



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월10일  
(11) 등록번호 10-0887164  
(24) 등록일자 2009년02월27일

(51) Int. Cl.  
A61K 48/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2001-7012300  
(22) 출원일자 2001년09월26일  
심사청구일자 2005년03월24일  
번역문제출일자 2001년09월26일  
(65) 공개번호 10-2002-0029651  
(43) 공개일자 2002년04월19일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/007870  
국제출원일자 2000년03월24일  
(87) 국제공개번호 WO 2000/57837  
국제공개일자 2000년10월05일  
(30) 우선권주장  
09/277,401 1999년03월26일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
국제특허공보 W09824888호\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
아벤티스 파마슈티칼스 인크.  
미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 코퍼레이트 드라이브 55  
더 트러스티즈 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아  
미국 펜실베이니아주 19104-3246 필라델피아 사우스 36번 스트리트 133 슈트 300 유니버시티 오브 펜실베이니아 오피스 오브 리써치 어드미니스트레이션  
(72) 발명자  
제이마이클  
미국펜실베이니아주19038글렌사이드노오쓰린우드애비뉴142  
린치케빈제이  
미국펜실베이니아주19446랜즈데일웨스트햄프셔드라이브17904  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이병호, 장훈

전체 청구항 수 : 총 3 항

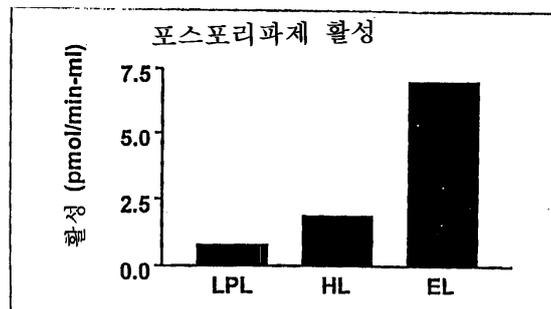
심사관 : 박정민

(54) LIPG 폴리펩타이드의 활성을 증가시키고 초저밀도 지단백질(VLDL) 콜레스테롤 및 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 조성물 및 이를 위해 유용한 화합물을 동정하는 방법

(57) 요약

본 발명은 환자에서 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI의 수준을 증가시키는 방법 및 조성물 및 환자 중의 초저밀도 지단백질(VLDL) 콜레스테롤 및 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 구성원인 리파제 효소를 암호화하는 유전자 LIPG의 발현에 영향을 미치거나 이 효소의 효소적 활성에 영향을 미치는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도26b



(72) 발명자

**아민딜립브이**

미국펜실베이니아주19446랜즈데일알렌베치레인2204

**도안킴-안티**

미국펜실베이니아주19475스프링시티케트린레인76

**마캐디어돈**

미국뉴저지주08043부리스우드스톤드라이브58

**마우게에이스시릴**

미국펜실베이니아주19102필라델피아사우쓰15번스트리트348

**레이더다니엘제이**

미국펜실베이니아주19146

필라델피아케이터스트리트2103

**크레웍존에이**

미국펜실베이니아주19406결프밀스아텐로오드360

**사우쓰빅토리아제이**

미국펜실베이니아주19426칼리지빌레전츠로오드122

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 가나, 감비아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 크로아티아, 그라나다

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

**특허청구의 범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

(A) (1)HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI, (2)LIPG 폴리펩타이드 및 (3)시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을, (4)HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI 및 (5)LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준과 비교하는 단계; 및

(B) 제1 시료가 다른 시료보다 더 높은 수준으로 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI를 갖고 있는지 여부를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI간의 효소적 반응을 억제하는데 효과적인지 여부를 동정하는 단계를 포함하는,

시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI 간의 효소적 반응을 억제할 수 있는지를 결정하는 방법.

**청구항 64**

(A) (1)초저밀도 지단백질(VLDL) 콜레스테롤, (2)LIPG 폴리펩타이드 및 (3)시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 VLDL 콜레스테롤의 수준을, (4)VLDL 콜레스테롤 및 (5)LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 VLDL 콜레스테롤의 수준과 비교하는 단계; 및

(B) 제1 시료가 다른 시료보다 더 낮은 수준으로 VLDL 콜레스테롤을 갖고 있는지 여부를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 VLDL 콜레스테롤간의 효소적 반응을 증가시키는데 효과적인지 여부를 동정하는 단계를 포함하는,

시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 VLDL 콜레스테롤간의 효소적 반응을 증가시킬 수 있는지를 결정하는 방법.

**청구항 65**

(A) (1)저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤, (2)LIPG 폴리펩타이드 및 (3)시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 LDL 콜레스테롤의 수준을, (4)LDL 콜레스테롤 및 (5)LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 LDL 콜레스테롤의 수준과 비교하는 단계; 및

(B) 제1 시료가 다른 시료보다 더 낮은 수준으로 LDL 콜레스테롤을 갖고 있는지 여부를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 LDL 콜레스테롤간의 효소적 반응을 증가시키는데 효과적인지 여부를 동정하는 단계를 포함하는,

시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 LDL 콜레스테롤간의 효소적 반응을 증가시킬 수 있는지를 결정하는 방법.

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**명세서**

<1> 본원은 U.S.C. § 119(e)하에서 1996년 12월 6일자로 출원된 미국 가출원 제60/032,254호 및 60/032,783호 둘 모두의 우선권을 주장하는, 1997년 12월 5일자로 출원된 미국 특허원 제08/985,492호의 부분계속출원인, 1999년 3월 26일자로 출원된 미국 특허원 제09/277,401호의 우선권을 주장하는 부분계속출원이며, 이들의 내용은 본원에서 이의 전체를 참조로 인용한다.

**기술분야**

<2> 본 발명은 환자에게 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI의 수준을 증가시키는 방법 및 조성물 및 환자에게 초저밀도 지단백질(VLDL) 콜레스테롤 및 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 이의 범위내에서 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 저하시키는 리파제 효소를 암호화하는 유전자 LIPG의 발현을 감소시키거나 그 효소의 활성을 억제하는 방법 및 조성물을 포함한다. 추가로 본 발명은 이의 범위내에 리파제 효소의 발현을 증가시키거나 그의 활성을 강화시켜 VLDL 및 LDL 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법 및 조성물을 포함한다.

<3> **지질**

- <4> 지질은 수불용성 유기 생체분자로서 에너지의 저장, 수송 및 대사 및 막 구조 및 유동성을 포함한 다양한 생물학적 기능을 위한 필수 성분이다. 지질은 사람 및 기타 동물에서 두 가지 기원으로부터 유도된다: 일부 지질은 식이 지방 및 오일로서 섭취되고 나머지 지질은 사람 또는 동물에 의해 생합성된다. 포유동물에서, 체중의 10% 이상이 지질이고 이 가운데 대부분은 트리아실글리세롤의 형태로 존재한다.
- <5> 트리글리세라이드 및 트리아실글리세라이드로도 알려진 트리아실글리세롤은 세 개의 지방산이 글리세롤에 에스테르화되어 이루어져 있다. 식이 트리아실글리세롤은 지방 조직에 에너지원으로 저장되거나 소화관에서 트리아실글리세롤 리파제(이 가운데 가장 중요한 것은 췌장 리파제이다)에 의해 가수분해된다. 트리아실글리세롤은 조직사이에서 지단백질의 형태로 수송된다.
- <6> 지단백질은 혈장에서 발견되는 마이셀형 응집체이며 이는 상이한 유형의 지질과 단백질(아포단백질이라 한다)을 다양한 비율로 함유한다. 5가지 주 부류의 혈장 지단백질이 있는데 이들의 주 기능은 지질 수송이다. 이들 부류는 밀도가 증가하는 순서로 킬로미크론, 초저밀도 지단백질(VLDL), 중밀도 지단백질(IDL), 저밀도 지단백질(LDL) 및 고밀도 지단백질(HDL)이 있다. 비록 많은 유형의 지질이 각각의 지단백질 부류와 결합되어 발견될 지라도 각 부류는 주로 한가지 유형의 지질을 수송한다. 상기된 트리아실글리세롤은 킬로미크론, VLDL 및 IDL로 수송되는 반면 인지질 및 콜레스테롤 에스테르는 각각 HDL 및 LDL로 수송된다.
- <7> 인지질은 포스페이트에 극성 그룹이 결합되어 있는 글리세롤 포스페이트의 이-지방산 에스테르이다. 인지질은 세포막의 중요한 구조 성분이다. 인지질은 포스포리파제라고 하는 효소에 의해 가수분해된다. 대표적인 인지질인 포스파티딜콜린은 대부분의 진핵 세포막의 주 성분이다.
- <8> 콜레스테롤은 스테로이드 호르몬과 담즙산의 대사 전구체이고 또한 세포막의 필수 성분이다. 사람 및 기타 동물에서 콜레스테롤은 음식으로 섭취되고 또한 간 및 기타 조직에 의해 합성된다. 식이 콜레스테롤은 혈액에서 커다란 지단백질 분자에 의해 소장에서 간으로 수송된다. 간은 초저밀도 지단백질(VLDL)을 분비하며 이는 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 및 기타 여러 화합물을 혈류로 수송한다. VLDL은 지방 조직에서 부분적으로 저밀도 지단백질(LDL)로 전환된다. LDL은 유리 콜레스테롤과 에스테르화 콜레스테롤 모두를 체조직으로 수송한다. 고밀도 지단백질(HDL)은 콜레스테롤을 간으로 수송하고 콜레스테롤은 분해되어 분비된다.
- <9> 막은 모든 생존 세포를 에워싸고 있으며 세포내 구획과 세포외 구획사이의 장벽으로서 작용한다. 막은 또한 진핵세포의 핵을 감싸고 있고, 소포체를 구성하며, 축삭돌기를 에워싸고 있는 수초에서와 같이 특별한 기능을 수행한다. 전형적인 막은 약 40%의 지질과 60%의 단백질을 함유하지만 상당히 변화된다. 주요 지질 성분은 인지질(특히, 포스파티딜콜린과 포스파티딜에탄올아민)과 콜레스테롤이다. 유동성과 같은 막의 물리화학적 특성은 인지질의 지방산 프로필 또는 콜레스테롤 함량의 변화에 의해 달라질 수 있다. 막 지질의 조성구성을 조절하는 것은 또한 수용체 활성, 세포내이입 및 콜레스테롤 유출과 같은 막-의존 세포 기능의 조절로 연결된다.
- <10> **효소**
- <11> 트리아실글리세롤 리파제는 체내에서 지질의 대사에서 수 가지의 중추적인 역할을 하는 효소의 패밀리이다. 사람 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 세 가지 구성원이 공지되어 있다: 췌장 리파제, 지단백질 리파제 및 간 리파제[Goldberg, I.J., Le, N.-A., Ginsberg, H.N., Krauss, R.M., 및 Lindgren, F.T. (1988) J. Clin. Invest. 81, 561-568; Goldberg, I.J., Le, N., Paterniti J.R., Ginsberg, H.N., Lindgren, F.T., and Brown, W.V. (1982) J. Clin. Invest. 70, 1184-1192; Hide, W.A., Chan, L., and Li, W.-H. (1992) J. Lipid. Res. 33, 167-178]. 췌장 리파제는 주로 식이 지질의 가수분해에 관여한다. 췌장 리파제의 변이체가 공개되었으나 그들의 생리학적 역할은 밝혀지지 않았다[Giller, T., Buchwald, P., Blum-Kaelin, D., 및 Hunziker, W. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16509-16516]. 지단백질 리파제는 체내에서 트리글리세라이드의 분배 및 유용성에 관여하는 주 효소이다. 지단백질 리파제는 킬로미크론 및 VLDL 모두에서 트리글리세라이드를 가수분해한다. 간 리파제는 IDL 및 HDL에서 트리글리세라이드를 가수분해하고 지단백질 재구성을 담당한다. 간 리파제는 또한 포스포리파제로 작용하고 HDL에서 인지질을 가수분해한다.
- <12> 포스포리파제는 지단백질의 인지질 성분과 막의 인지질을 이화 및 재구성하는데 중요한 역할을 한다. 포스포리파제는 또한 아라키돈산을 방출하고 뒤이어서 프로스타글란딘, 류코트리엔과, 다양한 염증 과정에 관여하는 다른 지질을 형성하는 역할을 담당한다.
- <13> 상기 리파제는 길이가 약 450개 아미노산이고 분비를 촉진하는 리더 시그널 펩타이드를 갖는다. 리파제는 두 개의 핵심적인 도메인으로 구성된다[Winkler, K., D'Arcy, A. and Hunziker, W. (1990) Nature 343, 771-774]. 아미노 말단 도메인은 촉매 부위를 함유하고 카복시 도메인은 기질 결합, 보조인자 결합 및 세포 수용체와의 상

중작용을 담당하는 것으로 생각된다[Wong, H., Davis, R.C., Nikazy, J., Seebart, K.E. and Schotz, M.C. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11290-11294; van Tilbeurgh, H., Roussel, A. Lalouel, J.-M. and Cambillau, C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 4626-4633; Wong, H., Davis, R.C., Thuren, T., Goers, J.W., Nikazy, J., Waite, M. and Schotz, M.C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 10319-10323; Chappell, D.A., Inoue, I., Fry, G.L., Pladet, M.W., Bowen, S.L., Iverius, P.-H., Lalouel, J.-M. and Strickland, D.K. (1994) J. Biol. Chem. 269, 18001-18006]. 이러한 패밀리의 구성원간에 아미노산 상동성의 전체 수준은 22 내지 65% 이고 고 상동성의 국소 영역은 효소 기능과 결부된 구조적 상동성에 상응한다.

<14> 천연 지단백질 리파제는 당화된다. 당화는 LPL 효소 활성을 위해 필요하다[Semenkovich, C.F., Luo, C.-C., Nakanishi, M.K., Chen, S.-H., Smith, L.C. and Chan L. (1990) J. Biol. Chem. 265, 5429-5433]. 간 및 지단백질 리파제에는 N-연결된 당화를 위한 부위가 2개 있고 췌장 리파제에는 1개가 있다. 추가로, 4개 세트의 시스테인은 효소 활성을 위한 구조적 보존을 유지하는데 필수적인 디설파이드 브릿지를 형성한다[Lo, J.-Y., Smith, L.C. and Chan, L. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 206, 266-271; Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Hugen-Jensen B., Norskov, L., Thim, L. and Menge, U. (1990) Nature 343, 767-770].

<15> 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 구성원은 많은 보존된 구조적 특징을 공유한다. 이와 같은 한 가지 특징은 중앙의 세린 잔기가 "촉매 트리아드"를 구성하는 세 개의 잔기 가운데 하나로 되어 있는 "GXSG" 모티프이다 [Winkler, K., D'Arcy, A. and Hunziker, W. (1990) Nature 343, 771-774; Faustiniella, F., Smith, L.C. and Chan, L. (1992) Biochemistry 31, 7219-7223]. 보존된 아스파테이트 및 히스티딘 잔기는 촉매 트리아드의 나머지를 구성한다. 19 내지 23개 아미노산의 짧은 범위("리드 영역")은 양쪽성 나선 구조를 형성하고 효소의 촉매 포켓을 커버한다[Winkler, K., D'Arcy, A. and Hunziker, W. (1990) Nature 343, 771-774]. 이 영역은 상기 리파제 패밀리의 구성원사이에서 상당히 다양하다. 상기 범위가 효소에 기질 특이성을 제공하는 것으로 최근에 결정되었다[Dugi, K.A., Dichek H.L. and Santamarina-Fojo, S. (1995) J. Biol. Chem. 270 25396-25401]. 간과 지단백질 리파제사이의 비교로 효소의 트리아실글리세롤 리파제와 포스포리파제 활성에서의 차이가 부분적으로 상기 리드 영역에 의해 매개되는 것으로 입증되었다[Dugi, K.A., Dichek H.L. and Santamarina-Fojo, S. (1995) J. Biol. Chem. 270, 25396-25401].

<16> 트리아실글리세롤 리파제는 헤파린 결합 활성을 다양한 정도로 나타낸다. 지단백질 리파제는 헤파린에 대해 최고의 친화성을 갖는다. 이 결합 활성은 아미노 말단 도메인내에 길게 뻗어있는 양전하 잔기로부터 유도되는 것으로 밝혀졌다[Ma, Y., Henderson, H.E., Liu, M.-S., Zhang, H., Forsythe, I.J., Clarke-Lewis, I., Hayden, M.R. and Brunzell, J.D. J. Lipid Res. 35, 2049-2059]. 지단백질 리파제의 내피 표면으로의 국소화 [Cheng, C.F., Oosta, G.M., Bensadoun, A. and Rosenberg, R.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12893-12896]는 표면 프로테오글리칸과의 결합을 통해 주로 매개된다[Shimada K., Gill, P.J., Silbert, J.E., Douglas, W.H.J. and Fanburg, B.L. (1981) J. Clin. Invest. 68, 995-1002; Saxena, U., Klein, M.G. and Goldberg, I.J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 17516-17521; Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. and Vlodaysky, I. (1992) J. Clin Invest. 90, 2013-2021]. 이 효소가 LDL과 세포 표면사이의 브릿지로 작용함으로써 LDL 흡수를 촉진케 하는 것은 바로 그러한 결합 활성이다[Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., vanBerkel T.J., Frants R.R. and Havekes, L.M. (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 185, 582-587; Rutledge, J.C. and Goldberg, I.J., (1994) J. Lipid Res. 35. 1152-1160; Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, T., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. (1980) Int. J. Cancer 26, 171-176].

<17> 지단백질 리파제 및 췌장 리파제는 모두 보조활성화제 단백질(지단백질 리파제의 경우 아포지단백질 CII, 췌장 리파제의 경우 콜리파제)과 결합하여 작용하는 것으로 알려져 있다.

<18> 사람 췌장 리파제, 간 리파제 및 지단백질 리파제를 암호화한 유전자 서열은 공개되어 있다(각각, 진뱅크 승인 번호 M93285, J03540 및 M15856). 사람 간 리파제 및 췌장 리파제의 전령 RNA는 각 길이가 약 1.7 및 1.8 키로염기이다. 사람 지단백질 리파제 유전자로부터는 3.6 및 3.2 키로염기의 두 개 mRNA 전사체가 생성된다. 이들 두 전사체는 또 다른 폴리아데닐화 시그널을 이용하며 해독 효율이 다르다[Ranganathan, G., Ong, J.M., Yukht, A., Saghizadeh, M., Sinsolo, R.B., Pauer, A. and Kern, P.A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 7149-7155].

<19> 생리학적 과정

<20> 지질의 대사는 지질, 아포단백질, 지단백질 및 효소의 상호작용을 포함한다.

- <21> 간 리파제 및 지단백질 리파제는 지단백질과 인지질의 결합, 흡수, 이화 및 재구성을 매개하는 다기능성 단백질이다. 지단백질 리파제 및 간 리파제는 각각 말초 조직내 내피 세포의 강내 표면 및 간에 결합하여 작용한다. 양 효소는 체외 분비 또는 재순환을 위해 말초 조직으로부터 간으로 콜레스테롤을 이동시키는 역 콜레스테롤 수송에 관여한다. 간 리파제와 지단백질 리파제 모두에서의 유전자 결합은 지단백질 대사의 가족성 질환의 원인인 것으로 알려져 있다. 지단백질의 대사 결합은 고콜레스테롤혈증, 고지혈증 및 아테롬성동맥경화증을 포함하여 중증의 대사 질환을 야기한다.
- <22> 보고된 진전
- <23> 아테롬성동맥경화증은 조직학적 관점에서 혈관벽, 특히 거대 동맥(대동맥, 관상동맥, 경동맥)에서 지질과 다른 혈액 유도체의 침적(지질 또는 섬유지질 플라크)으로 정의되는 복합 다유전자성 질환이다. 죽상동맥경화증 과정의 진행 정도에 따라 다소 석회화된 플라크는 병소와 결합할 수 있고 필수적으로 콜레스테롤 에스테르로 이루어진 지방 침적물의 혈관내 축적과 결부되어 있다. 이들 플라크는 혈관벽의 비후, 평활근의 비대, 포말 세포의 출현(보충된 대식세포에 의한 콜레스테롤의 비조절된 흡수로부터 기인하는 지질로 가득찬 세포) 및 섬유 조직의 축적을 동반한다. 죽종성 플라크가 벽으로부터 뚜렷이 돌출하고 벽에 협착 특성을 부여하여 대부분의 환자에게서 죽종에 의한 혈관 폐색, 혈전증 또는 색전증을 유발한다. 이들 병소는 경색, 급사, 심부전 및 발작과 같은 중증의 심혈관 질환을 유발할 수 있다.
- <24> 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤 수준 및 죽상동맥경화증 질환
- <25> 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤 수준은 죽상동맥경화성 심혈관 질환의 위험과 반비례한다[Gordon et al., N. Engl. J. Med., 321, 1311-1316 (1989)]. HDL 콜레스테롤 수준에 있어서 50% 이상의 변화는 유전학적으로 결정된다[Breslow, J.L., The Metabolic Basis of Inherited Disease, 2031-2052, McGraw-Hill, New York (1995); Heller et al., N. Engl. J. Med., 328, 1150-1156 (1993)]. 그러나, HDL 수준의 변화를 유도하는 유전자는 완전히 밝혀지지 않았다. 트리아실글리세롤 (TG) 리파제 패밀리의 두 구성원인 지단백질 리파제(LPL)와 간 리파제(HL) 모두는 HDL 대사에 영향을 미치며[상기 Breslow; Murthy et al., Pharmacol. Ther., 70, 101-135 (1996) ; Goldberg, J.I., J. Lipid Res., 37, 693-707 (1996); Bensadoun et al., Curr. Opin. Lipidol., 7, 77-81 (1996)], HL(LIPC) 유전자 좌위는 사람에게서 HDL 콜레스테롤 수준의 변화와 연관이 있는 것으로 알려져 왔다[Cohen et al., J. Clin. Invest., 94, 2377-2384 (1994); Guerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4532-4537 (1997)]. HDL 콜레스테롤의 정상 범위는 약 35 내지 65 mg/dl이고 HDL 수준은 전체 콜레스테롤의 25% 이상을 차지해야 한다.
- <26> 초저밀도 지단백질(VLDL) 및 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤 수준 및 죽상동맥경화 질환
- <27> 순환하는 LDL 및 VLDL 콜레스테롤의 고 수준은 죽상동맥경화증의 증가된 위험과 연관이 있다.
- <28> VLDL은 LDL의 전구체이다. 혈장 VLDL과 LDL 콜레스테롤 수준을 저하시키는 치료제는 이들 지질 변수가 관상동맥 심장 질환과 연관이 있는 것으로 매우 잘 알려져 있기 때문에 매우 바람직한 것이다.
- <29> 유행병 연구로부터 증가된 LDL 콜레스테롤과 관상동맥 심장 질환(CHD) 및 다른 죽상 혈관 질환사이의 강력한 관계가 입증되어 왔다[Kannel, W.B., Am. J. Cardiol., 76, 69C-77C (1995)]. 스타틴으로 실시된 3회의 대규모 일차 예방 시도에서 LDL 콜레스테롤 수준의 감소는 CHD 발생 및 전체 치사율의 유의적인 감소로 나타나는 것으로 입증되었다[Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, Lancet, 344, 1383-1389 (1994); Sacks et al., N. Engl. J. Med., 335, 1001-1009 (1996); Tonkin et al., N. Engl. J. Med., 339, 1349-1357 (1998); Grundy, S.M., Circulation, 1436-1439 (1998)]. 스타틴으로 실시된 2회의 대규모 일차 예방 시도에서 또한 스타틴에 의한 LDL 콜레스테롤 감소가 심혈관 발병의 감소라는 유의적인 이점을 제공한다는 것이 증명되었다[상기 Grundy; Shepherd et al., N. Engl. J. Med., 333, 1301-1307 (1995); Downs et al., JAMA, 279, 1615-1622 (1998)]. 그러나, 현재의 요법은 모든 사람에게서 LDL 콜레스테롤 수준을 적절히 감소시키지 않는다. VLDL 콜레스테롤 수준은 또한 CHD의 증가된 위험과 연관이 있는 것으로 인정되어 왔다[상기 Kannel]. 현재의 요법은 LDL 콜레스테롤과 같이 VLDL 콜레스테롤을 감소시키는데 많은 효과를 나타내지 않는다. 따라서, LDL 콜레스테롤과 VLDL 콜레스테롤 모두를 감소시키는 새로운 방법이 필요하다.
- <30> 이상적으로, VLDL 콜레스테롤의 범위는 약 1 내지 30 mg/dl이고 LDL 콜레스테롤의 범위는 약 60 내지 160 mg/dl이다. LDL 대 HDL의 비는 이상적으로 3.5미만이다.

<31> **죽상동맥경화증 질환에서 트리아실글리세롤 리파제의 역할**

<32> 죽상동맥경화증과 같은 혈관 질환에서 트리아실글리세롤 리파제의 역할은 중요한 연구 분야가 되어 왔다 [Olivecrona, G. and Olivecrona, T. (1995) *Curr. Opin. Lipid.* 6, 291-305]. 일반적으로, 지단백질 리파제의 작용은 이 효소가 혈청 트리아실글리세롤 수준을 저하시키고 HDL 형성을 촉진하기 때문에 항동맥경화성을 나타 내는 것으로 생각된다. 사람 지단백질 리파제를 발현하는 형질전환 동물은 혈장 트리글리세라이드의 수준을 감 소시키고 고밀도 지단백질(HDL)의 수준을 증가시켰다[Shimada, M., Shimano, H., Gotoda, T., Yamamoto, K., Kawamura, M., Inaba, T., Yazaki, T. and Yamada, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 17924-17929; Liu, M.-S., Jirik, F.R., LeBoeuf, R.C., Henderson, H., Castellani, L.W., Lusic, A.J., Ma, Y., Forsythe, I.J., Zhang, H., Kirk, E., Brunzell, J.D. and Hayden, M.R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 11417-11424]. 지단백질 리파제 활성 수준을 감소시키는 유전자 결함을 지닌 사람은 고트리글리세라이드혈증을 나타내는 것으로 밝혀졌 으나 관상동맥 심장 질환의 위험은 전혀 증가되지 않았다. 이것은 내피하 공간내에 축적될 수 있는 중간-크기의 동맥경화성 지단백질이 생성되지 않기 때문인 것으로 보고되고 있다[Zilversmit, D.B. (1973) *Circ. Res.* 33, 633-638].

<33> 지단백질 리파제(LPL)와 대조적으로, HL의 생리적 기능은 지단백질 잔존물 및 HDL의 대사와 관련이 있는 것으로 보인다[Bensadoun et al., *Curr. Opin. Lipidol.*, 7, 77-81 (1996)]. HL의 유전학적 결핍은 사람[Hegele et al., *Arterioscler. Thromb.*, 13, 720-728 (1993)] 및 돌연변이 마우스[Homanics et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 2974-2980 (1995)]에서의 잔존물과 HDL 콜레스테롤의 약간 증가된 수준과 연관이 있다. 증가된 혈장 콜레 스테롤 수준에도 불구하고, HL 결핍은 apoE 돌연변이 마우스에서 죽상동맥경화증의 감소와 관련이 있다[Mezdour et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 13570-13575 (1997)]. HL을 과발현하는 형질전환 동물은 HDL이 감소되었다 [Busch et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 16376-16382 (1994); Fan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8724-8728 (1994)]. 사람에게서 증가된 HL 활성은 저 HDL 콜레스테롤과 연관이 있다. 염색체 15q21상의 HL 유전 자 좌위는 사람에게서 혈장 HDL 콜레스테롤 수준의 변화와 연관이 있는 것으로 공개되었으나[Cohen et al., *J. Clin. Invest.*, 94, 2377-2384 (1984); Guerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 4532-4537 (1997)], HDL 콜레스테롤 수준의 변화에 대한 유전학적 이유 가운데 단지 일부분을 차지한다. 사람에게서 HDL 콜레스테롤 수준에 영향을 미치는 것으로 HL 유전자 좌위와 구분되는 한 개 이상의 주요 유전자 좌위가 있다[Mahaney et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15, 1730-1739 (1995)].

<34> 죽상동맥경화증 병소의 국소 부위에서, 리파제 활성의 증가된 수준은 동맥경화증 과정을 촉진하는 것으로 가설 되어 있다[Zilversmit, D.B. (1995) *Clin. Chem.* 41, 153-158; Zambon, A., Torres, A., Bijvoet, S., Gagne, C., Moojani, S., Lupien, P.J., Hayden M.R., and Brunzell, J.D. (1993) *Lancet* 341, 1119-1121]. 이것은 리파제에 의해 매개된 혈관 조직에 의해 지단백질의 결함 및 흡수가 증가되기 때문일 수 있다[Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. Vlodavsky, I. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 2013-2021; Tabas, I., Li, I., Brocia R.W., Xu, S.W., Swenson T.L., Williams, K.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 20419-20432; Nordestgaard, B.G. and Nielsen, A.G. (1994) *Curr. Opin. Lipid.* 5, 252-257; Williams, K.J. and Tabas, I. (1995) *Art. Thromb. 및 Vasc. Biol.* 15, 551-561]. 추가로, 리파제 활성의 국소적 고수준은 죽상동맥경화 증 병소의 전구체로 생성되는 지방산과 리소포스파티딜콜린을 세포독성 수준으로 유도할 수 있다.

<35> 지질과 여러 혈장 지단백질의 수준을 조절하는데 있어서 리파제 효소 활성의 역할에 관한 이해에도 불구하고, HDL 콜레스테롤의 수준을 증가시킬 뿐만 아니라 VLDL과 LDL 콜레스테롤의 수준을 저하시켜 죽상동맥경화성 심혈 관 질환의 위험을 감소시킬 수 있는 요법을 개발할 필요가 있다.

<36> **발명의 개요**

<37> 본 발명은 안티센스 핵산을 포함한 발현 벡터를 포함하여 안티센스 핵산을 포함하고 환자에게서 LIPG 유전자의 발현을 저하시키기 위한 조성물을 제공한다. 바람직한 발현 벡터의 예는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터 및 나출 DNA 벡터이다. 안티센스 핵산은 예를 들면, 화학적으로 변형된 염기를 함유한 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

<38> 다른 관점으로, 본 발명은 중화 항체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하여 LIPG 폴리펩타이드와 결합하고 이의 효소 활성을 저하시킬 수 있는 중화 항체를 포함하고 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 저하시키기 위한 조성물을 제공한다. 바람직한 발현 벡터의 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터 및 나출 DNA 벡터가 포함된다.

- <39> 또 다른 관점으로, 본 발명은 세포내 결합 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함한 발현 벡터를 포함하여 세포내 결합 단백질을 포함하고 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 저하시키기 위한 조성물을 제공한다. 바람직한 발현 벡터의 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터 및 나출 DNA 벡터가 포함된다.
- <40> 또 다른 관점으로, 본 발명은 (A) 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 억제할 수 있는 억제제를 포함하는 조성물; (B) 환자에게서 LIPG 유전자의 발현을 저하시킬 수 있는 억제제를 포함하는 조성물; 및 (C) 환자에게서 LIPG의 발현을 저하시킬 수 있고 리보자임을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하여 리보자임을 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직한 발현 벡터의 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터 및 나출 DNA 벡터가 포함된다. 바람직한 리보자임은 해머헤드 리보자임이다.
- <41> 또한, 본 발명은 (D) 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 수준을 증가시키고 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터 또는 LIPG 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 인헨서를 포함하는 조성물 및 (E) 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 증가시키고 LIPG 폴리펩타이드와 결합하고 이의 효소 활성을 증가시키는 인헨서를 포함하는 조성물을 제공한다.
- <42> 또한, 본 발명은 예를 들면, 환자에게서 LIPG 폴리펩타이드의 수준을 저하시킴으로써, 환자에게서 LIPG의 효소 활성을 저하시키는 조성물을 환자에게 투여하여 환자에게서 고밀도 지단백질(HDL) 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 증가시키는 방법을 제공한다. 바람직한 형태로서, 본 발명의 방법은 안티센스 핵산, 특히 핵산의 화학적 안정성을 증가시키도록 변형된 것을 포함하는 조성물의 사용을 포함한다. 상기 방법은 또한 LIPG 폴리펩타이드와 결합하고 이의 효소 활성을 저하시킬 수 있는 중화 항체를 포함하는 조성물, LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 억제하는 억제제, 예를 들면 LIPG 유전자의 발현을 저하시키는 화합물을 포함한 조성물, LIPG를 암호화하는 mRNA를 분해시키는 리보자임을 포함하는 조성물 또는 DNA 분자와 리포솜, 예를 들면 양이온성 리포솜을 포함하는 조성물을 사용하여 실시할 수 있다.
- <43> 바람직한 형태로서, 상기 방법은 또한 환자에게서 아포지단백질 AI를 발현할 수 있는 조성물의 투여를 포함한다.
- <44> 또 다른 관점으로, 본 발명은 예를 들면, LIPG 폴리펩타이드와 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 사용함으로써 환자에게서 LIPG의 효소 활성을 증가시킬 수 있고 바람직하게는 LIPG 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 발현 벡터, 보다 바람직하게는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-연관된 바이러스 벡터를 포함하는 조성물을 환자에게 투여함으로써 환자에게서 초저밀도 지단백질(VLDL) 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 증가시키는 인헨서 또는 LIPG 유전자의 발현을 증가시키는 인헨서를 포함하는 조성물을 사용하여 실시할 수 있다.
- <45> 또 다른 관점으로, 본 발명은 바람직하게는 LIPG 폴리펩타이드를 사용함으로써, 예를 들면 LIPG 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 발현 벡터, 바람직하게는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노-연관된 바이러스 벡터를 사용함으로써 환자에게서 LIPG의 효소 활성을 증가시킬 수 있는 조성물을 환자에게 투여함으로써 환자에게서 저밀도 지단백질(LDL) 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성을 증가시키는 인헨서 또는 LIPG 유전자의 발현을 증가시키는 인헨서를 포함한 조성물의 사용을 포함한다.
- <46> 또한, 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드와 HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI 사이의 효소 반응에 비해 LIPG 폴리펩타이드와 LDL 콜레스테롤 사이의 효소 반응을 우선적으로 증가시키는 인헨서를 환자에게 투여함으로써 환자에게서 LDL 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법을 제공한다.
- <47> 또한, 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드와 HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI 사이의 효소 반응에 비해 LIPG 폴리펩타이드와 VLDL 콜레스테롤 사이의 효소 반응을 우선적으로 증가시키는 인헨서를 환자에게 투여함으로써 환자에게서 VLDL 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 방법을 제공한다.
- <48> 또 다른 관점으로, 본 발명은 환자로부터 조직 시료를 채취하고 시료중의 LIPG 폴리펩타이드의 수준을 측정함으로써, 예를 들면 혈액 조직을 사용하고 측정을 위해 면역검정을 이용함으로써, HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 저 수준에 대한 소질을 진단하는 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 관점으로, LIPG 폴리펩타이드의 수준은 LIPG mRNA의 수준을 측정함으로써 측정한다.

<49> 추가의 관점으로, 본 발명은 (A) (1) HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI, (2) LIPG 폴리펩타이드 및 (3) 시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을, (4) HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI 및 (5) LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준과 비교하고 (B) 제1 시료가 다른 시료 보다 높은 수준의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI를 갖고 있는지를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드, HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI사이의 효소 반응을 억제하는데 효과적이지는 확인함을 포함하여, 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드, HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI 사이의 효소 반응을 억제할 수 있는지를 결정하는 방법을 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 (A) (1) VLDL 콜레스테롤, (2) LIPG 폴리펩타이드 및 (3) 시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 VLDL 콜레스테롤의 수준을, (4) VLDL 콜레스테롤 및 (5) LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 VLDL 콜레스테롤의 수준과 비교하고 (B) 제1 시료가 다른 시료 보다 낮은 수준의 VLDL 콜레스테롤을 갖고 있는지를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 VLDL 콜레스테롤사이의 효소 반응을 증가시키는데 효과적이지는 확인함을 포함하여, 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 VLDL 콜레스테롤사이의 효소 반응을 증가시킬 수 있는지를 결정하는 방법을 제공한다.

<51> 또 다른 관점으로, 본 발명은 (A) (1) LDL 콜레스테롤, (2) LIPG 폴리펩타이드 및 (3) 시험 화합물을 포함하는 제1 시료중의 LDL 콜레스테롤의 수준을, (4) LDL 콜레스테롤 및 (5) LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 다른 시료중의 LDL 콜레스테롤의 수준과 비교하고 (B) 제1 시료가 다른 시료 보다 낮은 수준의 LDL 콜레스테롤을 갖고 있는지를 관찰함으로써 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 LDL 콜레스테롤사이의 효소 반응을 증가시키는데 효과적이지는 확인함을 포함하여, 시험 화합물이 LIPG 폴리펩타이드와 LDL 콜레스테롤사이의 효소 반응을 증가시킬 수 있는지를 결정하는 방법을 제공한다.

**발명의 상세한 설명**

<80> 이하 상세한 설명은 본 발명의 기초와 정의를 설명하였다. 정의 설명 다음에는 본 발명의 실시예에 유용한 각종 조성물과 LIPG 활성 수준을 저하 또는 증가시키는데 사용한 방법에 관하여 설명하였다.

<81> **LIPG 유전자 생성물의 효소적 활성**

<82> 본 발명은 LIPG 리파제 효소의 활성을 저하 또는 상승시키는 방법 및 조성물을 이용하여 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI, VLDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤의 수준을 조절하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 부분적으로 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI, VLDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤에 대한 LIPG 유전자의 폴리펩타이드 생성물의 효소적 활성을 발견한데 기초한 것이다. LIPG의 폴리펩타이드 생성물은 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 구성원이며, 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 약 39kD 촉매성 도메인, 예컨대 서열 10의 서열을 포함한다. 처음 발견된 이 리파제는 내피 세포에 의해 합성되는 것으로 밝혀졌고, 이는 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 다른 구성원들과 비교하였을 때 독특한 특징이 있어, "내피 리파제"(EL)라 명명하였다. LIPG 유전자에 대해서는 이하에 부문별로 충분히 설명될 것이며, EL은 명확함을 위해 이하 LIPG 폴리펩타이드라 명명한다. 일반적으로, LIPG 폴리펩타이드는 이하 "LLGN 폴리펩타이드"와 "LLGX 폴리펩타이드"라 명명되는 2가지 주요 형태로 관찰된다. LLGN 폴리펩타이드는 354개의 아미노산을 보유한다. LLGX 폴리펩타이드는 사람 지단백질 리파제와 43%의 유사성, 사람 간 리파제와 37%의 유사성을 나타내고 500개의 아미노산을 보유한다. 본 명세서에 사용된 "LIPG 폴리펩타이드" 또는 "LIPG 단백질"은 LLGN과 LLGX를 모두 포함한다.

<83> LIPG 폴리펩타이드의 서열은 특징적인 GX SXG 리파제 모티프, 보존된 촉매성 트리아드, 19개 잔기의 리드(lid) 영역, 보존된 헤파린 및 지단백질 결합 부위들과 5개의 잠재성 N-결합된 당화 부위를 포함한다. 트리아실글리세롤 리파제 패밀리에서 최대의 서열 분기성을 나타내는 영역은 리드 도메인으로서, 이 도메인은 이 효소의 촉매성 포켓을 차지하는 양쪽성 헬릭스를 형성하고[Winkler et al., Nature, 343, 771-774 (1990); van Tilbeurgh et al. J. Biol. Chem., 269, 4626-4633 (1994)], 이 계의 효소들에 대한 기질 특이성을 부여한다[Dugi et al., J. Biol. Chem., 270, 25396-25401 (1995)]. LIPG의 19개 잔기의 리드 영역은 상이한 효소적 프로필과 일치하듯이 지단백질 리파제 및 간 리파제에서 발견되는 것보다 3개 잔기가 짧고 양쪽성이 적다. 성숙 단백질의 추론되는 분자량은 약 55kD이고; 68kD 형태는 당화된 형태인 것으로 추정되며, 40kD 형태는 특이적인 단백질 가수분해 절단의 생성물일 수 있다.

<84> LIPG 폴리펩타이드는 VLDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤의 수준 뿐만 아니라 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 저하시키는 성질이 있다. 저하된 HDL 콜레스테롤의 수준은 죽상동맥경화증에 대한 감수성을 증가시

키고 증가된 HDL 콜레스테롤의 수준은 죽상동맥경화증에 대한 감수성을 크게 감소시킬 수 있는 것으로 잘 알려져 있다.

<85> LIPG의 한 가지 생리학적 역할은 말초 조직과 간 중에 존재하는 HDL 인지질을 가수분해시켜 HDL 수용체 SR-BI를 통한 HDL 콜레스테롤 에스테르의 선택적 흡수를 용이하게 할 수 있다는 것이다[Kozarsky et al., Nature, 387, 414-417 (1997)]. 또 다른 가능한 역할은 간 리파제의 역할과 유사한 apoB를 함유하는 잔여 지단백질 흡수를 용이하게 한다는 것이다[Mahley et al., J. Lipid Res., 40, 1-16 (1999)]. 또한, LIPG는 태반에서 다량 발현되는 바, 성장시 이 효소의 역할이 가능하며, 태아 성장에 있어서 지질 수송의 중요성을 제공한다[Farese et al., Trends Genet., 14, 115-120(1998)].

<86> HDL 콜레스테롤이 유리한 성질이 있음을 기초해 볼 때, LIPG의 효소적 활성을 저하시켜 HDL 콜레스테롤의 수준을 증가시키는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 LIPG 유전자의 발현을 저하시키거나 LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 저하시켜 체내에 존재하는 LIPG의 활성을 저하시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

<87> VLDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 수준을 감소시키는 LIPG 폴리펩타이드의 성질 및 고농도의 상기 화합물 및 죽상동맥경화증 질환 간의 상관관계를 입증하는 연구가 제공된다면 환자 중의 상기 화합물의 수준을 저하시키는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 LIPG 유전자의 발현을 증가시키고 LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다.

<88> 이하, 본 명세서에 사용된 용어의 정의 및 본 발명의 바람직한 구체적인 예의 설명을 개시한다.

<89> **정의**

<90> 다음 정의된 용어들은 본 명세서를 통해 사용된 것으로, 본 발명의 범위와 실시를 이해하는데 도움이 될 것이다.

<91> "폴리펩타이드"는 공유 결합된 아미노산 잔기로 이루어진 중합체 화합물이다. 아미노산은 측쇄에 따라 7가지 군으로 분류된다: (1) 지방족 측쇄, (2) 하이드록실(OH) 그룹을 함유하는 측쇄, (3) 황 원자를 함유하는 측쇄, (4) 산성 그룹 또는 아미드 그룹을 함유하는 측쇄, (5) 염기성 그룹을 함유하는 측쇄, (6) 방향족 환을 함유하는 측쇄, 및 (7) 측쇄가 아미노 그룹에 융합되어 있는 이미노산인 프롤린.

<92> "단백질"은 생존 세포에서 구조적 또는 기능적 역할을 하는 폴리펩타이드이다.

<93> 본 발명의 폴리펩타이드와 단백질은 당화되거나 당화되지 않을 수도 있다.

<94> "상동성"은 공동의 진화적 기원을 반영하는 서열의 유사성을 의미한다. 폴리펩타이드 또는 단백질은 상당수의 아미노산이 (1) 동일하거나 또는 (2) 화학적으로 유사한 측쇄를 보유하는 경우 상동성 또는 유사성이 있다고 한다. 핵산은 상당수의 뉴클레오타이드가 동일하다면 상동성이 있다고 한다.

<95> "분리된 폴리펩타이드" 또는 "분리된 단백질"이란 용어는 천연 상태에서 일반적으로 결합되어 있는 화합물(예컨대, 다른 단백질 또는 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 지질)이 거의 없는 폴리펩타이드 또는 단백질이다. "분리된"이란 다른 화합물과의 인위적 또는 합성적 혼합물, 또는 생물학적 활성을 방해하지 않으며, 불완전한 정제, 안정화제의 부가 또는 약제학적으로 허용되는 제제로의 조제시 제공될 수 있는 불순물의 존재를 배제시키는 것을 의미하지는 않는다.

<96> 면역글로불린(항체) 또는 T 세포 항원 수용체와 같은 면역계의 항원 인식 분자와 특이적으로 상호작용할 수 있는 분자는 "항원성"이다. 항원성 폴리펩타이드는 약 5개 이상, 바람직하게는 약 10개 이상의 아미노산을 함유한다. 분자의 항원성 부분은 항체 또는 T 세포 수용체 인식에 면역우성이 있는 부분이거나 또는 면역화용 담체 분자에 항원성 부분을 접합시켜 상기 분자에 대한 항체를 생성하는데 사용되는 부분일 수 있다. 항원성이 있는 분자는 그 자체가 담체없이도 면역반응을 유도할 수 있는 면역원성일 필요는 없다.

<97> "LLGN 폴리펩타이드" 및 "LLGN 단백질"은 서열 6의 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하며, 이 폴리펩타이드는 당화되거나 당화되지 않은 것일 수 있다.

<98> "LLGXL 폴리펩타이드" 및 "LLGXL 단백질"은 서열 8의 서열을 포함하는 폴리펩타이드로서, 당화되거나 당화되지 않은 것일 수 있다.

<99> "LIPG 폴리펩타이드" 및 "LIPG 단백질"은 LIPG 유전자가 암호화하는 리파제 효소이며 일반적으로 LLGN 폴리펩타

이드와 LLGXL 폴리펩타이드를 모두 의미한다.

- <100> "내피 리과제" 또는 "EL"은 LIPG 유전자에 의해 암호화된 리과제 효소를 의미하며, LIPG 폴리펩타이드와 같은 의미이다.
- <101> 본 발명의 LIPG 폴리펩타이드 또는 단백질은 LIPG 폴리펩타이드에서 유래되고 LIPG 폴리펩타이드의 하나 이상의 생물학적 성질을 보유하는 모든 유사체, 단편, 유도체 또는 변이체를 포함한다. LIPG 폴리펩타이드의 상이한 변이체가 자연에 존재한다. 이러한 변이체는 이 단백질을 암호화하는 구조 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 차이가 있는 대립유전자 변형이거나, 상이한 스플라이싱이나 해독후 변형일 수 있다. 당업자라면 단일 또는 복수의 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 교체가 있는 변이체를 생성할 수 있다. 이러한 변이체로는 특히, (a) 하나 이상의 아미노산이 보존적 또는 비보존적 아미노산으로 치환되어 있는 변이체, (b) 1 또는 그 이상의 아미노산이 LIPG 폴리펩타이드에 부가된 변이체, (c) 하나 이상의 아미노산이 치환기를 포함하는 변이체, 및 (d) LIPG 폴리펩타이드가 혈청 알부민과 같은 다른 폴리펩타이드와 융합된 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 LIPG 폴리펩타이드로는 한 종의 아미노산 잔기가 보존적 위치 또는 비보존적 위치에서 다른 종의 상응하는 잔기로 치환된 변이체를 포함한다. 또 다른 구체적인 예에서, 비보존적 위치에 있는 아미노산 잔기는 보존적 또는 비보존적 잔기로 치환된다. 이러한 변이체를 수득하는 방법은 유전자적 기법(억제, 결실, 돌연변이 등), 화학적 기법 및 효소적 기법을 비롯하여 당업자에게 잘 알려져 있다.
- <102> 대안적인 mRNA 스플라이싱 형태 및 대안적인 해독후 변형 형태를 비롯하여 상기 대립유전자 변이체, 유사체, 단편, 유도체, 변이체 및 변형체가 LIPG 폴리펩타이드의 임의의 생물학적 성질을 보유하는 LIPG 폴리펩타이드의 유도체를 유도하는 경우 본 발명의 범위에 속하는 것이다.
- <103> "핵산"은 뉴클레오타이드라고 불리는 공유결합된 서브유닛으로 이루어진 중합체 화합물이다. 핵산은 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있는 폴리리보핵산(RNA) 및 폴리데옥시리보핵산(DNA)을 포함한다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA 및 반합성 DNA를 포함한다. 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드의 서열은 센스 서열이라 한다.
- <104> "안티센스 핵산"은 센스 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열이다. 안티센스 핵산은 센스 쇠에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 하향 조절하거나 차단하는데 사용할 수 있다.
- <105> "분리된 핵산"은 천연 상태에서 일반적으로 결합되어 있는 화합물이 거의 없는 핵산을 의미한다. "분리된"이란 다른 화합물과의 인위적 또는 합성적 혼합물이나, 또는 생물학적 활성을 방해하지 않으며, 불완전한 정제, 안정 화제의 부가 또는 약제학적으로 허용되는 제제로의 조제시 제공될 수 있는 불순물의 존재를 배제시키는 것을 의미하지는 않는다.
- <106> "높은 엄격한 조건에서 하이브리드화하는 핵산"이란 용어는 하이브리드화된 핵산이 높은 엄격한 조건하에서의 세척을 견딜 수 있는 것을 의미한다. DNA-DNA 하이브리드화에 대한 높은 엄격한 세척 조건의 예로는 68°C에서의 0.1X SSC, 0.5% SDS 이다. 높은 엄격한 세척의 다른 조건은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- <107> "조절 영역"이란 핵산의 발현을 조절하는 핵산 서열을 의미한다. 조절 영역은 특정 핵산을 발현하는데 있어 천연적으로 중요한 역할을 하는 서열(상동성 영역) 또는 다른 기원의 서열(다른 단백질 또는 심지어 합성 단백질의 발현에 중요한 역할을 하는 서열)을 포함할 수 있다. 특히, 이 서열은 특이적 또는 비특이적 방식 및 유도성 방식 또는 비유도성 방식으로 유전자의 전사를 자극 또는 억제하는 진핵 또는 바이러스 유전자의 서열이거나 유도된 서열일 수 있다. 조절 영역은 복제 오리진, RNA 스플라이싱 부위, 인핸서, 전사 종결 서열, 표적 세포의 분비 경로로 폴리펩타이드를 유도하는 시그널 서열 및 프로모터를 포함한다.
- <108> "이중성 공급원" 유래의 조절 영역은 발견된 핵산과 천연적으로 결합되어 있지 않은 조절 영역이다. 이중의 조절 영역 중에는 다른 종 유래의 조절 영역, 다른 유전자 유래의 조절 영역, 하이브리드화 조절 서열 및 자연에서 발생하는 않고 당업자에 의해 고안된 조절 서열을 포함한다.
- <109> "벡터"는 본 발명에 기재된 핵산을 숙주 세포로 전달하는 임의의 수단이다. "벡터"라는 용어는 시험관내, 생체 외 또는 생체내에서 원핵 또는 진핵 세포내로 핵산을 도입시키기 위한 바이러스 수단 및 비바이러스 수단을 포함한다. 비바이러스 벡터로는 플라스미드, 리포좀, 전기적으로 하전된 지질(사이토펙틴), DNA-단백질 복합체 및 생체 중합체가 있다. 바이러스 벡터로는 레트로바이러스, 아데노관련 바이러스, 폭스, 바칼로바이러스, 백시니아, 단순 포진, 엡스타인 바르 및 아데노바이러스 벡터가 있다. 본 발명에 기재된 핵산 외에도, 벡터는 하나 이상의 조절 영역 및/또는 핵산 전달 결과(조직으로의 전달, 발현의 지속 등)를 선택, 측정 및 모니터링하는데 유용한 선택성 마커를 포함할 수 있다.

- <110> "재조합 세포"는 세포내에 본래 존재하지 않는 핵산을 포함하는 세포를 의미한다. "재조합 세포"는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵 세포, 효모 세포와 같은 하등 진핵 세포, 원핵 세포 및 원시세균 세포를 포함한다.
- <111> "약제학적으로 허용되는 담체"란 용어는 투여 방법에 대해 약학적으로 허용되고, 멸균성이며, 적합한 분산제 또는 습윤화제와 현탁화제를 사용하여 조제한 수성 또는 유성의 현탁액일 수 있는 희석제 및 충전제를 포함한다. 특정한 약제학적으로 허용되는 담체 및 활성 화합물 대 담체의 비율은 조성물의 용해성과 화학적 성질, 특정 투여방식 및 표준 약제학적 실시예에 의해 결정된다.
- <112> "리파제"는 지질 기질을 효소적으로 절단할 수 있는 단백질이다.
- <113> "포스포리파제"는 인지질 기질을 효소적으로 절단할 수 있는 단백질이다.
- <114> "트리아실글리세롤 리파제"는 트리아실글리세라이드 기질을 효소적으로 절단할 수 있는 단백질이다.
- <115> "포스포티딜콜린"은 글리세롤 인지질로서, 레시틴으로도 알려져 있다.
- <116> "지질 프로필"은 사람 또는 기타 동물의 체내에 존재하는 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 지단백질 콜레스테롤 및 다른 지질들의 농도 세트를 의미한다.
- <117> "바람직하지 않은 지질 프로필"은 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 지단백질 콜레스테롤의 농도가 연령과 성별에 따라 조정된 참조 범위를 벗어난 상태이다. 일반적으로, 전체 콜레스테롤의 농도가 200mg/dl 초과, 혈장 트리글리세라이드의 농도가 200mg/dl 초과, LDL 콜레스테롤의 농도가 130mg/dl 초과, HDL 콜레스테롤의 농도가 39mg/dl 미만 또는 전체 콜레스테롤 대 HDL 콜레스테롤의 비가 4.0 초과는 바람직하지 않은 지질 프로필로 간주된다. 바람직하지 않은 지질 프로필은 고지혈증, 당뇨병성 고콜레스테롤혈증, 죽상동맥경화증 및 다른 형태의 관상 동맥 질환을 비롯한 다양한 병리적 상태와 관련이 있다.
- <118> "리보자임"은 효소로서 작용할 수 있는 RNA 분자이다.
- <119> "중화 항체"는 LIPG 폴리펩타이드에 결합할 수 있고 LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 저하 또는 제거시킬 수 있는 항체이다. 이 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 본 발명은 키메라 항체, 단일쇄 항체, 사람화된 항체 뿐만 아니라 Fab 단편과 Fab 발현 라이브러리의 생성물 및 Fv 단편과 Fv 발현 라이브러리의 생성물을 포함한다.
- <120> "억제성 분자" 또는 "억제제"는 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 저하 또는 제거하거나 또는 LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 저하 또는 제거하는 분자이다.
- <121> "인헨서 분자" 또는 "인헨서"는 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 증가시키거나 또는 LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 증가시키는 분자이다.
- <122> "리포솜"은 합성된 또는 천연 발생의 인지질 소체이다.
- <123> "양이온성 리포솜"은 순수 양성으로 하전된 리포솜이다.
- <124> 이하에서는, 본 발명에서 청구된 방법 및 조성물에 사용되는 성분들과 이 성분들의 바람직한 구체적인 예를 설명하였다.

<125> **폴리펩타이드**

- <126> 본 발명은 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 구성원이며 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 39kD 촉매성 도메인(예, 서열 10의 서열을 가짐)을 포함하는 LIPG에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 이용한다. 본 발명의 일부 구체적인 예에서는, 서열 6의 서열을 포함하고 10% SDS-PAGE 겔 상에서 겔보기 분자량이 약 40kD인 분리된 LIPG 폴리펩타이드가 사용된다. 본 발명의 또 다른 구체적인 예에서는 서열 8의 서열을 포함하고 10% SDS-PAGE 겔 상에서 겔보기 분자량이 약 55kD 또는 68kD인 분리된 LIPG 폴리펩타이드가 사용된다. 또 다른 구체적인 예에 있어서, 본 발명에 사용되는 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드들의 서브단편이다. 또 다른 구체적인 예에서, 본 발명에 사용된 폴리펩타이드는 LIPG 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 항체이다.
- <127> 본 발명에 사용된 폴리펩타이드 및 단백질은 재조합 폴리펩타이드, 천연 폴리펩타이드 또는 합성 폴리펩타이드이며, 사람, 토끼 또는 다른 동물 기원일 수 있다. 이러한 폴리펩타이드들은 재현적인 단일 분자량 및/또는 복수의 분자량, 크로마토그래피 반응 및 용출 프로필, 아미노산 조성 및 서열, 및 생물학적 활성을 특징으로

한다.

- <128> 본 발명에 사용되는 폴리펩타이드는 천연 공급원, 예컨대 태반 추출물, 사람 혈장 또는 대식세포 또는 내피세포와 같은 배양 세포 유래의 조건 배지로부터 당업자에게 공지된 정제 절차에 따라 분리할 수 있다.
- <129> 또는, 본 발명에 사용되는 폴리펩타이드는 이 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 적합한 벡터에 결합시키고, 수득되는 벡터를 적합한 숙주 세포에 삽입시키며, 수득되는 숙주 세포에 의해 생성되는 폴리펩타이드를 회수하고, 회수된 폴리펩타이드를 정제하는 단계를 포함하는 재조합 DNA 기법을 이용하여 제조할 수 있다.
- <130> **핵산**
- <131> 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 이용한다.
- <132> 또한, 본 발명은 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 하향 조절하거나 차단하는데 사용할 수 있는 안티센스 핵산을 이용한다.
- <133> 재조합 DNA 기법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 재조합 분자를 클로닝 및 발현하는 일반적 방법은 본 발명에 참조로 인용되는 문헌[Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982, and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley and Sons, 1987]에 개시되어 있다.
- <134> 본 발명의 핵산은 하나 이상의 조절 영역과 결합될 수 있다. 적합한 조절 영역의 선택은 당업자의 수준에서 통상적인 문제이다. 조절 영역으로는 프로모터를 포함하며, 인핸서, 서프레스 등을 포함할 수도 있다.
- <135> 본 발명에 사용할 수 있는 프로모터로는 항상성 프로모터 및 조절형(유도성) 프로모터를 포함한다. 이 프로모터들은 숙주에 따라 원핵성 또는 진핵성일 수 있다. 본 발명을 실시하는데 유용한 원핵성 프로모터 중에는 lacI, lacZ, T3, T7, 람다 P<sub>r</sub>, P<sub>i</sub> 및 trp 프로모터가 있다. 본 발명의 실시예에 유용한 진핵성(바이러스 포함) 프로모터 중에는 편재적 프로모터(예, HPRT, 비멘틴, 액틴, 튜블린), 중재적 필라멘트 프로모터(예, 데스민, 뉴로필라멘트, 케라틴, GFAP), 치료적 유전자 프로모터(예, MDR 유형, CFTR, 제VIII 인자), 조직 특이적 프로모터(예, 평활근 세포내의 액틴 프로모터 또는 내피 세포에서 활성적인 Flt 및 Flk 프로모터), 형질전환된 동물에 사용되었고 조직 특이성을 나타내는 동물 전사 조절 영역; 췌장의 선포 세포에서 활성적인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역[Swift et al., 1984, *Cell* 38: 639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515]; 췌장의 베타 세포에서 활성적인 인슐린 유전자 조절 영역[Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122], 림프계 세포에서 활성적인 면역글로불린 유전자 조절 영역[Grosschedl et al., *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444]; 고환, 유방, 림프계 및 비만 세포에서 활성적인 마우스 유방암 바이러스 조절 영역[Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495], 간에서 활성적인 알부민 유전자 조절 영역[Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276], 간에서 활성적인 α-페토단백질 유전자 조절 영역[Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58], 간에서 활성적인 α1-안티트립신 유전자 조절 영역[Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171], 골수계 세포에서 활성적인 β-글로빈 유전자 조절 영역[Mogran et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94], 뇌 중의 과돌기신경교세포에서 활성적인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역[Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712], 골격근에서 활성적인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역[Sani, 1985, *Nature* 314:283-286], 및 시상하부에서 활성적인 고키나도트로핀 방출 호르몬 유전자 조절 영역[Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378]을 포함한다.
- <136> 본 발명의 실시예에서 사용할 수 있는 다른 프로모터로는 분열 세포내에서 주로 활성화되는 프로모터, 자극에 반응하는 프로모터(예, 스테로이드 호르몬 수용체, 레티노산 수용체), 테트라사이클린이 조절하는 전사 조절인자, 사이토메갈로바이러스(CMV) 이메디에이트 어얼리(immediate-early) 프로모터, 레트로바이러스 LTR, 메탈로티오네인, SV-40, E1a 및 MLP 프로모터가 있다. 테트라사이클린이 조절하는 전사 조절인자 및 CMV 프로모터는 본 발명에 참조로 인용되는 문헌[WO 제96/01313호, US 제5,168,062호 및 제5,385,839호]에 개시되어 있다.
- <137> 바이러스 벡터 시스템
- <138> 본 발명의 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터는 복제 결손형, 즉 표적 세포내에서 자율적으로 복제할 수 없는 벡터인 것이 바람직하다. 일반적으로, 본 발명의 범위내에서 사용되는 복제 결손형 바이러스 벡터의 게놈은

감염된 세포내에서 바이러스의 복제에 필요한 하나 이상의 영역이 결실되어 있다. 이 영역은 제거(전체 또는 부분적으로)되거나 또는 당업자에게 공지된 임의의 기법에 의해 비기능성이 부여되어야 한다. 이러한 기법으로는 완전 제거, 치환(다른 서열, 특히 삽입된 핵산에 의한 치환), 부분적 결실 또는 필수(복제에 대한) 영역에 대한 하나 이상의 염기의 부가를 포함한다. 이러한 기법은 시험관내(분리된 DNA 상에서) 또는 원위치내 유전자 조작 기법을 사용하거나 또는 돌연변이유발제로 처리하여 실시할 수 있다.

- <139> 복제 결손형 바이러스는 바이러스 입자의 캡시드화에 필수적인 게놈 서열을 보유하는 것이 바람직하다.
- <140> 레트로바이러스는 분열 세포를 감염시키는 통합 바이러스이다. 레트로바이러스 게놈은 2개의 LTR, 캡시드화 서열 및 3개의 암호 영역(gag, pol 및 env)을 포함한다. 재조합 레트로바이러스 벡터의 작제에 대해서는 문헌[특히, EP 제453242호, EP 제178220호, Bernstein et al., Genet.Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689] 등에 개시되어 있다. 재조합 레트로바이러스 벡터에서 gag, pol 및 env 유전자는 그 전체 또는 일부가 일반적으로 결실되고 목적하는 이중 핵산 서열로 치환된다. 이 벡터는 여러 종류의 레트로바이러스, 예컨대 MoMuLV("쥐 몰로니 백혈병 바이러스", MSV("쥐 몰로니 육종 바이러스"), HaSV("하베이 육종 바이러스"), SNV("비장 괴사 바이러스"), RSV("라우스 육종 바이러스") 및 프렌드 바이러스로부터 작제할 수 있다. 렌티바이러스 벡터 시스템 역시 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다. 렌티바이러스 게놈은 모든 레트로바이러스에서와 같이 3개의 구조 유전자(gag, pol, env)가 5'에서 3'로 포함되어 있는 9000 내지 10000 염기쌍의 (+)-쇄 폴리아데닐화 RNA이다. 렌티바이러스 시스템에 대한 자세한 보고는 문헌[Fields Virology, Second Edition, Volume 2, Chapter 55, "Lentiviruses", pp. 1571-1589, Raven Press, New York, 1990]을 참조하기 바란다.
- <141> 일반적으로 LIPG를 암호화하는 서열을 포함하는 재조합 레트로바이러스를 작제하기 위하여, LTR, 캡시드화 서열 및 암호화 서열을 포함하는 플라스미드를 작제한다. 이 작제물을 사용하여 플라스미드에 결손된 레트로바이러스 기능을 트랜스로 공급할 수 있는 팩키징 세포주를 형성감염시킨다. 일반적으로, 팩키징 세포주는 gag, pol 및 env 유전자를 발현할 수 있다. 이러한 팩키징 세포주에 대해서는 종래 기술에 개시되어 있고, 그 예로는 세포주 PA317[미국 특허 제4,861,719호]; PsiCRIP 세포주[WO 제90/02806호] 및 GP<sup>+</sup>envAm<sup>-</sup>12 세포주[WO 제89/07150호]가 있다. 또한, 재조합 레트로바이러스 벡터는 일부 gag 유전자를 포함할 수 있는 확장된 캡슐화 서열 뿐만 아니라 전사 활성을 억제하기 위해 LTR 내에 변형을 포함할 수 있다[Bender et al., J. Virol. 61(1987) 1639]. 재조합 레트로바이러스 벡터는 당업자에게 공지된 표준 기법으로 정제한다.
- <142> 아데노관련 바이러스(AAV)는 감염된 세포의 게놈에 안정하고 부위 특이적 방식으로 통합될 수 있는 비교적 작은 크기의 DNA 바이러스이다. 이 바이러스는 세포의 성장, 형태 또는 분화에 어떤 영향도 미치지 않고 다양한 세포를 감염시킬 수 있고 사람의 병리상태에 관여하는 것으로 보이지 않는다. AAV 게놈은 클로닝, 서열분석 및 특성이 규명되어 있다. 약 4700개의 염기와 각 말단에 이 바이러스의 복제 오리진으로서 작용하는 약 145개 염기의 역위된 말단 반복체(ITR) 영역을 포함한다. 이 게놈의 다른 부분은 캡시드화 기능을 보유하는 2개의 필수 영역, 즉 바이러스 유전자의 바이러스 복제와 발현에 관여하는 rep 유전자를 포함하는 게놈의 좌측부 및 바이러스의 캡시드 단백질을 암호화하는 cap 유전자를 함유하는 게놈의 우측부로 나뉜다.
- <143> AAV 유래의 벡터는 시험관내 및 생체내에서 유전자를 전달하기 위한 용도에 관하여 이미 개시되어 있다[WO 제 91/18088호; WO 제93/09239호; US 제4,797,368호, US 제5,139,941호, EP 제488 528호]. 이 공보들은 rep 및/또는 cap 유전자가 결실되고 목적하는 유전자로 대체된 다양한 AAV 유래의 작제물 및 시험관내(배양된 세포로) 또는 생체내에서(유기체에 직접) 목적하는 유전자를 전달하기 위한 상기 작제물의 용도에 대하여 개시하고 있다. 본 발명에 기재된 복제 결손형 재조합 AAV는 목적하는 핵산 서열이 2개의 AAV 역위된 말단 반복체(ITR) 영역 사이에 삽입된 플라스미드 및 AAV 캡시드화 유전자(rep 및 cap 유전자)를 보유하는 플라스미드를 이용하여 사람 헬퍼 바이러스(예, 아데노바이러스)로 감염된 세포주를 동시형질감염시켜 제조할 수 있다. 그 다음, 생산된 AAV 재조합체는 표준 기법으로 정제한다. 또한, 본 발명은 게놈내에 AAV ITR사이에 삽입된 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 AAV 유래의 재조합 바이러스에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 AAV 유래의 2개의 ITR 사이에 삽입된 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 플라스미드에 관한 것이다. 이러한 플라스미드는 핵산 서열을 전달하기 위하여 그대로 사용될 수 있으며, 필요하다면 리포솜 벡터(슈도바이러스)에 도입될 수도 있다.
- <144> 바람직한 구체적인 예에서, 본 발명에 사용되는 벡터는 아데노바이러스 벡터이다.
- <145> 아데노바이러스는 본 발명의 핵산을 다양한 세포 종류에 효율적으로 전달하기 위하여 변형시킬 수 있는 진핵성 DNA 바이러스이다.

- <146> 아데노바이러스에는 다양한 혈청형이 존재한다. 이 혈청형 중에서 타입 2 또는 타입 5의 사람 아데노바이러스 (Ad2 또는 Ad5) 또는 동물 기원의 아데노바이러스 [WO 제94/26914호 참조]를 사용하는 것이 본 발명의 범위내에서 바람직하다. 본 발명의 범위내에서 사용할 수 있는 동물 기원의 아데노바이러스로는 개, 소, 쥐[예, Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81], 양, 돼지, 조류 및 원숭이(실시예: SAV) 기원의 아데노바이러스를 포함한다. 바람직하게는 동물 기원의 아데노바이러스는 개의 아데노바이러스이고, 보다 바람직하게는 CAV2 아데노바이러스 (예, Manhattan 또는 A26/61균주(ATCC VR-800))이다.
- <147> 바람직하게는, 본 발명의 복제 결손형 아데노바이러스 벡터는 ITR, 캡시드화 서열 및 목적하는 핵산을 포함한다. 보다 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터의 적어도 E1 영역이 비기능적인 것이다. E1 영역 중의 결실부는 Ad5 아데노바이러스의 서열 중 뉴클레오타이드 455 내지 3329인 것이 바람직하다. 또한, 다른 영역, 특히 E3 영역[WO 제95/02697호], E2 영역[WO 제94/28938호], E4 영역[WO 제94/28152호, WO 제94/12649호 및 WO 제95/02697호] 또는 레이트(late) 유전자 L1 내지 L5 중 임의의 유전자도 변형시킬 수 있다. 결손형 레트로바이러스 벡터는 문헌[WO 제95/02697호]에 개시되어 있다.
- <148> 바람직한 구체적인 예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 영역 및 E4 영역에 결실부를 갖고 있다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 아데노바이러스 벡터는 E4 영역과 LLG를 암호화하는 서열이 삽입된 E1 영역에 결실부를 갖고 있다[본 발명에 참조로 인용되는 FR 제94 13355호 참조].
- <149> 본 발명에 개시된 복제 결손형 재조합 아데노바이러스는 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 기법으로 제조할 수 있다[Levrero et al., Gene 101 (1991) 15, EP 제185 573호; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917]. 구체적으로, 특히 목적하는 DNA 서열을 보유하는 플라스미드와 아데노바이러스 간의 상동 재조합에 의해 제조할 수 있다. 이 상동 재조합은 상기 아데노바이러스와 플라스미드로 적당한 세포주를 동시형질감염시킨 후 실시한다. 사용되는 세포주는 바람직하게는 (i) 상기 성분들로 형질전환될 수 있어야 하고, (ii) 복제 결손형 아데노바이러스의 게놈 일부와 상보적일 수 있고, 바람직하게는 재조합의 위험을 피할 수 있도록 통합 형태인 서열을 포함해야 한다. 사용할 수 있는 세포주의 예는 Ad5 아데노바이러스의 좌측부(12%)가 게놈에 통합되어 있는 사람 배 신장 세포주 293[Graham et al., J. Gen. Virol. 36(1977) 59] 및 출원[WO 제94/26914호 및 WO 제95/02697호]에 개시된 바와 같이 E1 및 E4 기능에 상보적일 수 있는 세포주이다. 재조합 아데노바이러스는 당업자에게 잘 알려진 표준 분자생물학적 기법을 사용하여 회수 및 정제한다.
- <150> **안티센스 핵산**
- <151> 안티센스 핵산을 사용한 유전자 발현의 하향 조절은 해독 또는 전사 단계에서 실시할 수 있다. 본 발명의 안티센스 핵산은 LIPG를 암호화하는 핵산 또는 이에 상응하는 전령 RNA의 전체 또는 일부와 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 핵산 단편인 것이 바람직하다. 또한, LIPG 유전자의 발현을 1차 전사체의 스플라이싱을 억제하여 감소시키는 안티센스 핵산이 고안되거나 확인되었다. LIPG 유전자의 구조와 부분적 서열에 관한 정보를 기초로 하여 이러한 안티센스 핵산을 고안하고 효능을 시험할 수 있다.
- <152> 안티센스 핵산은 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 이 2개의 임의의 배합으로 대부분 구성된 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하다. 안티센스 핵산은 합성 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 이 올리고뉴클레오타이드는 필요하다면 안정성 및/또는 선택성을 향상시키기 위하여 화학적으로 변형시킬 수 있다. 이러한 변형은 올리고뉴클레오타이드가 세포내 뉴클레아제에 의한 분해에 민감하기 때문에, 예컨대 포스포디에스테르 결합의 유리 산소를 대체하기 위한 황 원자의 사용을 포함할 수 있다. 이 변형은 포스포로티오에이트 결합으로도 불린다. 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 수용성, 다중음이온성이며 내인성 뉴클레아제에 내성이 있다. 또한, 포스포로티오에이트 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 표적 부위에 하이브리드화하면 RNA-DNA 이분체는 하이브리드 분자의 mRNA 성분을 절단하는 내인성 효소 리보뉴클레아제(Rnase) H를 활성화시킨다.
- <153> 또한, 포스포르아미다이트 및 폴리아미드(캡타이드) 결합을 가진 안티센스 올리고뉴클레오타이드도 합성할 수 있다. 이 분자는 뉴클레아제 분해에 대하여 매우 내성이어야 한다. 또한, 당 잔기의 2' 탄소 및 피리미딘의 5번 탄소(C-5)에 화학적 그룹이 부가되어 안정성을 향상시키고 표적 부위에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 결합을 용이하게 할 수 있다. 변형으로는, 2' 데옥시, 0-펜톡시, 0-프로폭시, 0-메톡시, 플루오로, 메톡시에톡시 포스포로티오에이트, 변형된 염기 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 기타 변형을 포함할 수 있다.
- <154> 안티센스 핵산은 또한 세포내에서 발현시 LIPG mRNA의 전체 또는 일부 서열에 상보적인 RNA를 생산하는 DNA 서열일 수 있다. 안티센스 핵산은 문헌[EP 제140308호]에 기재된 바와 같이 서열 2, 서열 3, 서열 7 또는 서열 11

로 구성된 그룹 중에서 선택된 서열 전체 또는 일부를 발현시켜 제조할 수 있다. 안티센스 서열의 길이는 LIPG의 발현을 하향 조절하거나 차단시킬 수만 있다면 어떤 길이라도 본 발명을 실시하는데 적합하다. 바람직하게는, 안티센스 서열은 길이가 20개 이상인 뉴클레오타이드인 것이 좋다. 안티센스 핵산의 제조 및 용도, 안티센스 RNA를 암호화하는 DNA, 및 올리고 및 유전자 안티센스의 용도에 대해서는 본 발명에 참조로 인용되는 문헌 [WO 제92/15680호]에 개시되어 있다.

<155> 안티센스 핵산 치료 방법에 사용하기 위한 LIPG의 최적 단편을 측정하는 한 가지 방법은 기계적 전단, 효소적 처리로 LIPG cDNA의 랜덤 단편을 제조하고, 이 단편을 본 명세서에 설명된 임의의 벡터 시스템 중으로 클로닝하는 것을 포함한다. 각 클론 또는 클론 수집물을 사용하여 LIPG 발현 세포를 감염시키고, RNA 또는 단백질 단계에서 LIPG 발현을 모니터링하여 효과적인 안티센스 LIPG cDNA 단편을 확인한다.

<156> 전술한 레트로바이러스, 아데노관련 바이러스 및 아데노바이러스의 벡터 시스템은 모두 세포내에 안티센스 핵산을 도입시키고 발현시키는데 사용될 수 있다. 안티센스 합성 올리고뉴클레오타이드는 하기 기술되는 방법을 비롯하여 다양한 방법에 따라 도입할 수 있다.

<157> **리보자임**

<158> LIPG 폴리펩타이드 수준의 감소는 리보자임을 사용하여 실시할 수 있다. 리보자임은 촉매성 도메인과 기질 결합 도메인을 각각 보유하는 촉매성 RNA 분자(RNA 효소)이다. 기질 결합 서열은 뉴클레오타이드 상보성 및 가능하게는 표적 서열과의 비수소결합 상호작용에 의해 결합한다. 촉매성 부분은 특정 부위에서 표적 RNA를 절단한다. 리보자임의 기질 도메인은 리보자임을 특정 mRNA 서열을 표적하도록 가공될 수 있다. 리보자임은 상보성 염기쌍을 인식한 뒤 그 염기쌍을 통해 표적 mRNA에 결합한다. 정확한 표적 부위에 결합하면 리보자임은 효소적으로 작용하여 표적 mRNA를 절단한다. 리보자임에 의한 LIPG mRNA의 절단은 LIPG 폴리펩타이드의 합성을 유도하는 성질을 파괴시킨다. 리보자임은 표적 서열을 절단한 후, 방출되어 다른 LIPG mRNA에 반복하여 결합하고 절단할 수 있다.

<159> 본 발명의 바람직한 구체적인 예에 있어서, 리보자임은 해머헤드 모티프 형태로 형성된다. 다른 형태로는 헤어핀 모티프, 델타형 간염 바이러스, 제I 그룹 인트론 또는 RnaseP RNA(RNA 가이드(guide) 서열과 연합됨) 모티프 또는 뉴로스포라 VS RNA 모티프를 포함한다. 해머헤드 모티프에 대해서는 문헌[Rossi et al., 1992, Aids Research and Human Retroviruses, 8, 183]에 개시되어 있다. 헤어핀 모티프에 대해서는 문헌[Hampel and Tritz, 1989, Biochemistry, 28, 4929, and Hampel et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 299]에 개시되어 있다. 델타형 간염 바이러스 모티프에 대해서는 문헌[Perrotta and Been, 1992, Biochemistry, 31, 16]에, RnaseP 모티프에 대해서는 문헌[Guerrier-Takada et al., 1983, Cell, 35, 849]에, 뉴로스포라 VS RNA 리보자임 모티프에 대해서는 문헌[Saville and Collins, 1990, Cell, 61, 685-696; Saville and Collins, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8826-8830; Collins and Olive, 1993, Biochemistry, 32, 2795-2799]에, 제 I 그룹 인트론 모티프에 대해서는 문헌[Cech et al., 미국 특허 제4,987,071호]에 개시되어 있다.

<160> 리보자임을 제조하는 한 가지 방법은 전사 후 표적 LIPG mRNA에 하이브리드화하는 서열 사이에 삽입된 리보자임 촉매성 도메인(약 20개의 뉴클레오타이드)을 가진 올리고데옥시리보뉴클레오타이드를 화학적으로 합성하는 것이다. 이 올리고데옥시리보뉴클레오타이드는 프라이머로서 기질 결합 서열을 사용하므로써 증폭시킨다. 그 증폭 생성물은 진핵 발현 벡터에 클로닝한다.

<161> 해머헤드 구조 또는 헤어핀 구조를 보유하는 리보자임은 이러한 촉매성 RNA 분자들이 진핵의 프로모터에 의해 세포내에서 발현될 수 있기 때문에 용이하게 제조할 수 있다[예, Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992; Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990, Science, 247, 1222-1225]. 본 발명의 리보자임은 적당한 DNA 벡터로부터 진핵 세포내에서 발현시킬 수 있다. 필요한 경우에는, 제2 리보자임을 이용하여 1차 전사체로부터 해리시키므로써 리보자임의 활성을 증강시킬 수 있다[Ohkawa et al., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55].

<162> 리보자임을 제조하는 한 가지 방법으로는, 리보자임을 DNA 벡터, RNA 벡터 또는 바이러스 벡터에 삽입된 전사 유닛으로부터 발현시키는 것이다. 리보자임 서열의 전사는 진핵 RNA 폴리머라제 I(pol I), RNA 폴리머라제

II(pol II) 또는 RNA 폴리머라제 III(pol III)의 프로모터에 의해 유도된다. pol II 프로모터 또는 pol III 프로모터에 의한 전사체는 모든 세포내에서 고수준으로 발현된다; 제공된 세포 유형내에 존재하는 소정의 pol II 프로모터의 수준은 인접한 유전자 조절 서열에 따라 달라진다. 또한, 원핵성 RNA 폴리머라제 효소가 적당한 세포내에서 발현되기만 한다면 원핵성 RNA 폴리머라제 프로모터를 사용할 수도 있다[Elroy-Stein and Moss, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang 1993, Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993, Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37]. 이 프로모터들로부터 발현된 리보자임은 포유동물의 세포내에서 작용할 수 있는 것으로 입증되었다 [Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, EMBO J., 11, 4411-8; Lisiewicz et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8000-4].

<163> 본 발명의 한가지 구체적인 예에 있어서, LIPG RNA를 절단하는 리보자임을 발현하는 전사 유닛은 플라스미드 DNA 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 DNA 바이러스 벡터 또는 아데노 관련 바이러스 벡터에 삽입된다. 이 재조합 벡터는 DNA 플라스미드 또는 아데노바이러스 벡터인 것이 바람직하다. 하지만, RNA의 발현을 유도하는 기타 포유동물 세포의 벡터도 본 용도에 사용할 수 있다. 이 벡터들은 재조합 바이러스 입자로서 전달된다. DNA는 단독으로 또는 다양한 부형제와의 복합물로서 전달될 수 있다. DNA, DNA/비히클 복합물 또는 재조합 바이러스 입자는 하기 기술되는 바와 같이 치료 부위에 국소 투여된다. 리보자임을 발현할 수 있는 재조합 벡터는 하기 기술되는 바와 같이 국소 전달되어 표적 세포내에 잔존하는 것이 바람직하다. 일단 발현되면 리보자임은 표적 LIPG mRNA를 절단한다.

<164> 리보자임은 다양한 방법으로 환자에게 투여될 수 있다. 리보자임은 표적 조직에 직접 투여되거나, 양이온성 지질과의 복합물로서 투여되거나, 리포솜내에 캡핑되어 투여되거나 또는 당해 기술 분야에 공지된 기타 다른 방법으로 표적 세포에 전달될 수 있다. 바람직한 조직에 대한 국소적 투여는 하기 기술되는 바와 같이 생체 중합체 중에 리보자임을 부가하거나 또는 부가하지 않은 상태로 카테터, 주입 펌프 또는 스텐트를 이용하여 실시할 수 있다. 또 다른 투여 경로로는 정맥내 주사, 근육내 주사, 경피 주사, 에어로졸 흡입, 경구(정제 또는 환제 형태), 국소, 전신, 경안, 복강내 및/또는 협막내 전달을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다. 리보자임 전달 및 투여에 대한 보다 상세한 설명은 본 발명에 참조로 인용되는 문헌 [Sullivan et al., PCT WO 제94/02595호 and Draper et al., PCT WO 제93/23569호]에 제시되어 있다.

<165> **비바이러스 전달 시스템**

<166> 일부 비바이러스 시스템은 당해 기술 분야에서 사용된 바 있으며, 이 시스템은 LIPG 폴리펩타이드 또는 안티센스 핵산을 암호화하는 DNA를 환자에게 용이하게 도입시킬 수 있다.

<167> 바람직한 LIPG 폴리펩타이드 또는 안티센스 서열을 암호화하는 DNA 벡터는 리포펙션법으로 생체내에 도입시킬 수 있다. 과거 10년 동안 핵산을 시험관내에서 캡슐화하고 형질감염시키기 위해서 리포솜을 사용하는 예가 증가하였다. 리포솜 매개의 형질감염시 나타나는 어려움과 위험을 제한하기 위해 고안된 합성 양이온성 지질은 마커를 암호화하는 유전자의 생체내 형질감염을 위한 리포솜을 제조하는데 사용할 수 있다[Felgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7417 (1987); Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:8027-8031 (1988); Ulmer et al., Science 259: 1745-1748 (1993)]. 사용된 양이온성 지질은 음으로 하전된 핵산의 캡슐화 및 음으로 하전된 세포막과의 융합을 촉진시킬 수 있다[Felgner and Ringold, Nature 337:387-388(1989)]. 핵산을 전달하는데 특히 유용한 지질 화합물 및 조성물에 대해서는 문헌[국제 특허 공개번호 WO 제95/18863호 및 WO 제96/17823호과, 미국 특허 제5,459,127호]에 개시되어 있다. 외인성 유전자를 생체내 특정 기관으로 도입시키는데 사용되는 리포펙션법은 특별한 실용적 잇점이 있다. 잇점 중 한 가지는 리포솜을 특정 세포로 분자적 표적화할 수 있다는 것이다. 특정 세포 유형에 대한 유도성 형질감염은 세포 이종성이 있는 조직, 예컨대 췌장, 간, 신장 및 뇌에서 특히 유리하다는 것이 밝혀져 있다. 지질은 표적화를 위하여 다른 분자에 화학적으로 결합될 수 있다[Mackey et al., 상기 문헌 설명 참조]. 표적화된 펩타이드, 예컨대 호르몬 또는 신경전달물질, 및 단백질, 예컨대 항체 또는 비펩타이드성 분자가 리포솜에 화학적으로 결합될 수 있다.

<168> 또한, 핵산을 생체내 용이하게 형질감염시킬 수 있는 다른 분자, 예컨대 양이온성 올리고펩타이드[예, 국제 특허 공개번호 WO 제95/21931호], DNA 결합 단백질 유래의 펩타이드[예, 국제 특허 공개번호 WO 제96/25508호] 또는 양이온성 중합체[예, 국제 특허 공개번호 WO 제95/21931호]도 사용될 수 있다.

<169> LIPG 폴리펩타이드 또는 안티센스 서열을 암호화하는 DNA 벡터를 나출 DNA 플라스미드로서 생체내 도입시킬 수

도 있다[미국 특허 제5,693,622호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호 참조]. 유전자 요법에 사용되는 나출 DNA 벡터는 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 바람직한 숙주 세포로 도입시킬 수 있다. 그러한 방법의 예로는 형질감염법, 전기천공법, 미세주입법, 형질도입법, 세포 융합법, DEAE 텍스트란법, 인산칼슘 침전법, 유전자 총의 사용 또는 DNA 벡터 트랜스포터 (transporter)의 사용이 있다[예컨대, Wilson et al., J. Biol. Chem. 267:963-967 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624(1988); Hartmut et al., 캐나다 특허 출원 번호 제2,012,311호, 1990.3.15 출원; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991)]. 또한, 수용체를 매개로 한 DNA 전달 방법도 사용할 수 있다[Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)].

**<170> 항체**

<171> 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드에 대한 항체를 제공한다. 이 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 본 발명은 키메라 항체, 단일쇄 항체 및 사람화된 항체 뿐만 아니라 Fab 단편 및 Fab 발현 라이브러리의 생성물, 및 Fv 단편 및 Fv 발현 라이브러리의 생성물을 포함한다.

<172> 폴리클로날 항체는 하기 실시예 부분에서 설명되는 바와 같이 LIPG 폴리펩타이드의 항원성 단편에 대하여 제조할 수 있다. 또한, 항체는 본래의 LIPG 단백질 또는 폴리펩타이드, 또는 이 단백질이나 폴리펩타이드의 단편, 유도체 또는 에피토프에 대하여 생성될 수도 있다. 항체는 당해 기술 분야에 공지된 기법과 절차를 사용하여 상기 단백질, 폴리펩타이드, 단편, 유도체 또는 에피토프를 동물에게 투여한 후에 획득할 수 있다.

<173> 모노클로날 항체는 문헌[Mishell, B.B., et al., Selected Methods In Cellular Immunology, (W.H. Freeman, ed.) San Francisco (1980)]에 개시된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 간략히 설명하면, 본 발명의 폴리펩타이드를 사용하여 Balb/C 마우스의 비장 세포를 면역화시킨다. 면역화된 비장 세포를 골수종 세포와 융합시킨다. 비장 세포와 골수종 세포의 특성을 함유하는 융합 세포는, 2개의 모세포들은 사멸시키고 융합 생성물만을 생존 및 성장시키는 배지인 HAT 배지에서 성장시켜 분리한다.

<174> 본 발명의 모노클로날 항체는 숙주가 항체에 대한 면역 반응을 일으키지 않도록 "사람화된" 것일 수 있다. "사람화된 항체"는, 상보성 결정 영역(CDR) 및/또는 경쇄 및/또는 중쇄의 가변성 도메인 골격의 다른 부분은 비사람의 면역글로불린에서 유래한 것이지만 당해 분자의 나머지 부분은 한 종 이상의 사람 면역글로불린에서 유래한 것이다. 또한, 사람화된 항체로는 공여체 또는 수용체의 비변형된 경쇄 또는 키메라 경쇄와 결합된 사람화된 중쇄를 특징으로 하는 항체 또는 그 반대의 항체를 포함한다. 항체의 사람화는 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다[예컨대, G.E. Mark and E.A. Padlan, "Chapter 4. Humanization of Monoclonal Antibodies", The Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113, Springer-Verlag, New York, 1994]. 또한, 형질전환된 동물을 사용하여 사람화된 항체를 발현시킬 수 있다.

<175> 당해 기술 분야에 공지된 단일쇄 항체를 생산하는 기법을 변형시켜 본 발명의 면역원성 폴리펩타이드 및 단백질에 대한 단일쇄 항체를 생산할 수 있다.

<176> 바람직한 구체적인 예에서, 환자 중에서 LIPG에 결합하여 LIPG의 효소적 활성을 억제하기 위해 항LIPG 항체가 사용된다.

<177> 또한, 항LIPG 항체는 LIPG의 수준을 측정 또는 정량하는 분석법에 유용하다. 한 가지 구체적인 예로서, 이 분석법은 다양한 질환 상태하에서의 LIPG의 임상적 진단 및 평가 방법, 및 치료 효능을 모니터링하는 방법에 사용할 수 있다. 또한, 이 항LIPG 항체는 HDL 콜레스테롤 및 아포지단백질 AI의 저하된 수준에 대한 추가의 민감성을 예측하기 위하여 조직 시료내의 LIPG를 정량하는 방법에 추가로 사용할 수 있다.

**<178> 억제성 분자 및 인핸서 분자를 동정 및 이용하는 방법**

<179> 본 발명은 LIPG 활성의 단백질성 공동활성제 또는 억제제(길항제)를 비롯한 인핸서(효능제) 또는 공동활성제의 천연 생성물인 또는 소분자 라이브러리를 선별하는 방법을 제공한다. 잠재적 인핸서 또는 억제제를 LIPG 단백질 및 LIPG의 기질과 접촉시키고, LIPG 활성을 증강 또는 억제하는 잠재적 인핸서 또는 억제제의 능력을 측정한다.

<180> 또한, 이러한 선별 방법은 화합물이 기질 특이적 인핸서 또는 억제제로서 작용할 수 있는지, 즉 화합물이 한 기질에 대한 LIPG의 효소적 활성을 증강시킬 수 있으면서 다른 기질에 대한 일정 수준의 효소적 활성을 저하시키거나 유지시킬 수 있는지를 측정하는데 사용할 수 있으며, 예컨대, 본 발명의 LIPG 폴리펩타이드는 기질로서 HDL 콜레스테롤을 이용하고, 또한 기질로서 LDL 콜레스테롤 및 VLDL 콜레스테롤을 이용한다. 일부 구체적인 예

에서는, HDL 콜레스테롤에 대한 정상 수준의 효소 활성은 유지하거나 저하시키면서 LDL 콜레스테롤 또는 VLDL 콜레스테롤에 대한 LIPG 폴리펩타이드의 효소 활성은 증강시키는 기질 특이적 인헨서 또는 억제제를 분리 및 동정하는 것이 바람직할 수 있다.

- <181> 이러한 방법에 사용되는 LIPG 단백질은 포유동물 세포, 바콜로바이러스에 감염된 곤충 세포, 효모 및 세균을 비롯한 다양한 숙주 세포에서 재조합 방법으로 생산될 수 있다. 안정하게 형질감염된 CHO 세포에서의 LIPG 발현은 이 세포의 메토티렉세이트 증폭을 통해 최적화될 수 있다. 또한, LIPG 단백질은 사람 혈장, 태반 추출물 또는 내피 세포, THP-1 세포 또는 대식세포 배양물 유래의 조건 배지와 같은 천연원으로부터 정제할 수 있다.
- <182> 분석의 변수, 예컨대 pH, 이온 농도, 온도, 기질의 농도 및 유화 조건 등은 당업자라면 경험적으로 최적화할 수 있다.
- <183> 기질의 지방산 치환체는 불포화도 및 불포화 위치 뿐만 아니라 쇠의 길이도 다양할 수 있다. 이 기질은 여러 위치 중 임의의 위치에서 방사능표지될 수 있다. 포스파티딜콜린과 같은 인지질 기질은 예컨대 Sn-1 또는 Sn-2 지방산 위치, 또는 글리세롤, 인산염 또는 극성 헤드 그룹(포스파티딜콜린의 경우에는 콜린)에서 방사능표지될 수 있다.
- <184> 방사능표지된 기질에 대한 대안적인 예로서, 형광성 기질 또는 티오 함유 기질과 같은 다른 부류의 표지된 기질을 선별 방법에 사용할 수도 있다.
- <185> 형광성 기질은 기질로부터 생성물을 물리적 분리(추출)함이 없이 형광 강도를 측정하여 효소의 촉매작용을 연속적으로 측정할 수 있기 때문에 선별 분석법에 특히 유용하다. 형광성 포스파티딜콜린 기질의 예로는 C<sub>6</sub>NBD-PC{1-아실-2-[6-(니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]카프로일포스파티딜콜린}이 있다.
- <186> 티오 함유 기질로는, 1,2-비스(헥사노일티오)-1,2-디테옥시-sn-글리세로-3-포스포릴콜린이 있다[L.J. Reynolds, W.N. Washburn, R.A. Deems, and E.A. Dennis, 1991. *Methods in Enzymology* 197:3-23; L. Yu and E.A. Dennis, 1991. *Methods in Enzymology* 197: 65-75; L.A. Wittenauer, K. Shirai, R.L. Jackson, and J.D. Johnson, 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118:894-901].
- <187> 효소 활성 수준에서 작동하는 억제성 분자 및 인헨서 분자 외에도, LIPG 유전자의 발현 수준에서 작동하는 억제성 분자 및 인헨서 분자가 있다. LIPG의 발현을 증강 또는 억제할 수 있는 화합물을 동정하는 한 가지 방법은 리포터 유전자 시스템을 사용하는 것이다. 이 시스템은 쉽게 검출 및 정량될 수 있는 "리포터 유전자"의 상류에 소정의 프로모터가 클로닝될 수 있는 클로닝 부위를 포함하는 리포터 유전자 발현 벡터를 이용한다. 당업자라면, LIPG 유전자의 프로모터 뿐만 아니라 다른 조절 서열도 용이하게 동정하여 시판되는 리포터 유전자 발현 벡터에 서브클로닝할 수 있을 것이다. 이 발현 벡터를 숙주 세포로 전달시키고, 이 세포를 시험 화합물(추정상의 억제제 또는 인헨서 분자)에 노출시켜 리포터 유전자 생성물의 발현에 미치는 시험 화합물의 효과를 측정한다. 구체적으로, 리포터 mRNA의 양, 리포터 단백질 양 또는 리포터 단백질의 효소적 활성을 직접 측정하여 리포터 유전자 생성물의 존재에 대하여 세포를 분석한다. 리포터 유전자는 목적하는 세포 유형내에서 내인성으로 발현되지 않으며 민감한 정량적 신속 분석법에 제공되는 것이 이상적이다. 다양한 리포터 분석 작제물이 시판중이고, 여러 종류의 리포터 유전자와 분석법이 개발되어 있으며, 또한 당업자라면 용이하게 제조할 수도 있다. 진핵 세포내의 유전자 활성을 모니터할 수 있는 가장 일반적인 시스템으로는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), β-갈락토시다제, 개똥벌레 루시페라제, 성장 호르몬(GH), β-글루쿠로루다제(GUS), 알칼리성 포스파타제(AP), 녹색 형광성 단백질(GFP) 및 레닐라(Renilla) 루시페라제가 있다. 리포터 분석 작제물은 프로메가 및 인비트로젠 등의 다양한 공급처로부터 구입할 수 있다.
- <188> 전술한 바와 같이, 리포터 유전자 활성은 리포터 mRNA 또는 리포터 단백질을 분석하여 측정할 수 있다. 리포터 mRNA는 노던 블롯 분석, 리보뉴클레아제 보호 분석 또는 RT-PCR로 측정할 수 있다. 이 분석법들은 단백질 발현의 측정법 보다 더 직접적인 방법이다. 이에 반해, 세포내에 존재하는 mRNA 보다는 리포터 단백질의 존재를 측정하기 위하여 많은 분석법들이 개발되었다. 리포터 단백질은 분광분석법 또는 효소적 활성을 측정하여 분석할 수 있다. 리포터 단백질의 수준은 또한 항체에 근거한 분석법으로 측정할 수 있다. 일반적으로, 효소적 분석은 매우 민감하여 리포터 유전자 발현을 모니터하기 위한 바람직한 방법이다.
- <189> **조성물**
- <190> 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드, 핵산, 벡터 및 항체를 포함하는 조성물을 생물학적 적합성(생체적합성) 용액으로 제공한다. 생물학적 적합성 용액은 본 발명의 폴리펩타이드, 핵산, 벡터 또는 항체가 활성 형태, 예컨대

생물학적 활성을 나타낼 수 있는 형태로 유지되는 용액이다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드는 포스포리파제 활성을 갖고 있어야 하고, 핵산은 복제하거나, 메시지를 해독하거나 또는 상보성 핵산에 하이브리드화할 수 있어야 하며, 벡터는 표적 세포를 형질감염시킬 수 있어야 하고, 항체는 본 발명의 폴리펩타이드에 결합할 수 있어야 한다. 일반적으로, 이러한 생물학적 적합성 용액은 염이온을 함유하는 수성 완충액, 예컨대 트리스(Tris), 인산염 또는 HEPES 완충액이다. 통상, 염이온의 농도는 생리적 수준과 유사하다. 특정한 구체적인 예에서, 생체적합성 용액은 약제학적으로 허용되는 조성물이다. 생물학적 적합성 용액은 안정화제 및 방부제를 포함할 수 있다.

<191> 이러한 조성물은 국소, 경구, 비경구, 비내, 경피 및 안내 경로로 투여할 수 있도록 조제될 수 있다. 비경구 투여란 정맥내 주사, 근육내 주사, 동맥내 주사 또는 주입 기법 등을 의미하는 것이다. 조성물은 필요한 경우 공지된 표준 비독성 생리학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 단위 용량의 제제로 비경구적으로 투여될 수 있다.

<192> 바람직한 멸균 주사제는 비독성의 비경구적으로 허용되는 용매 또는 희석제 중의 용액 또는 현탁액일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예로는 식염수, 완충 식염수, 등장성 식염수(예, 인산이나트륨 또는 인산이나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 또는 염화마그네슘 또는 이 염들의 혼합물), 링거액, 텍스트로스, 물, 멸균수, 글리세롤, 에탄올 및 이의 배합물이 있다. 1,3-부탄디올 및 멸균된 비휘발성 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 편리하게 이용되고 있다. 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 비롯하여 모든 상표명의 비휘발성 오일을 사용할 수 있다. 올레산과 같은 지방산 또한 주사제의 제조에 유용하다.

<193> 또한, 조성물의 매질은 임의의 생체적합성 또는 비세포독성의 (호모 또는 헤테로) 중합체, 예컨대 약물 흡수 스폰지로서 작용할 수 있는 친수성 폴리아크릴산 중합체로부터 제조되는 하이드로겔일 수 있다. 이러한 중합체에 대해서는 예컨대 출원[WO 제93/08845호, 이의 전체 내용은 본 발명에 참고로 인용됨]에 개시되어 있다. 이 중 일부, 예컨대 특히 산화에틸렌 및/또는 산화프로필렌으로부터 수득되는 중합체는 시판되고 있다. 하이드로겔은 예컨대 외과적 처치 동안 치료할 조직의 표면 상에 직접 침착할 수 있다.

<194> 본 발명의 다른 바람직한 구체적인 예는 복제 결손형 재조합 바이러스 및 폴록사머를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 복제 결손형 재조합 바이러스와 폴록사머를 함유하는 조성물에 관한 것이다. 바람직한 폴록사머는 시판(제조원: BASF, Parsippany, NJ)되고, 비독성의 생체적합성 폴리올이며 가장 바람직한 것은 Poloxamer 407이다. 재조합 바이러스로 함유된 폴록사머는 예컨대 외과적 처치 동안 치료되는 조직의 표면 상에 직접 침착될 수 있다. 폴록사머는 점도가 더 낮으면서 하이드로겔과 거의 동일한 잇점을 제공한다.

<195> **치료 방법**

<196> 본 발명은 사람 또는 다른 동물에게 본 발명에 개시된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다.

<197> 유효량은 연령, 치료해야 하는 질환의 종류 및 정도, 체중, 원하는 치료 기간, 투여 방법 및 다른 변수에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 주치의 또는 자격이 있는 다른 의사가 결정한다. 대부분 투여량은 원하는 수준의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI가 달성된 뒤 유지될 수 있도록 조정할 수 있다. 이와 마찬가지로, 투여량은 VLDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 수준을 허용되는 수준으로 낮추고 HDL 콜레스테롤 대 LDL 콜레스테롤과 VLDL 콜레스테롤의 비가 원하는 수준의 범위가 되도록 조정할 수 있다.

<198> 본 발명에 개시된 폴리펩타이드는 일반적으로 1일당 약 0.01mg/kg(체중) 내지 약 100mg/kg, 바람직하게는 약 0.1mg/kg 내지 약 50mg/kg, 가장 바람직하게는 약 1mg/kg 내지 약 10mg/kg의 투여량으로 투여한다.

<199> 본 발명에 개시된 중화 항체는 환약으로만 전달하거나 일정 시간 동안 주입하거나 또는 환약과 일정 시간 동안의 주입액으로서 투여할 수 있다. 투여량이 전술한 변수에 따라 달라지기는 하지만, 항체의 결합성에 기초해 보면 환약으로서 0.2 내지 0.6mg/kg의 투여량을 제공한 다음 2 내지 12시간의 주입 시간 동안 투여할 수 있다. 또는, 복수의 환약 주사를 필요하다면 격일 또는 3일마다 또는 4일마다 투여할 수도 있다. 투여량은 HDL 콜레스테롤 수준 및/또는 VLDL과 LDL 콜레스테롤의 수준에 따라 조정할 수 있다.

<200> 전술한 바와 같이, 재조합 바이러스는 LIPG 및 LIPG의 서브단편을 암호화하는 DNA와 안티센스 핵산을 도입시키는데 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 재조합 바이러스는 일반적으로 약  $10^4$  내지 약  $10^{14}$  pfu의 투여량 형태로 조제하여 투여한다. AAV 및 아데노바이러스의 경우에 약  $10^6$  내지 약  $10^{11}$  pfu의 투여량을 사용하는 것이 바람직

하다. pfu("플라크 형성 단위")란 용어는 비리온 현탁액의 감염력에 해당하는 것으로, 적당한 세포 배양물을 감염시킨 뒤 형성된 플라크의 수를 측정하여 결정한다. 바이러스 용액의 pfu 역가를 측정하는 기법은 종래 기술에 잘 설명되어 있다.

<201> 본 발명에 개시된 리보자임은 약제학적으로 허용되는 담체 중에 약 5 내지 약 50mg/kg/일 범위의 양으로 투여할 수 있다. 투여량은 측정되는 치료 효능에 따라 조절할 수 있다.

<202> 억제성 분자 또는 인핸서 분자의 적당한 수준은 자격이 있는 의사라면 전술한 변수를 사용하여 결정할 수 있다.

<203> 본 발명은 환자 중의 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 증가시키고 VLDL 및 LDL 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 LIPG 폴리펩타이드 활성이 비정상적으로 높게 발현되어 지질 프로파일 바람직하지 않은 사람 또는 다른 동물을 치료하는 방법을 제공한다.

<204> **LIPG 폴리펩타이드 활성 수준을 저하시키는 방법 및 조성물**

<205> HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 증가시키고 LIPG 폴리펩타이드 활성으로 인하여 바람직하지 않은 지질 프로파일과 관련된 질병 또는 질환을 일으키는 상태를 치료하기 위하여 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 감소시키는 방법으로는, 안티센스 핵산을 함유하는 조성물의 투여 방법, 항체와 같은 세포내 결합 단백질을 함유하는 조성물의 투여 방법, LIPG의 효소적 활성을 억제하는 억제 분자, 예컨대 LLGN 폴리펩타이드 또는 소분자량의 분자와 같은 LIPG의 서브단편을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 조성물의 투여 방법, 예컨대 전사, 해독 또는 해독후 단계에서 LIPG 발현을 하향 조절하는 소분자량의 화합물의 투여 방법 및 LIPG를 암호화하는 mRNA를 절단하는 리보자임의 투여 방법이 있지만 이에 제한되지 않는다.

<206> **안티센스 핵산을 이용하는 방법**

<207> 한 가지 구체적인 예로서, 안티센스 핵산을 함유하는 조성물을 사용하여 LIPG의 발현을 차단하거나 하향 조절한다. 바람직한 한 가지 구체적인 예에서, 이 핵산은 안티센스 RNA 분자를 암호화한다. 이러한 구체적인 예에 있어서, 핵산은 이 핵산 서열을 발현시킬 수 있는 시그널에 작동가능하게 결합되어 있고, 바람직하게는 재조합 벡터 작제물을 이용하여 세포로 도입시키며, 상기 벡터 작제물은 이 벡터가 세포내로 도입되었을 때 안티센스 핵산을 발현하는 것이다. 적합한 벡터의 예로는 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스, 레트로바이러스 및 헤르페스바이러스가 있다. 벡터는 아데노바이러스인 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, 벡터가 바이러스의 E1 및/또는 E3 영역에 결실을 함유하는 복제 결손형 아데노바이러스이다.

<208> 또 다른 구체적인 예에서는 안티센스 핵산이 합성된 뒤, 전술한 바와 같이 세포내 뉴클레아제에 의한 분해에 내성이 생기도록 화학적으로 변형시킬 수 있다. 합성된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 리포솜을 사용하여 세포로 도입시킬 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 리포솜내에 캡슐화되면 세포에 흡수된다. 유효 전달 시스템을 사용하면 표적 mRNA의 해독을 억제하기 위하여 비독성의 안티센스 분자를 저농도로 사용할 수 있다. 또한, 세포 특이적 결합 부위에 접합된 리포솜은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 특정 조직으로 유도한다.

<209> **중화 항체 및 다른 결합 단백질을 이용하는 방법**

<210> 또 다른 구체적인 예에서는, LIPG의 발현이 LIPG와 선택적으로 상호작용할 수 있는 세포내 결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 발현시키므로써 차단되거나 하향 조절된다. 본 발명에 참고로 인용되는 문헌[WO 제94/29446호 및 WO 제94/02610호]는 세포내 결합 단백질을 암호화하는 유전자를 이용한 세포의 형질감염에 대하여 개시하고 있다. 세포내 결합 단백질로는 이것이 발현되는 세포내에서 LIPG와 선택적으로 상호작용하거나 결합하여 결합된 LLG의 기능을 중화시킬 수 있는 모든 단백질을 포함한다. 세포내 결합 단백질은 중화 항체 또는 중화 항체의 단편인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 세포내 결합 단백질은 단일쇄 항체인 것이다.

<211> 문헌[WO 94/02610호]는 항체의 제조 방법 및 특정 항체를 암호화하는 핵산의 동정 방법을 개시한다. 따라서, 특정 모노클로날 항체는 LIPG 또는 이의 단편을 사용하여 당해 기술 분야에 공지된 기법으로 제조한다. 그 다음, 세포내 결합 단백질 또는 이의 일부를 암호화하고 숙주 세포내에서 발현할 수 있는 핵산을 함유하는 벡터를 제조하여 본 발명의 방법에 사용한다.

<212> 또는, 중화 항체를 순환계중으로 투여하면 LIPG 활성을 차단시킬 수 있다. 이러한 중화 항체는 단백질로서 직접 투여하거나, 또는 벡터(분비 시그널 보유)로부터 발현될 수 있다.

<213> **LIPG의 효소적 활성을 억제하는 억제성 분자를 이용하는 방법**

<214> 다른 구체적인 예에서는 LIPG 폴리펩타이드의 서브단편, 예컨대 LLGN을 함유하는 조성물을 투여하여 LIPG 활성을 억제시킨다. 이 조성물은 경구, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 비내 또는 피부내 경로와 같은 편리한 방법으로 투여할 수 있다. 이 조성물은 직접 투여하거나 캡슐화(예컨대, 지질 시스템 중에, 아미노산 미소구 중에 또는 구형 덴드리머(dendrimer) 중에)할 수 있다. 일부 경우에, 상기 폴리펩타이드는 혈청 알부민 또는 폴리비닐 피롤리돈과 같은 다른 중합체에 부착시킬 수도 있다.

<215> 또 다른 구체적인 예에서, LIPG 활성은 유전자 요법의 사용을 통해 억제되는데, 즉 LIPG의 서브단편, 예컨대 LLGN을 암호화하고 그 발현을 유도하는 핵산을 포함하는 조성물을 투여함으로써 억제된다.

<216> 또 다른 구체적인 예에서, LIPG 활성은 억제성 분자를 사용함으로써 억제된다. 이러한 저분자량의 화합물은 LIPG의 효소적 성질을 방해하거나 세포 결합 부위를 적절하게 인식하지 못하도록 한다.

<217> 특정 구체적인 예에 있어서, 본 발명의 LIPG 폴리펩타이드는 또한 hepatin에 대한 친화성을 갖고 있다. 따라서, LIPG 폴리펩타이드는 혈관의 강내에 있는 세포외 hepatin에 결합할 수 있고, LDL과 세포외 hepatin 사이의 브릿지로서 작용하여 LDL 흡수를 가속화시킨다. 죽상동맥경화증 병변부의 국소 영역에서는 리파제 활성의 수준이 증가하여 죽상 유발의 과정을 가속화시키는 것으로 추정되고 있다 [Zilversmit, D.B. (1995) Clin. Chem. 41, 153-158; Zambon, A., Torres, A., Bijvoet, S., Gagne, C., Moojani, S., Lupien, P.J., Hayden M.R., and Brunzell, J.D. (1993) Lancet 341, 1119-1121]. 이것은 리파제를 매개로 한 혈관 조직에 대한 지단백질의 결합 및 흡수가 증가한 때문일 수 있다[Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. Vlodavsky, I. (1992) J. Clin. Invest. 90, 2013-2021; Tabas, I., Li, I., Brocia R.W., Xu, S.W., Swenson T.L. Williams, K.J. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20419-20432; Nordestgaard, B.G. and Nielsen, A.G. (1994) Curr. Opin. Lipid. 5, 252-257; Williams, K.J., and Tabas, I. (1995) Art. Thromb. and Vasc. Biol. 15, 551-561]. 또한, 국소적인 고수준의 리파제 활성은 죽상동맥경화증 병변부의 전구물질 중에 생성되는 지방산과 리소포스파티딜콜린을 세포독성 수준으로 유도할 수 있다. 이러한 LLG의 특정 활성은 특히 식이성 또는 유전적 요인으로 인한 과도한 지질 수준을 피검체 중에 제공하여 죽상동맥경화증을 발생 또는 진행시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 억제하거나 지단백질(예, LDL)에 대한 결합을 억제하여 지단백질 축적을 억제시킬 수 있다.

<218> **LIPG 유전자 발현을 차단하는 억제성 분자를 이용하는 방법**

<219> 또 다른 구체적인 예에서, 소분자량의 화합물을 비롯한 억제성 분자는 전사, 해독 또는 해독후 단계에서 LIPG 발현을 하향 조절할 수 있다. 이러한 억제성 분자를 동정하기 위해서는 전술한 리포터 유전자 시스템을 사용할 수 있다. 이 억제성 분자는 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합되어 당해 기술 분야에 공지된 통상의 방법에 따라 투여될 수 있다.

<220> **리보자임을 이용하는 방법**

<221> 리보자임은 리포솜내 캡슐화, 이온전기도입, 하이드로겔, 사이클로덱스트린, 생체분해성 나노캡슐 및 생체접착성 미소구 내로의 도입, 또는 전술한 기타 다른 다양한 방법을 통해 세포에 투여할 수 있다. 리보자임은 직접 주사하거나 또는 카테테르, 주입 펌프 또는 스텐트를 사용하여 표적 조직으로 전달할 수도 있다. 또 다른 전달 경로로는 정맥내 주사, 근육내 주사, 경피 주사, 에어로졸 흡입, 경구(정제 또는 환제 형태), 국소, 전신, 경안, 복강내 및/또는 척수강내 전달이 있다.

<222> 바람직한 구체적인 예로서, 리보자임 암호화 서열을 DNA 발현 벡터에 클로닝한다. 리보자임 서열의 전사는 진행의 RNA 폴리머라제 II(pol II) 또는 RNA 폴리머라제 III(pol III) 프로모터에 의해 유도된다. 발현 벡터는 전술한 아데노바이러스 또는 아데노관련 바이러스 벡터와 같은 바이러스 DNA 벡터를 비롯하여 다양한 벡터에 도입시킬 수 있다.

<223> 본 발명의 바람직한 구체적인 예에 있어서, LIPG RNA를 절단하는 리보자임을 발현하는 전사 유니트는 아데노바이러스 DNA 바이러스 벡터에 삽입된다. 이 벡터는 재조합 바이러스 입자로서 전달되고 카테터, 스텐트 또는 주입 펌프를 통해 치료 부위로 국소 투여된다.

<224> **아포지단백질 AI의 투여**

- <225> 또 다른 구체적인 예에서, 전술한 LIPG 폴리펩타이드 활성 수준을 저하시키는 방법은 아포지단백질 AI 또는 환자 중에서 아포지단백질 AI를 발현시킬 수 있는 발현 시스템의 투여와 함께 사용된다[예컨대, 본 명세서에 참조로 인용되는 미국 특허 제5,866,551호 참조].
- <226> **LIPG 폴리펩타이드 활성 수준을 증가시키는 방법 및 조성물**
- <227> VLDL 및 LDL 콜레스테롤의 수준을 저하시키기 위하여 LIPG 폴리펩타이드의 발현 또는 활성을 증가시키는 방법으로는 LIPG 폴리펩타이드를 함유하는 조성물의 투여, LIPG 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 벡터를 함유하는 조성물의 투여, LIPG 폴리펩타이드의 효소적 활성을 증가시키는 인헨서 분자를 함유하는 조성물의 투여 및 LIPG 유전자의 발현을 증가시키는 인헨서 분자의 투여를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <228> **LIPG 폴리펩타이드를 이용하는 방법**
- <229> 한 가지 구체적인 예에서, LIPG 활성 수준은 LIPG 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 투여를 통해 증가된다. 이 조성물은 경구, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 비내 또는 피부내 경로 등과 같은 통상의 방법으로 투여할 수 있다. 조성물은 직접 투여되거나 또는 캡슐화될 수 있다(예, 지질 시스템 중에, 아미노산 미소구 중에 또는 구형 덴드리머 중에). 몇몇 경우에, 폴리펩타이드는 혈청 알부민 또는 폴리비닐 피롤리돈과 같은 다른 중합체에 부착시킬 수도 있다.
- <230> **LIPG를 발현하는 벡터를 이용하는 방법**
- <231> 다른 구체적인 예에서, LIPG의 수준은 유전자 요법의 사용을 통해, 즉 LIPG 폴리펩타이드를 암호화하고 그 발현을 지시하는 핵산을 함유하는 조성물의 투여를 통해 증가된다. 이러한 양태에서, LIPG 폴리펩타이드는 적당한 발현 벡터에 클로닝된다. 사용 가능한 벡터 시스템과 프로모터에 대해서는 충분히 전술한 바와 같다. 발현 벡터는 전술한 벡터 전달 시스템 중 하나를 사용하여 표적 조직으로 전달시킨다. 이러한 전달은 실험실에서 핵산을 세포로 전달한 뒤 변형된 세포를 사람 또는 다른 동물에게 투여하는 생체외적 방법이나 또는 핵산을 사람이나 기타 동물내의 세포로 직접 전달하는 생체내적 방법을 통해 실시한다. 바람직한 구체적인 예로서, 발현 벡터의 전달에 아데노바이러스 벡터 시스템을 사용하는 것이 좋다. 필요하다면, 전술한 발현 벡터에 조직 특이적 프로모터가 사용되기도 한다.
- <232> 비바이러스 벡터는 인산칼슘 동시침전법, 리포펙션법(합성 음이온 및 양이온 리포솜), 수용체 매개의 유전자 전달법, 나출 DNA 주사법, 전기천공법 및 생체탄도성 또는 입자 가속화를 비롯한 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 세포로 전달할 수 있다.
- <233> **LIPG의 효소적 활성을 증가시키는 인헨서 분자를 이용하는 방법**
- <234> 또 다른 구체적인 예에서, LIPG의 활성은 LIPG의 효소적 활성을 증가시키거나 세포 결합 부위에 대한 적절한 인식을 증가시키는 인헨서 분자에 의해 증가된다. 이 인헨서 분자는 폴리펩타이드의 투여에 대하여 전술한 바와 같은 방법으로 도입시킬 수 있다.
- <235> **LIPG 유전자 발현을 증가시키는 인헨서 분자를 이용하는 방법**
- <236> 또 다른 구체적인 예에서, LIPG의 수준은 전사, 해독 또는 해독후 단계에서 LIPG 발현을 상향 조절할 수 있는 소분자량의 화합물의 사용을 통해 증가된다. 이 화합물은 폴리펩타이드의 투여에 대하여 전술한 바와 같은 방법에 의해 투여될 수 있다.
- <237> **손상된 담즙 분비와 연관된 치료 방법**
- <238> 간내 담즙울체(cholestasis)는 혈청 콜레스테롤 및 인지질 수준의 증가를 특징적으로 나타낼 수 있다. 최근 발표된 팔로이딘 약물 유도성 간내 담즙울체 래트 모델은 콜레스테롤과 인지질의 혈청 수준이 상당히 증가한다는 것을 입증하였다[Ishizaki, K., Kinbara, S., Miyazawa, N., Takeuchi, Y., Hirabayashi, N., Kasai, H., and Araki, T.(1997) Toxicol. Letters 90, 29-34]. 본 발명의 생성물은 혈청 콜레스테롤 및/또는 인지질이 증가된

환자의 간내 담즙울체를 치료하는데 사용할 수 있다. 또한, 이 래트 모델은 담즙 콜레스테롤 분비 속도의 상당한 감소를 보여주었다. 본 발명의 LIPG 폴리펩타이드 및 핵산 생성물은 손상된 담즙 분비계를 가진 환자를 치료하는데 사용할 수 있다.

<239> 간내 담즙울체는 또한 간으로부터 담즙 공급의 손상을 특징으로 나타낸다. 최근, 진행성 가족성 간내 담즙울체 (PFIC 또는 바일러(Byler)병) 및 양성 재발성 간내 담즙울체(BRIC)의 유전자 좌위는 18q21-q22로 맵핑되었다[각각 Carlton, V.E.H., Knisely, A.S., and Freimer, N.B. (1995) Hum. Mol. Genet. 4, 1049-1053; and Houwen, R.H., Baharloo, S., Blankenship, K., Raeymaekers, P., Juyn, J., Sandkuiji, L.A., and Freimer, N.B. (1994) Nature Genet. 8, 380-386]. 따라서, LLG 유전자가 18q21의 염색체 영역에서 맵핑되면, 본 발명의 LLG 유전자 또는 생성물은 PFIC/BRIC 질환 유전자의 돌연변이 또는 결손 발현으로 유발되는 간내 담즙울체를 앓고 있는 환자를 치료하는데 사용할 수 있다.

<240> 또 다른 구체적인 예에서, 본 발명의 LLG 유전자 또는 폴리펩타이드 생성물은 18q21-q22의 PFIC/BRIC 질환 유전자 중의 결손 때문이 아닌 간내 담즙울체를 앓고 있는 환자를 치료하는데에도 사용할 수 있다. 최근 연구에서는 18q21-q22 영역의 외측에 위치한 다른 유전자 좌위도 PFIC 표현형을 나타낼 수 있다는 것을 암시하였다 [Strautnieks, S.S., Kagalwalla, A.F., Tanner, M.S., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1996) J. Med. Genet. 33, 833-836]. 그럼에도 불구하고, LLG 폴리펩타이드의 직접 투여 또는 유전자 요법을 통한 투여는 이러한 형태의 질환을 경감시킬 수 있다.

<241> **저 HDL 수준에 대한 소질을 진단하는 방법 및 조성물**

<242> LIPG 폴리펩타이드가 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 수준을 저하시키는 능력이 있다면, 체내의 LIPG 폴리펩타이드의 수준을 이용하여 HDL 콜레스테롤과 아포지단백질 AI의 낮은 수준에 대한 소질이 있는 환자를 측정할 수 있다. 당해 방법에서, 먼저 환자로부터 조직 시료를 채취한다. 이 조직 시료는 혈액이거나 하기 실시예를 통해 설명되고 있는 바와 같은 LIPG를 발현시키는 것으로 입증된 조직 중 하나일 수 있다. LIPG 수준의 측정은 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 바람직한 구체적인 예로서, LIPG 폴리펩타이드에 대하여 유발된 항체를 사용하여 조직 시료 중의 LIPG의 수준을 측정할 수 있다.

**실시예**

<243> 다음 실시예는 본 발명을 예시한 것이다. 이 실시예는 단지 설명을 위한 것으로, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

<244> 실시예 1 - 차동 발현되는 cDNA의 확인

<245> RNA 제조

<246> 사람 단핵구 THP-1 세포[Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H. Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Anal. Biochem. 150, 76-85]는 25mM HEPES, 10% 태내 송아지 혈청, 100 단위/ml 페니실린 G 나트륨 및 100 단위/ml 스트렙토마이신 황산염을 함유하는 RPMI-1640 배지(제조원: GIBCO)에서 배양하였다. 세포를 15cm 조직 배양 접시에 1.5 x 10<sup>7</sup>개 세포/플레이트의 농도로 접종하고, 세포 분화를 유도하기 위하여 40ng/ml 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(제조원: Sigma)로 48 시간 동안 처리하였다. 사람 저밀도 지단백질(LDL)은 제조원(Calbiochem)에서 구입하고, 4℃에서 PBS에 대하여 철저히 투석하였다. 그 다음, LDL을 500µg/ml로 희석하고 PBS 중의 5µM CuSO<sub>4</sub>에 대하여 37℃에서 16시간 동안 투석하였다. 산화를 정지시키기 위하여, LDL을 150mM NaCl, 0.3mM EDTA에 대하여 철저히 투석한 다음, 여과 살균하였다. 단백질 농도는 BCA법[Schuh, J. Fairclough, G.F., and Haschemeyer, R.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3173-3177](제조원: Pierce)으로 측정하였다. 산화도는 TBARS[Chomczynski, P. (1993) Biotechniques 15, 532-537]로 측정된 결과 25 내지 30 nmol MDA 당량/mg 단백질 사이였다. 분화된 THP-1 세포는 10% 지단백질 결손형 태내 송아지 혈청(제조원: Sigma)을 부가한 RPMI 배지 중의 50µg/ml 산화된 LDL 또는 NaCl-EDTA 완충액에 24시간 동안 노출시켰다. RNA를 수거하기 위하여 플레이트를 PBS 10ml로 세정한 뒤, 각 플레이트에 트리졸(TRIZOL)[Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Science 257, 967-971](제조원: GIBCO) 14ml를 부가하였다. 이 용액을 수회 피펫팅하여 혼합한 뒤, 동일 시료를 원심분리 튜브에 보관한 뒤 플레이트 당 클로로포름 3ml를 부가하고 혼합하였다. 튜브는 12000 x g에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 새 튜브로 옮기고, 플레이트 당 이소프로판올 7.5ml를 부가하고 혼합하였다. 이 튜브를 다시 12000 x g에서 20분 동안 원심분리하였다. 펠릿을 냉각된 70% 에탄올로 세정하고 실온에서

건조시켰다. 펠릿을 500 $\mu$ l TE(트리스-EDTA)에 현탁시키고 RNase 제거된 DNaseI 200 단위와 RNasin 태반 RNase 억제제(제조원: Promega) 200 단위로 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 처리하였다. RNA는 페놀, 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:24:1) 및 클로로포름/이소아밀 알콜(24:1)로 연속 추출한 뒤, 에탄올 침전시켜 정제하였다.

<247>

cDNA 합성

<248>

cDNA 합성 및 PCR 증폭은 차동 디스플레이 키트(Differential Display Kit, 버전 1.0, 제조원: Display Systems Biotechnology, Inc.)의 프로토콜을 사용하여 실시하였다. 이 시스템은 본래 리양과 파디[Mead, D.A., Pey, N.K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A., and Smith, L.M., (1991) Bio/Technology 9, 657-663]가 개시한 기법을 기초로 한 것이다. 리파제 유사 유전자의 제1 정보를 함유하는 cDNA 단편을 생성하는 프라이머 쌍은 하류 프라이머 7과 상류 프라이머 15였다. 증폭시키기 위한 cDNA는 완충액 또는 산화된 LDL에 노출시킨 PMA 처리된 THP-1 세포 유래의 RNA를 사용하여 다음과 같이 합성하였다: 25  $\mu$ M 하류 프라이머 7의 3 $\mu$ l와 디에틸피로카보네이트(DEPC)-처리된 물 7.5 $\mu$ l을 상기 어느 하나의 THP-1 RNA 시료 유래의 RNA 300ng(3.0 $\mu$ l)에 추가하였다. 이것을 70 $^{\circ}$ C로 10분 동안 가열한 뒤 빙상에서 냉각시켰다. 이 튜브에 5x PCR 완충액(250mM 트리스-HCl, pH 8.3, 375mM KCl)(제조원: GIBCO) 3 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ l, 0.1M DTT 3 $\mu$ l, 500  $\mu$ M dNTP 1.2 $\mu$ l, RNasin 0.7 $\mu$ l 및 DEPC 처리된 물 5.6 $\mu$ l를 추가하였다. 이 튜브를 실온에서 2분 동안 항온처리한 뒤, 슈퍼스크립트 II RNase H- 역전사효소(제조원: GIBCO) 1.5 $\mu$ l(300 단위)를 추가하였다. 이 튜브를 실온에서 2분, 37 $^{\circ}$ C에서 60분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 연속 항온처리한 뒤 빙상에서 냉각시켰다. PCR 증폭은 10x PCR 완충액(500mM KCl, 100mM 트리스-HCl pH 8.3, 15mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.01%(w/v) 젤라틴) 117 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 70.2 $\mu$ l,  $\alpha$ -<sup>33</sup>P dATP(10m Ci/ml, 제조원: DuPont NEN) 5.9 $\mu$ l, 500  $\mu$ M dNTP 혼합물 4.7 $\mu$ l, AmpliTaq DNA 폴리머라제(5 단위/ $\mu$ l, 제조원: Perkin-Elmer) 11 $\mu$ l 및 DEPC 처리된 물 493.3 $\mu$ l를 함유하는 주 혼합물을 사용하여 실시하였다. 각 반응마다 주 혼합물 12 $\mu$ l를 하류 프라이머 #7 2 $\mu$ l, cDNA 1 $\mu$ l 및 상류 프라이머 #15 5 $\mu$ l에 추가하였다. 이 반응 혼합물을 94 $^{\circ}$ C로 1분간 가열한 뒤, 94 $^{\circ}$ C에서 15초간의 변성 단계, 40 $^{\circ}$ C에서 1분간의 어닐링 단계 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초간의 신장 단계로 40회 가열순환시켰다. 40회 순환한 뒤, 반응물을 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 항온처리한 다음 10 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. PCR 반응은 제조원(Perkin-Elmer)의 GeneAmp System 9600 가열순환기를 사용하여 실시하였다.

<249>

증폭 반응물 4 $\mu$ l를 등량의 로딩 완충액(0.2% 브로모페놀 블루, 0.2% 크실렌 시아놀, 10mM EDTA pH 8.0 및 20% 글리세롤)과 혼합하였다. 이 혼합물 4 $\mu$ l를 6% 비변성 아크릴아미드 서열분석 포맷 겔 상에서 1200 볼트(정전압)하에 3시간 동안 진행시켰다. 이 겔을 80 $^{\circ}$ C에서 1.5시간 동안 건조시킨 뒤 코닥 XAR 필름에 노출시켰다. 산화된 LDL에 노출된 THP-1 세포 유래의 cDNA를 함유하는 반응물에서만 발견되는 증폭 생성물을 동정하고 겔로부터 절단해 내었다. 절단된 겔 단편을 함유하는 소형원심분리 튜브에 DEPC 처리된 물 100 $\mu$ l를 추가하고, 실온에서 30분, 그 다음 95 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 항온처리하였다.

<250>

PCR 생성물을 재증폭시키기 위하여 용출된 DNA 26.5 $\mu$ l를 10x PCR 완충액 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ l, 500  $\mu$ M dNTP 5 $\mu$ l, 2  $\mu$ M 하류 프라이머 7 5 $\mu$ l, 상류 프라이머 15 7.5 $\mu$ l 및 Amplitaq 폴리머라제 0.5 $\mu$ l를 함유하는 증폭 반응물에 사용하였다. PCR 순환 변수와 기구는 전술한 바와 같다. 증폭 후, 재증폭물 20 $\mu$ l를 아가로스 겔 상에서 분석하고, 4 $\mu$ l는 TA 클로닝 시스템[Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002](제조원: Invitrogen)을 사용하여 벡터 pCRII 내로 PCR 생성물을 서브클로닝하는데 사용하였다. 14 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 연결시킨 후, 연결 생성물을 사용하여 이. 콜라이를 형질전환시켰다. 수득되는 형질전환체를 채집하여 하룻밤 배양한 뒤 그 배양물 3ml을 플라스미드 미량제조에 사용하였다. 삽입체 크기는 플라스미드를 EcoRI로 분해하여 측정하고, 본래 PCR 생성물의 적당한 크기의 삽입체를 함유하는 클론을 형광염료-중결인자 시약(Prism, 제조원: Applied Biosystems) 및 Applied Biosystems 373 DNA 서열분석기를 사용하여 서열 분석하였다. PCR 생성물의 서열은 도 2에 제시한 바와 같다. 증폭 프라이머의 서열에는 밑줄을 그어 표시하였다.

<251>

5'RACE 반응

<252>

RT-PCR을 통해 동정된 cDNA는 5'RACE 시스템을 사용하여 신장시켰다 [Loh, E.Y., Eliot, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L., and Davis, M.M. (1989) Science 243, 217-219; Simms, D., Guan, N., and Sitaraman, K., (1991) Focus 13, 99-100](제조원: GIBCO). 이 5'RACE 절차에는 처음 차동 디스플레이 반응에 사용된 THP-1 RNA(산화된 LDL 처리됨) 1 $\mu$ g을 사용하였다:

<253> RNA 1 $\mu$ l(1 $\mu$ g)를 프라이머 2a 3 $\mu$ l(3pmol) 및 DEPC 처리된 물 11 $\mu$ l와 배합하고 70 $^{\circ}$ C로 10분 동안 가열한 다음 병상에 1분 동안 방치하였다. 10x 반응 완충액(200mM 트리스-HCl, pH 8.4, 500mM KCl) 2.5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ l, 10mM dNTP 혼합물 1 $\mu$ l 및 0.1M DTT 2.5 $\mu$ l를 부가하였다. 이 혼합물을 42 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 항온처리한 뒤, 수퍼스크립트 II 역전사효소 1 $\mu$ l를 부가하였다. 이 반응물을 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 및 병상에서 1분간 더 항온처리하였다. RNase H(2 단위) 1 $\mu$ l를 부가하고 혼합물을 55 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 항온처리하였다. cDNA는 키트 중에 함유된 GlassMax 컬럼[Sambrook, J. Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]을 사용하여 정제하였다. 이 컬럼으로부터 cDNA를 dH<sub>2</sub>O 50 $\mu$ l 중에 용출시키고, 동결건조한 뒤 dH<sub>2</sub>O 21 $\mu$ l에 재현탁시켰다. cDNA의 테일링(tailing)은 다음과 같은 반응으로 실시하였다: dH<sub>2</sub>O 7.5 $\mu$ l, 반응 완충액 (200mM 트리스-HCl pH 8.4, 500mM KCl) 2.5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l, 2mM dCTP 2.5 $\mu$ l 및 cDNA 10 $\mu$ l를 94 $^{\circ}$ C에서 3분, 그 다음 병상에서 1분간 항온처리하였다. 말단 테옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 1 $\mu$ l(10 단위)를 부가하고, 이 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 항온처리하였다. 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 항온처리하여 효소를 가열 불활성화시키고, 그 혼합물을 얼음 상에 방치하였다. cDNA의 PCR 증폭은 다음과 같은 단계로 실시하였다: 테일링된 cDNA 5 $\mu$ l를, 10x PCR 완충액 (500mM KCl, 100mM 트리스-HCl pH 8.3, 15mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.01%(w/v) 젤라틴) 5 $\mu$ l, 10mM dNTP 혼합물 1 $\mu$ l, 앵커 프라이머 2 $\mu$ l(10pmol), 프라이머 3a 1 $\mu$ l(20pmol) 및 dH<sub>2</sub>O 35 $\mu$ l를 함유하는 반응물에 부가하였다. 이 반응물을 95 $^{\circ}$ C로 1분 동안 가열한 뒤, Amplitaq 폴리머라제 0.9 $\mu$ l(4.5 단위)를 부가하였다. 이 반응물을 다음과 같은 조건하에 40회 순환시켰다: 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 50 $^{\circ}$ C에서 20초 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초. 이 반응물 1 $\mu$ l를 네스티드(nested) 재증폭에 사용하여 이후에 분리할 특정 생성물의 수준을 증가시켰다. 재증폭에는 1차 증폭물 1 $\mu$ l, 10x PCR 완충액 5 $\mu$ l, 10mM dNTP 혼합물 1 $\mu$ l, 유니버설 증폭 프라이머 2 $\mu$ l(20pmol), 프라이머 4a 2 $\mu$ l(20pmol) 및 dH<sub>2</sub>O 38 $\mu$ l의 혼합물을 사용하였다. 이 반응물을 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 가열한 뒤, Amplitaq 폴리머라제 0.7 $\mu$ l(3.5 단위)를 부가하였다. 이 반응물을 다음과 같은 조건하에서 40회 순환시켰다: 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 50 $^{\circ}$ C에서 20초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초. 증폭 생성물은 0.8% 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석하였다. 약 1.2 킬로염기쌍의 주요 생성물이 검출되었다. 이 반응 생성물 2 $\mu$ l를 TA 클로닝 키트(제조원: Invitrogen) 유래의 pCRII 벡터에 클로닝하고 14 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 연결 생성물을 사용하여 이. 콜라이를 형질전환시켰다. 수득되는 형질전환체의 삽입체 크기는 EcoRI로 분해시킨 후 측정하였다. 거의 PCR 생성물 크기의 삽입체를 함유하는 클론을 가지고 형광 염료-중결인자 시약(Prism, 제조원: Applied Biosystems) 및 Applied Biosystems 373 DNA 서열분석기를 사용하여 서열 분석하였다. TA 벡터 유래의 EcoRI 부위를 함유하는 RACE 생성물의 서열은 도 3에 제시하였다. 앵플리머(유니버설 증폭 프라이머 및 5' RACE 프라이머 4a에 대한 상보체)의 서열은 밑줄친 부분이다.

<254> 실시예 2 - LIPG 유전자의 클로닝 및 염색체 위치 결정

<255> cDNA 라이브러리 스크리닝

<256> 사람 태반의 cDNA 라이브러리(올리고 dT 및 랜덤 프라이밍됨, Cat #5014b, Lot #52033)는 제조원(Clontech, Palo Alto, CA)에서 입수하였다. 방사능표지된 프로브는 전술한 5'RACE 반응 PCR 생성물을 함유하는 플라스미드의 삽입체를 절단하여 수득하였다. 이 프로브는 랜덤 프라이밍 기법을 사용하여 방사능표지하였다: DNA 단편(50 내지 100ng)을 랜덤 핵사머(제조원: Gibco) 1 $\mu$ g와 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 그 다음 병상에서 1분간 항온처리하였다. 그 다음 실온에서 10x 클레나우 완충액(100mM 트리스-HCl pH 7.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 57mM 디티오테이틀; 제조원: New England Biolabs) 3 $\mu$ l, 0.5mM dATP, dGTP, dTTP 3 $\mu$ l, 100  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP(3000 Ci/mmol, 제조원: New England Nuclear), 및 DNA 폴리머라제 I의 클레나우 단편 1 $\mu$ l(5 단위, 제조원: Gibco)를 부가하였다. 이 반응물을 실온에서 2 내지 3시간 동안 항온처리하고, 반응물의 부피를 TE pH 8.0으로 100 $\mu$ l로 증가시키고 EDTA를 최종 농도가 1mM이 되게 부가하여 반응을 정지시켰다. 반응물의 부피를 100 $\mu$ l로 증가시키고 G-50 스핀 컬럼(제조원: Boehringer Mannheim) 상으로 통과시켜 통합되지 않은 뉴클레오타이드를 제거하였다. 수득되는 프로브의 비활성은 5 x 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g DNA 이상이었다.

<257> 라이브러리는 종래의 방법으로 프로브화하였다[Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984) Cell 38,5-8]. 간략히 설명하면, 필터는 4.8X SSPE(20X SSPE = 3.6M NaCl, 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02M EDTA, pH 7.7), 20mM 트리스-HCl pH 7.6, 1X 덴하르트 용액(100X = 2% 피콜 400, 2% 폴리비닐피롤리돈, 2% BSA), 10% 텍스트란 설페이트, 0.1% SDS, 100 $\mu$ g/ml 연어 정자 DNA 및 1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml 방사능표지된 프로브 중에서 65 $^{\circ}$ C하에 24시간 동안 하

이브리드화하였다. 그 다음, 필터를 2X SSC(1X SSC = 150mM NaCl, 15mM 시트르산나트륨 pH 7.0), 0.1% 나트륨 도데실 설페이트(SDS)로 실온에서 15분 동안 3회 세척한 뒤, 0.5X SSC, 0.1% SDS로 65℃에서 각각 15분씩 3회 세척하였다. 프로브에 하이브리드화하는 파아지를 분리하고 증폭시켰다. 증폭된 파아지로부터 LambdaSorb 시약(제조사: Promega)을 제조업자의 지침에 따라 사용하여 DNA를 정제하였다. 삽입체는 EcoRI으로 분해하여 파아지 DNA로부터 절단해내었다. 삽입체를 플라스미드 벡터(Bluescript II SK, 제조원: Stratagene)의 EcoRI 부위에 서브클로닝하였다. cDNA의 2.6kb EcoRI 단편 중에 포함된 개방 판독 프레임의 서열은 전술한 바와 같은 자동 서열분석으로 결정하였다. 그 서열은 도 4에 제시하였다. 이 개방 판독 프레임에 의해 암호화된 예상 단백질의 아미노산 서열은 도 5에 도시하고 LLGXL이라 명명하였다. 제1 메티오닌은 뉴클레오타이드 쌍 252 내지 254에 의해 암호화되는 것으로 추정된다. 추론된 단백질은 길이가 500개의 아미노산이다. 처음 18개의 아미노산은 분비형 시그널 펩타이드의 특징적인 서열을 형성한다[Higgins, D.G., and Sharp, P.M. (1988) Gene 73, 237-244]. 이 프로펩타이드의 분자량은 56,800 달톤으로 예상된다. 위치 18에서 시그널 펩타이드가 절단되는 것으로 가정하면 변형되지 않은 성숙 단백질의 분자량은 54,724 달톤이다.

<258> 이 단백질과 트리아실글리세롤 리파제 패밀리의 다른 공지된 구성원 간의 전체 유사성은 도 6과 표 1에 제시하였다. 도 6에 제시한 정렬에서 LIPG는 실시예 1에서 설명된 cDNA(서열 5)가 암호화하는 폴리펩타이드(서열 6)이며, 이하 LLGN이라 명명한다. 이 단백질은 아미노 말단의 345개 잔기가 LLGXL 단백질과 동일하다. 9개의 고유 잔기 다음에 종결 코돈이 오고, 39.3kD의 프로폴리펩타이드와 37.3kD의 성숙 단백질을 생산한다. LLGN과 LLGXL에 공통적인 서열은 서열 9의 핵산 서열과 서열 10의 아미노산 서열이다.

<259> 흥미로운 것은, LLGN 및 LLGXL 단백질이 달라지는 위치가 이 단백질들의 아미노 도메인과 카복시 도메인 사이에 존재하는 다른 리파제의 구조로부터 공지된 영역에 있다는 점이다. 따라서, LLGN 단백질은 트리아실글리세롤 리파제의 2개의 도메인 중 단지 1개로 이루어진 것으로 나타난다. 이 서열은 위치 167 내지 171에 특징적인 "GX SXG" 리파제 모티프를 포함하고, Ser 169, Asp 193 및 His 274에서 촉매성 트리아드 잔기가 보존된다. 다른 리파제에서 디설파이드 결합에 관련되어 있는 시스테인 잔기(위치 64, 77, 252, 272, 297, 308, 311, 316, 463 및 483)의 보존은 LLGXL 단백질이 다른 효소와 구조적으로 유사함을 암시한다. N-결합된 당화의 예상 부위로는 다음 5개가 있다: 아미노산 위치 80, 136, 393, 469 및 491. 비교용으로 사용된 단백질 서열은 사람 지단백질 리파제(LPL; 진뱅크 승인 번호 M15856, 서열 13), 사람 간 리파제(HL; 진뱅크 승인 번호 J03540, 서열 14), 사람 췌장 리파제(PL; 진뱅크 승인 번호 M93285, 서열 15), 사람 췌장 리파제 관련 단백질-1(PLRP-1; 진뱅크 승인 번호 M93283) 및 사람 췌장 리파제 관련 단백질-2(PLRP-2; 진뱅크 승인 번호 M93284).

**표 1**

<260> 트리아실글리세롤 리파제 유전자 패밀리의 유사성

	LLGXL	LPL	HL	PL	PLRP1	PLRP2
LLGXL	-	42.7	36.5	24.5	22.5	22.6
LPL	42.7	-	40.0	22.8	22.7	20.9
HL	36.5	40.0	-	22.8	24.0	22.0
PL	24.5	22.8	22.8	-	65.2	62.2
PLRP1	22.5	22.7	24.0	65.2	-	61.7
PLRP2	22.6	20.9	22.0	62.2	61.7	-

<261> 유사성(%)은 메가라인 프로그램(제조사: Lasergene Biocomputing Software Suite, Dnastar)에서 클러스탈(Clustal) 알고리즘[Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S., and Olivecrona, T. 1990, Am. J. Physiol. 258, C673-C681]을 사용하여 쌍을 이룬 정렬에 기초한 것이다.

<262> 염색체 위치 결정

<263> 계놈 LLG DNA를 함유하는 P1 클론[Sternberg, N., Ruether, J. and DeRiel, K. The New Biologist 2:151-62, 1990] 유래의 DNA를 디콕시게닌 UTP로 닉(nick) 해독에 의해 표지화하였다. 표지된 프로브는 전단된 사람 DNA와 합하고, 50% 포름아미드, 10% 텍스트란 설페이트 및 2X SSC를 함유하는 용액 중에서 남성 공여체 유래의 PHA 자

극된 말초혈액 림프구에 하이브리드화하였다. 특이적인 하이브리드화 시그널은 하이브리드화된 세포를 플루오레세인 부가된 항디곡시게닌 항체 중에서 항온처리한 뒤 DAPI로 대비염색하여 측정하였다. 1차 실험 결과 그룹 E 염색체가 특이적으로 표지되는 것으로 나타났으며, DAPI 염색을 기초로 할 때 염색체 18인 것으로 추정되었다.

<264> 염색체 18의 동원체에 특이적인 바이오틴 표지된 프로브를 LLG 프로브와 공동 하이브리드화하는 2차 실험을 실시하였다. 이 실험 결과, 염색체 18 동원체는 적색으로, 염색체 18의 긴 팔(p)은 녹색으로 특이적으로 표지되었다. 11개의 특이적으로 표지 및 하이브리드화된 염색체 18의 측정은 LLG의 Filter이 0.67(Franke 측정값 0.38)로서 밴드 18q21에 상응함을 입증하였다. 간내 담즙울체, 원추간상체 이영양증 및 가족성 팽창성 골연화를 비롯한 여러 유전자 질환은 이 염색체 영역에 결손을 포함하는 것으로 생각된다.

<265> 실시예 3 - LIPG RNA 분석

<266> THP-1 세포에서 LIPG RNA의 발현

<267> cDNA가 유래되는 mRNA의 분석은 THP-1 RNA의 노던 분석으로 실시하였다. 이 세포의 RNA는 전술한 바와 같이 제조하였다. mRNA는 폴리-dT-자기비드 시스템(Polyattract system, 제조원: Promega)을 사용하여 전체 RNA로부터 정제하였다. 폴리(A)를 함유하는 mRNA 3 $\mu$ g을 1% 아가로스-포름알데히드 겔 상에서 전기영동하였다. 이 겔을 dH<sub>2</sub>O 중에서 30 분 동안 세척하였다. RNA는 알칼리 전달 완충액 (3M NaCl, 8mM NaOH, 2mM 사르코실)을 사용하여 나일론 막으로 진공 전달시켰다. 전달 후, 블롯은 200mM 인산염 완충액(pH 6.8) 중에서 5분 동안 항온처리하여 중화시켰다. RNA는 자외선 가교기 장치(제조원: Stratagene)을 사용하여 막에 가교결합시켰다.

<268> 프로브는 전술한 5'RACE 반응 PCR 생성물을 함유하는 플라스미드의 삽입체를 절단하여 제조하였다. 이 프로브는 실시예 2에 기재된 랜덤 프라이밍 기법을 사용하여 방사능표지하였다.

<269> 필터는 QuikHyb 급속 하이브리드화 용액(제조원: Stratagene)에서 65 $^{\circ}$ C 하에 30분 동안 예비하이브리드화하였다. 방사능표지된 프로브(1 내지 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml)와 초음파처리된 연어 정자 DNA(최종 농도 100 $\mu$ g/ml)는 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하여 변성시키고, QuikHyb 중의 필터에 부가하기 전에 빙상에서 급속 냉각시켰다. 하이브리드화는 65 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 실시하였다. 하이브리드화되지 않은 프로브는 2X SSC, 0.1% 나트륨 도데실 설페이트로 실온에서 15분 동안 2회 세척한 다음, 0.1X SSC, 0.1% SDS로 62 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 2회 세척하여 제거하였다. 세척후, 필터를 간단히 건조시킨 다음, 집광 스크린을 구비한 코닥 XAR-2 필름에 -80 $^{\circ}$ C에서 노출시켰다. 그 결과는 도 7에 도시하였고, 약 4.5kb의 주 mRNA 종을 나타낸다. 또한, 4.3kb 및 1.6kb의 mRNA도 소량 존재하는 것으로 나타났다. LLGN cDNA의 예상 크기는 1.6kb이다. LLGXL 서열은 상기 관찰된 주요 mRNA 종에 의해 암호화될 것으로 추정된다.

<270> 각종 사람 조직에서의 LIPG RNA의 발현

<271> 사람 조직(심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장 및 췌장) 유래의 mRNA를 각각 3 $\mu$ g씩 함유하는 시판 필터는 제조원(Clontech, Catalog #7760-1)에서 입수하였다. 이 필터를 전술한 바와 같이 프로브화하고 처리하였다. 방사능표지된 LLG 단편으로 프로브하고 자동방사능사진술로 촬영한 후, 프로브는 65 $^{\circ}$ C의 항온배양기 중에서 끓는 0.1X SSC, 0.1% SDS로 15분 동안 2회 세척하여 제거하였다. 그 다음, 막을 사람 지단백질 리파제를 암호화하는 1.4kb DNA 단편쌍으로 프로브하였다. 이 단편은 도 1에 제시한 5'LPL 프라이머와 3'LPL 프라이머를 사용하여 THP-1 RNA(PMA 및 oxLDL 처리됨)의 RT-PCR로 획득하였고, RT-PCR의 조건은 전술한 바와 같다. 자동방사능사진촬영 후, 막에서 프로브를 제거한 후, RNA 함량을 규정화하기 위하여 사람  $\beta$ -액틴 cDNA의 방사능표지된 단편으로 재프로브하였다. 이 분석 결과는 도 8에 제시하였다. 최고 농도의 LIPG 메시지는 태반 RNA에서 측정되고, 최저 수준은 폐, 간 및 신장 조직 유래의 RNA에서 관찰되었다. 이는 다른 연구진들에 의한 종래 연구[Verhoeven, A.J.M., Jansen, H. (1994) Biochem. Biophys. Acta 1211, 121-124]와 일치하는 것으로, 지단백질 리파제 메시지가 다양한 조직에서 관찰되었고, 최고 수준은 심장 및 골격근 조직에서 관찰되었다. 이러한 분석 결과는 LIPG 발현의 조직 분포가 LPL의 조직 분포와 매우 상이하다는 것을 시사한다. LIPG의 발현 패턴 역시 다른 연구진 [Wang, C.-S., and Hartsuck, J.A. (1993) Biochem. Biophys. Acta 1166, 1-19; Semenkovich, C.F., Chen, S.-W., Wims, M., Luo C.-C., Li, W.-H., and Chan, L. (1989) J. Lipid Res. 30, 423-431; Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fields, C., and Venter, C. (1993) Nature Genet. 4, 256-265]에 의해 보고된 바와 같이 간 리파제 또는 췌장 리파제의 발현 패턴과 상이하였다.

<272> 또 다른 사람 조직 중의 발현 패턴을 측정하기 위하여 다른 시판중인 막을 LLGXL cDNA로 프로브하였다. 이 도트 블롯(Human RNA Master Blot, 제조원: Clontech, Cat. #7770-1)은 50가지 상이한 조직 유래의 mRNA 100 내지

500ng을 포함하고, 상응하는 하우스키핑 유전자 발현을 위하여 규정화하였다[Chen, L., and Morin, R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 231, 194-197]. LLGLX cDNA의 1.6kb DraI-SrfI 단편은 랜덤 올리고뉴클레오타이드 프라이밍 시스템(Prime It II, 제조원: Stratagene)을 제조업자의 지침에 따라 사용하여 <sup>32</sup>P dCTP로 표지하였다. 65°C에서 30분간 예비하이브리드화한 후, 프로브를 QuikHyb 하이브리드화 용액에 1.3 x 10<sup>6</sup> cpm/ml 농도로 부가하였다. 하이브리드화는 65°C에서 2시간 동안 실시하였다. 하이브리드화되지 않은 프로브는 필터를 2X SSC, 0.1% 나트륨 도데실 설페이트로 실온에서 15분 동안 2회 세척한 뒤, 0.1x SSC, 0.1% SDS로 62°C에서 15분 동안 2회 세척하여 제거하였다. 세척 후, 필터는 간단히 건조시키고, -80°C에서 집광 스크린을 구비한 코닥 XAR-2 필름에 다양한 시간 동안 노출시켰다. 결과적으로 수득되는 영상은 밀도측정기로 정량하였다. 그 결과는 표 2에 제시하였다. 여러 조직의 노던 블롯과 여러 조직의 도트 블롯에서 나타나는 조직의 상대적 발현 수준은 유사하였고, 최고 수준은 태반에서, 최저 수준은 폐, 간 및 신장에서 관찰되었다. 태아의 간, 신장 및 폐 역시 성인의 조직에서와 거의 동일한 수준을 발현하였다. 놀라운 것은, 갑상선 조직에서의 발현 수준이 제시된 모든 조직에서 가장 높고, 태반 조직에서의 발현 수준의 122%였다. 태반에 의한 리파제 발현에 대해서는 선례가 있지만 [Rothwell, J.E., Elphick, M.C. (1982) J. Dev. Physiol. 4, 153-159; Verhoeven, A.J.M., Carling D., and Jansen H.(1994) J. Lipid Res. 35, 966-975; Burton, B.K., Mueller, H.W.(1980) Biochim. Biophys. Acta 618, 449-460], 갑상선이 리파제를 발현하는 것은 종래에는 알려진 바는 없다. 이러한 결과는 LIPG 발현이 태반의 유지에 관여할 수 있으며, 여기에서 LIPG는 인지질과 같은 기질로부터 유리 지방산을 에너지원으로서 방출시키는 작용을 할 수 있다. 갑상선에서 발현되는 LIPG는 갑상선에 의한 생체활성 분자의 합성에 전구체를 제공할 수 있다.

**표 2**

<273> 각종 사람 조직에서의 LIPG mRNA의 발현

전체 뇌	N.D.	흑색질	N.D.	자궁	N.D.	유선	N.D.	폐	29
편도	N.D.	측두엽	N.D.	전립선	5	신장	44	기관	12
미상핵	N.D.	시상	N.D.	위장	N.D.	간	61	태반	100
소뇌	4	시상하부핵	N.D.	정소	9	소장	6	태아 뇌	5
뇌 피질	N.D.	척수	N.D.	난소	N.D.	비장	N.D.	태아 심장	N.D.
전두엽	N.D.	심장	N.D.	췌장	N.D.	흉선	N.D.	태아 신장	56
해마	N.D.	대동맥	N.D.	뇌하수체	N.D.	말초 백혈구	N.D.	태아 간	14
연수	N.D.	골격근	N.D.	부신	N.D.	림프질	N.D.	태아 비장	N.D.
후두엽	N.D.	결장	8	갑상선	122	골수	N.D.	태아 흉선	N.D.
조가비핵	N.D.	방광	N.D.	타선	N.D.	충수	7	태아 폐	8

<274> 상기 제시된 값은 태반 조직에서의 수준을 100%로 임의 설정한 후 발현률(%)을 나타낸 것이다. 이 값은 2회의 자동방사능사진 노출 후 밀도측정기로 측정된 값의 평균값이다. N.D.는 측정 불가능한 값이다.

<275> 배양된 내피 세포에서의 LIPG RNA의 발현

<276> 사람 제대 정맥 내피 세포(HUVEC) 및 사람 관상 동맥 내피 세포(HCAEC)는 제조원(Clonetics)에서 입수하였다. HUVEC는 소 뇌 추출물[Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P.R., and Forand, R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5674-5678](제조원: Clonetics) 3mg/ml이 보충된 시판중인 내피 세포 성장 배지(EGM, 제조원: Clonetics)에서 증식시키고, HCAEC는 소 뇌 추출물 3mg/ml 및 3% 태내 송아지 혈청(최종 농도 5%)이 보충된 EGM에서 증식시켰다. 세포는 컨플루언스할때까지 증식시킨 후, 배지를 소뇌 추출물이 부가되지 않은 EGM으로 교환하였다. 포르볼 미리스테이트(제조원: Sigma) 100ng/ml를 부가하여 배양물을 자극하였다. 24시간 동안 항온처리한 후, 전술한 트리졸(Trizol)법을 통해 세포로부터 RNA를 추출하였다. 전체 RNA 20µg을 전기영동하고 분석용 막으로 전달시켰다. 이 막을 전술한 바와 같이 LIPG 및 LPL 프로브로 프로브화하였다. 그 결과는 도 9에 제시하였다. PMA로 자극시킨 THP-1 세포 유래의 전체 RNA 20µg은 비교용 블롯 상으로 진행시켰다. LIPG 프로브에 하이브리드화하는 RNA는 자극되지 않은 HUVEC 세포 및 PMA 자극된 HUVEC 세포에서 검출되었다. 이와 반대로, 검출가능한 수준의 LIPG mRNA는 PMA로 자극한 후의 HCAEC 배양물에서만 관찰되었다. 내피 RNA에서는 검출가능한 지단백질 리파제 mRNA를 전혀 검출할 수 없었는데, 이는 다른 연구진에 의한 종래 연구 결과와 일치하는 것이었다[Verhoeven, A.J.M., Jansen, H. (1994) Biochem. Biophys. Acta 1211, 121-124].

- <277> 실시예 4 - LIPG 단백질 분석
- <278> 항체 제조
- <279> 항혈청을 LIPG cDNA 개방 판독 프레임에 의해 암호화된 추정된 단백질 영역에 상응하는 서열을 가진 펩타이드에 대하여 생성시켰다. 이 펩타이드를 선택한 이유는 예상되는 항원성 지수가 높기 때문이다.[Jameson B.A., and Wolf, H. (1988) Comput. Applic. in the Biosciences 4, 181-186]. 면역화 펩타이드의 서열은 진뱅크 데이터 베이스내 어떤 단백질 또는 해독된 DNA 서열에서도 발견되지 않았다. LIPG 단백질내에서의 상응하는 위치는 도 10에 제시하였다. 이 펩타이드의 카복시 말단 시스테인은 LIPG 추정 단백질에 존재하는 잔기에 상응하는 것은 아니지만, 담체 단백질에 대한 커플링을 용이하게 하기 위하여 도입시켰다. 펩타이드는 펩타이드 합성기 (Applied Biosystems Model 433A) 상에서 합성하였다. 접합 키트(Inject Activated Immunogen Conjugation Kit, 제조원: Pierce Chemical)에 첨부된 프로토콜에 따라 상기 펩타이드 2mg을 말레이미드 활성화된 키홀 림펫 헤모시아닌 2mg에 커플링시켰다. 탈염 후, 접합체 절반은 동량의 프로인트 완전 보조제(제조원: Pierce)로 유화시켰다. 이 유화액은 뉴질랜드 화이트 토끼에게 주사하였다. 1차 접종한지 4주 후, 프로인트 불완전 보조제(제조원: Pierce)를 사용하는 것을 제외하고는 전술한 바와 같이 제조한 유화액을 부스터 접종하였다. 부스터 접종한 지 2주 후 시험 방혈시키고, 고정화된 펩타이드를 사용한 ELISA를 통해 특정 항체의 역가를 측정하였다. 이어서 추가 부스터는 1차 추가 부스터한 지 1개월 후에 실시하였다.
- <280> 내피 세포 배양물로부터 수득한 배지의 웨스턴 분석
- <281> HUVEC 및 HCEAC 세포를 PMA로 48시간 동안 자극하는 것을 제외하고는 실시예 3C에 기술된 바와 같이 세포를 배양하고 PMA로 자극하였다. 조건 배지 시료(9ml)을 인산염 완충 식염수(PBS, 150mM 염화나트륨, 100mM 인산나트륨, pH 7.2) 중에 현탁된 50% 슬러리의 헤파린-세파로스 CL-6B 500 $\mu$ l와 항온처리하였다. LPL의 헤파린 결합 활성에 중요한 것으로 동정된 LLGXL 서열내의 잔기의 보존으로 인하여 LIPG 단백질을 부분 정제하고 농축하기 위하여 헤파린-세파로스를 선택하였다[Ma, Y., Henderson, H.E., Liu, M.-S., Zhang, H., Forsythe, I.J., Clarke-Lewis, I., Hayden, M.R., and Brunzell, J.D. J. Lipid Res. 35, 2049-2059](도 6). 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 회전시킨 후, 시료를 150 x g에서 5분 동안 원심분리하였다. 배양액을 흡인하고 세파로스는 PBS 14ml로 세척하였다. 원심분리 및 흡인시킨 후 펠릿화된 헤파린-세파로스는 2 x SDS 로딩 완충액(4% SDS, 20% 글리세롤, 2%  $\beta$ -머캅토에탄올, 0.002% 브로모페놀 블루 및 120mM 트리스 pH 6.8) 200 $\mu$ l에 현탁시켰다. 시료는 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하고, 10% 트리스-글리신 SDS 겔 상에 40 $\mu$ l를 로딩시켰다. 약 90분 동안 140V에서 전기영동한 후, 단백질을 노백스(Novex) 전기블롯팅 장치(210V, 1시간)를 통해 니트로셀룰로스 막으로 전달시켰다. 이 막을 차단 완충액(5% 탈지분유, 0.1% 트윈 20, 150mM 염화나트륨, 25mM 트리스 pH 7.2) 중에서 30분 동안 차단시켰다. 항펩타이드 항혈청 및 정상 토끼 혈청을 차단 완충액으로 1:5000의 희석률로 희석하고 상기 막과 함께 저속 진탕하에 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 이 막을 그 다음 TBST(0.1% 트윈 20, 150mM 염화나트륨, 25mM 트리스 pH 7.2)로 15분 동안 4회 세척하였다. 염소 항토끼 퍼옥시다제 접합된 항혈청(제조원: Boehringer Mannheim)을 차단 완충액으로 1:5000의 비율로 희석한 뒤 진탕하에 1시간 동안 상기 막과 항온처리하였다. 이 막을 전술한 바와 같이 세척하고, 르네상스(Renaissance) 화학발광 시약(제조원: DuPont NEN)과 반응시킨 뒤, 코닥 XAR-2 필름에 노출시켰다. 그 결과는 도 11에 도시하였다. 자극되지 않은 HUVEC 및 HCAEC 세포 유래의 시료에는 2종의 면역반응성 단백질이 존재하였다. 자극되지 않은 HCAEC 시료 중의 면역반응성 단백질의 농도는 상응하는 HUVEC 시료내 농도 보다 훨씬 적었다. PMA로 자극한 경우에는, 내피 세포 배양물에 의해 3종의 면역반응성 단백질이 분비되었다. PMA 노출시 HCAEC 배양물에 의해 생성되는 LIPG 단백질의 농도는 크게 증가되었다. 하지만, HUVEC 배양물에서는 LLG 단백질의 PMA 유도가 급격한 증가를 나타내지는 않았다.
- <282> 실시예 5 - 재조합 LIPG 단백질 생산
- <283> LIPG 발현 작제물
- <284> LLGN 및 LLGXL 단백질을 암호화하는 cDNA를 포유동물 발현 벡터 pCDNA3(제조원: Invitrogen)에 클로닝하였다. 이 벡터는 사이토메갈로바이러스 메이저 레이트(major late) 프로모터를 사용하여 많은 포유동물 세포에서 이중 유전자를 발현시킨다. LLGN 5' RACE 생성물은 pCDNA3의 EcoRI 부위에 클로닝시켰다. LLGXL cDNA를 DraI 및 SrfI으로 분해하여 1.55kb cDNA를 생성하였다(도 4). 벡터는 제한 효소 EcoRV로 분해하고, 이 벡터와 삽입체를 T4 DNA 리가제와 급속 연결 키트(제조원: Boehringer Mannheim)의 시약으로 제조업자의 지침에 따라 연결시켰다. 이 연결 생성물을 사용하여 수용능 이. 콜라이를 형질전환시켰다. 수득되는 콜로니를 제한 효소 분석 및 서열 분석으로 스크리닝하고 발현 벡터내 삽입체의 존재와 배향을 조사하였다.

- <285> COS-7 세포내 LIPG의 일시적 형질감염
- <286> LIPG 발현 벡터는 리포펙타민(Lipofectamine) 양이온성 지질 시약(제조원: GIBCO)을 사용하여 COS-7 세포로 도입시켰다. 형질감염하기 24시간 전에 COS-7 세포는 60mm 조직 배양 접시 상에  $2 \times 10^5$  세포/플레이트의 농도로 플레이트 접종하였다. 이 세포를 10% 태내 송아지 혈청, 100U/ml 페니실린, 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지(DMEM; 제조원: GIBCO) 중에서 증식시켰다. 플라스미드 DNA 1 $\mu$ g를 Optimem I 무혈청 배지(제조원: Gibco) 300 $\mu$ l에 부가하였다. 리포펙타민 시약 10 $\mu$ l를 Optimem I 배지 300 $\mu$ l로 희석하고, 이것을 DNA 용액과 혼합 뒤 실온에서 30분 동안 방치하였다. 플레이트로부터 배양액을 제거하고, 세포를 Optimem 배지 2ml로 세정하였다. DNA-리포펙타민 용액을 Optimem 배지 2.7ml와 함께 플레이트에 부가하고, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 5시간 동안 항온처리하였다. 항온처리후, 무혈청 배지는 제거하고 2% FBS와 항생제가 보충된 DMEM으로 교환하였다. 형질감염 12시간 후, 배양물의 일부를 프로테아제 억제제인 0.25mM Pefabloc SC(제조원: Boehringer Mannheim) 또는 10U/ml 헤파린으로 처리하였다. 수거하기 30분 전에, 헤파린 처리된 시료를 40U/ml 헤파린으로 더 처리하였다. 형질감염 60시간 후 세포로부터 배지를 제거하였다. 헤파린-세파로스 CL-4B(PBS pH 7.2 중의 50% 슬러리 200 $\mu$ l)를 배지 1ml에 부가하고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 혼합하였다. 저속 원심분리로 세파로스를 펠릿화하고 빙냉한 PBS 1ml로 3회 세척하였다. 이 세파로스를 펠릿화하고 2x 로딩 완충액 100 $\mu$ l 중에 현탁시켰다. 시료를 95 $^{\circ}$ C로 5분 동안 가열하였다. 각 시료 40 $\mu$ l를 10% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 전기영동과 웨스턴 분석은 전술한 바와 같이 항LIPG 항혈청을 사용하여 실시하였다. 그 결과를 도 12에 제시하였다. HCAEC 조건 배지 유래의 단백질은 크기 대조를 위하여 포함시켰다. LLGN은 HCAEC에서 가장 낮은 밴드에 해당하는 약 40kD으로 이동하였다. LLGX cDNA로 형질감염된 COS 세포 유래의 배양액은 68kD과 40kD 중을 모두 포함하였다. 이 세포를 헤파린으로 처리하였을 때, 배양액으로부터 회수되는 68kD 단백질과 40kD 단백질의 양은 급격하게 증가하여, 세포 표면으로부터 프로테오글리칸 결합된 단백질의 방출 또는 헤파린에 의한 상기 단백질의 안정화를 시사하였다. 세포를 프로테아제 억제제 Pefabloc으로 처리하였을 때, 68kD 단백질의 양은 40kD 단백질의 양에 비하여 증가하였다. 이것은 이 세포에 의해 생산되는 저분자량의 단백질이 68kD 형태의 단백질분해 생성물이라는 것을 암시한다. 보다 작은 40kD 단백질 중을 암호화하고 차동 디스플레이를 통해 확인된 mRNA의 역할은 알려지지 않았다. 하지만, 조직 특이적 방식의 발현이 뚜렷한, 다르게 스플라이싱된 형태의 간 리파제에 대한 보고가 있었고 말단 절단된 단백질을 생산하였다.
- <287> 실시예 6 - 동물 종 내의 LIPG
- <288> LIPG 토끼 동족체의 클로닝
- <289> 토끼 폐 조직(제조원: Clontech, Cat. #TL1010b) 유래의 시판 람다 cDNA 라이브러리를 사용하여 LIPG 유전자의 토끼 동족체의 단편을 분리하였다. 원액 라이브러리 5 $\mu$ l를 물 45 $\mu$ l에 부가하고 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하였다. 그 후, 200  $\mu$ M dNTP, 20mM 트리스-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M 각 프라이머 dLIP774 및 LLGgen2a, 및 2.5U Taq 폴리머라제(제조원: GIBCO)를 최종 부피가 100 $\mu$ l가 되도록 부가하였다. 이 반응물을 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 50 $^{\circ}$ C에서 20초 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안의 반응을 35회 가열순환시켰다. 이 반응물 10 $\mu$ l를 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다. 약 300염기쌍의 생성물이 검출되었다. 반응 혼합물 일부(4 $\mu$ l)를 TA 클로닝 시스템을 통해 생성물을 클로닝하는데 사용하였다. 수득되는 클론의 삽입체를 서열 분석하였다(서열 11). 추론된 토끼 아미노산 서열(서열 12)과 사람 cDNA의 상응하는 서열을 정렬시켜 도 14에 제시하였다. 어느 한 증폭 프라이머의 전체 뉴클레오타이드 중에서 토끼 LLG 서열과 사람 LLG 서열 간에는 85.8%의 동일성을 나타내었다. 이 토끼 cDNA에 의해 암호화된 추론 단백질은 사람 단백질과 94.6%의 동일성을 공유하였고, 코돈의 제3 위치 또는 "동요(wobble)" 위치에서 대부분의 뉴클레오타이드 치환을 나타내었다. 특히, 이 영역은 추론 LLG 단백질의 "리드(lid)" 서열까지 연장되어 있으며, 리파제 유전자 패밀리 중에 존재하는 가변 도메인이다. 이것은 이 유전자가 고도의 종간 보존성이 있다는 것을 입증하는 것이다.
- <290> 다른 종에 존재하는 LIPG
- <291> 다른 종에도 LLG 유전자가 존재하는지를 입증하기 위하여, 다양한 종에서 수득되는 게놈 DNA를 EcoRI로 제한 분해하고, 아가로스 겔 전기영동을 통해 분리한 뒤 니트로셀룰로스 막에 블롯팅하였다.
- <292> 이 막을 6x SSC, 10% 텍스트란 설페이트, 5x 덴하르트 용액, 1% SDS 및 5 $\mu$ g/ml 연어 정자 DNA를 함유하는 하이브리드화 용액 중에서 랜덤 프라이밍된 <sup>32</sup>P-LLG 또는 <sup>32</sup>P-LPL(지단백질 리파제) 프로브  $2.5 \times 10^6$  cpm/ml과 65 $^{\circ}$ C

에서 하룻밤 동안 하이브리드화하였다. 이 막을 0.1X SSC, 0.5% SDS로 실온에서 10분, 40℃, 50℃ 및 55℃에서 10분 동안 연속 세척하였다. 블롯의 자동방사선사진은 도 16에 제시하였다.

- <293> 도 16은 래트 DNA에 대한 LLG 프로브에 의해 하이브리드화가 관찰되지 않은 것을 제외하고는 조사된 모든 종에서 LLG 유전자와 LPL 유전자가 존재함을 보여주고 있다. 래트에서의 예외적인 데이터는 LLG 서열을 함유하는 비정상적 크기의 제한 단편의 생성으로 인한 인공물임을 나타낸다. 이러한 단편들은 아가로스 겔의 분획 범위를 벗어나는 것이거나 비효율적으로 블롯팅할 수 있다. 두 프로브에 의해 검출된 상이한 밴드들은 LPL과 LIPG가 별도의 진화적으로 보존된 유전자임을 시사한다.
- <294> 실시예 7 - LLGXL의 효소적 활성화
- <295> 포스포리파제 활성화
- <296> 사람 지단백질 리파제(LPL), LLGN 또는 LLGXL을 일시적으로 발현하는 COS-7 세포 유래의 조건 배지를 가지고 포스포리파제 활성을 분석하였다. 10% FBS(MEM)를 함유하는 MEM을 블랭크로 사용하고, 안티센스 LLGXL 플라스미드(AS)로 형질감염시킨 COS-7 세포 유래의 조건 배지는 음성 대조군으로 사용하였다.
- <297> 포스파티딜콜린(PC) 유액은 포스파티딜콜린(10mM) 10 $\mu$ l, <sup>14</sup>C-포스파티딜콜린 40 $\mu$ l, sn 1 및 2 위치가 표지화된 디팔미토일(2 $\mu$  Ci) 및 트리스-TCNB(100mM 트리스, 1% 트리톤, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 200mM NaCl, 0.1% BSA) 100 $\mu$ l를 사용하여 제조하였다. 이 유액을 10분 동안 증발시킨 뒤, 트리스-TCNB로 최종 부피를 1ml로 만들었다.
- <298> 반응은 2회 반복적으로 실시하고, PC 유액 50 $\mu$ l와 배지 950 $\mu$ l를 추가하였다. 시료를 진탕 수조에서 37℃하에 2내지 4시간 동안 항온처리하였다. 반응은 1N HCl 1ml를 추가하여 종결시킨 뒤 2-프로판올:헥산(1:1) 4ml로 추출하였다. 상부의 1.8ml 헥산층을 실리카 겔 컬럼을 통해 통과시키고 유출 분획에 함유된 방출된 <sup>14</sup>C-유리 지방산은 신틸레이션 계수기로 정량하였다. 이 분석 결과는 도 14에 제시하였다.
- <299> 트리아실글리세롤 리파제 활성화
- <300> 사람 지단백질 리파제(LPL), LLGN 또는 LLGXL을 일시적으로 발현하는 COS-7 세포 유래의 조건 배지를 가지고 트리아실글리세롤 리파제 활성을 분석하였다. 10% FBS를 함유하는 MEM을 블랭크로 사용하고, 안티센스 LLGXL 플라스미드(AS)로 형질감염시킨 COS-7 세포 유래의 조건 배지는 음성 대조군으로 사용하였다.
- <301> 농축 기질은 표지된 트리올레인 [9,10-<sup>3</sup>H(N)]과 표지되지 않은 트리올레인(최종 전체 트리올레인 = 150mg, 6.25 x 10<sup>8</sup> cpm)의 무수 유액으로 제조하고, 100% 글리세롤 중의 레시틴 9mg을 추가하여 안정화시켰다. <sup>3</sup>H-트리올레인 0.56ml (0.28mCi)를 표지되지 않은 트리올레인 0.17ml 및 레시틴 90 $\mu$ l(9mg)와 혼합하였다. 이 혼합물을 질소 기류하에 증발시켰다. 건조된 지질 혼합물을 100% 글리세롤 2.5ml 중에서 초음파 처리(펄스 레벨 2로 30초 그 다음 냉각 2초의 사이클을 5분간 실시)하여 용해시켰다.
- <302> 분석 기질은 농축 기질 1 용적을 3% w/v 지방산 제거된 소혈청 알부민을 함유하는 0.2M 트리스-HCl 완충액(pH 8.0) 4 용적으로 희석하여 제조하였다. 희석된 기질은 5초 동안 강력하게 볼텍싱하였다.
- <303> 반응은 분석 기질 0.1ml와 소정의 조건 배지 0.1ml를 함유하는 전체 부피 0.2ml에서 2회 반복 실시하였다. 반응물은 37℃에서 90분 동안 항온처리하였다. 반응은 3.25ml의 메탄올-클로로포름-헵탄 1.41:1.25:1(v/v/v)과 그 다음 1.05ml의 0.1M 탄산칼륨-붕산염 완충액(pH 10.5)을 추가하여 종결시켰다. 15초 동안 강력하게 혼합한 후, 시료를 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상부의 수성상 중 1.0ml 일정량을 신틸레이션 계수기로 계수하였다. 이 분석 결과는 도 15에 제시하였다.
- <304> 실시예 8 - 인헨서 또는 억제제를 스크리닝하는데 사용되는 LIPG 폴리펩타이드의 용도
- <305> 재조합 LIPG는 바콜로바이러스 감염된 곤충 세포 또는 안정하게 형질감염된 CHO 세포 또는 다른 사용가능한 포유동물 숙주 세포에서 생성한다. 재조합 LIPG는 헤파린-세파로스 상에서의 크로마토그래피와 그 다음 양이온 교환 수지 상에서의 크로마토그래피를 통해 혈청 함유 조건 배지 또는 무혈청 조건 배지로부터 정제하였다. 분자체와 같은 제3의 크로마토그래피 또는 추가의 크로마토그래피 단계는 필요한 경우 LIPG의 정제에 사용하였다. 정제 동안, 항펩타이드 항체를 사용하여 LIPG 단백질을 모니터링하고 포스포리파제 분석을 사용하여 LIPG 활성을 측정하였다.
- <306> 형광 분석에서, 최종 분석 조건은 약 10mM 트리스-HCl(pH 7.4), 100mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5 $\mu$ M C<sub>6</sub>NBD-PC{1-아실-

2-[6-(니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]카프로일포스파티딜콜린 및 LIPG 단백질(약 1 내지 100ng)이다. 이 반응물을 470nm에서 형광 여기시키고, 효소 활성은 540nm에서의 형광 방출로 측정하고 연속 모니터링하였다. LIPG 활성의 자극 및/또는 억제에 대하여 시험되는 화합물 및/또는 물질은 디메틸설폭사이드 중의 10 내지 200mM 용액으로서 부가하였다. LIPG 활성을 자극 또는 억제하는 화합물은 540nm에서 증가 또는 감소된 형광 방출량을 나타내는 것으로 동정되었다.

- <307> 티오 분석에서, 최종 분석 조건은 약 25mM 트리스-HCl(pH 8.5), 10mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 4.24mM 트리톤 X-100, 0.5mM 1,2-비스(헥사노일티오)-1,2-디데옥시-sn-글리세로-3-포스포릴콜린, 5mM 4,4'-디티오비스피리딘(에탄올 중의 50mM 원액 유래) 및 1 내지 100ng의 재조합 LIPG 이다. 포스포리파제 활성은 342nm에서의 흡광도 증가를 측정하여 분석하였다. LIPG 활성의 자극 및/또는 억제에 대하여 시험되는 화합물 및/또는 물질은 디메틸설폭사이드 중의 10 내지 200mM 용액으로서 부가하였다. LIPG 활성을 자극 또는 억제하는 화합물은 342nm에서 증가 또는 감소된 흡광도를 나타내는 것으로 동정되었다.
- <308> 실시예 9 - 사람 LIPG를 발현하는 형질전환된 마우스
- <309> LIPG의 생리적 역할을 더 연구하기 위하여 사람 LIPG를 발현하는 형질전환된 마우스를 제조하였다.
- <310> LLGXL을 암호화하는 1.53kb DraI/SrfI 제한 단편은 플라스미드 벡터(pHMG)의 편재적으로 발현되는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴 조효소 A(HMG CoA) 환원효소 유전자에 대한 프로모터의 하류로 클로닝하였다. 상이한 수준의 사람 LLGXL을 발현하는 형질전환된 마우스는 표준 방법을 사용하여 제조하였다[예컨대, G.L. Tremp et al. Gene 156:199-205, 1995]. 이 형질전환된 마우스를 사용하여 지질 프로파일, 혈관 병리상태, 죽상동맥경화증의 성장률 및 정도, 및 다른 생리적 변수들에 대한 LLGXL 과발현의 영향을 측정하였다.
- <311> 실시예 10 - 죽상동맥경화증 조직내 LIPG의 발현
- <312> 죽상동맥경화증에서의 LLGXL 발현은 죽상동맥경화증을 앓고 있는 4명의 환자로부터 혈관 생검을 통해 분리한 mRNA를 사용하여 역전사-폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)을 실시하여 조사하였다. 조직 시료는 대동맥 벽(시료 1개), 장골 동맥(시료 2개), 경동맥(시료 1개)으로부터 획득하였다.
- <313> 죽상동맥경화증 생검은 영국의 왕립 병원(Gloucestershire Royal Hospital)에서 입수하였고, 폴리A+ mRNA는 제조한 뒤, 디에틸피로카보네이트(DEPC) 처리된 물에 0.5µg/µl mRNA의 농도로 재현탁시켰다. 역전사효소 반응은 제조원(GibcoBRL)의 프로토콜(제1쇄 cDNA 합성에 대한 Superscript Preamplification System)에 따라 실시하였다. 간단히 설명하면, cDNA를 다음과 같이 합성하였다: 각 mRNA 2µl를 올리고(dT)<sub>12-18</sub> 프라이머 1µl와 DEPC 물 9µl에 부가하였다. 튜브를 70°C에서 10분간 항온처리하고 1분 동안 빙상에 방치하였다. 각 튜브에 다음과 같은 성분을 부가하였다: 10X PCR 완충액 2µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 2µl, 10mM dNTP 혼합물 1µl 및 0.1M DTT 2µl. 42°C에서 5분 후에, 수퍼스크립트 II 역전사효소 1µl(200 단위)를 부가하였다. 이 반응물을 저속으로 혼합한 뒤, 42°C에서 50분 동안 항온처리하였다. 이 반응물을 70°C에서 15분 동안 항온처리한 뒤 빙상에 방치하여 반응을 종결시켰다. 남아있는 mRNA는 각 튜브에 RNase H 1µl를 부가하고 37°C에서 20분 동안 항온처리하여 파괴시켰다.
- <314> PCR 증폭은 cDNA 반응물 2µl를 사용하여 실시하였다. 각 튜브에 다음과 같은 성분을 부가하였다: 10X PCR 완충액 5µl, 2mM dNTP 5µl, h11g-gsp1 프라이머(20pmol/ml, 도 1 참조) 1µl, h11g-gsp2a 프라이머(20pmol/ml, 도 1 참조) 1µl, 50mM MgCl<sub>2</sub> 1.5µl, Taq 폴리머라제(5U/ml) 0.5µl 및 물 34µl. 반응물을 95°C에서 2분 동안 유지시킨 후, PCR을 다음과 같은 조건으로 30회 순환시켰다: 94°C에서 15초, 52°C에서 20초 및 72°C에서 30초. 결과적으로 획득되는 반응물을 72°C에서 10분 동안 유지시킨 뒤 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다. h11g-gsp 프라이머는 LIPG에 특이적이고 300bp의 예상 생성물을 생산한다. cDNA 합성 반응이 성공적으로 이루어지는지를 입증하기 위한 병행 PCR에는 하우스키핑 유전자 G3PDH(사람 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제)에 특이적인 프라이머를 사용하였다(20pmol/ml의 농도로 각각 1µl씩).
- <315> G3PDH 프라이머(도 1 참조)는 총 4가지 혈관 생검 시료에서 983bp의 예상 생성물을 생산하였다. LIPG 발현은 4가지 시료 중 3가지에서 검출되었고, 경동맥 시료에서는 발현이 관찰되지 않았다.
- <316> 실시예 11 - 차동 디스플레이, RT-PCR 및 cDNA 라이브러리 스크리닝
- <317> 실시예 12 내지 16에 제시된 실험을 실시하기 위하여 다음과 같은 절차(실시예 1에 개략된 절차에 기초함)를 사용하여 LIPG의 cDNA를 획득하였다. THP-1 세포를 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA, 40ng/ml; 제조원:

Sigma)의 존재하에 48시간 동안 평판배양하였다. 분화된 THP-1 세포를 oxLDL(50 $\mu$ g/ml) 또는 대조군 배지에 24시간 동안 노출시켰다. 전체 RNA를 수거하여 표준 절차에 따라 정제하였다. 폴리(A)<sup>+</sup> RNA는 폴리-dT 자기 비드 시스템(제조원: Promega)을 사용하여 전체 RNA로부터 정제하였다. cDNA 합성 및 PCR 증폭은 차동 디스플레이 키트 버전 1.0(제조원: Display Systems Biotechnology)의 프로토콜을 사용하여 실시하였다. EL의 1차 cDNA 단편을 생산한 프라이머쌍은 하류 프라이머 7(5'-TTTTTTTTTTGA-3')과 상류 프라이머 15(5'-GATCCAATCGC-3')이다. 이 증폭 반응물을 6% 비변성 아크릴아미드 서열분석용 겔에서 분리시키고, oxLDL에 노출된 THP-1 세포 유래의 cDNA를 함유하는 반응물에서만 발견되는 증폭 생성물을 동정하여 겔에서 절단해 내었다. 동일한 프라이머를 사용한 재증폭을 실시하고, 그 생성물을 절단하여 TA 클로닝 시스템(제조원: Invitrogen)을 사용한 pCRII 벡터에 서브클로닝하였다. 삽입체의 크기는 플라스미드를 EcoRI로 분해시켜 측정하고, 대략 본래 PCR 생성물의 크기에 해당하는 삽입체를 함유하는 클론을 가지고 형광염료-종결인자 시약(Prism, 제조원: Applied Biosystems) 및 Applied Biosystems 373 cDNA 서열분석기를 사용하여 서열 분석하였다. 겔에서 절단한 본래 cDNA의 cDNA 서열은 5'-RACE 시스템(제조원: GIBCO)을 사용하여 신장시켰다. 차동 디스플레이 반응에서 처음 사용한 THP-1 세포 유래의 RNA(1 $\mu$ g)를 사용하여 제1쇄 cDNA 합성의 유전자 특이적인 프라이머(5'-TAGGACATGCACAGTGAATCTG-3')를 이용하는 5'-RACE 절차를 실시하였다. 이 cDNA의 PCR 증폭은 앵커 프라이머와 유전자 특이적 프라이머 2(5'-GATTGTGCTGGCCACTTCTC-3')를 사용하여 실시하였다. 이 반응물(1 $\mu$ l)을 보편적인 증폭 프라이머(5'-CUACUACUACUAGCCACGCGTCTGACTAGTAC-3')와 유전자 특이적 프라이머 3(5'-GACTCCAGGGACTGAAG-3')을 이용한 네스트형 재증폭에 사용하여 이후에 분리하기 위한 특정 생성물의 수준을 증가시켰다. 이 반응 생성물을 TA 클로닝 키트의 pCRII 벡터에 클로닝하여 서열분석하였다. 사람 태반의 cDNA 라이브러리(올리고 dT 및 랜덤 프라이밍)는 제조원(Clontech)에서 입수하고 5'-RACE 반응 PCR 생성물로 프로브하였다. 하이브리드화 클론 유래의 DNA는 LambdaSorb 시약(제조원: Promega)을 사용하여 정제하였다. 삽입체는 EcoRI로 분해하여 파아지 DNA로부터 절단하고 Bluescript II SK 플라스미드 벡터(제조원: Stratagene)의 EcoRI 부위에 서브클로닝한 뒤 서열분석하였다.

<318> 실시예 12 - 항체 제조

<319> 펩타이드 합성기(Model 433A, 제조원: Applied Biosystems)를 가지고 분비된 LIPG 유전자 생성물의 잔기 8 내지 23에 해당하는 17개 잔기 펩타이드 (GPEGRLEDKHLKPKATC)를 합성하였다. 집합 키트(Imject Activated Immunogen Conjugation Kit, 제조원: Pierce Chemical)에 첨부된 프로토콜에 따라 상기 펩타이드 2mg을 말레이미드 활성화된 키홀 림펫 헤모시아닌 2mg에 커플링시켰다. 탈염 후, 집합체 절반은 동량의 프로인트 완전 보조제(제조원: Pierce)로 유화시켰다. 이 유화액은 뉴질랜드 화이트 토끼에게 주사하였다. 1차 접종한지 4주 후, 프로인트 불완전 보조제(제조원: Pierce)를 사용하는 것을 제외하고는 전술한 바와 같이 제조한 유화액을 부스터 접종하였다. 부스터한 지 2주 후 시험 방혈시키고, 고정화된 펩타이드를 사용한 ELISA를 통해 특정 항체의 역할을 측정하였다.

<320> 실시예 13 - 유전자 발현 연구

<321> HUVEC는 소 뇌 추출물(제조원: Clonetics) 3mg/ml이 보충된 시판 내피 세포 성장 배지(EGM, 제조원: Clonetics)에서 증식시키고, HCAEC는 소 뇌 추출물 3mg/ml 및 5% 태내 송아지 혈청이 보충된 EGM에서 증식시켰다. PMA 100ng/ml를 부가하여 배양물을 자극하였다. 24시간 동안 항온처리한 후, 트리졸(Trizol)법을 통해 세포로부터 RNA를 추출하고, 1% 아가로스-포름알데히드 겔 상에서 전기영동한 뒤, 터보블롯팅기(Turboblotter; Schleicher and Schuell) 상의 니트란(Nytran) 막으로 전달시키고 스트라타링커 자외선 가교기(제조원: Stratagene)를 사용하여 막에 가교결합시켰다. 5'-RACE 반응 PCR 생성물은 랜덤 프라이밍 기법으로 방사능표지하였다. 방사능표지된 프로브(1 내지 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml)는 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하여 변성시킨 뒤 빙상에서 급속 냉각시킨 후 QuikHyb 내의 필터에 부가하였다. 하이브리드화는 65 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 진행시켰다. 필터는 집광 스크린을 구비한 코닥 XAR-2 필름에 -80 $^{\circ}$ C에서 노출시켰다. HUVEC 조건 배지 및 HCEAC 조건 배지는 헤파린-세파로스 CL-6B와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 원심분리 후, 펠릿화된 헤파린-세파로스를 SDS 로딩 완충액에 현탁시키고, 95 $^{\circ}$ C로 5분간 가열한 다음, 10% 트리스-글리신 SDS 겔(NOVEX) 상에 도입하였다. 140V에서 90분 동안 전기영동한 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달시키고 토끼 항-LIPG 펩타이드 항혈청(1:5,000)과 제2 항체로서 염소 항토끼 피옥시다제 접합된 항혈청(1:5,000; Boehringer)을 사용하여 검출하였다. 이 막을 르네상스 화학발광 시약(제조원: DuPont NEN)과 반응시키고 코닥 XAR-2 필름에 노출시켰다. 사람 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근, 신장 및 췌장 유래의 폴리(A)<sup>+</sup>RNA(각각 3 $\mu$ g)(제조원: Clontech)를 함유하는 시판 필터를 방사능표지된 단편과 하이브리드화하고 전술한 바와 같이 처리하였다. 자동방사능사진촬영 후, 블롯을 끄

는 0.1x SSC와 0.1% SDS로 65°C에서 15분 동안 2회 세척하여 분리해 낸 다음, 사람 LPL을 암호화하는 1.4kb cDNA 단편과 전술한 바와 같이 프로브화하였다. 이 단편은 5'LPL 프라이머(5'-ACCACCATGGAGAGCAAAGCCCTG-3')와 3'LPL 프라이머(5'-CCAGTTTCAGCCTGACTTCTTATTC-3')를 사용하여 THP-1 RNA(PMA 및 oxLDL 처리됨)을 RT-PCR시켜 수득하였다. 필름에 노출시킨 후, 막을 다시 세척한 뒤 RNA 함량을 규정화하기 위하여 사람 β 액틴 cDNA의 방사능표지된 단편으로 재프로브화하였다.

- <322> 사람 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)는 예상된 바와 같이 LPL mRNA 발현에 있어서는 음성이었으나, LIPG 유전자에 대한 mRNA는 고수준의 항상성으로 발현하는 것으로 관찰되었다(도 9).
- <323> 사람 관상 동맥 내피 세포(HCAEC) 역시 포르볼 에스테르로 처리시 더욱 상향조절된 mRNA를 발현하는 것으로 관찰되었다(도 9).
- <324> 자극된 HUVEC 및 HCAEC 유래의 조건 배지는 약 68kD과 40kD의 면역반응성 단백질과 이 보다 덜 명백한 55kD 밴드를 포함하였다(도 11).
- <325> 생체내에서 LIPG 생산의 조직 부위를 측정하기 위하여 LIPG와 LPL에 대한 프로브를 이용한 복수의 사람 조직에 대한 노던 블롯 분석을 실시하였다. 폐, 간 및 신장(도 8) 조직에서는 다량의 LIPG mRNA가 발견되었지만 LPL 발현의 수준은 낮은 것으로 관찰되었다. LIPG는 또한 태반에서도 고수준으로 발현되었고(도 8), 이는 성장에 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 시사하는 것이다.
- <326> 다량의 LPL을 발현하는 심장 및 골격근과 같은 조직[종래 보고를 입증함, Goldberg, J.I., J. Lipid Res., 37, 693-707 (1996)]에서는 LIPG 발현이 측정되지 않았다. 이러한 분석은 HL 및 PL에 대해 보고된 것 뿐만 아니라 LIPG 발현의 조직 분포가 LPL의 조직 분포와 매우 상이하다는 것을 시사하였다. 부신과 난소에서도 LIPG mRNA를 관찰하지 못하였으나, 고환에서는 극소량의 LIPG mRNA가 관찰되었다(데이터는 제시 안됨). 또한, HepG2 세포는 HUVEC에 의해 발현되는 양의 10% 미만의 양으로 LIPG mRNA와 단백질을 시험관내에서 발현하는 것으로 관찰되었다(데이터는 제시 안됨).
- <327> 실시예 14 - 리파제 분석
- <328> 상기 cDNA와 1.4-kb LPL cDNA를 포유동물 발현 qrpjx pCDNA3(제조원: Invitrogen)의 EcoRV 부위에 클로닝하였다. 안티센스 pCDNA 3 벡터를 음성 대조군으로 사용하였다. 재조합 발현 벡터(3μg)는 리포펙타민(제조원: Life Technologies)과 혼합하고 60mm 접시에서 반응집성의 COS7 세포를 4회 반복적으로 형질감염시켰다. 확립된 방법을 사용하여, 형질감염된 COS7 세포로부터 수득한 조건 배지의 시료를 TG 리파제 및 포스포리파제 활성에 대하여 분석하였다 [Goldberg, J.I., J. Lipid Res., 37, 693-707(1996)]. TG 리파제 분석을 위하여 9,10-<sup>3</sup>H(N)-트리올레인(250 μCi; 제조원: NEN)을 미표지된 트리올레인(150mg)과 글리세롤 중의 타입 IV-S-α 레시틴(9mg; 제조원: Sigma)과 혼합하였다. 이 혼합물을 질소 하에 증발시키고, 초음파기(Branson Sonifier 450)로 초음파처리하여 글리세롤(2.5ml) 중에 유화시켰다. 분석 기질은 유화된 기질 1부피, 3%(w/v) 지방산 제거된 소혈청 알부민(BSA)을 함유하는 트리스-HCl(0.2M, pH 8.0) 4용적 및 열불활성화된 소혈청 1용적을 혼합하여 제조하였다. 분석 기질(0.1ml)과 조건 배지(0.1ml)을 함유하는 전체 용적(0.2ml)하에 반응을 3회 반복적으로 실시하였다. 반응물은 37°C에서 2시간 동안 항온처리하고, 메탄올-클로로포름-헵탄(1.41:1.25:1; 3.25ml)을 부가한 뒤 탄산칼륨-붕산염 완충액(1.05ml; 0.1M, pH 10.5)을 부가하여 반응을 종결시켰다. 15초 동안 강력하게 혼합한 후, 시료를 1,000rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상부의 수성상(1.0ml)을 신틸레이션 계수기에서 계수하였다. 포스포리파제 분석을 위하여, <sup>14</sup>C-디팔미토일 PC(2 μCi; NEN)와 레시틴(10μl)을 트리스-TCNB(100μl; 100mM 트리스-HCl pH 7.4, 1% 트리톤 X-100, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 200mM NaCl, 0.1% BSA)와 혼합하여 포스파티딜콜린(PC) 유액을 제조하였다. 이 혼합물을 2분 동안 불텍성한 뒤, 질소하에 증발시켰다. 건조된 지질은 TCNB(1ml)로 재구성하고 10초 동안 불텍성하였다. 반응물에는 PC 유액(50μl), 조건 배지(600μl) 및 MEM(350μl)을 부가하고, 3회 반복적으로 반응을 수행하였다. 시료를 37°C에서 2시간 동안 항온처리하고, HCl(1ml)을 부가하여 종결시킨 뒤, 2-프로판올:헥산(1:1; 4ml)으로 추출하였다. 상부 헥산 층의 시료(1.8ml)를 실리카 겔 컬럼을 통해 통과시키고, 유출 분획 중에 함유된 방출된 <sup>14</sup>C-유리 지방산을 신틸레이션 계수기로 정량하였다. 두 분석을 위하여, 10% FBS를 함유하는 MEM을 블랭크로서 사용하고 안티센스 플라스미드(AS)로 형질감염된 COS7 세포 유래의 조건배지는 음성 대조군으로서 사용하였다.
- <329> 실시예 15 - 재조합 아데노바이러스 작제 및 동물 연구
- <330> 사람 LIPG를 암호화하는 재조합 아데노바이러스는 문헌[Tsakamoto et al., J. Clin. Invest., 100, 107-114

(1997); Tsukamoto et al., J. Lipid Res., 38, 1869-1876 (1997)]에 기재된 바와 같이 작제하였다. 간략히 설명하면, 전장의 사람 cDNA를 서플라스미드 벡터 pAdCMVLink1에 서브클로닝하였다. 제한 분석으로 적당한 배향을 스크리닝한 후, 플라스미드를 NheI로 선형화하고, ClaI로 분해한 아데노바이러스 DNA와 함께 293 세포를 공동형질감염시켰다. 세포를 한천 상에 도말하고 37°C에서 15일 동안 항온배양하였다. 6개의 플라크를 취하여 PCR 스크리닝하였다; cDNA 양성의 2개의 플라크는 플라크 정제 처리를 2회 실시하였다. cDNA의 존재를 확인한 후, 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 37°C하에 증식시켰다. 세포 용해물을 사용하여 HeLa 세포를 감염시키고 조건 배지의 웨스턴 블롯으로 사람 LIPG의 발현을 확인하였다. 재조합 아데노바이러스(adhEL)는 293 세포에서 더욱 증식시키고 세습 클로라이드 초원심분리로 정제하였다. cDNA 삽입체를 함유하지 않는 대조군 아데노바이러스(Adnull) 역시 플라크 정제 처리하고 전술한 바와 같이 정제하였다. 정제된 바이러스는 10% 글리세롤/PBX에서 -80°C하에 저장하였다. 야생형 C57BL/6, 사람 apoA-I 형질전환된 마우스 및 LDL 수용체 변이 마우스는 잭슨 실험실(Jackson Laboratory)에서 입수하였다. 모든 마우스에게는 음식물을 공급하였다. 야생형 및 사람 apoA-I 형질전환된 마우스에게 AdhEL 또는 Adnull  $1 \times 10^{11}$  입자(약  $2 \times 10^9$  pfu)를 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 주사하고 LDLR 결손형 마우스에게는  $1 \times 10^{10}$  입자를 주사하였다. 모든 실험에서는, 주사 1일전과 주사후 여러 시점에서 역계도 신경총으로부터 혈액을 입수하였다.

<331> 야생형 C57BL/6 마우스에게 AdhEL을 정맥내 주사한 결과 HDL 콜레스테롤이 간에서 발현되었고(도 17), 혈장 수준은 감소하였으며, 주사 후 41일 이상 동안 대조군 바이러스 주사된 마우스보다 훨씬 낮은 수준을 유지하였다(도 18). 지단백질을 FPLC 겔여과로 분리하여, 아데노바이러스를 주사한지 14일 후에는 HDL이 검출되지 않았음을 입증하였다(도 19). 재조합 LIPG 아데노바이러스를 사람 apoA-I 형질전환된 마우스(훨씬 고농도의 HDL 콜레스테롤과 apoA-I를 보유함)에게 주사한 결과 HDL 콜레스테롤(도 20)과 apoA-I(도 21)의 수준이 모두 감소하였다. apoB를 함유하는 지단백질 VLDL 및 LDL과 비교하여 HDL에 미치는 LIPG 발현의 상대적 효과를 측정하기 위하여, 저용량의 LIPG 아데노바이러스를 약 70%의 VLDL/LDL과 약 30%의 HDL을 보유하는 음식물을 공급받은 LDL 수용체 결손형 마우스에게 주사하였다. 이전과 같이, LIPG의 발현은 HDL 콜레스테롤 수준을 감소시켰다(도 23). LIPG 발현은 동일한 마우스에 있어서 VLDL/LDL 콜레스테롤 수준을 감소시켰지만(도 24), 그 효과는 비례적으로 적었다. LIPG의 과발현은 VLDL/LDL 콜레스테롤을 감소시키는 바, apoB 함유 지단백질의 조절 과정에서 LIPG의 역할은 배제될 수 없다.

<332> 실시예 16 - 지질/지단백질 분석

<333> 혈장의 전체 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 수준은 시그마 시약을 사용하는 진단 시스템(Cobas Fara, 제조원: Roche Diagnostic systems) 상에서 효소적으로 측정하였다. ApoA-I는 코바스 파라(Cobas Fara) 상에서 혼탁도 측정 분석법(제조원: Sigma)을 사용하여 정량하였다. 혈장 시료를 모아, 문헌[Tsukamoto et al., J. Clin. Invest., 상기 문헌 설명 참조]에 기재된 바와 같이 2개의 수퍼로스(Suprose) 6 컬럼을 연속으로 사용하여 급속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC) 겔 여과(제조원: Pharmacia LKB Biotechnology)로 분석하였다. 분획(0.5 ml)을 수거하고, 효소 분석법(제조원: Wako Pure Chemical Industries)을 사용하여 콜레스테롤 농도를 측정하였다.

<334> 실시예 17 - LIPG 억제제의 동정

<335> EL 활성의 조절인자는 다음과 같은 방법으로 확인할 수 있다.

<336> 재조합 LIPG는 안정하게 형질감염된 중국 햄스터 난소 세포의 조건 배지, 바콜로바이러스 감염된 곤충 세포, 효모[피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 클루베로마이세스 락티스(Kluyveromyces Lactis)] 또는 다른 공급원으로부터 정제할 수 있다. LIPG(예, 사람 혈장, 내피 세포 조건 배지 등)의 비재조합원 역시 사용될 수 있다. LIPG 활성의 조절인자를 탐색하기 위한 1차 스크리닝의 한 가지 예는 가용성 형광성 기질 4-메틸움베리페릴 헤파타노에이트를 이용하는 것이다. 이 분석법은 연속적이며 균질적인 것이다. LIPG에 의한 상기 기질의 가수분해는 고도 형광성의 4-메틸움베리페론을 생산하여 미세평판 형광계로 측정할 수 있다. 사용될 수 있는 다른 1차 선별 분석법으로는 포스포리파제 활성을 측정하는 신틸레이션 근접 분석법(제조원: Amersham), 실시예 7에 기재된(또한 2차 분석법으로서 이하에 제안된) 보다 적은 처리량의 방사능측정 포스포리파제 분석법 또는 실시예 8에 제시된 대안적인 포스포리파제 분석법이 있다.

<337> 다른 TG 리파제와 마찬가지로, LIPG의 촉매성 중심은 세린 프로테아제에서 발견되는 바와 동일한 촉매성 트리아드(ser, his, asp)로 구성된다. 사실상, 지단백질 리파제와 같은 다른 TG 리파제는 PMSF 및 DFP와 같은 세린 프로테아제 억제제에 의해 억제된다. 이 화합물 중 어느 하나는 LIPG 활성 억제제의 양성 대조군으로 사용할 수

있다.

- <338> 2차 분석 : 에스터라제 분석 또는 전술한 대안적인 스크리닝 분석에서 활성이 있는 화합물은 전형적인 방사능측정 포스포리파제 A 분석으로 분석할 수 있다. 이 분석법은 [14C]-디팔미토일-포스포티딜콜린을 함유하는 복합 마이셀로부터 방출되는 방사능표지된 팔미트산을 측정한다. 형광 기질을 이용하고, 보다 다량을 처리하기에 적합한 다른 분석법도 사용될 수 있다.
- <339> 선택성 분석 : 관련 효소인 지단백질 리파제(LPL) 및 체장 리파제(PL)의 억제에 대해서도 화합물을 분석할 수 있다. 사람 PL 및 소의 LPL은 시판되고 있으며, 이 분석법은 용이하게 실시할 수 있다. PL의 포스포리파제 활성은 LIPG의 2차 분석에 대하여 전술한 바와 같은 방식으로 측정한다. LPL은 본래 TG 리파제이기 때문에 2차 분석법은 방사능표지된 TG(트리올레인)기질로부터 방사능표지된 지방산(올레산)의 방출을 측정하는 것이다(실시에 7 참조). 이 분석법은 용량이 유사하며, 형광 기질을 이용하고 보다 다량의 처리량을 분석할 수 있는 다른 분석법으로 변형시킬 수도 있다.
- <340> LIPG의 포스포리파제 활성은 생체내 기질인 HDL에 대하여 시험관내 분석으로 시험될 수 있다. 방사능표지된 HDL은 방사능표지된 인지질로 교환시켜 생성될 수 있고, 그 후 LIPG 포스포리파제 활성 및 스크리닝 후 나타나는 화합물의 활성을 측정하는데 사용할 수 있다.
- <341> 또 다른 분석법으로, 래트 Fu5AH 간암 세포주와 같은 배양 세포 유래의 방사능표지된 콜레스테롤 방출물에 대한 LIPG, HLD, +/- 화합물의 예비배양의 효과를 측정할 수 있다.
- <342> 화합물을 평가하기 위한 생체내 분석법은 야생형 마우스, LIPG를 과발현하는 마우스 및 대조군으로서 LIPG가 없는 마우스를 가지고 실시하였다. adenoEL 발현의 경우에서와 같이 형질전환된 마우스가 대조군 마우스에 비하여 감소된 HDL을 나타낸다면, LIPG 억제성 화합물을 이용한 대조군 마우스의 처리는 HDL을 대조군 마우스의 수준으로 상승시킬 것으로 예상된다. 또한, LDLR<sup>-/-</sup> 마우스, apoA1 형질전환된 마우스 햄스터 또는 토끼와 같은 다른 동물내의 LIPG 억제 활성(HDL의 상승)에 대해서도 화합물을 시험할 수 있다. LIPG 또는 LIPG 활성을 상승시킨 화합물은 이러한 동물 모델 또는 다른 동물 모델에서도 HDL을 상승시킬 것으로 예측된다.
- <343> 실시에 18 - 억제성 소분자 치료 방법
- <344> 시험관내에서 LIPG 폴리펩타이드를 억제할 수 있는 것으로서 실시에 17에 개략된 스크리닝에서 동정된 소분자(이하, "억제성 소분자"라 명명함)를 가지고 생체내에서도 LIPG 폴리펩타이드를 억제할 수 있는지 시험하였다. 소분자를 야생형 마우스 및 LIPG 형질전환된 마우스에게 경구(경구적으로 생체이용가능한 경우) 투여하거나 또는 정맥내 주사하여 조사한다. LIPG 폴리펩타이드의 활성은 헤파린을 주사(결합된 부위로부터 효소를 방출시키기 위함)하기 전과 후에 측정한다. 또한, 콜레스테롤, VLDL, LDL 및 HDL 콜레스테롤 및 apoA-I 수준을 억제성 소분자가 투여된 동물에서 모니터한다. 마지막으로, LDL 수용체 결손형 마우스에게 죽상유발성 식이를 공급하고 억제성 소분자 또는 위약을 8주 동안 투여한다. 마우스의 대동맥에서 죽상동맥경화증을 정량하여 억제성 소분자의 투여가 죽상동맥경화증의 진행을 감소시키거나 퇴행을 유도하는지를 측정하였다. 이러한 예비임상적 데이터를 기초로 하여, HDL 콜레스테롤 수준을 증가시키고, VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키며(또는) 죽상동맥경화증의 진행을 억제하는 억제성 소분자의 활성에 대하여 햄스터, 토끼 또는 돼지와 같은 추가 동물 모델을 대상으로 시험할 수 있다.
- <345> 바람직한 성질을 나타내는 것으로 밝혀진 억제성 소분자는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 환자에게 투여될 수 있다. 억제성 소분자는 환자에게 다양한 방식, 예컨대 경구 투여 및 정맥내 주사를 통해 투여될 수 있다. 환자의 HDL, VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수준은 모니터하여 억제성 소분자의 효능을 측정하고 투여량과 투여 프로토콜을 최적화한다.
- <346> 실시에 19 - 억제성 펩타이드 동정 방법
- <347> 치료 펩타이드는 LIPG 폴리펩타이드의 단편을 시험하여, 즉 이 단편이 시험관내에서 LIPG 폴리펩타이드의 활성을 억제하는지를 측정하여 동정한다. 동정되면, "억제성 펩타이드"를 그 다음 생체내에서 LIPG 폴리펩타이드를 억제하는 능력에 대하여 시험한다. 억제성 펩타이드는 이. 콜라이 중에서 재조합적으로 생산되고 당업자에게 공지된 방법에 의해 정제될 수 있다. 억제성 펩타이드의 효과는 억제성 펩타이드를 정맥내 주사로 투여하여 야생형 마우스 및 LIPG 형질전환된 마우스에 대하여 조사한다. LIPG 폴리펩타이드의 활성은 헤파린을 주사하기 전과 후(결합 부위로부터 효소를 방출시키기 위함)에 혈장을 가지고 측정한다. 또한, 콜레스테롤, VLDL, LDL 및 HDL

콜레스테롤 및 apoA-I 수준을 억제성 펩타이드가 투여된 동물에서 모니터링한다. 마지막으로, LDL 수용체 결손형 마우스에게 죽상유발성 식이를 공급하고 억제성 펩타이드 또는 위약을 8주 동안 투여한다. 마우스의 대동맥에서 죽상동맥경화증을 정량하여 억제성 펩타이드의 투여가 죽상동맥경화증의 진행을 감소시키거나 퇴행을 유도하는지를 측정하였다. 이러한 예비임상적 데이터를 기초로 하여, HDL 콜레스테롤 수준을 증가시키고, VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수준을 감소시키며(또는) 죽상동맥경화증의 진행을 억제하는 억제성 소분자의 능력에 대하여 햄스터, 토끼 또는 돼지와 같은 추가 동물 모델을 대상으로 시험할 수 있다.

<348> 바람직한 성질을 나타내는 것으로 밝혀진 억제성 펩타이드는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 환자에게 투여될 수 있다. 억제성 펩타이드는 환자에게 다양한 방식, 예컨대 경구 투여 및 정맥내 주사를 통해 투여될 수 있다. 환자의 HDL, VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수준은 모니터링하여 억제성 펩타이드의 효능을 측정하고 투여량과 투여 프로토콜을 최적화한다.

<349> 실시예 20 - 안티센스 치료 방법

<350> LIPG cDNA 서열의 약 20개 염기에 각각 상보적인 일련의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표준 기법으로 화학적으로 합성한다. 치료용으로 사용하기에 가장 효과적인 올리고뉴클레오타이드를 측정하기 위하여 각 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표준 형질감염 프로토콜에 따라 LIPG 유전자를 발현하는 세포를 각각 형질감염시킨다.

<351> 올리고뉴클레오타이드로 형질감염시킨 지 약 24 내지 48시간 후, 세포 중의 LIPG mRNA 수준은 정량적 PCR, 노던 블롯, RNase 보호 또는 다른 적당한 방법으로 측정한다. 대안적으로, LIPG 발현은 효과적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 선별하는데 사용할 수 있는 특정 항체로 모니터링할 수 있다. LIPG mRNA 수준을 효과적으로 감소시키는 올리고뉴클레오타이드는 치료제로서 생체내 전달용으로 조제한다.

<352> 안티센스 LIPG 서열은 유전자 요법 벡터, 예컨대 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스, 레트로바이러스, 나출 DNA 또는 전술한 기타 다른 시스템으로 전달할 수 있다. 이러한 단편은 유전자 치료 벡터로 전달하는 경우에는 치료적으로 사용될 수 있다. 이러한 재조합 벡터의 간 발현이 바람직한 시도이다. 대안적으로, 합성 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전술한 바와 같이 치료제로서 생체내 전달용으로 조제할 수 있다.

<353> 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 다음과 같은 경로로 투여할 수 있다: 정맥내, 경피, 피내, 폐, 경구, 심실내, 척수강내 및 국소 경로. 투여 경로는 혈관 벽(즉, 내피 및/또는 혈관의 평활근)으로의 직접 투여를 포함할 수 있다. 한 가지 예로서, 낮은 HDL-C를 보유한 환자에게는 효과적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 0.5 내지 2mg/kg을 최고 2 내지 3주 동안 격일로 정맥내 주입하여 투여할 수 있다. LIPG가 간에서 발현된다면 문맥의 혈행으로 안티센스 시약을 전달하는 것이 바람직하다. 이것은 올리고뉴클레오타이드를 아시알로당단백과 같은 간 표적화 잔기와 접합시키거나 복합체화시켜 실시할 수 있다. 치료 투여량 및 시기는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 반감기, 특이성 및 독성학과 같은 변수 뿐만 아니라 안티센스 전달의 효능에 따라 달라질 수 있다.

<354> HDL-C의 증가는 표준 임상적 실험 절차를 사용하여 모니터링할 수 있다. HDL-C가 35mg/dl 이상을 유지하도록 필요한 만큼 최초의 투여 계획(전술한 바와 같음)을 반복한다.

<355> 실시예 21 - 리보자임 치료 방법

<356> LIPG cDNA 서열에 기초하여, LIPG mRNA 수준을 효과적으로 감소시키는 해머헤드 리보자임을 제조한다. 이 리보자임은 촉매성 잔기에 의해 분리된, LIPG mRNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열의 각각 6 내지 7개의 염기로 이루어진 2개의 "암(arm)"으로 구성된다. 이러한 해머헤드 모티프의 예는 문헌[Rossi et al., 1992, Aids Research and Human Retroviruses, 8, 183]에 개시되어 있다. 이 리보자임은 적당한 DNA 벡터로부터 진핵 세포 중에서 발현된다.

<357> 이 리보자임은 전술한 바와 같이 리포솜에 캡슐화하여 투여할 수 있다.

<358> 리보자임/리포솜 조성물은 직접 주사하거나 카테터, 주입 펌프 또는 스텐트를 이용하여 간으로 전달한다. 투여 경로로는 혈관 벽(즉, 내피 및/또는 혈관 평활근)으로의 직접 투여를 포함할 수 있다. 환자는 약제학적으로 효과적인 담체 중의 리보자임 5 내지 50 mg/kg/일도로 최고 2주 동안 치료한다. HDL-C의 증가 및 투여량 섭생은 안티센스 올리고뉴클레오타이드에서와 같이 모니터링하고 측정한다.

<359> 실시예 22 - 중화 항체 치료 방법

- <360> 항LIPG 항체, 항체 단편 또는 실시예 12에서와 같이 제조된 하나 이상의 LIPG 결합 부분으로 이루어진 키메라 항체를 사용하여 생체내에서 LIPG 활성을 억제시킨다. 이 항체는 환약으로만 전달하거나 일정 시간 동안 주입하거나 또는 환약과 일정 시간 동안의 주입액으로서 투여할 수 있다. 일반적으로, 환약으로서 0.2 내지 0.6mg/kg의 투여량을 제공하는 다음 2 내지 12시간의 주입 시간 동안 투여할 수 있다. 또는, 복수의 환약 주사를 격일 또는 3일마다 또는 4일마다 LIPG를 감소시키고 HDL-C를 상승시키는데 필요한 만큼 투여할 수도 있다. HDL-C 수치를 측정하여 결정된 바와 같이 반복 투여를 수행한다. 또한, LIPG에 대한 항체도 생체내에서의 발현을 용이하게 하기 위한 유전자 요법의 비히클을 통해 전달할 수 있다. 항체의 발현 수준은 HDL-C 수치를 측정하여 간접적으로 결정하거나 필요한 경우 추가의 벡터를 사용할 수도 있다.
- <361> 실시예 23 - 억제성 분자 또는 인헨서 분자의 사용
- <362> 본래의 LIPG에 대한 결합 경쟁으로 LIPG 활성을 억제할 수 있는 LIPG 단백질의 단편, 필요한 공동활성인자 분자, 세포 표면 수용체 또는 결합 단백질을 치료 재조합 단백질로서 전달하거나 또는 유전자 요법의 벡터를 통해 전달할 수 있다.
- <363> 한 가지 예로서, LIPG에 근거한 LLGN 폴리펩타이드를 문헌[Tsukamoto et al., J. Clin. Invest., 100, 107-114 (1997); Tsukamoto et al., J. Lipid Res., 38, 1869-1876 (1997)]에 기재된 바와 같이 재조합 아데노바이러스로 클로닝한다. LLGN cDNA는 서틀 플라스미드 벡터 pAdCMVLink1에 클로닝하였다. 제한 분석으로 적당한 배향을 스크리닝한 후, 플라스미드를 NheI로 선형화하고, ClaI로 분해한 아데노바이러스 DNA와 함께 293 세포를 공동형질감염시켰다. 세포를 한천 상에 도말하고 37°C에서 15일 동안 항온배양하였다. 플라크를 취하여 PCR 스크리닝하였다; cDNA 양성 플라크는 플라크 정제를 2회 실시하였다. cDNA의 존재를 확인한 후, 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 37°C하에 증식시켰다. 세포 용해물을 사용하여 HeLa 세포를 감염시키고 조건 배지의 웨스턴 블롯으로 사람 EL의 발현을 확인하였다. 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 더욱 증식시키고 세슘 클로라이드 초원심분리로 정제하였다. 정제된 바이러스는 10% 글리세롤/PBX에서 -80°C하에 저장하였다. 환자에게는 재조합 아데노바이러스  $1 \times 10^{11}$  입자(약  $2 \times 10^9$  pfu)를 정맥내 주사하였다.
- <364> 실시예 24 - 발현 벡터로부터의 LIPG의 발현에 의한 환자내 LIPG의 수치를 증가시키는 방법
- <365> 사람 LIPG를 암호화하는 재조합 아데노바이러스[Tsukamoto et al., J. Clin. Invest., 100, 107-114 (1997); Tsukamoto et al., J. Lipid Res., 38, 1869-1876 (1997)]내로 전장의 LIPG cDNA를 클로닝하였다. 전장의 사람 LIPG cDNA를 서틀 플라스미드 벡터 pAdCMVLink1에 클로닝하였다. 제한 분석으로 적당한 배향을 스크리닝한 후, 플라스미드를 NheI로 선형화하고, ClaI로 분해한 아데노바이러스 DNA와 함께 293 세포를 공동형질감염시켰다. 세포를 한천 상에 도말하고 37°C에서 15일 동안 항온배양하였다. 플라크를 취하여 PCR 스크리닝하였다; cDNA 양성의 플라크는 플라크 정제를 2회 처리하였다. cDNA의 존재를 확인한 후, 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 37°C하에 증식시켰다. 세포 용해물을 사용하여 HeLa 세포를 감염시키고 조건 배지의 웨스턴 블롯으로 사람 LIPG 폴리펩타이드의 발현을 확인하였다. 재조합 아데노바이러스(AdhEL)는 293 세포에서 더욱 증식시키고 염화세슘 초원심분리로 정제하였다. 정제된 바이러스는 10% 글리세롤/PBX에서 -80°C하에 저장하였다. 환자에게는 AdhEL 또는 Adnu11  $1 \times 10^{11}$  입자(약  $2 \times 10^9$  pfu)를 정맥내로 주사하였다.
- <366> 실시예 25 - 전장의 야생형 또는 유전자조작된 재조합 LIPG 단백질의 투여에 의한 LIPG 활성 수치를 증가시키는 방법
- <367> 야생형 LIPG 단백질은 VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수치를 감소시키며, LIPG는 HDL 콜레스테롤에 영향을 미치지 없이 VLDL 및 LDL 콜레스테롤에 특이적으로 작용하도록 유전자조작할 수 있다. 야생형 또는 유전자조작된 재조합 LIPG의 투여는 몇몇 경우에는 VLDL 및/또는 LDL 콜레스테롤의 수치를 감소시키기 위한 치료법으로서 사용될 수 있다. 야생형 및/또는 가공된 LIPG 단백질("재조합 LIPG 단백질")은 이. 콜라이에서 재조합적으로 생산되고 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 정제될 수 있다. 야생형 마우스에게 재조합 LIPG 단백질을 정맥내 주사하여 연구할 수도 있다. LIPG의 활성은 혈장에서 측정한다. 또한, 재조합 LIPG 단백질을 투여한 동물에서 콜레스테롤, VLDL, LDL 및 HDL 콜레스테롤 및 apoA-I 수치를 모니터링한다. 마지막으로, LDL 수용체 결손형 마우스에게 죽상유발성 식이를 공급하고 재조합 LIPG 단백질 또는 위약을 8주 동안 투여한다. 마우스의 대동맥에서 죽상동맥경화증을 정량하여 재조합 LIPG 단백질의 투여가 죽상동맥경화증의 진행을 감소시키거나 퇴행을 유도하는지를 측정하였다. 이러한 예비임상적 데이터를 기초로 하여, VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수치를 감소시키며(시키거나) 죽상동맥경화증의 진행을 억제하는 재조합 LIPG 단백질의 활성에 대하여 햄스터, 토끼 또는 돼지와 같은 추가 동물 모델을 대상으로 시험할 수 있다. VLDL 및 LDL 콜레스테롤 수치를 감소시키며(시키거나) 죽상동맥경

화중의 진행을 억제하는 목적하는 능력을 나타내는 것으로 밝혀진 재조합 LIPG 단백질은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 혼합하여 환자에게 투여될 수 있다. 재조합 LIPG 폴리펩타이드는 다양한 방식, 예컨대 경구 투여 및 정맥내 주사를 통해 투여될 수 있다.

- <368> 본 명세서에 제시된 모든 참조문헌은 참조로서 인용된 것이다.
- <369> 본 발명을 용이하게 이해할 수 있는 당업자는 본 명세서에 제시된 것 뿐만 아니라 전술한 목적을 실시하고 결과와 잇점을 획득하기 위하여 본 발명을 변형시킬 수 있다. 본 명세서에 개시된 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 방법, 절차 및 기법은 바람직한 구체적인 예를 대표로 하여 제시하였으나, 예시적인 것으로서 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 본 발명의 범위에 포함되거나 첨부되는 청구의 범위에 의해 한정되는 본 발명의 변형 및 기타 다른 용도는 당업자에 의해 실시 가능할 것이다.
- <370> 실시예 26 - LIPG의 당화 및 생물학적 활성의 입증
- <371> LIPG의 특성을 추가 규명하기 위하여 다수의 실험을 실시하였다. 이하의 실험은 LIPG(본 실험과 도면에서는 "내피 리파제" 또는 "EL"이라 명명함)의 생물학적 활성을 나타낸 것이다.
- <372> 도 24는 내피 리파제가 당단백질임을 입증한 것이다. EL은 글리코시다제 EndoF, EndoH 및 뉴라미니다제로 처리하였다. 그 결과, 웨스턴 블롯을 통해 EL 밴드 크기의 감소를 확인할 수 있었고, 이는 폴리펩타이드쇄로부터 탄수화물이 제거된 경우와 일치하는 결과였다. 당화 역시 EL 발현 세포에서 투니카마이신으로 억제하였다. 그 결과, EL 밴드 크기의 실질적인 감소가 나타났다. 글리코시다제 및 투니카마이신 실험은 EL 이 당단백질을 시사한다.
- <373> 도 25는 내피 리파제가 헤파린 결합 단백질임을 입증한 것이다. EL AdhEL(실시예 15)을 발현하는 아데노바이러스 벡터를 마우스에게 주사하였다. 헤파린을 주사하기 전(pre)과 후(post)에 혈액을 채취하였다. 전장의 68kD EL 밴드의 강도가 헤파린 주사 후 크게 증가하였는데, 이것은 EL 이 헤파린 설페이트 프로테오글리칸에 결합되어 있고 헤파린 투여시 방출된다는 추정과 일치하는 것이다.
- <374> 도 26a 및 26b와 도 27a 및 27b는 지단백질 리파제(LPL) 및 간 리파제(HL)에 상대적인 내피 리파제의 지질분해 활성을 예시한 것이다. 이 실험은 내피 리파제가 트리글리세라이드(TG) 리파제 활성이 있는지를 측정하기 위한 것이다(도 27a). 여러 조건 배지에 대한 복수 연구에서, TG 리파제 활성의 명확한 증거가 반복적으로 관찰되었다. 내피 리파제의 포스포리파제 활성은 동일한 조건 배지 시료에서 분석하였다(도 27b). TG 리파제 활성에 대한 포스포리파제 활성의 비는 여러 조건 배지에서 분석된 바와 같이 매우 일정하였다. 절대치로서, 조건 배지 부피당 생산된 지방산의 몰은 TG 리파제 활성 보다 포스포리파제 활성에 의해 훨씬 높게 나타났다. 그 다음 혈청이 내피 리파제 활성에 영향을 미치는 지를 시험하였다(도 27a 및 도 27b). 예상한 바와 같이, 혈청 부가는 다른 apoC-II 공급원의 부재하에 지단백질 리파제 TG 리파제 활성을 유의적으로 증가시켰다. 흥미롭게도, 혈청은 내피 리파제의 활성을 재현성있게 실질적으로 감소시켰다. 이것은 apoC-II 또는 다른 혈청 인자도 내피 리파제의 보조인자로서 필요하지 않다는 것을 입증하는 것이다. 또한, 혈청 중에는 내피 리파제의 내인성 억제제가 존재함을 시사한다.
- <375> 도 28a 및 도 28b는 EL의 발현이 헤파린 부가 후 혈장 포스포리파제 활성을 용량 의존적 방식으로 증가시킨다는 것을 예시한 것이다. AdhEL을 3가지 용량 ( $1 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{10}$  또는  $1 \times 10^{10}$  입자)으로 마우스에게 주사한 결과 헤파린 주사후 혈장내에 EL 단백질이 존재하는 것으로 나타났다. 68kD 및 40kD의 주요 밴드와 55kD의 소수 밴드가 관찰되었다(도 28a). 68kD 밴드는 EL의 전장의 당화 형태이고 40kD는 단백질 가수분해성 단편으로 사료된다. 웨스턴 블롯으로 측정된 혈장내 EL 단백질의 양은 주사된 벡터의 용량에 비례하였다(도 28b). 여러 수준의 사람 EL의 발현은 Adnu11 주사된 마우스와 비교했을 때 헤파린 주사 후 혈장 포스포리파제 활성을 상당히 용량 의존적으로 증가시켰다(각각  $9779 \pm 733$ ,  $6501 \pm 1299$ ,  $3963 \pm 796$  nmol/ml/hr 대  $952 \pm 258$  nmol/ml/hr). 헤파린 주사 후 포스포리파제 활성은 68kD( $r=0.98$ ,  $P<0.01$ ), 55kD( $r=0.83$ ,  $P<0.05$ ) 및 40kD( $r=0.94$ ,  $P<0.05$ ) 밴드에 해당하는 사람 EL 단백질의 수준과 상호 관련이 있었다.

**도면의 간단한 설명**

- <52> 도 1은 예시된 PCR 증폭에 사용된 프라이머의 서열(서열 17 내지 31)을 나타낸다.
- <53> 도 2는 LIPG 유전자 cDNA를 함유하는 차동 디스플레이 RT-PCR 산물의 핵산 서열(서열 1) 및 추정 아미노산 서열

(서열 2)을 나타낸다. 증폭에 사용된 2개의 프라이머에 상응하는 서열은 밑줄로 표시되고 있다. 종결 코돈 및 폴리아데닐화 시그널은 박스로 표시되고 있다. GAATTC 모티프 및 플랭킹 서열은 상기 산물이 클로닝된 pCRII 벡터로부터 유래된 것이다.

- <54> 도 3은 LIPG cDNA의 5'RACE 신장의 핵산 서열(서열 3) 및 추정 아미노산 서열(서열 4)를 보여준다. 증폭에 사용된 2개의 프라이머에 상응하는 서열은 밑줄로 표시되고 있다. GAATTC 모티프 및 플랭킹 서열은 상기 산물이 클로닝된 pCRII 벡터로부터 유래된 것이다.
- <55> 도 4는 LIPG 유전자 LLGXL의 완전한 개방 판독 프레임을 함유하는 cDNA의 서열(서열 7)을 나타낸다. 출발 코돈(ATG)과 종결 코돈(TGA)은 박스로 표시되고 있다. 발현 벡터의 작제에 사용된 DraI 부위(TTAAA) 및 SrfI 부위(GCCCGGC)는 밑줄로 표시되고 있다.
- <56> 도 5는 LLGXL 단백질의 추정 아미노산 서열(서열 8)을 나타낸다. 추정된 시그널 서열은 밑줄로 표시되고 있다.
- <57> 도 6은 트리아실글리세롤 리파제 유전자 패밀리의 구성원들의 단백질 서열의 배열을 나타낸다(서열 13 내지 15). 그림자로 표시된 잔기는 LLGXL 단백질(서열 8)과 동일하다. 사람 LIPG(EL)의 추정 아미노산 서열은 상부 라인에 기술되어 있고 TG 리파제 패밀리의 다른 주요 구성원인 LPL, HL 및 PL과 비교되어 있다. TG 리파제 패밀리의 하나 이상의 다른 구성원에 있는 것과 동일한 EL 잔기는 다른 패밀리의 구성원에서의 상응하는 잔기와 더불어 그림자로 처리되어 있다. 아미노산의 번호는 분비된 단백질의 최초 잔기로 시작하여 관례에 따라 지정된다. 시그널 펩타이드 절단에 대한 추정 부위는 아미노산 잔기사이에 실선으로 표시되고 있다. 활성 세린을 함유하는 GXSG 리파제 모티프는 박스로 표시되고 있다. 촉매 트리아드의 아미노산은 별표로 표시되어 있다. 보존된 시스테인은 검은 원형으로 표시되어 있다. 잠재적인 N-연결된 당화 부위는 화살촉으로 표시되어 있다. 리드 영역은 굵은 선으로 표시되어 있다. CLUSTAL 프로그램을 사용하여 배열 값을 최대로 하기 위해 서열내에 갭을 도입하였다.
- <58> 도 7은 THP-1 세포내의 LIPG mRNA의 노던 분석을 보여준다. 세포를 PMA 또는 PMA와 산화된 LDL(PMA+oxLDL)로 자극하였다. 좌측의 숫자는 RNA 표준물의 위치를 가리킨다(킬로염기 단위).
- <59> 도 8은 사람 조직내에서 LIPG mRNA의 발현을 LPL과 비교하여 노던-블롯 분석한 결과를 보여준다. 표시된 사람 조직으로부터의 mRNA를 함유한 블롯을 기술된 바와 같이 방사능표지된 LPL 및 β-액틴(ACTB) 프로브와 함께 배양하였다.
- <60> 도 9는 배양된 세포주의 노던-블롯 분석 결과를 보여준다. 좌측의 패널(레인 1 내지 6)은 LIPG(EL) 프로브와 하이브리드화되었고 우측의 패널(레인 7 내지 12)은 LPL 프로브와 하이브리드화되었다. 레인 1 및 7은 비자극된 HUVEC, 레인 2 및 8은 PMA로 자극된 HUVEC, 레인 3 및 9는 트롬빈으로 자극된 HUVEC, 레인 4 및 10은 비자극된 HCAEC, 레인 5 및 11은 PMA로 자극된 HCAEC, 레인 6 및 12는 PMA로 자극된 THP-1.
- <61> 도 10은 면역화 펩타이드의 서열(서열 16)과 이의 LLGXL 단백질 서열과의 관계를 나타낸다. 펩타이드는 그림자 처리된 박스로 나타나 있다. 캐리어 단백질에 펩타이드의 연결을 보조하기 위해 말단 시스테인을 도입하였다.
- <62> 도 11은 HUVEC 및 HCAEC가 배양된 조건 배지를 토끼 항-EL 펩타이드 항혈청과 함께 면역블롯 분석한 후 수득한 결과를 나타낸다. 레인 1은 비조건 배지, 레인 2는 비자극된 HUVEC, 레인 3은 PMA로 자극된 HUVEC, 레인 4는 비자극된 HCAEC, 레인 5는 PMA로 자극된 HCAEC이다.
- <63> 도 12는 LLGN 또는 LLGXL에 대한 cDNA를 함유하는 발현 벡터로 일시적인 형질감염된 또는 DNA가 없는(mock) COS-7 세포가 배양된 조건 배지중의 헤파린-세파로즈 결합된 단백질의 웨스턴 분석 결과를 나타낸다. PMA-자극된 내피 세포(HCAEC+PMA)로부터의 단백질이 크기 참조를 위해 포함되었다. 좌측의 숫자는 단백질 표준물과 비교하여 결정된 주요 면역반응성 단백질의 겔보기 분자량을 가리킨다.
- <64> 도 13은 토끼 LIPG PCR 산물의 서열(RLLG. 서열, 서열 12)과 토끼 LIPG PCR 산물과 사람 cDNA에서의 상응하는 서열(LLG7742A)사이의 서열의 배열을 나타낸다. 동일한 뉴클레오타이드는 그림자로 처리되어 있다.
- <65> 도 14는 포스파티딜콜린 기질을 사용하여 사람 EL-AS, EL 및 LPL의 포스포리파제 A 활성을 나타낸 것이다. 분석을 수행하기 위하여, pcDNA3.0/LIPG-AS, LIPG 또는 LPL 발현 작제물로 일시적으로 형질감염시킨 COS-7 세포로부터 수거한 조건 배지 700μl를 하기 기술되는 포스포리파제 활성에 대하여 3회 반복으로 분석하였다. 37°C에서 2시간 동안 항온처리한 후 반응을 종결시키고 14C 표지된 유리 지방산을 추출하고, 계수하여 생성된 유리 지방산의 양을 측정하였다.

- <66> 도 15는 트리올레인 기질을 사용하여 사람 EL-AS, EL 및 LPL의 트리아실글리세라이드 리파제 활성을 나타낸 것이다. 분석을 수행하기 위하여, pcDNA3.0/LIPG-AS, LIPG 또는 LPL 발현 작제물로 일시적으로 형질감염시킨 COS-7 세포로부터 수거한 조건 배지 700 $\mu$ l를 하기 기술되는 트리글리세라이드 활성화에 대하여 3회 반복적으로 분석하였다. 37°C에서 2시간 동안 항온처리한 후 반응을 종결시키고 14C 표지된 유리 지방산을 추출하고, 계수하여 생성된 유리 지방산의 양을 측정하였다.
- <67> 도 16은 여러 종에서 유래되는 게놈 DNA에 대한 LIPG 프로브 및 LPL 프로브의 하이브리드화를 나타낸 것이다.
- <68> 도 17은 AdhEL을 주사한 지 5일 후 야생형 마우스의 간에서 나타나는 LIPG의 발현을 도시한 것이다. 레인 1, Adnu11 주사된 마우스 유래의 간; 레인 2, AdhEL 주사된 마우스 유래의 간.
- <69> 도 18은 AdhEL 및 Adnu11 주사된 야생형 마우스에 있어서 HDL 콜레스테롤의 혈장 수준을 도시한 것이다.
- <70> 도 19는 AdhEL 및 Adnu11을 주사한 야생형 마우스에서 나타나는 주사하기 전(좌)과 주사한지 14일 후(우)의 지단백질 프로필을 도시한 것이다.
- <71> 도 20은 Adnu11 또는 AdhEL을 주사한 후 사람 apoA-I 형질전환된 마우스에서 나타나는 HDL 콜레스테롤 수준을 도시한 것이다.
- <72> 도 21은 Adnu11 또는 AdhEL을 주사한 후 사람 apoA-1 형질전환된 마우스에서 나타나는 ApoA-I 수준을 도시한 것이다.
- <73> 도 22는 LDL 수용체 결손형 마우스에게 AdhEL을 주사한 후 나타나는 VLDL/LDL 콜레스테롤 수준에 미치는 영향을 도시한 것이다.
- <74> 도 23은 HDL 수용체 결손형 마우스에게 미치는 HDL 콜레스테롤 수준에 대한 AdhEL의 효과를 도시한 것이다.
- <75> 도 24는 EL에 대한 글리코시다제 및 투니카마이신의 효과를 입증하는 LIPG(EL)의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 레인은 좌측에서부터 우측으로 다음과 같은 성분을 나타낸다: 미처리 EL 대조군; EndoF-처리된 EL; EndoH-처리된 EL; 뉴라미니다제 처리된 EL; 마커, 혈장 시료; EL 미처리 용균물; EL 투니카마이신 처리된 용균물; EL 미처리된 펠릿; EL 투니카마이신 처리된 펠릿; EL 미처리된 배지; EL 투니카마이신 처리된 배지, 마커; 혈장.
- <76> 도 25는 헤파린 투여시 EL에 미치는 효과를 예시하는 웨스턴 블롯이다. "Pre" 레인은 헤파린 주사 전에 마우스에서 채취한 혈액 시료이고; "post" 레인은 헤파린 주사 후 채취한 혈액 시료이다. "대조군 바이러스"에는 EL을 부가하지 않았다; "EL 바이러스"는 EL을 발현하는 아데노바이러스 벡터이다.
- <77> 도 26a 및 도 26b는 LPL(지단백질 리파제), HL(간 리파제) 및 EL(내피 리파제)의 트리글리세리다제 활성화(도 26a) 및 포스포리파제 활성화(도 26b)를 예시하는 막대 그래프이다.
- <78> 도 27a 및 도 27b는 지단백질 리파제 트리글리세리다제 활성화(도 27a) 및 내피 리파제 트리글리세리다제 활성화(도 27b)에 미치는 사람 혈청의 효과를 예시하는 그래프이다.
- <79> 도 28a 및 도 28b는 여러 바이러스 투여량에서의 EL의 발현을 예시한 것이다. 도 28a는 여러 바이러스 투여량에서 존재하는 EL을 예시하는 웨스턴 블롯이다. 도 28b는 여러 바이러스 투여량에서 포스포리파제 활성을 예시한 것이다.

도면

도면1

- A. 차동 디스플레이 하류 프라이머 7: (서열 17)  
5'TTTTTTTTTTTGA3'
- B. 차동 디스플레이 상류 프라이머 15: (서열 18)  
5'GATCAATCGC3'
- C. 5'RACE 프라이머 2a: (서열 19)  
5'TAGGACATGCACAGTGTAAATCTG3'
- D. 5'RACE 프라이머 3a: (서열 20)  
5'GATTGTGCTGGCCACTTCTC3'
- E. 5'RACE 프라이머 4a: (서열 21)  
5'GACACTCCAGGGACTGAAG3'
- F. 5'RACE 앵커 프라이머 (서열 22)  
5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG3'
- G. 5'RACE 보편 증폭 프라이머 (서열 23)  
5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC3'
- H. 5'LPL Primer: (서열 24)  
5' ACCACCATGGAGAGCAAAGCCCTG3'  
-사람 LPL 암호화 서열의 출발 코돈은 밑줄침
- I. 3'LPL 프라이머 (서열 25)  
5' CCAGTTTCAGCCTGACTTCTTATTC3'  
-LPL 암호화 서열의 종결 코돈에 대한 상보체는 밑줄침
- J. 프라이머 DLIP774: (서열 26)  
5'GGCTGTGGACTCAACGATGTC3'
- K. 프라이머 LLGen2a: (서열 27)  
5'CCGGGTGGGTAGGTACATTTTG3'
- L. Hllg-gsp1 프라이머 5' GGG GGT GAC TTC CAG CCA GGC TGT G 3'  
(도 4의 뉴클레오타이드 772 내지 796, 서열 28)  
Hllg-gsp2a 프라이머 5' AAC TCT GAA AGG CAT GCC TGC CCG G 3'  
(도 4의 뉴클레오타이드 1053 내지 1077의 역 상보체, 서열 29)  
G3PDH 5' 프라이머 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3'  
(서열 30)  
G3PDH 3' 프라이머 5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'  
(서열 31)

PCR 프라이머

도면2

GAATTCCGCTTATGAAATGGTTTCAGAAAGGCGAATCTGTCTGACCTGCTCCCGACAGACCCTGTGTAAATGACATTCGCTACCAATGCCCAAGAAATGAGGACACAGGSAACACCAAAATGTACCTAAAAAACCCGGGCTAG  
 EFGGLINRFKKGICLSCKNRCSIGYNAKNRNKRNSKNYLKTRA  
 CCTTCCAGGATACCTTCAGTCCCTGSAATGTCCCTGAGAGGCTTAAATACCTCTCTAATACCATGCTCCAGAGGAGGACACATCCTAGCCAGGAAAGTGGCCACACAAATCAAAATGGTTG  
 PFRGNLQSLSECPGRPLIPPSYHAAEQGTS.PRRSGQHNPILKSL  
 TGAATTCACATGCGATGCTGCGAAGGCAATCTTACAAATTTCCAGTGTGAGCCCTGAAAAAAAAAAGCCCAATTC  
 IRLHCACPRKGNLYKINSVDPSKKKSR I

387



도면4

GAATTCGGCGCCCGCTCGACGGCGGCTCAGGACGAGGGCAGATCTCGTTCTGGGGCAAGCCG  
 TTGACACTCGCTCCCTGCCACCGCCCGGGCTCCGTGCCGCCAAGTTTTTCATTTTCCACCTTCT  
 CTGCCTCCAGTCCCCAGCCCTGGCCGAGAGAAGGGTCTTACCGGCCGGGATTGCTGGAAA  
 ACCCAAGAGGTGGTTTTTGTITLITLAAAACCTCTGTCTTCTGGGAGGGGGTGGCCGGGGCAGG  
 ATGAGCAACTCCGTCTCTGCTCTGTTTCTGGAGCCTCTGCTATTGCTTTGCTGCGGGGAGCC  
 CCGTACCTTTTGGTCCAGAGGGACGGCTGGAAGATAAGCTCCACAAACCCAAAGCTACACAG  
 ACTGAGGTCAAACCATCTGTGAGGTTAACTCCGCACTCCAGGACCCAGAGCATGAAGG  
 ATGCTACTCTCCGTCCGOCACAGCCAGCCCTTAGAAGACTGCACTTTCAACATGACAGCTAA  
 AACCTTTTTCATCATTACGGATGGAAGATGAGCGGTATCTTTGAAAACCTGGCTGCACAACT  
 CGTGTCCAGCCCTGCACACAAGAGAGAAAAGACGCCAATGTAGTTGTTGGTTGACTGGCTCCCT  
 GGCCCAACAGCTTTACACGGATGCGGTCAATAATACCAGGGTGGTGGACACAGCATTGCCA  
 GGATGCTCGACTGGCTGCAGGAGAAGGACGATTTTTCTCTCGGAAATGTCCACTTGATCGGCT  
 ACAGCCTCGGAGCGCACGTGGCCGGGTATGCAGGCAACTTGTGAAAAGGAAACGGTGGCCGA  
 ATCACAGGTTTGGATCTGCGGGGCCATGTTTGAAGGGGCGACATCCACAAGAGGCTCTCT  
 CCGGACGATGCAGATTTTGGATGTTCTCCACACTACACCGTTCTTGGCTTGAGCATT  
 GGTATTCAGATGCCTGTGGCCACATTGACATCTACCCCAATGGGGGTGACTTCCAGCCAGGC  
 TGTGGACTCAACGATGCTTGGATCAATTGCATATGGAACAATCACAGAGGTGTAATAATGT  
 GAGCATGAGCGGACCGTCCACTCTTTGTGACTCTCTGGTGAATCAGGACAAGCCGAGTTT  
 GCCTTCCAGTGCACACTCAATCGCTTCAAAAAGGGGATCTGTGAGCTGCCGCAAGAAC  
 CGTTGTAATAGCATTGGCTACAATGCCAAGAAAATGAGGAACAAGAGGAACAGCAAAATGTA  
 CCTAAAAACCCGGCCAGGCATGCCCTTTCAGAGTTTACATTATCAGATGAAAATCCATGTCTT  
 CAGTTACAAGAACATGGGAGAAATGAGCCACCTTTAAGTCAACCTTTATGGCACTAATGC  
 AGATTCCAGACTCTGCCACTGGAAATAGTGGAGCGGATCGAGCAGAATGCCACCAACA  
 CCTTCTGTGCTACACOGAGGAGGACTTGGGAGACCTTTGAAGATCCAGCTCACTGGGAGG  
 GGGCCTCTCAGTCTTGGTACAACCTGTGGAAGGAGTTTCGCAGCTACCTGTCTCAACCCCGCA  
 ACCCGGACCGGAGCTGAATATCAGGGCATCCGGGTGAAGTCTGGGAAAACCCAGCGGAAA  
 CTGACATTTTGTACAGAAGACCTGAGAACACCCAGCATATCCCAAGCCGGAGCTCTGGTTT  
 CGCAAGTGTCCGGATGGCTGGAGGATGAAAACGAAACCCAGTCCACTGTGGAGCTTCC  
 TGGGGTGGCCCGGCAAGTCTTCCAGCAAGGCAGCAAGACTTCCGTCTATCCAAGCCCATG  
 GAGGAAAGTTACTGCTGAGGACCCACCAATGGAAGGATCTTCTCAGCCTTGACCCTGGAGC  
 ACTGGGAACAACCTGGTCTCCTGTGATGGCTGGGACTCCTCGGGGAGGGGACTGCGCTGCTAT  
 AGCTCTTGTCTGCCTCTTGAATAGCTCTAACTCCAACCTCTGTCCACACTCCAGAGCA  
 CCAAGTCCAGATTTGTGTGTAAGCAGCTGGGTGCTGGGCGCTCTCGTGCACACTGGATTGGT  
 TTCTCAGTTGCTGGGCGAGCCTGTACTCTGCTGACGAGGAACCGTGGCTCCGAAAGAGCCCT  
 GTGTAGAAGGCTGTGCTCAGCTGCTTTGAGCCTCAGTGAAGTCTTCCGACAGGA  
 GCTGACTCATGTGAGGATGGCAGGCTGGTATCTGTCTCGGGCCCTGGCTGTGGGGTCTCAT  
 GGGTGTCACTGACCATACTGCTTACGCTTAGCCATTCGGTCTGCTCCCGAGCTCATTTG  
 AAGCACACATCATTGGCTTCTATTTTCTGTTCATTTTAAATTGAGCAAAATGCTATTGAAC  
 ACTTAAATTAATTAGAATGTGTAATGGACATATTACTGAGCCCTCCATTTGGAACCCAGTG  
 GAGTTGGGATTTCTAGACCCCTTTCTGTGTTGGATGGTGTATGTATATGCATGGGGAAAGGC  
 ACCTGGGCGCTGGGGAGGCTATAGGATATAAGCAGTCGACGGCGCCGCAATTC

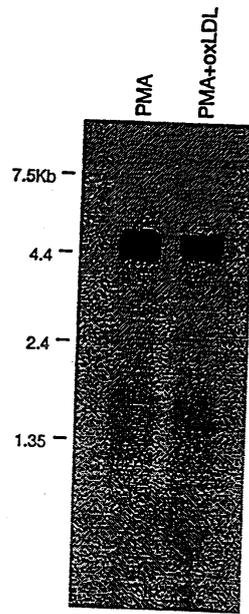
도면5

MSNSVPLLCFWSLCYCFAGSPVFFGPEGRLEDKHKPKATQTEVKPSVRFNLRITSKDPHEGCGY  
 LSVGHSQPLEDCSFNMTAKTFFIHWGWTMSGIFENWLHKLVSALHTREKDNVVDWVPLAHQL  
 YTDVAVNNRIVVGHISIRMLDWLQEKDDFSLGNVHLIGYSLGAHVAGYAGNFVKGTVGRITGLDP  
 AGPMFEGADIHKRLSPDDADFVDVLHTYIRSFGLSIGIQMPVGHIDIYPNGGDFQPGCLNDVLSI  
 AYGTITEVVKCEHERAVHLFVDSLVDKPSFAFQCTDSNRFKKHCISCRENRCNSIGYNAEKKM  
 RNKRNSKMYLKTACMPFRVYHYQMKIHVFSYKNMGEIETFYVILYGINADSOILPLEIVERIE  
 QNATNIFLVYTEEDLGDLLKIQLTWBGASQSWYNLWKEFRSYLSQPRNPGRELNRRIRVKSGETQ  
 RELTFCIEDPENTISISPGRELWFRKCRDGRMKNETSPTVELP

도면6

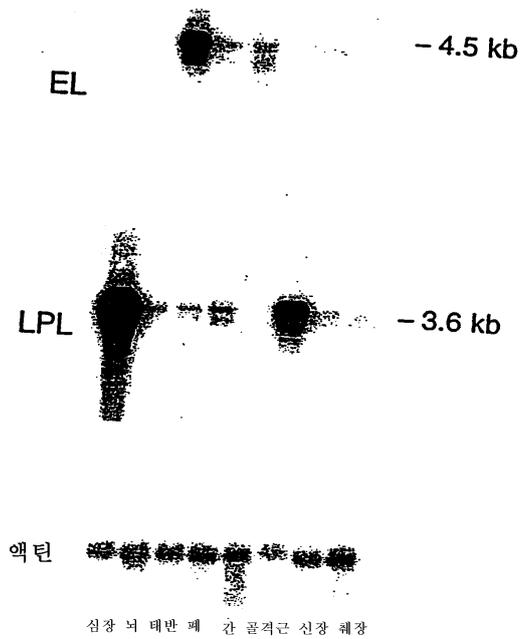
EL	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

도면7

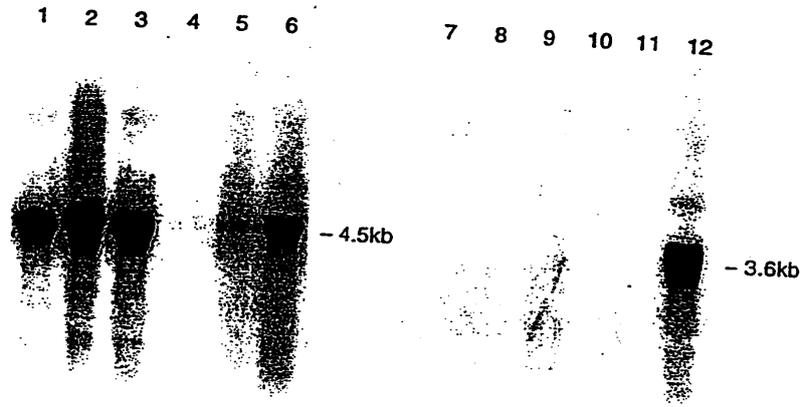


THP-1 세포로부터의 mRNA에 대한 노던 분석. 세포는 PMA 또는 PMA+산화된 LDL(PMA+oxLDL)로 자극시킨다. 좌측의 숫자는 RNA 표준(킬로염기 단위)의 위치를 나타낸다.

도면8



도면9

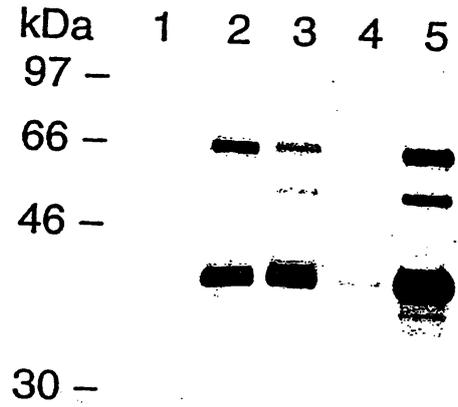


도면10

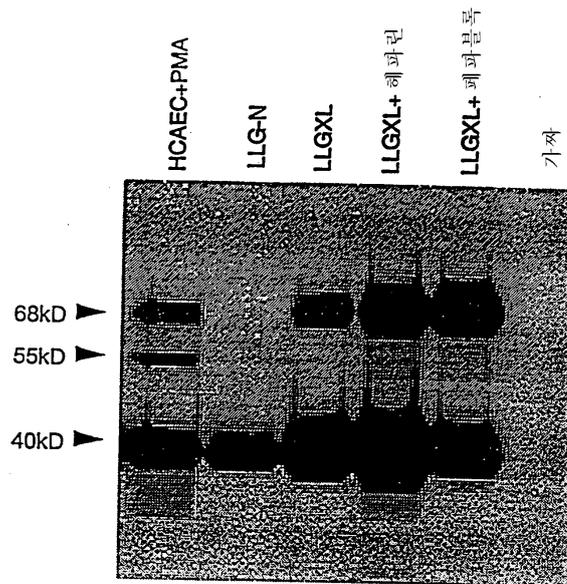
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 MSNSVPLLCFWSLCYCPAAGSPVFPPEGRLEDKLNKPKATQTEVKPSVRFNLRISKDPEHEGCYL  
 SVGHSQPLEDCSFNMTAKIFFIIHGWTMSGIFENWLNKLVSAHITREKDNANVVVDWVLAHQLY  
 TDAVNNIRVVGHSLARMLDWLQEKDDFSLGNVHLIGYSLGAHVAGYAGNFVKGTVGRITGLDPA  
 GPMFBGADIIKRLSPDDADFVDVLIHYTRSPGLSICQMPVGHIDIYPNGGDFQPGCGLNDVLSIA  
 YGITTEVVKCEHERAVHLFVDSLVDKPSFAFQCTDSNRFKKGICLSCRKNRNCNSIGYNNAKMR  
 NKRNSKMYLKTRAGMPFRVYHYQMKIHVFSYKNMGEIEPTFYVILYGTNADSQTLPLEIVERIQ  
 NATNIFLVYTEEDLGDLLKIQLTWEGASQSWYNLWKEFRSYLSQPRNPGRELNIRIRVKSGETQR  
 KLITCTEDPENISISPGRELWFRKCRDGRMKNETSPTVELP

LLGXL 단백질 서열과 항혈청 생산에 사용된 면역화 펩타이드의 상관관계. 펩타이드는 그림자 처리된 박스내에 나타낸다. 말단 시스테인은 펩타이드를 담체 단백질에 커플링시키는 것을 돕기 위해 도입되었다.

도면11

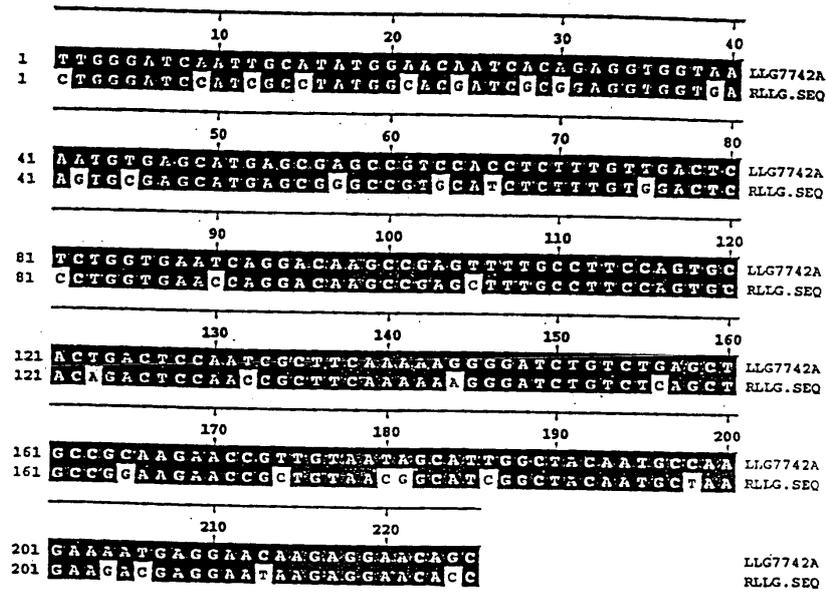


도면12



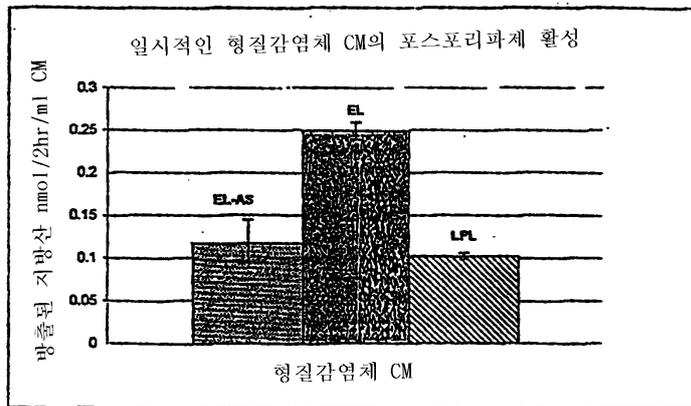
형질감염된 COS-7 세포로부터의 조건 매지에서 헤파린-세포로즈 결합 단백질의 웨스턴 분석. 세포는 LLGN cDNA 또는 LLGXL의 cDNA를 함유하거나 DNA를 함유하지 않는(가짜) 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. PMA-자극된 내피 세포(HCAEC+PMA)로부터의 단백질을 크기 참고용으로 포함시켰다. 좌측의 숫자는 단백질 표준에 대한 주요 면역반응성 단백질의 길모기 분자량을 나타낸다.

도면13



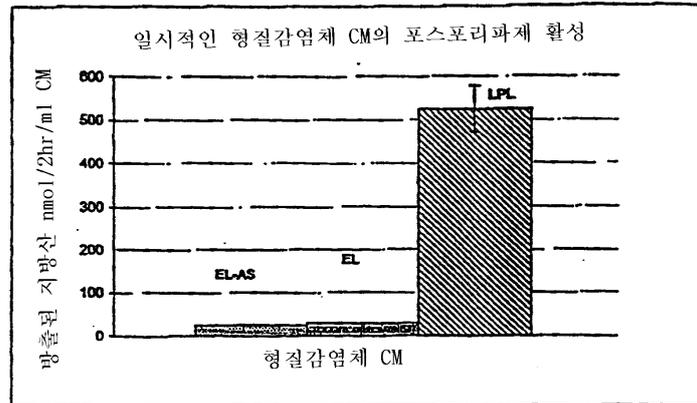
도면14

EL 트리글리세라이드 및 포스포리파제 활성

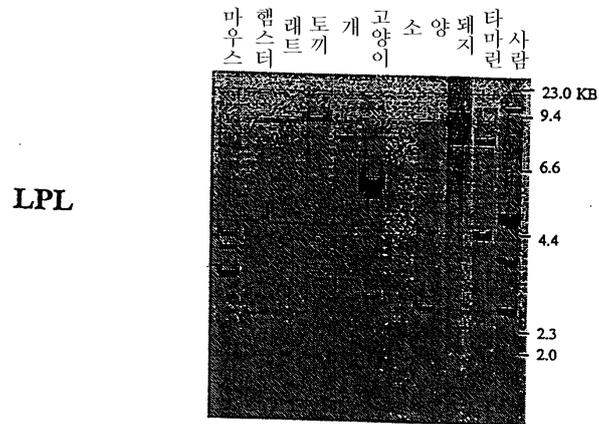
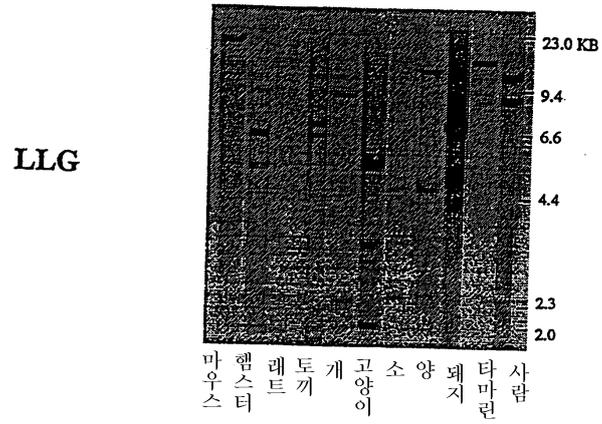


도면15

EL 트리글리세라이드 및 포스포리파제 활성

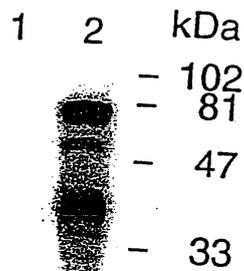


도면16

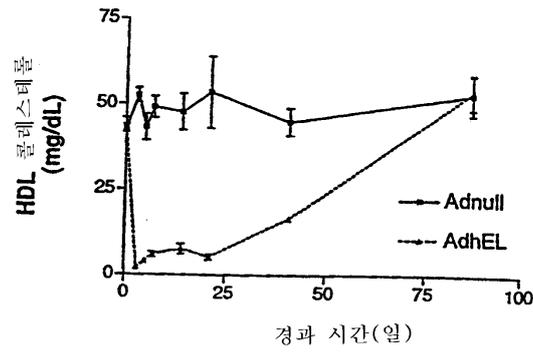


다양한 포유동물 중에서의 LLG 및 LpL 유전자의 서던 블롯

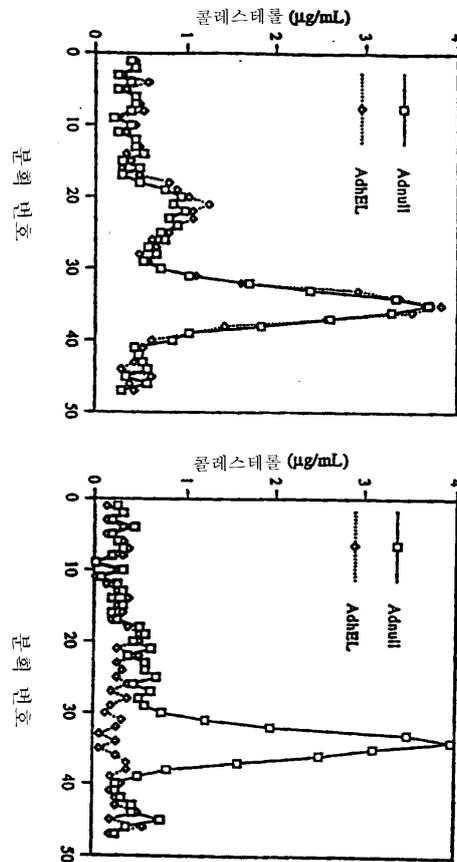
도면17



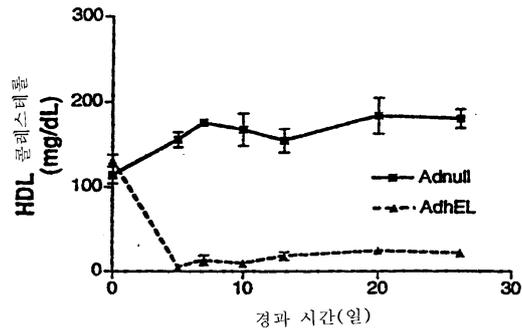
도면18



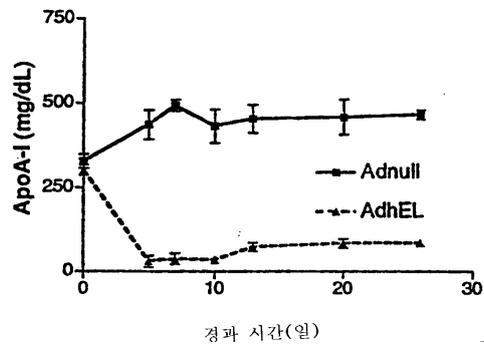
도면19



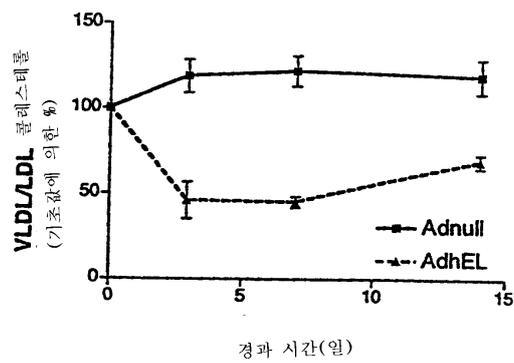
도면20



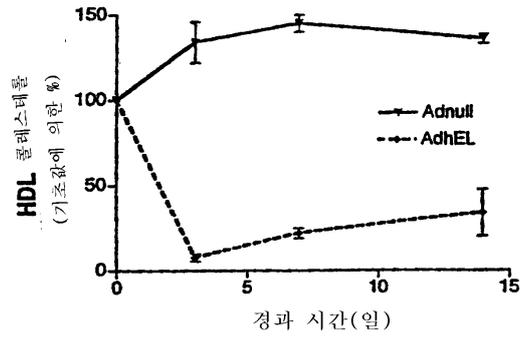
도면21



도면22



도면23

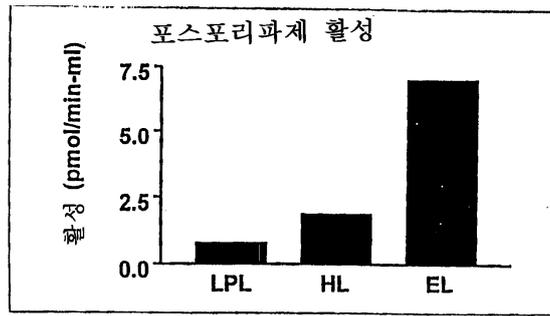


도면24



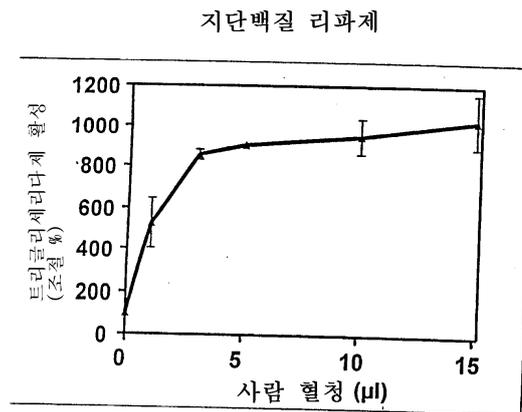


도면26b



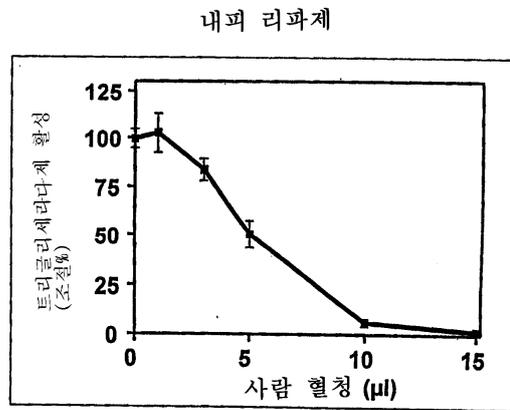
도면27a

LPL 및 EL의 리파제 활성에 대한 사람 혈청의 효과



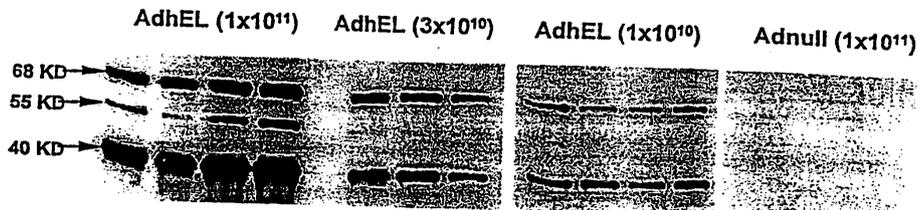
도면27b

LPL 및 EL의 리파제 활성에 대한 사람 혈청의 효과

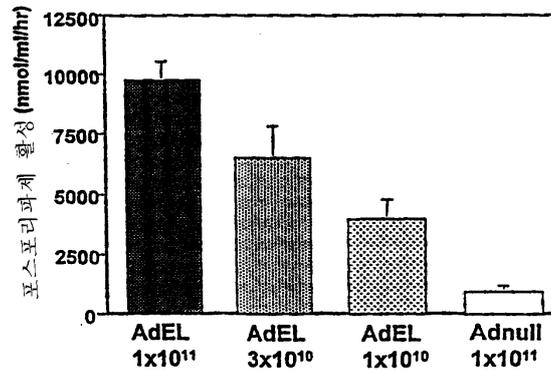


도면28a

EL의 발현은 투여량 의존적인 방식으로 hepatin 투여후 혈장 포스포리파제 활성을 증가시킨다



도면28b



서열목록

<110> Aventis Pharmaceuticals Products Inc.  
The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Compositions and methods for effecting the levels of high density lipoprotein(HDL) cholesterol and apolipoprotein AI, very low density lipoprotein(VLDL) cholesterol and low density lipoprotein (LDL) cholesterol

<150> US 09/277,401

<151> 1999-03-26

<160> 31

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 367

<212> DNA

<213> nucleic acid, double, linear

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(180)

<400> 1

gaattcggct tgatcaatcg c ttc aaa aag ggg atc tgt ctg agc 45  
Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser  
1 5

tgc cgc aag aac cgt tgt aat agc att ggc tac aat gcc aag aaa atg 93  
Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met  
10 15 20

agg aac aag agg aac agc aaa  
atg tac cta aaa acc cgg gca ggc atg 141  
Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met  
25 30 35 40

cct ttc aga ggt aac ctt cag tcc ctg gag tgt ccc tga ggaaggccct 190  
Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu Cys Pro \*  
45 50

taatacctcc ttcttaatac catgctgcag agcagggcac atcctagccc aggagaagtg 250  
gccagcaciaa tccaatcaaa tcgttgcaaa

tcagattaca ctgtgcatgt cctaggaaag 310  
ggaatcttta caaaataaac agtgtggacc cctcaaaaaa aaaaaaaagc cgaattc 367

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> amino acid, linear

<400> 2

Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser  
1 5 10 15

Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met  
20 25 30

Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser  
35 40 45

Leu Glu Cys Pro \*  
50

<210> 3

<211> 1382

<212> DNA

<213> nucleic acid, double, linear  
 <220>

<221> CDS  
 <222> (312)..(1370)  
 <400> 3

gaattcggct tctactacta ctaggccacg cgtcgcctag tacggggggg gggggggggg 60  
 tcagcgagtc cttgcctccc ggccggctcag gacgagggca gatctcgttc tggggcaagc 120  
 cgttgacaact cgtccctgc caccgcccg gctccgtgcc gccaaagtttt cattttccac 180  
 cttctctgcc tccagtcccc cagcccctgg ccgagagaag ggtcttaccc gccgggattg 240  
 ctggaaacac caagaggtgg tttttgtttt ttaaaacttc tgtttcttgg gaggggggtg 300  
 ggccggggcag g atg agc aac tcc gtt cct ctg ctc tgt ttc tgg  
 344

Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp

55 60  
 agc ctc tgc tat tgc ttt gct gcg ggg agc ccc gta cct ttt ggt cca 392  
 Ser Leu Cys Tyr Cys Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro  
 65 70 75 80

gag gga cgg ctg gaa gat aag ctc cac aaa ccc aaa gct aca cag act 440  
 Glu Gly Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr  
 85 90 96

gag gtc  
 aaa cca tct gtg agg ttt aac ctc cgc acc tcc aag gac cca 488  
 Glu Val Lys Pro Ser Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro  
 100 105 110

gag cat gaa gga tgc tac ctc tcc gtc ggc cac agc cag ccc tta gaa 536  
 Glu His Glu Gly Cys Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu  
 115 120 125

gac tgc agt ttc aac atg aca gct aaa acc ttt ttc atc att cac gga 584  
 Asp Cys Ser Phe Asn Met Thr Ala Lys  
 Thr Phe Phe Ile Ile His Gly  
 130 135 140

tgg acg atg agc ggt atc ttt gaa aac tgg ctg cac aaa ctc gtg tca 632  
 Trp Thr Met Ser Gly Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser  
 145 150 155 160

gcc ctg cac aca aga gag aaa gac gcc aat gta gtt gtg gtt gac tgg 680  
 Ala Leu His Thr Arg Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp  
 165 170 175

ctc ccc ctg gcc cac cag ctt tac acg gat gcg gtc aat aat acc agg 728  
 Leu Pro Leu Ala His Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg  
 180 185 190

gtg gtg gga cac agc att gcc agg atg ctc gac tgg ctg cag gag aag 776  
 Val Val Gly His Ser Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys  
 195 200 205

gac gat ttt tct ctc ggg aat gtc cac ttg atc ggc tac agc ctc gga 824  
 Asp Asp Phe Ser Leu Gly  
 Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly  
 210 215 220

gcg cac gtg gcc ggg tat gca ggc aac ttc gtg aaa gga acg gtg ggc 872  
 Ala His Val Ala Gly Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly  
 225 230 235 240

cga atc aca ggt ttg gat cct gcc ggg ccc atg ttt gaa ggg gcc gac 920  
 Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp  
 245 250 255

atc cac aag agg ctc tct ccg gac gat gca gat ttt gtg gat gtc ctc 968  
 Ile His Lys Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu  
 260 265 270

cac acc tac acg cgt tcc ttc ggc ttg agc att ggt att cag atg cct 1016  
 His Thr Tyr Thr Arg Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro  
 275 280 285

gtg ggc cac att gac atc tac ccc aat ggg ggt gac ttc cag cca ggc 1064  
 Val Gly His Ile Asp Ile  
 Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly  
 290 295 300

tgt gga ctc aac gat gtc ttg gga tca att gca tat gga aca atc aca 1112  
 Cys Gly Leu Asn Asp Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr  
 305 310 315 320

gag gtg gta aaa tgt gag cat gag cga gcc gtc cac ctc ttt gtt gac 1160  
 Glu Val Val Lys Cys Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp  
 325 330 335

tct ctg gtg aat cag gac aag ccg agt ttt gcc ttc cag tgc act gac 1208  
 Ser Leu Val Asn Gln Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp  
 340 345 350

tcc aat cgc ttc aaa aag ggg atc tgt ctg agc tgc cgc aag aac cgt 1256  
 Ser Asn Arg Phe Lys  
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg  
 355 360 365

tgt aat agc att ggc tac aat gcc aag aaa atg agg aac aag agg aac 1304  
 Cys Asn Ser Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn  
 370 375 380

agc aaa atg tac cta aaa acc cgg gca ggc atg cct ttc aga ggt aac 1352  
 Ser Lys Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn  
 385 390 395 400

ctt cag tcc ctg gag tgt caagccgaat tc 1382  
 Leu Gln Ser Leu Glu Cys  
 405

<210> 4  
 <211> 353  
 <212> PRT  
 <213> amino acid, linear  
 <400> 4

Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys  
 1 5 10 15

Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu  
 20 25 30

Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser  
 35 40 45

Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys  
 50 55 60

Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn



<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1065)

<400> 5

```

atg agc aac tcc gtt cct ctg ctc tgt ttc tgg agc ctc tgc tat tgc          48
Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys
   355                360                365

ttt gct gcg ggg agc ccc gta cct ttt ggt cca gag gga cgg ctg gaa          96
Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu
370                375                380                385

gat aag ctc cac aaa ccc aaa gct aca cag act gag gtc aaa cca
tct                144

Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser
                390                395                400

gtg agg ttt aac ctc cgc acc tcc aag gac cca gag cat gaa gga tgc          192
Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys
                405                410                415

tac ctc tcc gtc ggc cac agc cag ccc tta gaa gac tgc agt ttc aac          240
Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn
   420

                425                430

atg aca gct aaa acc ttt ttc atc att cac gga tgg acg atg agc ggt          288
Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly
   435                440                445

atc ttt gaa aac tgg ctg cac aaa ctc gtg tca gcc ctg cac aca aga          336
Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg
450                455                460                465

gag aaa gac gcc aat gta gtt gtg gtt gac tgg ctc ccc ctg gcc cac          384

Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His
                470                475                480

cag ctt tac acg gat gcg gtc aat aat acc agg gtg gtg gga cac agc          432
Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser
                485                490                495

att gcc agg atg ctc gac tgg ctg cag gag aag gac gat ttt tct ctc          480
Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu
   500                505

                510

ggg aat gtc cac ttg atc ggc tac agc ctc gga gcg cac gtg gcc ggg          528
Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly
   515                520                525

tat gca ggc aac ttc gtg aaa gga acg gtg ggc cga atc aca ggt ttg          576
Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu
530                535                540                545

gat cct gcc ggg ccc atg ttt gaa ggg gcc gac atc cac aag agg ctc          624

Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu
                550                555                560

tct ccg gac gat gca gat ttt gtg gat gtc ctc cac acc tac acg cgt          672
Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg
                565                570                575

tcc ttc ggc ttg agc att ggt att cag atg cct gtg ggc cac att gac          720
Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp
                580                585                590

atc tac ccc aat ggg ggt gac ttc cag cca ggc tgt gga ctc aac gat          768

```

Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp  
 595 600 605  
 gtc ttg gga tca att gca tat gga aca atc aca gag gtg gta aaa tgt 816  
 Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys  
 610 615 620 625  
 gag cat gag cga gcc gtc cac ctc ttt gtt gac tct ctg gtg aat cag 864  
 Glu His Glu Arg  
 Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln  
 630 635 640  
 gac aag ccg agt ttt gcc ttc cag tgc act gac tcc aat cgc ttc aaa 912  
 Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys  
 645 650 655  
 aag ggg atc tgt ctg agc tgc cgc aag aac cgt tgt aat agc att ggc 960  
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly  
 660 665 670  
  
 tac aat gcc aag aaa atg agg aac aag agg aac agc aaa atg tac cta 1008  
 Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu  
 675 680 685  
 aaa acc cgg gca ggc atg cct ttc aga ggt aac ctt cag tcc ctg gag 1056  
 Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu  
 690 695 700 705  
 tgt ccc tga 1065  
 Cys Pro \*  
 <210> 6  
 <211> 355  
  
 <212> PRT  
 <213> amino acid, linear  
 <400> 6  
 Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu  
 20 25 30  
  
 Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser  
 35 40 45  
 Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys  
 50 55 60  
 Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn  
  
 65 70 75 80  
 Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly  
  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg  
 100 105 110  
 Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His  
  
 115 120 125  
 Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser  
 130 135 140  
 Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu  
  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly  
 165 170 175

Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu  
 180 185 190  
 Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg  
 210  
 215 220  
 Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp  
 245 250 255  
 Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys  
 260 265 270  
 Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln  
 275 280 285  
 Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys  
 290 295  
 300  
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu  
 325 330 335  
 Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu  
 340 345 350  
 Cys Pro \*  
 355

<210> 7  
 <211> 2565  
 <212> DNA  
 <213> nucleic acid, double, linear  
 <220>

<221> CDS  
 <222> (252)..(1754)  
 <400> 7

gaattcgcgg ccgcgtcgac ggcggtcag gacgaggca gatctcgttc tggggcaagc 60  
 cgttgacact cgtccctgc caccgccgg gtcctgcc gccaaagttt cattttccac 120  
 cttctctgcc tccagtcgcc cagcccctgg ccgagagaag ggtcttaccg gccgggattg 180  
 ctggaaacac caagagtggt tttttgttt ttaaaacttc tgtttcttgg gagggggtgt 240  
 ggccggggcag g atg agc aac tcc gtt cct ctg ctc tgt ttc tgg agc ctc 290  
 Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu  
 360 365  
 tgc tat tgc ttt gct gcg ggg agc ccc gta cct ttt ggt cca gag gga 338  
 Cys Tyr Cys Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly  
 370 375 380  
 cgg ctg gaa gat aag ctc cac aaa ccc aaa gct aca cag act gag gtc 386  
 Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val  
 385 390 395 400  
 aaa cca tct gtg  
 agg ttt aac ctc cgc acc tcc aag gac cca gag cat 434  
 Lys Pro Ser Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His  
 405 410 415  
 gaa gga tgc tac ctc tcc gtc ggc cac agc cag ccc tta gaa gac tgc 482  
 Glu Gly Cys Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys



atg tac cta aaa acc cgg gca ggc atg cct ttc aga gtt tac cat tat 1298  
Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Val Tyr His Tyr  
690 695 700

cag atg aaa atc cat gtc ttc agt tac aag aac atg gga gaa att gag 1346  
Gln Met Lys Ile His Val Phe Ser Tyr

Lys Asn Met Gly Glu Ile Glu  
705 710 715 720

ccc acc ttt tac gtc acc ctt tat ggc act aat gca gat tcc cag act 1394  
Pro Thr Phe Tyr Val Thr Leu Tyr Gly Thr Asn Ala Asp Ser Gln Thr  
725 730 735

ctg cca ctg gaa ata gtg gag cgg atc gag cag aat gcc acc aac acc 1442  
Leu Pro Leu Glu Ile Val Glu Arg Ile Glu Gln Asn Ala Thr Asn Thr  
740 745 750

ttc ctg gtc tac acc gag gag gac ttg gga gac ctc ttg aag atc cag 1490  
Phe Leu Val Tyr Thr Glu Glu Asp Leu Gly Asp Leu Leu Lys Ile Gln  
755 760 765

ctc acc tgg gag ggg gcc tct cag tct tgg tac aac ctg tgg aag gag 1538  
Leu Thr Trp Glu Gly Ala Ser Gln Ser Trp Tyr Asn Leu Trp Lys Glu  
770 775 780

ttt cgc agc tac ctg tct caa ccc cgc aac ccc gga cgg gag ctg aat 1586  
Phe Arg Ser

Tyr Leu Ser Gln Pro Arg Asn Pro Gly Arg Glu Leu Asn  
785 790 795 800

atc agg cgc atc cgg gtg aag tct ggg gaa acc cag cgg aaa ctg aca 1634  
Ile Arg Arg Ile Arg Val Lys Ser Gly Glu Thr Gln Arg Lys Leu Thr  
805 810 815

ttt tgt aca gaa gac cct gag aac acc agc ata tcc cca ggc cgg gag 1682  
Phe Cys Thr Glu Asp Pro Glu Asn Thr Ser Ile Ser Pro Gly Arg Glu  
820 825 830

ctc tgg ttt cgc aag tgt  
cgg gat ggc tgg agg atg aaa aac gaa acc 1730  
Leu Trp Phe Arg Lys Cys Arg Asp Gly Trp Arg Met Lys Asn Glu Thr  
835 840 845

agt ccc act gtg gag ctt ccc tga gggcgccgg gcaagctctg ccagcaaggc 1784  
Ser Pro Thr Val Glu Leu Pro \*

850 855

agcaagactt cctgctatcc aagcccatgg aggaaagtta ctgctgagga cccaccaat 1844  
ggaaggattc ttctcagcct tgaccctgga

gcactgggaa caactggtct cctgtgatgg 1904

ctgggactcc tcgctggagg ggactgcgct gctatagctc ttgctgcctc tcttgaatag 1964  
ctctaactcc aaacctctgt ccacacctcc agagcaccac gtccagattt gtgtgtaagc 2024  
agctgggtgc ctggggcctc tcgtgcacac tggattggtt tctcagttgc tggcgagcc 2084  
tgtactctgc ctgacgagga acgctggctc cgaagaggcc ctgtgtagaa ggctgtcagc 2144  
tgctcagcct gctttgagcc tcagtggaaa gtccttcga caggagctga ctcatgtcag 2204  
gatggcaggc ctggtatctt gctcgggcc tggctgttgg ggttctcatg ggttgactg 2264

accatactgc ttactcttta gccattccgt cctgctcccc agctcactct ctgaagcaca 2324  
catcatggc tttcctatct ttctgttcat ttttaattg agcaaatgct tattgaacac 2384  
ttaaataaa ttagaatgtg gtaatggaca tattactgag cctctccatt tggaaaccag 2444  
tggagtggg atttctagac cctctttctg ttggatggg gtatgtgtat atgcatgggg 2504  
aaaggcacct ggggcctggg ggaggctata ggatataagc agtcgacgc gccgcgaatt 2564  
c 2565

<210> 8  
<211> 501  
<212> PRT  
<213>

amino acid, linear  
 <400> 8  
 Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu  
 20 25 30  
 Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser  
 35 40 45  
 Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys  
 50 55  
 60  
 Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn  
 65 70 75 80  
 Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg  
 100 105 110  
 Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His  
 115 120 125  
 Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser  
 130 135 140  
 Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala  
 His Val Ala Gly  
 165 170 175  
 Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu  
 180 185 190  
 Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg  
 210 215 220  
 Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile  
 Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp  
 245 250 255  
 Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys  
 260 265 270  
 Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln  
 275 280 285  
 Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys  
 290 295 300  
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu  
 325 330 335  
 Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Val Tyr His Tyr Gln Met Lys  
 340 345 350  
 Ile His Val Phe Ser Tyr Lys Asn Met Gly Glu Ile Glu Pro Thr Phe  
 355 360 365

Tyr Val Thr Leu Tyr Gly Thr Asn Ala Asp Ser Gln Thr Leu Pro Leu  
 370 375 380  
 Glu Ile Val Glu Arg Ile Glu Gln Asn Ala Thr Asn Thr Phe Leu Val  
 385 390 395 400  
  
 Tyr Thr Glu Glu Asp Leu Gly Asp Leu Leu Lys Ile Gln Leu Thr Trp  
 405 410 415  
 Glu Gly Ala Ser Gln Ser Trp Tyr Asn Leu Trp Lys Glu Phe Arg Ser  
 420 425 430  
 Tyr Leu Ser Gln Pro Arg Asn Pro Gly Arg Glu Leu Asn Ile Arg Arg  
 435 440 445  
 Ile Arg Val Lys Ser Gly Glu Thr Gln Arg Lys Leu Thr Phe Cys Thr  
 450 455 460  
  
 Glu Asp Pro Glu Asn Thr Ser Ile Ser Pro Gly Arg Glu Leu Trp Phe  
 465 470 475 480  
  
 Arg Lys Cys Arg Asp Gly Trp Arg Met Lys Asn Glu Thr Ser Pro Thr  
 485 490 495  
 Val Glu Leu Pro \*  
 500  
 <210> 9  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> nucleic acid, double, linear  
 <220>  
  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1035)  
 <400> 9  
 atg agc aac tcc gtt cct ctg ctc tgt ttc tgg agc ctc tgc tat tgc 48  
 Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys  
 505 510 515  
 ttt gct gcg ggg agc ccc gta cct ttt ggt cca gag gga cgg ctg gaa 96  
 Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu  
 520 525 530  
 gat aag ctc cac aaa ccc aaa gct aca cag act  
 gag gtc aaa cca tct 144  
 Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser  
  
 535 540 545  
 gtg agg ttt aac ctc cgc acc tcc aag gac cca gag cat gaa gga tgc 192  
 Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys  
 550 555 560 565  
 tac ctc tcc gtc ggc cac agc cag ccc tta gaa gac tgc agt ttc aac 240  
 Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn  
 570 575 580  
 atg aca gct aaa acc ttt ttc  
 atc att cac gga tgg acg atg agc ggt 288  
 Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly  
  
 585 590 595  
 atc ttt gaa aac tgg ctg cac aaa ctc gtg tca gcc ctg cac aca aga 336  
 Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg  
 600 605 610  
 gag aaa gac gcc aat gta gtt gtg gtt gac tgg ctc ccc ctg gcc cac 384  
 Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His



Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu  
 20 25 30  
 Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser  
 35 40 45  
 Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys  
 50 55 60  
 Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn  
 65 70 75 80  
 Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg  
 100 105 110  
 Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His  
 115 120 125  
 Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser  
 130 135 140  
 Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly  
 165 170 175  
 Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu  
 180 185 190  
 Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg  
 210 215 220  
 Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp  
 245 250 255  
 Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys  
 260 265 270  
 Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln  
 275 280 285  
 Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys  
 290 295 300  
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu  
 325 330 335  
 Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg  
 340 345  
 <210> 11  
 <211> 225

<212> DNA  
 <213> nucleic acid, double, linear  
 <220>

<221> CDS  
 <222> (1)..(225)

ctg gga tcc atc gcc tat ggc acg atc gcg gag gtg gtg aag tgc gag 48  
 Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Ala Glu Val Val Lys Cys Glu

350 355 360  
 cat gag cgg gcc gtg cat ctc ttt gtg gac tcc ctg gtg aac cag gac 96  
 His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln Asp

365 370 375  
 aag ccg agc ttt gcc ttc cag tgc aca gac tcc aac cgc ttc aaa aaa 144  
 Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys Lys

380 385 390  
 ggg atc tgt ctc agc tgc cgg  
 aag aac cgc tgt aac ggc atc ggc tac 192  
 Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Gly Ile Gly Tyr  
 395 400 405  
 aat gct aag aag acg agg aat aag agg aac acc 225  
 Asn Ala Lys Lys Thr Arg Asn Lys Arg Asn Thr

410 415 420  
 <210> 12  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> amino acid, linear  
 <400> 12

Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Ala Glu Val Val Lys Cys Glu  
 1 5 10 15  
 His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln Asp  
 20 25 30  
 Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys Lys  
 35 40 45  
 Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg  
 Cys Asn Gly Ile Gly Tyr  
 50 55 60  
 Asn Ala Lys Lys Thr Arg Asn Lys Arg Asn Thr

65 70 75  
 <210> 13  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> amino acid, linear  
 <400> 13

Met Glu Ser Lys Ala Leu Leu Val Leu Thr Leu Ala Val Trp Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Thr Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Gln Arg Arg  
 20 25 30  
 Asp Phe Ile Asp Ile Glu Ser Lys Phe Ala Leu Arg Thr Pro Glu Asp  
 35 40 45  
 Thr Ala Glu Asp Thr Cys His Leu Ile  
 Pro Gly Val Ala Glu Ser Val  
 50 55 60  
 Ala Thr Cys His Phe Asn His Ser Ser Lys Thr Phe Met Val Ile His  
 65 70 75 80





Lys Arg Leu Phe Leu Val Thr Arg Ala Gln Ser Pro Phe Lys Val Tyr  
                   340                                  345                                  350  
 His Tyr Gln Leu Lys Ile Gln Phe Ile Asn Gln Thr Glu Thr Pro Ile  
                   355                                  360                                  365  
 Gln Thr Thr Phe Thr Met Ser Leu Leu Gly Thr Lys Glu Lys Met Gln  
                   370                                  375                                  380  
  
 Lys Ile Pro Ile Thr Leu Gly Lys Gly Ile Ala Ser Asn Lys Thr Tyr  
 385                                  390                                  395                                  400  
  
 Ser Phe Leu Ile Thr Leu Asp Val Asp Ile Gly Glu Leu Ile Met Ile  
                   405                                  410                                  415  
 Lys Phe Lys Trp Glu Asn Ser Ala Val Trp Ala Asn Val Trp Asp Thr  
                   420                                  425                                  430  
 Val Gln Thr Ile Ile Pro Trp Ser Thr Gly Pro Arg His Ser Gly Leu  
  
                   435                                  440                                  445  
 Val Leu Lys Thr Ile Arg Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Gln Arg Met  
                   450                                  455                                  460  
 Thr Phe Cys Ser Glu Asn Thr Asp Asp Leu Leu Leu Arg Pro Thr Gln  
  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Glu Lys Ile Phe Val Lys Cys Glu Ile Lys Ser Lys Thr Ser Lys Arg  
                   485                                  490                                  495  
 Lys Ile Arg  
  
 <210> 15  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> amino acid, linear  
 <400> 15  
 Met Leu Pro Leu Trp Thr Leu Ser Leu Leu Leu Gly Ala Val Ala Gly  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Lys Glu Val Cys Tyr Glu Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser Pro  
                   20                                  25                                  30  
 Trp Ser Gly Ile Thr Glu Arg Pro Leu His Ile Leu Pro Trp Ser Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Lys Asp Val Asn Thr Arg Phe Leu Leu Tyr  
 Thr Asn Glu Asn Pro Asn  
                   50                                  55                                  60  
 Asn Phe Gln Glu Val Ala Ala Asp Ser Ser Ser Ile Ser Gly Ser Asn  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Phe Lys Thr Asn Arg Lys Thr Arg Phe Ile Ile His Gly Phe Ile Asp  
                   85                                  90                                  95  
 Lys Gly Glu Glu Asn Trp Leu Ala Asn Val Cys Lys Asn Leu Phe Lys  
                   100                                  105                                  110  
 Val Glu Ser Val Asn Cys Ile  
 Cys Val Asp Trp Lys Gly Gly Ser Arg  
                   115                                  120                                  125  
 Thr Gly Tyr Thr Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Val Gly Ala Glu  
   130                                  135                                  140  
 Val Ala Tyr Phe Val Glu Phe Leu Gln Ser Ala Phe Gly Tyr Ser Pro  
 145                                  150                                  155                                  160  
  
 Ser Asn Val His Val Ile Gly His Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly  
                   165                                  170                                  175  
 Glu Ala Gly Arg Arg Thr Asn Gly Thr Ile Gly Arg Ile Thr Gly Leu

180 185 190  
 Asp Pro Ala Glu Pro Cys Phe Gln Gly Thr Pro Glu Leu Val Arg Leu  
 195 200 205  
 Asp Pro Ser Asp Ala Lys Phe Val Asp Val Ile His Thr Asp Gly Ala  
 210 215 220

Pro Ile Val Pro Asn Leu Gly Phe Gly Met Ser Gln Val Val Gly His  
 225 230 235 240

Leu Asp Phe Phe Pro Asn Gly Gly Val Glu Met Pro Gly Cys Lys Lys  
 245 250 255  
 Asn Ile Leu Ser Gln Ile Val Asp Ile Asp Gly Ile Trp Glu Gly Thr  
 260 265 270  
 Arg Asp Phe Ala Ala Cys Asn His Leu Arg Ser Tyr Lys Tyr Tyr Thr  
 275 280 285  
 Asp Ser Ile Val Asn Pro Asp Gly Phe Ala Gly Phe Pro Cys Ala Ser  
 290 295 300

Tyr Asn Val Phe Thr Ala Asn Lys Cys Phe Pro Cys Pro Ser Gly Gly  
 305 310 315 320

Cys Pro Gln Met Gly His Tyr Ala Asp Arg Tyr Pro Gly Lys Thr Asn  
 325 330 335  
 Asp Val Gly Gln Lys Phe Tyr Leu Asp Thr Gly Asp Ala Ser Asn Phe  
 340 345 350  
 Ala Arg Trp Arg Tyr Lys Val Ser Val Thr Leu Ser Gly Lys Lys Val  
 355 360 365  
 Thr Gly His Ile Leu Val Ser Leu Phe Gly Asn Lys Gly Asn Ser Lys

370 375 380  
 Gln Tyr Glu Ile Phe Lys Gly Thr Leu Lys Pro Asp Ser Thr His Ser  
 385 390 395 400

Asn Glu Phe Asp Ser Asp Val Asp Val Gly Asp Leu Gln Met Val Lys  
 405 410 415  
 Phe Ile Trp Tyr Asn Asn Val Ile Asn Pro Thr Leu Pro Arg Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Ser Lys Ile Ile Val Glu Thr Asn Val Gly Lys Gln Phe Asn Phe  
 435 440 445  
 Cys Ser Pro Glu Thr Val Arg Glu Glu Val Leu Leu Thr Leu Thr Pro  
 450 455 460

Cys

465  
 <210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> amino acid  
 <400> 16  
 Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Cys

<210> 17  
 <211> 13  
 <212> DNA

<213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 17  
 tttttttttt tga 13  
 <210> 18  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 18  
 gatcaatcgc 10  
 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 19  
 taggacatgc acagtgtaat ctg 23  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 20  
 gattgtgctg gccacttctc 20  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 21  
 gacactccag ggactgaag 19  
 <210> 22  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <220>

<221> modified\_base  
 <222> 36  
 <223> i  
 <220>

<221> modified\_base

<222> 37  
 <223> i  
 <220>

<221> modified\_base  
 <222> 41  
 <223> i  
 <220>

<221> modified\_base  
 <222> 42  
 <223> i  
 <220>

<221> modified\_base  
 <222> 46  
 <223> i  
 <220>

<221> modified\_base  
 <222> 47  
 <223> i  
 <400> 22  
 cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt acgggnnggg nngggngg 48  
 <210> 23  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 23  
 cacacacagg ccacgcgtcg actagtag 28  
 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 24  
 accacatgg agagcaaagc cctg 24  
 <210> 25  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 25  
 ccagtttcag cctgacttct tattc 25  
 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 26  
 ggctgtggac tcaacgatgt c 21  
 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 27  
 ccgggtgggt aggtacatth tg 22  
 <210> 28  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 28  
 gggggtgact tccagccagg ctgtg 25  
 <210> 29  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 29  
 aactctgaaa ggcattgcctg cccgg 25  
 <210> 30  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 30  
 tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt 26  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <200>

<223> Description of artificial sequence: oligonucleotide  
 <400> 31  
 catgtgggcc atgaggtcca ccac 24