는 본원에서 "오염 단백질"로 언급됨) 또는 "실질적으로 순수하거나 정제된 제조물"은 20%(건조 중량) 미만, 바람직하게는 5% 미만의 오염 단백질을 가지는 RAP-결합 단백질의 제조물을 포함하는 의미이다. 목적 RAP-결합 단백질의 기능적 형태는 우선 본원에서 기술되는 재조합 단백질을 사용하여 정제된 제조물로서 제조될 수 있다. 또한, 목적 RAP-결합 단백질은, 예를 들어 매트릭스 결합된 FKBP/라파마이신 단백질을 사용하여 친화성 정제에 의해 단리될 수 있다. "정제된"은 펩티드 또는 DNA 또는 RNA 서열에 대하여 언급될 경우에, 지적된 분자가 다른 단백질 (특히 FK506 결합 단백질 및 그밖의 오염 단백질)과 같은 다른 생물학적 고분자의 실질적 부재하에 존재함을 의미한다. 본원에서 사용되는 "정제된"은 바람직하게는 80 건조 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 95 내지 99 중량%, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상의 동일한 유형의 생물학적 고분자가 존재함을 의미한다(그러나, 물, 완충액 및 그밖의 작은 분자, 특히 분자량이 5000 미만인 분자는 존재할 수 있다). 본원에서 사용되는 "순수한"은 바람직하게는 상기 "정제된"과 동일한 수적 제한을 가진다. "단리된" 및 "정제된"은 본래의 상태의 천연 물질, 또는 성분으로는 분리되었으나(예를 들어, 아크릴아미드 겔 중에서) 순수한(예를 들어, 오염 단백질, 또는 크로마토그래피 시약, 예를 들어 변성제 및 중합체, 예를 들어 아크릴아미드 아가로오스가 없는) 물질 또는 용액으로서 수득되지 않은 천연물질을 포함하지 않는다.

또한, 목적 RAP-결합 단백질의 단리된 펩티드 부분은 상기 펩티드를 엔코딩하는 핵산의 상응 단편으로부터 재조합에 의해 생성된 펩티드를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 또한, 단편은 통상의 메리필드 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 당분야에 공지된 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 RAP-결합 단백질은 임의로 단편의 중복이 없는 바람직한 길이의 단편으로 분할되거나, 바람직하게는 바람직한 길이의 중복 단편으로 분할될 수 있다. 상기 단편은 마이크로주입 검정 또는 시험관내 단백질 결합 검정에 의한 것과 같이 RAP-결합 단백질 활성의 작용제 또는 길항제로서 기능할 수 있는 펩티드 단편을 확인하기 위해 (재조합적으로 또는 화학적 합성에 의해) 제조되고 시험될 수 있다. 기술된 구체예에서, RAPT1 또는 rapUBC와 같은 RAP-결합 단백질의 펩티드 부분이 FKBP/라파마이신 결합 활성에 대하여 시험될 수 있다.

또한, 치료 또는 예방 효과 또는 안정성(예를 들어, 생체외 저장 수명 및 생체 내에서의 단백질 가수 분해에 대한 내성)의 증진과 같은 목적을 위하여 RAP-결합 단백질의 구조를 변형시키는 것이 가능하다. 단백질의 자연-발생 형태의 하나 이상의 활성을 보유하도록 디자인될 경우, 상기 변형된 펩티드는 본원에서 더욱 상세하게 기술되는 RAP-결합 단백질의 기능적 동등물로 고려된다. 상기 변형된 펩티드는, 예를 들어 아미노산 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성될 수 있다.

예를 들어, 류신의 이소류신 또는 발린으로의 단리된 치환, 아스파르테이트의 글루타메이트로의 단리된 치환, 트레오닌의 세린으로의 단리된 치환 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사 치환(즉, 보존적 돌연변이)은 단백질의 폴딩(folding)에 큰 영향을 미치지 않고, 생성된 분자의 생물학적 활성에 많은 영향을 미치거나 또는 미칠 수 없음이 예상될 수 있다. 보존적 대체는 곁사슬에 관련된 아미노산의 패밀리내에서 일어나는 것들이다. 유전학적으로 엔코딩된 아미노산은 4개의 패밀리로 나누어질 수 있다: (1) 산성 = 아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 하전되지 않은 극성 = 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 종종 방향족 아미노산으로서 함께 분류된다. 유사한 방식으로, 아미노산 레파토리는, (1) 산성 = 아스파르테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘, (3) 지방족 = 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, (세린 및 트레오닌은 임의적으로 지방족-히드록실로서 개별적으로 그룹화된다); (4) 방향족 = 페닐알라닌, 티로신, 트립토판; (5) 아미드 = 아스파라긴, 글루타민; 및 (6) 황-함유 = 시스테인 및 메티오닌으로 분류된다(참조: *Biochemistry,* 2nd ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman and Co.:1981). 또한, 아미노산 치환은 아미노산 곁사슬의 극성 또는 전하와 관계없이 입체 특성, 예를 들어 등입체성 치환에 기초할 수 있다. 펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능적 RAP-BP 동족체(예를 들어, 야생형을 모방하거나 또는 길항작용하는 의미로 기능적인)를 야기하는지의 여부는, 야생형 RAP-BP와 유사한 방식으로 세포에서 반응을 생성시키거나 또는 이러한 반응을 경쟁적으로 저해하는 변이체 펩티드의 능력을 평가함으로써 쉽게 측정될 수 있다. 하나 이상의 치환이 발생한 펩티드는 동일한 방법으로 쉽게 시험될 수 있다.

본 발명은, 예를 들어 RAPT1 단백질 및/또는 rap-UBC 효소의 RAP-결합 단백질의 조합 돌연변이체 및 이들의 불완전 돌연변이체의 세트를 생성하는 방법을 고려하고, 세포 성장 또는 분화의 관점 뿐만 아니라, 라파마이신-매개 효과를 조절하는 기능을 하는 변이체 서열(예를 들어, RAP-BP 동족체)을 확인하는 데에 특히 유용하다. 유사한 방식으로, 단백질의 진정한 형태의 일반적 세포 기능을 방해할 수 있는 길항제인 본 발명의 조합적 접근법에 의해 RAP-BP 동족체가 생성될 수 있다.

이러한 조합 라이브러리를 스크리닝하는 목적 중 하나는, 상기 라이브로러로부터, 예를 들어 야생형 ("진정한") 단백질의 생물학적 활성의 작용제 또는 길항제중 하나로서 기능할 수 있거나 대안적으로 모두 신규한 생물학적 활성을 가지는 신규한 RAP-BP 동족체를 단리하기 위한 것이다. 이를 설명하면, RAPT1 동족체는 FKBP/라파마이신 복합체에 결합할 수 없으나, 진정한 RAPT1과 결합하는 정상적인 세포 활성의 일부를 보유하는 동족체를 제공하기 위해 본 방법에 의해 처리될 수 있다. 따라서, 라파마이신-내성을 제공하기 위해 조합적으로 유래된 동족체가 생성될 수 있다. 재조합 DNA 작제물로부터 발현될 경우에, 이러한 단백질은 유전자 치료 프로토콜에 사용될 수 있다.

유사하게, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 단백질과는 확연히 다른 세포내 반감기를 가지는 RAP-BP 동족체를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 변형된 단백질은 진정한 RAP-결합 단백질의 파괴 또는 불활성화를 야기하는 단백질 가수 분해 또는 그밖의 세포성 처리에 대하여 더욱 안정하거나 더욱 불안정하게 될 수 있다. 이러한 동족체, 및 이들을 엔코딩하는 유전자는 단백질의 반감기를 조절함으로써 특정 RAP-BP의 발현의 엔벨로프(envelope)를 변성시키는 데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 짧은 반감기는 더 많은 일시적 RAPT1 생물학적 효과를 유발할 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부일 경우에는 세포내에서 재조합 RAPT1 농도의 더 철저한 제어를 가능하게 할 수 있다. 상기와 같이, 이러한 단백질 및 특히 이들의 재조합 핵산 작제물은 유전자 치료 프로토콜에서 사용될 수 있다.

본 발명의 예시적 구체예에서, 바람직하기로는 RAP-BP 동족체 군집 또는 그밖의 관련 단백질의 아미노산 서열을 정렬시켜, 가능한 가장 높은 상동성을 촉진시킨다. 이러한 변이체의 군집은 예를 들어 하나 이상의 종으로부터의 RAPT1 동족체, 예를 들어 서열번호 2 및 12으로 표시되는 마우스 및 사람 RAPT1 단백질의 서열 정렬 또는 동일한 종으로부터의 상이한 RAP-BP 이소폼, 예를 들어 상이한 사람 RAPT1 이소폼을 포함할 수 있다. 서열 정렬의 각 위치에서 나타나는 아미노산은 조합 서열의 축퇴 세트를 생성시키기 위해 선택될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 상기 조합 RAP-BP 라이브러리는 잠재적인 RAP-BP 서열의 적어도 일부, 예를 들어 서열번호 2 또는 12으로 표시되는 RAPT1의 일부 또는 서열번호 24으로 표시되는 rap-UBC의 일부를 각각 포함하는 폴리펩티드의 라

이브러리를 엔코딩하는 유전자의 축퇴 라이브러리에 의해 생성된다. 합성 올리고누클레오티드의 혼합물을 유전자 서열내로 효소에 의해 연결시켜서, 잠재적인 RAP-BP 서열의 축퇴 세트를 개별적 폴리펩티드로서, 또는 RAP-BP 서열 라이브러리를 함유하는 더 큰 융합 단백질(예를 들어, 파아지 디스플레이를 위한) 세트로서 발현시킬 수 있다.

축퇴 올리고누클레오티드 서열로부터 RAP-BP 동족체의 라이브러리가 생성될 수 있는 많은 방법이 있다. 예를 들어, 축퇴 유전자 서열의 화학 합성은 자동 DNA 합성기에서 수행되고, 상기 합성 유전자는 이후의 발현을 위한 적당한 유전자에 연결될 수 있다. RAP-BP 유전자의 축퇴 세트의 목적은 잠재적인 RAP-BP 서열의 바람직한 세트를 엔코딩하는 모든 서열을 혼합물로 제공하는 것이다. 축퇴 올리고누클레오티드의 합성은 공지되어 있다(참조: Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et *al.* (1981) *Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules,* ed. AG Walton, Amsterdam: *Elsevier* pp273-289; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). 이러한 기술은 그밖의 단백질의 배향된 전개에서 사용되어 왔다(참조: Scott *et al.* (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) PNAS 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) Science 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *PNAS* 87:6378-6382; 및 미국 특허 제5,223,409호. 제5,198,346호 및 제5,096,815호).

또한, 조합 라이브러리의 제조를 위해 다른 형태의 돌연변이유발이 사용될 수 있다. 예를 들어, RAP-BP 동족체(작용제 및 길항제 형태)는, 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이 등(Ruf *et al.* (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint *et al.* (1993) *Gene* 137:109-118; Groberg *et al.* (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman *et al.* (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; and Cunningham *et al.* (1989) *Science* 244:1081-1085), 링커 (linker) 스캐닝 돌연변이유발(Gustin *et al.* (1993) *Virology* 193:653-660; Brown *et al.* (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; Mcknight *et al.* (1982) *Science* 232:316); 포화 돌연변이유발(Meyers et al. (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung *et al.* (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); 또는 무작위 돌연변이유발(Miller *et al.* (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics,* CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; and Greener *et al.* (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)을 사용하여 생성된 라이브러리로부터 제조 및 단리될 수 있다.

조합 돌연변이유발에 의해 제조되는 여러 가지 유전자 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하기 위한 기술, 특히 특정 특성을 가지는 개별적인 유전자 생성물을 확인하기 위한 다양한 방법이 공지되어 있다. 이러한 기술은 일반적으로 예를 들어 RAPT1 동족체의 조합 돌연변이유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 적합될 수 있다. 거대 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 광범위하게 사용되는 기술은 일반적으로 상기 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현벡터로 클로닝하고 생성된 벡터의 라이브러리로 적합한 세포를 형질전환시키며, 목적하는 활성의 검출이, 생성물이 검출된 유전자를 엔코딩하는 벡터의 비교적 용이한 단리를 촉진시키는 조건에서 상기 조합 유진자를 발현시키는 것을 포함한다. 하기 기술된 각각의 예시적 검정은 조합 돌연변이유발 기술에 의해 제조되는 많은 축퇴 RAP-BP 서열을 스크리닝하는 데에 요구되는 고출력 분석에 따른 것이다.

스크리닝 검정에서, 후보 RAP-BP 유전자 생성물은 세포 또는 바이러스 입자 표면상에 디스플레이되고, 이러한 유전자 생성물을 통한 FKBP12/라파마이신 복합체에 결합하는 특정 세포 또는 바이러스 입자의 능력은 "패닝 검정(panning assay)"에서 검출된다. 예를 들어, 상기 축퇴 RAP-BP 유전자 라이브러리는 세균 세포의 표면 막 단백질의 유전자로 클로닝되고, 생성된 융합 단백질은 패닝 프로토콜에 의해 검출될 수 있다(참조: Ladner et *al.,* WO 88/06630; Fuchs *et al.* (1991). *Bio/Technology* 9:1370-1371; and Goward *et al.* (1992) *TIBS* 18:136-140). 유사한 방식으로, 예를 들어 형광 표지 라파마이신 또는 FKBP12/라파마이신 복합체와 같은 RAP-결합 단백질에 결합한 형광 표지 분자는 잠재적으로 기능성인 RAP-BP 동족체에 대한 스코어링에 사용될 수 있다. 세포는 형광 현미경하에서 육안으로 검사되고 분리되거나, 세포의 형태학이 가능한 경우, 형광-활성화 세포 분리기에 의해 분리될 수 있다.

다른 구체예에서, 유전자 라이브러리는 바이러스 입자의 표면 상에 융합 단백질로서 발현된다. 예를 들어, 사상(filamentous) 파아지 시스템에서, 외래 펩티드 서열은 감염 파아지의 표면상에 발현되며, 그 결과 두 가지의 현저한 잇점을 부여할 수 있다. 첫째, 이러한 파아지가 매우 고농도에서 친화 매트릭스에 제공될 수 있기 때문에 많은 파아지가 동시에 스크리닝될 수 있다. 둘째, 각각의 감염 파아지가 이의 표면상에서 조합 유전자 생성물을 나타내므로, 특정 파아지가 친화 매트릭스로부터 낮은 수율로 회수될 경우에, 상기 파아지는 다른 감염 라운드에서 증폭될 수 있다. 거의 동일한 대장균 사상 파아지 M13, fd 및 fl 군이 파아지 디스플레이 라이브러리에서 가장 빈번하게 사용되며, 파아지 gⅢ 또는 gⅧ 외피 단백질은 바이러스 입자의 궁극적 패키징을 파괴함이 없이 융합 단백질을 생성시키는 데에 사용될 수 있다(Ladnet *et al.* PCT *publication* WO90/02909; Garrard *et al.,* PCT publication WO92/09690, Marks *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; and Barbas *et al.* (1992) *PNAS* 89:4457-4461). 예시적 구체예에서, 재조합 파아지 항체 시스템(RPAS, Pharmacia 카탈로

그 번호 27-9400-01)이 RAP-BP 조합 라이브러리를 발현시키고, 스크리닝하는 데에 사용하기 위해 용이하게 변형될 수 있고, RAP-BP 파아지 라이브러리는 글루타티온-고정화 FKBP-GST/라파마이신 복합체 상에 패닝될 수 있다. 재감염, 파아지 증폭 및 패닝의 연속 라운드는 FKBP/라파마이신 결합을 보유하고, 작용제와 길항제를 구별하기 위해 추가의 생물학적 활성에 대하여 연속적으로 스크리닝될 수 있는 동족체를 매우 많이 부화시킬 것이다.

또한, 사람 및 마우스 RAP-결합 단백질의 동족체는 RAP-BP 돌연변이체의 조합 라이브러리를 스크리닝하기 위한 상호작용 트랩 검정의 사용을 통하여 제조될 수 있다. 하기 실시예 10에서 기술되는 바와 같이, 약제-의존적 방식으로 FK506-결합 단백질과 상호작용하는 단백질의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 데에 사용되는 동일한 2 하이브리드 검정은 작용제 및 길항제 형태를 발견하기 위해, 예를 들어 RAPT1 돌연변이체의 조합 라이브러리를 통하여 분류하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 리포터 작제물의 발현을 유도하는 데에 사용되는 프로모터 서열의 강도의 조작을 통해 상호작용에 대한 검정의 민감도를 제어함으로써, 상기 검정이 라파마이신에 대한 확실한 결합 친화성을 가지는 RAPT1의 작용 형태, 그후 단백질의 확실한 형태를 조력하기 위해 생성될 수 있다. 대안적으로, 실시예 10에 기술되는 바와 같이, 상기 검정은 라파마이신 복합체에 결합할 수 없으며, 세포를 마크로리드로의 처리에 반응하지 않도록 할 수 있는 RAPT1 단백질의 버전인 RAPT1 동족체를 선택하는 데에 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 FKBP/라파마이신 복합체와 본 발명의 폴리펩티드의 결합을 붕괴시킬 수 있는 모사체, 예를 들어 펩티드 또는 비-펩티드 제제를 생성시키기 위한, 목적 RAP-결합 단백질의 라파마이신 결합 도메인의 감소를 제공한다. 따라서, 상기 기술된 돌연변이 유발 방법은 또한, 예를 들어 FKBP/라파마이신 복합체에 대한 결합에 관여하는 상호작용에 참여하는 RAP-결합 단백질의 결정인자를 맵핑하는 데에 유용하다. 이를 설명하면, FKBP/라파마이신의 분자 인식에 관련된 RAP-결합 단백질의 중요 잔기가 결정되어, 라파마이신 복합체로의 RAP-BP의 결합을 경쟁적으로 저해하는 RAP-BP-유래 펩티도모사체(peptidomimetics)를 생성시키는데에 사용될수 있다. FKBP/라파마이신 복합체 결합에 관여하는 특정 RAP-결합 단백질의 아미노산 잔기를 맵핑하기 위해, 예를 들어 스캐닝 돌연변이 유발을 사용함으로써, 라파마이신 복합체로의 결합에서 상기 잔기를 모방하고, FKBP/라파마이신에 대한 RAP-BP의 결합을 저해함으로써, 세포-주기 정지에서의 라파마이신의 기능을 방해할 수 있는 펩티도모사체 화합물을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 레트로-역(inverse) 펩티드(예를 들어, 미합중국 특허 제5,116,947호 및 제5,218,089호; 및 Pallai et al. (1983) *Int J Pept Protein Res* 21:84-92), 벤조디아제핀(예를 들어, Freidinger et al. in *Peptides: Chemistry and Biology,* G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 아제핀(예를 들어, Huffman et al. in *Peptides: Chemistry and Biology,* G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 치환된 감마 락탐 고리(Garvey et al. in *Peptides: Chemistry and Biology,* G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 케토-메틸렌 슈도펩티드(Ewenson et al. (1986) *J Med Chem* 29:295; 및 Ewenson et al. in *Peptides: Structure and Function* (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), β-회전 디펩티드 코어(Nagai et al. (1985) *Tetrahedron Lett* 26:647; and Sato et al. (1986) *J Chem Soc Perkin Trans* 1:1231), 및 β-아미노알코올(Gordon et al. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126:419; and Dann et al. (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134:71)을 사용하여, 상기 잔기의 비-가수분해성 펩티드 유사체를 생성시킬 수 있다. 단계적 검정을 사용하여, 포유 동물 세포에서 FKBP12/라파마이신 복합체와 사람 RAPT1(또는 그밖의 포유류 동족체)의 상호작용을 특이적으로 저해하나, 효모 단백질 TOR1 또는 TOR2와 FKB1/라파마이신 복합체의 상호작용에는 실질적으로 영향을 주지 않는 펩티도모사체가 디자인될 수 있다. 상기 펩티드 유사체는, 항진균제로서의 라파마이신의 효능을 실질적으로 감소시킴이 없이, 면역 억제와 같은 라파마이신 부작용으로부터 숙주 포유 동물을 보호하기 위해 진균성 감염의 라파마이신 처리와 함께 사용될 수 있다.

본 발명의 그밖의 관점은, 하나 이상의 목적 RAP-결합 단백질과 특이적으로 반응하는 항체에 관한 것이다. 예를 들어, RAP-결합 단백질로부터 유래된 면역원을 사용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 모노클로날 항체가 표준 프로토콜에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). 마우스, 햄스터 또는 토끼와 같은 포유 동물은, 상기 펩티드(예를 들어, 전장 RAP-결합 단백질 또는 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단편)의 면역원 형태로 면역화될 수 있다. 단백질 또는 펩티드 상에 면역원성을 부여하는 기술은 캐리어와의 컨쥬게이션 또는 종래에 공지되어 있는 그밖의 방법을 포함한다. 목적 RAP-결합 단백질의 면역원성 부분은 보조제의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화 방법은, 혈장 또는 혈청에서 항체 역가의 검출에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 그밖의 면역검정이 항체의 농도를 평가하기 위한 항원으로서의 면역원과 함께 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 목적 항체는 본 발명의 RAP-결합 단백질의 항원성 결정인자, 예를 들어 서열번호 2, 12에서 제시되는 단백질 또는 이의 밀접하게 관련된 사람 동족체 또는 사람을 제외한 포유류 동물 동족체의 항원성 결정인자에 대해 면역 특이적이다. 서열번호 2, 12 또는 24 중 하나와 95% 미만의 상동성을 가지거나, 또는 서열번호 2 또는 12 중 하나와 98-99% 미만의 상동성을 가지는 단백질과 실질적으로 교차 반응하지 않는 항체가 특히 고려된다고 하더라도, 예를 들어 본 발명에서 선호되는 항-RAP-BP 항체는 서열번호 2 또는 12 중 하나에 90% 미만의 상동성을 가지는 단백질과 실질적으로 교차 반응(즉, 특이적 반응)하지 않는다. "실질적으로 교차 반응하지 않는"은, 항체가, 예를 들어 서열번호 2 또는

12 중 하나에 제시되는 것과 같은 포유 동물 RAPT1 단백질로의 결합 친화성이 10% 미만, 더욱 바람직하게는 5% 미만, 훨씬 더 바람직하게는 1% 미만인 비-상동 단백질(예를 들어, 효모 TOR1 또는 TOR2 단백질)에 결합 친화성을 가지는 것을 의미한다.

면역화 후, 항-RAP-BP 항혈청이 수득되고, 필요하다면 폴리클로날 항-RAP-BP 항체가 혈청으로부터 단리된다. 모노클로날 항체를 생성시키기 위해, 항체 생성 세포(림프구)를 면역화된 동물로부터 수집하고, 골수종 세포와 같은 불멸화 세포와의 표준 체세포 융합 방법으로 융합시켜 하이브리도마 세포를 생성시킬 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 하이브리도마 기술(Kohlet and Milstein, (1975) *Nature,* 256:495-497), 사람 B 세포 하이브리도마 방법(Kozbar et al., (1983) *Immunology Today,* 4:72), 및 사람 모노클로날 항체를 생성시키기 위한 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* Alan R. Lies, Inc. pp. 77-96)을 포함한다. 하이브리도마 세포는 이러한 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 단리된 모노클로날 항체 및 본 발명의 RAP-결합 단백질과 특이적으로 반응하는 항체의 생성에 대해 면역화학적으로 스크리닝될 수 있다.

상기 기술된 것과 같이, 폴리펩티드로부터 제조된 본 발명의 항체 제조물은 동결건조에 의해 수득되는 건조 형태일 수 있다. 그러나, 상기 항체는 일반적으로, PBS와 같은 적합한 완충액 또는 혈청중에서 수성 액체 조성물로 사용되며 공급된다.

본원의 "항체"는 또한 목적 RAP-결합 단백질중 하나와 특이적으로 반응하는 이들의 단편을 포함하는 의미이다. 항체는 재조합 공학을 포함한 통상의 기술을 사용하여 단편화되며, 단편은 완전한 항체에 대해 상기한 것과 동일한 방법으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편은, 펩신으로 항체를 처리함으로써 생성될 수 있다. 생성된 $F(ab')_2$ 단편은, 이황화물 브릿지를 환원시켜 Fab' 단편을 생성하도록 처리될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 항-RAP-BP 부분을 가지는 양쪽특이적인 키메라 분자를 포함한다.

RAP-결합 단백질에 대한 모노클로날 및 폴리클로날 항체(Ab)는, 예를 들어 세포내로 항-RAP-BP 항체의 마이크로주입에 의해, 단백질의 작용을 블로킹하는데 사용될 수 있으며, 예를 들어 일반적으로는 세포 주기 조절에서 또는 상세하게는 증식 및/또는 분화 장애의 병인학에서, 또는 라파마이신의 작용 메커니즘에서 특정 RAP-결합 단백질의 역할 연구를 가능하게 한다.

또한, RAP-BP 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 목적 RAP-결합 단백질의 각각의 발현의 패턴 및 농후함을 평가하기 위한 조직 샘플의 면역조직화학적 염색에 사용될 수 있다. 항-RAP-BP 항체는 면역-침전 및 면역-블로팅에서 진단학적으로 사용되어, 임상 시험 방법의 일부로서 조직 또는 체액에서의 RAP-BP 농도를 평가하고 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 유리 RAP-BP 대 RAP-BP/FKBP/약제 복합체의 농도의 측정은, 특정 라파마이신 유사체의 효능의 예상 평가에서 유용할 수 있으며, 개체에 대한 소정의 처리법의 효능의 측정을 가능하게 한다. RAP-결합 단백질의 농도는, 체액중에 존재하는 세포, 예를 들어 혈액 샘플로부터 얻은 세포에서 측정되거나, 또는 생검에 의해 제공되는 조직에서 측정될 수 있다.

목적 항체의 그밖의 적용은, λgt11, λgt18-23, λZAP 및 λORF8과 같은 발현 벡터에서 구성되는 cDNA 라이브러리의 면역학적 스크리닝에서이다. 올바른 리딩 프레임 및 배향으로 삽입된 코딩 서열을 가지는 이러한 유형의 메신저 라이브러리는 융합 단백질을 제공할 수 있다. 예를 들어, λgt11은, 아미노 말단이 β-갈락토시다제 아미노산 서열로 이루어지고, 카르복시 말단이 외래 폴리펩티드로 이루어진 융합 단백질을 제공한다. 다음으로, RAP-결합 단백질의 항원성 에피토프는, 예를 들어 항-RAP-BP 항체로 감염된 플레이트로부터 들어올린 니트로셀룰로오스 필터를 반응시킬 경우와 같이, 항체에 의해 검출될 수 있다. 다음으로, 상기 검정에 의해 평가되는 파아지는 감염된 플레이트로부터 단리될 수 있다. 따라서, RAP-BP 동족체의 존재가 다른 동물로부터 검출되고 클로닝될 수 있으며, 교체성 이소폼(스플라이싱 변이체를 포함하는)이 사람 공급원으로부터 검출되고 클로닝될 수 있다.

또한, 사람 세포주로부터의 목적 RAP-결합 단백질의 클로닝으로부터 측정된 누클레오티드 서열은, 다른 포유 동물로부터의 RAP-BP 동족체(예를 들어, 오르토로그) 뿐만 아니라, 사람의 다른 세포 유형에서 동족체를 확인하는 데에 사용할 수 있도록 디자인된 프로브의 생성을 가능하게 한다. 예를 들어, 효모 TOR 유전자와 포유류 동물 RAPT1 유전자의 비교를 통해 보존성이 큰 누클레오티드 서열을 확인함으로써, 실제로 임의의 진핵 세포로부터 RAPT1 동족체를 단리시키기 위한 축퇴 프라이머를 디자인하는 것이 가능하다. 예를 들어, 마우스 RAPT1 유전자 서열 및 효모 DRR-1 및 TOR2 서열의 정렬에서, 본 발명자들은 병원성 균류로부터 뿐만 아니라, 기타 포유류 동족체로부터 RAPT1 동족체를 단리시키기 위한 최적 프라이머는 프라이머 CRGAYTTRAWBGABGCHYAMGAWTGG, CAAGCBTGGGAYMTYMTYAYTATMAYGTBTTCAG 및 GAYYBGARTTGGCTGTBCCHGG를 포함함을 측정하였다.

따라서, 또한 본 발명은 실질적으로 정제된 올리고누클레오티드를 포함하는 프로브/프라이머를 제공하며, 상기 올리고누클레오티드는 서열번호 1 또는 11 중 하나 또는 이의 자연 발생 돌연변이의 센스 또는 안티-센스 서열의 10개 이상의 연속 누클레오티드와 엄격한 조건에서 하이브리드화되는 누클레오티드 서열의 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 프로브/프라이머는 그에 결합되어 있고, 검출성 표지군을 포함하며, 예를 들어 상기 표지군은 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 효소 및 효소 보조-인자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 상기 프로브는 환자로부터의 세포 샘플중의 RAP-BP 핵산의 농도 측정; 예를 들어, RAP-BP를 엔코딩하는 mRNA 농도의 검출; 예를 들어, 게놈 RNA-BP 유전자의 돌연변이 또는 결실 유무의 측정과 같은 형질전환된 세포의 확인을 위한 진단학적 시험용 키트의 일부로서 사용될 수 있다.

그외에, RAP-BP mRNA의 존재를 위해 온전한 조직 및 조직 샘플의 조직학적 스크리닝을 가능하게 하는 누클레오티드 프로브가 생성될 수 있다. 항-RAP-BP 항체의 진단학적 사용과 유사하게, 게놈 RAP-BP 서열 또는 RAP-BP mRNA에 대한 프로브의 사용은, 예를 들어 신생물성 또는 증식성 질환(예를 들어, 바람직하지 않은 세포 성장) 또는 조직의 이상 분화에서 나타나는 대립 유전자 돌연변이의 예방 및 치료학적 평가를 위해 사용될 수 있다. 항체 면역검정과 함께 사용될 경우, 상기 누클레오티드 프로브는 RAP-결합 단백질의 발현(또는, 이들의 결여)과 관련된 어떤 이상을 포함할 수 있는 발생 질환의 분자적 기초의 측정을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, RAP-결합 단백질의 합성에서의 변화는 유전자 코딩 서열의 돌연변이로부터 구별될 수 있다.

따라서, 본 발명은 피검자가 바람직하지 않은 세포 증식 또는 분화의 비정상적 제어를 특징으로 하는 질환의 위험이 있는가를 측정하기 위한 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 목적 방법은 일반적으로 피검자(예를 들어, 사람 환자)의 조직 샘플에서, (i) 목적 RAP-결합 단백질 중 하나를 엔코딩하는 유전자의 돌연변이 또는 (ii) RAP-BP 유전자의 오발현 중 하나 이상을 특징으로 하는 유전적 손상의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이를 설명하면, 이러한 유전적 손상은, (i) RAP-BP 유전자로부터의 하나 이상의 누클레오티드의 결실, (ii) 이러한 RAP-BP 유전자에 대한 하나 이상의 누클레오티드의 첨가, (iii) RAP-BP 유전자의 하나 이상의 누클레오티드의 치환, (iv) RAP-BP 유전자 중 하나의 전체 염색체의 재배열, (v) RAP-BP 유전자의 메신저 RNA 전사체의 농도의 전체 변화, (vi) RAP-BP 유전자의 메신저 RNA 전사체의 비-야생형 스플라이싱 패턴의 존재, 및 (vii) RAP-결합 단백질의 비-야생형 농도 중 하나 이상의 존재를 확인함으로써 검출될 수 있다. 본 발명의 한 관점에서, 서열번호 1 또는 11 중 하나 또는 이의 자연 발생 돌연변이체 또는 목적 RAP-BP 유전자와 자연적으로 결합하는 인트론 서열 또는 5' 또는 3' 플랭킹 서열의 센스 또는 안티센스 서열과 하이브리드화될 수 있는 누클레오티드 서열의 영역을 함유하는, 올리고누클레오티드를 포함 하는 프로브/프라이머가 제공된다. 상기 프로브는 조직 샘플의 핵산에 노출되고; 상기 샘플 핵산과 상기 프로브의 하이브리드화가 검출된다. 특정 구체예에서, 상기 손상의 검출은 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)(예를 들어, 미국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호) 또는 대안적으로, 연결 연쇄 반응 (LCR) (예를 들어, Landegran et al. (1988) *Science,* 241:1077-1080; 및 Nakazawa et al. (1944) *PNAS* 91:360-364)에서 상기 프로브/프라이머를 사용하는 것을 포함하고, 연결 연쇄 반응은 특히, RAP-BP 유전자에서 점 돌연변이를 검출하는 데에 유용하다. 대안적으로, 면역 검정은 RAP-결합 단백질의 농도 및/또는 단백질 복합체, 특히 FKBP/라파마이신을 포함하는 것과 같은 전사 조절 복합체에서 이의 참여를 측정하는 데에 사용될 수 있다.

또한, 특정 RAP-결합 단백질의 내인성 생성을 저해함으로써 안티센스 기술 (예를 들어, 안티센스 분자의 마이크로주입, 또는 전사체가 RAP-BP mRNA 또는 유전자 서열에 관련된 안티센스인 플라스미드로의 트랜스펙션)은 월름(Wilm) 종양에서 발생하는 것과 같은, 성장 및 분화 과정에서의 목적 RAP-BP 각각의 역할, 및 예를 들어 전사의 조절에서 목적 RAP-결합 단백질 각각의 정상적 세포 기능을 조사하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 기술은 세포 배양에서 사용될 수 있고, 또한 트랜스제닉 동물의 제조에 사용될 수 있다.

또한, 입수 가능한 정제된 재조합 RAP-결합 단백질을 제조함으로써, 본 발명은 목적 RAP-결합 단백질의 세포 기능, 또는 증식 및 분화 질환의 발병에서 역할하는 작용제 또는 길항제인 약제를 스크리닝하는 데에 사용될 수 있는 검정의 생성을 제공한다. 예를 들어, RAP-결합 단백질 및 FK506-결합 단백질 사이의 결합을 조정하는 화합물의 능력을 평가하는 검정이 본 발명에 따라 생성될 수 있다. 특히, 이러한 검정은 완전히 비관련된 화합물에 있어서 FKBP/RAP-BP 복합체의 형성을 매개하는데 대한 이의 능력을 시험하는 것 뿐만 아니라, 신규한 라파마이신 유사체를 디자인하고, 스크리닝하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 검정은, 예를 들어 라파마이신 유사체와 같이 라파마이신과 유사한 작용 메카니즘을 가지는 보다 더 강력한 증식억제제의 제조에 사용될 수 있다. 본 발명의 관점에서 다양한 검정 형식이 가능하고, 이는 당업자에게 이해될 것이다.

약제 스크리닝 검정, 특히 하기 기술되는 고출력 검정의 제조를 용이하게 하는 본 발명의 한 관점은, RAPT1 유사 단백질의 라파마이신 결합 도메인의 확인이다. 예를 들어, 본 발명은 전장 단백질 보다 더 조작이 용이한 RAPT1 유사 단백질의 일부를 제공한다. 전장 단백질은 그 크기로 인해, 라파마이신 결합 활성을 보유하는 재조합 단백질 또는 융합 단백질로서

발현되기 어려우며, 불용성일 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열번호 2의 Val26-Tyr160, 서열번호 12의 Val2012-Tyr2144, 서열번호 14의 Val41-Tyr173, 서열번호 16의 Val1-Tyr133 및 서열번호 18의 Val1-Arg133으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 라파마이신 결합 도메인과 같은, 상기 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하는 RAPT1 유사 폴리펩티드의 가용성 부분을 포함하는 가용성 폴리펩티드를 제공한다.

예를 들어, 본 스크리닝 검정에서 유용한 RAPT1 폴리펩티드는 일반식 X-Y-Z에 의해 제시될 수 있다. 상기식에서 Y는 서열번호 12의 잔기 2012 내지 2144내의 라파마이신 결합 도메인의 아미노산 서열을 나타내고, X는 부재 또는 Y에 의해 제시되지 않은 서열번호 12의 잔기 약 1700 내지 2144 사이의 아미노산 서열의 C-말단 부분 또는 전체를 나타내며, Z는 부재 또는 Y에 의해 제시되지 않은 서열번호 12의 잔기 2012 내지 2549 사이의 아미노산 서열의 N-말단 부분 또는 전체를 나타 낸다. 바람직하게, 상기 폴리펩티드는 RAPT1 단백질 서열의 단지 약 50 내지 200개의 잔기를 포함하고, 일부는 라파마이신 결합 도메인을 포함한다. 유사한 폴리펩티드가 다른 RAPT1 유사 단백질에서 제조될 수 있다.

다른 구체예에서, 또한 동일한 일반식이 목적 RAPT1 단백질의 생활성 단편을 나타내는 데에 사용될 수 있으며, 이 경우에 Y는 서열번호 12의 잔기 2012 내지 2144 내의 라파마이신 결합 도메인을 나타내고, X는 부재 또는 라파마이신 결합 도메인의 N-말단 부위의 서열번호 12의 1 내지 약 500개의 아미노산 잔기의 폴리펩티드를 나타내며, Z는 선택된 라파마이신 결합 도메인의 바로 C-말단에 존재하는 서열번호 2의 1 내지 약 365개의 아마노산 잔기로 이루어진 폴리펩티드를 나타낸다.

화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 시험하는 많은 약제 스크리닝 프로그램에서, 지정 기간 동안 검사되는 화합물의 수를 최대화하기 위해 고출력 검정이 바람직하다. 예를 들어, 정제 또는 반-정제 단백질로 유래될 수 있는 무세포 시스템에서 수행되는 검정이 "일차" 스크린으로서 종종 바람직한데, 이는 상기 검정이 시험 화합물과 접촉되는 경우에 분자 표적의 변형의 빠른 전개 및 비교적 용이한 검출을 가능하도록 할 수 있다는 점에서 그러하다. 또한, 시험관내 시스템에서, 상기 시험 화합물의 세포 독성 및/또는 생체 이용률의 영향은 통상 무시되며, 대신에 상기 검정은 분자 표적의 효소 특성의 변화 또는 다른 단백질과의 결합 친화성의 변화에서 확인되는 것과 같이, 분자 표적상의 약제의 효과에 일차적으로 집중된다. 따라서, 본 발명의 예시적 스크리닝 검정에서 목적 화합물("약제")은 RAPT1 또는 rapUBC와 같은 분리 및 정제 RAP-결합 단백질 및 FK506-결합 단백질로부터 제조되는 혼합물과 접촉된다. 약제-의존적 FKBP/RAP-BP 복합체의 검출 및 측정은 상기 두개의 단백질 사이에서 복합물의 형성을 조정하는, 상기 화합물의 효율을 측정하는 수단을 제공한다. 상기 화합물의 효율은 다양한 농도의 상기 화합물을 사용하여 수득되는 데이터로부터 얻어진 용량 반응 곡선에 의해 평가될 수 있다. 또한, 비교를 위한 기준선을 제공하기 위해 대조검정을 수행한다. 상기 대조 검정에서, 분리 및 정제 RAP-BP를 FK506-결합 단백질을 함유하는 조성물에 첨가하고, FKBP/RAP-BP 복합체의 형성을 상기 시험 화합물의 부재하에 측정한다.

RAP-결합 단백질 및 FKBP/약제 복합체 사이에서 복합체의 형성은 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 복합체의 형성의 변화는, 예를 들어 면역화적 검정 또는 크로마토그래피 검출에 의해 검출성 표지(예를 들어, 방사성표지, 형광 표지 또는 효소 표지) 단백질을 사용하여 측정될 수 있다.

일반적으로, 검정의 자동화를 도모하기 위해서 뿐만 아니라, 단백질 중 하나의 비복합체 형태로부터 약제-의존적 단백질 복합체의 분리를 용이하게 하기 위해 FK506-결합 단백질 또는 RAP-결합 단백질을 고정시키는 것이 바람직하다. 예시적 구체예에서, 단백질이 불용성 매트릭스에 결합되도록 하는 도메인이 첨가된 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제/FKBP(FKBP-GST) 융합 단백질은 글루타티온 세파로오스 비드(Sigma Chemical, St. Louis, MO) 또는 글루타티온 유도 마이크로역가 플레이트 상에 흡착되고, 다음 RAP-결합 단백질, 예를 들어 ^{35}S-표지 RAP-결합 단백질 및 시험 화합물과 결합되며, 복합체 형성을 유도하는 조건에서 인큐베이션될 수 있다(실시예 9 참조). 인큐베이션 후, 상기 비드를 세척하여 결합되지 않은 RAP-BP를 제거하고, 매트릭스 비드-결합 방사성 표지(예를 들어, 섬광하의 비드)를 직접 측정하거나, 또는 예를 들어 마이크로역가 플레이트가 사용되는 경우에 FKBP/RAP-BP 복합체를 분리한 후 상층액에서 직접 측정한다. 대안적으로, 비결합 단백질을 세척한 후, 상기 복합체를 매트릭스로부터 이탈시키고, SDS-PAGE 겔에 의해 분리시키며, 표준 전기영동 방법을 사용하여 상기 겔로부터 매트릭스-결합 분획에서 RAP-BP의 농도를 측정할 수 있다.

또한, 매트릭스 상에 단백질을 고정시키는 그밖의 방법이 상기 검정에서 유용하다. 예를 들어, FK506-결합 단백질은 바이오틴 및 스트렙타비딘의 컨쥬게이션을 사용하여 고정될 수 있다. 바이오틴화된 FKBP를 공지된 방법(예를 들어, 바이오틴화 키트, Pierce Chemicals, Rockford, IL)을 사용하여 바이오틴-NHS(N-히드록시-숙신이미드)로부터 제조하고, 스트렙타비딘-피복된 96 웰 플레이트(Pierce Chemical)의 웰(well)에 고정시킨다. 대안적으로, FKBP와 반응하는 항체를 플레이트의 웰에 도입하며, FKBP는 항체 컨쥬게이션에 의해 웰에 포획될 수 있다. 상기와 같이, RAP-결합 단백질 및 시험

화합물의 제조물은 플레이트의 FKBP-존재 웰에서 인큐베이션되고, 웰내에 포획된 FKBP/RAP-BP 복합체의 양이 측정될 수 있다. GST-고정 복합체에서 상기 기술된 것에 추가하여 상기 복합체를 검출하는 예시적 방법은, RAP-결합 단백질과 반응하거나 또는 FK506-결합 단백질과 반응하며, RAP-BP와의 결합에 대해 경쟁적인 항체를 사용하는 복합체의 면역학적 검출; 및 RAP-결합 단백질과 관련된 효소적 활성을 검출하는 것에 의존하는 효소-결합 검정을 포함한다. RAP-결합 단백질과 결합하는 효소적 활성을 검출하는 것에 의존적인 효소-결합 검정의 예에서, 효소 활성은 키나제(RAPT1) 또는 유비퀴틴 리가제(rapUBC) 활성과 같은 내인성이거나, 또는 RAP-결합 단백질과 화학적으로 결합되거나 또는 이와의 융합 단백질로서 제공되는 외인성 활성일 수 있다. 예로서, RAP-결합 단백질은 알칼리 포스파타제와 화학적으로 교차-결합될 수 있으며, 복합체내에 포획된 RAP-BP의 양은 파라니트로페닐 포스페이트와 같은 효소의 색원체(chromorenic) 기질로 평가될 수 있다. 유사하게, RAP-BP 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제를 포함하는 융합 단백질이 제공되고, 복합체 형성은 1-클로로-2,4-디니트로벤젠을 사용하여 GST 활성을 검출함에 의해 측정될 수 있다(Habig et al (1974) *J Biol Chem* 249:7130).

복합체내에 포획된 단백질 중 하나를 측정하기 위한 면역학적 검출에 의존적인 과정에서, 본원에서 기술된 항-RAP-BP 항체와 같은 상기 단백질에 대한 항체가 사용될 수 있다. 대안적으로, 복합체내에 검출되는 단백질은 RAP-BP 또는 FKBP 서열 이외에, 항체가(예를 들어, 상업적 공급처로부터) 쉽게 입수될 수 있는 제2 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 형태의 "태깅된 에피토프"일 수 있다. 예를 들어, 또한 상기한 GST 융합 단백질은 GST 부분에 대한 항체를 사용하여 결합의 측정에 사용될 수 있다. 그밖의 유용한 에피토프 태그는, pFLAG 시스템(International Biotechnologies, Inc.) 또는 pEZZ-단백질 A 시스템(Pharamacia, NJ) 뿐만아니라, c-*myc*로부터의 10-잔기 서열을 포함하는 *myc*-에피토프(예를 들어, Ellison et al. (1991) *J Biol Chem* 266:21150-21157)를 포함한다.

또한, 본 RAP-결합 단백질은, RAP-결합 단백질 및 FK506-결합 단백질 사이에서 복합체의 형성을 유도하는 제제를 검출하기 위해 하기 실시예에서 기술되는 것과 같이 약제-의존적 상호작용 트랩 검정을 제조하는 데에 사용될 수 있다. 하기에서 기술되는 것과 같이, 상기 상호작용 트랩 검정은 2개의 별개의 융합 단백질로부터 기능성 전사 활성인자 단백질을 생체내에서 재구성하는 것에 의존적이며, 상기 2개의 별개의 융합 단백질중 하나는 FK506-결합 단백질에 융합된 전사 활성인자의 DNA-결합 도메인을 포함한다(또한, 미국 특허 제5,283,317호; PCT 출원 WO94/10300; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; 및 Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). 제2 융합 단백질은 목적 RAP-결합 단백질 중 하나에 융합되어 있는 전사 활성화 도메인(예를 들어, RNA 중합 효소 전사를 개시시킬 수 있는)을 포함한다. FKBP 및 RAP-결합 단백질이 라파마이신과 같은 제제의 존재하에 상호작용할 경우에, 전사 활성인자 단백질의 2개의 도메인은 리포터 유전자의 전사를 야기하기에 충분히 근접하게 된다. 하기의 실시예에서 기술되는 LexA 상호작용 트랩 이외에, 기타 예시적 구체예는 GAL4db-FKBP 융합(db: DNA 결합 도메인)을 엔코딩하는 플라스미드, 및 목적 RAP-BP에 융합되는 GAL4 활성화 도메인(GAL4ad)을 엔코딩하는 플라스미드로 동시에 형질전환된 사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*) YPB2 세포를 포함한다. 또한, 상기 균주는 GAL4-반응성 프로모터가 표현형 마커의 발현을 유도하도록 형질전환된다. 예를 들어, 히스티딘의 부재하의 성장 능력은 HIS3 유전자의 발현에 의존적일 수 있다. HIS3 유전자가 GAL4-반응성 프로모터의 조절하에 배치될 경우, 이러한 영양 요구 표현형은 기능성 GAL4 활성인자가 FKBP 및 RAP-BP의 약제-의존적 상호작용을 통하여 재구성되었음을 나타낸다. 따라서, FKBP와 RAP-BP 상호작용을 촉진시킬 수 있는 제제는, 효모 세포에서 히스티딘의 부재하의 성장을 가능하게 한다. 목적 RAP-결합 단백질로 2-하이브리드 검정을 전개시키기 위해 변형될 수 있는 상업적 키트는 현재 입수 가능하다(MATCHMAKER 키트, ClonTech 목록 번호 K1605-1, Palo Alto, CA).

바람직한 구체예에서, 라파마이신 보다 더욱 선호되는 치료학적 지수를 가지는 라파마이신 모사체를 확인하기 위해, 목적 포유류 동물 RAP-결합 단백질을 사용하는 검정이 사용될 수 있다. 예를 들어, 라파마이신에 비해 강화된 조직-유형 또는 세포-유형 특이성을 가지는 라파마이신-유사 약제가 본 발명에 의해 확인될 수 있다. 예로서, 본 검정은, 실질적으로 기타 조직, 예를 들어 간세포와의 상호작용이 없이, 림프구의 IL-2 매개 증식/활성화를 선택적으로 저해하는 화합물을 제조하는 데에 사용될 수 있다. 유사하게, 효모 세포 또는 보다 더 하등의 저급 진핵세포의 증식을 저해하나, 포유류 동물 세포에 대해서는 실질적으로 효과가 감소되어, 라파마이신에 비해 항진균제로서 약제의 치료학적 지수가 개선된 라파마이신-유사약제를 동정하기 위해 유사한 검정이 사용될 수 있다.

한 구체예에서, 상기 화합물의 확인은 2종 이상의 FKBP/RAP-BP 복합체의 약제-매개 형성을 검출하고, 비교하는 차별적 스크리닝 검정의 사용에 의해 가능하다. 예로서, 상기 검정은 조직-유형 특이적 FKBP/RAPT1 복합체의 형성에 대한 시험 화합물의 영향의 단계적 비교를 위해 디자인될 수 있다. RAPT1이 관련된 단백질의 큰 분류의 일원을 나타내는 실질적 가능성 및 FKBP의 변화를 고려하면, 다른 기능적 FKBP/RAPT1 복합체가 존재하고, 어떤 경우에는 특정 조직 또는 세포 유형으로 한정되는 것이 가능하다. PCT 공개 WO93/23548 [Method of Detecting Tissue-Specific FK506 Binding Protein Messenger RNAs and Uses Thereof]에 기술된 바와 같이, FKBP의 조직 분포는 단백질의 한 종류로부터 다른 종으로 변화될 수 있다. 따라서, 시험 화합물은 FKBP/RAPT1 복합체의 가능한 레퍼터리의 서브 세트만의 조직-특이적 형

성을 매개할 수 있는 제제에 대하여 스크리닝될 수 있다. 예시적 구체예에서, 상호작용 트랩 검정은 2개 이상의 다른 미끼 단백질, 예를 들어 FKBP12(서열 번호 5 및 6), FKBP25(GenBank Accession M90309) 또는 FKBP52(GenBank Accession M88279)를 사용하여 유도될 수 있고, 반면에 물고기 단백질은 각각, 예를 들어 사람 RAPT1 작제물에서 일정하다. ITS 단계의 작동은, 더 큰(예를 들어, 그밖의 FKBP 복합체의 형성 보다 FKBP/RAPT1 복합체 중 하나의 형성에 통계적으로 현저한) 효과를 가지는 제제의 검출을 가능하게 한다.

유사한 방식으로, 차별적 스크리닝 검정이 포유 동물 FKBP/RAP-BP 복합체 및 효모 FKBP/TOR 복합체의 약제-매개 형성에서의 차이를 이용하여, 포유 동물 복합체에 비해 효모 복합체에 대한 특이성에서 통계적으로 현저한 증가를 나타내는 제제를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 특히 진균 감염에 관여하는 진균과 같은 병원균에 특이적으로 작용하는 선도 화합물이 개발될 수 있다. 예로서, 본 발명의 검정은, 결과적으로 칸디다증, 아스페르길루증, 무코르미코시스(mucormycosis), 블라스토마이세스증, 제오트리코시스(geotrichosis), 크립토코코시스(cryptococcsis), 크로모블라스토미코시스(chromoblastomycosis), 코시디오이도미코시스(coccidioidomycosis), 코니디오스포로시스(conidiosporosis), 히스토플라스모시스(histoplasmosis), 마두로미코시스(macuromycosis), 르히노스포리도시스(rhinosporidosis), 노카이디오시스(nocaidiosis), 파라-악티노미코시스(para-actinomycosis), 페니실리오시스(penicilliosis), 모노리아시스(monoliasis) 또는 스포로트리코시스(sporotrichosis)와 같은 진균병에 관련된 하나 이상의 진균류를 저해하는 데에 유용한 제제의 스크리닝에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료가 요구되는 진균성 감염이 칸디다증일 경우, 본 발명의 검정은 포유 동물 FKBP/RAPT1 복합체의 형성을 매개함에 있어서 시험 화합물의 상대적 효과를, 칸디다 알비칸스*(Candida albicans),* 칸디다 스텔라토이데아 *(Candida stellatoidea),* 칸디다 트로피칼리스 *(Candida tropicalis),* 칸디다 파라실로시스 *(Candida parasilosis),* 칸디다 크루세이 *(Candida krusei),* 칸디다 슈도트로피칼리스 *(Candida pseudotropicalis),* 칸디다 퀼레르몬디 *(Candida quillermondii)* 또는 칸디다 루고사 *(Candida rugosa)*로 이루어진 군으로부터 선택되는 효모로부터 클로닝된 유전자로부터 형성되는 복합체를 매개하는 효과와 비교하는 것을 포함할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 검정은, 아스퍼질루스 푸미가투스*(Aspergillus fumigatus),* 아스페르길루스 플라부스*(Aspergillus flavus),* 아스페르길루스 니게르*(Aspergillus niger),* 아르페르길루스 니둘란스*(Aspergillus nidulans)* 또는 아스페르길루스 테레우스 *(Aspergillus terreus)*와 같은 효모로부터 클로닝된 FKBP 및 TOR 유전자로부터 유래되는 본 목적 약제-의존적 상호작용 트랩 검정을 사용함으로써 아스페르길로시스의 처리에서 치료학적 유용성을 가질 수 있는 항진균제를 확인하는 데에 사용될 수 있다. 진균 감염이 무코미코시스인 경우, 복합체는 예를 들어 리조푸스 아르히주스(Rhizopus arrhizus), 리조푸스 오리제(Rhizopus oryzae), 아브시디아 코림비페라(Absidia corymbifera), 아브시디아 라모사(Absidia ramosa), 또는 무코르 푸실러스(Mucor pusillus)와 같은 효모로부터 얻어진다. 포유류 동물 FKBP/RAPT1 복합체와의 비교를 위한 그밖의 라파마이신 의존적 복합체의 공급원은 병원균 뉴모사이시스 카리니*(Pneumocysis carinii)*를 포함한다. 사람 병원균 및 그밖의 하등한 진핵 생물로부터의 예시적 FK506-결합 단백질은, 예를 들어 GenBank 수탁번호: M84759 *(Candida albican)*; U01195, U01198, U01197, U01193, U01188, U01194, U01199 *(Neisseria spp.)*; 및 M98428 *(Streptomyces chrysomallus)*에 의해 제공된다.

예시적 구체예에서, 상기 차별 스크리닝 검정은, 칸디다 알비칸스 RAPT1 단백질(실시예 11 참조) 및 칸디다 FK506-결합 단백질(예를 들어, RBP1, GenBank 제 M84759호, Ferrara et al. (1992) *Gene* 113:125-127) 또는 효모 FK506-결합 단백질(실시예 8 및 도 3 참조)의 라파마이신 결합 도메인을 사용하여 이루어질 수 있다. 사람 RAPT1 복합체 및 칸디다 RAPT1 복합체의 형성의 비교는, caRAPT1 복합체의 형성에 더 선택적이어서, 라파마이신에 비해 항진균 제제로서 더욱 특이적인 제제를 확인하는 수단을 제공한다.

본 발명의 그 밖의 관점은, 본 발명의 이식 유전자를 함유하고, 바람직하게는 (임의적일지라도) 동물의 하나 이상의 세포에서 외인성 RAP-결합 단백질을 발현시키는 (동물의) 세포로 이루어진 트랜스제닉 동물에 관한 것이다. RAP-BP 이식 유전자는, 단백질의 야생형을 엔코딩할 수 있거나, 작용제 및 길항제를 모두 포함하는 이들의 동족체, 뿐만 아니라 내인성 유전자의 발현을 저해하도록 고안된 안티센스 작제물을 엔코딩할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 이식 유전자의 발현은, 예를 들어 바람직한 패턴으로 발현을 조절하는 시스(cis)-작용 서열의 사용을 통하여, 세포, 조직 또는 발생 단계의 특정 서브 세트 사용에 제한된다. 본 발명에서, 본 RAP-결합 단백질의 모자이크 발현은 계통 분석의 많은 형태에서 필수적일 수 있으며, 또한 결손은 정상적인 배아(embryo)내에서의 조직의 작은 단편에서 발생을 전체적으로 변경시킬 수 있는 기능-손실 돌연변이의 영향을 평가하는 수단을 제공할 수 있다. 조직-특이적 조절 서열 및 잠정적인 조절 서열은, 특정 공간적 패턴에서 이식 유전자의 발현을 조절하는 데에 사용될 수 있다. 또한, 발현의 일시적 패턴은, 예를 들어 잠정적 재조합 시스템 또는 진핵 생물 전사 조절 서열에 의해 제공될 수 있다.

생체내 부위-특이적 유전자 조작을 통하여 이식 유전자의 발현의 조절을 가능하게 하는 유전학적 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 표적 서열에서 유전자 재조합을 촉매하는 재조합효소(recombinase)의 조절된 발현을 가능하게 하는 유전적 시스템이 이용될 수 있다. 본원의 "표적 서열"은 재조합효소에 의해에 의해 유전적으로 재조합되는 누클레오티드 서열을 의미한다. 표적 서열은, 재조합효소 인식 서열에 플랭킹되고, 통상 재조합효소 활성을 발현하는 세포에서 삭제

되거나 또는 역전된다. 재조합효소에 의해 촉매된 재조합은, 상기 표적 서열의 재조합이 목적 RAP-결합 단백질의 발현의 활성화 또는 억제를 초래하도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 재조합 RAP-BP 유전자의 발현을 방해하는 표적 서열의 삭제는 상기 유전자의 발현을 활성화시키도록 디자인될 수 있다. 이러한 단백질 발현의 방해는 내부 종결 코돈 또는 프로모터 요소로부터 상기 유전자의 공간적 분리와 같은 다양한 메커니즘으로부터 유도될 수 있다. 또한, 이식 유전자는 재조합효소 인식 서열에 플랭킹되고, 프로모터 요소에 관련된 3' 또는 5' 배향에서 세포로 초기에 트랜스펙션된다. 예를 들어, 표적 서열의 인버팅은 프로모터 유도 전사 활성화를 가능하게 하는 프로모터 요소와 관련된 방향으로 코딩 서열의 5' 말단을 배치함으로써 목적 유전자를 재배향한다.

예시적 구체예에서, 생체내 부위-특이적 유전자 재조합 시스템을 제조하기 위해, 박테리오파아지 P1의 *cre/lokP* 재조합효소 시스템(Lakso et al. (1992) *PNAS* 89:6232-6236; Orban et al. (1992) *PNAS* 89:6891-6865) 또는 사카로마이세스 세레비시애의 FLP 재조합효소 시스템(0'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351- 1355; PCT 출원 WO 92/15694)이 사용될 수 있다. Cre 재조합효소는, *loxP* 서열 사이에 위치한 중간 표적 서열의 부위-특이적 재조합을 촉매한다. *loxP* 서열은, Cre 재조합효소가 결합하는 34 염기쌍 누클레오티드 반복 서열이고, Cre 재조합효소 매개 유전자 재조합에 요구된다. *loxP* 서열의 배향은 Cre 재조합효소가 존재할 경우에, 중간 표적 서열의 삭제 또는 역전 여부를 결정한다(Abermski et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514); *loxP* 서열이 역전된 반복체로서 배향되는 경우, 표적 서열의 역전을 촉매하고 *loxP* 서열이 직접 반복체로서 배향될 경우에 표적 서열의 삭제를 촉매한다.

따라서, 표적 서열의 유전적 재조합은 Cre 재조합효소의 발현에 의존적이다. 재조합효소의 발현은 외부에서 부가된 제제에 의해 유도되거나 또는 억제되는, 예를 들어 조직-특이적, 발생 단계-특이적 조절 제어를 받는 프로모터 요소에 의해 조절될 수 있다. 이러한 조절된 제어는, 재조합효소의 발현이 상기 프로모터 요소에 의해 매개되는 세포에서만 상기 표적 서열의 유전적 재조합을 초래한다. 따라서, RAP-결합 단백질의 활성화 발현은 재조합효소의 발현의 조절을 통해 조절될 수 있다.

RAPT1 또는 rapUBC와 같은 재조합 RAP-결합 단백질의 발현을 조절하기 위한 *cre/loxP* 재조합효소 시스템의 사용은, Cre 재조합효소 및 목적 단백질을 모두 엔코딩하는 이식 유전자를 함유하는 트랜스제닉 동물의 구성을 요구한다. "이중" 트랜스제닉 동물의 구성을 통하여 Cre 재조합효소 및 재조합 RAP-BP 유전자를 모두 함유하는 동물이 제공될 수 있다. 이러한 동물을 제공하기 위한 일반적 방법은, 예를 들어 한 동물에서 RAP-BP 유전자 및 다른 동물에서 재조합효소와 같이 하나의 이식 유전자를 각각 함유하는, 2 마리의 트랜스제닉 동물을 교미시키는 것이다.

재조합효소-매개 발현 형식에서 이식 유전자를 함유하는 초기 구성 트랜스제닉 동물로 인한 한가지 잇점은 목적 단백질이 트랜스제닉 동물에서 발현될 때에 손상될 가능성에 기인한다. 이러한 예에서, 목적 이식 유전자가 모든 조직에서 발현되지 않는 초기 집단(founder population)은 번식되고, 유지될 수 있다. 이러한 초기 집단의 각 동물은, 예를 들어 하나 이상의 조직에서 재조합효소를 발현시키는 동물과 교배될 수 있다. 따라서, 예를 들어 길항제 RAP-BP 이식 유전자가 발현되지 않는 초기 집단의 제조는 특정 조직에서 또는 발생 단계에서의 세포-주기 조절의 붕괴가, 예를 들어, 치사 표현형을 초래하는 초기 집단으로부터의 자손의 연구를 가능하게 한다.

유사한 잠정적 이식 유전자는 상기 이식 유전자의 발현을 촉진시키기 위해 동시에 발현되는 원핵 세포 단백질을 요구하는 원핵 세포 프로모터 서열을 사용하여 제공될 수 있다. 예시적 프로모터 및 상응하는 트랜스-활성화 원핵 세포 단백질은 미국 특허 제4,833,080호에 제시되어 있다. 또한, 잠정적 이식 유전자의 발현은 유전자 치료와 같은 방법에 의해 유도되며, 여기서 트랜스-활성화 단백질, 예를 들어 재조합효소 또는 원핵 세포 단백질을 엔코딩하는 유전자가 조직에 전달되고, 예를 들어 상기 기술된 유전자 치료 작제물 중 하나를 사용하여 발현이 유도될 수 있다. 이러한 방법에 의해, RAP-BP 이식 유전자는 성인기에 침묵 상태로 보유하고, 이들의 발현은 트랜스-활성인자의 도입에 의해 개시된다.

예시적 구체예에서, 본 발명의 "사람을 제외한 트랜스제닉 동물"은, 사람을 제외한 동물의 생식 세포 계열로 이식 유전자를 도입시킴으로써 생성된다. 여러 발생 단계에서의 배의 표적 세포가 이식 유전자를 도입시키는 데에 사용될 수 있다. 그밖의 방법이 배의 표적 세포의 발생 단계에 의존적으로 사용된다. 접합체(zygote)는 마이크로-주입을 위한 최선의 표적이다. 마우스에서 수컷의 전핵(pronucleus)은 직경이 20 마이크로미터에 이르며, DNA 용액의 1-2 pl의 재생 주입을 가능하게 한다. 유전자 전달을 위한 표적으로서의 접합체의 사용은 대부분의 경우에 주입되는 DNA가 제1 난할 전에 숙주 유전자로 혼입된다는 점에서 커다란 잇점을 가진다(Brinster et al. (1985) PNAS 82:4438-4442). 결과적으로, 사람을 제외한 트랜스제닉 동물의 모든 세포는 혼입된 이식 유전자를 운반한다. 또한, 이것은 통상 상기 생식 세포의 50%가 이식 유전자를 가질 것이므로, 초기 집단의 자손으로의 이식 유전자의 효과적인 전달에서 반영된다. 접합체의 마이크로주입은 본 발명의 실시에서 이식 유전자를 혼입시키는 바람직한 방법이다.

레트로바이러스 감염은 사람을 제외한 동물에 RAP-BP 이식 유전자를 도입시키는 데에 사용될 수 있다. 발생중인 인간 이외의 배는 시험관내에서 낭포 단계로 배양될 수 있다. 이 기간 동안 할구는 레트로바이러스 감염을 위한 표적일 수 있다(Jaenich, R. (1976) *PNAS* 73:1260-1264). 할구의 효과적인 감염은 투명대(zona pellucia)를 제거하는 효소처리에 의해 수득된다(*Manipulating the Mouse Embryo,* Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986)). 이식 유전자를 도입시키는 데에 사용되는 바이러스 벡터 시스템은, 전형적으로 이식 유전자를 함유하는 복제-결함 레트로바이러스이다(Jahner et al. (1985) *PNAS* 82:6927-6931; Van der Putten et al. (1985) *PNAS* 82:6148-6152). 트랜스펙션은 단층의 바이러스-생성 세포상에 할구를 배양함으로써 용이하고 효과적으로 수득된다(Van der Putten, *supra*; Stewart et al. (1987) *EMBO J.* 6:383-388). 대안적으로, 감염은 후기 단계에서 수행될 수 있다. 바이러스 또는 바이러스-생성 세포는 포배강으로 주입될 수 있다(Jahner et al. (1982) *Nature* 298:623-628). 초기 집단의 대부분이 이식 유전자에 대해 모자이크인데, 이는 혼입이 사람을 제외한 트랜스제닉 동물을 형성하는 세포의 서브세트에서 발생하기 때문이다. 더욱이, 초기집단은 게놈의 여러 위치에 이식 유전자의 다양한 레트로바이러스 삽입물을 함유할 수 있고, 이는 일반적으로 자손에서 분리될 것이다. 또한, 회태 기간 중의 배의 자궁내 레트로바이러스 감염에 의해 생식 세포 계열로 이식 유전자를 도입시키는 것이 가능하다(Jahner et al. (1982) *supra*).

이식 유전자 도입을 위한 표적 세포의 제3 유형은 배아 간세포 (ES)이다. ES 세포는 시험관내에서 배양된 예비-주입 배아로부터 수득되고, 배아와 융합된다(Evans et al. (1981) *Nature* 292:154-156; Bradley et al. (1984) *Nature* 309:255-258; Gossler et al. (1986) *PNAS* 83:9065-9069); 및 Robertson et al. (1986) *Nature* 322:445-448). 이식 유전자는 DNA 트랜스펙션 또는 레트로바이러스-매개 형질 도입에 의해 ES 세포로 효과적으로 도입될 수 있다. 그후 이러한 형질 전환된 ES 세포는 사람을 제외한 동물로부터의 낭포와 조합될 수 있다. 다음 ES 세포는 배를 롤로니화시키고, 생성된 키메라 동물의 생식 계열로 기여된다. 참조: Jaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474.

또한, 녹-아웃(knock-out) 또는 분열(disruption) 트랜스제닉 동물의 제조 방법이 일반적으로 공지되어 있다. 참조: 예를 들어, *Manipulating the Mouse Embryo,* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). 또한 재조합효소 의존적 녹아웃은 RAP-BP 유전자의 비활성화의 조직 특이적 및/또는 일시적 조절이 상기 기술된 것과 같이 조절될 수 있도록, 예를 들어 삽입체 재조합 효소 표적 서열로의 상동 재조합에 의해 제조될 수 있다.

본 발명의 그밖의 관점은 "미끼" 단백질/약제 복합체와 물리적으로 상호작용하는 단백질을 엔코딩하는 유전자의 분리를 위한 신규한 생체내 방법에 관한 것이다. 상기 방법은, 약제의 존재하에 전사 활성인자의 재구성을 검출하는 것에 의존적이며, 특히 여기서 약제는 비-펩티드성 작은 유기 분자(예를 들어, <2500K), 예를 들어 매크로리드, 예를 들어 라파마이신, FK506 또는 사이클로스포린이다. 특히, 상기 방법은 하이브리드 단백질을 발현시키는 키메라 유전자를 사용한다. 제1 하이브리드 단백질은 미끼 단백질에 융합된 전사 활성인자의 DNA-결합 도메인을 포함한다. 제2 하이브리드 단백질은 "물고기" 단백질, 예를 들어 cDNA 라이브러리로부터 유도된 시험 단백질에 융합된 전사 활성화 도메인을 함유한다. 물고기 및 미끼 단백질이 약제-의존적 방식으로 상호작용할 수 있을 경우, 이들은 전사 활성인자의 2개의 도메인에 근접한다. 이러한 근접은 전사 활성인자에 반응성인 전사 조절 부위에 실시 가능하게 연결된 리포터 유전자의 전사를 야기하기에 충분하고, 마커 유전자의 발현은 검출되어, 미끼 단백질/약제 복합체와 기타 단백질의 상호작용에 대해 평가하는 데에 사용될 수 있다.

상기 방법의 잇점 중 하나는, 약제/단백질 복합체와의 상호작용 여부를 측정하기 위해 단수의 단백질이 동시에 시험될 수 있다. 예를 들어, DNA-결합 도메인을 엔코딩하는 DNA 단편이 미끼 단백질을 엔코딩하는 DNA 단편에 융합되어, 하나의 하이브리드를 제공하도록 할 수 있다. 상기 하이브리드는, 마커 유전자를 함유하는 세포내로 도입되고, 상기 세포는 미끼 단백질에 결합하는 것으로 알려진 약제와 접촉된다. 제2 하이브리드에 있어서, 예를 들어 활성화 도메인을 엔코딩하는 DNA 서열에 융합되는 전체 포유 동물 상보적 DNA(cDNA)을 포함할 수 있는, 플라스미드의 라이브러리가 구성될 수 있다. 상기 라이브러리는 제1 하이브리드를 함유하는 세포로 도입된다. 시험 라이브러리로부터의 개별적 플라스미드가 약제/단백질 복합체와 상호작용할 수 있는 단백질을 엔코딩하는 경우, 리포터 유전자의 발현을 검출함에 의해 포지티브 시그널이 수득될 수 있다. 또한, 약제 복합체 및 신규한 단백질 사이의 상호작용이 발생할 경우에 신규하게 확인된 단백질에 대한 유전자가 쉽게 입수될 수 있다.

본원에서 기술되는 바와 같이, 본 발명의 상호작용 트랩 시스템은 특정 단백질/약제 복합체로부터 직접 상류 또는 하류에 배치되는 지정된 시그널 트랜스덕션 경로의 한 지점에서 작용하는 단백질을 엔코딩하는 신규한 유전자의 확인에서의 중요한 수단이다. 예를 들어, 본 검정은 FKBP/라파마이신 복합체 또는 FKBP/FK506 복합체 또는 사이클로필린/사이클로스포린 복합체의 직접 하류 표적을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 약제-의존적 방식으로 상기 복합체 중 하나와 상호작용하는 단백질이 확인될 수 있으며, 이러한 단백질은 진단 및 치료학적 유용성을 가질 수 있다.

숙주 세포, 바람직하게는 효모 세포, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시애 또는 스키조사카로마이세스 폼베 *(Schizosaccharomyces pombe)*에서 발현될 수 있는 제1 키메라 유전자가 제공된다. 상기 숙주 세포는 전사 활성인자의 DNA-결합 도메인을 위한 결합 부위를 가지는 검출가능한 유전자를 함유하며, 그 결과 마커 유전자가 전사 활성화되는 경우에 유전자가 마커 단백질을 발현시킨다. 이러한 활성화는 전사 활성인자의 전사 활성화 도메인이 전사 활성인자의 DNA-결합 도메인에 충분히 근접할 경우에 일어난다. 제1 키메라 유전자는 숙주 세포의 염색체내에 존재할 수 있다. 상기 유전자는 제2 시험 단백질 또는 단백질 단편과 약제-매개 상호작용을 위해 시험되는 미끼 단백질 및 숙주 세포에서 마커 유전자 상의 결합부위를 인식하는 DNA-결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 엔코딩한다.

상기 숙주 세포에서 발현가능한 제2 키메라 유전자가 제공된다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 키메라 유전자가 플라스미드의 형태로 숙주 세포에 도입된다. 그러나, 바람직하게는 제1 키메라 유전자가 숙주 세포의 염색체내에 존재하고, 제2 키메라 유전자는 플라스미드의 일부로서 숙주 세포로 도입된다. 제2 키메라 유전자는 제2 하이브리드 단백질을 엔코딩하는 DNA 서열을 함유한다. 제2 하이브리드 단백질은 전사 활성화 도메인을 함유한다. 또한, 제2 하이브리드 단백질은 제1 시험 단백질 또는 단백질 단편과의 상호작용에 대하여 시험되는 제2 시험 단백질 또는 단백질 단편을 함유한다. 바람직하게, 제1 하이브리드 단백질의 DNA-결합 도메인 및 제2 하이브리드 단백질의 전사 활성화 도메인은 별개의 DNA-결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 가지는 전사 활성인자로부터 유래된다. 또한, 이러한 별개의 DNA-결합 및 전사 활성 도메인은 효모 GAL4에 존재하는 것으로 공지되고, 효모 GCN4 및 ADR1 단백질에 존재하는 것으로 공지되어 있다. 또한, 전사에 관여하는 많은 다른 단백질은 본 발명에서 이들을 유용하게 하는 분리가능한 결합 및 전사 활성화 도메인을 가진다. 그밖의 구체예에서, DNA-결합 도메인 및 전사 활성화 도메인은 다른 전사 활성인자로부터 얻을 수 있다. 제2 하이브리드 단백질은 전사 활성화 도메인을 엔코딩하는 DNA 서열에 융합되는 게놈 cDNA 또는 합성적으로 제조된 DNA 서열을 함유하는 플라스미드의 라이브러리 상에서 엔코딩되는 것이 바람직하다.

그러므로, 숙주 세포내의 제1 시험 단백질 및 제2 시험 단백질 사이의 약제-매개 상호작용은 전사 활성화 도메인이 검출가능한 유전자의 전사를 활성화하도록 유도한다. 상기 방법은, 제1 키메라 유전자 및 제2 키메라 유전자를 숙주 세포로 도입시키고 목적 약제와 세포를 접촉시킴으로써 수행된다. 상기 숙주 세포는 제1 하이브리드 단백질 및 제2 하이브리드 단백질이 활성화되는 검출성 유전자를 위해 충분한 양으로 발현되는 조건에서 배치된다. 다음, 상기 세포는 검출성 유전자의 약제-의존적 발현에 대하여 시험된다.

따라서, 제1 시험 단백질 및 단백질의 라이브러리 사이의 상호작용을 목적 약제의 존재하에 시험하여 상기 라이브러리의 일원중 어떤 것이 제1 및 제2 단백질 사이의 약제-의존적 복합체의 형성에 관여하는지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 미끼 단백질은 FK506, 라파마이신 또는 사이클로스포린에 결합하는 단백질일 수 있고, 예를 들어 FKBP 또는 사이클로필린일 수 있다. 제2 시험 단백질은 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 사람 RAPT1 클론을 클로닝시키는 데에 사용되는 pACT 벡터의 지도를 도시한다. 상기 pACT의 RAPT1-함유 버전, 즉 "pIC524"가 ATCC에 기탁되어 있다.

도 2는 라파마이신 농도의 함수로서 FKBP12 및 hRAPT1(라파마이신 결합 도메인)의 상호작용을 도시한다. 상기 상호작용은 β-갈락토시다제 활성으로서 검출되었다. FK506이 라파마이신 대신에 사용되거나 또는 lex.da(대조 플라스미드)가 FKBP12를 대신하는 경우에는 상호작용이 검출되지 않는다.

도 3은 β-갈락토시다제 발현에 의해 측정되는(실시예 8 참조), 다양한 농도의 라파마이신의 존재하에 FK506-결합 단백질 및 라파마이신 결합 도메인(BD) 융합체 사이의 상호작용의 상대 강도를 도시한다. 효모 리포터 균주 VBY567를 상기 지적된 플라스미드의 쌍으로 형질전환시켰다. 사람 FKBP12, 효모 FKBP12 및 네거티브 대조로서 기능하는 비관련 서열로의 LexA DNA-결합 도메인 융합체를 "미끼"로서 사용했다. 사람 RAPT1 BD, 아르기닌 치환으로 세린을 함유하는 사람 RAPT1 BD, 효모 Tor1 BD, 효모 Tor2 BD (제시되지 않음) 및 칸디다 알비칸스 RAPT1 BD를 미끼 융합체와의 상호작용에 대하여 시험했다. 플라스미드의 각 쌍을 함유하는 형질전환체를 색원체 기질 X-gal을 함유하는 배지 상에서 β-갈락토시다제 발현에 대해 시험하였다. 콜로니를 2일 동안 30℃에서 성장시킨 후, 화이트(□) 또는 블루(■)로서 기록하였다. β-갈락토시다제 발현의 농도는 1 (밝은 청색) 내지 4(짙은 청색) 범위의 청색의 강도에 의해 질적으로 체크했다.

실시예

일반적으로 기술된 본 발명은, 본 발명의 구체예 및 특정 관점의 설명 목적을 위해 포함되는 하기 실시예를 참고로 더욱 쉽게 이해될 것이며, 이것은 본 발명을 제한하지 않는다.

실시예 1

2-하이브리드 스크린을 위한 미끼 플라스미드의 구성

A. *LexA-FKBP12* 미끼:

본 발명의 약제-의존적 상호작용 트랩에서 사용되는 미끼 단백질 및 물고기 단백질 작제물은 기타 2 하이브리드 검정에서 사용되는 작제물과 기본적으로 동일했다 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,283,317호; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; 및 Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). 하기 올리고누클레오티드를 사용했다:

코딩 가닥

G GGT TTG GAA TTC CTA ATA ATG TCT GTA CAA GTA GAA ACC

(서열 번호 3)

비-코딩 가닥

GGG TTT CGG GAT CCC GTC ATT CCA GTT TTA GAA G

(서열 번호 4)

PCR 증폭을 림프구 cDNA 라이브러리로부터 수행하여 FKBP12 단백질의 코딩 서열을 분리하였다. 클로닝된 사람 FKBP12의 서열은 하기와 같았다:

ATGTCCGTACAAGTAGAAACCATCTcCCCAGGAGACGGGCGCACCTTcCCCA

AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGgATGCTTGAAGATGGAAA

GAAATTTGATTCCTCCCGTGACCGTAACAAGCCCTTTAAGTTtATgCTAGGC

aAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAagGGGTTGcCCAGATGAGTGTGG

gTCAGCGTGCCAAaCTgACTAtAtCTCcAGaTtATgCcTATGgTGCCACTGG

GCAccCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTT

CTAAAACTGGAATGA (서열 번호 5)

사람 FKBP12 코딩 서열을 함유하는 생성된 PCR 생성물을 그후 EcoRI 및 BamHI으로 분해시키고, pBTM116의 EcoRI + BamHI 부위로 클로닝시켜서 LexA 및 FKBP12 사이의 인-프레임 융합체를 생성시켰다. 생성된 플라스미드는 하기에서 pIC504로 언급하였다.

B. LexA-$(gly)_6$-FKBP12 미끼:

6개의 글리신 잔기에 의해 분리된 FKBP12 및 LexA 사이의 인 프레임 융합체를 생성시키기 위해, 사람 FKBP12로부터의 코딩 서열을 상기와 같은 PCR에 의해 클로닝시키되, 단 융합 단백질의 오픈 리딩 프레임내에 6개의 글리신을 삽입시킨 추가의 18개의 누클레오티드를 제공하는 센스 올리고누클레오티드를 사용하였다. 사용된 올리고는 하기와 같았다:

코딩 가닥

TCG CCG GAA TTC GGG GGC GGA GGT GGA GGA GTA CAA

GTA GAA ACC ATC (서열 번호 7)

비-코딩 가닥

GGG TTT CGG GAT CCC GTC ATT CCA GTT TTA GAA G

(서열 번호 8)

다음 사람 FKBP12 코딩 서열을 함유하는 PCR 생성물을 EcoRI 및 BamHI으로 분해시키고, 상기와 같이 pBTM116의 EcoRI + BamHI 부위로 클로닝시켰다. 생성된 플라스미드는 하기에서 pIC506으로 언급하였다.

실시예 2

FKBP12 결실 균주의 구성

FKB1(FKBP12의 사카로마이세스 세레비시애 동족체)를 함유하는 1.8kb HindⅢ-EcoRI 효모 게놈 단편을 pSP72 (Promega)의 HindⅢ + EcoRI 부위로 클로닝시켰다.

ATG 개시 코돈으로부터 TGA 종결 코돈까지 연장된 FKB1 코딩 서열의 정확한 결실을 생성시키기 위해, 1-단계 PCR 방법을 사용했다. 동시에 단일 BamⅢ 부위를 FKB1 코딩 서열 대신에 도입시켰다. 단일 BamHI 부위의 도입 및 FKB1 결실을 생성시키기 위해 사용된 올리고는 하기와 같았다:

CGCGGATCCGCGCATTATTACTTGTTTTGATTGATTTTTTG

(서열 번호 9)

CGCGGATCCGCGTAAAAGCAAAGTACTATCAATTGAGCCG

(서열 번호 10)

다음, 3.6kb BamHI 단편 상의 효모 ADE2 유전자를 상기한 플라스미드의 단일 BamHI 부위로 클로닝시켜, 플라스미드 pVB172를 생성시켰다. FKB1의 5' 및 3' 비코딩 서열의 pVB172의 ADE2 분열(disruption) 마커 플랭킹은 XhoI 부위였다. pVB172를 XhoI으로 분해시켜, FKB1 비코딩 서열에 플랭킹된 ADE2를 함유하는 선형 단편을 배출시켰다. 상기 선형 단편을 사용하여, 효모 균주 L40(Mat a his3 △200 trpI-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::$(lexAop)_8$-lacZ GAL4 gal80)를 형질전환시키고, 아데닌 영양요구성에 대해 선별했다.

ADE+ 효모 형질전환체를 라파마이신 내성에 대해 시험하여, 야생형 FKB1 대립 유전자가 ADE2에 의해 대체되었음을 확인했다. FKB1의 이러한 분열(disruption) 대립 유전자를 L40-fkb1-2로 명명했다.

실시예 3

포유 동물 라파마이신 표적 유전자의 클로닝

본 발명자들은 상기 실시예 1에서 기술된 약제-의존적 상호작용 트랩을 사용하고, VP16 활성화-도메인 융합체를 함유하는 cDNA 라이브러리로부터의 클론과의 상호작용을 검출하기 위한 미끼로서 LexA 결합-도메인 융합 작제물을 사용하였다. 상기 시스템에서 "판독" 시그널링 상호작용으로서 사용되는 리포터는 사카로마이세스 세레비시애 HIS3 및 E. coli LacZ 유전자였다. 효모 균주 L40, 미끼 벡터 플라스미드 pBTM116 및 벡터 pVP16의 마우스 배아 PCR 라이브러리를 사용하여 cDNA 융합 단백질 라이브러리를 구성했다.

상기 실시예 2에서 기술된 균주 L40-fkb1-2를 각각 2개의 미끼 플라스미드, pIC504(LexA-FKBP12 융합 단백질을 엔코딩함) 또는 pIC506(LexA-(gly)6-FKBP12 융합 단백질을 엔코딩함)로 형질전환시켰다. 상기 형질전환체 L40-fkb1-2/pIC504(ICY99) 및 L40-fkb1-2/pIC506(ICY101)를, 미끼 플라스미드를 함유하는 세포를 선택하기 위한 트립토판 결여 효모 배지 상에서 유지시켰다.

10.5일-후-교미성 CD1 마우스 배아 폴리A+ RNA의 임의적-프라이밍된 합성을 사용한 표준 프로토콜에 의해 제조되고, 350bp 내지 700bp 길이의 삽입체에 대하여 크기-선택되는 pVP16내의 마우스 배아 PCR 라이브러리(pSH10.5)를 사용하여, 효모ICY99 및 ICY101을 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 효모 세포를 트립토판 및 류신 결여 배지 상에 플레이팅시켰다. 각각의 균주로부터의 대략 10^7 형질전환체를 풀링 (pooling)시키고, 완전히 혼합시켰으며, -80℃에서 50% 글리세롤 중에 분취액으로 동결 저장시켰다.

스크리닝에 앞서, 세포를 해동시키고 액상 배지 중에서 5시간 동안 성장시켰으며, 선별 배지 상에서 플레이팅시켰다. 약 1.5×10^7 ICY99/pSH10.5 세포를 약 10^6/15cm 플레이트의 플레이팅 밀도에서, (i) 트립토판, 류신 및 히스티딘을 제외한 모든 아미노산, (ii) 125ng/㎖의 라파마이신, (iii) 100ng/㎖의 색원체 기질 X-gal 및 (iv) 탄소 공급원으로서 2% 글루코오스를 함유하는 포스페이트-완충(pH7) 합성 한천 배지 상에 플레이팅시켰다. ICY101/pSH10.5 형질전환체를 스크리닝하기 위해 동일한 프로토콜을 사용하였으며, 단 15.6ng/㎖인 저농도의 라파마이신을 사용했다.

선별 배지 상에서 성장한 것과, 푸른색을 띠는 콜로니를 차후 시험을 위해 모두 취했다. 이는 성장을 위해 히스티딘을 요구하지 않고, β-갈락토시다제 리포터를 발현시키는 세포를 나타낸다. 플레이팅 후 4 내지 11일 사이에 후보 콜로니가 나타났으며, 푸른 색은 매우 밝은 것으로부터 매우 어두운 청색의 범위에 있었다. 다음 이를 하기와 같이 시험하였다.

i) 라파마이신-의존성

각 후보를, 라파마이신 125ng/㎖(ICY99/pSH10.5 후보의 경우) 또는 15.6ng/㎖(ICY101/pSH10.5 후보의 경우)을 함유하거나 라파마이신을 함유하지 않는 히스티딘 결핍 배지 상에 스트리킹했다. 라파마이신의 존재하에 성장하고, 라파마이신이 없는 배지 상에서는 성장하지 못하는 후보 클론을 다음 시험을 위해 선택했다.

ICY99/pSH10.5 스크린에서, 스크리닝된 107개 His+ 및 LacZ+ 후보 중 24개가 히스티딘 결핍 배지상 성장에 있어 라파마이신 의존적이었다. ICY101/pSH10.5 스크린에서, 스크리닝된 101개 His+ 및 LacZ+ 후보 중 20개가 라파마이신 의존적이었다.

ii) 플라스미드-연결

염색체 돌연변이에 의해 야기되는 허위 포지티브를 제거하기 위해, 각 후보를 비선별 배지(VPD)에서 성장시켜, 미끼(Trp+) 및 cDNA(Leu+) 플라스미드의 손실을 가능하게 했다. 플라스미드(Trp+ 및 Leu+)를 보유하는 것 뿐만 아니라, 미끼 플라스미드(Trp-), cDNA 플라스미드(Leu-) 또는 플라스미드(Trp- 및 Leu-) 부재의 세포를 라파마이신을 함유하고, 히스티딘이 결핍된 배지에 스트리킹시켰다. 플라스미드(Trp+ 및 Leu+)를 함유하는 유도체만이 성장하고, 다른 3개 유도체는 성장하지 못하는 후보를 차후 분석을 위해 선택했다.

ICY99/pSH10.5 스크린에서, 24개 중 23개가 시험을 통과하였다. ICY101/pSH10.5 스크린에서, 20개 모두 시험을 통과했다.

iii) 대조 미끼와의 포지티브 및 네가티브 상호작용

종래의 시험이 상호작용의 요소(미끼 및 물고기 작제물) 중 하나 또는 모두가 손실된 경우에, 상호작용이 사라지는지 여부를 조사하였던 것에 반하여, 본 발명은 후보 cDNA 플라스미드(Leu-)가, 다양한 미끼를 함유하는 효모 균주로 형질전환될 경우, 상호작용을 부여할 수 있는지를 조사했다. 각 후보로부터 DNA 샘플을 제조하여, E. coli 균주 B290(트립토판 및 류신 영양 요구주)를 형질전환시키는 데에 사용했다. 효모 TRP1 및 LEU2 유전자가 세균 영양 요구주를 보충할 수 있기 때문에, 각각 미끼 플라스미드를 함유하는 B290 세포는 Trp+ 이고, 트립토판이 결핍된 배지에서 성장할 수 있고, cDNA 플라스미드를 함유하는 B290 세포는 Leu+ 이며 류신이 결핍된 배지에서 성장할 수 있었다. 플라스미드 DNA 샘플은 각각 다른 미끼를 함유했다: i) ICY99, 스크린에서 사용되는 본래의 균주, LexA::FKBP12 미끼 융합체를 함유; ii) ICY101,

LexA::$(gly)_6$::FKBP12 미끼 융합체를 함유; 및 iii) ICY102, 본 발명의 연구와 무관하고 네가티브 대조인 LexA 융합 미끼를 함유. 이상적인 후보 클론은, 라파마이신 의존적 방식으로 ICY99 및 ICY101에 His+ 및 LacZ+ 를 부여하여야 하며, ICY102에는 부여하지 않아야 한다.

ICY99/pSH10.5 스크린에 있어서, 23개의 후보 중 11개가 상기 기준을 충족시켰다. ICY101/pSH10.5 스크린에 있어서, 20개의 후보 중 10개가 상기 기준을 충족 하였다.

이러한 후보 클론의 cDNA 삽입체를, ABI 형광 서열분석 시스템을 사용하여 양 균주에서 서열분석했다. ICY99/pSH10.5 스크린으로부터의 11개의 후보 모두 및 ICY101/pSH10.5 스크린으로부터의 10개의 후보 중 4개 이상이 동일한 서열의 중복 단편을 함유했다. 14개의 클론이, 각 클론의 삽입체/벡터 경계에 의해 판단할 때 라이브러리로부터 5개 이상의 독립적 클로닝 이벤트를 나타낸다. 가장 긴 삽입체 및 가장 짧은 삽입체의 차이는 아미노-말단에서 대략 70bp이고, 아미노-말단에서 약 10bp이었다. 마우스 라파마이신/FKBP12 결합 단백질(RAPT1)으로부터 분리된, 일부 누클레오티드 서열 및 이에 상응하는 아미노산 서열을 각각 서열번호 1 및 서열번호 2에 제시하였다.

프로그램 BLAST를 사용한 GenBank 데이터베이스의 연구는, 상기 서열에 의해 엔코딩된 펩티드가, 60% 미만의 절대 상동성일지라도, 종래에 효모로부터 분리된 *S. cerevisia* TOR1 (및 DRR1) 및 TOR2 유전자 생성물에 일부 상동성을 공유함을 제시하였다.

실시예 4

라파마이신 표적 유전자의 사람 동족체의 클로닝

마우스 라이브러리로부터 라파마이신-표적-단백질을 엔코딩하는 유전자의 일부 서열을 분리함으로써, 본 발명자들은 프로브로서 상기 마우스 서열을 사용하여 사람 유전자의 분리를 진행하였다. RAPT1 클론의 가장 긴 삽입체를 함유하는 플라스미드 클론 pIC99.1.5를 하이브리드화를 위한 프로브로서 선택했다. 상기 삽입체(500 bp)를, Not I 제한 엔도누클레아제로 분해시키고, 아가로오스 겔 전기 영동 및 단편 정제를 수행함으로써, 플라스미드 DNA로부터 분리시켰다. 상기 단편을, DNA 중합 효소의 클레노우(Klenow) 단편과 임의 혼입하여, αP^{32}-표지된 dCTP로 방사성 표지시켰다. 상기 방사성 표지된 DNA 프로브를 G50 컬럼에 의해 유리 누클레오티드로부터 분리시키고, 알칼리-변성시켰으며, 2×10^6cpm/㎖에서 하이브리드화 혼합물에 첨가시켰다.

λ-pACT(도 1)에서 사람 B 세포 cDNA 라이브러리의 약 3×10^6 파아지를, 50℃에서, 30% 포름아미드, 5XSSC, 5X Denhardts, 20㎍/㎖ 변성된 연어 정자 DNA 및 1% SDS 중에서, 상기 기술된 프로브를 사용한 필터 하이브리드화로 스크리닝시켰다. 이는 마우스-대-사람 교차-종 하이브리드화에 적당한 배지 엄격 조건을 나타냈다. 많은 포지티브 플라크가 수득되고 이중 수개를 분석하였다. 많은 분리된 클론은 동일한 유전자 또는 매우 밀접하게 관련된 유전자(서열 분석 후, 사람 RAPT1 유전자로 조사됨)의 다양한 3' 단편으로 판명되었다. 가장 긴 코딩 서열을 함유하는 클론을 플라스미드 pIC524로 명명하였으며, 상기 pIC524는 전장 단백질의 약 절반(C-말단)으로 여겨지고, FKBP/라파마이신 결합 부위 및 추정 PI-키나제 활성을 포함하였다. pIC524의 pACT 플라스미드 형의 기탁은 부다페스트 조약 하에 1994년 5월 27일에 American Type Culture Collection (Rockville, MD)로 이루어졌다. ATCC 수탁 번호 제75787호로 지정되었다.

도 1은 pIC524의 사람 RAPT1 클론(XhoI 부위에서 삽입)의 지도이다. 상기 삽입체는 약 3.74kb이고, 상기 삽입체로부터 누클레오티드 RAPT1 코딩 서열을 수득하였고, 이는 서열번호 11의 누클레오티드 잔기 4717-7746으로 제시하였다. 상응하는 아미노산 서열은 서열번호 12의 잔기 His1541-Trp2549로 제시하였다. 마우스 RAPT1 단편에 상응하는 사람 RAPT1 클론의 영역은 누클레오티드 수준에서 90% 상동이고, 아미노산 수준에서 95% 이상 상동이었다. pIC524 클론 이외에 추가의 사람 RAPT1 유전자의 5' 서열을 중복 클론으로부터 서열번호 11에 제시된 ~5.4kb 일부 유전자의 3' 말단의 추가 서열과 함께 수득하였다. 또한, 서열번호 19가 RAPT1 코딩 서열을 플랭킹하는 추가의 3' 비-코딩 서열(다른 클론으로부터 수득)을 제공했다.

본 발명의 서열 정보가 주어지면, PCR 프라이머가 pIC524에서 제공되는 RAPT1 유전자 서열의 일부 단편 또는 모두를 증폭시키도록 디자인될 수 있음이 당 업자에게는 분명할 것이다. 예를 들어, 프라이머 TGAAGATACCCCACCAAACCC(서열번호 21) 및 TGCACAGTTGAAGTGAAC(서열번호 22)는 XhoI 부위를 플랭킹하는 pACT 서열에 상응하며, pIC524로부터의 전체 RAPT1 서열을 PCR 증폭시키는 데에 사용될 수 있다. 대안적으로, 서열번호 11의 핵산 서열을 기초로 하는 프라이머가 pIC524에서 RAPT1 유전자의 단편을 증폭시키는 데에 사용될 수 있다. 상기 PCR 프라이머는 결과적으로 발

현 벡터로 서브-클로닝되고, 목적 RAPT1 단백질의 재조합 형태를 제조하는 데에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 ATCC 수탁번호 제75787호로부터의 RAPT1 누클레오티드 서열을 포함하는 재조합 유전자에 의해 엔코딩된 재조합 RAPT1 단백질을 제공한다. 더욱이, 공지된 서열을 기초로 하는 PCR 프라이머를 간단히 제공함으로써, 서열분석되지 않은 pIC524의 일부를 포함하는 프라이머/프로브가 제조될 수 있음이 분명하다.

또한, 본 발명자들의 예비 데이터는 예를 들어 RAPT1 동족체와 같은 RAPT1과 관련된 기타 단백질이 본 발명의 검정으로부터 수득되며, RAPT1이 관련된 단백질의 보다 큰 패밀리의 일원임을 제시했다.

실시예 5

신규한 사람 유비퀴틴 결합 효소의 클로닝

약제-의존적 상호작용 트랩 검정에 대해 상기한 것과 유사한 구성체를 pGADGH(XhoI 삽입체, Clonetech)에서 W138(혼합 G_0 및 분리된 섬유아세포) cDNA 라이브러리(Clonetech, Palo Alto CA)를 스크리닝하기 위해 사용하였다. 요약하면, FKB1 유전자가 분열(disruption)된 HF7C 효모 세포(Clonetech)에서, LexA 대신에 GAL4 작제물을 사용하여, 2개의 하이브리드 검정을 상기와 같이 수행하였다(실시예 1 참조). 분리된 클론 중, 신규한 사람 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소(rap-UBC)를 확인하였다. pGADCH 플라스미드(클론 "SMR4-15")를 부다페스트 조약하에 1994년 5월 27일에 American Type Culture Collection (Rovkville, MD) 기탁하였고, ATCC 수탁번호 제75786호로 지정되었다. 삽입체는 약 1kB이었다.

SMR4-15 삽입체의 서열 UBC-엔코딩 부분은 서열번호 23(누클레오티드) 및 서열번호 24(아미노산)으로 제시하였다. 상기 클론의 3' 부분의 서열은 서열번호 25로 제공하였다. 상기한 바와 같이, 서열번호 23(및 25)의 핵산 서열을 기초로 하는 프라이머를 SMR4-15로부터 rap-UBC 유전자의 단편을 증폭하는데 사용하였다. 다음, 발현 벡터로 PCR 프라이머를 서브-클로닝시키고, 목적 효소의 재조합 형태의 제조에 사용하였다. 따라서, 본 발명은 ATCC 수탁번호 제75786호로부터의 rap-UBC 누클레오티드 서열을 포함하는 재조합 유전자에 의해 엔코딩된 재조합 rap-UBC 단백질을 제공하였다.

실시예 6

세린-대-아르기린 RAPT1 돌연변이의 구성

FKBP12/라파마이신 복합체와 상호작용하는 가장 작은 mRAPT1 클론은 399bp 였으며, 이를 라파마이신 결합 도메인으로 정의하였다. RAPT1 결합 도메인은 지질 키나제 컨센서스 서열 밖에 위치하나, 직상류에 위치하는 효모 TOR1/TOR2의 영역에 상응한다. 상기 영역은 세린 잔기를 함유하며, 이는 효모 TOR1에서 돌연변이가 유발될 경우에, 라파마이신에 대한 내성을 부여하였다(Cafferkey et al. (1993 *Mol Cell Biol* 13:6012-6023). 마우스 및 사람의 RAPT1 세린-대-아르기닌 돌연변이를 올리고누클레오티드 돌연변이 유발에 의해 구성시켰다. mRAPT1 돌연변이체의 예에서, 돌연변이를 함유하는 코딩 및 비코딩 가닥 올리고누클레오티드는 GAAGAGGCAAGACGCTTGTAC(서열번호 26) 및 GTACAAGCGTCTTGCCTCTTC(서열번호 27)였다. PCR 반응을 올리고누클레오티드 GAGTTTGAGCAGATGTTTA(서열번호 28), 및 mRAPT1 삽입체의 5' 및 3', pVP16 벡터내의 서열인 M13 공통 프라이머와 함께 상기 올리고누클레오티드를 사용하여 수행했다. mRAPT1을 함유하는 pVP16을 PCR의 주형으로서 사용했다. BamHI 및 EcoRI으로 분해시킨 PCR 생성물을 pVP16에서 BamHI 및 EcoRI 부위로 클로닝시켰다. 생성된 클론을 서열분석하여 상기 클론이 세린-대-아르기닌 돌연변이를 함유하고, 그밖의 돌연변이는 함유하지 않음을 확인했다.

FKBP12/라파마이신 복합체와 상호작용하는 가장 작은 mRAPT1 클론은 RAPT1 결합 도메인으로 정의되는 399bp이었다. RAPT1 결합 도메인은 지질 키나제 컨센서스 서열밖에 위치하나, 직상류에 위치하는 효모 TOR의 영역에 상응했다. 이러한 영역은 효모 TOR1(또한 DRR1으로 언급됨)에서 돌연변이가 유발될 경우, 라파마이신에 대한 내성을 부여하는 세린 잔기를 함유했다(Cafferkey et al. (1993) *Mol Cell Biol* 13:6012-6023; Helliwell et al. (1994) *Mol. Cell Biol.* 5:105-118). 상응하는 돌연변이는 mRAPT1에서 구성했다. 세린-대-아르기닌 돌연변이는 2-하이브리드 검정에서 HIS3 및 lacZ 발현을 활성화시키지 않는 FKBP12/라파마이신 복합체와 mRAPT1의 상호작용을 폐지시키고(도 3 참조), 이는 세린이 mRAPT1과 FKBP12/라파마이신 복합체의 결합에 관여함을 시사했다.

실시예 7

노던 분석

복합 조직 노던 블롯(사람 RNA 2㎍/레인 함유)을 클론테크 랩스., 인크(Clonetech Labs., Inc)로부터 입수하였다. 5X SSPE, 5X 덴하르트, 30% 포름아미드, 1% SDS 및 200㎍/㎖ 변성된 연어 정자 DNA 중에 42℃에서 하이브리드화시켰다. 55℃ 하에 0.1XSSC 및 0.1% SDS로 세척하였다. 방사선 자동 사진법 전에 상기 블롯을 5일 동안 노출시켰다. 각 레인에 로딩되는 RNA의 양을 동일한 블롯과 사람 G3PDH 프로브를 하이브리드화시킴으로써 독립적으로 검사하였으며, 상기 로딩된 양은 시그널을 대략 2-3배 가지는 골격 근육을 제외하고 모든 레인에서 비슷한 것으로 나타났다.

RAPT1은 시험되는 모든 조직내에 존재하였고(고환에서 가장 높은 수준을 나타내었다) 약 9kb의 단일 전사체를 지정했다. 상기 전사체는, 284kDa인 효모 TOR의 크기와 동등한 단백질을 엔코딩하기에 충분하다. RAPT1의 크기가 유사하다고 가정하면, 커다란 단백질로부터 클론된 133 아미노산의 작은 단편이나, 상기 단편은 FKBP12/라파마이신 복합체에 결합하기에 충분했다.

실시예 8

신규한 라파마이신 유사체를 확인하기 위한 2-하이브리드 시스템을 기초로 하는 고출력 검정

2-하이브리드 시스템을 기초로 하는 고출력 스크린을 개발하기 위해, 본 발명자들은 작은 분자에 의해 매개되는 단백질-단백질 상호작용을 계측하는 공정을 고안하였다. 2-하이브리드 시스템내의 단백질-단백질 상호작용이 lacZ 리포터 유전자의 전사를 자극하기 때문에, 상기 검정은 분해될 경우에 측정될 수 있는 화학 발광 시그널을 제공하는 β-갈락토시다제의 기질(*lacZ* 유전자 생성물)을 사용하였다. 상기 검정을 마이크로역가 플레이트에서 수행할 수 있으며, 이는 1주마다 수천개의 화합물의 스크리닝을 가능하게 한다. 상기 검정은 하기 단계를 포함했다:

1. 단일 롤로니로부터의 효모 세포를 류신 및 트립토판이 결핍된 50㎖ 합성 완전 배지, 성장 배지에 접종시키고, 상기 플라스크를 하룻밤 동안 30℃에서 진탕(~200rpm) 중에 인큐베이션시켰다.

2. 하룻밤 동안의 배양액을 성장 배지 중에서 0.02 최종 A_{600}로 희석시키고, 단계 1에서 기술된 것과 같이 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다.

3. 제2의 하룻밤 동안의 배양액을 성장 배지 중에서 0.5의 최종 A_{600}로 희석시켰다. Quadra 96 피페터(TomTec, Inc.)를 사용하여, 다양한 농도의 시험 화합물 15㎕/웰을 예비-로딩시킨 둥근 바닥 마이크로역가 플레이트의 웰내로 세포 현탁액의 135㎕ 분취액을 분배시켰다. 상기 화합물을 5% 디메틸 설폭사이드중에 용해시켜, 세포에 첨가되는 최종 DMSO 농도가 0.5%가 되도록 했으며, 이는 효모 세포 성장을 혼란시키지 않았다. 마이크로역가 플레이트를 덮고, 300rpm으로 진탕하면서 30℃에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다.

4. 2000rpm에서 10분 동안 마이크로역가 플레이트를 원심분리시켰다. Quadra 96 피페터로 상층액을 제거하고, 225㎕ 인산 완충 식염수로 세척하였다.

5. 각 웰내에 용균 작용 완충액(100 mM_2HPO_4 pH 7.8; 0.2% 트리톤 X-100; 1.0mM 디티오트리오톨) 100㎕를 분배시키고, 덮었으며, 300rpm으로 진탕하면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다.

6. 마이크로플루오르(Microfluor) 플레이트(Dynatech Laboratories, Chantilly, VA)의 각각의 웰내로 희석제(100mM Na_2HPO_4, 1mM $MgCl_2$, pH 8.0)중의 화학 발광 기질, Galacton Plus™(Tropix, Inc., Bedford, MA) 50㎕를 분배시켰다. 상기 웰에 세포 용해물 20㎕를 옮기고, 실온에서 60분 동안 암실에서 인큐베이션시켰다.

7. 각 웰에 Emeral™ 촉진제 75㎕를 첨가시켰다. 플레이트를 덮고, 0.01분/웰에 대하여 Topcount 신틸레이션 계수기(Packard, Inc.)로 계수하였다.

상기한 바와 같이 단리시킨 라파마이신 표적 단백질을 다양한 FKBP와 마찬가지로 정량 검정으로 혼입시켰다. 스크린에 포함되는 FKBP는 사람 FKBP12 및 병원성 진균, FKBP13(Jin et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:6677) 및 FKBP25(Jin et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:2942; Galat et al. (1992) *Biochem.* 31:2427-2434)로부터 것이다. 다른 FKBP-표적 쌍을 함유하는 효모 균주가, FK506 유사체 및 라파마이신의 라이브러리에 대해 시험될 수 있다. 그러한 스크린으로부터 (i) 하나 이상의 FKBP 및 특이적 표적 사이의 상호작용을 매개하는 표적-특이적 화합물, (ii) 하나 이상의 표

적 및 특정 FKBP 사이의 상호작용을 매개하는 FKBP-특이적 화합물, 가장 이상적으로 (iii) 표적 및 특정 FKBP 사이의 상호작용을 매개하는 FKBP/표적-특이적 화합물을 포함하는 다양한 부류의 화합물을 얻을 수 있다. 시험 화합물에 의해 매개되고, 상기 검정에서 측정되는 단백질 상호작용은 FKBP PPIase 활성의 저해에 대한 이들의 Ki's 뿐만 아니라, 면역억제, 항균, 항증식 및 독성 프로필과 관련될 수 있다.

상기한 정량적인 화학 발광 검정을 사용하여, 라파마이신의 존재 및 부재 하에 사람 LexA-FKBP12및 VP16-RAPT1의 상호작용을 분석하였다. FKBP12 및 RAPT1 사이의 상호작용은 약제 농도의 함수로서 측정했다. 0 내지 500ng/㎖의 라파마이신의 첨가는 β-갈락토시다제 활성을 대략 1천-배 증가시켰다. 이러한 효과는 라파마이신에 대하여 특이적이었다; 동일한 농도의 FK506은 β-갈락토시다제 활성을 기본 수준에서 현저하게 증가시키지 않는다. 만약, 대조 작제물인 lexA-da가 lexA-FKBP12로 치환될 경우에, β-갈락토시다제 활성은 라파마이신 첨가의 함수로서 증가하지 않았다. 네가티브 대조에서의 B-갈락토시다제의 기본 수준은 500ng/㎖ 라파마이신을 함유하는 배지에서 성장된 FKBP12 및 RAPT1 작제물을 함유하는 효모 균주에서 검출되는 최고 수준의 0.1%이었다. 도 2에 제시된 이러한 결과는 2-하이브리드 시스템에서 작은 분자에 의해 매개되는 단백질 상호작용이, 고출력 스크리닝에서 사용될 수 있는 마이크로역가 포맷으로 측정되고, 분석될 수 있음을 제시한다. 2-하이브리드 구성에서 다양한 FKBP 및 RAPT1 단백질을 사용하여(도 3) 라파마이신-매개 상호작용을 정량 검정에서 측정했다.

실시예 9

라파마이신에 의해 매개되는 시험관내 단백질 상호작용

FK506-결합 단백질 및 RAPT1 단백질의 약제-매개 상호작용을 시험관내 전사 및 번역으로 제조하고 ^{35}S 표지시킨 RAPT1 단백질 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)에 융합된 정제 FKBP12를 사용하여 시험관내에서 분석했다. 이러한 목적을 위해 FKBP12를 pGEX(Pharmacia, Piscataway, NJ)에서 GST의 프레임에 융합시켰다. GST-FKBP12 융합 단백질을 발현시키고 대장균으로부터 정제했다(vojtek et al. (1993) Cell 74:205-214). RAPT1 코딩 서열을 포유 동물 발현 벡터인 pX내에서 CMV 및 T7 프로모터 다음으로 클로닝시켰다(Superti-Furga et al. (1991) *J. Immunol. Meths.* 151:237-244). RAPT1 서열을 T7 프로모터로부터 전사시키고, ^{35}S-메티오닌을 함유하는 반응에서 상업적으로 입수 가능한 제제(Promega, Madison, WI)를 사용하여 시험관내에서 번역시켰다. 시험관내 결합(Toyoshima et al. (1994) *Cell* 78:67-74)을 위해, 시험관내 전사/번역 반응액 5 내지 20㎕를 결합 완충액(20mM HEPES [pH7.4], 150mM NaCl, 10% 글리세롤, 0.05% NP-40) 200㎕에 첨가시켰다. 글루타티온-아가로오스 비드에 결합된 GST-FKBP12 10㎕의 첨가 후, 상기 반응액을 4℃에서 2시간 동안 교반하면서 인큐베이션시켰다. 몰 기준으로 FKBP12의 0.1 내지 10배인 다양한 농도의 약제를 반응액에 첨가시켰다. 다음, 아가로오스 비드를 침전시키고, 결합 완충액으로 4회 세척하였다. 결합 단백질을 Laemmli 샘플 완충액에서 끓임으로써 분리시키고, 4-20% 구배 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에 용해시키며, 방사성 자동사진법으로 시각화하였다. 약제를 함유하는 결합 반응물로부터 ^{35}S-표지 RAPT1 단백질의 검출은 약제의 작용으로 FKBP12에 직접 결합함을 입증하였다.

실시예 10

라파마이신 민감성 및 복합체 형성에 대한 RAPT1 돌연변이의 영향

RAPT1의 라파마이신 결합 도메인을 더욱 상세히 맵핑하기 위해서는 FKBP/라파마이신 복합체에 결합하지 못하는 돌연변이체의 단리가 필요하다. 상기 실시예에서 기술된 바와 같이, FKBP/라파마이신과의 결합은 LexA 2-하이브리드 시스템에서 시험할 수 있으며, 상기 시스템에서 FKBP12가 LexA로의 융합체로서 발현되었으며, RAPT1 단백질은 VP16 활성화 도메인으로의 융합체로서 발현되었다. 따라서, PCR-생성 임의적 돌연변이 유발을 통하여 코딩 서열에 돌연변이를 유발시킴으로써, 돌연변이 RAPT1 단백질의 라이브러리를 제조했다(Cadwell and Joyce (1992) *PCR Methods Appl* 2:28-33). PCR을 위한 5' 및 3' 올리고는, 각각 인-프레임 융합체를 생성시키는 pVP16으로의 PCR 생성물의 연속적인 클로닝을 가능하게 하는 BamHI 및 EcoRI 제한 부위를 각각 함유했다. 또한, 3' 올리고는 인 프레임 종결 코돈이 이어지는 27 bp HA 에피토프 서열을 함유했다. 상기 융합 단백질의 C-말단으로의 HA 에피토프 태그의 첨가는 돌연변이 RAPT1 단백질의 특성화를 가능하게 했다(하기 참조).

돌연변이 유발의 완료시에 EcoRI-BamHI으로 분해시킨 PCR 생성물을 pVP16에 삽입했다. 돌연변이 RAPT1 단백질의 라이브러리를 *E. coli*로 형질전환시켜 증폭시켰다. FKBP/라파마이신 복합체와 상호작용하는 RAPT1의 능력을 손상시키는 돌연변이를 확인하기 위해 돌연변이가 유발된 RAPT1 라이브러리를 LexA-FKBP 미끼 단백질을 함유하는 효모 균주로 도입시켰다. 각각의 형질전환된 세포가 전사 활성인자 VP16에 융합된 하나의 개별적 돌연변이 RAPT1를 함유한다. 라파

마이신 함유 배지에서 세포를 성장시킬 경우에, FKBP 및 야생형 RAPT1 사이의 상호작용이 일어났으며, lacZ 발현을 유도하였고, X-GAL 인디케이터 플레이트 상에서 콜로니를 푸른색으로 변색시켰다. FKBP/라파마이신 복합체 및 RAPT1 돌연변이체 사이의 상호작용이 손상된 콜로니는 밝은 푸른색 또는 흰색을 나타냈다. 2 종류의 돌연변이가 하기 표현형을 생성시켰다: FKBP/라파마이신 복합체로의 RAPT1의 결합에 작용하는 센스 돌연변이 또는 RAPT1의 트렁케이션 버전을 초래하는 넌센스 돌연변이. 2가지 유형의 돌연변이를 구별하기 위해, 이러한 콜로니로부터 제조된 총 단백질 추출물을 항-HA 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석에 배치시켰다. 보다 더 짧은 트렁케이션된 단백질을 야기하는 넌센스 돌연변이는 C-말단에서 HA 에피토프를 함유하지 않으며, 따라서 항-HA 항체에 의해 검출되지 않았다. 반대로, 혼입된 센스 돌연변이를 가지는 전장 단백질은 상기 항체로 검출되었다.

HA 에피토프를 가지는 전장 RAPT1 단백질을 발현시키는 밝은 청색 또는 흰색의 콜로니로부터의 라이브러리 플라스미드를 대장균으로 다시 형질전환시켜 레스큐했다. 돌연변이의 위치를 서열 분석으로 측정하고, LexA-FKBP12를 함유하는 효모 균주로 상기 플라스미드를 다시 형질전환시켜 그 표현형을 확인했다.

또한, 재시험되는 돌연변이는 포유 동물 발현 벡터, pX로 클로닝했다. 다음, pX-RAPT1 또는 RAPT1 서열 부재의 pX를, 라파마이신에 민감한 비림프 세포(MG63 및 RH30) 및 림프 세포(CTLL 및 Kit225)로 도입시켰다. 라파마이신 민감도에 대한 돌연변이의 영향을 BrdU 혼입에 의해 모니터링되는 DNA 합성의 저해로 측정했다. FKBP12/라파마이신 복합체와의 결합 불가로 인해 라파마이신의 내성을 부여하는 돌연변이체는 어떤 돌연변이가 림프 및 비림프 세포에서 약제 민감성을 매개하는가를 제시했다. 다른 RAPT1이 다른 세포 유형에서 약제 민감성을 매개하는지는 매우 흥미로운 것이다.

실시예 11

칸디다 알비칸스로부터의 RAPT1류 폴리펩티드의 클로닝

사람 병원체 칸디다로부터 RAPT1 유전자의 동족체를 클로닝시키기 위해, RATP1 및 TOR 단백질의 보존 영역을 기초로 하는 축퇴 올리고누클레오티드를 디자인하고, λZAP(균주 3153A)에서 칸디다 알비칸스 cDNA를 증폭시키는 데에 사용했다. 증폭은 PCR 프라이머 GGNAARGCNCAYCCNCARGC 및 ATNGCNGGRTAYTGYTGDATNTC로, 94℃에서 1 분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분의 30 싸이클로 이루어졌다. 상기 PCR 반응액을 꽤 큰 단편을 확인시키는 2.5% 낮은 용융 아가로오스 겔 상에서 분리시켰다. 상기 단편을 용리시키고, pCRII(TA 클로닝 시스템, Invitrogen corporation)으로 클로닝시켰다.

칸디다 알비칸스 DNA 프로브를 닉(nick) 번역에 의해 ^{32}P-표지시키고, 서던 블롯을 사용하여 단편의 종 동일성을 확인하였으며, 칸디다 알비칸스 cDNA 라이브러리를 추가로 스크리닝하였다. 보다 더 큰 cDNA의 서열분석은 클론의 동일성을 확인시켰다. 지정된 오픈-리딩 프레임을 가지는 칸디다 알비칸스 RAPT1 유사 폴리펩티드의 일부 서열을 서열번호 13 및 14으로 제공했다.

상기-언급된 참고문헌 및 출원 모두를 본원에 참고로 인용하였다.

동등물

당업자들은, 단지 일반적인 실험을 사용하여 본원에서 기술된 본 발명의 특정 구체예에 많은 동등물이 가능함을 인식할 것이다. 이러한 동등물은 하기 특허청구의 범위에 의해 포함되도록 의도된다.

산업상 이용 가능성

본 발명은, 피검자, 예를 들어 사람 환자가 바람직하지 않은 세포 증식을 특징으로 하는 질환의 가능성을 가지는 지를 측정하기 위한 방법을 제공한다.

[서열표]

(1) 일반적 사항

(i) 출원인

(A) 성명 : 미토틱스, 인코포레이티드

(B) 스트리트 : 원 켄달 스퀘어 빌딩 600

(C) 도시명 : 캠브리지

(D) 주 : 메사츄세츠

(E) 국명 : 미합중국

(F) 우편번호 (ZIP) : 02139

(G) 전화 : (617)225-0001

(H) 텔레픽스 : (617)225-0005

(ii) 발명의 명칭 : 면역억제 표적 단백질

(iii) 서열의 수 : 25개

(iv) 컴퓨터 판독형태

(A) 매체 유형 : 플로피디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환기종

(C) 작업 시스템 : PC-DOS / MS-DOS

(D) 소프트웨어 : ASCII (text)

(vi) 현재 출원상황 :

(A) 출원번호 : US 08/250,795

(B) 출원일 : 27-5-1994

(vii) 우선출원 상황 :

(A) 출원번호 : US 08/250,795

(B) 출원일 : 20-12-1994

(2) 서열번호 1에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 486 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 양형태

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 1. .486

(xi) : 서열 : 서열번호 1 :

```
CTC ACC CGT CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATC TTG AAG AAC ATG TGT GAA        48
Leu Thr Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu
  1               5                  10                  15

CAC AGC AAC ACG CTG GTC CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGT GAA GAG CTG        96
His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
            20                  25                  30

ATT CGG GTA GCC ATC CTC TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG GAA       144
Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
         35                  40                  45

GAG GCA TCT CGC TTG TAC TTT GGG GAG AGG AAC GTG AAA GGC ATG TTT       192
Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
     50                  55                  60

GAG GTG CTG GAG CCC CTG CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGT CCC CGG ACT       240
Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Arg Thr
 65                  70                  75                  80

CTG AAG GAA ACA TCC TTT AAT CAG GCA TAT GGC CGA GAT TTA ATG GAG       288
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
                85                  90                  95

GCA CAA GAA TGG TGT CGA AAG TAC ATG AAG TCG GGG AAC GTC AAG GAC       336
Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
            100                 105                 110

CTC ACG CAA GCC TGG GAC CTC TAC TAT CAC GTG TTC AGA CGG ATC TCA       384
Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
        115                 120                 125

AAG CAG CTA CCC CAG CTC ACA TCC CTG GAG CTG CAG TAT GTG TCC CCC       432
Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
    130                 135                 140

AAA CTT CTG ATG TGC CGA GAC CTT GAG TTG GCT GTG CCA GGA ACA TAC       480
Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
145                 150                 155                 160

GAC CCC                                                              486
Asp Pro
```

(2) 서열번호 2에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 162 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 2 :

```
Leu Thr Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu
  1               5                  10                  15

His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
             20                  25                  30

Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
         35                  40                  45

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
     50                  55                  60

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Arg Thr
 65                  70                  75                  80
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
                 85                  90                  95
 Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
            100                 105                 110

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
        115                 120                 125

Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
    130                 135                 140

Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
145                 150                 155                 160
Asp Pro
```

(2) 서열번호 3에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 40 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 3 :

```
GGGTTTGGAA TTCCTAATAA TGTCTGTACA AGTAGAAACC                          40
```

(2) 서열번호 4에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 34 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 4 :

```
GGGTTTCGGG ATCCCGTCAT TCCAGTTTTA CAAC                                  34
```

(2) 서열번호 5에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 348 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 14. .325

(xi) : 서열 : 서열번호 5 :

```
GGAATTCCTA ATA ATG TCC GTA CAA GTA GAA ACC ATC TCC CCA GGA GAC          49
               Met Ser Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp
                 1               5                  10

GGG CGC ACC TTC CCC AAG CGC GGC CAG ACC TGC GTG GTG CAC TAC ACC         97
Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr
         15                  20                  25

GGG ATG CTT GAA GAT GGA AAG AAA TTT GAT TCC TCC CGT GAC CGT AAC        145
Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn
     30                  35                  40

AAG CCC TTT AAG TTT ATG CTA GGC AAG CAG GAG GTG ATC CGA GGC TGG        193
Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp
 45                  50                  55                  60

GAA GAA GGG GTT GCC CAG ATG AGT GTG GGT CAG CGT GCC AAA CTG ACT        241
Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr
                 65                  70                  75

ATA TCT CCA GAT TAT GCC TAT GGT GCC ACT GGG CAC CCA GGC ATC ATC        289
Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile
             80                  85                  90

CCA CCA CAT GCC ACT CTC GTC TTC GAT GTG GAG CTT CTAAAACTGG             335
Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
         95                  100

AATGACGGGA TCC                                                        348
```

(2) 서열번호 6에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 104 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 6 :

```
Met Ser Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
 1               5                  10                  15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
        35                  40                  45

Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val
    50                  55                  60

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
                85                  90                  95

Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu
            100
```

(2) 서열번호 7에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 48 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 7 :

```
TCGCGGAAT TCGGGGGCGG AGGTGGAGGA GTACAAGTAG AAACCATC                48
```

(2) 서열번호 8에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 34 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 8 :

GGGTTTCGGG ATCCCGTCAT TCCAGTTTTA GAAG 34

(2) 서열번호 9에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 41 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 9 :

CGCGGATCCG CGCATTATTA CTTGTTTTGA TTGATTTTTT G 41

(2) 서열번호 10에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 40 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 10 :

CGCGGATCCG CGTAAAAGCA AAGTACTATC AATTGAGCCG 40

(2) 서열번호 11에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 7824 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 양형태

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 97. .7743

(xi) : 서열 : 서열번호 11 :

```
AAGGCGGGCG GTGGGGCACG GGGCCTGAAG CGGCGGTACC GGTGCTGGCG GCGGCAGCTG      60

AGGCCTTGGC CGAAGCCGCG CGAACCTCAG GGCAAG ATG CTT GGA ACC GGA CCT      114
                                        Met Leu Gly Thr Gly Pro
                                          1               5

GCC GCC GCC ACC ACC GCT GCC ACC ACA TCT AGC AAT GTG AGC GTC CTG      162
Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ser Ser Asn Val Ser Val Leu
            10                  15                  20

CAG CAG TTT GCC AGT GGC CTA AAG AGC CGG AAT GAG GAA ACC AGG GCC      210
Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser Arg Asn Glu Glu Thr Arg Ala
        25                  30                  35

AAA GCC GCC AAG GAG CTC CAG CAC TAT GTC ACC ATG GAA CTC CGA GAG      258
Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr Val Thr Met Glu Leu Arg Glu
    40                  45                  50

ATG AGT CAA GAG GAG TCT ACT CGC TTC TAT GAC CAA CTG AAC CAT CAC      306
Met Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe Tyr Asp Gln Leu Asn His His
55                  60                  65                  70

ATT TTT GAA TTG GTT TCC AGC TCA GAT GCC AAT GAG AGG AAA GGT GGC      354
Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp Ala Asn Glu Arg Lys Gly Gly
                75                  80                  85

ATC TTG GCC ATA GCT AGC CTC ATA GGA GTG GAA GGT GGG AAT GCC ACC      402
Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly Asn Ala Thr
            90                  95                  100

CGA ATT GGC AGA TTT GCC AAC TAT CTT CGG AAC CTC CTC CCC TCC AAT      450
Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg Asn Leu Leu Pro Ser Asn
        105                 110                 115

GAC CCA GTT GTC ATG GAA ATG GCA TCC AAG GCC ATT GGC CGT CTT GCC      498
Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys Ala Ile Gly Arg Leu Ala
    120                 125                 130

ATG GCA GGG GAC ACT TTT ACC GCT GAG TAC GTG GAA TTT GAG GTG AAG      546
Met Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Val Glu Phe Glu Val Lys
135                 140                 145                 150

CGA GCC CTG GAA TGG CTG GGT GCT GAC CGC AAT GAG GGC CGG AGA CAT      594
Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp Arg Asn Glu Gly Arg Arg His
                155                 160                 165

GCA GCT GTC CTG GTT CTC CGT GAG CTG GCC ATC AGC GTC CCT ACC TTC      642
Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu Ala Ile Ser Val Pro Thr Phe
            170                 175                 180

TTC TTC CAG CAA GTG CAA CCC TTC TTT GAC AAC ATT TTT GTG GCC GTG      690
Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe Asp Asn Ile Phe Val Ala Val
        185                 190                 195

TGG GAC CCC AAA CAG GCC ATC CGT GAG GGA GCT GTA GCC GCC CTT CGT      738
Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly Ala Val Ala Ala Leu Arg
    200                 205                 210

GCC TGT CTG ATT CTC ACA ACC CAG CGT GAG CCG AAG GAG ATG CAG AAG      786
Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu Pro Lys Glu Met Gln Lys
215                 220                 225                 230

CCT CAG TGG TAC AGG CAC ACA TTT GAA GAA GCA GAG AAG GGA TTT GAT      834
Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu Ala Glu Lys Gly Phe Asp
                235                 240                 245

GAG ACC TTG GCC AAA GAG AAG GGC ATG AAT CGG GAT GAT CGG ATC CAT      882
Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn Arg Asp Asp Arg Ile His
            250                 255                 260
```

```
GGA GCC TTG TTG ATC CTT AAC GAG CTG GTC CGA ATC AGC AGC ATG GAG       930
Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val Arg Ile Ser Ser Met Glu
        265                 270                 275

GGA GAG CGT CTG AGA GAA GAA ATG GAA GAA ATC ACA CAG CAG CAG CTG       978
Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu Ile Thr Gln Gln Gln Leu
    280                 285                 290

GTA CAC GAC AAG TAC TGC AAA GAT CTC ATG GGC TTC GGA ACA AAA CCT      1026
Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met Gly Phe Gly Thr Lys Pro
295                 300                 305                 310

CGT CAC ATT ACC CCC TTC ACC AGT TTC CAG GCT GTA CAG CCC CAG CAG      1074
Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln Ala Val Gln Pro Gln Gln
                315                 320                 325

TCA AAT GCC TTG GTG GGG CTG CTG GGG TAC AGC TCT CAC CAA GGC CTC      1122
Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr Ser Ser His Gln Gly Leu
            330                 335                 340

ATG GGA TTT GGG ACC TCC CCC AGT CCA GCT AAG TCC ACC CTG GTG GAG      1170
Met Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro Ala Lys Ser Thr Leu Val Glu
        345                 350                 355

AGC CGG TGT TGC AGA GAC TTG ATG GAG GAG AAA TTT GAT CAG GTG TGC      1218
Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu Met Glu Glu Lys Phe Asp Gln Val Cys
    360                 365                 370

CAG TGG GTG CTG AAA TGC AGG AAT AGC AAG AAC TCG CTG ATC CAA ATG      1266
Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser Lys Asn Ser Leu Ile Gln Met
375                 380                 385                 390

ACA ATC CTT AAT TTG TTG CCC CGC TTG GCT GCA TTC CGA CCT TCT GCC      1314
Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Arg Leu Ala Ala Phe Arg Pro Ser Ala
                395                 400                 405

TTC ACA GAT ACC CAG TAT CTC CAA GAT ACC ATG AAC CAT GTC CTA AGC      1362
Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp Thr Met Asn His Val Leu Ser
            410                 415                 420

TGT GTC AAG AAG GAG AAG GAA CGT ACA GCG GCC TTC CAA GCC CTG GGG      1410
Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr Ala Ala Phe Gln Ala Leu Gly
        425                 430                 435

CTA CTT TCT GTG GCT GTG AGG TCT GAG TTT AAG GTC TAT TTG CCT CGC      1458
Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu Phe Lys Val Tyr Leu Pro Arg
    440                 445                 450

GTG CTG GAC ATC ATC CGA GCG GCC CTG CCC CCA AAG GAC TTC GCC CAT      1506
Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu Pro Pro Lys Asp Phe Ala His
455                 460                 465                 470

AAG AGG CAG AAG GCA ATG CAG GTG GAC GCC ACA GTC TTC ACT TGC ATC      1554
Lys Arg Gln Lys Ala Met Gln Val Asp Ala Thr Val Phe Thr Cys Ile
                475                 480                 485

AGC ATG CTG GCT CGA GCA ATG GGG CCA GGC ATC CAG CAG GAT ATC AAG      1602
Ser Met Leu Ala Arg Ala Met Gly Pro Gly Ile Gln Gln Asp Ile Lys
```

```
            490                 495                 500

GAG CTG CTG GAG CCC ATG CTG GCA GTG GGA CTA AGC CCT GCC CTC ACT      1650
Glu Leu Leu Glu Pro Met Leu Ala Val Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr
        505                 510                 515

GCA GTG CTC TAC GAC CTG AGC CGT CAG ATT CCA CAG CTA AAG AAG GAC      1698
Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln Ile Pro Gln Leu Lys Lys Asp
    520                 525                 530

ATT CAA GAT GGG CTA CTG AAA ATG CTG TCC CTG GTC CTT ATG CAC AAA      1746
Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys Met Leu Ser Leu Val Leu Met His Lys
535                 540                 545                 550

CCC CTT CGC CAC CCA GGC ATG CCC AAG GGC CTG GCC CAT CAG CTG GCC      1794
Pro Leu Arg His Pro Gly Met Pro Lys Gly Leu Ala His Gln Leu Ala
                555                 560                 565

TCT CCT GGC CTC ACG ACC CTC CCT GAG GCC AGC GAT GTG GGC AGC ATC      1842
Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala Ser Asp Val Gly Ser Ile
            570                 575                 580

ACT CTT GCC CTC CGA ACG CTT GGC AGC TTT GAA TTT GAA GGC CAC TCT      1890
Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe Glu Phe Glu Gly His Ser
        585                 590                 595

CTG ACC CAA TTT GTT CGC CAC TGT GCG GAT CAT TTC CTG AAC AGT GAG      1938
Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp His Phe Leu Asn Ser Glu
    600                 605                 610

CAC AAG GAG ATC CGC ATG GAG GCT GCC CGC ACC TGC TCC CGC CTG CTC      1986
His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg Thr Cys Ser Arg Leu Leu
615                 620                 625                 630

ACA CCC TCC ATC CAC CTC ATC AGT GGC CAT GCT CAT GTG GTT AGC CAG      2034
Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His Ala His Val Val Ser Gln
                635                 640                 645

ACC GCA GTG CAA GTG GTG GCA GAT GTG CTT AGC AAA CTG CTC GTA GTT      2082
Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu Ser Lys Leu Leu Val Val
            650                 655                 660

GGG ATA ACA GAT CCT GAC CCT GAC ATT CGC TAC TGT GTC TTG GCG TCC      2130
Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg Tyr Cys Val Leu Ala Ser
        665                 670                 675

CTG GAC GAG CGC TTT GAT GCA CAC CTG GCC CAG GCG GAG AAC TTG CAG      2178
Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala Gln Ala Glu Asn Leu Gln
    680                 685                 690

GCC TTG TTT GTG GCT CTG AAT GAC CAG GTG TTT GAG ATC CGG GAG CTG      2226
Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val Phe Glu Ile Arg Glu Leu
695                 700                 705                 710

GCC ATC TGC ACT GTG GGC CGA CTC AGT AGC ATG AAC CCT GCC TTT GTC      2274
Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser Met Asn Pro Ala Phe Val
                715                 720                 725
```

```
ATG CCT TTC CTG CGC AAG ATG CTC ATC CAG ATT TTG ACA GAG TTG GAG      2322
Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln Ile Leu Thr Glu Leu Glu
            730                 735                 740

CAC AGT GGG ATT GGA AGA ATC AAA GAG CAG AGT GCC CGC ATG CTG GGG      2370
His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln Ser Ala Arg Met Leu Gly
        745                 750                 755

CAC CTG GTC TCC AAT GCC CCC CGA CTC ATC CGC CCC TAC ATG GAG CCT      2418
His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile Arg Pro Tyr Met Glu Pro
    760                 765                 770

ATT CTG AAG GCA TTA ATT TTG AAA CTG AAA GAT CCA GAC CCT GAT CCA      2466
Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys Asp Pro Asp Pro Asp Pro
775                 780                 785                 790

AAC CCA GGT GTG ATC AAT AAT GTC CTG GCA ACA ATA GGA GAA TTG GCA      2514
Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala Thr Ile Gly Glu Leu Ala
                795                 800                 805

CAG GTT AGT GGC CTG GAA ATG AGG AAA TGG GTT GAT GAA CTT TTT ATT      2562
Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp Val Asp Glu Leu Phe Ile
            810                 815                 820

ATC ATC ATG GAC ATG CTC CAG GAT TCC TCT TTG TTG GCC AAA AGG CAG      2610
Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Lys Arg Gln
        825                 830                 835

GTG GCT CTG TGG ACC CTG GGA CAG TTG GTG GCC AGC ACT GGC TAT GTA      2658
Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val Ala Ser Thr Gly Tyr Val
    840                 845                 850

GTA GAG CCC TAC AGG AAG TAC CCT ACT TTG CTT GAG GTG CTA CTG AAT      2706
Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu Leu Glu Val Leu Leu Asn
855                 860                 865                 870

TTT CTG AAG ACT GAG CAG AAC CAG GGT ACA CGC AGA GAG GCC ATC CGT      2754
Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr Arg Arg Glu Ala Ile Arg
                875                 880                 885

GTG TTA GGG CTT TTA GGG GCT TTG GAT CCT TAC AAG CAC AAA GTG AAC      2802
Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro Tyr Lys His Lys Val Asn
            890                 895                 900

ATT GGC ATG ATA GAC CAG TCC CGG GAT GCC TCT GCT GTC AGC CTG TCA      2850
Ile Gly Met Ile Asp Gln Ser Arg Asp Ala Ser Ala Val Ser Leu Ser
        905                 910                 915

GAA TCC AAG TCA AGT CAG GAT TCC TCT GAC TAT AGC ACT AGT GAA ATG      2898
Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp Tyr Ser Thr Ser Glu Met
    920                 925                 930

CTG GTC AAC ATG GGA AAC TTG CCT CTG GAT GAG TTC TAC CCA GCT GTG      2946
Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp Glu Phe Tyr Pro Ala Val
935                 940                 945                 950

TCC ATG GTG GCC CTG ATG CGG ATC TTC CGA GAC CAG TCA CTC TCT CAT      2994
Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg Asp Gln Ser Leu Ser His
```

```
                955                 960                 965

CAT CAC ACC ATG GTT GTC CAG GCC ATC ACC TTC ATC TTC AAG TCC CTG      3042
His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr Phe Ile Phe Lys Ser Leu
            970                 975                 980

GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC CTG CCC CAG GTC ATG CCC ACG TTC CTT      3090
Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln Val Met Pro Thr Phe Leu
        985                 990                 995

AAT GTC ATT CGA GTC TGT GAT GGG GCC ATC CGG GAA TTT TTG TTC CAG      3138
Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile Arg Glu Phe Leu Phe Gln
    1000                1005                1010

CAG CTG GGA ATG TTG GTG TCC TTT GTG AAG AGC CAC ATC AGA CCT TAT      3186
Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys Ser His Ile Arg Pro Tyr
1015                1020                1025                1030

ATG GAT GAA ATA GTC ACC CTC ATG AGA GAA TTC TGG GTC ATG AAC ACC      3234
Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu Phe Trp Val Met Asn Thr
                1035                1040                1045

TCA ATT CAG AGC ACG ATC ATT CTT CTC ATT GAG CAA ATT GTG GTA GCT      3282
Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile Glu Gln Ile Val Val Ala
            1050                1055                1060

CTT GGG GGT GAA TTT AAG CTC TAC CTG CCC CAG CTG ATC CCA CAC ATG      3330
Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro Gln Leu Ile Pro His Met
        1065                1070                1075

CTG CGT GTC TTC ATG CAT GAC AAC AGC CCA GGC CGC ATT GTC TCT ATC      3378
Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro Gly Arg Ile Val Ser Ile
    1080                1085                1090

AAG TTA CTG GCT GCA ATC CAG CTG TTT GGC GCC AAC CTG GAT GAC TAC      3426
Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asp Asp Tyr
1095                1100                1105                1110

CTG CAT TTA CTG CTG CCT CCT ATT GTT AAG TTG TTT GAT GCC CCT GAA      3474
Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys Leu Phe Asp Ala Pro Glu
                1115                1120                1125

GCT CCA CTG CCA TCT CGA AAG GCA GCG CTA GAG ACT GTG GAC CGC CTG      3522
Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu Glu Thr Val Asp Arg Leu
            1130                1135                1140

ACG GAG TCC CTG GAT TTC ACT GAC TAT GCC TCC CGG ATC ATT CAC CCT      3570
Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala Ser Arg Ile Ile His Pro
        1145                1150                1155

ATT GTT CGA ACA CTG GAC CAG AGC CCA GAA CTG CGC TCC ACA GCC ATG      3618
Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu Leu Arg Ser Thr Ala Met
    1160                1165                1170

GAC ACG CTG TCT TCA CTT GTT TTT CAG CTG GGG AAG AAG TAC CAA ATT      3666
Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu Gly Lys Lys Tyr Gln Ile
1175                1180                1185                1190
```

```
TTC ATT CCA ATG GTG AAT AAA GTT CTG GTG CGA CAC CGA ATC AAT CAT      3714
Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val Arg His Arg Ile Asn His
                1195                1200                1205

CAG CGC TAT GAT GTG CTC ATC TGC AGA ATT GTC AAG GGA TAC ACA CTT      3762
Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile Val Lys Gly Tyr Thr Leu
            1210                1215                1220

GCT GAT GAA GAG GAG GAT CCT TTG ATT TAC CAG CAT CGG ATG CTT AGG      3810
Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr Gln His Arg Met Leu Arg
        1225                1230                1235

AGT GGC CAA GGG GAT GCA TTG GCT AGT GGA CCA GTG GAA ACA GGA CCC      3858
Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly Pro Val Glu Thr Gly Pro
    1240                1245                1250

ATG AAG AAA CTG CAC GTC AGC ACC ATC AAC CTC CAA AAG GCC TGG GGC      3906
Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn Leu Gln Lys Ala Trp Gly
1255                1260                1265                1270

GCT GCC AGG AGG GTC TCC AAA GAT GAC TGG CTG GAA TGG CTG AGA CGG      3954
Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp Leu Glu Trp Leu Arg Arg
                1275                1280                1285

CTG AGC CTG GAG CTG CTG AAG GAC TCA TCA TCG CCC TCC CTG CGC TCC      4002
Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser Ser Pro Ser Leu Arg Ser
            1290                1295                1300

TGC TGG GCC CTG GCA CAG GCC TAC AAC CCG ATG GCC AGG GAT CTC TTC      4050
Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro Met Ala Arg Asp Leu Phe
        1305                1310                1315

AAT GCT GCA TTT GTG TCC TGC TGG TCT GAA CTG AAT GAA GAT CAA CAG      4098
Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu Leu Asn Glu Asp Gln Gln
    1320                1325                1330

GAT GAG CTC ATC AGA AGC ATC GAG TTG GCC CTC ACC TCA CAA GAC ATC      4146
Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala Leu Thr Ser Gln Asp Ile
1335                1340                1345                1350

GCT GAA GTC ACA CAG ACC CTC TTA AAC TTG GCT GAA TTC ATG GAA CAC      4194
Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu Ala Glu Phe Met Glu His
                1355                1360                1365

AGT GAC AAG GGC CCC CTG CCA CTG AGA GAT GAC AAT GGC ATT GTT CTG      4242
Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp Asp Asn Gly Ile Val Leu
            1370                1375                1380

CTG GGT GAG AGA GCT GCC AAG TGC CGA GCA TAT GCC AAA GCA CTA CAC      4290
Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala Tyr Ala Lys Ala Leu His
        1385                1390                1395

TAC AAA GAA CTG GAG TTC CAG AAA GGC CCC ACC CCT GCC ATT CTA GAA      4338
Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro Thr Pro Ala Ile Leu Glu
    1400                1405                1410

TCT CTC ATC AGC ATT AAT AAT AAG CTA CAG CAG CCG GAG GCA GCG GCC      4386
Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln Gln Pro Glu Ala Ala Ala
```

```
1415                1420                1425                1430

GGA GTG TTA GAA TAT GCC ATG AAA CAC TTT GGA GAG CTG GAG ATC CAG      4434
Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe Gly Glu Leu Glu Ile Gln
                1435                1440                1445

GCT ACC TGG TAT GAG AAA CTG CAC GAG TGG GAG GAT GCC CTT GTG GCC      4482
Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp Glu Asp Ala Leu Val Ala
            1450                1455                1460

TAT GAC AAG AAA ATG GAC ACC AAC AAG GAC GAC CCA GAG CTG ATG CTG      4530
Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp Asp Pro Glu Leu Met Leu
        1465                1470                1475

GGC CGC ATG CGC TGC CTC GAG GCC TTG GGG GAA TGG GGT CAA CTC CAC      4578
Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly Glu Trp Gly Gln Leu His
    1480                1485                1490

CAG CAG TGC TGT GAA AAG TGG ACC CTG GTT AAT GAT GAG ACC CAA GCC      4626
Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val Asn Asp Glu Thr Gln Ala
1495                1500                1505                1510

AAG ATG GCC CGG ATG GCT GCT GCA GCT GCA TGG GGT TTA GGT CAG TGG      4674
Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala Trp Gly Leu Gly Gln Trp
                1515                1520                1525

GAC AGC ATG GAA GAA TAC ACC TGT ATG ATC CCT CGG GAC ACC CAT GAT      4722
Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile Pro Arg Asp Thr His Asp
            1530                1535                1540

GGG GCA TTT TAT AGA GCT GTG CTG GCA CTG CAT CAG GAC CTC TTC TCC      4770
Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu His Gln Asp Leu Phe Ser
        1545                1550                1555

TTG GCA CAA CAG TGC ATT GAC AAG GCC AGG GAC CTG CTG GAT GCT GAA      4818
Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Ala Glu
    1560                1565                1570

TTA ACT GCA ATG GCA GGA GAG AGT TAC AGT CGG GCA TAT GGG GCC ATG      4866
Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser Arg Ala Tyr Gly Ala Met
1575                1580                1585                1590

GTT TCT TGC CAC ATG CTG TCC GAG CTG GAG GAG GTT ATC CAG TAC AAA      4914
Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu Glu Val Ile Gln Tyr Lys
                1595                1600                1605

CTT GTC CCC GAG CGA CGA GAG ATC ATC CGC CAG ATC TGG TGG GAG AGA      4962
Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg Gln Ile Trp Trp Glu Arg
            1610                1615                1620

CTG CAG GGC TGC CAG CGT ATC GTA GAG GAC TGG CAG AAA ATC CTT ATG      5010
Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp Trp Gln Lys Ile Leu Met
        1625                1630                1635

GTG CGG TCC CTT GTG GTC AGC CCT CAT GAA GAC ATG AGA ACC TGG CTC      5058
Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu Asp Met Arg Thr Trp Leu
    1640                1645                1650
```

```
AAG TAT GCA AGC CTG TGC GGC AAG AGT GGC AGG CTG GCT CTT GCT CAT      5106
Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly Arg Leu Ala Leu Ala His
1655                1660                1665                1670

AAA ACT TTA GTG TTG CTC CTG GGA GTT GAT CCG TCT CGG CAA CTT GAC      5154
Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp Pro Ser Arg Gln Leu Asp
                1675                1680                1685

CAT CCT CTG CCA ACA GTT CAC CCT CAG GTG ACC TAT GCC TAC ATG AAA      5202
His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val Thr Tyr Ala Tyr Met Lys
            1690                1695                1700

AAC ATG TGG AAG AGT GCC CGC AAG ATC GAT GCC TTC CAG CAC ATG CAG      5250
Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp Ala Phe Gln His Met Gln
        1705                1710                1715

CAT TTT GTC CAG ACC ATG CAG CAA CAG GCC CAG CAT GCC ATC GCT ACT      5298
His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala Gln His Ala Ile Ala Thr
    1720                1725                1730

GAG GAC CAG CAG CAT AAG CAG GAA CTG CAC AAG CTC ATG GCC CGA TGC      5346
Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His Lys Leu Met Ala Arg Cys
1735                1740                1745                1750

TTC CTG AAA CTT GGA GAG TGG CAG CTG AAT CTA CAG GGC ATC AAT GAG      5394
Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn Leu Gln Gly Ile Asn Glu
                1755                1760                1765

AGC ACA ATC CCC AAA GTG CTG CAG TAC TAC AGC GCC GCC ACA GAG CAC      5442
Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Ala Thr Glu His
            1770                1775                1780

GAC CGC AGC TGG TAC AAG GCC TGG CAT GCG TGG GCA GTG ATG AAC TTC      5490
Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala Trp Ala Val Met Asn Phe
        1785                1790                1795

GAA GCT GTG CTA CAC TAC AAA CAT CAG AAC CAA GCC CGC GAT GAG AAG      5538
Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn Gln Ala Arg Asp Glu Lys
    1800                1805                1810

AAG AAA CTG CGT CAT GCC AGC GGG GCC AAC ATC ACC AAC GCC ACC ACT      5586
Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn Ile Thr Asn Ala Thr Thr
1815                1820                1825                1830

GCC GCC ACC ACG GCC GCC ACT GCC ACC ACC ACT GCC AGC ACC GAG GGC      5634
Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ser Thr Glu Gly
                1835                1840                1845

AGC AAC AGT GAG AGC GAG GCC GAG AGC ACC GAG AAC AGC CCC ACC CCA      5682
Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr Glu Asn Ser Pro Thr Pro
            1850                1855                1860

TCG CCG CTG CAG AAG AAG GTC ACT GAG GAT CTG TCC AAA ACC CTC CTG      5730
Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu
        1865                1870                1875

ATG TAC ACG GTG CCT GCC GTC CAG GGC TTC TTC CGT TCC ATC TCC TTG      5778
Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe Phe Arg Ser Ile Ser Leu
```

```
    1880                1885                1890

TCA CGA GGC AAC AAC CTC CAG GAT ACA CTC AGA GTT CTC ACC TTA TGG      5826
Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu Arg Val Leu Thr Leu Trp
1895                1900                1905                1910

TTT GAT TAT GGT CAC TGG CCA GAT GTC AAT GAG GCC TTA GTG GAG GGG      5874
Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn Glu Ala Leu Val Glu Gly
                1915                1920                1925

GTG AAA GCC ATC CAG ATT GAT ACC TGG CTA CAG GTT ATA CCT CAG CTC      5922
Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu Gln Val Ile Pro Gln Leu
            1930                1935                1940

ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC TTG GTG GGA CGT CTC ATT CAC      5970
Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu Val Gly Arg Leu Ile His
        1945                1950                1955

CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC CAC CCC CAG GCC CTC ATC TAC      6018
Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His Pro Gln Ala Leu Ile Tyr
    1960                1965                1970

CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC ACG ACA GCC CGG CAC AAT GCA      6066
Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr Thr Ala Arg His Asn Ala
1975                1980                1985                1990

GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT GAG CAC AGC AAC ACC CTG GTC      6114
Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu His Ser Asn Thr Leu Val
                1995                2000                2005

CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGC GAG GAG CTG ATC CGA GTG GCC ATC CTC      6162
Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu Ile Arg Val Ala Ile Leu
            2010                2015                2020

TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG GAA GAG GCA TCT CGT TTG TAC      6210
Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr
        2025                2030                2035

TTT GGG GAA AGG AAC GTG AAA GGC ATG TTT GAG GTG CTG GAG CCC TTG      6258
Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu
    2040                2045                2050

CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGC CCC CAG ACT CTG AAG GAA ACA TCC TTT      6306
His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe
2055                2060                2065                2070

AAT CAG GCC TAT GGT CGA GAT TTA ATG GAG GCC CAA GAG TGG TGC AGG      6354
Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg
                2075                2080                2085

AAG TAC ATG AAA TCA GGG AAT GTC AAG GAC CTC ACC CAA GCC TGG GAC      6402
Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp
            2090                2095                2100

CTC TAT TAT CAT GTG TTC CGA CGA ATC TCA AAG CAG CTG CCT CAG CTC      6450
Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu
        2105                2110                2115
```

```
ACA TCC TTA GAG CTG CAA TAT GTT TCC CCA AAA CTT CTG ATG TGC CGG      6498
Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Lys Leu Leu Met Cys Arg
    2120                2125                2130

GAC CTT GAA TTG GCT GTG CCA GGA ACA TAT GAC CCC AAC CAG CCA ATC      6546
Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Asp Pro Asn Gln Pro Ile
2135                2140                2145                2150

ATT CGC ATT CAG TCC ATA GCA CCG TCT TTG CAA GTC ATC ACA TCC AAG      6594
Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu Gln Val Ile Thr Ser Lys
                2155                2160                2165

CAG AGG CCC CGG AAA TTG ACA CTT ATG GGC AGC AAC GGA CAT GAG TTT      6642
Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly Ser Asn Gly His Glu Phe
            2170                2175                2180

GTT TTC CTT CTA AAA GGC CAT GAA GAT CTG CGC CAG GAT GAG CGT GTG      6690
Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu Arg Gln Asp Glu Arg Val
        2185                2190                2195

ATG CAG CTC TTC GGC CTG GTT AAC ACC CTT CTG GCC AAT GAC CCA ACA      6738
Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Ala Asn Asp Pro Thr
    2200                2205                2210

TCT CTT CGG AAA AAC CTC AGC ATC CAG AGA TAC GCT GTC ATC CCT TTA      6786
Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg Tyr Ala Val Ile Pro Leu
2215                2220                2225                2230

TCG ACC AAC TCG GGC CTC ATT GGC TGG GTT CCC CAC TGT GAC ACA CTG      6834
Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val Pro His Cys Asp Thr Leu
                2235                2240                2245

CAC GCC CTC ATC CGG GAC TAC AGG GAG AAG AAG AAG ATC CTT CTC AAC      6882
His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys Lys Lys Ile Leu Leu Asn
            2250                2255                2260

ATC GAG CAT CGC ATC ATG TTG CGG ATG GCT CCG GAC TAT GAC CAC TTG      6930
Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala Pro Asp Tyr Asp His Leu
        2265                2270                2275

ACT CTG ATG CAG AAG GTG GAG GTG TTT GAG CAT GCC GTC AAT AAT ACA      6978
Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu His Ala Val Asn Asn Thr
    2280                2285                2290

GCT GGG GAC GAC CTG GCC AAG CTG CTG TGG CTG AAA AGC CCC AGC TCC      7026
Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp Leu Lys Ser Pro Ser Ser
2295                2300                2305                2310

GAG GTG TGG TTT GAC CGA AGA ACC AAT TAT ACC CGT TCT TTA GCG GTC      7074
Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr Thr Arg Ser Leu Ala Val
                2315                2320                2325

ATG TCA ATG GTT GGG TAT ATT TTA GGC CTG GGA GAT AGA CAC CCA TCC      7122
Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Pro Ser
            2330                2335                2340

AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG AAG ATC CTG CAC ATT GAC TTT      7170
Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys Ile Leu His Ile Asp Phe
```

```
        2345                2350                2355

GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC CGA GAG AAG TTT CCA GAG AAG      7218
Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg Glu Lys Phe Pro Glu Lys
    2360                2365                2370

ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG ACC AAT GCT ATG GAG GTT ACA      7266
Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Asn Ala Met Glu Val Thr
2375                2380                2385                2390

GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA TGC CAC ACA GTG ATG GAG GTG      7314
Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys His Thr Val Met Glu Val
                2395                2400                2405

CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG GCC GTG CTG GAA GCC TTT GTC      7362
Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala Val Leu Glu Ala Phe Val
            2410                2415                2420

TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG ATG GAC ACA AAT ACC AAA GGC      7410
Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met Asp Thr Asn Thr Lys Gly
        2425                2430                2435

AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT TCC TAC TCT GCT GGC CAG TCA      7458
Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser Tyr Ser Ala Gly Gln Ser
    2440                2445                2450

GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT GGA GAG CCA GCC CAT AAG AAA      7506
Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly Glu Pro Ala His Lys Lys
2455                2460                2465                2470

ACG GGG ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT CAT TCT TTC ATT GGA GAC GGT      7554
Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His Ser Phe Ile Gly Asp Gly
                2475                2480                2485

TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG AAA GCT ATC CAG ATT ATT AAC      7602
Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys Ala Ile Gln Ile Ile Asn
            2490                2495                2500

AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG GAC TTC TCT CAT GAT GAC ACT      7650
Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp Phe Ser His Asp Asp Thr
        2505                2510                2515

TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG CTC ATC AAA CAA GCG ACA TCC      7698
Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu Ile Lys Gln Ala Thr Ser
    2520                2525                2530

CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT GGC TGG TGC CCT TTC TGG          7743
His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly Trp Cys Pro Phe Trp
2535                2540                2545

TAACTGGAGG CCCAGATGTG CCCATCACGT TTTTTCTGAG GCTTTTGTAC TTTAGTAAAT    7803

GCTTCCACTA AACTGAAAAA A                                              7824
```

(2) 서열번호 12에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 2549 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 12 :

```
Met Leu Gly Thr Gly Pro Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ser
 1               5                  10                  15

Ser Asn Val Ser Val Leu Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser Arg
            20                  25                  30

Asn Glu Glu Thr Arg Ala Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr Val
        35                  40                  45

Thr Met Glu Leu Arg Glu Met Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe Tyr
    50                  55                  60

Asp Gln Leu Asn His His Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp Ala
65                  70                  75                  80

Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly Val
                85                  90                  95

Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu Arg
            100                 105                 110

Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val Met Glu Met Ala Ser Lys
        115                 120                 125

Ala Ile Gly Arg Leu Ala Met Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu Tyr
    130                 135                 140

Val Glu Phe Glu Val Lys Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp Arg
145                 150                 155                 160

Asn Glu Gly Arg Arg His Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu Ala
                165                 170                 175

Ile Ser Val Pro Thr Phe Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe Asp
            180                 185                 190

Asn Ile Phe Val Ala Val Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu Gly
        195                 200                 205

Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Glu Met Gln Lys Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu Glu
225                 230                 235                 240

Ala Glu Lys Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly Met Asn
                245                 250                 255

Arg Asp Asp Arg Ile His Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu Val
            260                 265                 270
```

```
Arg Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu Met Glu Glu
        275                 280                 285

Ile Thr Gln Gln Gln Leu Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu Met
    290                 295                 300

Gly Phe Gly Thr Lys Pro Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe Gln
305                 310                 315                 320

Ala Val Gln Pro Gln Gln Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly Tyr
                325                 330                 335

Ser Ser His Gln Gly Leu Met Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro Ala
            340                 345                 350

Lys Ser Thr Leu Val Glu Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu Met Glu Glu
        355                 360                 365

Lys Phe Asp Gln Val Cys Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Ser Leu Ile Gln Met Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Arg Leu Ala
385                 390                 395                 400

Ala Phe Arg Pro Ser Ala Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp Thr
                405                 410                 415

Met Asn His Val Leu Ser Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr Ala
            420                 425                 430

Ala Phe Gln Ala Leu Gly Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu Phe
        435                 440                 445

Lys Val Tyr Leu Pro Arg Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu Pro
    450                 455                 460

Pro Lys Asp Phe Ala His Lys Arg Gln Lys Ala Met Gln Val Asp Ala
465                 470                 475                 480

Thr Val Phe Thr Cys Ile Ser Met Leu Ala Arg Ala Met Gly Pro Gly
                485                 490                 495

Ile Gln Gln Asp Ile Lys Glu Leu Leu Glu Pro Met Leu Ala Val Gly
            500                 505                 510

Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln Ile
        515                 520                 525

Pro Gln Leu Lys Lys Asp Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys Met Leu Ser
    530                 535                 540

Leu Val Leu Met His Lys Pro Leu Arg His Pro Gly Met Pro Lys Gly
545                 550                 555                 560

Leu Ala His Gln Leu Ala Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu Ala
                565                 570                 575
```

```
Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser Phe
            580                 585                 590

Glu Phe Glu Gly His Ser Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala Asp
        595                 600                 605

His Phe Leu Asn Ser Glu His Lys Glu Ile Arg Met Glu Ala Ala Arg
    610                 615                 620

Thr Cys Ser Arg Leu Leu Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly His
625                 630                 635                 640

Ala His Val Val Ser Gln Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val Leu
                645                 650                 655

Ser Lys Leu Leu Val Val Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile Arg
            660                 665                 670

Tyr Cys Val Leu Ala Ser Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu Ala
        675                 680                 685

Gln Ala Glu Asn Leu Gln Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln Val
    690                 695                 700

Phe Glu Ile Arg Glu Leu Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser Ser
705                 710                 715                 720

Met Asn Pro Ala Phe Val Met Pro Phe Leu Arg Lys Met Leu Ile Gln
                725                 730                 735

Ile Leu Thr Glu Leu Glu His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu Gln
            740                 745                 750

Ser Ala Arg Met Leu Gly His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu Ile
        755                 760                 765

Arg Pro Tyr Met Glu Pro Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu Lys
    770                 775                 780

Asp Pro Asp Pro Asp Pro Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu Ala
785                 790                 795                 800

Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu Met Arg Lys Trp
                805                 810                 815

Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile Met Asp Met Leu Gln Asp Ser Ser
            820                 825                 830

Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu Val
        835                 840                 845

Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr Leu
    850                 855                 860

Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly Thr
865                 870                 875                 880

Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp Pro
```

```
                885                 890                 895

Tyr Lys His Lys Val Asn Ile Gly Met Ile Asp Gln Ser Arg Asp Ala
            900                 905                 910

Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser Asp
        915                 920                 925

Tyr Ser Thr Ser Glu Met Leu Val Asn Met Gly Asn Leu Pro Leu Asp
    930                 935                 940

Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser Met Val Ala Leu Met Arg Ile Phe Arg
945                 950                 955                 960

Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr Met Val Val Gln Ala Ile Thr
                965                 970                 975

Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro Gln
            980                 985                 990

Val Met Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala Ile
        995                 1000                1005

Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly Met Leu Val Ser Phe Val Lys
    1010                1015                1020

Ser His Ile Arg Pro Tyr Met Asp Glu Ile Val Thr Leu Met Arg Glu
1025                1030                1035                1040

Phe Trp Val Met Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu Ile
                1045                1050                1055

Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu Pro
            1060                1065                1070

Gln Leu Ile Pro His Met Leu Arg Val Phe Met His Asp Asn Ser Pro
        1075                1080                1085

Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe Gly
    1090                1095                1100

Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val Lys
1105                1110                1115                1120

Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala Leu
                1125                1130                1135

Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr Ala
            1140                1145                1150

Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro Glu
        1155                1160                1165

Leu Arg Ser Thr Ala Met Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln Leu
    1170                1175                1180

Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro Met Val Asn Lys Val Leu Val
1185                1190                1195                1200
```

```
Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg Ile
                1205                1210                1215

Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile Tyr
            1220                1225                1230

Gln His Arg Met Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser Gly
        1235                1240                1245

Pro Val Glu Thr Gly Pro Met Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile Asn
    1250                1255                1260

Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp Trp
1265                1270                1275                1280

Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Ser
                1285                1290                1295

Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn Pro
            1300                1305                1310

Met Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser Glu
        1315                1320                1325

Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu Ala
    1330                1335                1340

Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn Leu
1345                1350                1355                1360

Ala Glu Phe Met Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg Asp
                1365                1370                1375

Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg Ala
            1380                1385                1390

Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly Pro
        1395                1400                1405

Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu Gln
    1410                1415                1420

Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala Met Lys His Phe
1425                1430                1435                1440

Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu Trp
                1445                1450                1455

Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys Met Asp Thr Asn Lys Asp
            1460                1465                1470

Asp Pro Glu Leu Met Leu Gly Arg Met Arg Cys Leu Glu Ala Leu Gly
        1475                1480                1485

Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu Val
    1490                1495                1500
```

```
Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys Met Ala Arg Met Ala Ala Ala Ala Ala
1505                1510                1515                1520

Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser Met Glu Glu Tyr Thr Cys Met Ile
                1525                1530                1535

Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala Leu
            1540                1545                1550

His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala Arg
        1555                1560                1565

Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala Met Ala Gly Glu Ser Tyr Ser
    1570                1575                1580

Arg Ala Tyr Gly Ala Met Val Ser Cys His Met Leu Ser Glu Leu Glu
1585                1590                1595                1600

Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile Arg
                1605                1610                1615

Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu Asp
            1620                1625                1630

Trp Gln Lys Ile Leu Met Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His Glu
        1635                1640                1645

Asp Met Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly
    1650                1655                1660

Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp
1665                1670                1675                1680

Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val
                1685                1690                1695

Thr Tyr Ala Tyr Met Lys Asn Met Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp
            1700                1705                1710

Ala Phe Gln His Met Gln His Phe Val Gln Thr Met Gln Gln Gln Ala
        1715                1720                1725

Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu His
    1730                1735                1740

Lys Leu Met Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu Asn
1745                1750                1755                1760

Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr Tyr
                1765                1770                1775

Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His Ala
            1780                1785                1790

Trp Ala Val Met Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn
        1795                1800                1805

Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn
```

```
    1810                1815                1820

Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr
1825                1830                1835                1840

Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr
                1845                1850                1855

Glu Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp
            1860                1865                1870

Leu Ser Lys Thr Leu Leu Met Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe
        1875                1880                1885

Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu
    1890                1895                1900

Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn
1905                1910                1915                1920

Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu
                1925                1930                1935

Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu
            1940                1945                1950

Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His
        1955                1960                1965

Pro Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr
    1970                1975                1980

Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn Met Cys Glu
1985                1990                1995                2000

His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala Met Met Val Ser Glu Glu Leu
                2005                2010                2015

Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
            2020                2025                2030

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
        2035                2040                2045

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr
    2050                2055                2060

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
2065                2070                2075                2080

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp
                2085                2090                2095

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser
            2100                2105                2110

Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro
        2115                2120                2125
```

```
Lys Leu Leu Met Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr
    2130                2135                2140

Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser Leu
2145                2150                2155                2160

Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu Met Gly
                2165                2170                2175

Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp Leu
            2180                2185                2190

Arg Gln Asp Glu Arg Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu
        2195                2200                2205

Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg
    2210                2215                2220

Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val
2225                2230                2235                2240

Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys
                2245                2250                2255

Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile Met Leu Arg Met Ala
            2260                2265                2270

Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu Met Gln Lys Val Glu Val Phe Glu
        2275                2280                2285

His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp
    2290                2295                2300

Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr
2305                2310                2315                2320

Thr Arg Ser Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu
                2325                2330                2335

Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys
            2340                2345                2350

Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala Met Thr Arg
        2355                2360                2365

Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr
    2370                2375                2380

Asn Ala Met Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys
2385                2390                2395                2400

His Thr Val Met Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val Met Ala
                2405                2410                2415

Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu Met
            2420                2425                2430


Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser
        2435                2440                2445

Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly
    2450                2455                2460

Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His
2465                2470                2475                2480

Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys
                2485                2490                2495

Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp
            2500                2505                2510

Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu
        2515                2520                2525

Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly
    2530                2535                2540

Trp Cys Pro Phe Trp
2545
```

(2) 서열번호 13에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 1794 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 양형태

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 1. .1686

(xi) : 서열 : 서열번호 13 :

```
TTG GTT TAC CCT TTG ACA GTT GCT ATT ACT TCC GAA TCA ACG AGC CGT        48
Leu Val Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ile Thr Ser Glu Ser Thr Ser Arg
  1               5                  10                  15

AAA AAG GCA GCT CAA TCC ATT ATT GAA AAA ATG CGA GTA CAT TCT CCT        96
Lys Lys Ala Ala Gln Ser Ile Ile Glu Lys Met Arg Val His Ser Pro
             20                  25                  30

AGC TTG GTG GAT CAA GCA GAA TTA GTG AGT CGA GAA CTC ATC CGA GTT       144
Ser Leu Val Asp Gln Ala Glu Leu Val Ser Arg Glu Leu Ile Arg Val
         35                  40                  45

GCA GTT TTA TGG CAC GAA CAA TGG CAC GAT GCT TTG GAA GAT GCT AGC       192
Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp His Asp Ala Leu Glu Asp Ala Ser
     50                  55                  60
```

```
AGG TTT TTC TTT GGT GAA CAC AAC ACA GAA AAG ATG TTT GAA ACA TTG       240
Arg Phe Phe Phe Gly Glu His Asn Thr Glu Lys Met Phe Glu Thr Leu
 65                  70                  75                  80

GAA CCA TTA CAT CAA ATG TTG CAA AAG GGA CCA GAA ACG ATG AGG GAA       288
Glu Pro Leu His Gln Met Leu Gln Lys Gly Pro Glu Thr Met Arg Glu
                 85                  90                  95

CAA GCC TTT GCA AAT GCT TTT GGC AGG GAG TTG ACA GAT GCA TAC GAG       336
Gln Ala Phe Ala Asn Ala Phe Gly Arg Glu Leu Thr Asp Ala Tyr Glu
            100                 105                 110

TGG GTG CTC AAC TTT AGA AGA ACT AAA GAC ATA ACC AAT TTG AAT CAA       384
Trp Val Leu Asn Phe Arg Arg Thr Lys Asp Ile Thr Asn Leu Asn Gln
        115                 120                 125

GCA TGG GAT ATA TAC TAC AAT GTC TTT AGA AGA GTA AGC AAA CAG GTG       432
Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val Phe Arg Arg Val Ser Lys Gln Val
    130                 135                 140

CAG CTG TTA GCT AGT CTT GAG TTG CAG TAT GTA TCT CCG GAC TTA GAG       480
Gln Leu Leu Ala Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Asp Leu Glu
145                 150                 155                 160

CAT GCT CAA GAT TTG GAA TTG GCT GTA CCA GGT ACT TAC CAA GCA GGC       528
His Ala Gln Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Gln Ala Gly
                165                 170                 175

AAA CCT GTG ATC AGA ATA ATC AAA TTT GAT CCT ACT TTT TCG ATT ATT       576
Lys Pro Val Ile Arg Ile Ile Lys Phe Asp Pro Thr Phe Ser Ile Ile
            180                 185                 190

TCA TCT AAA CAA AGA CCG AGA AAA TTA TCG TGC AGA GGA AGT GAT GGT       624
Ser Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Ser Cys Arg Gly Ser Asp Gly
        195                 200                 205

AAA GAC TAC CAA TAT GCG TTG AAA GGA CAT GAA GAT ATC AGA CAA GAT       672
Lys Asp Tyr Gln Tyr Ala Leu Lys Gly His Glu Asp Ile Arg Gln Asp
    210                 215                 220

AAC TTA GTG ATG CAA TTG TTT GGT TTG GTT AAT ACG TTG TTG GTA AAT       720
Asn Leu Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Val Asn
225                 230                 235                 240

GAT CCG GTA TGT TTC AAG AGA CAT TTG GAT ATA CAA CAA TAT CCT GCT       768
Asp Pro Val Cys Phe Lys Arg His Leu Asp Ile Gln Gln Tyr Pro Ala
                245                 250                 255

ATT CCA TTA TCA CCA AAA GTG GGA TTG CTT GGT TGG GTT CCA AAT AGT       816
Ile Pro Leu Ser Pro Lys Val Gly Leu Leu Gly Trp Val Pro Asn Ser
            260                 265                 270

GAC ACT TTC CAT GTA TTG ATC AAA GGC TAT CGC GAA TCA AGA AGT ATA       864
Asp Thr Phe His Val Leu Ile Lys Gly Tyr Arg Glu Ser Arg Ser Ile
        275                 280                 285

ATG TTG AAT ATT GAA CAC AGG CTT TTG TTG CAA ATG GCA CCT GAT TAT       912
```

```
Met Leu Asn Ile Glu His Arg Leu Leu Leu Gln Met Ala Pro Asp Tyr
    290                 295                 300

GAT TTC TTG ACA TTA TTG CAA AAA GTT GAA GTG TTC ACA AGT GCA ATG      960
Asp Phe Leu Thr Leu Leu Gln Lys Val Glu Val Phe Thr Ser Ala Met
305                 310                 315                 320

GAT AAT TGT AAG GGA CAG GAT TTG TAC AAA GTG TTA TGG CTC AAA TCT     1008
Asp Asn Cys Lys Gly Gln Asp Leu Tyr Lys Val Leu Trp Leu Lys Ser
                325                 330                 335

AAA TCA TCC GAG GCG TGG TTG GAC CGT AGA ACA ACA TAC ACG AGA TCA     1056
Lys Ser Ser Glu Ala Trp Leu Asp Arg Arg Thr Thr Tyr Thr Arg Ser
            340                 345                 350

TTA GCT GTA ATG TCT ATG GTT GGG TAT ATA TTA GGT TTG GGG GAT AGG     1104
Leu Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg
        355                 360                 365

CAC CCA TCA AAT TTG ATG TTG GAC CGT ATT ACT GGG AAA GTC ATC CAT     1152
His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Ile Thr Gly Lys Val Ile His
    370                 375                 380

ATT GAT TTC GGA GAC TGT TTT GAA GCA GCA ATA TTA CGT GAG AAG TAT     1200
Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Ala Ala Ile Leu Arg Glu Lys Tyr
385                 390                 395                 400

CCA GAG AGA GTT CCG TTT AGA TTG ACG AGA ATG CTT AAT TAT GCC ATG     1248
Pro Glu Arg Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Asn Tyr Ala Met
                405                 410                 415

GAA GTT AGT GGA ATA GAG GGC TCG TTC AGA ATC ACA TGT GAA CAT GTT     1296
Glu Val Ser Gly Ile Glu Gly Ser Phe Arg Ile Thr Cys Glu His Val
            420                 425                 430

ATG AGG GTG TTG CGT GAT AAT AAA GAG TCT TTA ATG GCA ATA TTA GAG     1344
Met Arg Val Leu Arg Asp Asn Lys Glu Ser Leu Met Ala Ile Leu Glu
        435                 440                 445

GCC TTT GCT TAC GAT CCC TTG ATA AAT TGG GGG TTT GAT TTC CCA ACA     1392
Ala Phe Ala Tyr Asp Pro Leu Ile Asn Trp Gly Phe Asp Phe Pro Thr
    450                 455                 460

AAG GCG TTG GCT GAA TCA ACG GGT ATA CGT GTT CCA CAA GTC AAC ACT     1440
Lys Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Ile Arg Val Pro Gln Val Asn Thr
465                 470                 475                 480

GCA GAA TTA TTA CGC AGA GGA CAG ATT GAC GAA AAA GAA GCT GTA AGA     1488
Ala Glu Leu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Asp Glu Lys Glu Ala Val Arg
                485                 490                 495

TTG CAA AAG CAA AAT GAA TTG GAA ATA AGA AAC GCT AGA GCT GCA TTA     1536
Leu Gln Lys Gln Asn Glu Leu Glu Ile Arg Asn Ala Arg Ala Ala Leu
            500                 505                 510

GTG TTG AAA CGT ATT ACC GAT AAG TTA ACT GGT AAC GAT ATC AAA CGG     1584
Val Leu Lys Arg Ile Thr Asp Lys Leu Thr Gly Asn Asp Ile Lys Arg
        515                 520                 525


  TTG AGA GGA TTA GAT GTG CCT ACT CAA GTC GAT AAA TTG ATT CAA CAA     1632
  Leu Arg Gly Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Asp Lys Leu Ile Gln Gln
      530                 535                 540

  GCC ACC AGT GTT GAG AAT TTG TGT CAG CAT TAC ATT GGT TGG TGT TCG     1680
  Ala Thr Ser Val Glu Asn Leu Cys Gln His Tyr Ile Gly Trp Cys Ser
  545                 550                 555                 560

  TGT TGG TAGGTTGATT ATCGTCATGT GTCGATAAGT ATGGTATTGT GGTAACTATT      1736
  Cys Trp

  TTATAAAGGG AAATATTAAA GAATTGTATA TTATTAAAAA AAAAAAAAAA AACTCGAG     1794
```

(2) 서열번호 14에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 562 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 14 :

```
Leu Val Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ile Thr Ser Glu Ser Thr Ser Arg
  1               5                  10                  15

Lys Lys Ala Ala Gln Ser Ile Ile Glu Lys Met Arg Val His Ser Pro
             20                  25                  30

Ser Leu Val Asp Gln Ala Glu Leu Val Ser Arg Glu Leu Ile Arg Val
         35                  40                  45

Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp His Asp Ala Leu Glu Asp Ala Ser
     50                  55                  60

Arg Phe Phe Phe Gly Glu His Asn Thr Glu Lys Met Phe Glu Thr Leu
 65                  70                  75                  80

Glu Pro Leu His Gln Met Leu Gln Lys Gly Pro Glu Thr Met Arg Glu
                85                  90                  95

Gln Ala Phe Ala Asn Ala Phe Gly Arg Glu Leu Thr Asp Ala Tyr Glu
            100                 105                 110

Trp Val Leu Asn Phe Arg Arg Thr Lys Asp Ile Thr Asn Leu Asn Gln
        115                 120                 125

Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val Phe Arg Arg Val Ser Lys Gln Val
    130                 135                 140

Gln Leu Leu Ala Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Asp Leu Glu
145                 150                 155                 160

His Ala Gln Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr Tyr Gln Ala Gly
```

```
                165                 170                 175

Lys Pro Val Ile Arg Ile Ile Lys Phe Asp Pro Thr Phe Ser Ile Ile
            180                 185                 190

Ser Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Ser Cys Arg Gly Ser Asp Gly
        195                 200                 205

Lys Asp Tyr Gln Tyr Ala Leu Lys Gly His Glu Asp Ile Arg Gln Asp
    210                 215                 220

Asn Leu Val Met Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu Val Asn
225                 230                 235                 240

Asp Pro Val Cys Phe Lys Arg His Leu Asp Ile Gln Gln Tyr Pro Ala
                245                 250                 255

Ile Pro Leu Ser Pro Lys Val Gly Leu Leu Gly Trp Val Pro Asn Ser
            260                 265                 270

Asp Thr Phe His Val Leu Ile Lys Gly Tyr Arg Glu Ser Arg Ser Ile
        275                 280                 285

Met Leu Asn Ile Glu His Arg Leu Leu Leu Gln Met Ala Pro Asp Tyr
    290                 295                 300

Asp Phe Leu Thr Leu Leu Gln Lys Val Glu Val Phe Thr Ser Ala Met
305                 310                 315                 320

Asp Asn Cys Lys Gly Gln Asp Leu Tyr Lys Val Leu Trp Leu Lys Ser
                325                 330                 335

Lys Ser Ser Glu Ala Trp Leu Asp Arg Arg Thr Thr Tyr Thr Arg Ser
            340                 345                 350

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

His Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Ile Thr Gly Lys Val Ile His
    370                 375                 380

Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Ala Ala Ile Leu Arg Glu Lys Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Glu Arg Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Met Leu Asn Tyr Ala Met
                405                 410                 415

Glu Val Ser Gly Ile Glu Gly Ser Phe Arg Ile Thr Cys Glu His Val
            420                 425                 430

Met Arg Val Leu Arg Asp Asn Lys Glu Ser Leu Met Ala Ile Leu Glu
        435                 440                 445

Ala Phe Ala Tyr Asp Pro Leu Ile Asn Trp Gly Phe Asp Phe Pro Thr
    450                 455                 460

Lys Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Ile Arg Val Pro Gln Val Asn Thr
465                 470                 475                 480


 Ala Glu Leu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Asp Glu Lys Glu Ala Val Arg
                 485                 490                 495

 Leu Gln Lys Gln Asn Glu Leu Glu Ile Arg Asn Ala Arg Ala Ala Leu
             500                 505                 510

 Val Leu Lys Arg Ile Thr Asp Lys Leu Thr Gly Asn Asp Ile Lys Arg
         515                 520                 525

 Leu Arg Gly Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Asp Lys Leu Ile Gln Gln
     530                 535                 540

 Ala Thr Ser Val Glu Asn Leu Cys Gln His Tyr Ile Gly Trp Cys Ser
 545                 550                 555                 560

 Cys Trp
```

(2) 서열번호 15에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 399 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 1. .399

(xi) : 서열 : 서열번호 15 :

```
GTT AGT CAC GAG TTG ATC AGA GTA GCC GTT CTA TGG CAC GAA TTA TGG        48
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Val Ala Val Leu Trp His Glu Leu Trp
  1               5                  10                  15

TAT GAA GGA CTG GAA GAT GCG AGC CGC CAA TTT TTC GTT GAA CAT AAC        96
Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Val Glu His Asn
             20                  25                  30

ATA GAA AAA ATG TTT TCT ACT TTA GAA CCT TTA CAT AAA CAC TTA GGC       144
Ile Glu Lys Met Phe Ser Thr Leu Glu Pro Leu His Lys His Leu Gly
         35                  40                  45

AAT GAG CCT CAA ACG TTA AGT GAG GTA TCG TTT CAG AAA TCA TTT GGT       192
Asn Glu Pro Gln Thr Leu Ser Glu Val Ser Phe Gln Lys Ser Phe Gly
     50                  55                  60

AGA GAT TTG AAC GAT GCC TAC GAA TGG TTG AAT AAC TAC AAA AAG TCA       240
Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Ser
 65                  70                  75                  80

AAA GAC ATC AAT AAT TTG AAC CAA GCT TGG GAT ATT TAT TAT AAC GTC       288
Lys Asp Ile Asn Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                 85                  90                  95

TTC AGA AAA ATA ACA CGT CAA ATA CCA CAG TTA CAA ACC TTA GAC TTA       336
Phe Arg Lys Ile Thr Arg Gln Ile Pro Gln Leu Gln Thr Leu Asp Leu
            100                 105                 110

CAG CAT GTT TCT CCC CAG CTT CTG GCT ACT CAT GAT CTC GAA TTG GCT       384
Gln His Val Ser Pro Gln Leu Leu Ala Thr His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

GTT CCT GGG ACA TAT                                                   399
Val Pro Gly Thr Tyr
    130
```

(2) 서열번호 16에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 133 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 16 :

```
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Val Ala Val Leu Trp His Glu Leu Trp
  1               5                  10                  15

Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Val Glu His Asn
             20                  25                  30

Ile Glu Lys Met Phe Ser Thr Leu Glu Pro Leu His Lys His Leu Gly
         35                  40                  45

Asn Glu Pro Gln Thr Leu Ser Glu Val Ser Phe Gln Lys Ser Phe Gly
     50                  55                  60

Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Ser
 65                  70                  75                  80

Lys Asp Ile Asn Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                 85                  90                  95

Phe Arg Lys Ile Thr Arg Gln Ile Pro Gln Leu Gln Thr Leu Asp Leu
            100                 105                 110

Gln His Val Ser Pro Gln Leu Leu Ala Thr His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

Val Pro Gly Thr Tyr
    130
```

(2) 서열번호 17에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 399 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 1. .399

(xi) : 서열 : 서열번호 17 :

```
GTC AGC CAC GAA TTG ATA CGT ATG GCG GTG CTT TGG CAT GAG CAA TGG        48
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Met Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp
  1               5                  10                  15

TAT GAG GGT CTG GAT GAC GCC AGT AGG CAG TTT TTT GGA GAA CAT AAT        96
Tyr Glu Gly Leu Asp Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Gly Glu His Asn
             20                  25                  30

ACC GAA AAA ATG TTT GCT GCT TTA GAG CCT CTG TAC GAA ATG CTG AAG       144
Thr Glu Lys Met Phe Ala Ala Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Met Leu Lys
         35                  40                  45

AGA GGA CCG GAA ACT TTG AGG GAA ATA TCG TTC CAA AAT TCT TTT GGT       192
Arg Gly Pro Glu Thr Leu Arg Glu Ile Ser Phe Gln Asn Ser Phe Gly
     50                  55                  60

AGG GAC TTG AAT GAC GCT TAC GAA TGG CTG ATG AAT TAC AAA AAA TCT       240
Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Met Asn Tyr Lys Lys Ser
 65                  70                  75                  80

AAA GAT GTT AGT AAT TTA AAC CAA GCG TGG GAC ATT TAC TAT AAT GTT       288
Lys Asp Val Ser Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                 85                  90                  95

TTC AGG AAA ATT GGT AAA CAG TTG CCA CAA TTA CAA ACT CTT GAA CTA       336
Phe Arg Lys Ile Gly Lys Gln Leu Pro Gln Leu Gln Thr Leu Glu Leu
            100                 105                 110

CAA CAT GTG TCG CCA AAA CTA CTA TCT GCG CAT GAT TTG GAA TTG GCT       384
Gln His Val Ser Pro Lys Leu Leu Ser Ala His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

GTC CCC GGG ACC CGT                                                  399
Val Pro Gly Thr Arg
```

(2) 서열번호 18에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 133 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 18 :

```
Val Ser His Glu Leu Ile Arg Met Ala Val Leu Trp His Glu Gln Trp
 1               5                  10                  15

Tyr Glu Gly Leu Asp Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Gly Glu His Asn
            20                  25                  30

Thr Glu Lys Met Phe Ala Ala Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Met Leu Lys
        35                  40                  45

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

Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Met Asn Tyr Lys Lys Ser
65                  70                  75                  80

Lys Asp Val Ser Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
                85                  90                  95

Phe Arg Lys Ile Gly Lys Gln Leu Pro Gln Leu Gln Thr Leu Glu Leu
            100                 105                 110

Gln His Val Ser Pro Lys Leu Leu Ser Ala His Asp Leu Glu Leu Ala
        115                 120                 125

Val Pro Gly Thr Arg
    130
```

(2) 서열번호 19에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 531 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 양형태

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(xi) : 서열 : 서열번호 19 :

```
TGACCCTCAC CCCTTCCACC TATCCCAAAA ACCTCACTGG GTCTGTGGAC AAACAACANA      60

AATNTTTTCC ANANAGGCCC CAAATGAGNC CCANGGGTCT NTCTTCCATC AGACCCAGTG     120

ATTCTGCGAC TCACACNCTT CAATTCAAGA CCTGACCNCT AGTAGGGAGG TTTANTCAGA     180

TCGCTGGCAN CCTCGGCTGA NCAGATNCAN AGNGGGGNTC GCTGTTCAGT GGGNCCACCC     240

TCNCTGGCCT TCTTCANCAG GGGTCTGGGA TGTTTTCAGT GGNCCNAANA CNCTGTTTAG     300

AGCCAGGGCT CAGNAAACAG AAAANCTNTC ATGGNGGTTC TGGACACAGG GNAGGTCTGG     360

NACATATTGG GGATTATGAN CAGNACCAAN ACNCCACTAA ATNCCCCAAG NANAAAGTGT     420

AACCATNTCT ANACNCCATN TTNTATCAGN ANAAATTTTN TTCCNATAAA TGACATCAGN     480

ANTTTNAACA TNAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAANAAAAA AAAAAAAAAA A              531
```

(2) 서열번호 20에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 231 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 2본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : misc_특성

(B) 존재 위치 : 128

(D)기타 정보 : /표지 = XhoI

(xi) : 서열 : 서열번호 20 :

```
GCGTATAACG CGTTTGGAAT CACTACAGGG ATGTTTAATA CCACTACAAT GGATGATGTA      60
TATAACTATC TATTCGATGA TGAAGATACC CCACCAAACC CAAAAAAAGA GATCTGGAAT     120
TCGGATCCTC GAGAGATCTA TGAATCGTAG ATACTGAAAA ACCCCGCAAG TTCACTTCAA     180
CTGTGCATCG TGCACCATCT CAATTTCTTT CATTTATACA TCGTTTTGCC T               231
```

(2) 서열번호 21에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 21 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 21 :

```
TGAAGATACC CCACCAAACC C                                               21
```

(2) 서열번호 22에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 18 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 22 :

TGCACAGTTG AAGTGAAC 18

(2) 서열번호 23에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 907 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특성 :

(A) 기호/키 : CDS

(B) 존재 위치 : 34. .507

(xi) : 서열 : 서열번호 23 :

```
GCCGGGGCTG CGGCCGCCCG AGGGACTTTG AAC ATG TCG GGG ATC GCC CTC AGC        5
                                     Met Ser Gly Ile Ala Leu Ser
                                       1               5

AGA CTC GCC CAG GAG AGG AAA GCA TGG AGG AAA GAC CAC CCA TTT GGT       10
Arg Leu Ala Gln Glu Arg Lys Ala Trp Arg Lys Asp His Pro Phe Gly
         10                  15                  20

TTC GTG GCT GTC CCA ACA AAA AAT CCC GAT GGC ACG ATG AAC CTC ATG       15
Phe Val Ala Val Pro Thr Lys Asn Pro Asp Gly Thr Met Asn Leu Met
     25                  30                  35

AAC TGG GAG TGC GCC ATT CCA GGA AAG AAA GGG ACT CCG TGG GAA GGA       19
Asn Trp Glu Cys Ala Ile Pro Gly Lys Lys Gly Thr Pro Trp Glu Gly
 40                  45                  50                  55

GGC TTG TTT AAA CTA CGG ATG CTT TTC AAA GAT GAT TAT CCA TCT TCG       24
Gly Leu Phe Lys Leu Arg Met Leu Phe Lys Asp Asp Tyr Pro Ser Ser
                 60                  65                  70

CCA CCA AAA TGT AAA TTC GAA CCA CCA TTA TTT CAC CCG AAT GTG TAC       29
Pro Pro Lys Cys Lys Phe Glu Pro Pro Leu Phe His Pro Asn Val Tyr
             75                  80                  85

CCT TCG GGG ACA GTG TGC CTG TCC ATC TTA GAG GAG GAC AAG GAC TGG       34
Pro Ser Gly Thr Val Cys Leu Ser Ile Leu Glu Glu Asp Lys Asp Trp
         90                  95                 100
AGG CCA GCC ATC ACA ATC AAA CAG ATC CTA TTA GGA ATA CAG GAA CTT       39
Arg Pro Ala Ile Thr Ile Lys Gln Ile Leu Leu Gly Ile Gln Glu Leu
    105                 110                 115

CTA AAT GAA CCA AAT ATC CAA GAC CCA GCT CAA GCA GAG GCC TAC ACG       43
Leu Asn Glu Pro Asn Ile Gln Asp Pro Ala Gln Ala Glu Ala Tyr Thr
120                 125                 130                 135

ATT TAC TGC CAA AAC AGA GTG GAG TAC GAG AAA AGG GTC CGA GCA CAA       48
Ile Tyr Cys Gln Asn Arg Val Glu Tyr Glu Lys Arg Val Arg Ala Gln
                140                 145                 150

GCC AAG AAG TTT GCG CCC TCA TAAGCAGCGA CCTTGTGGCA TCGTCAAAAG          53
Ala Lys Lys Phe Ala Pro Ser
            155

GAAGGGATTG GTTTGGCAAG AACTTGTTTA CAACATTTTT GGCAAATCTA AAGTTGCTCC     59

ATACAATGAC TAGTCACCTG GGGGGGTTGG GCGGGCGCCA TCTTCCATTG CCGCCGCGGG     65

TGTGCGGTCT CGATTCGCTG AATTGCCCGT TTCCATACAG GGTCTCTTCC TTCGGTCTTT     71

TGGTATTTTT GGATTGTTAT GTAAAACTCG CTTTTATTTT AATATTGATG TCAGTATTTC     77

AACTGCTGTA AAATTATAAA CTTTTATACT GGGTAAGTCC CCCAGGGGCG AGTTNCCTCG     83

CTCTGGGATG CAGGCATGCT TCTCACCGTG CAGAGCTGCA CTTGNCCTCA GCTGNCTGNA     89

TGGAAATGCA                                                            90
```

(2) 서열번호 24에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 158 아미노산

(B) 서열의 형 : 아미노산

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) : 서열 : 서열번호 24 :

```
Met Ser Gly Ile Ala Leu Ser Arg Leu Ala Gln Glu Arg Lys Ala Trp
  1               5                  10                  15

Arg Lys Asp His Pro Phe Gly Phe Val Ala Val Pro Thr Lys Asn Pro
             20                  25                  30

Asp Gly Thr Met Asn Leu Met Asn Trp Glu Cys Ala Ile Pro Gly Lys
         35                  40                  45

Lys Gly Thr Pro Trp Glu Gly Gly Leu Phe Lys Leu Arg Met Leu Phe
     50                  55                  60

Lys Asp Asp Tyr Pro Ser Ser Pro Pro Lys Cys Lys Phe Glu Pro Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Phe His Pro Asn Val Tyr Pro Ser Gly Thr Val Cys Leu Ser Ile
                 85                  90                  95

Leu Glu Glu Asp Lys Asp Trp Arg Pro Ala Ile Thr Ile Lys Gln Ile
            100                 105                 110

Leu Leu Gly Ile Gln Glu Leu Leu Asn Glu Pro Asn Ile Gln Asp Pro
        115                 120                 125

Ala Gln Ala Glu Ala Tyr Thr Ile Tyr Cys Gln Asn Arg Val Glu Tyr
    130                 135                 140

Glu Lys Arg Val Arg Ala Gln Ala Lys Lys Phe Ala Pro Ser
145                 150                 155
```

(2) 서열번호 25에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A) 서열의 길이 : 207 염기쌍

(B) 서열의 형 : 핵산

(C) 쇄의 수 : 양형태

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 기타 핵산

(xi) : 서열 : 서열번호 25 :

```
CCCTCCCTCC TGCCGCTCCT CTCTAGAACC TTCTAGAACC TGGGCTGTGC TGCTTTTGAG      60

CCTCAGACCC CAGGGCAGCA TCTCGGTTCT GCGCCACTTC CTTTGTGTTT ANATGGCGTT     120

TTGTCTGTGT TGCTGTTTAG AGTAGATNAA CTGTTTANAT AAAAAAAAAA NAAAATTNAC     180

TNGAGGGGGC NTGNAGGCAT GCNNAAC                                        207
```

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 서열번호 1 또는 11의 누클레오티드 서열을 가지거나;

(b) pIC524(ATCC 수탁번호 제75787호)의 RAPT 유전자 삽입체의 누클레오티드 서열로서 RAPT 유전자 삽입체의 코딩 서열이 서열번호 11의 누클레오티드 잔기 4717번 내지 7746번에 해당하는 누클레오티드 서열을 가지거나;

(c) (i) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드, (ii) 서열번호 12의 잔기 2012번 내지 2144번의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드, 또는 (iii) 상기 (i) 또는 (ii)의 폴리펩티드가 GAL4, GCN4, LexA, VP16 및 ADR1, 로타바이러스 VP6 단백질, 폴리오바이러스 캡시드 단백질, 글루타티온-S-트랜스페라제, 및 파지 외피 단백질의 DNA 결합 도메인 또는 전사 활성화 도메인으로부터 선택된 이종성 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질을 엔코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 2.

(i) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드;

(ii) 서열번호 12의 아미노산 잔기 2012번 내지 2144번, 서열번호 2의 아미노산 잔기 26번 내지 160번, 또는 서열번호 12의 아미노산 잔기 1541번 내지 2549번을 가지는 폴리펩티드; 및

(iii) 상기 (i) 또는 (ii)의 폴리펩티드가 GAL4, GCN4, LexA, VF16 및 ADR1, 로타바이러스 VP6 단백질, 폴리오바이러스 캡시드 단백질, 글루타티온-S-트랜스페라제, 및 파지 외피 단백질의 DNA 결합 도메인 또는 전사 활성화 도메인으로부터 선택된 이종성 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질로부터 선택된, FKBP/라파마이신 복합체에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 가지는 단리된 핵산.

청구항 3.

(a) (i) 서열번호 1 또는 11의 누클레오티드 서열을 가지거나; (ii) pIC524(ATCC 수탁번호 제75787호)의 RAPT 유전자 삽입체의 누클레오티드 서열로서 RAPT 유전자 삽입체의 코딩 서열이 서열번호 11의 누클레오티드 잔기 4717번 내지 7746번에 해당하는 누클레오티드 서열을 가지거나; (iii) (A) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 (B) 서열번호 12의 잔기 2012번 내지 2144번의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 엔코딩하는, FKBP/라파마이신 복합체에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열; 및

(b) 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있고 상기 코딩 서열과 이종성인, SV40, 아데노바이러스, 사이토메갈로바이러스, lac, trp, TAC, TRC, T7, 파지람다, fd 외피 단백질, 3-포스포글리세레이트 키나아제, 및 Pho5의 프로모터로부터 선택된 전사 조절 서열을 가지는 핵산.

청구항 4.

(i) FK506 결합 단백질(FKBP)의 라파마이신 결합 도메인이 전사 활성화 도메인에 융합된 제1 융합 단백질을 엔코딩하는 제1 핵산; 및

(ii) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열 또는 서열번호 12의 잔기 2012번 내지 2144번의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드가 DNA 결합 도메인에 융합된 제2 융합 단백질을 엔코딩하는 제2 핵산을 포함하는 세포내 발현을 위한 조성물로서,

상기 전사 활성화 도메인 및 DNA 결합 도메인이 GAL4, GCN4, LexA, VP16 및 ADR1로부터 선택되는, 세포내 발현을 위한 조성물.

청구항 5.

(i) FK506 결합 단백질(FKBP)의 라파마이신 결합 도메인이 DNA 결합 도메인에 융합된 제1 융합 단백질을 엔코딩하는 제1 핵산; 및

(ii) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열 또는 서열번호 12의 잔기 2012번 내지 2144번의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드가 전사 활성화 도메인에 융합된 제2 융합 단백질을 엔코딩하는 제2 핵산을 포함하는 세포내 발현을 위한 조성물로서,

상기 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인이 GAL4, GCN4, LexA, VP16 및 ADR1로부터 선택되는, 세포내 발현을 위한 조성물.

청구항 6.

제2항 또는 제3항에 있어서, FKBP/라파마이신 복합체에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드가 서열번호 12의 2012번 내지 2144번 잔기를 가지는 폴리펩티드임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 7.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는, 원핵 세포, 진핵 세포, 또는 이들 둘 모두에서 복제될 수 있는 발현 벡터.

청구항 8.

제7항에 있어서, 바이러스 벡터임을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 9.

제8항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 백시니아 바이러스로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 10.

제9항에 따른 발현 벡터를 포함하는 진핵 세포.

청구항 11.

세포 배양 배지에서 제10항에 따른 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 단리하는 것을 포함하는, 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 12.

제1항 또는 제2항에 따른 핵산에 의해 엔코딩되는 단리된 폴리펩티드.

청구항 13.

제2항 또는 제3항에 따른 핵산에 의해 엔코딩되는 융합 단백질.

청구항 14.

서열번호 2의 Val26 내지 Tyr160 및 서열번호 12의 Val2012 내지 Tyr2144 중 하나 또는 둘 모두와 동일한 아미노산 서열을 가지는, 단리되거나 재조합된 폴리펩티드.

청구항 15.

서열번호 2의 Val26 내지 Tyr160 및 서열번호 12의 Val2012 내지 Tyr2144 중 하나 또는 둘 모두와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드가 GAL4, GCN4, LexA, VP16 및 ADR1, 로타바이러스 VP6 단백질, 폴리오바이러스 캡시드 단백질, 글루타티온-S-트랜스페라제, 및 파지 외피 단백질의 DNA 결합 도메인 또는 전사 활성화 도메인으로부터 선택된 이종성 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질.

청구항 16.

(ⅰ) 서열번호 2 또는 12의 아미노산 서열에 의해 표시되는 라파마이신-결합 도메인을 포함하는 RAP-BP 폴리펩티드, 및 FK506-결합 단백질의 라파마이신-결합 도메인을 포함하는 FKBP 폴리펩티드를 상기 RAP-BP와 FKBP 폴리펩티드가 상호작용 할 수 있는 조건 하에서 혼합시키고;

(ⅱ) 상기 혼합물을 시험 화합물과 접촉시키고;

(ⅲ) 상기 RAP-BP 및 FKBP 폴리펩티드를 포함하는 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하여, FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질의 결합을 유도하는 작용제에 대해 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 검정법으로서,

상기 시험 화합물의 부재 시에 복합체가 형성되는 정도와 비교하여 상기 시험 화합물의 존재 시에 상기 복합체가 형성되는 정도가 통계적으로 유의하게 증가된 경우, 시험 화합물이 FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질 사이의 상호작용의 유도제임을 나타내는 검정법.

청구항 17.

(ⅰ) RAPT1 또는 RAPT1-유사 단백질의 라파마이신-결합 도메인을 필수적으로 포함하는 RAP-BP 폴리펩티드, 및 FK506-결합 단백질의 라파마이신-결합 도메인을 포함하는 FKBP 폴리펩티드를 상기 RAP-BP와 FKBP 폴리펩티드가 상호작용할 수 있는 조건 하에서 혼합시키고;

(ⅱ) 상기 혼합물을 시험 화합물과 접촉시키고;

(ⅲ) 상기 RAP-BP 및 FKBP 폴리펩티드를 포함하는 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하여, FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질의 결합을 유도하는 작용제에 대해 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 검정법으로서,

시험 화합물의 부재 시에 복합체가 형성되는 정도와 비교하여 시험 화합물의 존재 시에 복합체가 형성되는 정도가 통계적으로 유의하게 증가된 경우, 시험 화합물이 FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질 사이의 상호작용의 유도제임을 나타내는 검정법.

청구항 18.

(ⅰ) 전사 활성화 도메인이 검출가능한 유전자에 충분히 근위적으로 존재하여 검출가능한 유전자가 전사 활성화 도메인을 포함하는 아미노산 서열에 의해 활성화되는 경우 검출가능한 단백질을 발현시키는 검출가능한 유전자를 함유하는 숙주 세포를 제공하고;

(ii) (a) 숙주 세포내의 검출가능한 유전자 상의 결합 부위를 인식하는 DNA-결합 도메인; 및 (b) FK506-결합 단백질의 라파마이신-결합 도메인을 포함하는 제1 하이브리드 단백질을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 숙주 세포에서 발현될 수 있는 제1 키메라 유전자로 숙주 세포를 형질전환시키고;

(iii) (a) 전사 활성화 도메인; 및 (b) RAPT1-유사 단백질의 라파마이신-결합 도메인을 포함하는 제2 하이브리드 단백질을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 숙주 세포에서 발현될 수 있는 제2 키메라 유전자로 숙주 세포를 형질전환시키고;

(iv) 제1 하이브리드 단백질 및 제2 하이브리드 단백질이 검출가능한 유전자를 활성화시키기에 충분한 양으로 발현되는 조건으로 숙주 세포를 처리하고;

(v) 시험 작용제와 숙주 세포를 접촉시키고;

(vi) 검출가능한 유전자가 제1 시험 단백질 및 제2 시험 단백질 사이의 상호 작용의 부재시 발현되는 정도 보다 통계적으로 유의하게 큰 정도로 발현되었는 지를 측정하는 것을 포함하여, FK506-결합 단백질과 RAP-결합 단백질의 결합을 유도하는 작용제에 대해 시험 화합물을 스크리닝하기 위한 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인이 분리가능한 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 갖는 전사 활성인자로부터 유래됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인이 전사 활성인자 GAL4, GCN4, LexA, VP16 및 ADR1으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

서열번호 2 및 서열번호 12중 하나 또는 둘 모두와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드에 특이적으로 반응하는 항체.

청구항 22.

서열번호 2의 Val26 내지 Tyr160 및 서열번호 12의 Val2012 내지 Tyr2144 중 하나 또는 둘 모두와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드에 특이적으로 반응하는 항체.

청구항 23.

서열번호 2 및 서열번호 12중 하나 또는 둘 모두와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 항원성 결정인자에 면역특이적인 항체.

청구항 24.

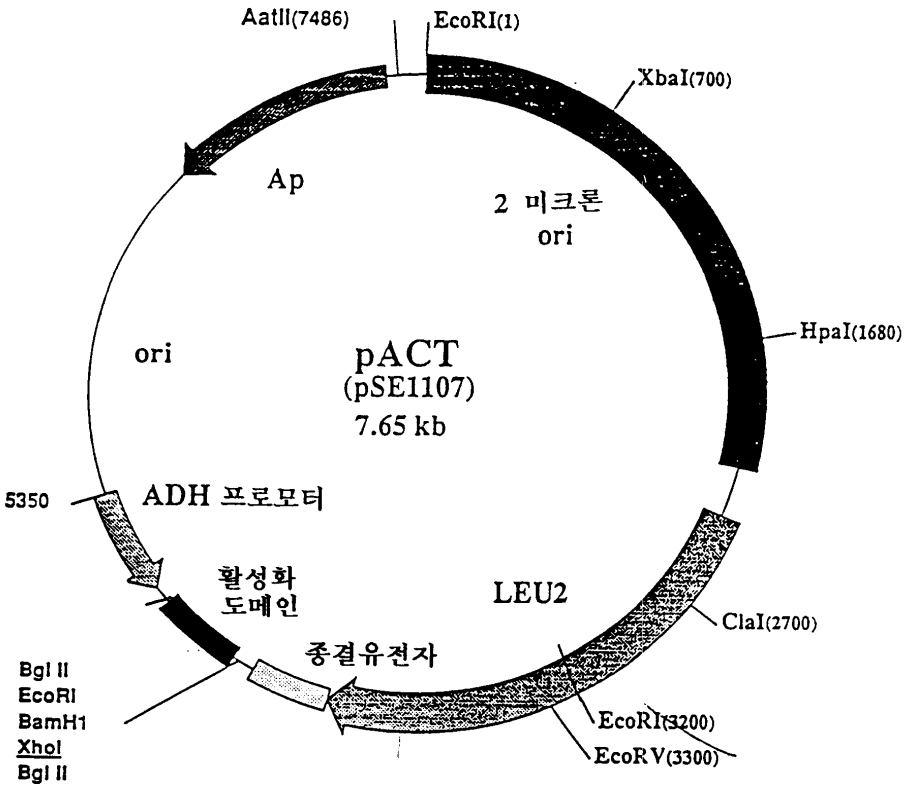
제21항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체임을 특징으로 하는 항체.

청구항 25.

제21항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체임을 특징으로 하는 항체.

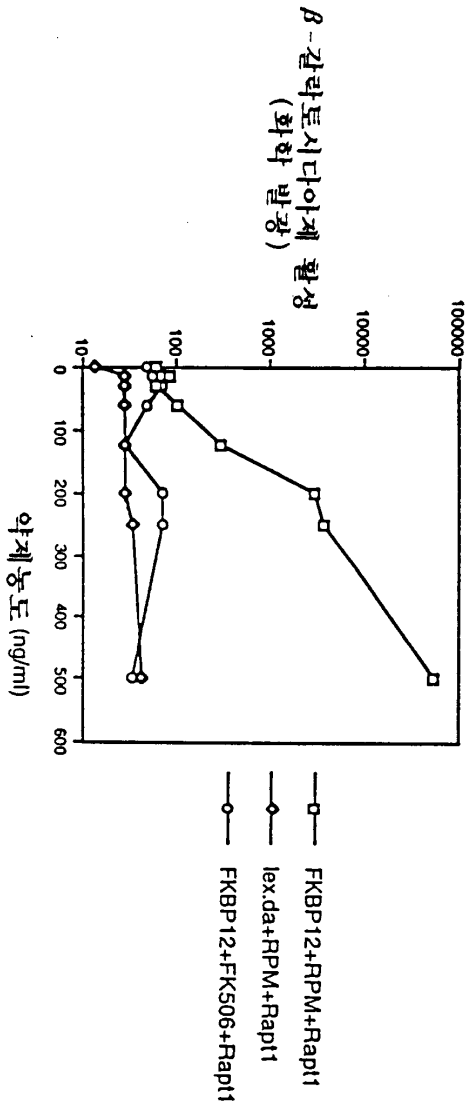
도면

도면1

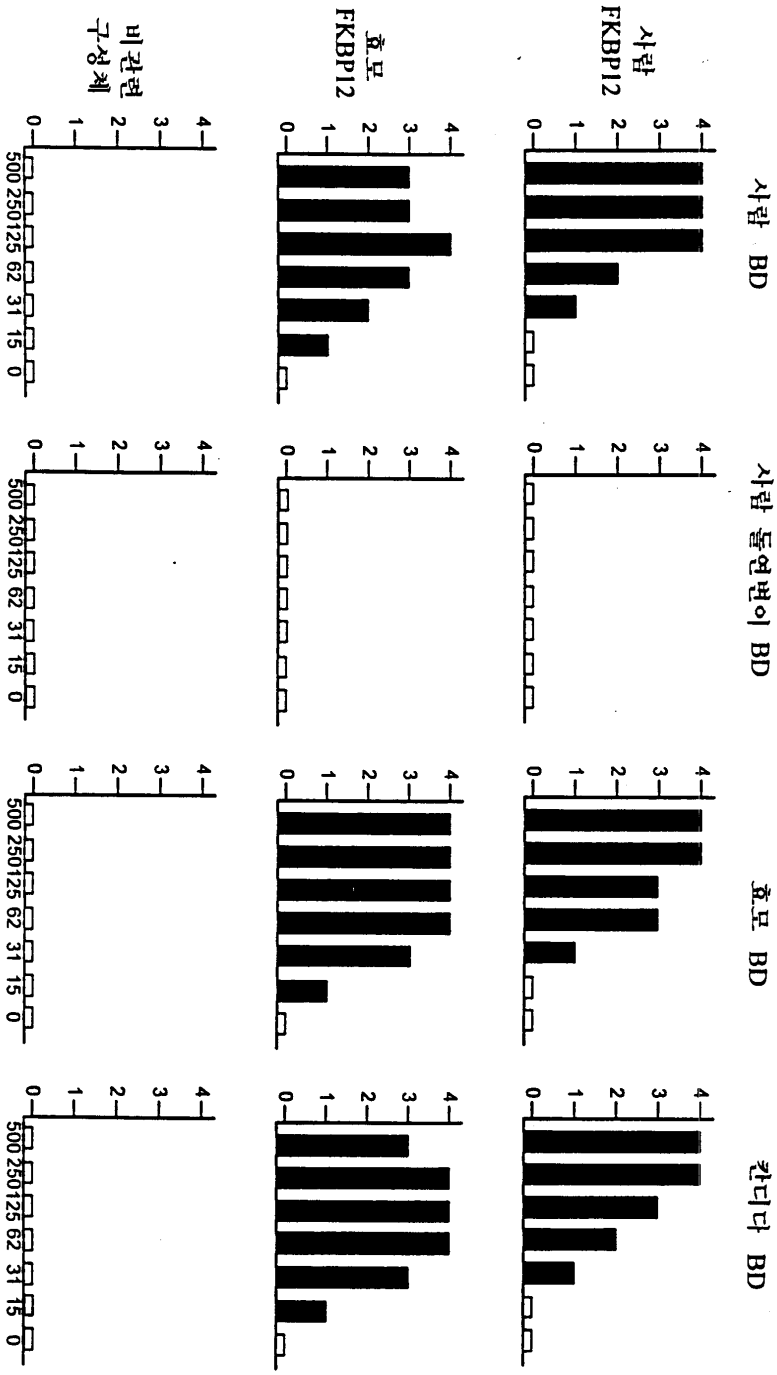


cDNA는 xho I 부위에 삽입된다.

도면2


β-갈락토시다아제 활성
(화학 발광)
100000
10000
1000
100
10
0
100
200
300
400
500
600
약제농도 (ng/ml)
FKBP12+RPM+Rapt1
lex.da+RPM+Rapt1
FKBP12+FK506+Rapt1

도면3


사람 BD
사람 돌연변이 BD
효모 BD
칸디다 BD
사람 FKBP12
효모 FKBP12
비관련 구성체
0
1
2
3
4
500 250 125 62 31 15 0