

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/19  
C07K 14/52  
C07K 16/24  
C12N 5/10  
C12N 15/63

(11) 공개번호 특2000-0064765  
(43) 공개일자 2000년11월06일

(21) 출원번호	10-1998-0707528		
(22) 출원일자	1998년09월 19일		
번역문제출일자	1998년09월 19일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/04329	(87) 국제공개번호	
(86) 국제출원출원일자	1997년03월 19일	(87) 국제공개일자	
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 일본 북한 대한민국 리투아니아 라트비아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 터어키 우즈베키스탄 베트남		
(30) 우선권주장	60/013,653 1996년03월 19일 미국(US)		
(71) 출원인	휴먼 게놈 사이언시즈, 인코포레이티드 벤슨 로버트 에이치. 미국 메릴랜드주 20850-3338 록크빌 키 웨스트 애비뉴 9410		
(72) 발명자	니 지안 미국 메릴랜드주 20853 록빌 매노르필드 로드 5502 겐츠 라이너 엘 미국 메릴랜드주 20904 실버 스프링 페어랜드 파크 드라이브 13404 수 제프리 와이 미국 메릴랜드주 20878 게이더스버그 #304 웨스트 사이드 드라이브 443 리 하오동 미국 메릴랜드주 20878 게이더스버그 러트레지 드라이브 11033		
(74) 대리인	나영환, 이상섭		

심사청구 : 없음

(54) 케모카인 알파 2

요약

본 발명은 인간의 케모카인 알파-2 폴리펩티드, 그러한 주화성 사이토카인을 암호화하는 DNA(RNA) 및 그러한 폴리펩티드를 재조합 기술에 의해 제조하는 방법을 개시한다. 본 발명은 또한 백혈병, 종양, 만성 감염, 자가 면역 질병, 섬유증 질환, 상처 치료 및 건선의 치료에 그러한 주화성 사이토카인을 이용하는 방법도 개시한다. 상기 주화성 사이토카인에 대한 길항물질 및 류마티스 관절염, 자가 면역 질병, 만성 및 급성 염증 질병, 감염성 질병, 알레르기 반응, 프로스타글란딘-무관성 발열 및 골수의 손상을 치료하기 위한 치료제로서의 길항물질의 용도 역시 본 발명에 의해 개시된다. 또한 본 발명은 핵산 서열의 돌연변이와 폴리펩티드의 변화된 농도와 관련된 질병을 검출하는 진단 분석법을 개시한다. 본 발명은 또한 주화성 사이토카인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에서의 돌연변이를 검출하는 진단 분석법 및 숙주내의 그 폴리펩티드의 변화된 레벨을 검출하는 진단 분석법을 개시한다.

대표도

도1

명세서

## 기술분야

본 발명은 신규하게 동정된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드; 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 변형체 및 유도체; 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 이의 변형체 및 유도체를 제조하는 방법; 폴리펩티드의 작용물질 및 길항물질; 및 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 변형체, 유도체, 작용물질 및 길항물질의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 인간 케모카인 알파-2(이하 'CK $\alpha$ -2로 칭함)의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 관한 것이다.

## 배경기술

각종 세포형의 이동과 '수송(trafficking))'을 조절하는 능력은 소세포의 인자 또는 단백질에 의해 조절되며, 이중 하나의 예가 케모카인이다.

인터크린(interocrine) 사이토카인으로도 지칭되는 케모카인은 구조와 기능면에서 관련되어 있는 주화성 사이토카인의 아군이다. 이들 분자의 크기는 8kd 내지 10kd이다. 일반적으로, 케모카인은 아미노산 수준에서 20% 내지 75%의 상동성을 나타내며, 2개의 디설파이드 결합을 형성하는 4개의 보존성이 있는 시스테인 잔기를 가지는 것을 특징으로 한다. 처음 2개의 시스테인 잔기의 배열을 기준으로, 케모카인을 2개의 아군, 즉 알파와 베타로 분류하여 왔다. 알파 아군에서, 처음 2개의 시스테인은 1개의 아미노산에 의해 분리되어 있으므로 'C-X-C' 아군으로 지칭된다. 베타 아군에서는, 2개의 시스테인이 인접한 위치에 있으므로 'C-C' 아군으로 지칭된다. 지금까지, 이 군중 8개 이상의 다른 구성원이 인간에서 동정되었다.

인터크린 사이토카인은 광범위한 기능을 나타낸다. 검증된 특징은 단핵구, 호중구, T 임파구, 호염기구 및 섬유아세포를 비롯한 별개 세포형의 주화성 이동을 유발하는 능력이다. 여러 케모카인은 예비염증 활성을 가지며 염증 반응 과정에서 다단계에 관련되어 있다. 이들 활성은, 히스타민 방출, 리소좀 효소 및 류코트리엔 방출, 내피 세포에의 표적 면역 세포의 부착력의 증가, 보체 단백질의 결합력의 증가, 과립구 부착 분자와 보체 수용체의 발현의 유도 및 호흡 폭발을 촉진하는 것이다. 염증과의 관련 이외에도, 특정 케모카인은 다른 활성을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 예를 들어 대식세포 염증성 단백질 1(MIP-1)은 조혈 간세포(stem cell) 증식을 억제할 수 있고, 혈소판 인자-4(PF-4)는 내피세포 증식의 유효 억제제이며, 인터루킨-3(IL-3)은 각질 세포의 증식을 촉진하며, GRO는 흑색종 세포에 대한 자가분비성 (autocrine) 증식 인자이다.

다양한 생물학적 활성을 고려하면, 케모카인이 임파구 교류, 상처 치유, 조절 조절과 알레르기, 천식 및 관절염 등의 면역 질환을 비롯하여 여러 생리적인 질병 증상과 관련이 있다는 것은 놀라운 일이 아니다.

'C-C' 분자의 구성원들은 하기 세포에 그 영향을 끼친다: 기생체를 파괴하여 기생충 감염을 감소시키고 호흡계의 기도에 만성적인 염증을 유발하는 호산구; 척추 동물의 종양 형성을 억제하는 대식세포; 알레르기 염증에서 중요한 역할을 하는 히스티딘을 방출시키는 호염기구. 그러나, 한 분자의 구성원은 케모카인의 다른 분자에 정상적으로 반응하는 세포에 영향을 끼칠 수 있으며, 따라서 분자들의 구성원과 관련된 정확한 역할을 알 수 없다.

C-C 분자의 구성원이 단핵구 세포상에서 주로 작용하고 C-X-C 분자의 구성원은 호중구상에서 주로 작용하지만, 상기 지칭에 따라서는 케모카인의 명확한 주화인자 특성을 정할 수 없다. 한 군의 일부 케모카인은 다른 군의 특성을 나타낸다.

본 발명의 폴리펩티드는 'C-X-C' 영역의 보존성이 있는 사이토카인 잔기를 가지며, 알려진 케모카인에 대한 아미노산 서열 상동성이 있다.

별개의 세포형의 이동과 장애 및 질병에 대한 이들의 작용을 조절하는 인자가 필요한 것은 명백하다. 따라서, 세포, 특히 면역계 시스템의 세포의 이동을 조절하고, 장애 또는 질병을 예방, 개선 또는 교정할 수 있는 그러한 인자를 동정 및 특성화할 필요가 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개요

본 발명의 제1목적은 특히 도 1(서열 번호 1) 및 도 2(서열 번호 2)에 도시된 아미노산 서열과 도 3 및 도 4(서열 번호 4)에 도시된 중국산 햄스터 GRO 단백질과 같은 기타 단백질의 알려진 아미노산 서열 사이의 상동성에 의해 신규 CK $\alpha$ -2로 동정된 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 제2목적은 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 구체적으로는 본원에서 CK $\alpha$ -2로 명명한 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 제2목적의 특히 바람직한 일양태에서, 폴리뉴클레오티드는 도 1 및 도 2(서열 번호 1)에 도시된 서열중 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 영역을 포함한다.

본 발명의 상기 양태에 따라서, 본 발명은 1996년 1월 2일에 기탁된 ATCC 기탁 번호 97400호에 포함되어 있는 인간 cDNA에 의해 발현되는 성숙 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다.

본 발명의 상기 양태에 따라서, 본 발명은 mRNA, cDNA, 게놈 DNA를 비롯하여 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공하며, 본 발명의 또 다른 양태들에서는, 생물학적, 진단학적, 임상적 또는 치료학적으로 유용한 이 핵산 분자의 변형체, 유사체 또는 유도체나, 변형체, 유사체 및 유도체의 단편을 비롯한 이 핵산 분자의 단편을 제공한다.

특히 바람직한 양태로서, 본 발명은 인간 CK $\alpha$ -2의 자연 발생적인 대립 유전자 변형체를 제공한다.

본 발명의 제3의 목적은 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드, 특히 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 제공하는 것이며, 이는 예를 들어 종양, 만성 감염, 백혈병, T-세포 매개된 자가면역 질환, 기생충감염, 건선, 천식, 알레르기의 예방

및/또는 치료, 조절 조절, 증식 인자 활성화 자극, 혈관형성 억제 및 상처 치유 촉진 등의 치료용으로 사용할 수 있다.

본 발명의 제3목적에 따라서, 본 발명은 본원에서 CK $\alpha$ -2로 명명한 인간 유래의 신규한 폴리펩티드 뿐만 아니라 생물학, 진단학 또는 치료학적으로 유용한 이들 폴리펩티드의 단편, 변형체 및 유도체, 단편의 변형체와 유도체, 및 전술한 유사체를 제공한다.

특히 바람직한 일양태로서, 본 발명은 인간 CK $\alpha$ -2 유전자의 자연 발생적 대립 유전자에 의해 암호화되는 인간 CK $\alpha$ -2의 변형체를 제공한다.

본 발명의 제4목적은 전술한 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 변형체 및 유도체, 변형체와 유도체의 단편, 및 전술한 유사체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 바람직한 일양태에서, 숙주 세포내에서 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 조건하에, 외래에서 유래한 인간 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 내부로 발현가능하게 삽입한 숙주 세포를 배양시키는 단계와, 발현된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하여, 전술한 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 제5목적은 연구, 생물학적, 임상적 및 치료학적 용도를 위해 전술한 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드를 이용한 생성물, 조성물, 공정 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제5목적의 특성의 바람직한 양태로는, 무엇보다도 특히 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드 또는 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 mRNA를 측정함으로써 세포내 CK $\alpha$ -2 발현을 평가하고; CK $\alpha$ -2 유전자중 결손과 같은 유전적 변형 및 이상을 분석하고; 및 유기체에게 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 투여하여 CK $\alpha$ -2 작용을 증가시키거나 또는 CK $\alpha$ -2 장애를 구제하기 위한 방법, 조성물 및 생성물을 제공한다.

본 발명의 제5목적과 기타 목적의 특성의 바람직한 양태로서는, 인간 CK $\alpha$ -2 서열에 하이브리드화된 프로브를 제공한다.

본 발명의 제5목적의 또 다른 바람직한 양태들에서는, CK $\alpha$ -2 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다. 이와 관련하여 특히 바람직한 양태들에서, 항체는 인간 CK $\alpha$ -2에 높은 선택성이 있다.

본 발명의 제6목적은 CK $\alpha$ -2 작용물질을 제공하는 것이다. 바람직한 작용물질은 CK $\alpha$ -2 결합 분자 또는 수용체 분자에 결합하고, CK $\alpha$ -2에서 유도된 반응을 유발하거나 증대시키는 CK $\alpha$ -2와 유사한 분자이다. 또한 바람직한 작용물질은 CK $\alpha$ -2나 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드, 또는 기타 CK $\alpha$ -2 활성 조절인자와 상호작용하고, 따라서 CK $\alpha$ -2의 효과 또는 하나 이상의 CK $\alpha$ -2 효과를 가능하게 하거나 증가시키는 분자이다.

본 발명의 제7목적은 CK $\alpha$ -2 길항물질을 제공하는 것이다. 바람직한 길항물질은 CK $\alpha$ -2와 유사하여 CK $\alpha$ -2 수용체 또는 결합 분자에 결합하나 CK $\alpha$ -2에서 유도된 반응 또는 하나 이상의 CK $\alpha$ -2에서 유도된 반응을 유발하지 않는 물질이다. 또한 바람직한 길항 물질은 CK $\alpha$ -2에 의해 매개된 질병 및 장애를 치료하기 위해서, CK $\alpha$ -2와 결합하거나 상호작용하여 CK $\alpha$ -2의 효과 또는 하나 이상의 CK $\alpha$ -2 효과를 억제하거나, 또는 CK $\alpha$ -2의 발현을 방지하는 분자이다.

본 발명의 제8목적은 시험관내 세포, 생체외 세포 및 생체내 세포에, 또는 다세포 유기체에 투여하기 위한 CK $\alpha$ -2 폴리뉴클레오티드 또는 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 이 목적에 대한 특히 바람직한 양태들에서, 조성물은 숙주 유기체에서 질병을 치료하기 위한 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 발현시키는 CK $\alpha$ -2 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이와 관련하여 특히 바람직한 일양태에서는 CK $\alpha$ -2의 내인성 이상 활성화와 관련이 있는 장애를 치료하기 위해 인간 환자에서 이 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 발현시킨다.

본 발명의 기타의 목적, 특징, 장점 및 양태들은 하기의 설명으로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자들라면 분명하게 알 수 있을 것이다. 그러나, 하기의 상세한 설명 및 특정 실시예는 본 발명의 바람직한 양태들을 나타내지만 단지 예시용라는 것을 인지해야 한다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기의 상세한 설명 및 본 발명에 개시된 다른 부분으로부터 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형에 및 개조제가 가능하다는 것을 쉽게 알 수 있을 것이다.

바람직한 양태들의 상세한 설명

하기의 예시적 설명은 본원, 특히 실시예에 종종 사용되는 특정 용어의 이해를 용이하게 하기 위해 제시하는 것이다.

DNA의 '분해(digestion)'는 DNA에서 특정 서열에만 작용하는 제한 효소로 DNA를 촉매적으로 절단하는 것을 의미한다. 본원의 각종 제한 효소는 시판되는 것이며, 이를 사용하기 위한 반응 조건, 보조인자 및 기타 필수조건들은 알려져 있으며 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게는 일상적인 것이다.

분석 목적을 위해, 통상 플라스미드 또는 DNA 단편 1 $\mu$ g을 약 20  $\mu$ l의 반응 완충액중의 약 2 유닛의 효소에 의해 분해한다. 플라스미드 작제를 위해 DNA 단편을 분리하기 위해서, 통상 DNA 5  $\mu$ g 내지 50  $\mu$ g를 비례적으로 더 큰 거대 부피에서 효소 20 내지 250 유닛에 의해 분해한다. 특정한 제한 효소용으로 적절한 완충액 및 기질의 양은 표준 실험실용 지침서(예, 후술)에 개시되어 있으며, 지침서는 시판용 공급원자들이 명기하였다.

일반적으로 37 °C에서 약 1 시간 동안 항온처리하지만, 표준 절차, 공급자의 지시 및 반응의 특색에 따라서 조건을 다양하게 할 수 있다. 분해 후에, 반응물을 분석하고, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 일상적인 공지된 방법을 사용하여 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔을 통한 전기 영동법으로 단편을 정제할 수 있다.

'유전 인자(genetic element)'는 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 영역이나, 전사 또는 해독이나 숙주세포에서 폴리펩티드를 발현하는 데 중요한 기타 과정을 조절하는 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리펩티드를 암호화하는 영역과 발현을 조절하도록 작동가능하게 결합된 영역을 모두 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

유전 인자를 에피솜 인자(즉, 숙주 세포의 게놈과 물리학적으로 무관한 분자)로서 복제되는 벡터내에 포함시킬 수 있다. 유전 인자를, 진핵 세포에서 메토크세이트 선별로 형질감염된 DNA의 증폭 과정에서 발생하는 것과 같은, 미니-염색체내에 포함시킬 수 있다. 유전 인자를 숙주 세포의 게놈내에 포함시킬 수도 있다; 자연 상태에서가 아니라, 분리, 클로닝 및 숙주 세포내로의 도입과 같은 조작 후에 정제된 DNA 형태로 또는 벡터로 숙주 세포의 게놈내에 포함시킬 수 있다.

'분리된(isolated)'은 자연 상태에서부터 '인간의 손에 의해' 변경된다는 것을 의미한다. 즉 자연 상태에서 발생하는 경우, 본래 환경으로부터 변화 또는 제거되거나, 또는 변화 및 제거된다. 예를 들어, 자연 발생적 폴리뉴클레오티드 또는 자연 상태에서 생존하고 있는 동물내에 자연적으로 존재하는 폴리펩티드는 '분리된' 것이 아니지만, 자연 상태에서 공존하는 물질로부터 분리한 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 본원에 사용되는 용어대로 '분리된' 것이다. 예컨대 폴리뉴클레오티드에 대하여, '분리된'은 그것을 자연적으로 발생시키는 염색체와 세포로부터 분리된 것을 의미한다.

분리 과정의 일부로서 또는 분리 후에, 예를 들어 상기 폴리뉴클레오티드를 DNA와 같은 다른 폴리뉴클레오티드에 연결하여 융합 단백질 형성을 위해 돌연변이를 유발하고 숙주내에서 증식 및 발현시킬 수 있다. 단독 또는 벡터와 같은 기타 폴리뉴클레오티드에 연결시킨 분리된 폴리뉴클레오티드를 배양물 또는 전체 유기체의 숙주세포내로 도입시킬 수 있다. 배양물이나 전체 유기체의 숙주 세포내로 도입시킨 경우, 이러한 DNA는 본원에서 사용하는 용어대로 분리될 수 있는데, 이는 상기 DNA가 자연 발생적 형태 또는 환경에 존재하는 형태가 아니기 때문이다. 유사하게, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 조성물의 형태로 존재할 수 있는데, 예를 들어 배지 제제, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 예컨대 세포내로 도입하기 위한 용액, 화학 반응이나 효소 반응용 조성물 또는 용액으로 존재할 수 있으며, 이들은 자연 발생적인 조성물이 아니며, 그 조성물내에 본원에서 사용한 용어의 의미의 범위내의 분리된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드로 잔존하는 것이다.

'결찰(ligation)'은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 사이의 포스포디에스테르 결합을 형성하는 과정을 의미하는 것이며, 가장 일반적인 폴리뉴클레오티드는 2분쇄 DNA이다. 결찰 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 결찰을 위한 프로토콜은 표준 실험실 지침서 및 참고 문헌, 예컨대 Sambrook 등의 문헌[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 판; 콜드 스프링 하버 래보러터리즈 프레스, 콜드 스프링 하버, 뉴욕 (1989)] 및 문헌[후술하는 Maniatis 등의 문헌, p 146, 후술]에 개시되어 있다.

'올리고뉴클레오티드(들)'은 상대적으로 짧은 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 종종 이 용어는 1분쇄 대옥 시리보뉴클레오티드를 의미하지만, 1분쇄 또는 2분쇄 리보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 2분쇄 DNA를 의미할 수 있다.

종종 1분쇄 DNA 프로브 올리고뉴클레오티드 등의 올리고뉴클레오티드는 예컨대 자동 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하는 방법 등의 화학적 방법으로 합성한다. 그러나, 시험관내 재조합 DNA-매개된 기술을 비롯한 각종 방법과 세포 및 유기체내에서 DNA를 발현시키는 방법으로 뉴클레오티드를 제조할 수 있다.

처음에, 화학적으로 합성된 DNA는 통상 5' 포스페이트 없이 얻어진다. 이러한 올리고뉴클레오티드의 5' 말단은, 재조합 DNA 분자를 형성하는 데 통상 사용하는 DNA 리가제를 이용한 결찰 반응에 의한 포스포디에스테르 결합 형성의 기질이 아니다. 올리고뉴클레오티드의 결찰을 원하는 경우, 표준 기술, 예컨대 키나제와 ATP를 사용하는 기술로 포스페이트를 첨가할 수 있다.

화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드의 3' 말단은 일반적으로 히드록실기가 없으며 T4 DNA 리가제와 같은 리가제의 존재하에 또 다른 폴리뉴클레오티드, 예컨대 다른 올리고뉴클레오티드의 5' 포스페이트와 포스포디에스테르 결합을 용이하게 형성할 것이다. 알려진 바와 같이, 필요에 따라 결찰전에 다른 폴리뉴클레오티드(들)의 5' 포스페이트를 제거하므로써 반응을 선택적으로 방지할 수 있다.

일반적으로 '플라스미드'는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 익숙한 표준 명명 조약에 따라서 대문자 및/또는 숫자의 앞 및/또는 뒤에 소문자 p를 표시하여 명명한다.

본원에 개시된 출발 플라스미드는 시판되고 비제한적으로 널리 이용할 수 있는 것이거나, 또는 알려지고 발표된 절차와 적용하여 이용가능한 플라스미드로부터 작제할 수 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 여러 플라스미드와 기타 클로닝 및 발현 벡터는 널리 알려져 있으며, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 사용할 수 있다. 더구나, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자들은 본 발명에 사용하기 적합한 임의의 다수 플라스미드를 용이하게 작제할 수 있다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 플라스미드 뿐만 아니라 기타 벡터의 특성, 작제 및 용도를 본원에 개시된 내용으로부터 용이하게 알 수 있을 것이다.

일반적으로 '폴리뉴클레오티드(들)'는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 의미하며, 이들은 변형되지 않은 RNA 또는 DNA이거나 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. 따라서, 본원에서 사용한 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 1분쇄 DNA, 2분쇄 DNA, 1분쇄와 2분쇄 영역이 혼합된 DNA; 1분쇄 RNA, 2분쇄 RNA, 1분쇄와 2분쇄 영역이 혼합된 RNA; 1분쇄, 더욱 전형적으로는 2분쇄, 또는 1분쇄와 2분쇄 영역이 혼합되어 있는 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 의미한다. 또한, 본원에서 사용한 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA나 RNA와 DNA를 모두 포함하는 3분쇄 영역을 의미한다. 이들 영역의 가닥은 동일한 분자 또는 상이한 분자에서 유래한 것일 수 있다. 이 영역은 하나 이상의 분자의 전부를 포함할 수 있으나, 통상 분자의 일부 영역만을 포함한다. 3중-나선 영역의 분자중 하나는 종종 올리고뉴클레오티드이다.

본원에서 사용한 폴리뉴클레오티드라는 용어는 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 전술한 DNA 또는 RNA를 포함한다. 따라서, 안정성 또는 기타의 이유에서 변형된 골격 구조를 가지는 DNA 또는 RNA가 본원에서 의미하는 용어로서의 '폴리뉴클레오티드'이다. 더구나, 일반적이지 않은 염기, 예컨대 이노신, 또는 변형된 염기(예; 트리틸화된 염기)를 포함하는 DNA와 RNA는 단지 2가지 예만을 지정하였지만 이들은 본원에서 사용하는 용어로서의 폴리뉴클레오티드이다.

당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 여러 가지 유용한 용도로 작용하는 DNA와 RNA에 각종

변형을 일으킬 수 있음을 이해할 것이다. 본원에서 사용한 폴리뉴클레오티드란 용어에는 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태의 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 특히 단순 세포와 복합 세포를 비롯한 세포 및 바이러스의 특징적인 DNA 및 RNA의 화학적 형태도 포함한다.

본원에서 사용한 '폴리펩티드'는 후술하는 모든 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드의 영기 구조는 널리 알려져 있으며, 헤아릴 수 없이 많은 당업계의 교과서 및 기타 출판물에 개시되어 있다. 본원에서, 이 용어는 펩티드 결합에 의해 직쇄상에서 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 의미한다. 본원에서 사용한 바와 같이, 이 용어는 통상 당업계에서 예컨대 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 지칭되는 단쇄와 일반적으로 당업계에서 단백질로 지칭되는 장쇄를 모두 의미하며, 여기에는 여러 유형이 있다.

종종 폴리펩티드는 일반적으로 20개의 자연 발생 아미노산으로 지칭되는 20개의 아미노산 이외의 아미노산을 포함하며, 말단 아미노산을 비롯하여 여러 아미노산은 프로세싱 및 기타 해독후 변형과 같은 자연적인 처리 과정에 의해서 뿐만 아니라 당업계에 공지된 화학적 변형 기술에 의해서 주어진 폴리펩티드를 변형시킬 수 있다. 폴리펩티드에서 자연적으로 발생하는 일반적인 변형은 너무 다양하여 일일이 열거할 수 없으나, 기본서 및 더 상세한 전문서적과 다양한 연구 문헌에 잘 개시되어 있으며, 이들 변형은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 공지되어 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 존재할 수 있는 알려진 변형 방법의 몇가지 예로는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 결합, 헴 부분의 공유 결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 포스포티달리노시톨의 공유 결합, 교차 결합, 환형화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 교차 결합의 형성, 시스틴의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 고정부 형성, 히드록실화, 요소화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 분해 처리, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화 및 같이 단백질에 아미노산의 전이 RNA-매개된 첨가, 및 유비퀴틴화가 있다.

이러한 변형은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있으며 과학 문헌에 상세히 기술되어 있다. 몇가지 특히 일반적인 변형법으로는 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 히드록실화 및 ADP-리보실화가 있으며, 이는 예컨대 대부분의 기본서, 예컨대 문헌[Creighton, T.E., *Proteins—Structure And Molecular Properties*, 2판, 더블유.에이치.프리만 앤드 컴퍼니, 뉴욕 (1993)]에 개시되어 있다. 이를 고찰하기 위해서 여러 문헌[Wold F., 'Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects,' in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Johnson B.C. 판, 아카데미 프레스, 뉴욕 (1983), p1-12; Scifter 등, 'Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors,' *Meth. Enzymol.* 182:626-646(1990), 및 Rattan 등, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)]을 이용할 수 있다.

널리 공지되어 있으며 전술한 바와 같이, 폴리펩티드는 항상 전체적으로 선형인 것은 아니다. 예컨대, 폴리펩티드는 유비퀴틴화의 결과로서 분지되어 있을 수 있으며, 자연 프로세싱 조작 및 자연적으로 발생하지 않는 인간의 조작에 의해 생기는 조작(들)을 비롯하여, 일반적으로 해독후 조작의 결과로서 분지되거나 분지되지 않은 환형일 수 있다. 환형 폴리펩티드, 분지형 폴리펩티드 및 분지된 환형 폴리펩티드는 비-해독 자연적 과정과 완전 합성 방법에 의해 합성될 수 있다.

펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 비롯한 펩티드의 어느 곳에서도 변형이 발생할 수 있다. 사실, 공유 결합 변형에 의한 폴리펩티드의 아미노기 또는 카르복실기, 또는 둘 모두의 차단은 자연 발생적 폴리펩티드 및 합성 폴리펩티드에 공통되며, 그러한 변형은 또한 본 발명의 폴리펩티드에도 존재할 수 있다. 예컨대, 단백질 분해 프로세싱 전에 이. 콜리(*E. coli*)에서 제조된 폴리펩티드의 아미노 말단 잔기는 거의 항상 N-포르밀메티오닌일 것이다.

폴리펩티드에서 발생하는 변형은 종종 제조하는 방법에 따라 달라질 것이다. 숙주에서 클로닝된 유전자를 발현하므로써 제조된 폴리펩티드의 경우, 예컨대 대부분의 변형의 성질 및 정도는, 폴리펩티드 아미노산 서열에 존재하는 변형 신호와 숙주 세포 해독후 변형 능력으로 결정될 것이다. 예를 들어, 널리 알려진 바와 같이, 글리코실화는 종종 이.콜리와 같은 박테리아 숙주에서는 발생하지 않는다. 따라서, 글리코실화를 원하는 경우, 폴리펩티드는 글리코실화가 가능한 숙주, 일반적으로 진핵 세포에서 발현되어야 한다. 종종 곤충 세포는 포유 동물에서와 동일한 해독후 글리코실화를 수행하기 때문에, 곤충 세포 발현 시스템을 개발하여 글리코실화의 천연 패턴을 가진 포유동물 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있다. 이와 유사하게 기타의 변형에도 이러한 고려 사항을 적용한다.

동일한 유형의 변형이 주어진 폴리펩티드의 여러 부위에서 동일한 정도로 또는 다양한 정도로 존재할 수 있다. 또한 주어진 폴리펩티드는 여러 종류의 변형을 포함할 수 있다.

일반적으로, 본원에서 사용한 폴리펩티드란 용어에는 그러한 모든 변형, 특히 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현하므로써 합성된 폴리펩티드에 존재하는 변형을 포함한다.

본원에서 사용한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 '변형체(들)'는 각각 기준 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와는 다른 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드이다. 이러한 의미의 변형체는 본 명세서의 도처에 더 상세하게 기술되어 있다.

폴리뉴클레오티드 변형체는 또 다른 기준 폴리뉴클레오티드와 뉴클레오티드 서열이 다른 변형체이다. 일반적으로 기준 뉴클레오티드 서열과 변형체의 뉴클레오티드 서열은 전체적으로 매우 유사하고 여러 영역에서 동일하도록 두 뉴클레오티드 서열의 차이는 제한된다. 후술하는 바와 같이, 변형체의 뉴클레오티드 서열의 변화는 침묵상태일 것이다. 즉, 그러한 변화는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 아미노산을 변경하지 않을 수도 있다. 변경이 이러한 유형의 침묵 변형에 한정되는 경우, 변형체는 기준 서열과 동일한 아미노산 서열을 암호화할 것이다. 또한 후술하는 바와 같이, 변형체의 뉴클레오티드에서의 변화는 기준 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시킬 수 있다. 후술하는 바와 같이 이러한 뉴클레오티드 변화는, 기준 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드중 아미노산 치환, 첨가, 결실, 융합 및 절단을 초래할 수 있다.

폴리펩티드 변형체는 또 다른 기준 폴리펩티드와 아미노산 서열이 다른 변형체이다. 일반적으로 기준 서열과 변형체의 서열이 전체적으로 거의 유사하고 여러 영역이 동일하게 되도록 두 서열의 차이는 제한된다. 변형체 폴리펩티드와 기준 폴리펩티드는 1개 이상의 치환, 첨가, 결실, 융합 및 절단(이들의 임의의 조합도 가능함)으로 인하여 아미노산 서열이 다를 수 있으며, 임의의 조합체로 존재할 수 있다.

본원에서 사용한 '수용체 분자'는 바람직한 고유의 수용체 뿐만 아니라 본 발명의 폴리펩티드와 특이적으로 결합 또는 상호작용하는 기타 분자를 비롯하여, 본 발명의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드와 특이적으로 결합 또는 상호작용하는 분자를 의미한다(또한, 각각 '결합 분자'와 '상호작용 분자' 및 'CK $\alpha$ -2 결합 분자'와 'CK $\alpha$ -2 상호작용 분자'로 칭하기도 함). 본 발명의 폴리펩티드와, 수용체 또는 결합 분자나 상호작용 분자를 비롯한 분자 사이의 결합은 본 발명의 폴리펩티드에 대해 유일한 것일 수 있는데, 이는 매우 바람직한 것이며, 본 발명의 폴리펩티드에 대해 매우 특이성이 있을 수 있는데, 이는 매우 바람직하며, 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 단백질의 군에 매우 특이적일 수 있는데, 이는 바람직하며, 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 하나 이상의 단백질 군에 특이적일 수 있다. 또한 수용체는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 및 항체에서 유래된 시약과 같이 비자연 발생적일 수 있다.

하기에 상세히 기술하는 바와 같이 본 발명은 신규의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 신규의 인간 CK $\alpha$ -2의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 이는 중국산 햄스터 GRO에 대한 아미노산 서열 상동성에 의해 연관관계가 있다. 본 발명은 특히 서열 번호 1 및 서열 번호 2에 제시된 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 가지는 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드와, 기탁된 클론 내의 인간 cDNA의 CK $\alpha$ -2 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 관한 것이다. 도 1 및 도 2에 개시된 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 기탁된 클론의 인간 cDNA를 서열결정하여 얻었다. 따라서, 기탁된 클론의 서열은 이들 서열 사이의 불일치를 조절하며, 도 1 및 도 2의 서열에 관한 언급은 기탁 클론의 인간 cDNA의 서열에 관한 언급을 포함하는 것이다.

본 발명은 도 1 및 도 2의 추정 아미노산 서열을 가지는 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본원에서 제공된 정보, 예컨대 도 1 또는 도 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열을 이용하여, 인간 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 표준 클로닝 과정과 선별 과정, 예컨대 출발물질로서 인간 조직 세포에서 유래한 mRNA로 cDNA를 클로닝하기 위한 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 본 발명의 실례로서, 도 1 및 도 2에 제시된 폴리뉴클레오티드는 6주령의 태아의 세포에서 유래한 cDNA 라이브러리에서 발견하였다.

본 발명의 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드는, 기탁 클론내에 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 인간 cDNA를 서열 결정하므로써 알 수 있는 바와 같이 케모카인 군의 기타 단백질과 구조적으로 관련이 있다. 이렇게 하여 얻은 cDNA 서열은 도 1 및 도 2에 제시되어 있으며 2개의 가능한 개방 해독들을 포함하는 것으로 보인다. 도 1에 도시된 하나의 개방 해독들은 추정 분자량이 약 10 kDa이고 추정 리더 서열이 약 28 아미노산인 약 111 아미노산 잔기(서열 번호 2)의 단백질을 암호화한다. 이 단백질은 알려진 단백질중 중국산 햄스터 GRO(서열 번호 4)에 가장 큰 상동성을 나타낸다(도 3). 도 1의 전체 CK $\alpha$ -2 단백질은 중국산 햄스터 GRO 단백질의 아미노산 서열과의 동일성이 약 32% 이고 유사성이 약 50% 이다.

도 2에 도시된 제2 개방 해독들은 추정 분자량이 약 8.6 kDa이고 추정 리더 서열이 약 16 아미노산인 약 99 아미노산 잔기(서열 번호 3)의 단백질을 암호화한다. 이 단백질은 알려진 단백질 중 중국산 햄스터 GRO(서열 번호 4)에 대해 가장 큰 상동성을 나타낸다(도 4).

수많은 진핵세포의 mRNA는 상이한 AUG 코돈을 이용하여 1 이상의 전사체를 암호화한다는 것을 보여준다. 진핵 세포에서, 해독 출발점으로 AUG 코돈을 선택하는 것은 mRNA 분자의 5' 말단에 캡과 관련된 코돈의 위치와 그 코돈 주변의 뉴클레오티드로부터 결정한다. 제1 AUG 코돈이 전사를 개시하기에 좋지 않은 위치에 있는 경우, 다수의 리보솜은 이 코돈을 뺄리고 mRNA 분자중의 다른 AUG 코돈으로 진행한다. 결과적으로, 다수의 해독 생성물이 동일한 mRNA 분자로부터 생성될 수 있다. 본 발명의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA는 그러한 mRNA 분자로부터 생성된 것으로 생각된다. 또한, 서열 번호 2 및 서열 번호 3에 도시된 2개의 해독 생성물이 생성될 것으로 생각된다. 이들 생성물은 추정 리더 서열의 길이 면에서 다양하다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는, mRNA와 같은 RNA의 형태로, 또는 cDNA 및 게놈 DNA를 비롯한 DNA의 형태로 존재할 수 있으며, 이는 클로닝 기술에 의해 얻거나 또는 화학적 합성 기술에 의해 생성하거나 또는 이의 조합 방법에 의해 생성한다. DNA는 2분체 또는 1분체일 수 있다. 1분체 DNA는 센스 가닥으로도 알려진 암호 가닥이거나, 또는 안티센스 가닥으로도 알려진 비-암호 가닥일 수 있다.

폴리펩티드를 암호화하는 암호 서열은 도 1 및 도 2에 도시된 폴리뉴클레오티드의 암호 서열과 동일할 수 있다. 또한 암호서열은, 유전자 코드의 중복(축퇴)의 결과로서, 도 1 및 도 2에 표시된 DNA의 폴리펩티드를 암호화하는 상이한 서열을 가진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

도 1 및 도 2의 폴리펩티드를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 하기 서열들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다; 성숙 폴리펩티드에 대한 암호 서열(단독); 성숙 폴리펩티드에 대한 암호서열과 추가의 암호 서열, 예컨대 프리단백질 서열, 프로단백질 서열 또는 프리프로단백질 서열 등의 리더 서열 또는 분비 서열을 암호화하는 서열; 전술한 추가의 암호 서열의 존재 또는 부재하에 추가적인 비-암호 서열과 함께 성숙 폴리펩티드의 암호 서열; 추가의 아미노산 서열을 암호화하는 추가의 암호 서열, 예컨대 추가적인 기능을 제공하는 서열. 상기 비-암호 서열의 비제한적인 예로는 인트론 및 비-암호 5' 및 3' 서열, 예컨대 전사, mRNA 프로세싱(예, 편집 및 폴리아데닐화 신호), 리보솜 결합 및 mRNA의 안정성에 중요한 역할을 하는 전사되나 해독되지 않는 서열이 있다. 따라서, 융합 폴리펩티드의 정제를 용이하게 하는 마커 서열에, 예컨대 펩티드에 폴리펩티드를 융합시킬 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 마커 서열은 pQE 벡터(퀴아겐 인코포레이티드)에 제공된 표지(tag)와 같은 핵사-히스티딘 펩티드이며, 그 대부분은 시판되고 있다. 예를 들어 Gentz 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:821-824 (1989)]에 개시된 바와 같이, 핵사-히스티딘은 융합 단백질의 간편한 정제를 위해 제공된다. HA 표지는 인플루엔자

혈구응집소 단백질에서 유래한 에피토프에 해당하며, 예를 들어 Wilson 등의 문헌[Cell 37:767(1984)]에 개시되어 있다.

전술한 바에 따라서, 본원에서 사용한 '폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드'는 본 발명의 폴리펩티드, 특히 도 1 및 도 2에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이 용어는 추가의 영역과 함께 폴리펩티드(예컨대, 인트론이 개재된 폴리펩티드)를 암호화하는 단일 연속 영역 또는 불연속 영역을 포함하고, 암호 및/또는 비-암호 서열을 포함할 수도 있는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

본 발명은 또한, 도 1 및 도 2의 추정 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체를 암호화하는 전술한 폴리뉴클레오티드의 변형체에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드 변형체는 자연 발생적인 대립 유전자 변형체와 같이 자연 발생적인 변형체이거나, 또는 자연적으로 발생하는 것으로 알려지지 않은 변형체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 비-자연 발생적 변형체는 돌연변이 형성 기술을 폴리뉴클레오티드, 세포 또는 유기체에 적용하여 제조할 수 있다.

이 경우의 변형체는 뉴클레오티드 치환, 결실 또는 첨가에 의해 전술한 폴리펩티드와 상이한 변형체이다. 치환, 결실 또는 첨가는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 변형체는 암호 영역 또는 비암호 영역 또는 두 영역에서 변경될 수 있다. 암호 영역에서의 변경은 보존성이 있거나 보존성이 없는 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 일으킬 수 있다.

본 발명의 특히 바람직한 양태는 도 1 및 도 2에 제시된 CK $\alpha$ -2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 이의 변형체, 유사체, 유도체 및 단편과, 변형체의 단편, 유사체의 단편 및 유도체의 단편이다.

CK $\alpha$ -2 변형체, 유사체, 유도체 및 단편, 이 단편의 변형체, 유사체 및 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 특히 바람직하며, 이는 아미노산 잔기의 여러개, 소수개, 5 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 2개, 1개 또는 0개가 치환, 결실 또는 첨가되거나, 이들 치환, 결실 또는 첨가가 조합된 도 1 및 도 2의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가진다. 이 중에서 CK $\alpha$ -2의 활성 및 특성을 변경시키지 않는 침묵 치환, 첨가 및 결실이 특히 바람직하다. 보존성이 있는 치환도 특히 바람직하다. 치환 없이 도 1 및 도 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 가장 바람직하다.

본 발명의 또 다른 바람직한 양태는 도 1 및 도 2에 제시된 아미노산 서열을 가지는 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 70% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드와 이 폴리뉴클레오티드에 상보적인 폴리뉴클레오티드이다. 대안적으로, 기탁 클론의 인간 cDNA의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 80% 이상 동일한 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 이에 상보성이 있는 폴리뉴클레오티드가 가장 바람직하다. 이 경우, 상기 폴리뉴클레오티드와 90% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드가 특히 바람직하며, 이중 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드가 특히 더 바람직하다. 또한, 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드 중 97% 이상인 것이 매우 바람직하며, 그 중 98% 이상인 것과 99% 이상인 것이 더욱 더 바람직하며, 이중 99% 이상인 것이 더 바람직하다.

또한, 특히 바람직한 양태는 도 1 및 도 2의 인간 cDNA에 의해 암호화되는 성숙 폴리펩티드와 같이 거의 동일한 생물학적 기능과 활성을 보유하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

본 발명은 전술한 서열에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 특히 본 발명은 엄중(stringent) 조건하에서 전술한 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화시킨 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에서 사용한 '엄중 조건'은 서열 사이에서 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상 동일성이 있는 경우에만 하이브리드화가 발생하는 것을 의미한다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드 분석에 대해 본원에 개시한 바와 같이, 예컨대 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 cDNA 및 게놈 DNA에 대한 하이브리드화 프로브로 사용하여 전장 cDNA 및 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 클론과 인간 CK $\alpha$ -2 유전자에 대해 높은 서열 유사성을 가지는 기타 유전자의 cDNA 및 게놈 클론을 분리할 수 있다. 이 프로브는 일반적으로 15 이상의 염기를 포함할 것이다. 바람직하게는, 이 프로브는 30 이상의 염기를 가지며, 50 개 이상의 염기를 포함할 수 있다.

예를 들어, CK $\alpha$ -2 유전자의 암호 영역은 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성하기 위해서 알려진 DNA 서열을 이용하여 검색하므로써 분리할 수 있다. 이어서, 본 발명의 유전자의 올리고뉴클레오티드와 서열 상보성이 있는 표지된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 인간 cDNA, 게놈 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 검색하여 프로브가 하이브리드화된 라이브러리 성분을 측정할 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 인간의 질병에 대한 치료와 진단을 개발하기 위한 연구 시약 및 재료로서 이용할 수 있으며, 특히 폴리뉴클레오티드 분석법에 관하여 이하에 보다 상세히 설명하고자 한다.

폴리뉴클레오티드는 성숙 단백질과 또다른 아미노 또는 카르복실 말단 아미노산들, 또는 성숙 폴리펩티드 내부에 존재하는 아미노산들(예컨대, 성숙 폴리펩티드 형태가 1개 이상의 폴리펩티드 사슬을 나타내는 경우)을 함유하는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 이 서열은 전구체로부터 성숙 형태로 단백질을 프로세싱하는데 큰 역할을 하거나, 단백질의 수송을 용이하게 하거나, 단백질의 수명을 연장 또는 단축시키거나, 또는 단백질 분석이나 생산 중에 단백질의 조작을 용이하게 한다. 동일계내 일반적인 경우와 같이 부가 아미노산들은 세포 효소에 의해 성숙 단백질로부터 프로세싱에 의해 제거될 수 있다.

1개 이상의 프로서열(prosequence)에 융합된 폴리펩티드의 성숙 형태인 전구체 단백질은 폴리펩티드의 불활성 형태이다. 프로서열이 제거되면 그 불활성 전구체는 일반적으로 활성화된다. 프로서열중 일부 또는 전부는 활성화전에 제거된다. 일반적으로, 이 전구체를 프로단백질(proprotein)이라 한다.

결론적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 성숙 단백질, 성숙 단백질 + 리더 서열(프리단백질이라 함), 프리단백질(preprotein)의 리더 서열이 아닌 1개 이상의 프로서열을 가진 성숙 단백질의 전구체, 또는 리더 서열과 1개 이상의 프로서열(일반적으로 폴리펩티드의 활성 형태 및 성숙 형태를 생성하는 프로세싱

단계 동안 제거됨)을 갖고 있고 프로단백질에 대한 전구체인 프리프로단백질(preproprotein)을 암호화한다.

인간 CK $\alpha$ -2 cDNA를 함유하는 기탁물은 전술한 바와 같이 미국 모식균 배양 수집소에 기탁되어 있다. 또한, 전술한 바와 같이 cDNA 기탁물은 '기탁 클론' 또는 '기탁 클론의 cDNA'로 지칭한다. 기탁 클론은 1996년 1월 2일에 미국 매릴랜드 20852 록빌 파크 런 드라이브 12301에 소재하는 미국 모식균 배양 수집소에 ATCC 기탁번호 97400으로 기탁되었다. 기탁물은 기탁시 'PF250'이라고 부른 총 길이의 CK $\alpha$ -2 cDNA를 함유하는 pBluescript SK(-) 플라스미드(미국 캘리포니아 라 줄라에 소재하는 스트래티진 제품)이다.

기탁은 특허 절차상의 목적으로 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약하에 이루어진 것이다. 이 균주는 변경될 수 없으며 특허 허여시 대중에게 제한이나 조건 없이 분양될 것이다. 기탁은 당해 기술 분야의 숙련자들이 편리하게 이용할 수 있도록 제공된 것이지, 35 U.S.C. § 112 하에 요구되는 것과 같은 허가를 위해 요구되는 승인서는 아니다. 기탁물에 함유된 폴리뉴클레오티드의 서열 및 이 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드의 아미노산 서열은 본 명세서에 제시된 서열들 간의 어떤 설명에 모순이 생기는 경우 중재 역할을 하는 것이다. 기탁물을 제조, 이용 또는 판매하기 위해서는 허가가 필요하며 그 허가는 부여된 바 없다.

또한, 본 발명은 도 1 및 도 2의 추정 아미노산 서열을 가진 인간 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드에 관한 것이다.

본 발명은 이러한 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체에 관한 것이다. 도 1 및 도 2의 폴리펩티드와 관련하여 '단편', '유도체' 및 '유사체'란 용어는 그 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능이나 활성을 보유하는 폴리펩티드를 의미한다. 따라서, 유사체는 프로단백질부를 절단하여 활성화되므로써 활성 성숙 폴리펩티드를 생성하는 프로단백질을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 천연 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 양태는, 재조합 폴리펩티드이다.

도 1 및 도 2에 제시된 폴리펩티드의 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 1개 이상의 아미노산 잔기가 보존 또는 비보존 아미노산 잔기(바람직하게는 보존 아미노산 잔기)로 치환되고, 그 치환된 아미노산 잔기가 유전자 코드에 의해 암호화된 잔기이거나 암호화된 잔기가 아닌 것, (ii) 1개 이상의 아미노산 잔기 치환기를 포함하는 것, (iii) 성숙 폴리펩티드가 이의 수명을 증가시키는 화합물(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜) 같은 다른 화합물과 융합된 것, 또는 (iv) 성숙 폴리펩티드 또는 프로단백질 서열의 정제에 이용된 서열이나 리더 또는 분비 서열과 같은 성숙 폴리펩티드에 부가 아미노산이 융합된 것을 포함한다. 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 본 명세서에 교시된 내용으로부터 당해 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자라면 충분히 이해할 수 있는 것이다.

이와 관련하여, 본 발명의 특히 바람직한 양태는 도 1 및 도 2에 제시된 CK $\alpha$ -2 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드, 그 변이체, 유사체, 유도체 및 단편과, 이 단편의 변형체, 유사체 및 유도체를 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 특히 바람직한 양태는 기탁 클론이 함유하는 cDNA에 의해 암호화된 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드의 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드, 그 변형체, 유사체, 유도체 및 그 단편과, 이 단편의 변형체, 유사체, 및 유도체를 포함한다.

바람직한 변형체중에는 보존적 아미노산 치환에 의해 기준 폴리펩티드와 상이한 것이 있다. 이러한 치환에는 폴리펩티드 중에 존재하는 소정의 아미노산이 유사한 특성을 가진 다른 아미노산으로 치환되는 것을 포함한다. 일반적으로, 보존적 치환으로 관찰되는 것은 지방족 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile 들 간의 상호 대체; 히드록실 잔기 Ser과 Thr간의 상호교환, 산성 잔기 Asp과 Glu의 교환, 아미드 잔기 Asn과 Gln 간의 치환, 염기성 잔기 Lys과 Arg간의 교환 및 방향족 잔기 Phe와 Tyr간의 대체를 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 분리형으로 제공되는 것이 바람직하며, 균질하게 정제한 것이 바람직하다.

본 발명의 폴리펩티드는 서열 2 또는 서열 3의 폴리펩티드(특히 성숙 폴리펩티드) 뿐만 아니라 서열 2 또는 서열 3의 폴리펩티드와 유사성이 70% 이상(바람직하게는 동일성이 70% 이상)인 폴리펩티드, 보다 바람직하게는 서열 2 또는 서열 3의 폴리펩티드와 유사성이 90% 이상(보다 바람직하게는 동일성이 90% 이상)인 폴리펩티드, 가장 바람직하게는 서열 2 또는 서열 3의 폴리펩티드와 유사성이 95% 이상(보다 바람직하게는 동일성이 95% 이상)인 폴리펩티드를 포함하며, 또한 이러한 폴리펩티드의 부분이 일반적으로 30개 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 50개 이상의 아미노산을 함유하는 상기 폴리펩티드의 부분을 포함한다.

당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 2가지 폴리펩티드 사이의 '유사성'은 제1 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 이것의 보존적인 아미노산 치환체와 제2 폴리펩티드의 서열을 비교하여 측정한다.

본 발명의 폴리펩티드 단편이나 부분은 이에 대응하는 총길이의 폴리펩티드를 펩티드 합성법으로 생성하는 데 이용할 수 있으며, 단편은 총길이 폴리펩티드를 생성하는 데 중간체로서 이용할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 단편이나 부분은 본 발명에 기재된 총길이 폴리뉴클레오티드를 합성하는 데 이용할 수 있다.

이러한 측면의 본 발명의 바람직한 양태에는 CK $\alpha$ -2 단편, 구체적으로 도 1 및 도 2에 제시된 아미노산 서열이나 기탁 클론에 의해 암호화된 CK $\alpha$ -2 단백질의 아미노산 서열을 가진 CK $\alpha$ -2 단편, 및 도 1과 도 2에 기재되거나 기탁 클론에 의해 암호화된 CK $\alpha$ -2 단백질의 변형체와 유도체의 단편을 포함한다. 이와 관련하여, 단편은 전 서열은 아니지만 일부 서열이 전술한 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드와 이의 변형체 또는 유도체의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드이다. 본 발명의 폴리펩티드 단편을 대표하는 예는 약 30개 내지 약 111개 아미노산을 가진 것을 들 수 있다.

이러한 단편은 '자립성', 즉 다른 아미노산이나 폴리펩티드에 융합되거나 그 일부가 아닌 것이거나, 보다 큰 폴리펩티드 중에서 일부분 또는 일정 영역을 형성할 수 있다. 보다 큰 폴리펩티드 중에 포함되는 경우에, 이러한 단편은 단일 연속 영역을 형성하는 것이 가장 바람직하다. 하지만, 하나의 큰 폴리펩티드 중

에 여러 단편들이 포함될 수도 있다. 예컨대, 바람직한 특정 양태는 숙주내에서 발현할 수 있도록 디자인 되어 CK $\alpha$ -2 단편의 아미노 말단에는 이중의 프리폴리펩티드 영역과 프로폴리펩티드 영역이 융합되어 있고, 상기 단편의 카르복시 말단에는 부가 영역이 융합되어 있는 전구체 폴리펩티드에 포함된 본 발명의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드 단편에 관한 것이다. 따라서, 본 명세서에서 의도하는 의미를 가진 1 양태의 단편은 CK $\alpha$ -2에서 유도된 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 부분(들)을 말한다.

본 명세서에서 약(about)은 구체적으로 언급된 범위(들)이 한쪽 극한치이나 양쪽 극한치에서 여러개, 수개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산만큼 많거나 적은 것도 포함함을 의미한다. 예컨대, 약 30개의 아미노산이란 30개  $\pm$  여러개, 수개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산을 가진 폴리펩티드 단편 내지 111개  $\pm$  여러개, 수개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산을 가진 폴리펩티드 단편, 즉 가장 넓게는 30개 - 여러개 아미노산 내지 111개 + 여러개 아미노산 범위, 가장 좁게는 30개 + 여러개 아미노산 내지 111개 - 여러개 아미노산 범위를 의미한다.

이와 관련하여 바람직하게는, 기재된 범위  $\pm$  한쪽 또는 양쪽 극한치에 5개 아미노산을 갖는 것이다. 특히 바람직한 것은 기재된 범위  $\pm$  한쪽 또는 양쪽 극한치에 3개 아미노산을 갖는 것이다. 더욱 특히 바람직한 것은 기재된 범위  $\pm$  한쪽 또는 양쪽 극한치에 1개 아미노산을 갖는 것이거나, 또는 기재된 범위에 부가 서열이나 결실 서열이 없는 것이다. 가장 바람직하게는 약 30개 내지 약 111개 아미노산의 단편이다.

본 발명에 기재된 가장 바람직한 단편은 CK $\alpha$ -2의 절두 돌연변이체이다. 절두 돌연변이체는 아미노 말단을 포함하는 일련의 연속 잔기(연속 영역, 부 또는 부분)가 결실되거나 또는 카르복시 말단을 포함하는 일련의 연속 잔기가 결실되거나, 또는 이중 절두 돌연변이체인 경우와 같이 아미노 말단을 포함하는 잔기와 카르복시 말단을 포함하는 잔기인 2개의 일련 연속 잔기가 결실된 것을 제외하면 도 1 및 도 2에 기재되거나, 기탁 클론의 아미노산 서열을 갖는 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드, 또는 그 변형체 또는 유도체를 포함한다. 대략의 크기 범위를 갖는 단편 역시 일반적으로 단편 중에서 특히 바람직한 절두 단편의 바람직한 양태이다.

또한, 본 발명의 이러한 양태에 바람직한 것은 CK $\alpha$ -2의 구조적 또는 기능적 특성을 특징으로 하는 단편이다. 이러한 관점에서 본 발명의 바람직한 양태는 알파-헬릭스 영역 및 알파-헬릭스 형성 영역('알파 영역'), 베타-시이트 영역 및 베타-시이트 형성 영역('베타-영역'), 턴(turn) 영역 및 턴 형성 영역('턴-영역'), 코일(coil) 영역 및 코일 형성 영역('코일-영역'), 친수성 영역, 소수성 영역, 알파 양친매성 영역, 베타 양친매성 영역, 가요성 영역, 계면 형성 영역 및 CK $\alpha$ -2의 높은 항원 지수 영역을 포함한다.

이와 관련하여 특히 바람직한 영역은 도 5에 도시하였으며, 도 1 및 도 2에 기재된 아미노산 서열의 분석으로 확인되는 전술한 유형의 영역을 포함하며, 이것에 국한되는 것은 아니다. 도 5에 도시한 바와 같이, 바람직한 영역으로는 가니어-로브슨(Garnier-Robson) 알파-영역, 베타-영역, 턴 영역 및 코일 영역과, 추-파스만(Chou-Fasman) 알파-영역, 베타-영역 및 턴 영역, 카이트-둘리틀(Kyte-Doolittle) 친수성 영역과 소수성 영역, 아이젠버그(Eisenberg) 알파 및 베타 양친매성 영역, 카플러스-슐쯔(Karplus-Schulz) 가요성 영역, 에미니(Emini) 계면 형성 영역 및 제임슨-울프(Jameson-Wolf) 높은 항원 지수 영역을 포함한다.

이와 관련하여, 가장 바람직한 단편은 전술한 여러 특징과 같은 여러 구조적 특징을 병합한 CK $\alpha$ -2 영역을 포함하는 것이다. 또한, 턴 영역, 친수성 영역, 가요성 영역, 계면 형성 영역 및 높은 항원 지수 영역을 나타내는 매우 특징적인 아미노산 조성을 특징으로 하는 도 1의 약 30 내지 111 잔기(서열 2의 아미노산 2 내지 83) 및 도 2의 약 18 내지 99 잔기(서열 3의 아미노산 6 내지 83)로 한정된 영역이 특히 바람직한 영역이다. 이러한 영역들은 전술한 바와 같이 보다 큰 폴리펩티드 내에 포함되거나, 또는 그 자체가 본 발명의 바람직한 단편이다. 본 문단에서 사용된 '약'이란 용어도 일반적으로 단편과 관련하여 전술한 바와 같은 의미를 나타낸다.

더욱 바람직한 영역은 CK $\alpha$ -2의 활성을 매개하는 것이다. 바람직한 것은 CK $\alpha$ -2와 유사 활성이나 개선된 활성을 가지며 바람직하지 않은 활성은 감소된 단편을 비롯하여 CK $\alpha$ -2의 화학적, 생물학적 또는 기타 다른 활성을 가진 단편을 포함한다. 더욱 바람직한 것은 관련 폴리펩티드, 예컨대 중국 햄스터 GRO를 비롯하여 도 3과 도 4에 제시된 관련 폴리펩티드의 활성 영역에 대해 서열이나 위치, 또는 서열과 위치에서 상동성인 영역을 포함하는 단편을 포함한다. 특히 바람직한 단편은 전술한 바와 같이 절두 돌연변이체이다.

또한, 본 발명은 전술한 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 전술한 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드, 구체적으로, 염중 조건하에서 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드, 및 전술한 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 PCR 프라이머와 같은 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 이와 관련하여, 바람직한 폴리뉴클레오티드는 전술한 바람직한 단편에 상응하는 것이다.

본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포 및 재조합 기법을 통해 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

숙주 세포는 유전자 조작으로 폴리뉴클레오티드가 도입된 뒤 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있다. 예컨대, 폴리뉴클레오티드는 감염, 형질도입, 형질감염, 트랜스백션 및 형질전환의 공지 기법을 사용하여 숙주 세포로 도입시킬 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단독 도입시키거나 다른 폴리뉴클레오티드와 함께 도입시킬 수 있다. 이러한 기타 다른 폴리뉴클레오티드는 독립적으로, 동시적으로 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 연결시켜 도입시킬 수 있다.

따라서, 예컨대 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 선택 마커를 암호화하는 다른 별도의 폴리뉴클레오티드와 함께, 예컨대 포유류 세포의 동시형질감염과 선별에 대한 표준 기법을 사용하여 숙주 세포를 형질감염시킬 수 있다. 이러한 경우에, 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 숙주 세포 계능내로 안정하게 도입된다.

대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 숙주 중에서 증식시키기 위하여 선택 마커를 함유하는 벡터에 결합시킬 수도 있다. 벡터 작제물은 전술한 기법을 통해 숙주 세포로 도입시킬 수 있다. 일반적으로, 플라스미드

백터는 침전물, 예컨대 인산 칼슘 침전물 중의 DNA로, 또는 하전된 지질과 복합체를 형성한 DNA로서 도입시킨다. 전기사출법(electroporation)을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 숙주에 도입시킬 수도 있다. 백터가 바이러스인 경우에는 시험관내 패키징시거나 패키징 세포로 도입시키고 패키징된 바이러스를 이용하여 세포에 형질도입시킨다. 본 발명의 양태에 따라 폴리뉴클레오티드를 제조하고, 이 폴리뉴클레오티드를 세포 중으로 도입시키는 데 적합한 다양한 기법은 공지된 것으로 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 통상적인 일이다. 이러한 기법에 대해서는 많은 실험실 기법을 상세히 설명하고 있는 문헌[Sambrook et al., *전술한 인용문헌 참조*]에 충분히 설명되어 있다.

이러한 양태의 본 발명에 따르면, 백터는 예컨대 플라스미드 백터, 1분쇄 또는 2분쇄 파지 백터, 1분쇄 또는 2분쇄 RNA 또는 DNA 바이러스 백터를 포함한다. 이 백터는 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 DNA로서 세포 중으로 DNA 및 RNA를 도입시키는 공지의 기법을 통해 세포 중으로 도입시킬 수 있다. 또한, 파지 백터 및 바이러스 백터의 경우에, 백터는 감염과 형질도입의 공지 기법을 통해 패키징되거나 캡시드화된 바이러스로서 세포 중으로 도입시키는 것이 바람직하다. 바이러스 백터는 복제 능력성이거나 복제 결손성이다. 복제 결손성인 경우에 바이러스 증식은 일반적으로 상보성 숙주 세포에서만 일어날 것이다.

특정 양태의 백터 중에서 바람직한 것은 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드를 발현하는 것이다. 일반적으로, 이러한 백터는 발현될 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합되어 숙주 중에서 발현하기에 효과적인 시스 작용성 조절 영역을 포함한다. 적합한 트랜스 작용성 인자는 숙주에 의해 제공되거나, 상보성 백터에 의해 제공되거나, 또는 숙주 중에 도입되었을 때 백터 자체에 의해 제공된다.

바람직한 특정 양태에 있어서, 백터는 특정 발현을 제공한다. 특정 발현은 유도성 발현이거나 특정 종류의 세포에서만 발현하거나, 또는 유도성 및 세포 특이성이다. 유도성 백터 중에서 특히 바람직한 것은 조작이 쉬운 환경 인자, 예컨대 온도 및 영양분 첨가제로 발현을 유도할 수 있는 백터이다. 원핵 및 진핵 숙주에 사용되는 보존성 및 유도성 발현 백터를 비롯하여 전술한 바와 같은 본 발명의 양태에 적합한 각종 백터는 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 통상적으로 이용되는 것이다.

유전자 조작된 숙주 세포는 통상의 영양 배지에서 배양할 수 있고, 필요한 경우에는 특히 프로모터를 활성화하거나, 형질전환체를 선별하거나, 유전자를 증폭시키기 위하여 변화시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현에 대한 선별된 숙주 세포에 사용했었던 조건들이 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 데에도 적합하며, 이것은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 데에는 다양한 발현 백터를 사용할 수 있다. 이러한 백터로는 염색체 백터, 에피솜 백터 및 바이러스 유래의 백터, 예컨대 세균 플라스미드, 박테리오파지, 효모 에피솜, 효모 염색체 인자, 파콜로바이러스, 파포바 바이러스(예, SV40), 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 계두 바이러스, 슈도라비스 바이러스 및 레트로바이러스 유래의 백터, 및 그 조합체 유래의 백터, 예컨대 플라스미드와 박테리오파지 유전 인자 유래의 백터, 예컨대 코스미드 및 파지미드를 포함하며, 이들 모두는 본 발명의 양태에 따라 발현용으로 사용할 수 있다. 일반적으로, 숙주 중에서 폴리펩티드를 발현시키기 위해 폴리뉴클레오티드를 유지, 증식 또는 발현시키는 데 적합한 모든 백터라면 발현용으로 사용할 수 있다.

적합한 DNA 서열은 각종 공지의 통상적인 기법을 통해 백터에 삽입할 수 있다. 일반적으로, 발현용 DNA 서열은 그 DNA 서열과 발현 백터를 1종 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 절단한 후에 그 제한 단편을 T4 DNA 리가제를 사용하여 함께 결합시키므로써 발현 백터에 결합시킨다. 이러한 용도로 사용될 수 있는 제한 분해 및 결합의 절차는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 것으로 일상적인 것이다. 이와 관련하여 적합한 절차와 대안의 기법을 통해 발현 백터를 작제하는 방법도 당해 기술 분야에 공지되어 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 통상적인 일이며, 본 명세서에 인용되는 문헌(Sambrook et al.,)에 상세히 설명되어 있다.

발현 백터의 DNA 서열은 직접 mRNA 전사에 대한 프로모터를 비롯하여 적당한 발현 조절 서열(들)에 작동적으로 결합된다. 이러한 프로모터의 대표예로는 공지 프로모터 중에 몇가지만을 들어 보면 파지 람다 PL 프로모터, E.coli lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 초기(early) 및 후기(late) 프로모터, 및 레트로바이러스 LTRS 프로모터를 포함한다. 제시되지 않은 많은 프로모터들 역시 전술한 양태의 본 발명에 사용하기에 적합하다는 것은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있으며, 본 명세서에 기재된 실시예와 토론 부분에서 예시한 방식으로 용이하게 이용할 수 있다.

일반적으로, 발현 작제물은 전사 개시 부위와 종결 부위를 함유하며, 전사 영역에는 해독시의 리보솜 결합 부위를 함유한다. 이 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 암호 부분은 개시부에 해독 개시 AUG를 포함하고, 해독된 폴리펩티드의 말단에 적절하게 위치한 종결 코돈을 포함한다.

또한, 본 발명의 작제물은 발현을 유발시킬 뿐만 아니라 조절하는 조절 영역을 포함할 수 있다. 일반적으로, 이 조절 영역은 통상적으로 실시되는 여러 방법에 따라 전사를 조절하는 작용을 하며, 예컨대 억제인자 결합 부위 및 인핸서 등이 있다.

일반적으로 증식 및 발현용 백터는 선택 마커를 포함한다. 이러한 마커 들은 증폭에 적합하거나, 또는 증폭용의 부가 마커를 포함할 수도 있다. 이와 관련하여, 발현 백터는 1개 이상의 선택 마커 유전자를 함유하여 형질전환된 숙주 세포를 선별할 수 있는 표현형의 특징을 제공하는 것이 바람직하다. 바람직한 마커로는 진핵 세포 배양에 적합한 디히드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 내성 유전자와, 이.콜리 및 기타 다른 세균 배양에 적합한 테트라사이클린이나 암피실린 내성 유전자를 포함한다.

본 명세서에 기재된 바와 같은 적당한 DNA 서열, 적당한 프로모터 및 기타 다른 적당한 조절 서열을 함유하는 백터는 목적 폴리펩티드의 발현에 적당한 공지의 다양한 기법을 통해 적당한 숙주로 도입시킬 수 있다. 적당한 숙주의 대표적인 예로는 이.콜리, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피유리움(*Salmonella typhimurium*) 세포와 같은 세균 세포; 효모 세포와 같은 진균 세포; 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포도프테라(*Spodoptera*) Sf9 세포와 같은 곤충 세포; CHO, COS 및 보웬스 흑색종 세포; 및 식물 세포를 포함한다. 다양한 발현 작제물용 숙주는 공지되어 있으며, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 양태에 따른 폴리펩티드를 발현하기 위한 숙주를 용이하게 선택할 수 있다.

보다 구체적으로, 본 발명은 전술한 1가지 이상의 서열을 함유하는 재조합 작제물, 예컨대 발현 작제물을 포함한다. 이 작제물은 본 발명의 서열이 삽입된 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터를 포함한다. 이 서열은 전방향 또는 역방향으로 삽입될 수 있다. 특정한 바람직한 양태로서, 이 작제물은 예컨대 상기 서열에 작동가능하게 결합된 프로모터를 비롯한 조절 서열을 추가로 포함한다. 적합한 다수의 벡터 및 프로모터는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있으며, 본 발명에 사용하기에 적합한 다양한 시판용 벡터도 있다.

일 예로서, 시판되는 벡터에는 다음과 같은 예가 있다. 세균용으로 바람직한 벡터 중에는 쿼겐의 시판품인 pQE70, pQE60 및 pQE-9; 스트래터진의 시판품인 pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 파마시아 시판품인 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5가 있다. 바람직한 진핵용 벡터 중에는 스트래터진 시판품인 PWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1 및 pSG; 파마시아 시판품인 pSVK3, PBPV, PMSG 및 PSVL이 있다. 이 벡터들은 단지 예시용으로서, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 양태에 따라 사용하기 위해 입수할 수 있는 다양한 공지의 시판 벡터이다. 따라서, 예컨대 숙주 중에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드를 도입, 유지, 증식 또는 발현하기에 적합하다면 기타 다른 플라스미드 또는 벡터도 본 발명에 사용할 수 있다.

프로모터 영역은 프로모터 영역이 결실된 리포터 전사 유닛, 예컨대 시험 프로모터 단편, 즉 프로모터를 함유할 수 있는 단편을 도입하기 위한 제한 부위 또는 부위들의 하류에 위치한 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제('cat') 전사 유닛을 포함하는 벡터를 사용하여 임의의 바람직한 유전자로부터 선택할 수 있다. 공지된 바와 같이, cat 유전자의 상류에 있는 제한 부위에 프로모터 함유 단편의 벡터를 도입시키면 표준 CAT 분석으로 검출할 수 있는 CAT 활성이 생성된다. 이러한 목적에 적합한 벡터는 공지되어 있으며, 쉽게 입수할 수 있다. 예컨대, 이러한 2가지 벡터로는 pKK232-8 및 pCM7이 있다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 발현용 프로모터는 공지되어 입수가능한 프로모터를 포함할 뿐만 아니라 리포터 유전자를 사용하여 전술한 기법을 통해 쉽게 얻을 수 있는 프로모터도 포함한다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 발현에 적합한 공지의 세균 프로모터 중에는 이.콜리 lacI 및 lacZ 프로모터, T3 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, 람다 PR, PL 프로모터 및 trp 프로모터가 있다. 또한, 적합한 공지의 진핵 프로모터 중에는 CMV 직접 초기 프로모터, HSV 티미딘 키나제 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터, 레트로바이러스 LTR의 프로모터, 예컨대 로우스(Rous) 육종 바이러스('RSV') 및 메탈로티오네인 프로모터, 예컨대 마우스 메탈로티오네인-1 프로모터가 있다.

숙주 세포 중에서 발현시기에 적당한 벡터와 프로모터의 선택은 공지 절차이며, 발현 벡터 작제, 숙주 내로 벡터의 도입 및 숙주 중에서의 발현에 필요한 필수 기법들은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 통상의 기술이다.

또한, 본 발명은 전술한 작제물을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵 세포 또는 효모 세포와 같은 하등 진핵 세포이거나, 또는 세균 세포와 같은 원핵 세포일 수 있다.

숙주 세포 내로 작제물을 도입시키는 방법으로는 인산 칼슘 형질감염법, DEAE-덱스트란 매개의 형질감염법, 양이온 지질 매개의 형질감염법, 전기사출법, 형질도입법, 감염법 또는 기타 다른 방법들이 있다. 이러한 방법들은 많은 표준 실험서, 예컨대 문헌[Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986)]에 기재되어 있다.

숙주 세포 내의 작제물을 통상의 방법으로 사용하여 재조합 서열에 의해 암호화된 유전자 생성물을 생성시킬 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 통상의 펩티드 합성기를 사용하여 합성적으로 생성할 수 있다.

성숙 단백질은 적당한 프로모터 조절하의 포유동물 세포, 효모, 세균 또는 기타 다른 세포종에서 발현될 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 작제물 유래의 RNA를 사용하는 무세포 해독 시스템을 이용하여 전술한 단백질을 생성할 수도 있다. 원핵 숙주와 진핵 숙주에 사용하기에 적당한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2판, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989)]에 기재되어 있다.

일반적으로, 재조합 발현 벡터는 복제 기점, 하류 구조 서열을 직접 전사하는 고도 발현성 유전자 유래의 프로모터, 및 벡터에 노출된 후 벡터 함유 세포를 분리 용이하게 하는 선택 마커를 포함한다. 적합한 프로모터 중에는 3-포스포글리세레이트 키나제('PGK')와 같은 해당효소,  $\alpha$ -인자, 산 포스파타제, 및 열 충격 단백질을 암호화하는 유전자에서 유래된 것이 있다. 적합한 마커로는 이.콜리의 암피실린 내성 유전자 및 에스.세레비지에의 trpI 유전자가 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 DNA의 고등 진핵세포에 의한 전사는 벡터 중에 인헨서 서열을 삽입하면 증가될 수 있다. 인헨서는 소정의 숙주 세포 종류에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키는 작용을 하는 보통 10 내지 300 bp인 DNA의 시스 작용성 인자이다. 인헨서의 예로는 bp 100 내지 270에 있는 복제 기점의 뒤쪽에 위치한 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 뒤쪽에 있는 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드중 이종 구조 서열을 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 발현용 프로모터에 작동가능하게 결합되도록 표준 기법을 사용하여 벡터에 삽입된다. 이 폴리뉴클레오티드는 전사 개시 부위가 리보솜 결합 부위의 5'에 적당하게 위치되도록 삽입된다. 리보솜 결합 부위는 발현되는 폴리펩티드의 해독을 개시하는 AUG에 대해 5' 측이다. 일반적으로, 개시 코돈, 일반적으로 AUG로 시작하며 리보솜 결합 부위 사이와 개시 AUG 사이에 위치하는 기타 다른 개방 해독들은 제공되지 않는다. 또한, 일반적으로 폴리펩티드의 말단에는 해독 종결 코돈이 있고, 전사된 영역의 3' 말단에는 폴리아데닐화 신호와 전사 종결 신호가 적당하게 배치되어 있다.

소포체의 루멘, 페리플라스막 간극 또는 세포외 환경 내로 해독 단백질을 분비하는 경우에는 발현된 폴리펩티드에 적당한 분비 신호가 도입되어 있다. 이 신호는 폴리펩티드에 대해 내인성이거나, 이종 신호일 수

있다.

폴리펩티드는 용합 단백질과 같은 변형 형태로 발현될 수 있고, 분비 시그널 뿐만 아니라 부가 이중 작용성 영역도 포함할 수 있다. 따라서, 정제 과정 중이나 연속 취급과 저장 중에 숙주 세포 중에서의 안정성과 지속성을 향상시키기 위하여 폴리펩티드의 N-말단에, 예컨대 부가 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역을 첨가할 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하는 영역을 폴리펩티드에 첨가할 수도 있다. 이러한 영역은 폴리펩티드의 최종 제조 이전에 제거한다. 분비 또는 배출을 증가시키고, 안정성을 증가시키며 정제 과정을 용이하게 하기 위하여 폴리펩티드에 펩티드 부분을 첨가하는 것은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 익숙하며 통상적인 기법이다.

본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 증식, 유지 또는 발현에 적합한 원핵 숙주로는 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)을 포함한다. 슈도모나스, 스트렙토마이세스 및 스타필로코커스의 다양한 종들도 적합한 숙주이다. 또한, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 기타 다른 숙주들도 본 발명에 이용할 수 있다.

대표적 예지만 비제한적인 예로서, 세균용으로 유용한 발현 벡터는 공지된 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 유전 인자를 함유하는 시판용 플라스미드 유래의 세균용 복제 기점과 선택 마커를 포함할 수 있다. 이러한 시판용 벡터로는 예컨대 pKK223-3(스웨덴 옵살라 소재의 파마시아 파인 케미칼스 제품) 및 GEM1(미국 위스콘신 매디슨 소재의 프로메가 바이오텍 제품)을 포함한다. 이러한 pBR322 '골격' 구역과 적당한 프로모터 및 발현될 구조 서열을 결합시킨다.

적합한 숙주 균주를 형질전환시키고 적당한 세포 밀도로 숙주 균주를 성장시킨 후, 선택된 프로모터가 유도성인 경우에는 적당한 수단(예컨대, 온도 변화 또는 화학적 유도제에 노출)으로 세포를 유도한 후 다시 배양한다. 세포는 일반적으로 원심분리하여 수거하고, 물리적 또는 화학적 수단으로 파괴시킨 뒤, 얻어지는 미정제 추출물을 추가 정제를 위해 보유한다.

단백질 발현에 이용되는 미생물 세포는 동결-해동 순환법, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 용해제의 이용을 비롯한 임의의 편리한 방법으로 파괴할 수 있으며, 이러한 방법은 당해 기술분야에 공지된 기술이다.

다양한 포유동물 세포 배양계 역시 발현에 이용할 수 있다. 포유동물 발현계의 예로는 문헌[Gluzman et al., Cell 23:175(1981)]에 기재된 바와 같은 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 세포주를 포함한다. 상용성 벡터를 발현할 수 있는 기타 다른 세포주로는 예컨대 C127, 3T3, CHO, HeLa, 인간 신장 293 및 BHK 세포주를 포함한다.

포유동물 발현 벡터는 복제 기점, 적합한 프로모터와 인핸서, 임의의 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 편집 공여 부위와 수용 부위, 전사 종결 부위 및 발현에 필수적인 5' 인접 비전사 서열을 포함한다. 바람직한 양태로서, 전술한 유형의 필수적인 비전사 유전 인자에 SV40 스플라이스 부위 및 SV40 폴리아데닐화 부위 유래의 DNA 서열을 사용한다.

CK $\alpha$ -2 폴리펩티드는 황산 암모늄 또는 에탄올 침전법, 산 추출법, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 비롯한 공지 방법을 통해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제할 수 있다. 정제에는 고성능 액체 크로마토그래피('HPLC')를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 폴리펩티드가 분리 및/또는 정제 동안 변성되는 경우에는 단백질을 리폴딩(refolding)하는 공지 기법을 통해 활성 형태를 복원시킬 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 천연 정제 산물, 화학 합성 절차의 산물 및 예컨대 세균, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 비롯한 원핵 숙주나 진핵 숙주로부터 재조합 기법을 통해 생성한 산물을 포함한다. 재조합 생성 절차에 이용된 숙주에 따라, 본 발명의 폴리펩티드는 글리코실화되거나 또는 비글리코실화될 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 일부 경우에는 숙주 매개의 방법의 결과로서 변형된 메티오닌을 처음에 함유할 수 있다.

CK $\alpha$ -2 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 다양한 용도, 구체적으로 CK $\alpha$ -2의 화학적 성질 및 생물학적 성질을 이용하는 용도에 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 기타 다른 용도는 세포, 조직 및 유기체의 질환을 진단 및 치료하는 데 관한 것이다. 이러한 양태의 본 발명은 이하에 상세히 설명한다.

또한, 본 발명은 예컨대 진단 시약으로서 상보적 폴리뉴클레오티드를 검출하기 위한 CK $\alpha$ -2 폴리뉴클레오티드의 용도에 관한 것이다. 기능부전과 관련있는 CK $\alpha$ -2의 돌연변이 형태의 검출은 CK $\alpha$ -2 발현 저하, 과잉 발현 또는 이상 발현으로부터 생기는 질병의 진단이나 그 질병에 대한 감수성 판단에 부가적이거나 한정적인 진단 도구 역할을 한다. 인간 CK $\alpha$ -2 유전자에 돌연변이를 포함하는 개체는 다양한 기법을 통해 DNA 수준에서 검출할 수 있다. 진단에 사용하기 위한 핵산은 환자 세포, 예컨대 혈액, 뇨, 침, 조직 생검 및 사체 등으로부터 얻을 수 있다. 게놈 DNA는 검출에 직접 사용하거나 분석 이전에 PCR을 사용하여 효소적으로 증폭시킬 수도 있다[PCR(Saiki et al., Nature 324: 163-166(1986))]. RNA 또는 cDNA 역시 동일한 방식으로 사용할 수 있다. 일 예로서, CK $\alpha$ -2를 암호화하는 핵산에 상보적인 PCR 프라이머는 CK $\alpha$ -2 발현 및 돌연변이를 동정 및 분석하는데 사용할 수 있다. 예컨대, 결실과 삽입은 정상 유전자형과 증폭 생성물의 크기를 비교하여 그 크기 변화로서 검출할 수 있다. 점 돌연변이는 방사능표지된 CK $\alpha$ -2 RNA 또는 대안적으로 방사능표지된 CK $\alpha$ -2 안티센스 DNA 서열에 증폭 DNA를 하이브리드화하여 확인할 수 있다. RNase A 분해 또는 융점차를 통해 완전 정합성 서열과 부정합성 2분체를 구별할 수 있다.

또한, 기준 유전자와 돌연변이를 가진 유전자 간의 서열 차이는 직접적인 DNA 서열분석으로 확인할 수 있다. 클로닝된 DNA 단편은 특정 DNA 단편을 검출하기 위한 프로브로서 이용할 수 있다. 이 방법의 감도는 PCR이나 기타 다른 증폭 방법을 적당하게 이용하면 크게 향상시킬 수 있다. 예컨대, 서열결정 프라이머는 변형 PCR법으로 생성한 1분쇄 주형 분자 또는 2분쇄 PCR 생성물과 함께 이용한다. 서열 결정은 방사능표지된 뉴클레오티드를 이용하여 통상적인 방법으로 실시하거나 형광 표지를 이용하여 자동 서열분석 절차

로 실시한다.

DNA 서열차를 기본으로 한 유전자 시험은 변성제를 함유하거나 함유하지 않은 겔에 있어서 DNA 단편의 전기영동적 이동성 변화를 검출하여 실시한다. 높은 해상도의 겔 전기영동을 실시하면 작은 서열의 결실과 삽입도 육안 관찰할 수 있다. 다른 서열의 DNA 단편은 각각의 비유점이나 부분 용점에 따라 겔의 다른 위치에서 그 이동이 지연되는 변성 포름아미드 구배 겔 상에서 구별할 수 있다[예컨대, Myers et al., Science 230:1242(1985)].

특정 위치에 있어서의 서열 변화는 RNase 및 S1 보호법과 같은 뉴클레아제 보호법이나, 또는 화학적 절단법을 통해 확인할 수 있다[예컨대, Cotton et al., Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 85:4397-4401(1985)].

따라서, 특정 DNA 서열의 검출은 하이브리드화, RNase 보호, 화학 절단, 직접 DNA 서열결정 또는 제한 효소 이용[예컨대, 제한 단편 길이 다형태성('RFLP')] 및 게놈 DNA의 서던 블롯팅과 같은 방법으로 실시할 수 있다. 통상적인 겔 전기영동 및 DNA 서열분석 외에도, 돌연변이는 동일계내 분석법으로 검출할 수 있다.

또한, 본 발명의 서열은 염색체 동정에 중요하다. 이 서열은 각 인간 염색체 상의 특정 위치를 특이적인 표적으로 하여 하이브리드화할 수 있다. 더욱이, 현재에는 염색체 상의 특정 부위를 동정하는 방법이 요구되고 있다. 현재 이용되는 염색체 위치 표시 방법은 활성 서열 데이터(반복 다형태성)를 기본으로 한 몇몇 염색체 표시 시약을 이용하는 방법이다. 본 발명에 기재된 염색체에 대한 DNA 지도화는 질병과 관련된 유전자를 가진 서열과 상관 관련성을 규명하는데 있어서 중요한 제1 단계이다.

특정의 바람직한 양태로서, 본 명세서에 개시된 cDNA는 CK $\alpha$ -2 유전자의 게놈 DNA를 클로닝하는데 사용한다. 이것은 일반적으로 시판되는 다양한 라이브러리와 공지된 기법을 통해 실시할 수 있다. 게놈 DNA는 이러한 목적의 공지 기법을 사용하여 동일계내 염색체 지도화에 이용한다. 일반적으로, 염색체 지도화의 통상적인 절차에 따르면, 우수한 동일계내 하이브리드화 신호를 찾는 게놈 프로브를 동정하는 데에는 일부 시험과 오류가 필수적이다.

또한, 일부 경우에 서열은 cDNA 유래의 PCR 프라이머(바람직하게는 15 내지 25 bp)를 제조하여 염색체로 지도작성할 수 있다. 유전자의 3' 비해독 영역을 컴퓨터 분석하는 방법은 게놈 DNA 중에 존재하는 1개 이상의 엑손에 걸쳐 존재하지 않는 프라이머를 신속하게 선택하는데 사용되지만, 증폭 과정이 복잡하게 이루어진다. 상기 프라이머는 각 인간 염색체를 함유하는 체세포 하이브리드를 PCR 선별하는 데에도 사용된다. 이 프라이머에 상응하는 인간 유전자를 함유하는 하이브리드 만이 증폭 단편을 생성한다.

체세포 하이브리드의 PCR 지도화는 특정 DNA를 특정 염색체로 분류하는 데 신속한 방법이다. 동일한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 가지고 본 발명을 이용하는 경우에는, 특정 염색체 유래의 단편의 패널이나 많은 게놈 클론 풀(pool)을 가지고 유사한 방법으로 부분적 국부화를 실시할 수 있다. 염색체 지도 지도작성하는데 유사하게 사용할 수 있는 기타 다른 지도화 방법으로는 동일계내 하이브리드화, 표지된 유동-분류된 염색체로의 예비선별 및 염색체 특이적인 cDNA 라이브러리를 작제하기 위한 하이브리드에 의한 예비선별을 포함한다.

중기 염색체 확산에 대한 cDNA 클론의 형광 동일계내 하이브리드화('FISH')는 정확한 염색체 위치를 1단계로 규명하는데 사용할 수 있다. 이 기법은 50개 또는 60개 정도로 짧은 cDNA에 대하여 사용할 수 있다. 이 기법에 대해서는 문헌[Verma et al., Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)].

일단 서열이 정확한 염색체 위치에 지도화되면 이 서열의 염색체 상의 물리적 위치를 유전자 지도 데이터와 상호관련 지을 수 있다. 이러한 유전자 지도 데이터는 예컨대 존스 홉킨스 유니버시티, 웰치 메디칼 라이브러리에서 자료 입수 용이한 문헌[V. McKusick, Mendelian Inheritance In Man]에 제시되어 있다. 그 다음, 동일한 염색체 영역에 대해 지도화된 바 있는 질병과 유전자 사이의 관계를 연관 분석(물리적 인접 유전자의 공동유전)을 통해 확인한다.

다음, 감염자와 비감염자 사이의 cDNA 또는 게놈 서열에서의 차이를 결정할 필요가 있다. 감염자의 일부 또는 전부에서 돌연변이가 관찰되지만, 정상인에게서는 관찰되지 않으면, 그 돌연변이가 질병의 원인일 가능성이 있다.

물리적 지도 작성 및 유전자 지도 작성 기술의 현재의 해법에 의하면, 질병과 관련된 염색체 영역에 정확히 집중된 cDNA는 50개 내지 500개의 유력한 원인 유전자중 하나일 수 있다(이것은 1 메가염기의 지도 해독능 및 20 kb당 하나의 유전자를 추정한다).

본 발명은 또한 정상 및 비정상 레벨의 측정을 포함하여 세포 및 조직내 CK $\alpha$ -2 단백질의 레벨을 검출하기 위한 정량적 및 진단적 분석과 같은 진단 분석법에 관한 것이다. 따라서, 예를 들면, 정상 대조 조직 샘플에 비교되는 CK $\alpha$ -2 단백질의 과다발현을 검출하기 위한 본 발명에 따른 진단 분석법을 사용하여 중앙의 존재를 검출할 수 있다. 숙주에서 유래한 샘플에서 본 발명의 CK $\alpha$ -2 단백질과 같은 단백질의 레벨을 측정하는 데에 사용할 수 있는 분석 기술은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 널리 공지되어 있다. 그러한 분석 방법으로는 방사성 면역 분석법, 경쟁적 결합 분석법, 웨스턴 블롯 분석법 및 ELISA 분석법이 있다. 그 중에서 ELISA가 흔히 바람직하게 사용된다. ELISA 분석법은 초기에 CK $\alpha$ -2에 특이적인 항체, 바람직하게는 단일클론 항체를 제조하는 단계를 포함한다. 또한 일반적으로 단일클론 항체에 결합하는 리포터 항체를 제조한다. 리포터 항체는 방사성, 형광성 또는 효소적 시약, 이 실시예에서는 양고추냉이 퍼옥시다제 효소와 같은 검출가능한 시약에 부착한다.

ELISA를 수행하기 위해서는, 샘플을 숙주로부터 제거하고, 샘플내 단백질과 결합하는 고체 지지체(예: 폴리스티렌 접시) 상에서 항온처리한다. 접시상의 임의의 방출 단백질 결합 부위는 소의 혈청 알부민과 같은 비특이적 단백질과 항온처리함으로써 채워진다. 다음, 단일클론 항체를 그 접시에서 항온처리하는데, 그 동안 단일클론 항체는 폴리스티렌 접시에 부착된 임의의 CK $\alpha$ -2 단백질에 부착한다. 결합되지 않은 단일클론 항체는 완충제로 세척한다. 양고추냉이 퍼옥시다제에 연결된 리포터 항체는 접시에 배치하여 리포터 항체가 CK $\alpha$ -2에 결합된 임의의 단일클론 항체에 결합하도록 한다. 그 다음, 부착되지 않은 리포터 항

체를 세척한다. 그 다음, 축색성 기질을 포함하여 퍼옥시다제 활성에 대한 시약을 접시에 첨가한다. 1차 및 2차 항체를 통해 CK $\alpha$ -2에 연결된 고정화된 퍼옥시다제는 발색된 반응 생성물을 생성시킨다. 주어진 시간에 나타난 색깔의 양은 샘플에 존재하는 CK $\alpha$ -2 단백질의 양을 나타내는 것이다. 정량 분석 결과는 통상 표준 곡선을 참조하여 수득된다.

경쟁 분석법을 이용할 수 있는데, 여기서는 고체 지지체에 부착된 CK $\alpha$ -2 및 표지된 CK $\alpha$ -2와 숙주에서 유래한 샘플을 고체 지지체 위로 통과시키고, 고체 지지체에 부착된 채로 검출되는 표지의 양은 샘플내 CK $\alpha$ -2의 양과 상호 관련시킬 수 있다.

폴리펩티드, 그 단편 또는 기타 유도체, 또는 그 유사체 또는 이들을 발현시키는 세포를 면역원으로서 사용하여 그에 대한 항체를 생산할 수 있다. 이들 항체는 예를 들면, 다클론 항체 또는 단일클론 항체일 수 있다. 본 발명은 또한 키메라성 단일쇄 및 인간화된 항체, 뿐만 아니라 Fab 단편 또는 Fab 발현 라이브러리의 생성물을 포함한다. 당해 분야에 공지된 다양한 절차를 그러한 항체 및 단편의 생산에 사용할 수 있다.

본 발명의 서열에 상응하는 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 폴리펩티드를 동물내로 직접 주사하거나 또는 폴리펩티드를 동물, 바람직하게는 인간 이외의 동물에 투여함으로써 수득할 수 있다. 그렇게 수득된 항체는 폴리펩티드 자체에 결합한다. 이러한 방식으로, 폴리펩티드의 단편만을 암호화하는 서열 조차도 전체 천연 폴리펩티드에 결합하는 항체를 생성시키는 데에 사용할 수 있다. 그러한 항체를 사용하여 폴리펩티드를 발현시키는 조직으로부터 그 폴리펩티드를 분리할 수 있다.

상기 항체들을 이용하여 폴리펩티드를 발현시키는 클론을 분리 또는 동정하거나, 또는 친화도 크로마토그래피에 의한 분리 및/또는 정제를 위해 고체 지지체에 부착시킴에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 정제할 수 있다.

단일클론 항체의 제조를 위해서는, 연속 세포주 배양에 의해 생성되는 항체를 제공하는 임의의 기술을 사용할 수 있다. 그 기술의 예로는 하이브리도마 기술(Kohler, G. 및 Milstein, C., Nature 256:495-497(1975)), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor 등, Immunology Today 4:72 (1983)) 및 인간의 단일클론 항체를 제조하는 EVB-하이브리도마 기술(Cole 등, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96면)을 들 수 있다.

단쇄 항체의 제조에 대해 기재하고 있는 기술(미국 특허 제4,946,778호)은 본 발명의 면역원성 폴리펩티드 생성물에 대한 단쇄 항체를 생산하도록 변형시킬 수 있다. 또한, 돌연변이 마우스 또는 기타 포유동물과 같은 기타 생물을 사용하여 본 발명의 면역원성 폴리펩티드에 대해 인간화된 항체를 발현시킬 수 있다.

상기 항체들을 이용하여 고체 지지체에 대한 항체의 부착에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 분리하고, 정제하고자 하는 폴리펩티드를 칼럼 위로 통과시켜 친화도 크로마토그래피를 실시하고, 정제된 폴리펩티드를 회수할 수 있다.

따라서, 무엇보다도, CK $\alpha$ -2를 이용하여 암 화학 요법중 및 백혈병에 대한 보조제 보호 치료로서 골수 간세포 콜로니 형성을 억제할 수 있다.

CK $\alpha$ -2를 이용하여 각질 세포의 과다 증식을 특징으로 하는 건선의 치료를 위해 전염성 각질 세포 증식을 억제할 수도 있다.

CK $\alpha$ -2를 이용하여 숙주 방어 세포, 예를 들면, 세포 독성의 T 세포 및 대식세포의 침입 및 활성화를 자극하고, 종양의 혈관형성을 억제함으로써, 고체성 종양을 치료할 수도 있다. CK $\alpha$ -2를 이용하여 내성이 있는 만성 및 급성 감염, 예를 들면, 살미생물성의 백혈구의 유인 및 활성화를 통해 마이코박테리아 감염에 대한 숙주의 방어 작용을 증강시킬 수도 있다.

CK $\alpha$ -2를 이용하여 T-세포 매개 자가 면역 질병 및 임파구성 백혈병의 치료를 위해 IL-2 생합성의 억제에 의해 T 세포 증식을 억제할 수도 있다.

CK $\alpha$ -2를 이용하여 찌꺼기 제거의 보충 및 연결 조직에 의한 염증의 자극을 통해, 그리고 또한 과도한 TGF $\beta$ -매개 섬유증의 조절을 통해 상처 치료 작용을 자극할 수도 있다. 이와 동일한 방법으로, CK $\alpha$ -2를 이용하여 간 경변, 골관절염 및 폐의 섬유증을 포함하여 기타 섬유증 질환을 치료할 수도 있다.

CK $\alpha$ -2는 주혈충증, 선모충증 및 회충증에서처럼 조직에 침입하는 기생체의 유충을 사멸시키는 뚜렷한 기능을 가지는 호산구의 존재를 증가시키기도 한다.

CK $\alpha$ -2를 이용하여 다양한 조혈성 조상 세포의 활성화 및 분화를 조절함으로써 조혈(造血)을 조절할 수도 있는데, 예를 들면, 화학 요법 이후의 골수로서 성숙 백혈구를 방출시킬 수 있다.

본 발명은 또한 CK $\alpha$ -2에 결합하는 수용체 분자와 같은 분자들의 동정 방법을 제공한다. 수용체 단백질과 같이 CK $\alpha$ -2에 결합하는 단백질을 암호화하는 유전자는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 공지된 다수의 방법으로, 예를 들면, 리간드 선별법 및 FACS 분류법으로 동정할 수 있다. 그러한 방법들은 예를 들면, 문헌[Coligan 등, Current Protocols in Immunology 1(2); 제5장 (1991)]에 기재된 바와 같이 다수의 실험실 매뉴얼에 기재되어 있다.

예를 들면, 상기 목적으로 발현 클로닝을 이용할 수 있다. 이 목적으로, 폴리아데닐화된 RNA는 CK $\alpha$ -2에 반응하는 세포로부터 제조하고, cDNA 라이브러리는 이 RNA로부터 생성시키고, 그 라이브러리는 푸울로 나누고, 그 푸울을 CK $\alpha$ -2에 반응성이 없는 세포내로 개별적으로 형질 감염시킨다. 그 다음, 형질감염된 세포를 표지된 CK $\alpha$ -2에 노출시킨다(CK $\alpha$ -2는 방사성 요소드화하거나 또는 부위 특이적 단백질 키나제의 인지 부위를 포함시키는 표준 방법들을 포함하여 널리 공지된 다양한 기술에 의해 표지할 수 있다). 노출 단계후, 세포를 고정시키고, CK $\alpha$ -2의 결합을 측정한다. 이러한 절차는 방출 슬라이드상에서 수행하는 것이 편리하다.

푸울은 CK $\alpha$ -2 결합 세포를 생산한 cDNA의 푸울로 동정되었다. 이들 양성 푸울로부터 세부 푸울을 제조하

고, 숙주 세포내로 형질감염시키고, 상기한 바와 같이, 검색하였다. 반복적인 세부 푸울 작업 및 재검색 공정을 사용하여 수용체 분자와 같은 임시의 결합 분자를 암호화하는 하나 이상의 단일 클론을 분리할 수 있다.

한편, 표지된 리간드는 수용체 분자와 같이 리간드가 결합하는 분자를 발현시키는 세포로부터 제조된 막 또는 막 추출물과 같은 세포 추출물에 광친화성에 의해 연결시킬 수 있다. 교차결합된 재료는 폴리아크릴 아미드 겔 전기영동('PAGE')에 의해 분리하고 X-선 필름에 노출시킨다. 리간드-수용체를 함유하는 표지된 복합체를 절제하고, 펩티드 단편으로 분리하고 단백질 미세 서열 분석하였다. 미세 서열 분석으로부터 수득한 아미노산 서열을 사용하여 임시적인 수용체 분자를 암호화하는 유전자를 동정하는 cDNA 라이브러리를 검색하기 위한 특이적 또는 축퇴성 올리고뉴클레오티드 프로브를 안출할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 세포내 또는 무세포 제제내의 수용체 분자와 같은 CK $\alpha$ -2 결합 분자의 CK $\alpha$ -2 결합능을 평가할 수도 있다.

본 발명은 또한 수용체 분자와 같은 CK $\alpha$ -2-결합 분자와의 상호작용과 같이, 세포에 대한 CK $\alpha$ -2의 작용을 증강 또는 차단하는 것들을 동정하는 화합물의 검색 방법을 제공한다. 작용물질은 CK $\alpha$ -2의 천연적인 생물학적 기능을 증가시키거나 또는 CK $\alpha$ -2와 유사한 방식으로 기능하는 화합물인 반면에, 길항물질은 그러한 기능을 감소 또는 제거한다.

예를 들면, 세포 구획물(예; 막 또는 막-제제와 같은 그 제제)은 CK $\alpha$ -2에 의해 조절되는 신호 작용 경로 또는 조절 경로의 분자와 같이, CK $\alpha$ -2에 결합하는 분자를 발현시키는 세포로부터 제조할 수 있다. 이 제제는 CK $\alpha$ -2 작용물질 또는 길항물질일 수 있는 후보 분자의 존재 또는 부재하에 표지된 CK $\alpha$ -2와 항온처리한다. 후보 분자가 결합 분자에 결합하는 능력은 표지된 리간드의 감소된 결합에서 유추된다. 무상으로, 즉 CK $\alpha$ -2가 CK $\alpha$ -2 결합 분자에 결합하는 효과를 유도하지는 않으면서, 결합하는 분자들이 양호한 길항물질이 될 가능성이 높다. 잘 결합하고 CK $\alpha$ -2와 동일하거나 또는 밀접하게 관련되는 효과를 유도하는 분자들이 작용물질이다.

유리한 작용물질 및 길항물질의 CK $\alpha$ -2-유사 효과는 예를 들면, 후보 분자를 세포 또는 적합한 세포 제제와 상호작용시킨 다음, 제2 메신저 시스템의 활성을 측정하고, CK $\alpha$ -2나 그와 동일한 효과를 유발하는 분자의 효과를 그 효과와 비교함으로써, 측정할 수 있다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 제2 메신저 시스템은 AMP 구아닐레이트 사이클라제, 이온 채널 또는 포도이노시티드 가수분해 제2 메신저 시스템이 있으나, 이에 국한되지 않는다.

CK $\alpha$ -2 길항물질에 대한 분석법의 또 다른 예는 CK $\alpha$ -2 및 유리한 길항물질을 막-결합된 CK $\alpha$ -2 수용체 분자 또는 재조합 CK $\alpha$ -2 수용체 분자와 경쟁적 억제 분석법에 적합한 조건하에서 배합하는 경쟁적 분석법이다. CK $\alpha$ -2는 방사성 같은 것에 의해 표지할 수 있고, 그 결과 수용체 분자에 결합된 CK $\alpha$ -2 분자의 수는 유리한 길항물질의 효능을 평가하기 위해 정확히 측정할 수 있다.

유리한 길항물질로는 본 발명의 폴리펩티드에 결합함으로써 그 활성을 억제 또는 소멸시키는 소형 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드 및 항체가 있다. 유리한 길항물질은 또한 CK $\alpha$ -2-유도 활성을 유도하지 않고 수용체 분자와 같이 결합 분자상의 동일 부위에 결합함으로써, CK $\alpha$ -2가 결합하는 것을 배제시킴에 의해 CK $\alpha$ -2의 작용을 방해하는 소형 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드 및 항체가 있다.

유리한 길항물질로는 폴리펩티드의 결합 부위에 결합하여 그 부위를 차지함으로써 수용체 분자와 같은 세포 결합 분자에의 결합을 방해하고, 그 결과 정상적인 생물학적 활성이 방해되는 소형 분자가 있다. 소형 분자의 예로는 소형 유기 분자, 펩티드 또는 펩티드-유사 분자가 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다.

기타 유리한 길항물질로는 안티센스 분자가 있다. 안티센스 기술을 사용하여 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 또는 3중 나선 형성을 통해 유전자 발현을 조절할 수 있다. 안티센스 기술은 예를 들면, 문헌[Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides As Antisense Inhibitors Of Gene Expression, 플로리다 보카 래트 소재의 CRC 프레스(1988)]에 언급되어 있다. 3중 나선 형성은 예를 들면, 문헌[Lee 등, Nucl. Acids Res.6:3073(1979); Cooney 등, Science 241:456(1988); 및 Dervan 등, Science 251:1360(1991)]에 언급되어 있다. 그 방법들은 폴리뉴클레오티드가 상보성 DNA 또는 RNA에 결합하는 원리에 근거하고 있다. 예를 들면, 본 발명의 성숙한 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 5' 암호 부를 사용하여 약 10개 내지 40개 염기쌍 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 안출할 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드는 전사에 관계하는 유전자 영역과 상보적이어서 CK $\alpha$ -2의 전사 및 생성을 방해하도록 안출된다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 mRNA에 하이브리드화하고, mRNA 분자의 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드로의 해독을 차단한다. 상기 올리고뉴클레오티드를 세포로 전달함으로써 안티센스 RNA 또는 DNA가 생체내에서 발현되어 CK $\alpha$ -2의 생성을 억제하도록 할 수도 있다.

길항물질을 이용하여, 예를 들면, 특정 자가 면역성 질병 및 만성 염증성 및 감염성 질병에서, 대식세포 및 그 전구체의 주화성 및 활성화, 호중구, 호염기구, B 임파구 및 일부 T 세포 부분집합, 예를 들면, 활성화되고 CD8 세포 독성인 T 세포와 천연 킬러 세포의 주화성 및 활성화를 억제할 수 있다. 자가 면역성 질병의 예로는 다발성 경화 및 인슐린 의존성 당뇨병이 있다.

길항물질을 이용하여 단핵구성 식세포의 보강 및 활성화를 방해함으로써 규폐증, 유육종증(類肉腫症), 특발성 폐 섬유증과 같은 감염성 질병을 치료할 수도 있다. 이들은 또한 호산구 생성 및 이동을 방해함으로써 특발성 과호산구 증후군의 치료에 이용할 수도 있다. 내독소 충격은 또한 대식세포의 이동 및 본 발명의 인간 케모카인 폴리펩티드의 생성을 방해함으로써 길항물질에 의해 치료될 수도 있다.

길항물질을 이용하여 동맥벽에서 단구 침입을 방지함으로써 동맥경화증을 치료할 수도 있다.

길항물질을 이용하여 케모카인-유도 비만 세포 및 호염기구 과립 제거 및 히스타민의 방출을 억제함으로써 알기 단계의 알레르기 반응, 만성 두드러기 및 아토피성 피부염과 같은 히스타민-매개의 알레르기 반응 및 면역학적 질환을 치료할 수도 있다. 알레르기성 천식, 비염 및 습진과 같은 IgE-매개의 알레르기 반응을 치료할 수도 있다.

길항물질을 이용하여 상처 부위로의 단구의 유인을 방지함으로써 만성 및 급성 염증을 치료할 수도 있다. 이들은 또한 정상적인 폐 대식세포 군집을 조절하는 데에도 이용할 수 있는데, 그 이유는 만성 및 급성 염증성 폐 질환은 폐내의 단핵구 식세포의 격리와 관련되기 때문이다.

길항물질을 이용하여 환자의 관절내 활액내로의 단구의 유인을 방지함으로써 류마티스성 관절염을 치료할 수도 있다. 단구 유입 및 활성화는 퇴행성 및 염증성 관절증의 발병에 중요한 역할을 한다.

길항물질을 이용하여 주로 IL-1 및 TNF가 원인인 유해한 다단계 반응을 방해함으로써, 기타 염증성 사이토카인의 생합성을 방지할 수 있다. 이러한 방법으로, 길항물질을 이용하여 염증을 방지할 수 있다. 길항물질을 이용하여 케모카인에 의해 유도된 프로스타글린딘-의존성 발열을 억제할 수도 있다.

길항물질을 이용하여 골수의 손상, 예를 들면, 재생불량성 빈혈 및 골수형성 이상 증후군 환자를 치료할 수도 있다.

길항물질을 이용하여 폐내 호산구 축적을 방지함으로써 천식 및 알레르기를 치료할 수도 있다. 길항물질을 이용하여 천식성 폐의 현저한 특징인 상피하부 기저막 섬유증을 치료할 수도 있다.

길항물질은 하기하는 약학적으로 허용 가능한 담체와의 조성물로 이용할 수 있다.

본 발명은 또한 상기한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드나 작용물질 또는 길항물질을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 세포, 조직 또는 유기체와 함께 사용하기 위한 비열균 또는 열균 담체(들), 예를 들면, 환자에게 투여하기에 적합한 약학적 담체와 함께 이용할 수 있다. 그러한 조성물은 예를 들면, 매질 첨가제 또는 본 발명의 폴리펩티드 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유할 수 있다. 그러한 담체의 예로는 염수, 완충 염수, 맥스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 들 수 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다.

본 발명은 또한 전술한 본 발명의 조성물의 성분이 하나 이상 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제 팩 및 키트에 관한 것이다. 그러한 용기(들)와 관련하여서는 그 제조를 규율하는 정부 부처에 의한 지시문, 제조 부처의 승인을 나타내는 약제 또는 생물학적 제품의 사용법 또는 판매가, 인간 투여용 제품의 사용법 또는 판매가가 표시될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 및 기타 화합물은 치료용 화합물과 같은 기타 화합물과 함께 또는 단독으로 이용할 수 있다.

약학 조성물은 예를 들면, 국소, 경구, 항문, 바기나, 정맥, 복강, 근육내, 피하, 비강내 또는 피내 경로에 의한 투여를 포함하여 효율적이고 편리한 임의의 방법으로 투여할 수 있다.

약학 조성물은 일반적으로 구체적인 징후(들)의 치료 또는 예방에 유효한 양으로 투여한다. 일반적으로, 그 조성물은 체중 kg당 약 10 $\mu$ g 이상의 양으로 투여한다. 대부분의 경우에, 조성물은 하루에 체중 kg당 약 8 mg을 초과하지 않는 양으로 투여된다. 대부분의 경우에는, 투여량이 하루에 체중 kg당 약 10  $\mu$ g 내지 약 1 mg인 것이 바람직하다. 최적 투여량은 징후, 심도, 투여 경로, 합병증 상태 등을 고려하여 각각의 치료 양식 및 징후에 대한 표준 방법으로 결정될 것임을 알 수 있다.

CK $\alpha$ -2 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 작용물질 및 길항물질(폴리펩티드)는 '유전자 치료'로 종종 지칭되는 치료 양식으로 생체내에서 그러한 폴리펩티드의 발현에 의해 본 발명에 따라 이용할 수 있다.

따라서, 예를 들면, 환자의 세포는 생체외 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 또는 RNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 사용하여 유전자를 조작할 수 있으며, 조작된 세포는 그 폴리펩티드로 치료할 환자에게 제공할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 RNA를 함유하는 레트로바이러스 플라스미드 벡터를 사용하여 생체외에서 세포들을 유전자 조작할 수 있다. 그러한 방법들은 당해 분야에서 널리 공지되어 있으며, 본 발명에서 그 방법들의 사용은 본 명세서로부터 명확히 알 수 있다.

유사하게, 당해 분야에 공지된 절차에 의해 생체내 폴리펩티드의 발현을 위해 세포들을 생체내 조작할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 조작하여 상기한 바와 같이 복제 결함성 레트로바이러스 벡터에서 발현시킬 수 있다. 레트로바이러스 발현 구조물을 분리하여 패키징 세포내로 도입하고, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 RNA를 함유하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 형질도입시킴으로써, 패키징 세포가 당해 유전자를 함유하는 감염성 바이러스 입자를 생산할 수 있도록 한다. 이들 생산한 세포를 환자에게 투여하여 세포들을 생체내에서 조작하고 생체내에서 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 그러한 방법에 의해 본 발명의 폴리펩티드를 투여하는 상기 및 기타 방법은 본 발명의 개시 사항으로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 명백히 이해될 수 있다.

전술한 레트로바이러스 벡터가 유래될 수 있는 레트로바이러스로는 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 로우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus), 하비(Harvey) 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 기본(gibbon) 원숭이 백혈병 바이러스, 인간의 면역 결핍증 바이러스, 아데노바이러스, 골수증식성 육종 바이러스 및 유선 종양 바이러스를 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한 가지 양태에서, 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 몰로니 쥐 백혈병 바이러스에서 유래한 것이다.

그러한 벡터는 폴리펩티드의 발현용으로 하나 이상의 프로모터를 포함한다. 이용할 수 있는 적합한 프로모터로는 레트로바이러스의 LTR, SV40 프로모터 및 문헌[Miller 등, Biotechniques 7:980-990 (1989)]에 기재된 인간의 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터가 있으며, 이에 국한하지 않고 기타 임의의 프로모터(예; 히스톤, RNA 폴리머라제 III 및  $\beta$ -액틴 프로모터를 비롯한(이에 국한되지 않음) 진핵세포의 프로모터와 같은 세포 프로모터)를 사용할 수도 있다. 이용할 수 있는 기타 바이러스 프로모터로는 아데노바이러스 프로모터, 티미딘 키나제(TK) 프로모터 및 B19 파르보바이러스 프로모터가 있으나, 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에 개시한 사항으로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 적합한 프로모터를 선택할 수 있음은 명확한 사항이다.

본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 적합한 프로모터의 조절하에 배치된다. 이용할 수 있는

적합한 프로모터로는 아데노바이러스 주요 후기 프로모터와 같은 아데노바이러스 프로모터; 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터와 같은 이종성 프로모터; 호흡기 합포체 바이러스(RSV) 프로모터; MMT 프로모터, 메탈로티오네인과 같은 유도성 프로모터; 열 충격 프로모터; 알부민 프로모터; ApoA1 프로모터; 인간 글로빈 프로모터; 단순 포진 티미딘 키나제 프로모터와 같은 바이러스 티미딘 키나제 프로모터; 레트로바이러스 LTR(상기 변형된 레트로바이러스 LTR 포함);  $\beta$ -액틴 프로모터; 및 인간 성장 호르몬 프로모터가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 프로모터는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 제어하는 천연 프로모터도 사용할 수 있다.

레트로바이러스 플라스미드 벡터를 이용하여 패키지 세포주에 형질도입시킴으로써 생산자 세포주를 형성한다. 형질감염될 수 있는 패키지 세포의 예로는 문헌[Miller, A., Human Gene Therapy 1:5-14(1990)]에 기재된 바와 같이, PE501, PA317, Y-2, Y-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, YCRE, YCRIP, GP + E-86, GP + envAm 12 및 DAN 세포주가 있으며, 이에 국한되지 않는다. 벡터는 당해 분야에 공지된 임의의 수단을 통해 패키지 세포내로 형질도입시킬 수 있다. 그러한 수단의 예로는 전기사출법, 리포솜의 사용 및  $\text{CaPO}_4$  침전법을 들 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 한 가지 대안으로서, 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 리포솜내로 캡슐화하거나, 지질에 연결한 다음, 숙주에게 투여할 수 있다.

생산자 세포주는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자를 생산한다. 그러한 레트로바이러스 벡터 입자는 생체외 또는 생체내에서 진핵 세포에 형질도입시키는 데에 이용될 수 있다. 형질도입된 진핵 세포는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열(들)을 발현시킨다. 형질도입될 수 있는 진핵 세포로는 배의 간세포, 배의 암종, 뿐만 아니라, 조혈성 간세포, 혈구, 섬유아세포, 근아세포, 각질세포, 상피 세포 및 기관지 상피 세포가 있으나, 이에 국한되지 않는다.

본 발명은 하기 실시예들에 의해 더욱 상세히 설명한다. 실시예들은 구체적 양태와 관련하여 본 발명을 예시할 목적으로만 제시된 것이다. 본 발명의 특징의 구체적인 측면을 예시하는 이들 실시예는 개시된 본 발명의 범위를 제한 또는 한정하고자 하는 것은 아니다. 실시예에 사용된 특징의 용어는 상기 용어 설명에서 설명한 바와 동일하다.

모든 실시예들은 표준 기술을 사용하여 수행하였는데, 이 기술들은 달리 상세한 언급이 없으면, 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 널리 공지된 통상의 기술이다. 하기 실시예들에서 제시된 모든 부 또는 양은 달리 언급하지 않는한, 중량 기준이다. 하기 실시예들의 통상의 분자 생물학 기술은 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판; 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989), 본원에서는 '샘브록'으로 지칭함]과 같은 표준 실험실 매뉴얼에 기술된 대로 수행할 수 있다.

달리 언급하지 않으면, 하기 실시예들의 단편의 크기에 따른 분리는 샘브록의 문헌 및 다수의 기타 참조 문헌[예; Goeddel 등, Nucleic Acids Res, 8:4057(1980)]에 기재된 아가로스 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동('PAGE')의 표준 기술을 사용하여 수행하였다.

다른 언급이 없으면, 결찰은 표준 완충액, 항온처리 온도 및 시간, 결찰할 DNA 단편의 대략 동일몰량 및 DNA 0.5  $\mu\text{g}$ 당 T4 DNA 리가제('리가제') 약 10 단위를 사용하여 수행하였다.

### 도면의 간단한 설명

하기 도면은 본 발명의 특정 양태들을 도시한 것이다. 이들은 단지 예시용이며, 본 발명을 제한하려는 것은 아니다.

도 1은 뉴클레오티드(서열 번호 1)와 서열 번호 1의 43 내지 45에 위치한 AUG 코돈으로부터 개시된 인간 CK $\alpha$ -2 단백질의 추정 아미노산 서열(서열 번호 2)을 도시한 것이다. 이 단백질은 약 28 아미노산 잔기(밀줄)의 예상 리더 서열과 약 10 킬로달톤(kDa)의 추정 분자량을 가진다.

도 2는 뉴클레오티드(서열 번호 1)와 서열 번호 1의 79 내지 81에 위치한 AUG 코돈으로부터 개시된 인간 CK $\alpha$ -2 단백질의 추정 아미노산 서열(서열 번호 3)을 도시한다. 이 단백질은 약 16 아미노산 잔기(밀줄)의 예상 리더 서열과 약 8.6 kDa의 추정 분자량을 가진다.

도 3은 서열 번호 2의 CK $\alpha$ -2의 아미노산 서열과 중국산 햄스터 GRO 폴리펩티드(서열 번호4) 사이의 유사 영역을 도시한 것이다.

도 4는 서열 번호 3의 CK $\alpha$ -2의 아미노산 서열과 중국산 햄스터 GRO 폴리펩티드(서열 번호4) 사이의 유사 영역을 도시한 것이다.

도 5는 아미노산 서열의 함수로서, 알려진 기술로 추론한 서열 번호 2에 도시된 CK $\alpha$ -2의 구조 및 기능적 특징을 도시한 것이다.

### 실시예

#### 실시예 1

박테리아를 사용한 인간 CK $\alpha$ -2의 발현 및 정제

기탁된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 인간 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 DNA 서열은 도 1(서열번호 2)에 도시된 인간 CK $\alpha$ -2 단백질의 성숙한 형의 아미노산 카르복실 말단에 특이적이고 유전자에 대해 3'인 벡터 서열에 특이적인 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 클로닝을 촉진하기 위한 제한 부위를 포함하는 부가의 뉴클레오티드를 5' 및 3' 서열에 각각 첨가하였다.

5' 올리고뉴클레오티드 프라이머는 밀줄친 SphI 제한 부위를 포함하는 서열 5' CCC GCA TGC CCG CGC GTG TGG ACG GG 3'(서열번호 5)을 가졌다. 3' 프라이머는 밀줄친 BamHI 제한 부위를 포함하는 서열 5' CCC GGA TCC CTA TTC TTC GTA GAA CCT 3'(서열번호 6)을 가졌다.

이들 제한 부위는 이들 실시예에서 박테리아의 발현에 사용된 박테리아의 발현 벡터 pQE-9(캘리포니아주 91311 채츠워스 이튼 애비뉴 9259 소재의 퀴아젠 인코오포레이티드)의 제한 효소 부위에 적당하다. pQE-9는 암피실린 항생물질 내성('Amp<sup>r</sup>')을 암호화하고, 박테리아의 복제 기점('ori'), IPTG 유도성 프로모터, 리보솜 결합 부위('RBS'), 6-His 표지 및 제한 효소 부위를 포함한다.

증폭된 인간 CK $\alpha$ -2 DNA 및 벡터 pQE-9는 둘다 SphI 및 BamHI으로 처리하고, 처리된 DNA를 함께 결합시켰다. 제한 효소 처리된 벡터내로 CK $\alpha$ -2를 삽입시킴에 의해 CK $\alpha$ -2 암호 영역을 벡터의 IPTG-유도성 프로모터의 하류에 그리고 그 프로모터에 작동적으로 연결시키고, CK $\alpha$ -2의 해독을 위해 개시 AUG를 해독들에 적절하게 위치시켰다.

결찰 혼합물은 표준 절차를 사용하여 경쟁적 이.콜리 세포내로 형질전환시켰다. 그러한 절차는 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989)]에 기재되어 있다. lac 리프레서를 발현시키고 카나마이신 내성('Kan')을 부여하는 플라스미드 pREP4의 다수 사본을 포함하는 이.콜리 균주 M15/rep4를 본원에 기재한 예시적 실시예를 수행하는 데에 사용하였다. 이 균주는 CK $\alpha$ -2를 발현시키기 위해 적합한 다수 균주중의 단 하나인 균주로서 퀴아젠에서 시판되고 있다.

형질전환체는 암피실린의 존재하에 LB 평판상에서 증식하는 능력으로 동정하였다. 플라스미드 DNA는 내성 콜로니로부터 분리하고, 클로닝된 DNA는 제한 분석에 의해 확인하였다.

목적 구조물을 포함하는 클론을 암피실린(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 카나마이신(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 보충된 LB 배지내에서 액체 배양으로 하루밤 동안('O/N') 증식시켰다.

O/N 배양물을 사용하여 대략 1:100 내지 1:250의 희석률로 대량의 배양물을 점종시켰다. 세포들을 증식시켜 600 nm에서의 광학 밀도('OD<sub>600</sub>') 0.4 내지 0.6을 얻었다. 그 다음, 이소프로필-B-D-티오갈락토피라노사이드('IPTG')를 첨가하여 최종 농도를 1mM로 만들고, lacI 리프레서를 불활성화시킴으로써 lac 리프레서 민감성 프로모터로부터 전사를 유도하였다. 이어서 세포들을 3 시간 내지 4 시간 더 항온 배양하였다. 그 다음 세포들을 원심분리에 의해 수집하고 표준 방법으로 파괴하였다. 봉입체를 통상의 수집 기술을 사용하여 파괴된 세포로부터 정제하고, 단백질은 봉입체로부터 8M 우레아에 용해시켰다. 용해된 단백질을 함유하는 8M 우레아 용액을 2 $\times$ 인산염 완충 염수('PBS')중에서 PD-10 칼럼위로 통과시켜 우레아를 제거하고, 완충액을 교환하고, 단백질을 재폴딩하였다. 단백질을 크로마토그래피의 추가 단계에 의해 정제하여 내독소를 제거하였다. 그 다음, 단백질을 멸균 여과하였다. 멸균 여과된 제제를 2 $\times$  PBS에 95  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 보관하였다.

## 실시예 2

바쿨로바이러스에서의 인간 CK $\alpha$ -2의 클로닝 및 발현

도 1(서열번호 2)에 도시되고 기탁된 클론에 의해 암호화된 전 길이의 인간 CK $\alpha$ -2 단백질을 암호화하는 cDNA 서열을, 유전자의 5' 및 3' 서열에 상응하는 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭시켰다.

5' 프라이머는 밀줄친 BamHI 제한 효소 부위를 포함하는 서열 5' GCC GGA TCC GCC ATC ATG TCC CTG CTC CC 3'(서열번호 7)을 가졌다. 하기하는 바와 같이, 발현 벡터내로 인간 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 증폭된 단편의 5' 단부를 삽입하여 효율적인 신호 펩티드를 수득한다. 문헌[Kozak, M., J. Mol. Biol. 196:947-950 (1987)]에 기재된 바와 같이, 진핵 세포 내에서의 해독의 개시를 위한 효율적인 신호는 대략 구조물의 벡터 부분에 위치한다.

3' 프라이머는 밀줄친 XbaI 제한 부위를 포함하는 서열 5' CGC GTC TAG ACT ATT CTT CGT AGA ACC T 3'(서열번호 8)을 가졌다.

증폭된 단편은 시판 키트(캘리포니아주 라 졸라 소재의 바이오 101 인코오포레이티드의 '제네클린')를 사용하여 1% 아가로스 겔로부터 분리하였다. 그 다음, 그 단편을 BamHI 및 Asp718로 처리하고, 다시 1% 아가로스 겔상에서 정제하였다. 이 단편을 F2로 명명한다.

문헌[Summers 등, A Manual of Methods For Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, 텍사스 어그리컬처럴 익스퍼리멘탈 스테이션 볼리턴 번호 1555(1987)]에 기재된 것과 같은 표준 방법을 사용하여 바쿨로바이러스 발현 시스템에서 벡터 pRG1을 사용하여 CK $\alpha$ -2 단백질을 발현시킨다. 이 발현 벡터는 오토그라파 캘리포니카 핵 다면증 바이러스(AcMNPV)의 강력한 폴리헤드린 프로모터와 그에 따른 적합한 제한 부위를 포함한다. 원숭이 바이러스('SV40')의 폴리아데닐화 부위를 효율적인 폴리아데닐화에 사용한다. 재조합 바이러스의 용이한 선별을 위해, 이.콜리의 베타-갈락토퍼시다제 유전자를 폴리헤드린 프로모터와 동일한 방향으로 삽입한 다음에, 폴리헤드린 유전자의 폴리아데닐화 신호를 삽입한다. 폴리헤드린 서열은 바이러스 서열에 의해 양쪽에 인접시켜 야생형 바이러스 DNA와 세포 매개의 상동 재조합이 클로닝된 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 생바이러스를 생성시키게 한다.

당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 이해하듯이, 그 구성이 필요에 따라 틀내 AUG 및 신호 펩티드와 같이 전사, 해독 및 수송 등에 대한 적합하게 위치한 신호를 제공한다면, PRG1 대신에 pAc373, pVL941 및 pAc1M1과 같은 다수의 기타 바쿨로바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 그러한 벡터들은 문헌[Luckow 등, Virology 170:31-39]에 기재되어 있다.

플라스미드는 제한효소 XbaI 및 BamHI으로 처리한 다음, 당해 분야에 공지된 통상의 절차를 사용하여 송아지 장 포스파타제를 사용하여 탈포스포릴화한다. 그 다음, 시판 키트(캘리포니아주 라 졸라 소재의 바이오 101 인코오포레이티드의 '제네클린')를 사용하여 DNA를 1% 아가로스 겔로부터 분리한다. 이 벡터 DNA를 'V2'로 명명한다.

단편 F2 및 탈포스포릴화된 플라스미드 V2는 T4 DNA 리가제로 함께 결합한다. 이.콜리 HB101 세포는 결합 혼합물로 형질전환시키고, 배양 평판상에 확포한다. XbaI 및 BamHI을 사용하여 각각의 콜로니로부터 얻은

DNA를 처리한 다음, 겔 전기영동에 의해 처리 생성물을 분석함으로써 인간 CK $\alpha$ -2 유전자와 함께 플라스미드를 함유하는 박테리아를 동정하였다. 클로닝된 단편의 서열은 DNA 서열 분석에 의해 확인한다. 이 플라스미드를 pBacCK $\alpha$ -2로 명명한다.

문헌[Felgner 등, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 84:7413-7417(1987)]에 기재된 리포펙션(lipofection) 방법을 사용하여 플라스미드 pBacCK $\alpha$ -2 5 $\mu$ g을 시판되는 선형화된 바쿨로바이러스 DNA(캘리포니아 샌 디에고 소재의 파밍겐의 '바쿨로골드(BaculoGold™) 바쿨로바이러스 DNA') 1.0  $\mu$ g으로 동시 형질감염시켰다. 바쿨로골드 바이러스 DNA 1  $\mu$ g 및 플라스미드 pBacCK $\alpha$ -2 5 $\mu$ g을 무혈청 그레이스 배지(매릴랜드주 게이더스버그 소재의 라이프 테크놀로지스 인코오포레이티드) 50  $\mu$ l를 함유하는 미량역가 평판의 멸균 웰에서 혼합하였다. 그 후, 리포펙틴 10  $\mu$ l + 90  $\mu$ l의 그레이스 배지를 첨가하고, 혼합하고 실온에서 15분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 형질감염 혼합물을 무혈청 그레이스 배지 1 ml와 함께 35 mm의 조직 배양 평판에 파종된 Sf9 곤충 세포(ATCC CRL 1711)에 적가하였다. 그 평판을 앞뒤로 흔들어서 새로이 첨가된 용액을 혼합하였다. 그 다음, 평판을 27 $^{\circ}$ C에서 5 시간 동안 항온 처리하였다. 5 시간후, 형질감염 용액을 평판으로부터 제거하고, 10% 태내 송아지 혈청으로 보충된 그레이스 곤충 배지 1 ml를 첨가하였다. 그 평판을 항온처리기에 다시 넣고, 27 $^{\circ}$ C에서 4 시간 동안 배양을 계속하였다.

4일후, 상청액을 수집하고, 상기한 서머스 및 스미스의 문헌에 기재된 바와 같이 플라크 분석을 실시하였다. '블루 갈'(게이더스버그 소재의 라이프 테크놀로지스 인코오포레이티드)을 가진 아가로스 겔을 사용하여 gal-발현 클론의 용이한 동정 및 분리를 가능하게 하는데, 이들 클론은 청색으로 염색된 플라크를 생성시켰다. (이러한 유형의 '플라크 분석'에 대한 상세한 설명은 게이더스버그 소재의 라이프 테크놀로지스 인코오포레이티드에서 배포된 곤충 세포 배양 및 바쿨로바이러스학에 대한 사용자의 지침 9-10면에서도 확인할 수 있다.)

연속 희석한 지 4일후, 바이러스를 세포에 첨가하였다. 적합한 항온 배양후에, 청색으로 염색된 플라크를 에펜도르프 피펫의 끝을 사용하여 집어냈다. 재조합 바이러스를 함유하는 아가를 그레이스 배지 200  $\mu$ l를 함유하는 에펜도르프 튜브에 재현탁시켰다. 아가를 간단히 원심분리하여 제거하고, 재조합 바쿨로바이러스를 함유하는 상청액을 사용하여 35개 넌(nun) 점시에 파종된 Sf9 세포를 감염시켰다. 4일후, 이들 배양 점시의 상청액을 수집한 다음, 이들을 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 적절히 삼입된 CK $\alpha$ -2를 함유하는 클론은 제한 지도 작성 및 서열 분석을 포함하는 DNA 분석법으로 동정하였다. 이것은 V-CK $\alpha$ -2로 명명한다.

Sf9 세포를 10% 열 불활성화된 FBS로 보충한 그레이스 배지에서 증식시켰다. 그 세포들을 감염 다중도('MOI')가 약 2(약 1 내지 약 3)인 재조합 바쿨로바이러스 V-CK $\alpha$ -2로 감염시켰다. 6 시간후, 배지를 제거하고, 메티오닌과 시스테인을 뺀 SF900 II 배지(게이더스버그 소재의 라이프 테크놀로지스 인코오포레이티드에서 입수 가능함)로 대체하였다. 42 시간후, 5  $\mu$ Ci의  $^{35}$ S-메티오닌 및 5  $\mu$ Ci의  $^{35}$ S 시스테인(아머샴에서 입수 가능함)을 첨가하였다. 그 세포들을 16 시간 동안 더 항온 배양한 다음, 이들을 원심분리에 의해 수집하고, 용해시키고, 표지된 단백질은 SDS-PAGE 및 자동 방사선 사진법으로 가시화하였다.

### 실시예 3

#### COS 세포에서의 CK $\alpha$ -2의 발현

발현 플라스미드 CK $\alpha$ -2 HA는 도 1(서열번호 2)에 도시된 CK $\alpha$ -2를 암호화하는 cDNA를 발현 벡터 pcDNA1/Amp(인비트로젠 인코오포레이티드에서 입수할 수 있음)내로 클로닝하여 만들었다.

발현 벡터 pcDNA1/amp는 (1) 이.콜리 및 기타 원핵 세포에서의 증식에 효과적인 이.콜리의 복제 기점; (2) 플라스미드-함유 원핵 세포의 선별에 대한 암피실린 내성 유전자; (3) 진핵 세포 내에서의 증식을 위한 SV40의 복제 기점; (4) cDNA가 CMV 프로모터의 발현 제어하에 적합하게 배치되고 폴리링커내 제한 부위에 의해 SV40 인트론 및 폴리아데닐화 신호에 작동적으로 연결되도록 배열된 CMV 프로모터, 폴리링커, SV40 인트론 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

전체 CK $\alpha$ -2 전구체를 암호화하는 DNA 단편 및 그 3' 단부에 해독틀내에 융합된 HA 표지를 벡터의 폴리링커 영역으로 클로닝하여 재조합 단백질 발현이 CMV 프로모터에 의해 일어나도록 하였다. HA 표지는 문헌 [Wilson 등, Cell 37:767 (1984)]에 기재된 인플루엔자 혈구 응집소 단백질에서 유래한 에피토프에 상응한다. HA 표지의 표적 단백질에의 융합은 HA 에피토프를 인지하는 항체를 사용하여 재조합 단백질을 용이하게 검출하도록 한다.

플라스미드 구성 전략은 다음과 같다. 기탁 클론의 CK $\alpha$ -2 cDNA는 이.콜리 및 에스 퍼지페르다(S. furgiperda)에서 CK $\alpha$ -2의 발현을 위한 발현 벡터의 구성과 관련하여 상기한 바와 같이 적합한 제한 부위를 포함하는 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 발현된 CK $\alpha$ -2의 검출, 정제 및 특성 분석을 용이하게 하기 위해, 프라이머중의 하나는 상기한 바와 같이 혈구 응집소 표지('HA 표지')를 포함한다.

본 실시예에서 사용된 적합한 프라이머는 다음과 같다. 밀줄친 BamHI 부위를 포함하는 5' 프라이머는 다음과 같은 서열을 가졌다: 5' AAA GGA TCC ATG TCC CTG CTC CCA CGC CGC 3'(서열번호 9). 밀줄친 XbaI 부위를 포함하는 3' 프라이머는 다음의 서열을 가졌다: 5' CGC TCT AGA TCA AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA TTC TTC GTA GAA CCT GCG 3'(서열번호 10).

PCR 증폭된 DNA 단편 및 벡터 pcDNA1/amp를 제한효소 처리한 다음 결찰하였다. 결찰 혼합물을 이.콜리 균주 슈어(SURE, 캘리포니아 라 줄라 소재의 스트래티진 클로닝 시스템스에서 입수 가능함)내로 형질전환시키고, 형질전환된 배양물을 암피실린 배지 평판상에 도말한 다음, 항온 배양하여 암피실린 내성 콜로니가 성장하도록 하였다. 플라스미드 DNA는 내성 콜로니로부터 분리하고, CK $\alpha$ -2-암호화 단편의 존재에 대해 제한 효소 분석 및 겔 분류법으로 검사하였다.

재조합 CK $\alpha$ -2의 발현을 위해, 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 뉴욕주 콜드스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989)]에 기재된 것과 같은 DEAE-DEXTRAN을 사용하여, 상기한 바와 같이 COS 세포를 발현 벡터로 형질감염시켰다.

세포들을 그 벡터에 의해 CK $\alpha$ -2의 발현을 위한 조건하에 항온 배양하였다.

CK $\alpha$ -2 HA 융합 단백질의 발현은 예를 들면, 문헌[Harlow등, Antibodies: A Laboratory Manual, 제2판, 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1988)]에 기재된 방법을 사용하여, 방사성 표지법 및 면역 침전법으로 검출하였다. 이 목적으로, 형질감염 2일후, 세포들을 <sup>35</sup>S-시스테인을 함유하는 배지에서 8 시간 동안 항온 배양하여 표지하였다. 그 세포 및 배지를 수집하고, 상기 윌슨 등의 문헌에 기재된 바와 같이, 세포들을 세척하고 세정제-함유 RIPA 완충액(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% DCC, 50mM TRIS, pH7.5)으로 용해시켰다. HA-특이적 단일클론 항체를 사용하여 세포 용균 물 및 배양 배지로부터 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 SDS-PAGE 겔 및 자동 방사성 사진법으로 분석하였다. 예상된 크기의 발현 생성물이 세포 용균물에 나타났으나, 음성 대조군에는 나타나지 않았다.

#### 실시예 4

##### CK $\alpha$ -2 발현의 조직 분포

상기 샘플 등 의 문헌에 기재된 방법을 사용하여 인간 조직에서 CK $\alpha$ -2의 발현 레벨을 검사하기 위해 노던 블롯 분석을 수행하였다. 전체 세포 RNA 샘플을 RNAzol(RNAzol™) B 시스템(텍사스주 77033 휴스턴 소재의 사우스 루프 이스트 6023 바이오텍스 래보러토리즈 인코오포레이티드)를 사용하여 분리하였다.

총 RNA 약 10  $\mu$ g를 조직 샘플로부터 분리하였다. 강 변성 조건하에 1% 아가로스 겔을 통해 전기영동에 의해 RNA를 크기에 따라 분리하였다. RNA를 나일론 필터상에 겔로부터 블로팅하고, 검출 가능하게 표지된 폴리뉴클레오티드 프로브에 하이브리드화할 목적의 필터를 제조하였다.

CK $\alpha$ -2를 암호화하는 mRNA를 검출하기 위한 프로브로서, 기탁된 클론내 cDNA 삽입체의 암호 영역의 안티센스 가닥을 고틱이 합성으로 표지하였다. 그 cDNA를 스트래티진에서 입수 가능한 프라이머-잇 키트를 사용하여 프라이머 연장에 의해 표지하였다. 제조자에 의해 추천된 표준 반응 원리에 따라 50 ng의 cDNA를 사용하여 반응을 수행하였다. 표지된 폴리뉴클레오티드를, 코네티컷주 80303 볼더 소재의 아라파호 로드 5603에 소재하는 5-프라이머-3-프라이머 인코오포레이티드에서 입수한 셀렉트-G-50 칼럼을 사용하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 기타 표지된 반응 성분으로부터 정제해냈다.

표지된 프로브를 65°C에서 소량 부피의 7% SDS, 0.5M NaPO<sub>4</sub>, pH7.4에서 1,000,000 cpm/ml의 농도로 필터에 하이브리드화시켰다.

그후, 프로브 용액을 인출하고 필터를 0.5×SSC, 0.1% SDS로 실온에서 2회, 그리고 60°C에서 2회 세척하였다. 그 다음, 필터를 건조시키고, 강화 스크린으로 -70°C에서 필름에 노출시켰다.

자동 방사성 사진으로부터 CK $\alpha$ -2에 대한 mRNA는 소장예 풍부함을 알 수 있다.

#### 실시예 5

##### 인간 CK $\alpha$ -2의 유전자 치료적 발현

피부 생검에 의해 환자로부터 섬유아세포를 수득하였다. 생성 조직을 조직 배양 배지에 배치하고 작은 조각으로 분리하였다. 조직의 작은 덩어리를 조직 배양 플라스크의 수성 표면에 위치시켰는데, 대략 10개의 조각이 각각의 플라스크에 배치되었다. 그 플라스크를 거꾸로 뒤집고, 긴밀하게 밀봉하고 실온에서 하루 밤 동안 방치하였다. 실온에서 24 시간후에, 조직 덩어리가 플라스크의 바닥에 고정된 채로 남아 있는 플라스크를 뒤집고, 새로운 배지를 첨가하였다(예; 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유한 햄(Ham)의 F12 배지). 그 다음, 조직을 약 1주 동안 37°C에서 항온 배양하였다. 이 시점에서, 새로운 배지를 첨가하고, 이어서 수일마다 배지를 교환하였다. 추가의 2주 배양후에, 섬유아세포의 단일층이 나타난다. 단일층을 트립신으로 처리하고 보다 큰 플라스크로 계량해 넣었다.

유전자 치료용 벡터는 발현시킬 단편을 클로닝하기 위한 제한 효소로 처리하였다. 처리된 벡터는 송아지 장 포스파타제로 처리하여 자가 결찰을 방지하였다. 탈인산화된 선형 벡터를 아가로스 겔상에서 분획하고 정제하였다.

합성 CK $\alpha$ -2를 발현시킬 수 있는 인간 cDNA를 분리하였다. 단편의 말단을 필요에 따라 벡터내로 클로닝하기 위해 변형시켰다. 예를 들면, 5' 돌출부는 DNA 폴리머라제 처리하여 평활 말단(blunt ends)을 생성시킬 수 있다. 3' 돌출부는 S1 뉴클레아제를 사용하여 제거할 수 있다. T4 DNA 리가제를 사용하여 링커들을 평활 말단에 결찰시킬 수 있다.

몰로니 쥐 백혈병 바이러스의 선형 골격 및 CK $\alpha$ -2 단편을 동일량으로 함께 혼합하고 T4 DNA 리가제를 사용하여 연결하였다. 결찰 혼합물을 사용하여 이.콜리를 형질전환시키고, 박테리아를 카나마이신을 함유하는 아가상에 도말하였다. 카나마이신 표현형 및 제한 효소 분석은 그 벡터가 적절하게 삽입된 유전자를 가진다는 것을 확인해 준다.

패키지 세포는 조직 배양에서 10% 송아지 혈청(CS), 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유한 돌베코의 변형 이글 배지(DMEM)에서 융합성의 밀도로 증식시켰다. CK $\alpha$ -2를 함유하는 벡터를 표준 기술에 의해 패키지 세포로 도입시켰다. CK $\alpha$ -2 유전자를 함유하는 감염성 바이러스 입자를 패키지 세포로부터 수집하는데, 이제 이들 세포는 생산자 세포라 칭한다.

새로운 배지를 생산자 세포로 첨가하고, 적합한 항온 배양 기간후에, 융합성 생산자 세포의 평판으로부터 배지를 수집하였다. 감염성 바이러스 입자를 함유하는 배지를 밀리포어 필터를 통해 여과시켜 부착된 생산자 세포를 제거하였다. 여과된 배지를 사용하여 섬유아세포를 감염시켰다. 섬유아세포의 부분-융합성 평판으로부터 배지를 제거하고, 여과된 배지와 신속히 교체하였다. 폴리브렌(알드리치)을 배지에 포함시켜 형질 도입을 촉진시킬 수 있다. 적합한 항온 배양후에, 배지를 제거하고 새로운 배지로 대체하였다. 바이러스의 역가가 높으면, 실제로 모든 섬유아세포가 감염되며, 선별이 필요 없다. 그 역가가 낮으면, neo 또는 his와 같은 선별 마커를 가진 레트로바이러스 벡터를 사용하고 증폭을 위해 형질 도입된 세포를

선별할 필요가 있다. 주입된 섬유아세포는 CK $\alpha$ -2 생성물을 생산하며, 단백질의 생물학적 작용은 숙주에게 전달된다.

상기 상세한 설명 및 실시예에 구체적으로 기재된 것과 달리 본 발명을 실시할 수 있음은 분명하다. 본 발명의 다수의 변형예 및 개조예가 상기 개시 사항을 통해 가능한 것이며, 그러므로, 그들 역시 본 발명의 특허 청구 범위에 속한다.

#### 서열표

##### (1) 일반 정보:

(i) 출원인: 휴먼 제논 사이언시즈, 인코오포레이티드

미국 매릴랜드주 20850 록빌 키 웨스트 애비뉴 9410

출원인/발명자: 니 지안/겐츠 라이너 엘/수 제프리 와이/리 하오둥

(ii) 발명의 명칭: 케모카인 알파 2

(iii) 서열수: 10

(iv) 서신 주소:

(A) 수신인: 스텐, 케슬러, 골드스타인 앤드 팩스, 피.엘.엘.씨.

(B) 거리명: 슈트 600 뉴욕 애비뉴 1100

(C) 도시명: 워싱턴

(D) 주명: DC

(E) 국가명: 미국

(F) 우편번호: 20005-2934

(v) 컴퓨터 판독 형태:

(A) 매체 유형: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC-호환 가능

(C) 운영 체제: PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어: 페이턴트인 릴리스 #1.0, 버전 #1.30

(vi) 현재 출원 데이터:

(A) 출원번호: 미지정

(B) 출원일: 동일자

(C) 분류:

(vii) 선출원 데이터:

(A) 출원번호: US 60/013,653

(B) 출원일: 1996. 03. 19

(viii) 대리인/대리회사 정보:

(A) 성명: 스테피 에릭 케이

(B) 등록번호: 36,688

(C) 참조/문서 번호: 1488.085PC01

(ix) 장거리 통신 정보:

(A) 전화: 202-371-2600

(B) 팩스: 202-371-2540

(2) 서열번호 1에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 461개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쇄의 수: 2본쇄

(D) 형태: 양 형태

(ii) 분자 형태: cDNA

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 43..375

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 79..375

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: sig\_펩티드

(B) 위치: 43..126

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: mat\_펩티드

(B) 위치: 127..375

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: sig\_펩티드

(B) 위치: 79..126

(xi) 서열: 서열번호 1:

**서열 1A**

```

ACGAGCTCCG GGCCGCGCT CCGACGGGCC AGCGCCCTCC CC ATG TCC CTG CTC      54
                                     Met Ser Leu Leu
                                     -28      -25

CCA CAC CGC GCC CCT CCG GTC AGC ATG AGG CTC CTG GCG GCC GCG CTG      102
Pro Arg Arg Ala Pro Pro Val Ser Met Arg Leu Leu Ala Ala Ala Leu
                -20                -15                -10

```

**서열 1B**

```

CTC CTC CTG CTG CTG GCG CTG TAC ACC GCG CGT GTG GAC GGG TCC AAA      150
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Tyr Thr Ala Arg Val Asp Gly Ser Lys
                -5                1                5

TGC AAG TGC TCC CGG AAG GGA CCC AAG ATC CGC TAC AGC GAC GTG AAG      198
Cys Lys Cys Ser Arg Lys Gly Pro Lys Ile Arg Tyr Ser Asp Val Lys
    10                15                20

AAG CTC GAA ATG AAG CCA AAG TAC CCG CAC TGC GAG GAG AAG ATG GTT      246
Lys Leu Glu Met Lys Pro Lys Tyr Pro His Cys Glu Glu Lys Met Val
    25                30                35                40

ATC ATC ACC ACC AAG AGC GTG TCC AGG TAC CGA GGT CAG GAG CAC TGC      294
Ile Ile Thr Thr Lys Ser Val Ser Arg Tyr Arg Gly Gln Glu His Cys
                45                50                55

CTC CAC CCC AAG CTG CAG AGC ACC AAG CGC TTC ATC AAG TGG TAC AAC      342
Leu His Pro Lys Leu Gln Ser Thr Lys Arg Phe Ile Lys Trp Tyr Asn
                60                65                70

GCC TGG AAC GAG AAG CGC AGG TTC TAC GAA GAA TAGGGTGAAA AACCTCAGAA      395
Ala Trp Asn Glu Lys Arg Arg Phe Tyr Glu Glu
                75                80

GGGAAACTC CAAACCAGTT GGGAGACTTG TGGCAAAGGA ACTTTGCAGA TTAAAAA      455
AAAAA      461

```

(2) 서열번호 2에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 111개 아미노산

(B) 서열형: 아미노산

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: 단백질

(xi) 서열: 서열번호 2:

## 서열 2

```

Met Ser Leu Leu Pro Arg Arg Ala Pro Pro Val Ser Met Arg Leu Leu
-25          -25          -20          -15

Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Tyr Thr Ala Arg Val
      -10          -5          1

Asp Gly Ser Lys Cys Lys Cys Ser Arg Lys Gly Pro Lys Ile Arg Tyr
  5          10          15          20

Ser Asp Val Lys Lys Leu Glu Met Lys Pro Lys Tyr Pro His Cys Glu
          25          30          35

Glu Lys Met Val Ile Ile Thr Thr Lys Ser Val Ser Arg Tyr Arg Gly
          40          45          50

Gln Glu His Cys Leu His Pro Lys Leu Gln Ser Thr Lys Arg Phe Ile
      55          60          65

Lys Trp Tyr Asn Ala Trp Asn Glu Lys Arg Arg Phe Tyr Glu Glu
      70          75          80

```

(2) 서열번호 3에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 99개 아미노산

(B) 서열형: 아미노산

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: 단백질

(xi) 서열: 서열번호 3:

## 서열 3

Met Arg Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Tyr  
 -16 -15 -10 -5

Thr Ala Arg Val Asp Gly Ser Lys Cys Lys Cys Ser Arg Lys Gly Pro  
 1 5 10 15

Lys Ile Arg Tyr Ser Asp Val Lys Lys Leu Glu Met Lys Pro Lys Tyr  
 20 25 30

Pro His Cys Glu Glu Lys Met Val Ile Ile Thr Thr Lys Ser Val Ser  
 35 40 45

Arg Tyr Arg Gly Gln Glu His Cys Leu His Pro Lys Leu Gln Ser Thr  
 50 55 60

Lys Arg Phe Ile Lys Trp Tyr Asn Ala Trp Asn Glu Lys Arg Arg Phe  
 65 70 75 80

Tyr Glu Glu

(2) 서열번호 4에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 98개 아미노산

(B) 서열형: 아미노산

(C) 쇠의 수: 무관

(D) 형태: 무관

(ii) 분자 형태: 펩티드

(xi) 서열: 서열번호 4:

## 서열 4

Ala Pro Pro Thr Arg Arg Leu Leu Asn Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Met Ala Thr Ser His Gln Pro Ser Gly Thr Val Val Ala Arg  
 20 25 30

Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Lys Thr Leu Pro Arg Val Asp Phe Glu  
 35 40 45

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

Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Gln Glu Val Cys Leu Asn  
 65 70 75 80

Pro Gln Ala Pro Arg Leu Gln Lys Ile Ile Gln Lys Leu Leu Lys Ser  
 85 90 95

Pro Ser

(2) 서열번호 5에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 26개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쇄의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 5:

### 서열 5

CCC3CATGCC CGCGCGTGTG GACGGG

26

(2) 서열번호 6에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 27개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쇄의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 6:

### 서열 6

CCC3GATCCC TATTCTTCGT AGAACCT

27

(2) 서열번호 7에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 29개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쇄의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 7:

### 서열 7

GCC3GATCCG CCATCATGTC CCTGCTCCC

29

(2) 서열번호 8에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 28개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쇄의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 8:

**서열 8**

CGCGTCTAGA CTATTCTTCG TAGAACCT

28

(2) 서열번호 9에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 30개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 9:

**서열 9**

AAAGGATCCA TGTCCCTGCT CCCACGCCGC

30

(2) 서열번호 10에 관한 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 57개 염기쌍

(B) 서열형: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 형태: 직쇄상

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열: 서열번호 10:

**서열 10**

CGCTCTAGAT CAAGCGTAGT CTGGGACGTC GTATGGGTAT TCTTCGTAGA ACCTGCG

57

**(57) 청구의 범위****청구항 1**

하기 서열 (a) 내지 (g)로 구성된 군에서 선택되는 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자:

(a) 서열번호 2에서 약 -28 내지 약 83 위치의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 서열번호 3에서 약 -16 내지 약 83 위치의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(c) 서열번호 2에서 약 1 내지 약 83 위치의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(d) ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(e) ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 성숙 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(f) (a), (b), (c), (d) 또는 (e)의 뉴클레오티드 서열중 하나에 상보적인 뉴클레오티드 서열; 및

(g) (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 뉴클레오티드 서열중 하나의 30 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가진 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가진 성숙 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 ATCC 기탁번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론의 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 성숙 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 8**

염중 하이브리드화 조건하에서 제1항의 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 또는 (g)의 뉴클레오티드 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산 분자로서, 이 때, 하이브리드화하는 상기 폴리뉴클레오티드는 염중 하이브리드화 조건하에 A 잔기만으로 또는 T 잔기만으로 이루어진 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화 되지 않는 것인 분리된 핵산 분자.

**청구항 9**

제1항의 분리된 핵산 분자를 벡터내로 삽입하는 단계를 포함하는 재조합 벡터의 제조 방법.

**청구항 10**

제9항의 방법에 의해 제조된 재조합 벡터.

**청구항 11**

제10항의 재조합 벡터를 숙주 세포내로 도입시키는 단계를 포함하는 재조합 숙주 세포의 제조 방법.

**청구항 12**

제11항의 방법에 의해 제조된 재조합 숙주 세포.

**청구항 13**

CK $\alpha$ -2 폴리펩티드가 발현되도록 하는 조건하에서 제12항의 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계 및 그 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, CK $\alpha$ -2 폴리펩티드의 제조를 위한 재조합 방법.

**청구항 14**

하기 서열 (a) 내지 (e)로 구성되는 군에서 선택된 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 가진 분리된 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드:

(a) 서열번호 2에서 약 -28 내지 약 83 위치의 아미노산;

(b) 서열번호 3에서 약 -16 내지 약 83 위치의 아미노산;

(c) 서열번호 2에서 약 1 내지 약 83 위치의 아미노산;

(d) ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드의 아미노산 서열; 및

(e) ATCC 기탁 번호 제97400호에 포함된 cDNA 클론이 암호화하는 아미노산 서열을 가진 성숙 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드의 아미노산 서열.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 재조합 숙주 세포에서 제조되거나 또는 그 세포에 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 분리된 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 상기 재조합 숙주 세포가 포유동물인 것을 특징으로 하는 분리된 CK $\alpha$ -2 폴리펩티드.

#### 청구항 17

제14항의 폴리펩티드에 대한 항체.

#### 청구항 18

제14항의 폴리펩티드의 활성을 가진 작용물질(agonist) 또는 길항물질(antagonist).

#### 청구항 19

제14항의 폴리펩티드를 치료학적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, CK $\alpha$ -2를 필요로 하는 환자의 치료 방법.

#### 청구항 20

제14항의 폴리펩티드의 활성을 가진 길항물질을 치료학적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, CK $\alpha$ -2 폴리펩티드를 억제할 필요가 있는 환자의 치료 방법.

#### 청구항 21

제14항의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열에서의 돌연변이를 측정하는 단계를 포함하는, 상기 펩티드의 발현과 관련된 질병 또는 그 질병에 대한 민감성을 진단하는 방법.

#### 청구항 22

숙주에서 유래한 샘플내에서 제14항의 폴리펩티드의 존재를 분석하는 단계를 포함하는 진단 방법.

#### 청구항 23

제14항의 폴리펩티드에 대한 수용체에 결합하고 그 수용체를 활성화하거나 또는 억제하는 화합물의 동정 방법으로서, (a) 상기 폴리펩티드에 대한 수용체를 그 표면에 발현시키는 세포를 수용체에의 결합을 허용하는 조건하에서 검색하고자 하는 화합물과 접촉시키며, 이 때, 수용체는 자신에 대한 하나의 화합물의 결합에 반응하여 검출 가능한 신호를 제공할 수 있는 제2 성분과 관련되어 있는 것인 접촉 단계; 및 (b) 화합물과 수용체의 상호작용으로부터 발생된 신호의 존재 또는 부재를 검출함으로써, 그 화합물이 수용체에 결합하고 그것을 활성화하거나 또는 억제하는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 화합물의 동정 방법.

**도면**





