

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(21) 출원번호	10-1999-7004445	(65) 공개번호	10-2000-0057159
(22) 출원일자	1999년05월20일	(43) 공개일자	2000년09월15일
번역문 제출일자	1999년05월20일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/021880	(87) 국제공개번호	WO 1998/22589
국제출원일자	1997년11월20일	국제공개일자	1998년05월28일

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨.

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

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

(30) 우선권주장 60/031,435 1996년11월20일 미국(US)  
08/975,080 1997년11월20일 미국(US)

(73) 특허권자 예일 유니버시티  
미국 코네티컷주 06511 뉴헤븐 투 휘트니 애비뉴

(74) 대리인 김용인  
석혜선

심사관 : 조명선

(54) 세포 아폽토시스를 저해하는 셀바이빈 단백질 및 이를 조절하는 방법

## 요약

본 발명은 세포 아폽토시스를 저해하는 아미노산(여기에서는 설바이빈으로 명명함), 이를 인코드하는 핵산을 제공한다. 본 원 명세서 내용을 기초하면, 본 발명은 분리된 설바이빈 단백질, 분리된 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자, 설바이빈 족 단백질의 다른 성분을 분리하는 방법, 설바이빈에 의해 중개되는 세포 아폽토시스 저해를 차단시키는 물질을 확인하는 방법, 설바이빈에 의한 저해 또는 설바이빈 발현을 조절하는 물질을 이용하여 생물학적 병인학적 과정을 조절하는 방법, 설바이빈 활성을 조사하는 방법을 제공한다.

## 대표도

도 14a

## 명세서

### 기술분야

본 출원은 1996년 11월 20일자 출원된 미국 출원 60/031,435예비 출원에 기초한다.

본 발명은 아폽토시스를 조절하는 분야, 특히 아폽토시스를 저해하는데 유용한 물질 및 아폽토시스 저해물질을 발현시켜 조절할 수 있는 진단 및 예후 검사에 관계한다. 본 발명은 특히 설바이빈(Survivin)이라고 명명한 신규한 사람 유전자를 확인하는 것에 관계한다. 설바이빈은 암 세포 및 배아 세포에서 특히 아폽토시스를 저해하는 단백질인 설바이빈을 인코드한다.

### 배경기술

발생 및 분과과정동안에 예정된 세포 죽음(아폽토시스)에 의해 세포 증식을 조절하여 조직 지혈을 유지한다(Raff, M.D., Nature (1992) 356:397-400; Vaux, D.L. et al., Cell (1994) 76:777-779). 이 과정에는 발생학적으로 보존된 다단계 연속반응이 관련되고(Oltvai, Z. et al., Cell(1994) 79:189-192), 아폽토시스성 세포 죽음을 촉진시키거나 또는 방해하는 단백질에 의해 조절된다. 아폽토시스에는 세포 표면 수용체(Smith, A. et al., Cell (1994) 76, 959-962), 관련 시그널 변환 물질(Tartaglia, L.A. et al., Immunol Today (1992) 13:151-153), 프로테아제 유전자 족(Martin, S.J. et al., Cell (1995) 82:349-352), 세포내 2차 메신저(Kroemer, G. et al., FASEB J (1995) 9:1277-1287), 종양 억제 유전자(Haffner, R. et al., Curr Op Gen Dev (1995) 5:84-90), 아폽토시스성 세포 죽음을 방해하는 음성 조절 단백질(Hockenberry, D. et al., Nature (1990) 348:334-336)이 관련된다. 비정상적으로 아폽토시스가 증가되거나(Oltvai, Z.N. et al., Cell (1994) 79:189-192) 또는 비정상적으로 연장된 세포 죽음은 자가면역 질환, 신경계퇴행성 질환 및 암을 포함하는 사람 질병의 병인이 될 수 있다(Steller, H., Science (1995) 267:1445-1449; Thompson, C.B., Science (1995) 267:1456-1462).

특히, 예를 들어보면, 아폽토시스의 저해물질인 가장 두드러진 *bcl-2*족(Reed, J. J Cell Biol (1994) 124:1-6, and Yang, E. et al., Blood (1996) 88:386-401)은 성인에서 임파구 조혈 및 형태발생을 유지하고(Hockenberry, D et al., Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88:6961-6965), 태아 조직(LeBrun, D. et al. (1993) 142:743-753)에서 임파구 조혈 및 형태발생을 유지시킨다. *bcl-2*의 발현이 조절안되는 경우에 비정상적으로 세포 생존이 연장되고, 형질 돌연변이 반란을 실행하여 암과 연관된다.

*bcl-2*에 추가하여, 베쿨로바이러스 IAP 유전자(Birnbaum, M.J. et al., J Virology (1994) 68:2521-2528; Clem, R.J. et al., Mol Cell Biol (1994) 14:5212-5222)에 관련된 아폽토시스 저해물질중 새로운 유전자 족의 몇 가지 성분들이 초파리와 포유류 세포에서 확인되었다(Duckett, C.S. et al., EMBO J (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A. et al., Cell (1995) 83:1253-1262; Liston, P. et al., Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M. et al., Cell (1995) 83:1243-1252; Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167-178). 이들 분자들은 발생학적으로 상당히 보존되어, 이들은 2 또는 3개의 약 70개 아미노산 말단 Cys/His 베쿨로바이러스 IAP 반복체(BIR)와 카르복시 말단 아연-결합 도메인인 RING 핑거라고 불리는 유사한 구조를 공유한다(Duckett, C.S. et al., EMBO J (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A. et al., Cell (1995) 83:1253-1262; Liston, P. et al., Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M. et al., Cell (1995) 83:1243-1252; Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167-178). IAP 단백질이 재조합에 의해 발현되면, *in vitro*에서 다양한 자극에 의해 유도되는 아폽토시스를 차

단하고(Duckett, C.S. et al., EMBO J (1996) 15:2685–2694; Liston, P. et al., Nature (1996) 379:349–353), *in vivo*에서 발생학적으로 조절된 모델인 초파리 눈에서 비정상적으로 연장된 세포 생존을 촉진시킨다(Hay, B.A. et al., Cell (1995) 83:1253–1262). 마지막으로, 척수 근육 이상 환자의 75%가 아폽토시스의 IAP 신경 저해물질인 NAIP이 결손된 것으로 보고되어 이는 사람 질병에서 이들 유전자 족에 잠재적인 역할을 하는 것으로 보인다(Roy, O특허 문현WO 97/06255, WO 97/26331, WO 97/32601들을 참고하면, IAP 족의 구성요소에 관련되는 아폽토시스의 다양한 저해물질을 인코드하는 핵산을 치료 및 진단에 이용한다고 설명하고 있다. 특히, 이와 같은 유전자 및 유전자 생산물을 이용하면, 하기에서 설명하는 신규한 단백질 및 이를 인코드하는 핵산으로 간주된다.

## 삭제

최근에는, 설바이빈이라고 명명한 구조적으로 독특한 IAP 아폽토시스 저해물질을 인코드하는 신규한 유전자가 확인되었다. 설바이빈은 한 개의 BIR, RING 팽기 대신에 하전을 띠는 카르복시 말단 코일-코일 부분을 포함하는 ~16.5 kD 세포질 단백질인데, 코일-코일 부분은 B 세포 전구물질에 옮겨질 경우에 생장인자(IL-3)를 철수시켜 유도되는 아폽토시스를 저해한다(Ambrosini, G. et al., Nature Med. (1997) 3:917–921). *bcl-2* 또는 다른 IAP 단백질에 변화를 주었을 경우에, 성인 조직에서는 설바이빈을 감지할 수는 없지만, 폐, 결장, 유방, 췌장, 전립선등의 가장 일반적인 사람의 암에서 주로 발현되고, *in vivo*에서 고등급 비-호지킨(Hodgkin) 질병의 ~50%에서 발현된다. 흥미로운 것은 설바이빈 유전자의 코딩 가닥은 효과물질 세포 프로테아제 수용체-1[Effector cell Protease Receptor-1 (EPR-1)](Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860–865)의 서열에 상동성이 매우 크나, 방향이 반대이어서, 머리방향에서 머리방향으로(head-to-head) 중복된 두 개별도 유전자가 존재한다는 것을 알 수 있다.

본 발명은 EPR-1과 거의 동일하나 방향이 반대인 신규한 사람 유전자를 확인하는 것에 기초한다. 설바이빈이라고 지정한 안티센스 EPR-1은 아폽토시스 저해물질인 IAP 족의 관련 성분이고(Duckett, C.S. et al., EMBO J (1996) 15:2685–2694; Hay, B.A. et al., Cell (1995) 83:1253–1262; Liston, P. et al., Nature (1996) 379:349–353; Rothe, M. et al., Cell (1995) 83:1243–1252; Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167–178), 이는 *in vivo*에서 통상의 사람 암과 형질변환 세포가 활발하게 증식되는 곳에서 주로 발현되나 인접한 정상인 세포에서는 발현되지 않는다. 자연 안티센스 EPR-1 전사체를 상향 조절하여 설바이빈 발현을 기능적으로 저해하면, 방대한 아폽토시스가 일어나고, 세포 생장이 감소된다.

## 발명의 요약

본 발명은 대부분 암세포에서 발현되고 세포 아폽토시스를 저해하는 단백질을 분리 확인하는 것에 일부 기초한 것으로, 이하 이 단백질은 설바이빈 또는 설바이빈 단백질이라고 통칭한다. 이와 같은 관찰에 기초하여, 본 발명은 정제된 설바이빈 단백질을 제공한다.

본 발명은 또한 설바이빈 단백질을 인코드하는 핵산 분자를 제공한다. 이와 같은 핵산 분자는 분리된 형이 될 수 있고 또는 발현 조절 원소 또는 벡터 서열에 작동식으로 연결될 수 있다.

본 발명은 또한 설바이빈 족 단백질의 다른 성분을 확인하는 방법을 제공한다. 특히, 설바이빈의 핵산 서열을 프로브로 이용하거나 PCR 프라이머를 만드는데 이용하여, 설바이빈 족 단백질의 다른 구성원을 인코드하는 핵산 분자를 확인한다.

본 발명은 설바이빈에 결합할 수 있는 항체를 제공하는데, 이와 같은 항체는 다클론성 또는 단클론성일 수 있다. 항-설바이빈 항체는 다양한 진단 포맷 및 다양한 치료 방법에 이용될 수 있다.

본 발명은 또한 설바이빈 결합 짹을 분리하는 방법을 제공한다. 포집(capture) 프로브로 설바이빈 단백질을 이용하여 설바이빈 결합 짹을 분리한다. 또는 이스트 이중 하이브리드 시스템에서 설바이빈을 미끼로 이용하여, 발현 라이브러리를스크린하여, 설바이빈 단백질에 결합하는 단백질을 인코드하는 유전자를 확인한다. 이와 같은 방법에 의해 분리된 결합 짹은 항체를 분비하는데 이용하고, 약품 개발에 표적으로 이용된다.

본 발명은 또한 설바이빈과 결합 짹의 연합을 차단 또는 조절할 수 있는 물질을 확인하는 방법을 제공한다. 특히, 이 물질은 설바이빈 또는 이의 단편과 테스트 물질과 함께 결합 짹을 접촉시키고, 설바이빈 단백질이 이의 결합 짹에 결합되는 것을 테스트 물질이 차단 또는 감소시키는지를 결정하여 설바이빈과 결합 짹의 연합을 차단, 감소 또는 조절하는 능력을 테스트한다.

본 발명은 또한 한 개 이상의 결합 짹과 설바이빈이 연합되는 것을 감소시키거나 또는 차단하는 방법을 제공한다. 특히, 설바이빈과 이의 결합 짹이 연합되는 것은 설바이빈 또는 이의 결합 짹을 특정 물질(설바이빈이 결합 짹에 결합하는 것을 차단하는 물질)과 접촉시켜 차단하거나 감소시킬 수 있다. 이 방법은 설바이빈 또는 결합 짹에 결합하는 물질을 이용할 수 있다.

본 발명은 또한 세포내에 설바이빈의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 세포 내에 설바이빈의 발현을 조절하여 설바이빈을 생산하거나 이의 생산을 방해할 수 있다.

설바이빈/결합 짹 연합 또는 설바이빈 발현을 차단시켜 설바이빈을 요구하는 생물학적 병인학적 공정을 조절한다. 예를 들면, 설바이빈 생산을 감소시키는 방법을 이용하면 종양 세포의 아폽토시스를 유도할 수 있다. 설바이빈 생산을 촉진시켜 세포 또는 조직의 배양능을 연장할 수 있다.

설바이빈 또는 설바이빈/결합 짹 상호작용을 요구하는 생물학적 병인학적 공정은 유전자 치료방법을 이용하여 조절할 수 있다. 유기체내에 추가적인 유전자 조절을 이용하여 설바이빈 유전자 발현 또는 동물 모델에서 설바이빈 단백질의 생성을 변형시킬 수 있다. 예를 들면 설바이빈 유전자를 변형시켜 유전자 결손을 교정할 수 있는데; 유전자 형질변환 방법을 이용하여 표적 세포 내에 설바이빈 활성의 웨티드 조절 물질을 만들어, 표적 세포 내에 핵산 분자를 인코드하는 조절물질을 도입시킬 수 있다. 안티센스 및 삼중 나선 치료법 및 중재에 핵산을 이용하는 것도 고려할 수 있다.

본 발명은 또한 설바이빈을 요구하는 질병의 심각성을 줄이는 방법을 제공한다. 설바이빈이 중개된 생물학적 공정에는 설바이빈 또는 설바이빈-결합 짹 연합을 요구하기 때문에, 설바이빈 발현을 차단하는 물질, 설바이빈 활성 또는 설바이빈-결합 짹 연합을 차단하는 물질을 치료방법에 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 상보적인 EPR-1 유전자를 확인하는 것을 보여준다. A, B.는 염색체 위치이다. EPR-1 cDNA과 하이브리드하여 선택된 디고시제닌(digoxigenin)-라벨된 사람 P1 계놈 클론은 50% 포름아미드, 10% 텍스트란 설레이트, 2X SSC에서 피토헤마글루터닌으로 자극한 PBMC에서 분리한 중기 염색체와 배양한다. EPR-1-하이브리드되는 유전자는 E 염색체의 긴 팔에 단일 색 라벨되고(A, 그린 염색), 염색체 17의 동원체(B, 적색 염색)에 특이적인 프로브 D17Z1와는 두 가지 색으로 착색되는데, 염색체 17의 긴 팔(B, 그린 착색), 밴드 17q25. C는 EPR-1 유전자의 안티센스이다. 두 개 EPR-1-하이브리드 P1 클론에서 contig 스패닝 14796 bp을 유도하여, pBSKS에 서브클론시키고, 두 가닥을 완전하게 서열화한다. 유전자 지도에서 방향은 인트론-엑손 경계(하기 참조)에 대해 5'→3'이다. 엑손은 짧은 상자로 표시하고, 엑손 1의 상류인 가상 CpG은 흰 상자로 표시하였다. 해독 개시 코돈(ATG)을 표시하였다. 제한 효소 부위는 다음과 같은 약어로 표기한다; B. *Bam*H, H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sma*I; X, *Xba*I. D는 안티센스 EPR-1 유전자의 인트론-엑손 경계를 나타낸다. 인트론-엑손 경계 위치(bp)는 팔호로 나타낸다.

도 2는 EPR-1-관련 서열의 복합성 및 진화에 따른 보존성을 나타낸다. A는 사람 계놈 DNA의 서든 블랏을 나타낸다. 샘플은 지정한 제한 효소로 절단하고, GeneScreen 나일론 막에 읊기고, 65°C에서 EPR-1 cDNA과 하이브리드시킨다(조건; 5X SSC, 0.5% SDS, 5X Denhardt's, 0.1% 피로포스페이트 나트륨). 화살표로 표시한 방사능활성 밴드(7.6kb *Bam*H, 7.5kb *Xba*I, 15, 7.5, 6.4, 3.7kb *Hind*III)는 도 1C에 있는 안티센스 EPR-1 유전자에서 유도한 것이 아니다. B는 펠스된 겔 전기영동의 서든 블랏이다. 고분자량 사람 계놈 DNA는 지적한 제한 효소로 절단하고, 200V에서 20시간동안 펠스된 겔 전기영동에서 분리하는데, 이때 펠스는 75초간 제공하고, 이는 나일론 막에 읊기고, A에서와 같이 EPR-1 cDNA에 하이브리드시킨다. C는 다양한 종의 서든 블랏이다. 표시된 종에서 *Eco*RI-절단된 계놈 DNA는 A에서 설명한 것과 같이 EPR-1 cDNA 3,548bp 단편과 하이브리드시킨다. 전체 패널에서 분자량 kb은 좌측에 나타내었다.

도 3은 센스/안티센스 EPR-1 전사체의 조직 분포가 일치하지 않음을 나타낸다. 다중 조직의 성숙한 또는 어린 mRNA와 단일 가닥 특이적인 프로브를 이용하여 5X SSPE, 10X Denhardt's 용액, 2% SDS, 100mg/ml 변성 연어 정자 DNA에서 60°C, 14h동안 노던 하이브리드 반응을 실시한다. 60°C에서 2X SSC, 22°C에서 0.2X SSC로 세척한 다음 방사능활성 밴드는 자가방사선그래프로 볼 수 있다. A는 EPR-1 특이적인 단일 가닥 프로브이고, B는 안티센스 EPR-1 특이적인 단일 가닥 프로브를 나타낸다. C는 기준 악틴 프로브이다. 분자량 기준(kb)은 좌측에 표시하였다.

도 4는 설바이빈의 서열 분석 및 세포주에서 발현을 나타낸다. A는 안티센스 EPR-1 유전자 생성물(설바이빈)[서열 34]의 예측되는 해독상황을 나타낸다. B는 Clustal 방법으로 다른 IAP 단백질과 설바이빈에서 BIR의 서열[서열 8, 서열 21] 배열을 나타낸 것이다. IAP 단백질은 취득 번호로 확인되는데, L49433[서열 9, 서열 22]은 TNFR2-TRAF 시그널발생

복합체-연합된 IAP; L49441[서열 10, 서열 23]은 아폽토시스 2 저해물질(초파리); P41436[서열 11, 서열 24]는 신디아 포모넬라 그라눌로시스 바이러스(*Cydia pomonella granulosis virus*)에서 취한 IAP; P41437[서열 12, 서열 25]는 오리자 슈도슈가타 핵 폴리헤드로시스 바이러스(*Orgya pseudotsugata nuclear polyhedrosis virus*)의 IAP 유전자; U19251 [서열 13, 서열 26]는 아폽토시스 신경 저해물질, NAIP; U32373[서열 14, 서열 27]는 초파리 멜라고노스터에서 취한 IAP 유사 단백질 ILP; U32974[서열 15, 서열 28]는 사람 IAP-유사 단백질 ILP; U36842[서열 16, 서열 29]는 쥐에서 아폽토시스 저해물질; U45878[서열 17, 서열 30]는 사람에서 아폽토시스 1 저해물질; U45879[서열 18, 서열 31]는 사람에서 아폽토시스 2 저해물질; U45880[서열 19, 서열 32]는 아ປ토시스 X-연결된 저해물질; U45881[서열 20, 서열 31]는 초파리 아ປ토시스 저해물질. 보존된 잔기는 박스로 표시하고, 설바이빈과 NAIP(U19251)[서열 13, 서열 26]간에 동일한 것은 빛금친 것으로 나타낸다. C는 항-설바이빈 항체 JC700와 이뮤노블랏팅한 것이다. 세포주 HEL (적백혈병), Daudi 및 JY(B 임파종), THP-1(단구), Jurkat 및 MOLT13(T 백혈병), 비-형질변환된 사람 폐 Lu18 섬유아세포, HUVEC, PBMC의 SDS-추출물에서 단백질 부분은 5-20% SDS 농도차 겔에서 전기영동에 의해 분리하고, Immobilin으로 끓기고, 기준 비-면역 토끼 IgG(RbIgG) 또는 항-설바이빈 항체 JC700(Survivin)과 함께 이뮤노블랏시킨다. 단백질 벤드는 알칼리 포스포타제-공액된 염소 항-토끼 IgG 및 테트라졸리움 염으로 볼 수 있다. 분자량 기준(kDa)은 좌측에 표시해 두었다.

도 5는 세포 생장/분화에 의한 설바이빈 발현이 조절되는 것을 보여준다. HL-60 세포는 0.1mM vitamin D<sub>3</sub> + 17.8 mg/ml 인도메타신으로 72시간 배양하면, 성숙한 단구 표현형으로 분화된다. 비타민 D<sub>3</sub> 분화전후에 설바이빈 발현은 JC700 항체와 이뮤노블랏팅 또는 설바이빈-특이적인 단일 가닥 프로브와 노든 하이브리드에 의해 감지할 수 있다. RbIgG는 기준 비-면역 토끼 IgG이다. 분자량 표식 kDa과 리보솜 벤드 위치는 각 블랏의 좌측에 표시한다.

도 6은 *in vivo*에서 사람의 암에서 설바이빈이 과발현되는 것을 보여준다. A는 친화력에 의해 정제된 항-설바이빈 항체 JC700(20 $\mu$ g/ml)과 사람 폐 선암의 면역조직학적 착색을 나타낸 것이다. B는 면역화된 설바이빈 3-19 웨티드와 선-흡착에 의해 폐 선암의 JC700 착색 저해를 나타낸 것이다. C는 비늘모양의 폐 세포 암종에서 설바이빈의 면역조직학적 발현을 나타내는데, 폐의 인접하는 정상 선 상피에는 설바이빈이 발현되지 않았다(C. 화살표). D는 설바이빈-특이적인 비로프로브와 비늘모양의 폐 세포 암종에서 설바이빈 mRNA의 *In-situ* 하이브리드를 나타낸다. E는 JC700과 면역조직화학에 의해 궤장 선암에서 설바이빈의 발현을 나타낸다. F는 정상 궤장을 나타내는 것으로 면역조직화학에 의해 설바이빈의 발현이 없었다. G는 결장 선암에서 설바이빈 mRNA의 *In situ* 하이브리드를 나타낸 것이나 H는 인접 정상적인 신조직 형성이 없는 결장 선 상피에서는 설바이빈의 mRNA 발현이 없음을 나타낸다(화살표). 확대는 x200이고, 단 G는 x400 확대한 것이다.

도 7은 아ປ토시스/증식에서 설바이빈 효과를 나타낸다. A는 설바이빈 발현에 대한 EPR-1-조절을 나타낸 것이다. 기준 벡터 pML1 또는 EPR-1 cDNA(설바이빈에 대해 안티센스)를 전기천공에 의해 HeLa 세포에 전이 감염시키고, 하이그로마이신(0.4 mg/ml)에 대해 선별한다. 기준 벡터 HeLa 세포(벡터) 또는 설바이빈 안티센스 전이감염체(안티센스)는 200mM ZnSO<sub>4</sub> 계면활성제(용해된)로 유도하고, 항-설바이빈 JC700 항체로 이뮤노블랏팅한다. 분자량은 좌측에 표시하였다. B는 아ປ토시스에서 설바이빈의 영향을 나타낸다. 설바이빈 안티센스 전이감염체(1,2) 또는 기준 벡터 HeLa 세포(3,4)는 24시간동안 0% FBS에서 Zn<sup>2+</sup> 이온으로 유도하고, Aptotag 방법으로 착색시키는데, TdT-촉매된 dUTP와 면역과산화효소를 3'-OH DNA 단부에 라벨하고(1,3), 또는 혜마토실린-에오신(HE)으로(2,4) 착색한다. 1. 혈청이 부족한 설바이빈 안티센스 전이감염체에 Aptotag 착색으로 감지되는 중요한 핵 DNA 단편화; 2. 안티센스 전이감염체의 HE 착색으로 상당수의 아ປ토시스성 몸체가 존재한다는 것을 알았다(화살표); 3. 기준 벡터 HeLa 세포를 Aptotag 착색하는 경우에 어느 정도의 아ປ토시스성 세포를 감지하였다(화살표); 4. 기준 벡터 HeLa 세포의 HE 착색. 화살표는 한 개의 아ປ토시스성 몸체를 나타낸다. 확대는 x400배이다. C는 세포 생장에서 설바이빈의 영향을 나타낸 것이다. 2만개 기준 벡터 HeLa 세포(벡터) 또는 설바이빈 안티센스 전이감염체(안티센스)를 24-웰 플레이트에 접종시키고, ZnSO<sub>4</sub>로 유도하고, 지정한 시간대에 수득하여, 직접 세포 수를 헤아려 세포 증식을 현미경으로 측정한다. 데이터는 몇 가지 독립적인 결정치에서 제시한 평균 ± SEM로 나타낸다.

도 8은 HL-60 세포에서 설바이빈의 발현을 나타낸다. HL-60 세포는 웨스턴 및 노던 블랏을 통하여 설바이빈 발현에 대해 검사한다.

도 9는 설바이빈의 구조 분석을 나타내는데, 설바이빈 단백질은 Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyle-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz, Jameson-Wolf, Emini 분석 방법을 이용하여 분석하였다.

도 10은 ELISA와 이뮤노블랏팅으로 항-설바이빈 mAb 8E2의 특징 조사 및 설바이빈의 발현 및 생성을 나타낸다.

도 11는 설바이빈의 부위-직접적인 돌연변이 생성 및 아폽토시스 저해에 관련된 주요 기능을 하는 잔기를 확인한 것을 나타낸다.

도 12은 내피 세포 아폽토시스에서 설바이빈을 추가하였을 경우에 세포 보호 효과를 나타낸다.

도 13는 설바이빈이 존재한다는 것은 신경아세포종에서 음성적인 예측-예측 인자가 된다.

도 14는 설바이빈이 존재한다는 것은 높은 수준의 비-Hodgkin's 임파종에서 음성적인 예측-예후 인자가 된다.

도 15은 염증 및 세포 활동을 억제하는 사이토킨에 의해 유도되는 설바이빈의 하향 조절을 나타낸다.

도 16은 NIH3T3 세포에서 과산화수소에 의해 유도된 아폽토시스에서 설바이빈 구조 또는 XIAP의 효과를 나타낸다.

## 작제

### 발명의 상세한 설명

#### I. 일반적인 설명

본 발명은 종양 세포에서 발현되는 세포 아폽토시스를 저해하는 신규한 단백질을 확인하는 것에 기초하는데, 이하 이러한 단백질은 설바이빈이라고 부른다.

설바이빈 단백질은 배양물에서 세포 생장을 연장하거나 비정상적인 세포 생장을 차단하는 등의 세포 아폽토시스를 저해하는 것과 관련된 설바이빈을 저해하거나 촉진하는데 이용할 수 있는 물질 또는 물질의 표적으로 이용할 수 있다.

여기에서 사용된 것과 같이, 세포 수를 증가시키거나 감소시키는 아폽토시스 수단을 조절하여 주어진 집단에서 아폽토시스를 실행한다. 세포에 있는 설바이빈의 양을 증가 또는 감소시키거나 설바이빈 활성을 증가 또는 감소시켜 조절한다. 바람직하게는, 종양 또는 이와 같은 조절로 인하여 유익한 효과를 얻게되는 다른 조직 또는 세포 군에서 이와 같은 아폽토시스가 조절되는 것이 발견된다. 또한, 적절하게는 주어진 세포 집단에서 아폽토시스를 하게되어 세포 수의 증가 또는 감소는 그 집단 세포의 적어도 약 10%, 20%, 40% 그 이상 바람직하게는 적어도 약 50%정도가 된다.

본 발명은 또한 설바이빈에 결합하는 단백질을 분리하는 방법을 개발하는데 기초한다. 하기에서 상술하는 것과 같이 설바이빈 단백질 또는 설바이빈 단편에 기초한 프로브는 설바이빈 결합 단백질을 분리하기 위한 포집 프로브로 이용된다. 우세 음성 단백질, 이들 단백질을 코드하는 DNA, 이들 결합 단백질에 대한 항체, 이들 단백질의 웨티드 단편 또는 이들 단백질 모방체를 세포로 도입시켜 설바이빈 기능에 영향을 줄 수 있다. 또한, 설바이빈 기능을 조절하는 새로운 치료법을 개발하기 위해, 합성 소 분자, 복합적인 또는 자연 발생적인 화합물 라이브러리를 스크린하는데 이를 단백질을 새로운 표적으로 제공한다.

#### II. 설바이빈의 확인, 일반적인 특징 및 조직에서의 분포

본 발명은 설바이빈이라고 명명한 아폽토시스의 방해물질로, 암 세포 생장에 선택적으로 이익을 주는 것으로 보이는 IAP 족의 새로운 구성 요소를 염색체 17q25에서 확인한 것에 기초한다. 설바이빈 유전자의 관련 특징에는 발생학적으로 그리고 분화시에 조절되는 발현, 인자 Xa 수용체 EPR-1과 거의 동일한 상보적인 DNA 서열, 통상적인 사람의 종양에는 *in vivo*에서 발현이 잘되고, 인접한 신조직형성안된 집단에서는 발현을 볼 수 없는 것 등을 포함한다. 하기에서 설명하는 것과 같이, EPR-1 mRNA를 메탈로티오네으로 유도시키면 설바이빈을 발현시켜 아폽토시스가 일어나고, HeLa 세포 전이감염체의 증식을 저해하게 된다.

조혈에 이들이 관여하는 것에 추가하여, 혈액 프로테아제에 대한 세포 수용체는 만능 시그널발생시키는 분자로 배 발생 (Connolly, A.J. et al., Nature (1996) 381:516-519) 및 맥관 형성(Carmeliet, P. et al., Nature (1996) 383:73-75)에 중요한 역할을 한다. 이와 같은 배경 하에, 설바이빈 유전자는 응혈촉진 활성을 관여하는(Altieri, D.C., FASEB J(1995) 9:860-865) 그리고 T 세포 활성화에 관여하는(Duchosal, M.A. et al., Nature (1996) 380:352-356) 인자 Xa의 수용체인 EPR-1의 cDNA와 하이브리드시켜 분리하였다. 설바이빈 코드 서열은 EPR-1 cDNA와 거의 동일하나, 이의 방향은 인트론-엑손 경계에서 표준 접합 부위 위치에 대한 안티센스 EPR-1 가닥으로 정하였다(Padgett, R.A. et al., Ann Rev

Biochem (1986) 55:1119-1150). 한편, EPR-1 "센스" 가닥에 대해서는 기존 연구에서 설명을 하고 있는데, EPR-1 cDNA 또는 키메라 EPR-1 구조로 감염된 포유류 세포(Ambrosini, G. et al., J Biol Chem (1996) 271:1243-1248 and Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)는 항-EPR-1 mAbs에 의해 인지되고, 특정 포화된 반응에서 인자 Xa에 결합된다.

이들 발견은 EPR-1 전사체와 방향은 반대이나 상동성이 여러 부분에서 매우 큰 것과 일치한다. EPR-1 mRNA와 서든 블릿 하이브리드 복합 패턴이 다른 것이 이와 같은 가설을 뒷받침한다. 기존에는 이중 가닥 EPR-1 프로브가 EPR-1<sup>+</sup> 세포 mRNA에서 세 개 강력한 하이브리드 밴드 즉, 1.9kb, 3.4kb, ~1.5kb 밴드를 감지한다(Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865). 여기에서, 단일 가닥-특이적인 프로브는 여러 개 성숙한 폴리아데닐화된 EPR-1 관련 메시지가 존재한다는 것을 확인시켜주고, 1.9kb와 3.4kb는 두 개의 매우 조절이 잘 된 안티센스 EPR-1 전사체에 상응하고, 1.5kb 밴드, 좀더 정확하게 표현하면, 1.2kb는 순수 EPR-1-인코드 메시지와 일치한다는 것을 알았다. 1.9kb 안티센스 전사체는 분명히 여기에서 설명하는 설바이빈 유전자에서 유래되었지만, 1.2kb "센스" EPR-1 메시지를 인코드하는 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있다.

그러나, (i) 설바이빈 유전자와 무관한 몇 가지 게놈 EPR-1-하이브리드되는 밴드가 존재한다는 것; (ii) 다양한 종에서 EPR-1 서열의 제한 효소 패턴이 상이하다는 점; (iii) 상당수의 발현된 tag 데이터베이스가 양성(제공번호 W46267) 또는 음성(제공번호 W34764, W83810, T29149) EPR-1 가닥과 일치한다는 것( $P=0.018-7 \times 10^{-11}$ ) 모두 상기에서 설명하는 것에 반대 방향으로 적어도 제2의 매우 관련성이 큰 EPR-1 유전자가 존재하고, 이는 기존의 특정 인자 Xa 수용체를 인코드한다는 것을 암시한다(Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865).

EPR-1 서열과 연관된 유전자 복제 과정에서 유사한 상황이 발생할 수 있다. 흥미로운 것은 한 개의 하이브리드 시그널이 염색체 17q25에서 감지되었고, 한 개의 하이브리드 밴드가 고분자량 게놈 DNA의 서든 블릿에서 확인되었는데 이는 반대 방향으로 된 EPR-1 관련 서열이 75-130kb 사이 공간내에 매우 인접하게 위치한다는 것을 암시한다.

반대 방향의 다중 EPR-1 전사체가 존재한다는 것은 자연 발생 안티센스에 의해 상호조절되는 메가니즘을 암시하는 것이다. 이는 *in vivo*에서 발생하는 동안 또는 어른 조직 그리고, HL-60 세포 말단 분화시에 센스와 안티센스 EPR-1 메시지가 상호 배타적, 대부분 부정합적으로 분포한다는 것과 일치한다. 안티센스 조절이 원핵세포에서 일반적인 것인지만(Green, P.J. et al., Annu Rev Biochem (1986) 55:569-597), 유전자 조절에 참여할 수 있는 기능을 하는 안티센스 전사체 발생에 대해 진핵세포 유전자 생성물의 수가 증가된다는 것이 최근에 확인되었는데, 여기에는 기본 섬유아세포 생장 인자(Kimmelman, D. et al., Cell (1989) 59:687-696; Murphy, P.R. et al., Molecular Endocrinology (1994) 8:852-859); al(I) 콜라겐(Farrell, C.M. et al., J Biol Chem (1995) 270:3400-3408 and Lukens, 1995); n-myc(Krystal, G.W. et al., Mol Cell Biol (1990) 10:4180-4191); c-myc(Celano, P. et al., J Biol Chem (1992) 267:15092-15096); p53(Khochbin, S. et al., EMBO J (1989) 8:4107-4114); c-erbAa(Lazar, M.A. et al., Mol Cell Biol (1989) 9:1128-1136); CD3 ζ/η/θ위치(Lerner, A. et al., J Immunol (1993) 151:3152-3162)를 포함한다.

하기에서 설명하는 것과 같이, HeLa 세포 전사체에서 기능성 안티센스에 의해 EPR-1/설바이빈 유전자가 균형을 이루고 있다는 것을 설명하였고, EPR-1 "센스" 가닥의 메탈로티오닌-유도된 전사는 설바이빈의 발현을 억제하고, 아폽토시스/세포 증식에 상당한 영향을 준다(하기 참고). 이와 같은 조절 메카니즘은 EPR-1과 설바이빈사이에 가능성있는 단백질 연합으로 인한 것은 아닌데, 그 이유는 이들 실험에 이용되는 EPR-1 구조는 해독 개시 코돈이 부족하기 때문이다. 추가 실험에서는 세포 생장을 저해하는 설바이빈 안티센스의 능력을 평가하는 것이다. 설바이빈 안티센스를 lacZ 있는 플라스미드로 일시적으로 공동 전이감염시키고, 48시간 후에 β-갈락토시다제 발현 세포에서 세포 생존성을 측정하여 실시한다. 결과를 보면, 설바이빈 안티센스의 생존능은 빈 벡터로 전이감염시킨 기준 세포보다 <20%이하가 된다는 것을 알 수 있다. HeLa 세포에 유사하게 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 기준 안티센스를 전이 감염시켰을 경우에는 효과가 없었다.

설바이빈은 EPR-1에 아미노산 서열 상동성이 없는 142개 아미노산(~16.5 kDa)의 소(小) 단백질로, 아폽토시스의 IAP 저해물질에서 발견되는(Duckett, C.S. et al., EMBO J (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A. et al., Cell (1995) 83:1253-1262; Liston, P. et al., Nature (1996) 379:349-353; Rothe, M. et al., Cell (1995) 83:1243-1252; Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167-178) BIR-상동 도메인(Birnbaum, M.J. et al., J Virology (1994) 68:2521-2528; Clem, R.J. et al., Mol Cell Biol (1994) 14:5212-5222)이 존재하는 경우에 설바이빈(Survivin)으로 명명한다. 전반적인 서열 보존에 기초하여, 카르복시 말단 RING 핑거가 없고, 한 개의 부분적으로 보존된 BIR 도메인이 존재하는 경우에, 설바이빈은 가장 멀리 떨어져 있는 IAP 족의 관련 요소로, NAIP와 상당한 정도의 유사성을 공유한다(Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167-178). 따라서, *bcl-2* 또는 다른 IAP 단백질과는 달리, 설바이빈은 성인 조직에서는 감지할 수 없고, 사람에서 가장 흔한 암인 폐

암, 결장암, 유방암, 췌장암, 전립선암에서 주로 발현되고, *in vivo*에서 높은 등급 Hodgkin 임파종의 ~50%에서 발현된다. 또한, 다른 IAP 단백질과는 달리(Deveraux, Q. et al., *Nature* (1997) 388:300-304), 설바이빈은 세포 없는 시스템에서 카스파제(caspases)에 결합하지 않는다(Roy, N. et al., *Blood* (1997) 595:2645).

*in vitro*에서 IAP 단백질의 항-아폽토시스 성질(Duckett, C.S. et al., *EMBO J* (1996) 15:2685-2694; Liston, P. et al., *Nature* (1996) 379:349-353)과 *in vivo*에서 IAP 단백질의 항-아폽토시스 성질(Hay, B.A. et al., *Cell* (1995) 83:1253-1262)과 일치하게, EPR-1 전사체(설바이빈에 대한 자연 안티센스)에 의해 설바이빈 발현이 저해되어, 아폽토시스가 증가되는데, 이는 HeLa 세포 전이감염체에 뉴클레오솜간에 *in situ* DNA 분절로 측정할 수 있다. 아폽토시스를 방해하는 RING 평거-IAP 단백질(less)의 능력은 NAIP에 의해 중개되는 아폽토시스의 억제(Liston, P. et al., *Nature* (1996) 379:349-353) 또는 RING 평거 결손 후에 초파리 IAP 단백질의 *in vivo* 수득 기능으로 설명한 전례가 있다(Hay, B.A. et al., *Cell* (1995) 83:1253-1262). 항-아폽토시스 유전자는 비정상적으로 오래 사는 세포에서 온코젠 돌연변이 축적을 하여, 세포 생장에서 간접적인 역할을 하는 것으로 보이나(Reed, J.C., *J Cell Biol* (1994) 124:1-6), 설바이빈을 하향 조절하면 HeLa 세포 증식이 상당히 방해받게 된다. 아폽토시스에 의해 안티센스 전사체가 최대 수준으로 발현되는 HeLa 세포가 갑자기 사라지면 나타나는데 비해, *bcl-2*의 안티센스 저해후에 *in vivo*에서 종양 세포 증식이 비슷하게 감소되었음이 보고된 바 있다(Reed, J.C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87:3660-3664).

IAP 단백질이 아폽토시스 저해에 국한되지 않고, 세포 증식에 좀더 일반적인 역할을 한다는 가능성은 이미 제시된 바 있다. Rothe et al., 은 최근에 두 개 IAP 단백질(cIAPs)에서 아미노 말단 BIR은 75kDa TNF 수용체(Rothe, M. et al., *Cell* (1995) 83:1243-1252)[아폽토시스 시그널 발생보다는 세포 증식 및 생존에 주로 연관되는 분자(Tartaglia, L.A. et al., *Immunol Today* (1992) 13:151-153)]와 연합된 시그널 변환물질과 물리적으로 상호 작용한다는 것을 설명하였다. 설바이빈은 시그널 분자에 물리적으로 연결되는지를 알 수 없기 때문에(Rothe, M. et al., *Cell* (1995) 83:1243-1252), 다른 IAP와 비교하여 이의 BIR 구조적 다양성은(Duckett, C.S. et al., *EMBO J* (1996) 15:2685-2694; Hay, B.A. et al., *Cell* (1995) 83:1253-1262; Liston, P. et al., *Nature* (1996) 379:349-353; Rothe, M. et al., *Cell* (1995) 83:1243-1252; Roy, N. et al., *Cell* (1995) 80:167-178) 아폽토시스 저해/세포 생장의 특정 메카니즘에 대해 초분자적인 상호작용에 대한 특이성을 부여할 수 있다.

최근, 암을 포함하는 다양한 인간 질병의 병인형성에 기인하는 주요 메카니즘으로 예정된 세포 죽음(아폽토시스)의 제어 상실이 대두되었다(Steller, H., *Science* (1995) 267:1445-1449; Thompson, C.B., *Science* (1995) 267:1456-1462). 신형성에서 항-아폽토시스 유전자가 충돌하여, 포낭성 임파종에서 *bcl-2* 역할이 강조되었으나(Korsmeyer, S.J., *Blood* (1992) 80:879-886), 암에서 IAP 단백질의 분포에 대해서는 조사된 것이 없었다. 이에 대해, 설바이빈의 가장 놀라운 특징은 활성적으로 증식된 세포주에서 가령 거의 모든 통상적인 암, 즉 폐, 결장, 췌장, 유방 암등에서 *in vivo* 발현이 풍부하나 인접한 신조직 형성이 안된 세포 집단에서는 발현되지 않았다는 것이다. 여러 가지 사람 암에서 이들이 분포된다는 것은 신조직에서 아폽토시스/세포 증식 메카니즘에 이들 분자가 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. *bcl-2* 전형을 분석하면, 암에서 설바이빈의 과발현이 비정상적인 세포 생존을 유도하고(Veis, D.J. et al., *Cell* (1993) 75:229-240), 화학요법으로 유도되는 아폽토시스에 저항성이 증가되고(Miyashita, T. et al., *Blood* (1993), 81:151-157), 상기에서 보고된 *in vitro* 연구와 같이, 형질변형된 세포 증식에 직접적인 이점을 준다.

한편, 정상 PBMC와 *in vivo*에서 양성 유방 선종에 이들이 존재한다는 것은(공고안된 보고서), 설바이빈 발현이 반드시 그 자체로 악성 형질변환으로 해석할 필요는 없으나, 일반적으로 발생 또는 특정 자극에 대해 세포 특이적인 반응을 반영한다는 것이다. 이는 정상적인 배(공고안된 보고) 및 태아 발생시에 설바이빈이 존재하고, 생장이 멈춘 세포(가령, 비타민 D<sub>3</sub>-처리된 HL-60) 및 최종 분화된 조직 *in vivo*에서는 이들이 신속하게 사라지는 것과 일치한다. 성숙한 조직에서 구조적으로 발견되는 다른 IAP 단백질을 다양하게 하였을 경우(Duckett, C.S. et al., *EMBO J* (1996) 15:2685-2694; Liston, P. et al., *Nature* (1996) 379:349-353; Rothe, M. et al., *Cell* (1995) 83:1243-1252), 발현 패턴은 태아 조직에서 *bcl-2*의 분포(LeBrun, D.P. et al., *Am J Pathol* (1993) 142:743-753)를 암시하고, 아폽토시스에 감수성과 일치하는 분화된 세포에 좀더 제한적으로 존재한다는 것을 암시한다(Hockenberry, D.M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:6961-6965).

요약하면, 이와 같은 발견은 *in vivo*에서 IAP 단백질과 암간에 새로운 연결고리로 설바이빈을 확인하였다. 하기에서 제시하는 데이터의 주요 함축내용은 EPR-1 발현에 중심이 되는 정상 세포 조절 매카니즘을 조절하여 이와 같은 유력한 항-아폽토시스 유전자의 영향을 조절할 수 있을 것이라는 가능성이(Altieri, D.C., *FASEB J* (1995) 9:860-865). 설바이빈을 표적으로 하면, 형질변환된 세포 생장에 대한 선택적인 장점을 없애고, 이를 치료요법적으로 유익하게 이용하면, 화학요법

에 의해 유도된 아폽토시스에 대해 암세포의 감수성을 증가시킬 수 있다. 동일선상에서, EPR-1/설바이빈 위치 내에 또는 주변에 다형성 표식의 확인 및 연장된 아플로타입(aplotypes) 작제는 화학요법에 감수성 있는 유전학 분야에 새로운 식견을 제공한다.

### III. 특정 구체예

#### A. 설바이빈 단백질

본 발명은 분리된 설바이빈 단백질 및 설바이빈 단백질의 대립유전자 변이체, 설바이빈 단백질의 보존성 아미노산 치환체를 제공한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 설바이빈 단백질(또는 설바이빈)은 도 4에 제시한 사람 설바이빈의 아미노산 서열을 가지는 단백질을 말한다. "설바이빈 단백질"이라는 용어에는 설바이빈의 자연 발생 대립유전자 변이체를 포함하는데, 자연 발생 단백질은 상기에서 구체적으로 언급한 아미노산 서열과는 약간 다른 것을 말한다. 상기에서 언급한 서열과는 약간 다른 아미노산 서열을 가지는 대립유전자 변이체도 세포 아폽토시스를 저해하는 필요 능력을 가질 수 있다.

여기에서 언급한 것과 같이 설바이빈 단백질 족은 사람이외에 유기체에서 분리된 설바이빈 단백질을 말한다. 설바이빈 단백질 족의 다른 구성 요소를 확인하고 분리하는데 이용되는 방법은 다음에서 설명한다.

설바이빈은 IAP(저해성 아폽토시스 단백질) 단백질 족의 구성 요소이다. 그러나, 설바이빈은 여러 가지 점에서 다른 IAP 단백질과는 다른 IAP 단백질 족에 유일한 서브페밀리의 제 1 요소이다. 설바이빈과 이들 유전자 족의 다른 성분간에 BIR 모듈에서 상동성 및 서열 보존성이 있는데도 불구하고, 설바이빈 단백질 족의 요소에만 독특한 중요한 구조적 차이가 있다. 우선, 임의 다른 IAP 단백질과는 달리, 설바이빈은 오로지 한 개의 BIR 모듈을 가진다(대부분 다른 분자의 경우에는 2-3개를 가진다). 또한, 설바이빈은 카르복시-말단 RING 핑거를 포함하나 대신에 예측된 코일-코일을 가진다. IAP족에서 신경성 아폽토시스 저해 단백질(NAIP)만이 RING 핑거가 보족하나 카르복시 말단에 코일-코일 구조를 가지지는 않는다. 마지막으로, 설바이빈과 다른 IAP 단백질간에 DNA 서열의 유사성이 없다(설바이빈에 대해 고안된 PCR 프라이머는 다른 IAP 단백질 및 이의 역에 대해서도 감지되지 않았다).

본 발명의 설바이빈 단백질은 분리된 형태가 바람직하다. 여기에서 사용된 바와 같이, 물리적인, 기계적인 또는 화학적인 방법을 이용하여, 설바이빈 단백질과 정상적으로 연합된 세포 구성물질로부터 설바이빈 단백질을 분리된 형태의 단백질을 말한다. 당업자는 표준 정제 방법을 이용하여 분리된 설바이빈 단백질을 수득할 수 있다.

본 발명의 설바이빈 단백질에는 추가로 하기에서 설명하는 보존성 설바이빈 단백질 변이체를 포함한다. 여기에서 설명한 것과 같이, 설바이빈 결합 짹에 결합하는 능력 또는 세포 아폽토시스를 저해하는 설바이빈의 능력에는 나쁜 영향을 주지 않으면서 아미노산 서열에 변화를 주는 것이 보존성 변이체라고 한다. 변화된 서열로 인하여 설바이빈 단백질이 설바이빈 결합 짹과 연합되지 못하거나 또는 세포 아폽토시스를 방해하지 못하는 경우에는 치환, 삽입 또는 결손은 설바이빈 단백질에 역효과를 제공하는 것이다. 가령, 설바이빈의 활성에 영향을 주지 않고 설바이빈의 전체 전하, 구조, 소수성 또는 친수성 성질을 변화시킬 수 있다. 따라서, 설바이빈 아미노산 서열은 설바이빈의 활성에 역효과를 주지 않으면서 웨티드에 친수성 또는 소수성을 더 제공할 수 있다.

설바이빈 족 단백질의 대립유전자 변이체, 보존성 치환 변이체 및 구성원은 세포 아폽토시스를 저해하는 능력을 가진다. 이와 같은 단백질은 일반적으로 사람 설바이빈 서열에 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 가지는데, 적절하게는 약 80%, 좀더 바람직하게는 적어도 90% 동일하고, 가장 바람직하게는 95% 동일하다. 이와 같은 서열에 대한 동일 또는 상동성은 최대 비율의 상동성을 얻기 위해 서열과 사이 갭을 배열하고, 임의 보존성 치환을 상동인 것에 포함시켜 공지의 웨티드와 동일한 서열에서 아미노산 잔기 비율로 나타낸다. 웨티드 서열 내에 N-말단, C-말단 또는 내부 연장부분은 상동성으로 간주하지 않는다.

따라서, 본 발명의 설바이빈 단백질에는 도 1에 나타낸 아미노산 서열을 가지는 문자를 포함하고; 이의 단편은 설바이빈 단백질의 적어도 약 3, 5, 10, 15 아미노산 잔기의 연속 서열을 가지는 것이고, 이들 서열의 아미노산 변이체는 아미노산 잔기가 제시된 설바이빈 또는 이의 단편 N-말단 또는 C-말단 또는 그 내부에 삽입된 것이다. 변이체로 간주하는 것에는 상동 재조합, 부위-직접적인 또는 PCR 돌연변이에 의해 예정된 돌연변이를 포함하고, 토키, 들쥐, 뮤린, 돼지, 소, did, 말 및 사람이 아닌 영장류종을 포함하나 이에 국한시키지 않는 다른 동물 종의 이에 상응하는 설바이빈 단백질, 설바이빈 단백질 족의 대립유전자 변이체 또는 자연 발생 변이체; 설바이빈 단백질을 치환, 화학적, 효소적 또는 자연 발생 아미노산이 외의 부분(예를 들면 효소 또는 방사능동위원소와 같은 감지가능한 부분)으로 공유적으로 변화시킨 유도체등을 포함한다. 또한 재조합 설바이빈 단백질을 이용하여 2D-NMR, circular dichroism, X-ray 결정 구조등으로 설바이빈 문자 구조를 알 수 있고, 따라서 부위-직접적인 돌연변이발생 방법을 이해할 수 있고 및 특정 소(小)문자 저해물질의 고안할 수 있다.

하기에서 설명하는 것과 같이, 설바이빈 단백질 족의 구성요소들은 다음에 이용할 수 있다; 1) 설바이빈이 관련된 세포 아폽토시스 저해를 차단하는 표적으로 이용; 2) 설바이빈에 결합하는 결합 짹을 확인 및 분리; 3) 설바이빈과 설바이빈 결합 짹이 연합하는 것을 차단하는 물질을 확인하는 방법에 이용; 4) 설바이빈이 관련된 세포 아폽토시스를 검사하는데 표적으로 이용; 5) 세포 아폽토시스를 차단하는 물질로 단독 또는 다른 복합 치료의 일부로 이용; 6) 항-설바이빈 항체의 순환하는 수준을 정량화하기 위한 검사에 결합 짹으로 이용; 7) 항-설바이빈 항체 생산을 밝혀, 순환하는 설바이빈 수준을 정량화하는 검사에 이용되는 항원 또는 면역조직화학 목적으로 이용; 8) 치료제 항-암 백신 또는 다가 백신의 성분으로 이용.

## B. 항-설바이빈 항체

본 발명은 설바이빈 단백질에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 제공하는 것이다. 항-설바이빈 항체에는 단클론성 항체 및 다클론성 항체 뿐만 아니라 항원 결합 도메인 또는 하나이상의 상보적인 결정 부분을 포함하는 단편도 포함된다.

항체는 일반적으로 분리형 또는 면역공액 형으로 설바이빈 단백질 또는 단편을 이용하여 적절한 포유류 숙주에 면역화시켜 준비할 수 있다(Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). 도 9는 다양한 설바이빈의 항원 지수 Jameson-Wolf 플롯을 제공한다. 도 9에서 제공하는 다른 구조 분석과 복합하여 이와 같은 부분은 설바이빈 특이적인 항체를 만드는데 이용하는 적절한 단편을 제공한다. BSA, KLH 또는 다른 운반체 단백질과 같은 담체와 단백질을 면역원 공액물을 준비하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 일부 조건에서, 카르보디이드 시약을 이용하여 직접적인 공액을 이용할 수 있으나, 다른 경우에는 Pierce Chemical Co., Rockford, IL에서 공급하는 연결 시약이 효과적일 수 있다.

적절한 시간동안 설바이빈 이뮤노겐을 주사로 투여할 수 있는데, 적절한 어쥬번트를 이용하는 경우도 당분야에 그 방법이 공지되어 있다. 면역화 과정 동안에 적절한 항체 형성이 되었는가는 항체 역가로 알 수 있다.

일부 용도에는 이와 같은 방식으로 생산된 다클론성 항혈청이 적합할 수도 있겠지만, 제약학적 조성물의 경우에는 단클론성 항체를 사용하는 것이 바람직하다. Kohler and Milstein 방법을 이용하거나 또는 임파세포 또는 비장 세포의 불사화에 영향을 주는 변형 방법을 이용하여, 원하는 단클론성 항체를 분비하는 불사화된 세포주를 만들 수 있는데, 일반적으로 이와 같은 방법은 공지되어 있다. 원하는 항체를 분비하는 불사화된 세포주는 설바이빈 웨티드를 항원으로 이용하는 면역 검사로 스크린한다. 원하는 항체를 분비하는 적절한 불사화된 세포 배양물을 확인하면, 세포는 *in vitro*에서 배양하거나 또는 복수에서 생산할 수 있다.

그 다음 배양 상청액 또는 복수 상청액으로부터 원하는 단클론성 항체를 회수한다. 단클론 단편 또는 면역학적으로 중요한 부분을 포함하는 다클론성 항혈청을 길항체 또는 완전한 항체로 이용할 수 있다. Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 단편과 같은 면역학적으로 활성을 가지는 단편을 이용하는 것도 치료요법에서는 적절한데, 그 이유는 이를 단편이 전체 이뮤노글로불린보다는 면역원성이 일반적으로 약하기 때문이다.

항체 또는 단편은 재조합 수단 등의 현재 기술을 이용하여 만들 수 있다. 키메라 또는 다중 종 기원의 CDR 이식편 항체에서는 수용체의 원하는 부분에 특이적으로 결합하는 부분을 만들 수 있다.

따라서 생성된 항체는 설바이빈에 설바이빈 결합 짹이 연합되는 것을 조절하는 물질 뿐만 아니라 설바이빈 발현/활성을 감지하는 면역검사, 설바이빈과 연합된 결합 짹을 정제하는 경우에도 유용하다.

## C. 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자

본 발명은 또한 여기에서 설명하고 있는 분리형의 설바이빈 및 관련 설바이빈 단백질을 인코드하는 핵산 분자를 제공한다. 편의를 위해, 모든 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자는 설바이빈 인코드 핵산 분자, *Survivin* 유전자 또는 *Survivin* 이라 한다. 여기에서 이용된 것과 같이, "핵산"은 상기에서 정의한 바와 같은 웨티드를 인코드하는 RNA 및 DNA; 이와 같은 웨티드를 인코드하는 핵산 서열에 상보적인 RNA 및 DNA; 이와 같은 핵산에 하이브리드되어, 스트린전트 조건하에 안정하게 결합을 유지하는 RNA 및 DNA; 웨티드 서열과 적어도 75% 상동성을 공유하는, 적절하게는 적어도 80%, 가장 적절하게는 85% 상동성을 공유하는 폴리웨티드를 인코드하는 RNA 및 DNA로 정의한다. 특히, 계놈 DNA, cDNA, mRNA, 안티센스 분자 뿐만 아니라 또다른 기본 구조의 핵산 또는 천연 소스 또는 합성된 것에서 유도된 또 다른 엔기를 포함하는 핵산 등도 포함된다. 그러나, 이와 같은 하이브리드 가능한 또는 상보적인 핵산도 본 발명에 따른 설바이빈 단백질을 인코드하는 핵산, 염격한 스트린전트 조건하에 하이브리드되는 핵산 또는 이 핵산에 상보적인 핵산을 포함하는 핵산은 새로운 진보성을 가지는 것이 된다.

여기에서 사용된 바와 같이, "스트린전트 조건"은 하이브리드반응이 분명한 감지가능한 서열을 만드는 조건을 말한다. 스트린전트 조건은 (1) 세척 시에 낮은 이온 강도 및 고온을 이용하는데 예를 들면, 0.015M NaCl/0.0015M 구연산 나트륨/0.1% SDS, 50°C; (2) 하이브리드하는 동안에 50%(vol/vol) 포름아미드와 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐파롤리돈/50mM 인산나트륨 완충액 pH6.5 750mM NaCl, 75mM 구연산 나트륨, 42°C와 같은 변성제를 이용한다. 또 다른 예를 들면, 50% 포름아미드, 5xSSC(0.75M NaCl, 0.075M 구연산나트륨), 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 파로포스페이트 나트륨, 5x Denhardt's 용액, 초음파분쇄된 억제 정자 DNA(50 $\mu$ g/ml), 0.1% SDS, 10% 엑스트란 설페이트를 이용하는데, 42°C에서 0.2xSSC 및 0.1% SDS에서 세척한다. 당업자는 분명한 감지가능한 하이브리드 시그날을 얻는데 적절한 스트리전트 조건을 결정하고 다양하게 변화시킬 수 있을 것이다.

여기에서 언급한 바와 같이, 핵산은 다른 소스 핵산으로부터 다른 폴리펩티드를 인코드하는 핵산 혼합물질에서 실제 분리된 것을 "분리형"이라고 한다.

본 발명은 또한 설바이빈 핵산 분자를 인코드하는 단편을 제공한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자 단편은 전체 단백질 인코드 서열의 작은 부분을 말한다. 단편의 크기는 원하는 용도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, C-말단  $\beta$ -코일 또는 IAP 모티프와 같은 설바이빈 단백질의 활성 단편을 인코드하는 단편을 선택하고자 하는 경우에는 이 단편은 설바이빈 단백질의 기능을 가지는 부분을 인코드할 수 있을 정도로 충분한 크기를 가져야 한다. 단편을 핵산 프로브 또는 PCR 프라이머로 이용하고자 하는 경우에는 프로브 또는 프라이밍 동안에 가짜 양성 수가 상대적으로 적도록 단편 길이를 선택해야 한다. 도 1에서는 선택적인 하이브리드 프로브 또는 PCR 프라이머로 이용할 수 있는 *Survivin* 유전자 단편을 확인하였다.

PCR반응에서 프로브 또는 특정 프라이머로 이용할 수 있는 본 발명의 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자 단편(가령 합성된 올리고뉴클레오티드) 또는 설바이빈 단백질을 인코드하는 유전자 서열을 합성하는데 이용되는 단편은 Matteucci, et al., J Am Chem Soc (1981) 103:3185-3191의 포스포디에스테르 방법 또는 자동 합성 방법 등을 이용하여 용이하게 합성할 수 있다. 또한, *Survivin* 유전자의 다양한 모듈라 단편으로 정의되는 올리고뉴클레오티드 집단의 합성 후에, 완전하게 변형된 *Survivin* 유전자에 결합하는 올리고뉴클레오티드에 결찰시키는 공지의 방법으로 더 큰 DNA 단편을 준비할 수 있다.

본 발명의 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 추가 변형시켜 진단 및 프로브로 이용하는 감지가능한 라벨을 포함시킨다. 상기에서 설명하는 것과 같이, 이와 같은 프로브를 이용하여 설바이빈 족의 다른 단백질 원소를 확인하고, 아래에서 설명하는 것과 같이, 이와 같은 프로브를 이용하여 설바이빈 발현 및 종양 생장 가능성을 감지한다. 당분야에서는 이와 같은 다양한 라벨이 공지되어 있고, 여기에서 설명하는 설바이빈 인코드 분자와 함께 이용할 수 있다. 적절한 라벨로는 바이오틴, 방사능라벨된 뉴클레오티드등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 당업자는 라벨된 설바이빈 인코드하는 핵산 분자를 얻는데 공지의 라벨을 이용할 수 있을 것이다.

*Survivin* 유전자는 EPR-1 유전자의 안티센스 또는 역방향을 가지기 때문에 진단 목적으로 이용할 수 있는 단일 가닥 프로브가 특히 바람직하다. 특히, 단일 가닥 프로브를 이용하여 설바이빈을 인코드하는 mRNA에 선택적으로 하이브리드될 수 있다. 단일 가닥 프로브는 공지의 방법을 이용하여 만들 수 있는데, 이중 가닥 프로브중 한 가닥을 분리하거나 또는 단일 가닥 RNA를 만드는 방법을 이용한다.

단백질의 활성을 파괴시키지 않으면서 해독하는 동안에 단백질 서열에 결합되는 아미노산의 결손, 추가 또는 변형에 의해 1차 구조를 변형시킬 수 있다. 이와 같은 치환 또는 다른 변형을 한 결과 본 발명의 범위에 속하는 DNA에 의해 인코드되는 아미노산 서열을 가지는 단백질이 된다.

#### D. 핵산 분자를 인코드하는 다른 설바이빈 분리

상기에서 설명한 바와 같이, 사람 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 확인하면 당업자는 여기에서 설명하는 사람 서열에 추가하여 설바이빈 족 단백질의 다른 구성 요소를 인코드하는 핵산 분자를 분리할 수 있다.

기본적으로 당업자는 설바이빈 아미노산 서열을 이용하여 세포에서 준비한 발현 라이브러리를 스크린하기 위해 항체 프로브를 만든다. 일반적으로 정제된 설바이빈 단백질(하기에서 설명) 또는 단클론항체로 면역화시킨 토끼와 같은 포유류의 다클론성 항체를 이용하여, 포유류 cDNA 또는 게놈 발현 라이브러리 가령 람다 gt11 라이브러리에 프로브시켜, 설바이빈 또는 설바이빈 족의 다른 단백질에 대한 적절한 코딩 서열을 얻을 수 있다. 클론된 cDNA 서열은 이의 고유 제어 서열을 이용하여 직접 발현된 융합 단백질로 발현되거나 효소 발현에 이용되는 특정 숙주에 적절한 기준 서열을 이용한 구조물에서 발

현된 융합 단백질로 발현된다. 도 1에서는 설바이빈 단백질 서열에서 볼 수 있는 중요한 항원성 또는 가상 작동 도메인을 확인하였다. 이와 같은 부분은 프로브 생산, 진단 및 치료용 항체를 생산하는데 설바이빈 단백질의 항원성 부분의 적절한 자료가 된다.

또는, 여기에서 설명하는 설바이빈을 인코드하는 부분을 합성하여, 이와 같은 단백질을 포함하는 임의 포유류 유기체로부터 설바이빈 죽 단백질의 구성 요소를 인코드하는 DNA를 회수하는 프로브로 이용된다. 약 18-20 뉴클레오티드(약 6-7 아미노산을 인코드하는)를 포함하는 올리고머를 준비하고, 이를 이용하여 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리를 스크린하여 염격한 조건 또는 과도한 가짜 양성을 제거할 수 있는 충분한 스트린дж트 조건하에서 하이브리드를 할 수 있다.

또한, PCR 반응에 이용할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 준비하여, 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 선택적으로 클론한다. 이와 같은 PCR 프라이머로 이용하기 위한 PCR 변성/어닐링/연장 과정은 당분야에 공지되어 있고, 이를 이용하여 다른 설바이빈 인코드 핵산 분자를 분리하는데 이용할 수 있다. 도 1에서는 프로브 또는 프라이머로 이용하기에 적합한 사람 *Survivin* 유전자 부분을 확인하였다.

#### E. 설바이빈 인코드하는 핵산 분자를 포함하는 rDNA 분자

본 발명은 설바이빈을 인코드하는 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자(rDNAs)를 제공한다. 여기에서 사용된 것과 같이, rDNA는 *in vitro*에서 분자 조작을 받게되는 DNA 분자이다. rDNA 분자를 만드는 방법은 당분야에 공지되어 있는데 예를 들면 Sambrook et al., Molecular Cloning (1989)을 참고로 한다. 적절한 rDNA 분자에서, 설바이빈 인코드하는 서열을 발현 조절 서열 또는 벡터 서열에 작동식으로 연결된다.

본 발명의 설바이빈을 인코드하는 서열중 하나에 연결되는 벡터 또는 발현 조절 서열은 원하는 기능상의 특징 가령, 단백질 발현, 형질변환되는 숙주 등에 따라 당업자가 선택할 수 있을 것이다. 본 발명에서 고려하는 벡터는 숙주 염색체로 직접 복제 또는 삽입할 수 있고 적절하게는 rDNA 분자에 포함된 *Survivin* 유전자를 발현시킬 수 있는 것이어야 한다.

당분야에는 작동할 수 있도록 연결된 단백질 인코딩 서열의 발현을 조절하는데 이용되는 발현 조절 원소가 공지되어 있는데, 예를 들면, 유도성 프로모터, 구성 프로모터, 분비 시그널, 다른 조절 원소 등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 적절하게는 유도성 프로모터는 숙주 세포 배지에 있는 영양소에 대해 반응하여 조절될 수 있다.

한 구체예에서, 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 포함하는 벡터는 원핵 레플리콘(replicon)을 포함하는데, 이는 형질변형된 박테리아 숙주 세포와 같은 원핵 숙주 세포에서 자동적으로 복제를 하고, 염색체 밖에서 재조합 DNA 분자를 유지시킬 수 있는 능력을 가지는 DNA 서열이다. 이와 같은 레플리콘은 당분야에 공지되어 있다. 또한, 원핵 레플리콘을 포함하는 벡터에는 유전자가 발현하여 약물 저항성과 같은 감지 가능한 표식을 제공하는 유전자를 포함할 수 있다. 일반적인 박테리아 약물 저항성 유전자는 암피실린 또는 테트라사이클린에 저항성을 제공하는 것이다.

원핵 레플리콘을 포함하는 벡터에는 *E. coli*과 같은 박테리아 숙주 세포에서 설바이빈 인코드 유전자 서열을 직접 발현(전사 및 해독)시킬 수 있는 원핵 또는 바이러스성 프로모터를 포함한다. 프로모터는 전사하기 위해 RNA 중합효소에 결합할 수 있는 DNA 서열에 의해 만들어진 발현 조절 원소이다. 박테리아 숙주에 필적할 수 있는 프로모터 서열은 본 발명의 DNA 단편을 삽입할 수 있도록 통상의 제한효소 부위를 포함하는 플라시미드 벡터에 제공된다. 이와 같은 플라스미드로는 pUC8, pUC9, pBR322, pBR329(Biorad Laboratories, Richmond, CA), pPL, pKK223(Pharmacia, Piscataway, NJ) 등이 된다.

진핵 세포 적절하게는 척추동물 세포와 필적할 수 있는 발현 벡터를 이용하여 설바이빈 코딩 서열을 포함하는 rDNA 분자를 만든다. 진핵 세포 발현 벡터는 당분야에 공지되어 있고, 몇 군데 회사로부터 구입할 수 있다. 일반적으로 이와 같은 벡터에는 원하는 DNA 단편을 삽입할 수 있도록 통상적인 제한 효소 부위가 있다. 이와 같은 벡터에는 PSVL, pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1(ATCC, #31255), 여기에서 설명하는 벡터 pCDM8 및 유사 진핵 발현 벡터 등이 된다.

본 발명의 rDNA 분자를 만드는데 이용되는 진핵 세포 발현 벡터에는 진핵 세포에서 효과적인 선택성 표식 적절하게는 약물 저항성 선택 표식 등을 포함할 수 있다. 적절한 약물 저항성 표식은 네오마이신에 저항성을 제공하는 네오마이신 포스포트란스퍼라제(*neo*) 유전자가 된다(Southern et al., Mol Anal Genet (1982) 1:327-341). 또는 선택성 표식은 별도 플라스미드로 제공될 수 있고, 두 개 벡터를 숙주 세포에 동시 형질 감염시켜, 선택성 표식에 해당되는 적절한 약물에서 배양하여 선별할 수 있다.

## F. 외부에서 공급하는 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포

본 발명의 설바이빈 단백질을 인코드하는 핵산 분자로 형질변환된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 진핵 또는 원핵세포이다. 설바이빈 단백질을 발현시키는데 유용한 진핵세포에는 제한을 두지는 않지만, 세포주는 세포 배양 방법에 적합해야 하고, *Survivin* 유전자 생성물의 발현 및 발현 벡터의 증식에 적합해야만 한다. 적절한 진핵 숙주 세포에는 이스트, 곤충, 포유류 세포 등을 포함하고, 바람직하게는 마우스, 들쥐, 원숭이, 사람 섬유아세포주등의 척추 동물 세포, 가장 바람직하게는 설바이빈 단백질을 자연상태에서 발현시키지 않는 세포가 되나 이에 국한시키지는 않는다. 적절한 진핵 숙주 세포에는 뮤린 IL-3 의존성 세포주 BaF3 및 진핵 조직 배양 세포주를 포함한다.

임의 원핵 숙주 세포를 이용하여 설바이빈 인코드하는 rDNA를 발현시킬 수 있다. 적절한 원핵 세포 숙주는 대장균(*E. coli*)이다.

공지 방법을 이용하여 본 발명의 rDNA 분자를 적절한 숙주 세포에 형질도입시키는데, 일반적으로 이용되는 벡터 형태 및 이용되는 숙주 시스템에 따라 달라진다. 원핵 숙주 세포를 형질 변환시키는 경우에는 전기천공 및 염 처리 방법이 일반적으로 이용된다(Cohen et al., Proc Natl Acad Sci USA (1972) 69:2110; Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)). rDNAs를 포함하는 벡터를 척추동물 세포에 형질도입시키는 경우에는, 전기천공, 양이온 지질 또는 염 처리 방법이 일반적으로 이용된다(Graham et al., Virol (1973) 52:456; Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA (1979) 76:1373-76).

본 발명의 rDNA 분자를 포함하는 성공적으로 형질 변환된 세포를 공지 방법으로 확인한다. 예를 들면, 본 발명의 rDNA를 수용한 세포는 한 개 콜로니를 만들어 클론된다. 이를 콜로니에서 세포를 수득하고, 용해시켜, Southern, J Mol Biol (1975) 98:503, or Berent et al., Biotech (1985) 3:208에서 설명하는 방법을 이용하여, DNA 내용물에 rDNA 존재하는지를 검사하거나 면역학적 방법을 이용하여 검사한 세포에서 생산된 단백질이 존재하는지를 검사한다.

## G. 설바이빈 단백질을 인코드하는 rDNA 분자를 이용하여 설바이빈 생산

본 발명은 또한 여기에서 설명하는 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자중 한가지를 이용하여 설바이빈 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 일반적으로 재조합 형태의 설바이빈 단백질을 생산하는 단계는 다음과 같은 단계가 관련된다.

첫째, 도 1에서 설명하는 핵산 분자와 같은 설바이빈 단백질을 인코드하는 핵산 분자를 얻는다. 설바이빈 인코드 서열에 인트론이 없는 경우에, 임의 숙주에서 발현될 수 있다. 그렇지 않은 경우에는 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자의 접합형을 만들고, 이를 이용하거나 또는 인트론을 포함하는 핵산 분자는 적합한 진핵 발현 시스템에서 이용할 수 있다.

설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 상기에서 설명하는 적절한 조절 서열에 연결되도록 위치시켜 설바이빈 인코드 서열을 포함하는 발현 단위를 만든다. 발현 단위를 이용하여 적절한 숙주에 형질변환시키고, 형질변환된 숙주는 설바이빈 단백질이 생산될 수 있는 조건하에 배양한다. 배양 배지 또는 세포로부터 선택적으로 설바이빈 단백질을 분리하는데, 약간의 다른 불순물에 대해 내성이 있는 경우에는 단백질의 회수 및 경제 과정이 필요 없다.

전술한 각 단계는 다양한 방식으로 실행될 수 있다. 예를 들면, 게놈 단편에서 원하는 코딩 서열은 얻을 수 있고 이를 바로 적절한 숙주에 이용할 수 있다. 적절한 레플리콘 및 조절 서열(상기에서 제시한)을 이용하여, 다양한 숙주에서 작용할 수 있는 발현 벡터 만들 수 있다. 조절 서열, 발현 벡터, 형질변환 방법은 유전자를 발현시키는데 이용되는 숙주 세포 형태에 따라 달라진다. 일상적으로 이용되지 않는 적절한 제한 부위를 코딩 서열 말단에 추가시켜 이를 벡터에 절단 가능한 유전자를 삽입할 수 있다. 당업자는 설바이빈 단백질을 생산하기 위해 설바이빈 인코드 서열을 이용하는 당분야에 공지된 임의 숙주/발현 시스템을 채택할 수 있을 것이다.

## H. 설바이빈을 이용한 세포 죽음을 저해하는 방법.

상기에서 제공된 바와 같이, 설바이빈은 세포 아폽토시스를 저해하는 것으로 보인다. 따라서, 설바이빈을 이용하여 세포 생명을 연장시킬 수 있다. 일반적으로 설바이빈을 세포와 접촉시키면 세포 아폽토시스가 저해된다.

세포 아폽토시스를 저해하고자 하는 다양한 상황이 있다. 예를 들면, 이동 및 이식을 위해 준비된 조직 및 기관에서 설바이빈 단백질을 이용하여 세포 죽음을 저해한다. 또는, 세포 주에서 발현되는 설바이빈 인코드 핵산 분자를 이용하여 장시간 배양을 위한 세포주를 만든다.

여기에서, 설바이빈 단백질 또는 *Survivin* 유전자를 세포 아폽토시스를 저해하는 수단으로 이용할 수 있다. 세포 배양 시스템에서, 설바이빈 단백질은 리포좀, Penetrin-1 수송 또는 세포 생장 배지에 포집시키는 등의 수단을 이용하여 세포로 유입시켜 아폽토시스를 저해한다. 또한, *Survivin* 유전자를 세포에 도입시켜 발현시킴으로써 배양물에서 세포 생명을 연장시킬 수 있다. 이는 배양된 세포가 원하는 화합물을 생산하는 능력을 증가시키는 방법 및 수단을 제공하고, 세포 및 조직의 1차 외식편 장기 배양물을 만드는 방법을 제공한다.

조직 이식편에서, 일반적으로 조직 및 기관은 이식하기 전에 저장하고 운반된다. 아폽토시스와 유사한 기작으로 세포 죽음으로 조직 또는 기관의 생존능이 상실하게 된다. 이와 같은 세팅에서, 조직 및 기관에서 세포 죽음을 저해하는 방법에 설바이빈 단백질 주입이 이용된다.

조로 질환과 같은 원하지 않는 또는 미숙한 세포 아폽토시스 등으로 인한 질병 상태가 있다. IAP 단백질에서 비활성화된 돌연변이는 인체 질병의 원인이 된다는 것은 알려진 사실이다. 예를 든다면 NAIP(상기 참조)이 있다. SMA(척추 근육 이상, 비정상적으로 아폽토시스가 증가된 것이 원인이 되는 신경 퇴행성 질환) 환자를 연구한 결과, NAIP 유전자가 비활성화되고, 이들 환자들 중 75%가 이 유전자가 결손되었다는 것이다(Roy et al. 1995, Cell 80:167). 연장시키면, 설바이빈에 비활성 돌연변이로 인하여 세포 죽음이 비정상적으로 증가된 것을 특징으로 하는 퇴행성 질환을 일으키게 된다. 염색체 17q25에 설바이빈 위치 내에 그리고 주변에 반수체 표시를 이용하면 이들 위치가 아폽토시스가 증가되는 질병에 관련되는지를 결정할 수 있다. 이와 같은 경우에 *Survivin* 유전자 또는 설바이빈 단백질을 이용하여 이와 같은 질병을 치료한다. 따라서, 비정상적인 아폽토시스를 치료하기 위해 환자에게 설바이빈 단백질 또는 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 투여한다.

## I. 설바이빈 결합 짹을 확인하는 방법

본 발명의 또 다른 구체예에서는 설바이빈의 결합 짹을 분리하고 확인하는데 이용되는 방법을 제공한다. 특히, 설바이빈 단백질을 포집 프로브로 이용하여 설바이빈 결합 짹을 확인한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 설바이빈 결합 짹은 설바이빈에 결합하고, 세포 아폽토시스를 설바이빈이 저해하는 것을 중개하는 생분자(단백질, DNA 또는 다른 공인자)이다.

상세하게 설명하면, 설바이빈 단백질은 설바이빈에 결합 짹이 연합될 수 있는 조건하에 설바이빈이 발현되는 세포 분취물 또는 추출물과 혼합한다. 혼합 후에, 설바이빈과 연합된 웨티드는 혼합물에서 분리할 수 있다. 설바이빈에 결합된 결합 짹을 제거하여 분석할 수 있다.

결합 짹을 확인하고 분리하기 위해, 전제 설바이빈 단백질을 이용할 수 있다. 또는, 설바이빈 단백질 단편을 이용할 수 있다.

여기에서 사용된 바와 같이, 세포 추출물은 용해된 또는 파열된 세포에서 만들어진 준비물 또는 분취물을 말한다. 세포 추출물의 적절한 원료는 자연상태에서 설바이빈을 발현시키는 세포가 된다. 이와 같은 세포를 예로 들면 종양 세포 및 배아 조직을 포함하거나 이에 국한시키지는 않는다.

다양한 방법을 이용하여 세포 추출물을 수득할 수 있다. 물리적 또는 화학적인 파열 방법을 이용하여 파열시킨다. 물리적인 파열 방법으로는 초음파 분쇄 및 기계적인 전단 등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 화학적인 용해 방법으로는 계면활성제 용해 및 효소 용해 등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는다. 또한, 개체에서 새로 분리된 세포 또는 배양된 세포 또는 세포주에서 세포 추출물을 준비한다. 당업자는 본 발명의 방법에 이용할 수 있는 추출물을 얻기 위해 세포 추출물을 준비하는 방법을 용이하게 선택할 수 있다.

일단 세포 추출물을 준비한 후에, 추출물은 설바이빈에 결합 짹이 연합할 수 있는 조건하에 설바이빈 단백질과 복합한다. 다양한 조건을 이용할 수 있는데, 가장 적절한 조건은 설바이빈을 발현하는 세포의 조직에서 발견되는 조건에 근접한 것이다. 삼투압, pH, 온도, 이용된 세포 추출물의 농도 등의 특징을 다양하게 하여, 설바이빈에 결합 짹이 연합되는 것을 최적화 시킬 수 있다.

적절한 조건하에서 혼합한 후에, 설바이빈을 혼합물로부터 분리한다. 혼합물을 분리하는데에는 다양한 기술을 이용할 수 있다. 예를 들면, 설바이빈에 특이적인 항체를 이용하여 설바이빈과 이에 연합된 결합 짹을 면역 침전시킬 수 있다. 또는, 크로마토그래피와 밀도/침전 원심분리와 같은 표준 화학적인 분리 기술을 이용할 수 있다.

추출물에서 발견되는 비연합안된 세포 구성물을 제거한 후에, 통상적인 방법을 이용하여 설바이빈 단백질로부터 결합 짹을 분리한다. 예를 들면 혼합물에서 염 농도 또는 온도를 변화시켜 분리할 수 있다.

혼합 추출물에서 설바이빈/결합 짹 연합물을 분리하는데 도움을 주기 위해, 설바이빈 단백질을 고형상 서포트에 고정시킬 수 있다. 예를 들면, 설바이빈은 니트로셀룰로오즈 매트릭스 또는 아크릴 비드에 부착된다. 고형성 서포트에 설바이빈이 부착되면 추출물에서 볼 수 있는 다른 구성성분으로부터 웨티드/결합째를 분리하는데 도움이 된다.

또는, 이스트 이중 하이브리드 시스템에 설바이빈을 인코드하는 핵산 분자를 이용할 수 있다. 이스트 이중 하이브리드 시스템을 이용하여 다른 단백질 결합째 쌍을 확인하고, 여기에서 설명하는 것과 같은 설바이빈을 인코드하는 분자를 이용하도록 한다.

#### J. 설바이빈 결합 짹의 용도

상기 방법을 이용하여 분리된 설바이빈 결합 짹은 다양한 목적에 이용될 수 있다. 결합째를 이용하여 당분야에 공지된 기술로 설바이빈 결합 짹에 결합하는 항체를 만들 수 있다. 설바이빈 결합 짹에 결합하는 항체를 이용하여 설바이빈 활성을 조사하는데, 이는 설바이빈에 의해 중개되는 생물학적 또는 병인성 과정을 조절하는 치료제로 이용되고, 결합 짹을 정제하는데 이용된다. 이와 같은 용도는 다음에 설명한다.

#### K. 설바이빈/결합 짹 상호작용을 방해하는 물질을 확인하는 방법

본 발명의 또 다른 구체예에서는 설바이빈에 설바이빈 결합 짹이 연합되는 것을 감소시키거나 방해하는 물질을 확인하는 방법을 제공한다. 특히, 테스트할 물질 존재 하에 또는 이 물질 없이 설바이빈을 설바이빈 결합 짹과 혼합시킨다. 설바이빈에 결합 짹이 연합할 수 있는 조건하에 혼합한 후에, 두 가지 혼합물을 분석하고, 비교하여, 이물질이 설바이빈에 결합 짹이 연합되는 것을 방해하는지를 확인한다. 테스트 물질을 포함하는 샘플에 존재하는 연합의 양이 감소되면 설바이빈에 설바이빈 결합 짹이 연합되는 것을 차단하는 또는 연합정도를 감소시키는 물질이 존재한다는 것을 확인할 수 있다.

여기에서 사용된 바와 같이, 물질이 존재함으로써 설바이빈 결합 짹이 설바이빈에 연합되는 것을 또는 연합되는 정도를 감소시키는 경우에 설바이빈/설바이빈 결합 짹 연합을 줄이는 또는 차단하는 물질이다. 한종류의 물질이 설바이빈 결합째에 결합하여 연합을 감소 또는 차단시키는 반면에, 다른 종류의 물질은 설바이빈에 결합하여 연합을 차단 또는 감소시킬 수 있다.

상기 검사에 이용된 설바이빈 결합 짹은 완전한 단백질 특징을 가지는 분리된 형태가 될 수 있고, 또는 세포 추출물에 존재하는 것으로 확인된 설바이빈 또는 설바이빈 결합 짹에 결합할 수 있는 부분적인 특징을 가지는 단백질이 될 수도 있다. 당업자는 문자량등의 확인가능한 성질로 설바이빈 결합째의 특징이 확인되는한 현재 검사를 이용할 수 있다.

상기 방법에서 검사된 물질은 무작위로 선택되거나 의도적으로 선택되도록 또는 고안되도록 한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 설바이빈에 설바이빈 결합 짹이 연합되는 것에 관련하는 것으로 보이는 특정 서열없이 물질을 무작위로 선택하는 경우에는 물질이 무작위로 선택되었다고 한다. 무작위로 선택된 물질의 예로는 화학적 라이브러리 또는 웨티드 복합 라이브러리 또는 유기체의 생장 배지 등이 있다.

여기에서 사용된 바와 같이, 물질이 물질의 작용과 연관하여 표적 부위 서열 또는 그 모양을 고려하여 선택된 경우에는 의도적으로 선택되었거나 고안되었다고 한다. 상기에서 설명하는 것과 같이, 설바이빈/설바이빈 결합 짹 상호작용을 차단하는 물질은 두 가지 작용 부위를 가진다; 설바이빈에서 결합 짹 접촉 부위와 설바이빈 결합 짹에서 설바이빈 접촉 부위. 설바이빈/설바이빈 결합 짹 접촉 부위로 구성된 웨티드 서열을 이용하여 물질을 의도적으로 선택하거나 고안할 수 있다. 예를 들면, 의도적으로 선택된 웨티드 물질은 이의 아미노산 서열이 설바이빈 결합째에 있는 설바이빈 접촉 부위와 동일한 웨티드이다. 이와 같은 물질은 설바이빈 결합째에 결합함으로써 결합 짹이 설바이빈에 연합되는 것을 감소시키거나 또는 차단시킬 수 있다.

본 발명의 물질은 웨티드, 소(小) 문자, 비타민 유도체 및 탄수화물 등이 될 수 있다. 당업자는 본 발명의 물질의 구조적 특징에는 제한이 없다는 것을 알 것이다. 본 발명에서 한 종류의 물질은 아미노산 서열이 설바이빈 단백질의 아미노산 서열에 기초하여 선택된 웨티드 물질이 된다.

본 발명의 웨티드 물질은 당분야에 공지된 표준 고형상(또는 용액상) 웨티드 합성 방법을 이용하여 준비할 수 있다. 또한, 통상적으로 이용할 수 있는 올리고뉴클레오티드 합성 기구를 이용하여 이를 웨티드를 인코드하는 DNA를 합성할 수 있고, 표준 재조합 생산 시스템을 이용하여 재조합에 의해 DNA를 만들 수 있다. 아미노산을 인코드하지 않는 유전자가 포함된 경우에는 고형상 웨티드 합성을 이용해야 한다.

본 발명에서 다른 한 종류의 물질은 설바이빈 또는 설바이빈 결합짝의 중요한 부위에 면역반응을 하는 항체이다. 상기에서 설명한 것과 같이, 항체는 항체가 표적으로 하기를 원하는 설바이빈 또는 결합짝의 일부분인 항원성 부분을 포함하는 웹티드를 적절한 포유류 개체를 면역화시켜 수득할 수 있다. 중요한 부분에는 설바이빈에 설바이빈 결합짝이 연합하는데 관여하는 접촉 부위를 포함한다.

하기에서 논의하는 것과 같이, 설바이빈 활성에 관계하는 중요한 최소 서열은 설바이빈 연합 분자를 확인하고, 이중 하이브리드 스크리닝에 사용되는 먹이로 이용되는 기능을 가지는 선형 도메인이 된다. 이와 같은 설바이빈 단편을 이용하면, 전체 길이 문자 또는 전체 BIR 도메인을 이용하는 것에 반대되는 스크린 특이성을 상당히 증가시킨다. 유사하게, 이와 같은 선형 서열은 생화학 친화력 정제 방법을 이용하여 설바이빈 결합 단백질을 분리하는 친화력 매트릭스로 이용된다.

## L. 설바이빈에 설바이빈 결합 짹이 연합되는 것을 차단하는 물질의 용도

배경 기술에서 설명한 것과 같이, 설바이빈은 세포 아폽토시스를 저해한다. 설바이빈에 설바이빈 결합 짹과 상호작용을 감소시키거나 차단하는 물질을 이용하여 설바이빈 기능 및 활성이 관여하는 생물학적 병인학적 과정을 조절한다.

상세하게 설명하면, 설바이빈에 의해 중개되는 생물학적 또는 병인학적 공정은 설바이빈에 설바이빈 결합 짹의 상호작용을 차단하는 물질을 개체에 투여하여 조절한다.

여기에서 사용된 것과 같이, 개체는 설바이빈에 의해 중개되는 병인 또는 생물학적 공정을 조절할 필요가 있는 포유류가 된다. "포유류"란 의미는 *Mammalia* 속에 속하는 대체를 말한다. 본 발명은 특히 사람을 치료하는데 특히 유용하다.

여기에서 언급한 바와 같이, 설바이빈 또는 설바이빈 결합 짹에 설바이빈 결합되는 것에 의해 조절되는 생물학적 또는 병인학적 공정은 설바이빈에 의해 중개되는 다양한 세포 과정을 말한다. 병인학적 과정은 유해한 효과를 일으키는 생물학적 과정을 말한다. 예를 들면, 설바이빈에 의해 조절되는 병인학적 과정은 종양 세포에서 세포 아폽토시스를 저해하는 것이다. 이와 같은 병인학적 과정은 설바이빈/설바이빈 결합짝 연합 또는 설바이빈 발현을 차단하는 또는 감소시키는 물질을 이용하여 조절할 수 있다.

여기에서 사용된 바와 같이, 물질이 이와 같은 질병의 정도 및 상태의 심각성을 줄이는 경우에 이 물질은 병인학적 과정을 조절한다고 말한다. 예를 들면, 물질이 세포 분할 속도 또는 그 정도를 줄이는 경우에 종양 세포 증식을 조절한다고 말한다.

## M. 설바이빈 또는 설바이빈 활성에 영향을 주는 물질의 투여

설바이빈/설바이빈 결합짝 연합을 차단하는 또는 설바이빈 단백질을 차단하는 본 발명의 물질은 장관외, 피하, 정맥내, 근육내, 복막내에, 경피로, 또는 볼을 통하여 투여할 수 있다. 또는 구강을 통하여 투여할 수 있다. 투여되는 약량은 물질을 제공받는 개체의 나이, 건강 상태, 체중, 병행 치료 종류, 및 치료 빈도, 원하는 효과 등에 따라 달라진다. 예를 들면, 설바이빈이 아폽토시스를 저해하지 못하도록 하여 종양 세포를 치료하고자 하는 경우에는 치료를 받는 개체에 설바이빈 발현 또는 설바이빈에 설바이빈 결합짝이 연합되는 상호작용을 방해하는 물질을 전신 또는 국소적으로 투여한다. 하기에서 설명하는 바와 같이, 이와 같은 물질을 투여하는 많은 방법을 이용할 수 있다.

본 발명은 또한, 설바이빈 또는 설바이빈/설바이빈 결합짝 연합을 차단하는 한 가지 이상의 물질을 포함하는 조성물을 제공한다. 개체에 따라 다양하게 변화될 수 있기 때문에, 당업자는 각 성분의 효과적인 범위의 약량을 결정할 수 있을 것이다. 일반적으로 약량은 0.1 내지 100 $\mu$ g/kg(체중)이다. 좀 더 바람직한 약량은 0.1 내지 10 $\mu$ g/kg(체중)이다. 가장 바람직한 약량은 0.1 내지 1 $\mu$ g/kg(체중)이다.

약리학적 활성 물질에 추가하여, 본 발명의 조성물에는 작용부위로 활성 화합물을 수송하는데 이용되는 부형제 및 보조제로 구성된 적절한 제약학적 수용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 장관외 투여에 적합한 조성물에는 수용성 염과 같은 수용성 상태에 활성 물질을 포함하는 수용액이 포함된다. 또한, 적절한 오일성 주사 혼탁액으로 활성 화합물을 혼탁액을 투여할 수 있다. 적절한 친지성 용매 또는 담체에는 참깨 오일과 같은 지방 오일, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 합성 지방산 에스테르 등을 포함한다. 수용성 주사 혼탁액에는 혼탁액의 접성을 증가시키는 물질을 포함할 수 있는데, 가령, 카르복시메틸 셀룰로오즈, 솔비톨, 텍스트란등이 포함된다. 선택적으로 혼탁액에는 안정화제가 포함될 수 있다. 리포좀을 이용하여 세포로 운반되는 물질을 포집시킬 수 있다.

본 발명에 따른 전신 투여를 위한 제약학적 조성물은 장관, 장관외, 국소 투여용으로 제조될 수 있다. 또한, 세 가지 형태의 조제물을 동시에 이용하여 활성 성분을 전신 투여할 수 있다.

경구 투여에 적합한 조성물에는 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 알약, 정제(피복된 정제포함), 연금약액, 혼탁액, 시럽, 흡입제 및 이의 방출 조절형을 포함한다.

본 발명의 방법을 실행하는데 있어서, 본 발명의 화합물은 단독 또는 복합하여 이용할 수 있고, 다른 치료 및 진단제와 복합하여 사용할 수 있다. 적절한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학요법제와 같은 일반적으로 이용되는 의료 행위에 따라 이들 질병에 일반적으로 처방되는 다른 화합물과 함께 투여할 수 있다.

## N. 복합 치료법

설바이빈 활성을 조절하는 본 발명의 물질 및 설바이빈을 단독으로 또는 특정 생물학적 또는 병인 과정을 조절할 수 있는 또 다른 물질과 복합하여 제공할 수 있다. 예를 들면, 설바이빈이 아폽토시스를 저해하지 못하도록 하는 본 발명의 물질은 암 세포 생장을 조절하는 방법에서 다른 항-암 물질과 복합하여 투여할 수 있다. 또는, 설바이빈을 세포 아폽토시스를 줄이는 수단으로 다른 보호성 물질과 함께 투여할 수 있다. 여기에서 사용된 바와 같이, 두 가지 물질은 동시에 투여할 경우 또는 물질이 동시에 작용할 수 있는 방식으로 각각 독립적으로 투여할 수 있다.

통상적인 화학요법과 복합하여 설바이빈 활성/발현을 저해할 수 있다. 설바이빈 활성/발현을 저해시키는데 복합하여 화학요법제를 사용하는 시기는 사용되는 화학요법제 및 치료하고자하는 종양 세포에 따라 달라진다. 설바이빈 활성/발현에 영향을 주는 물질과 복합하여 이용할 수 있는 화학요법제로는 사이클로포스포아미드(CTX; cytoxan), 클로람부실(CHL; leukeran), 시스팔라틴(CisP; platinol), 부설판(myleran), 멜파란, 카르무스틴(BCNU), 스트렙토조코신, 트리에틸렌멜아민(TEM), 미토마이신 C 등의 알킬레이트 물질 및 유사 알킬레이트 물질; 메트트렉세이트(MTX), 에토포시드(VP16; vepesid)6-멜 кап토퓨린(6MP), 6-티오구아닌(6TG), 사티라빈(Ara-C), 5-플로로우라실(5FU), 다카르바진(DTIC)과 같은 항-대사물질 및 이와 유사한 물질; 악티노마이신 D, 독소루비딘(DXR; 아드리아마이신), 다우노르루비빈(다우노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 등의 항생제 및 이와 유사한 항생제; 빈크리스틴(VCR), 빈블라스틴등과 같은 빈카 알칼로이드; 탁솔 및 탁솔 유도체와 같은 다른 항-종양 물질, 디사메타손(DEX; 데카드론)과 같은 세포증식 억제 물질인 글루코코르티코이드와 프레디니손과 같은 코르티코스테로이드, 하이드록시우레이아와 같은 뉴클레오시드 효소, 아스파라기나제와 같은 아미노산 결손 효소 및 다양한 항종양 물질을 포함한다.

화학요법에서 상기에서 설명하는 세포독성 물질을 이용하는 방법은 암 치료분야에 잘 공지된 바, 내성 및 효과를 모니터하고, 투여경로 및 약량을 조절하는데 이들 이용하는 경우에도 동일하게 고려한다. 예를 들면, 세포 독성 물질의 실제 약량은 현재 조직 배양 방법을 이용하여 결정한 환자의 배양된 세포 반응에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 설바이빈 활성/발현에 영향을 주는 물질이 없는 경우에 이용된 약량에 비교하면 약량이 감소될 것이다.

효과적인 세포독성 물질의 전형적인 약량의 범위는 제조업자가 권하는 범위가 될 수 있고, 동물 모델에서 *in vitro* 반응으로 그 약량 또는 농도를 줄일 수 있다. 따라서, 약량은 의사의 판단, 환자의 상태, 1차 배양된 악성 세포 또는 조직학적으로 배양된 조직 샘플의 *in vitro* 반응에 기초한 치료방법의 효과 또는 적절한 동물 모델에서 관찰된 반응에 기초한 치료 방법의 효과등에 따라 달라진다.

## O. 설바이빈 발현 및 설바이빈에 의해 중개되는 아폽토시스를 저해하는 것을 확인하는 방법.

본 발명은 또한 설바이빈이 중개되는 아폽토시스를 저해하는데 관여하는 세포를 방법을 제공하고, 설바이빈 활성이 관여하는 생물학적 병인학적 공정을 진단하고, 이와 같은 상태의 진행을 진단하고, 이와 같은 상태를 치료하고 치료에 효과적인 조건을 확인하는 방법에 사용되는 기술을 제공한다. 특히, 설바이빈에 의해 중개되는 아폽토시스는 설바이빈 단백질이 세포에서 발현되었는지를 결정하는 것으로 확인할 수 있다. 설바이빈을 발현하는 세포는 자연적인 세포 아폽토시스를 방해한다고 보인다.

다양한 면역학적 그리고 핵산 기술을 이용하여 설바이빈 단백질 또는 설바이빈을 인코드하는 mRNA가 특정 세포에서 생산되는지를 결정한다. 한 예에서, 세포 추출물을 준비한다. 그 다음 추출물을 검사하여, 세포에서 설바이빈이 발현되었는지를 결정한다. 발현 정도는 아폽토시스의 저해 정도를 측정하는데 이용된다. 발현이 증가되면 아폽토시스의 저해 정도가 증가되었다는 것이다.

설바이빈 발현을 측정하여 다양한 목적의 표적으로 이용한다. 종양에서, 설바이빈 발현이 존재한다는 것은 종양의 증식능력과 관계가 있다는 것이다. 실시예에서, 임파종은 다양한 수준의 설바이빈 발현을 나타내는데; 설바이빈을 거의 발현시키지 않는 임파종은 효과적으로 치료할 수 있는 낮은 수준의 임파종이고, 반면에 높은 수준으로 설바이빈을 발현시키는 임파종은 일반적으로 효과적으로 치료하기 힘든 높은 수준의 공격성 임파종이 된다. 따라서, 임파종 또는 다른 종양에서 설바이빈이 발현되는 수준을 이용하여 종양의 공격성 및 치료가능성을 예측할 수 있는데; 설바이빈의 발현 수준이 높은 경우에는 종양의 공격성이 크고, 치료하기가 더욱 힘들다.

예를 들면, 종양의 증식 능력 또는 치료 예후를 용이하게 결정하기 위해, 종양 세포 추출물을 만들어, 이를 전기영동을 통하여 분석하여 설바이빈 단백질이 존재하는지를 결정한다. 설바이빈의 존재 및 그 수준은 암의 증식능력 및 치료용이성과 연관된다. 또는, 상기에서 설명한 것과 같이, 단일-가닥 프로브를 이용하여 세포 추출물에 설바이빈을 인코드하는 mRNA를 확인한다.

종양의 공격성 및 치료 능력의 표식에 추가하여, 설바이빈 발현을 이용하여 항-종양 치료의 효과를 측정한다. 실시예에서, 전골수세포인 HL-60은 높은 수준의 설바이빈 발현을 가진다. 레토닌산으로 HL-60 세포를 치료하고, 종양 세포의 분화시키는 항-암제로 치료하면 설바이빈 발현이 줄어들거나 감소한다. 발현 감소는 분화정도와 연관관계가 있는데, 분화정도가 클수록 설바이빈 발현 수준이 낮다. 따라서, 설바이빈 발현을 이용하여 항-종양 처리의 효과를 측정하는데; 설바이빈 발현은 치료하는 동안에 감소된다면, 치료 프로토콜은 효과가 있는 것이고, 치료를 지속할 수 있으나, 설바이빈 발현 정도가 변함이 없다면 다른 치료 방법 또는 과정이 필요하다.

#### P. 설바이빈 발현을 조절하는 다른 방법

본 발명은 세포에서 *Survivin* 발현을 조절하는데 이용되는 추가 방법을 제공한다. 상기 및 아래에서 설명하는 것과 같이, *Survivin* 프로모터는 상류에 CPG 섬을 가진다. CPG 섬은 DNA 메틸화반응에 표적으로 알려져 있다. CPG 섬에서 DNA 메틸화 부위는 *Survivin* 발현을 조절하는 수단으로 작용된다; CPG 섬의 메틸화반응으로 인하여 프로모터의 하류에 있는 유전자의 전사가 억제된다. 따라서, DNA를 메틸화하는 물질 가령 메틸레이즈, 내상 메틸레이즈 생산을 자극하는 물질을 이용하여 설바이빈 발현을 조절할 수 있다. 특히, 세포에서 DNA 메틸레이션 수준을 증가시키고 특히 *Survivin* 유전자의 상류에 있는 CPG 섬에서 메틸레이션을 증가시켜 설바이빈 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다.

또 다른 방법에서, EPR-1 발현을 증가시켜 설바이빈 발현을 줄일 수 있다. 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 설바이빈 발현 및 EPR-1 발현은 일반적으로 상호 배타적인 것으로, EPR-1 발현되면 설바이빈 발현이 감소되거나 줄어들게 되고, 이역이 성립된다. 따라서, 세포에서 EPR-1 발현을 증가시키면 설바이빈 발현을 줄일 수 있다.

#### Q. 동물 모델

완전한 구조의 쥐의 설바이빈 유전자를 분리하였다. 유전자는 인트론 및 엑손 크기, 인트론-엑손 경계를 포함하는 사람에 상응하는 부분등이 상당히 보존되어있었다. 쥐 설바이빈 유전자의 코딩 부분은 88% 정도가 사람 단백질과 동일한 것으로 나타났는데, 이는 진화를 통하여 상당히 보존되었다는 것을 의미한다. 사람 및 쥐 발생동안에 설바이빈의 분화 및 발생학적으로 조절된 분포를 결정한다. 쥐의 설바이빈 유전자 및 단백질의 완전한 구조를 이용하면 유전자 실격 실험용 표적 벡터를 만들고 조직-특이적인 프로모터 조절하에 설바이빈을 발현하는 유전자 전이 위를 만드는데 있어서 좀더 이론적인 접근을 할 수 있다.

*Survivin* 유전자 및 설바이빈 단백질은 유전자 치료법에서 표적으로 이용된다. 한 실시예에서, 표준 뉴아웃(knock-out) 과정을 이용하여, 설바이빈-결손된 사람이 아닌 동물을 만들어 *Survivin* 유전자를 비활성화시키거나 또는 이와 같은 동물이 생존할 수 없는 경우에는 유도성 설바이빈 안티센스 분자를 이용하여 설바이빈 활성/발현을 조절한다. 또는, 동물을 변형시켜 조직 특이적인 방식으로 설바이빈 또는 안티센스 분자 발현에 관계하는 설바이빈 또는 안티센스-설바이빈 발현 단위를 포함하도록 한다. 이와 같은 용도에서, 사람이 아닌 포유류 가령, 쥐 또는 들쥐에서 활성화 또는 비활성화에 의해 *Survivin* 유전자 발현을 변경시킨다. 표적화된 재조합 등과 같은 공자의 다양한 과정을 이용하여 만들 수 있다. 일단 만들 어지면, 설바이빈 결손 동물, 조직 특이적으로 설바이빈을 발현시키는 동물 또는 안티센스 분자를 발현시키는 동물을 통하여 1) 설바이빈에 의해 중개되는 생물학적 병리학적 과정을 확인하고; 2) 설바이빈과 상호 작용하는 단백질 및 다른 유전자를 확인하고; 3) 설바이빈 결손을 극복하도록 외부에서 공급되는 물질을 확인하고; 4) *Survivin* 유전자의 활성 증가 또는 감소시키는 *Survivin* 유전자내에 돌연변이를 확인하기 위해 적절한 스크린으로 작용한다.

예를 들면, 조직-특이적인 방식으로 사람 설바이빈의 미니 유전자를 발현시키는 유전자 전이된 쥐를 만들 수 있고, 정상적으로는 설바이빈을 포함하지 않는 단백질의 과발현 효과를 테스트할 수 있다. 이와 같은 전략은 아폽토시스 저해물질 즉 bcl-2의 또 다른 족에 성공적으로 이용되었다(Veis et al., Cell (1993)75:229). 이와 같은 방법을 설바이빈 단백질에 적용시키거나 아폽토시스로부터 세포를 보호하기 위해 특정 조직 부위에 설바이빈의 유익한 효과에 대한 문제를 제기할 수 있다.

## R. 설바이빈 유전자 치료법

또 다른 구체예에서, 유전자 치료법은 설바이빈이 중개하는 생물학적 또는 병인학적 과정을 조절하는 수단으로 이용한다. 예를 들면, 종양 치료법에서, 안티센스를 인코드하는 핵산 분자와 같은 설바이빈 발현의 조절물질을 인코드하는 유전자 발현 단위를 치료할 개체내로 도입시키는 것이 바람직하다. 이와 같은 조절물질은 세포 또는 특이적인 표적 세포내에서 구조적으로 생산되는 것이거나 유도될 수 있는 것이다. 이로 인하여 개체에 설바이빈 발현 조절물질을 지속적으로 또는 일시적인 유도 공급을 하게 된다. 설바이빈 발현을 차단하면 종양세포 생장을 조절할 수 있다. 유사하게, 이식을 위해 동종이식편제장  $\beta$ 세포에서 설바이빈이 발현될 수 있도록 세포를 유전공학적으로 조작할 수 있다.

설바이빈 유전자 발현 수준은 아폽토시스에 저항하는 수준과 연관된다. 따라서, 설바이빈 유전자는 항-아폽토시스 유전자 치료에 이용된다. 특히, 기능을 가지는 설바이빈 유전자를 이용하여, 신경퇴행성 질환, 임파세포(가령, T 세포 및 B 세포) 또는 혀열에 의해 손상되는 세포에서 아폽토시스를 하는 신경 세포를 유지시킨다.

치료요법적 설바이빈 유전자 구조에서 유전자를 전달하는 시스템으로는 아폽토시스에 관여하는 것으로 보이는 세포(가령 상피세포)에 대해 적절한 굴성을 가지는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연합 바이러스 벡터 또는 다른 바이러스 벡터를 이용한다. 이와 같은 목적에 맞는 여러 가지 벡터가 공지되어 있다(Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis and Anderson, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev and Anderson, current opinion in biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechniques 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993; and Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995). 레트로바이러스 벡터는 특히 잘 개발되어 임상적인 세팅에 이용된다(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson et al., U.S. Patent No. 5,399,346).

비-바이러스성 방식을 이용하여 아폽토시스를 하게 되는 세포로 치료요법적 DNA를 도입시킬 수 있다. 예를 들면, 설바이빈은 리포펙션(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987; Ono et al., Neurosci. Lett. 117:259, 1990; Brigham et al., Meth. Enz. 101:512, 1983); 아시알로소뉴코이드[asialorosonucoid]-폴리리신 접합(Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985, 1989); 또는 다소 부적절한 경우이지만, 외과적인 상태 하에서 마이크로인젝션(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)으로 신경 또는 T 세포에 도입될 수 있다.

상기에서 설명하는 임의 방법의 경우에, 치료요법적 설바이빈 핵산 구조는 예상되는 아폽토시스 부위에 바로 투여할 수 있다(주사에 의해). 그러나, 예측되는 아폽토시스 부위에 인접한 조직 또는 혈액으로 주사하여 아폽토시스를 할 것으로 보이는 세포에 제공할 수 있다.

설명한 구조에서, 설바이빈 cDNA 발현은 임의 적절한 프로모터가 관여하는데 예를 들면, 사람 사이토메갈로바이러스 (CMV), 원숭이 바이러스 40(SV40) 또는 메탈로티오닌 프로모터 등이 있고, 이는 적절한 포유류 조절 원소에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 원하는 경우에 신경 세포, T 세포, B 세포에서 직접 발현시키는 것으로 알려진 인핸서를 이용하여 설바이빈을 발현시킬 수 있다. 이용되는 인핸서에는 조직 또는 세포 특이적인 발현을 하는 것을 포함하나 이에 국한시키지 않는다. 또는, 설바이빈 계놈 클론을 치료 구조물로 이용하는 경우에(가령, 상기에서 설명하는 설바이빈 cDNA와 하이브리드에 의해 분리한 후) 같은 종류의 조절 서열에 의해 조절될 수 있거나 원하는 경우에 상기에서 설명하는 프로모터 또는 조절 원소를 포함하는 이형 소스에서 유도된 조절 서열에 의해 조절될 수 있다.

## S. 유전자 발현에 관계하는 설바이빈 프로모터의 용도

본 발명은 발현 벡터를 만드는데 이용될 수 있는 형태의 *Survivin* 유전자 프로모터를 제공한다. 특히, 설바이빈에 ATG 코돈으로부터 5'에 있는 것으로 확인된 *Survivin* 프로모터를 이용하여 단백질을 인코드하는 DNA 서열 발현에 관계한다. 설바이빈 프로모터는 TATA 박스를 가지고 있지 않기 때문에, 당업자는 뉴클레오티드 2560-2920(엑손 1을 포함) 5' 단편

을 이용해야 한다. *Survivin* 프로모터는 태아 조직에서 발현되어, 이를 이용하면 특정 발생 단계동안에 특정 세포 형에서 단백질을 발현시킬 수 있다. 아래에서 논의되는 바와 같이, c-myc 온코젠을 3T3 세포에 전이 감염시키면 설바이빈 mRNA가 상향 조절되는데 이는 노던 블랏으로 확인할 수 있다. 따라서, *Survivin* 프로모터 제어 하에 항-종양 폴리펩티드를 인코드하는 DNA를 이용하면 이들이 발현될 종양세포에 전이감염된다. 당업자는 공지의 방법을 이용하여 발현 벡터에서 설바이빈 프로모터를 이용할 수 있다.

#### T. 항-아폽토시스성 예방 요법

*Survivin* 돌연변이에 대해 이형접합성으로 진단을 받은 환자 또는 *Survivin* 돌연변이에 걸릴 가능성이 있는 환자(이와 같은 돌연변이로 인하여 설바이빈의 생물학적 활성이 변형 또는 상실되지는 않는다) 또는 퇴행성 질환(가령 SMA, ALS 질병과 같은 운동 신경 퇴행성 질병)으로 진단을 받은 환자 또는 HIV 양성으로 진단 받은 환자에게서는 상기 치료법중 한 가지를 질병 표현형이 나타나기 전에 투여할 수 있다. 예를 들면, HIV에 양성 반응을 나타내나 아직 T 세포 수가 감소되지는 않았거나 분명한 AIDS 증상이 나타나지 않는 환자에게 이와 같은 치료법을 제공할 수 있다. 특히, 설바이빈 발현 또는 설바이빈의 생물학적 활성을 증가시키는 화합물 표준 약량을 임의 투여경로를 통하여 투여할 수 있다. 또는 설바이빈 발현 구조물을 이용하는 유전자 요법을 사용하여 퇴행성 질환이 발생되기 전에 세포가 죽는 것을 방지할 수 있다.

본 발명의 방법을 이용하여 임의 포유류 가령 사람, 애완동물 또는 가축에서 상기에서 설명한 질병 발생을 줄이거나 진단 할 수 있다. 사람이 아닌 포유류를 진단하는 경우에는 이용되는 설바이빈 폴리펩티드, 핵산 또는 항체는 치료 종에 특이적인 것이 적절하다.

#### U. 추가 아폽토시스 평가 실시예

상기 설명에 추가하여, 아폽토시스 평가 특징에는 다음의 문헌에서 볼 수 있다. 임파세포에서 아폽토시스에 대한 평가는 Li et al., "Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein", Science 268:429-431, 1995; Gibellini et al., "Tat-expressing Jurkat cells show and increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection", Br. J. Haematol. 89:24-33, 1995; Martin et al., "HIV-1 infection of human CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*. Differential induction of apoptosis in these cells." J. Immunol. 152:330-42, 1994; Terai et al., "Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1", J. Clin Invest. 87:1710-5, 1991; Dhein et al., "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)11, Nature 373:438-441, 1995; Katsikis et al., "Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals", J. Exp. Med. 181:2029-2036, 1995; Westendorp et al., Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120", Nature 375:497, 1995; DeRossi et al., Virology 198:234-44, 1994을 참고로 한다.

섬유아세포에서 아폽토시스에 대한 평가는 Vossbeck et al., "Direct transforming activity of TGF-beta on rat fibroblasts", Int. J. Cancer 61:92-97, 1995; Goruppi et al., "Dissection of c-myc domains involved in S phase induction of HIH3T3 fibroblasts", Oncogene 9:1537-44, 1994; Fernandez et al., "Differential sensitivity of normal and Ha-ras transformed C3H mouse embryo fibroblasts tumor necrosis factor; induction of bcl-2, c-myc, and manganese superoxide dismutase in resistant cells", Oncogene 9:2009-17, 1994; Harrington et al., "c Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines", EMBO J., 13:3286-3295, 1994; Itoh et al., "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen", J. Biol. Chem. 268:10932-7, 1993를 참고로 한다.

신경 세포에서 아폽토시스에 대한 평가는 Melino et al., "Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells", Mol. Cell Biol. 14:6584-6596, 1994; Rosenblbaum et al., "Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons", Ann. Neurol. 36:864-870, 1994; Sato et al., "Neuronal differentiation of PC12 cells as a result of prevention of cell death by bcl02", J. Neurobiol. 25:1227-1234, 1994; Ferrari et al., "N-acetylcysteine D- and L-stereoisomers prevents apoptotic death of neuronal cells", J. Neurosci. 15:2857-2866, 1995; Talley et al., "Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crma", Mol. Cell Biol. 15:2359-2366, 1995; Talley et al., "Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis in

Human Neuronal Cells: Protection by the Antioxidant N-Acetylcysteine and the Genes bcl-2 and crma", Mol. Cell. Biol. 15:2359–2366, 1995; Walkinshaw et al., "Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease," J. Clin. Invest. 95:2458–2464, 1995를 참고로 한다.

곤충 세포에서 아폽토시스에 대한 평가는 Clem et al., "Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection on insect cells", Science 254:1388–90, 1991; Crook et al., "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif", J. Virol. 67:2168–74, 1993; Rabizadeh et al., "Expression of the baculovirus p35 gene inhibits mammalian neural cell death", J. Neurochem. 61:2318–21, 1993; Birnbaum et al., "An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs", J. Virol. 68:2521–8, 1994; Clem et al., Mol. Cell. Biol. 14:5212–5222, 1994를 참고로 한다.

## V. 조직 및 기관 이식에서 설바이빈의 용도

본 발명에는 개체에서 조직 또는 기관 이식 거부를 예방하는 또는 방지하는 방법을 포함하는데, 이 방법은 설바이빈 폴리펩티드, 설바이빈 폴리펩티드 단편, 아폽토시스를 저해하는 설바이빈 웨프티드유사물질, 설바이빈 폴리펩티드 단편을 인코드하는 전이유전자 또는 설바이빈 폴리펩티드를 인코드하는 전이유전자를 이식부위, 조직 또는 기관에 국소적으로 투여하는 것이다. 조직, 기관 또는 이식근접 부위에 폴리펩티드, 이의 유사물질을 국소 투여하는 방법은 통상적인 이용할 수 있는 방법을 사용하는데 예를 들면, 국소 주입, 주사, 마아크로스폰지, 마이크로캡슐, 리포좀 또는 시간에 따른 운반 담체등을 이용한다.

조직, 기관 또는 이식 근접 부위에 설바이빈 폴리펩티드를 인코드하는 전이유전자 또는 설바이빈 폴리펩티드 단편을 인코드하는 전이유전자를 국소적으로 전달하는 방법은 벡터로 리포펙틴 또는 직접 플라스미드 DNA 주입을 통하여 실시할 수 있다(Qin et al. (1995) Transplantation 59(6):809–816; Le Coultr et al. (1997) Eur. J. Pediatr. Surg. 7(4):221–226; Wang et al. (1992) Transplantation 53(3):703–705; Wang et al. (1996) Transplantation 61(12):1726–1729; Schmid et al., (1997) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 11(6):1023–28; Boasquevisque, C. et al. (1997) Ann. Thorac. Surg. 63(6):1556–1561). 전이유전자를 인코드하는 벡터에는 아폽토시스에 관련된 세포 또는 아폽토시스 부위에 근접해 있는 세포에 적합한 주성을 가지는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 다른 벡터와 같은 복제가능한 그리고 복제하는 결손 벡터를 모두 포함한다. 유전자전이 구조에서, 임의 적절한 프로모터에 의해 발현이 이루어지는데, 이와 같은 프로모터에는 사람 인슐린 프로모터와 같은 특정 세포형에서 유전자 발현에 관계하는 조직 특이적인 프로모터를 포함한다. 조직, 기관 또는 이식체 주위로 전이유전자를 국소적으로 전달하는 것은 국소 주입, 주사, 마이크로스폰지, 마이크로캡슐, 리포좀 또는 시간에 따른 운반 담체를 포함하나 이에 국한시키지는 않는다.

추가 설명이 없더라도, 당업자는 다음의 실시예 및 전술한 설명을 이용하면, 본 발명의 화합물을 만들고 이를 이용할 수 있을 것이다. 따라서, 다음의 작업 실시예는 본 발명의 적절한 구체예를 설명하나 이에 국한시키고자 함은 아니다. 다른 일반적인 특징도 당업자가 잘 인지할 것이다. 모든 문헌, 특히공보 및 출원은 전문을 참고로 첨부한다.

### 실시예

#### 실시예 1. 실험 과정 및 클로닝

##### 세포 및 세포 배양

적혈구백혈병 HEL, B-임파종 Daudi & JY, 단구성 THP-1, T 백혈병 Jurkat, 상피 암종 HeLa, 전골수세포 HL-60, 비-형질변환성 사람 폐 섬유아세포 Lu18 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD)에서 구한 것이다. T 백혈병 세포주 MOLT13는 이미 특징이 조사된 바 있다(Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860–865). 세포주는 10% 열에 의해 비활성화시킨 태아 소 혈청(FBS, Whittaker), 2mM L-글루타민, 10mM HEPES를 보충한 완전 배지 RPMI 1640 또는 DMEM(HeLa, Lu18)(Bio Whittaker, Walkersville, MD)에서 배양하여 유지시킨다. 콜라게네이즈로 처리하여 사람 배꼽 내피 세포(HUVEC)를 분리하고, 20% FBS, 2mM L-글루타민, 내피 세포 생장 인자(Biomedical Technologies, Stoughton, MA)가 보충된 DMEM 배지에서 배양하여 유지시킨다.

정상인 지원자의 혈액을 혜파린처리하여, 혜파린처리된 혈액으로부터 Ficoll-Hypaque(Pharmacia, Piscataway, NJ) 400g, 22°C에서 차등 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하고, 인산완충염(PBS), pH7.4로 세척한다. 일부 실험에서, 0.1μM 1,25-디하이드록시-비타민D<sub>3</sub> 및 17.8μg/ml 인도메타신(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 존재

하에 HL-6- 세포를 72시간동안 배양하면 성숙한 단핵구 표현형으로 분화된다. CD11b/CD18 인테그린(Hickstein, D.D. et al., J Immunol (1987) 138:513-519)을 포함하는 비타민 D<sub>3</sub>-처리된 HL-60 세포에서 분화에 따른 표식이 처음부터 분화가 유도되었는지는 항-CD11b mAb LM2/1를 이용한 유동 세포계를 이용하여 평가한다.

### 계놈 및 cDNA 클로닝, 염색체 국소화 및 서든 블랏

완전한 사람 EPR-1 cDNA(Altieri, D.C., FASEB J(1995) 9:860-865)을 포함하는 1.6kb 단편으로 하이브리드시켜 사람 P1 계놈 라이브러리(Genome Systems, St. Louis, MO)를 스크리닝하였다. 세 개의 겹쳐지는 클론이 분리되었는데, 이를 정제하고, EPR-1 cDNA와 서든 하이브리드로 확인하였다. *Bam*Hi, *Hind*II, *Xba*I (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 제한 효소로 처리하여 발생된 하이브리드 단편은 추가 분석을 위해 pBluescript(pBSKS<sup>-</sup>, Stratagene, San Diego, CA)에 클론시킨다. 두 개의 EPR-1-하이브리드 P1 클론으로부터 겹쳐지는 contig 연장 14796bp를 배열하고, 이는 제한 효소분석으로 조사하여, Applied BioSystem Prism 377 자동화된 서열화기(Foster City, CA)를 이용하여 Taq FS 폴리 메라제-기초된 자동서열 조사에 의해 양쪽 가닥의 서열을 완전하게 조사하였다. 일부 실험에서, 구아니디움 이소티오시아네이트 방법을 이용하여 HeLa 세포로부터 추출한 10mg total RNA를 EPR-1 전방 "센스" 올리고뉴클레오티드 C3/27(bp 80-102)로 프라임시키고, 200U Superscript II(Life Science, Grand Island, NY) 존재 하에 50분간 42°C에서 역전사시킨다.

0.5mg EPR-1 유도된 프라이머 T5/27(bp 161-184), G11/16(1124-1098, EPR-1 코딩 서열에서부터 번호를 붙임), 200mM dNTPs(New England Biolabs, Beverly, MA), 2U Vent DNA 중합효소(New England Biolabs) 총 50ml 용적 존재 하에 PCR을 이용하여 생성된 cDNA를 증폭시킨다. 58°C에서 1분간 어닐링, 94°C에서 1분간 변성, 72°C에서 1분간 연장시키는 35회 과정 증폭시킨 후에, 생성물은 아가로즈 겔 전기영동에 의해 분석하고, pCRII(Invitrogen Corp., San Diego, CA)에 서브클론시켜, 양 가닥을 완전하게 서열화한다. Lasergene(DNASTAR, Madison, WI) 및 MacVector (Eastman Kodak, Rochester, NY) 소프트웨어를 이용하여, Contig 어셈블리, DNA 및 단백질 서열 분석을 한다. *in situ* 하이브리드 반응에 의해 EPR-1 하이브리드 유전자의 염색체상에 위치를 실행한다. EPR-1-하이브리드 P1 클론으로부터 정제된 DNA는 닉[nick] 해독에 의해 디곡시제닌[digoxigene] dUTP(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)으로 라벨링한다.

라벨된 프로브는 전단된 사람 DNA와 복합시키고, 50% 포름아미드, 10% 텍스트란 설페이트, 2X SSC를 포함하는 용액에서 파이토헤마글루터닌-자극된 PBMC에서 유도된 정상 중기 염색체에 하이브리드시킨다. 이중 색으로 착색을 하기 위해, 염색체 17의 동원체에 특이적인 바이오텐-공액된 프로브 D17Z1와 디곡시제닌-라벨된 P1 클론과 동시에 하이브리드시킨다. 하이브리드된 슬라이드를 형광처리된 항-디곡시제닌 항체 및 Texas red avidin에 배양하여 특정 착색을 감지할 수 있다. 단색 라벨링을 위해서는 슬라이드를 프로피디니움 요오드에 반대 착색시키거나 또는 이중 착색을 위해서는 DAPI에 반대착색시킨다. 총 80개 중기세포를 분석하였는데, 69개 세포가 특정 라벨을 나타내었다. 서든 하이브리드의 경우에, 사람 계놈 DNA는 프로토콜에 따라 HeLa 세포에서 추출하고, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*II로 절단하고, 0.8% 아가로즈 겔에서 분리하여 GeneScreen 나일론 막(New England Nuclear, Boston, MA)에 옮긴다.

UV 교차 연결 후에(Stratalinker, Stratagene, San Diego, CA), 100mg/ml 변성된 연어 정자 DNA(Promega Corp. Madison, WI) 5X SSC, 0.5% SDS, 5X Denhardt's 용액 및 0.1% 피로포스페이트 나트륨에서 막을 65°C 롤러 하이브리드 반응 오븐(Hoefer Scientific, San Francisco, CA)에서 선하이브리드시킨다. 겔 정제한(GeneClean Bio101, Vista, CA) <sup>32</sup>P-dCTP(Amersham) 부작위 프라임 라벨된(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) 1.6kb EPR-1 cDNA를 16시간동안 65°C에서 하이브리드 반응시킨다.

2X SSC, 1% SDS에서 65°C 30분간, 0.2X SSC, 22°C 2회 세척한 후에, 방사능활성 밴드는 Kodak X-Omat AR X-ray 필름과 보력 스크린(DuPont de Nemours, Wilmington, DE)을 이용하여 방사능사진으로 볼 수 있다. 다른 실험에서는, 배양된 임파아구 세포를 2x10<sup>6</sup>/220μl 블록 농도로 LMP 아가로즈(Bio Rad, Richmond, CA)에 넣고, 표준 과정에 따라 DNA를 추출한다. *Mlu*I 또는 *Nod*I를 이용하여 블록 절단한후에, 1% 아가로즈 겔상에서 20시간동안 200V로 펠스 겔 전기영동을 실시하여 샘플을 분리하는데, 펠스는 Bio-Rad CHEF DRII 장비(Hercules, CA)를 이용하여 75초간 펠스한다. 나일론 막에 옮긴 후에, UV 교차 연결, EPR-1 cDNA과의 하이브리드 반응 및 세척을 상기에서 설명한 것과 같이 실행한다.

또 다른 일련의 실험에서, 몇 가지 종에서 분리된 계놈 DNA를 포함하는 블랏(Clontech, San Francisco, CA)은 상기에서 설명한 것과 같이 EPR-1 cDNA 3' 548bp와 하이브리드시킨다.

## 노던 블랏

301bp의 EPR-1 cDNA를 비대칭 PCR 증폭시켜 센스 또는 안티센스 EPR-1 서열에 특이적인 단일 가닥 프로브를 만든다. EPR-1 cDNA를 *Eco*RI(cloning site) 및 *Sac*II로 제한 효소 절단하여, EPR-1 코딩 서열 처음 5,226bp에 보유하고 있는 조절 인트론 75bp(Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)로 구성된 주형을 만들고, 이를 젤-정제하고, 20mM Tris HCl, 50mM KCl, pH 8.4, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5U Taq DNA 중합효소(Life Science) 존재 하에, 총 10ml의 15pmol dNTP (New England Biolabs), 7.5pmol dCTP, 25mCi <sup>32</sup>P-dCTP(Amersham)과 혼합시킨다.

0.2mg/ml "SacII" 역 올리고뉴클레오티드 5TGCTGGCCGCTCCTCCCTC3'(서열 1)를 추가하여 EPR-1 특이적인 안티센스 프로브를 만들고, 0.2mg/ml 전방 F11 올리고뉴클레오티드 5'ATGACCTCCAGAGGTTTC3'(서열 2)를 이용하여 EPR-1 양성 가닥의 연장 및 설바이빈-특이적인 프로브를 만든다. 94°C에서 1분간 변성, 52°C에서 1분간 어닐링, 72°C에서 1분간 연장하여 25회 증폭과정을 실행한다. EPR-1 센스 또는 안티센스 프로브는 Sephadex G-50 spin column (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ)을 이용하여 14,000g에서 5분간 원심분리시켜, 결합된 방사능활성에서 결합안된 활성을 분리하고, 100°C에서 2분간 가열시키고, 바로 하이브리드 반응에 첨가한다.

동일한 가닥에 특이적인 프로브를 이용하여 성인 또는 태아 사람 mRNA (Clontech) 다중 조직 블랏을 하이브리드하는데, 조건은 5X SSPE, 10X Denhardt's 용액, 2% SDS, 100mg/ml 변성 엔자 정자 DNA에서 60°C 14시간동안, 세척은 60°C에서 실시한다. 분화안된 또는 비타민 D<sub>3</sub> 중국에는 HL-60 세포로 분화되는 것에서 추출한 총 RNA는 상기에서 설명한 것과 같이 설바이빈-특이적인 단일 가닥 프로브와 노던 하이브리드시킨다.

## 실시예 2; 항-설바이빈 항체 생산

JC700라고 불리는 설바이빈 서열 특이적인 항체는 다음과 같이 만들고 서열화시킨다. 설바이빈 서열 A<sup>3</sup>PTLPPAWQPFLKDHR<sup>19</sup>에 상응하는 17-mer 웨პ티드를 합성 시키고, 질량 스펙트로메터를 이용하여 특징을 조사한다. 100mg 설바이빈 웨პ티드는 1:1 비율로 Keyhole Limpet Hemocyanin에 결합시키고, 캠플리트 Freund's adjuvant를 이용하여 토끼의 피하로 주사한다. 4주 후에, 동물에 인кам플리트 Freund's 어쥬번트를 이용하여 웨პ티드 100mg을 피하로 주사하여 부스트시킨 다음 그 다음 주에 다시 부스트시키고 격주간격으로 피를 뽑는다.

웨პ티드-Sepharose 매트릭스(5mg/ml 웨პ티드)에서 특정 IgG 분취물/1mM 글리신, pH 2.5 용출시켜 친화력 크로마토그래피를 실시하여, 항-설바이빈 항체를 정제한다. JC700라고 지정된 친화력에 의해 정제된 항-설바이빈 항체의 특이성은 고정된 설바이빈 웨პ티드에 대한 ELISA 또는 기준 EPR-1 웨პ티드에 대한 ELISA를 OD<sub>405</sub>에서 흡수도를 읽어 결정한다.

## 실시예 3; 설바이빈 융합 단백질에 대한 단클론 항체 생산

대장균(*E. Coli*) BL21 균주에서 설바이빈 cDNA는 GST-융합 단백질로 발현되고, 정제하면, GST 프레임을 제거된 것과 상동성을 나타낸다. 정제된 단백질을 쥐에 주사하여 표준 하이브리도마 기술을 이용하여 단클론 항체를 만든다. 세 개의 별개 mAbs를 분리하고, 한정 희석시켜 2회 클론시키고, 추가 특징을 조사한다. 새로운 항-설바이빈 mAb, 8E2는 ELISA에 의하면 고정된 정제 재조합 설바이빈을 인지하여, 이뮤노블랏에서 설바이빈에 결합된다(도 11 참고).

## 실시예 4; 이뮤노블랏팅 및 *in situ* 하이브리드반응

이뮤노블랏팅의 경우에, 다양한 형질변형된 세포주 추출물, 형질변환된 HUVEC, PBMC, Lu18 또는 분화안된 또는 비타민 D<sub>3</sub>-분화된 HL-60 세포의 SDS-용해된 추출물 몇 방울을 OD<sub>280</sub>에서 단백질 함량에 대해 표준화하고, 변성이 안되는 조건하에서 5-20% SDS 폴리아크릴아미드 농도차 젤상에서 전기영동에 의해 분리하여, Immobilon 막(Millipore Corp., New Bedford, MA)에 22°C, 1.1 A, 30분간 이뮤노블랏시킨다. 막은 TBS, pH 7.4, + 5% 우유로 차단시키고, 22°C에서 1시간동안 Irwns이 되는 비-면역 토끼 IgG 또는 항-설바이빈 항체(JC700)로 배양하고, TBS, pH 7.4에 세척시킨 후에, 30분간 22°C에서 알칼리 포스포타제-공액된 염소 항-토끼IgG (Promega) 1:7500 희석물을 첨가한다. 75mg/ml 니트로 블루 테트라졸리움 70% 디메틸포름아미드(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 용액과 50mg/ml 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 포스페이트(Sigma) 100% 디메틸로름아미드 용액을 첨가하면 1차 항체 결합이 나타난다.

## 조직 샘플, 면역조직화학 및 *in situ* 하이브리드반응

결장 선종(6 개), 폐 비늘 세포 암종(6개), 폐 선종(9개), 췌장 선종(2개), 침입성 유방 선종(7개)의 조직 샘플은 Yale-New Haven Hospital의 보관소에서 얻어 본 연구에 사용하였다. 44개 고등급 임파종 조직 및 7개 저등급 임파종 조직 샘플을 얻었다. 조직 샘플은 포르말린에 고정시키고, 파라핀에 묻어 5 $\mu$ m 크기로 절단한다음 실렌에서 파라핀을 제거하고, 규격 알코올을 이용하여 재수화시키고, 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 메탄올로 처리하여 내생 과산화효소 활성을 제거한다.

면역착색을 위해서는, 표준 압력 조리기에서 슬라이드를 5분간 가열시키고, 10% 정상 염소 혈청으로 차단하고, 친화력에 의해 정제한 항-설바이빈 항체 JC700 (20 $\mu$ g/ml)로 14시간동안 4°C에서 배양한다. PBS pH 7.4에서 세척한 후에, 슬라이드는 추가로 바이오틴-공액된 염소 항-토끼 IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 30분간 22°C에서 배양한다. 스트렙토아비딘-바이오틴 공액된 과산화효소(Boehringer Mannheim)를 30분간 22°C에서 추가한 후에, 슬라이드는 세척하고, 3'-3'-디아미노-벤지딘(DAB)을 첨가하고, 헤마토실린으로 반대착색을 시키면 1차 mAbs 결합이 나타난다.

동일한 실험 조건하에서 정상 염소 혈청을 1차 항체대신에 사용한 것을 음성 기준으로 한다. 일부 실험에서, JC700 항체는 조직 착색시키기전에 25mg/ml 설바이빈 3-19 웨티드로 흡착시킨다. *in situ* 하이브리드반응을 위해, pcDNA3 (Invitrogen)에 있는 설바이빈 cDNA를 포함하는 전체 코딩 서열에 3'해독안되는 271bp부분 1 $\mu$ g을 EcoRI으로 완전하게 절단하고, 디곡시제닌 11-우리딘-5'트리포스페이트(Boehringer Mannheim) 존재 하에, T7 RNA 중합효소를 이용하여 안티센스 방향으로 전사한다. 조직 슬라이드는 1% 젤라틴, 1% 크롬-알룸으로 피복하고, 2시간동안 120°C로 굽고, 22°C에서 청정상태(먼지 없는)에서 저장한다. 파라핀을 제거하고, 규격 알코올을 이용하여 재수화시키고, 프로테네이즈 K (100mM Tris HCl pH 8.7, 50mM EDTA 용액상에 1 $\mu$ g/ml)로 37°C에서 30분간 처리하고, 0.25% 무수아세트산 및 100mM 트리에탄올아민 pH8.0으로 22°C에서 10분간 아세틸화시킨다.

4X SSC, 1X Denhardt's 용액, 50% 탈이온화된 포름아미드, 250 $\mu$ g/ml 이스트 tRNA, 500 $\mu$ g/ml 연어 정자 DNA, 5% 텍스트란을 포함하는 완충액에 설바이빈 안티센스리보프로브를 16시간동안 50°C에서 *in situ* 하이브리드시키면 사람 조직에서 설바이빈 mRNA를 감지할 수 있다. 48°C에서 90분간 2X SSC로 세척한 후에, 1:3000으로 희석된 항-디곡시제닌 mAb (Boehringer Mannheim)를 이용하여 고정된 디곡시젠을 감지하고, NBT/BCIP 세포화학 착색과 함께 알칼리 포스포타제 착색으로 나타낸다.

### 실시예 5; 사람 암에서 설바이빈 발현

설바이빈은 주로 사람의 암에서 발현된다. 형질변환된 세포형에서 풍부하게 분포되어 있기 때문에, 신형성조직에서 설바이빈의 *in vivo* 발현 능력을 조사하였다. 친화력에 의해 정제된 항-설바이빈 JC700 항체와 포르말린-고정된 파라핀에 묻은 조직 단편을 면역조직화학적으로 분석하면, 선종(도 6A) 및 속발성 세포 선종(도 6C)를 포함하는 검사한 모든 종류의 인체 암에서 설바이빈이 상당히 발현되었음을 알 수 있다. 다른 IAP 단백질의 지세와 일치하게(Duckett, C.S. et al., EMBO J(1996) 15:2685-2694), 단백질은 종양 세포의 세포질에 상당히 배타적으로 발현되고, 인접한 정상인 폐 상피선에는 설바이빈이 발현되지 않았다(도 6C, 화살표). 항-설바이빈 항체를 기준 염소 혈청으로 대체하거나(나타내지 않음) 또는 면역화된 설바이빈 3-19 웨티드로 선흡착시킨 경우에는 착색이 나타나지 않는데(도 6B), 이는 관찰된 인지에 대해 특이성을 확인할 수 있다.

설바이빈-특이적인 단일 가닥 리보프로브로 *in situ* 하이브리드하면, 속발성 폐 세포 암종에서 설바이빈 mRNA가 주로 축적되는 것을 설명할 수 있다(도 6D). 설바이빈은 또한, 검사한 모든 조직 췌장 선종(도 6E), 유방(나타내지 않음)에서 많이 발견되고(면역조직화학으로 감지) 결장(도 6G)에서도 많이 발견된다는 것(*in situ* 하이브리드반응)을 알 수 있다. 그러나, 형질변환된 세포 형 HUVEC 및 Lu18(도 4C), 성숙한 조직(도 3), 최종적으로-분화된 HL-60(도 5)에서는 이들이 발견되지 않는 것은 면역조직화학에 의해 정상적인 엑소크린 췌장 상피 세포로도 관찰되고(도 6F), *in situ* 하이브리드반응에 의하면 인접하는 비-신조직형성 결장 선 상피에서는 설바이빈 mRNA가 발견되지 않는다(도 6H).

### 임파종 조직에서 설바이빈 발현

공격적인 높은 등급의 임파종 환자 44명, 비-공격적인 낮은 등급의 임파종 환자 7명으로부터 조직 샘플을 얻는다. 상기에서 설명한 것과 같이 샘플을 처리하고, 설바이빈 발현에 대해 검사한다. 낮은 등급의 임파종 샘플에서는 설바이빈이 발현된 것이 없는 반면에 높은 등급의 임파종 환자에서 얻은 샘플에서는 27개(61%) 설바이빈이 발현되었다.

### 실시예 6; 다른 암에서 설바이빈 발현

상기에서 설명한 악성 종양에 추가하여, 다른 형태의 암에서 설바이빈이 발현되는지에 대해 발명자 실험실 또는 다른 연구자와 공동으로 연구하였다. 설바이빈은 주로 대부분 공격성 전이형 악성 흉선종(100가지 경우 테스트함), 머리와 목의 속발성 세포 암종(140 경우), 모든 종류의 전립선 암(15가지 경우; 양성 전립선 과형성의 일시적 병소를 포함)에 주로 설바이빈이 발현되었다. 가장 공격적인 신경아세포종은 하기에서 논의되는 바와 같이 설바이빈에 대해 양성이다.

### 실시예 7: 설바이빈의 조직 특이적인 발현

설바이빈은 대부분의 혼한 사람의 암에서는 발견되나 정상적으로 분화된 성인 조직에서는 발견되지 않았다. 배아 및 태아 발생시에 설바이빈 발현에 대해 연구되었다. 면역조직화학 및 *in situ* 하이브리드반응 연구에 따르면, 간세포의 적층 상피, 엔도크린 췌장, 흉성 골수 등을 포함하는 아폽토시스 조절된 태아 조직 몇몇에서 설바이빈이 강하게 발현되는데 이는 또다른 아폽토시스 저해물질인 *bcl-2*의 패턴과는 겹쳐지지 않는다. 설바이빈에서 특이적인 항체는 사람 태아 폐, 간, 심장, 신장, 위장관에 있는 단일 ~16.5 kD 밴드에 면역블랏팅된다. 쥐 배아에서, 배발생(E) 11.5일에 대부분의 거의 산재된 설바이빈 분포가 발견되지만, 이에 반해 E15~21시기에는 설바이빈은 폐의 말단 기관지 상피, 신경릉에서 유도된 세포(배근 강글리온 뉴우런 포함), 뇌하수체, 융모막 총에 제한적으로 발현된다. 이와 같은 데이터를 기초하면, 배발생 및 태아 발생하는 동안에 설바이빈이 발현됨으로써 조직 조혈 및 독립적으로 *bcl-2* 분화에 기여한다는 것을 알 수 있다.

### 실시예 8: 설바이빈 트랜스펙턴트(transflectants) 준비

#### 유도성 설바이빈 안티센스 트랜스펙턴트 및 아폽토시스/증식 실험

EPR-1 cDNA 뉴클레오티드 379~1087를 포함하는 708 bp *SmaI-EcoRI* 단편을 포유류 발현 벡터인 pML1(Dr. R. Pytela, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco으로부터 제공받음)에 센스 방향으로 바로 클론시킨다. 벡터는 에피좀성 포유류 세포 발현 벡터 pCEP4로부터 사이토메갈로바이러스 프로모터 카제트를 mMT1 프로모터로 대체하여 만든 것으로 포유류 세포에서 재조합 단백질이 Zn<sup>2+</sup>에 따라 발현되도록 유도한 것이다 (Lukashev, M.E. et al., J Biol Chem (1994) 269:18311~18314).

100만개 HeLa 세포는 설바이빈 안티센스 구조를 포함하는 10mg pML1 DNA와 50mg 연어 정자 DNA로 얼음에서 15분간 배양시키고, Gene Pulser 장치(Bio-Rad)를 이용하여, 350V 960μF에서 단일 전자 펄스시킨다. 트랜스펙션 후 48시간 경에, 세포는 14배 회석시켜, 100mm 직경 조직 배양 접시에 도말시키고, 4주간 0.4mg/ml 하이그로마이신을 포함하는 완전 생장 배지에서 선별한다. 기준 배양에서의 아폽토시스 또는 설바이빈 안티센스 HeLa 세포 트랜스펙턴트는 혈청이 없는 조건하에 Zn<sup>2+</sup>에 따른 EPR-1 전사 유도 후에 뉴클레오좀간에 DNA 분해를 *in situ*에서 감지하여 평가한다.

간략하면, 기준 또는 안티센스 설바이빈 트랜스펙턴트는 37°C에서 24시간동안 200mM ZnSO<sub>4</sub>/0% FBS로 처리한다. 세포를 수득하고, 10분간 4°C에서 800g에서 원심분리하고, 펠렛은 10% 포르말린에서 하룻밤동안 고정시키고, 탈수하여, 파라핀 블록에 고정시키고, 3~5mm 부분은 높은 흡착성 슬라이드에 놓는다. 샘플은 15분간 22°C에서 20mg/ml 프로테나제 K로 처리하고, 중류수로 세척하고, 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS에서 내생 과산화효소를 제거하고, 말단 데옥시뉴클레오티딜 전이효소(TdT) 존재 하에 디옥시체닌-라벨된 dUTP와 혼합하고, 과산화효소 공액된 항-디옥시체닌 항체와 연속하여 혼합한다.

제조업자의 지시에 따라(AptoTag, Oncor, Gaithersburg, MD), DAB에 의해 아폽토시스 세포에서 핵 착색을 감지한다. 기준은 효소 배양 단계를 생략하고 실행하는 것이다. 테스트한 다양한 조건하에 아폽토시스성 세포(아폽토시스성 몸체)의 형태학적 특징은 동일한 슬라이드에서 혼마토실린/에오신 착색으로 감지한다.

증식 실험에서, 기준 벡터 HeLa 세포 또는 설바이빈 안티센스 트랜스펙턴트는 20 × 10<sup>4</sup>/웰의 농도로 24-웰 조직 배양 플레이트(Costar)에 도말하고, 16시간동안 37°C에서 200mM ZnSO<sub>4</sub>로 유도하고, 24시간 간격으로 회수하고, 직접 세포 수를 헤아려 테스트한 다양한 조건하에서 세포 증식을 확인한다. 이와 같은 실험조건하에 설바이빈 발현이 하향 조절되는 것은 JC700 항체로 면역블랏팅하여 평가할 수 있다.

### 실시예 9: EPR-1 상보 유전자의 확인

EPR-1 cDNA와 사람 P1 플라스미드 게놈 라이브리리의 하이브리드 스크린으로 세 개의 겹쳐지는 클론을 분리하여, 서든 블랏으로 확인한다. 이와 같은 유전자는 형광 *in situ* 하이브리드반응에 의해 염색체 17의 긴 부분 밴드 17q25에 위치한다(도 1A, B).

14796bp의 P1 단편 contig는 pBSKS<sup>-</sup>에 클론시키고, 두 가닥을 모두 완전하게 서열화시킨다(도 1C). 진핵세포의 인트론-엑손 경계에 대해 정상 서열(Padgett, R.A. et al., Ann Rev Biochem (1986) 55:1119-1150)에 완전하게 일치하는 세 군데 추정되는 접합부위를 2922, 3284, 5276(제공자) 위치 및 3173, 5157, 11954(수용자) 위치에서 확인하여, 각각 유전자 구조가 4개 엑손 및 3개 인트론 252, 1874, 6678bp(도 1D)로 정의할 수 있다.

가장 코딩 서열의 서열 분석에 따르면, 5개 뉴클레오티드 변화 및 6개 뉴클레오티드 삽입을 제외하고는 EPR-1 cDNA (Altieri, D.C., FASEB J (1995)9:860-865)와 거의 완전하게 동일하다는 것을 말한다. 그러나, EPR-1 코딩 서열의 상보적인 안티센스 가닥에는 세 개 접합 부분이 발견되었다. 예기치못한 방향과 일치하게, EPR-1 상보 유전자는 5'GC 풍부 유전자로 나타났는데, 이 구성은 2560-2920 뉴클레오티드와 엑손 1(하기 참고)을 포함하고, 이는 CpG 섬의 기초 조성을 기준으로 작용한다(Gardiner-Garde, M. et al., J Mol Biol (1987) 196:261-282 and Frommer, 1987). CpG의 2.5kb 상류 서열은 상당수 Sp1 부위를 가지는(나타내지 않음) TATA가 적은 프로모터로 밝혀졌다.

### 복합 하이브리드 패턴 및 EPR-1의 진화에 따른 보존

사람 게놈 DNA에 EPR-1 cDNA로 프로브를 시키면 몇 개의 하이브리드 단편이 나타난다(도 2A). 이들 중에, ~7.5kb *Xba*I, a 7.6kb *Bam*II, 4개 *Hind*III 단편 ~ 15kb, 7.5kb, 6.4kb, 3.7kb(도 2A) 각각은 안티센스 EPR-1 유전자 제한효소에서도 반복되지 않는다(도 1C). 대조적으로 5.15kb *Xba*I 및 7.1kb *Bam*II 단편을 포함하는 비교할 정도의 강도를 가지는 다른 밴드는 안티센스 EPR-1 유전자에서 유래된 것으로 처음 두 개 또는 세 개 엑손으로 구성된다(도 2A).

이와 같은 복합적인 하이브리드 패턴과는 일치하지 않게, *Mlu*I 또는 *Nos*I으로 절단한 분자량이 큰 사람 게놈 DNA를 서든 블랏하고, 펠스형 겔 전기영동으로 분리하면, 각각 ~ 75kb, 130kb 밴드의 EPR-1 하이브리드되는 밴드가 나타난다(도 2B). 마지막으로, 다양한 종의 게놈 DNA의 서든 블랏에서는 EPR-1-관련된 서열이 진화되면서 상당히 보존되었다는 것을 알 수 있는데(도 2C), 매우 스트린전트가 강한 하이브리드 조건하에서 포유류 종에서 여러 개의 강력한 하이브리드 가능한 밴드가 있고, 토끼 또는 병아리 게놈 DNA에서는 그 시그날이 약하게 나타난다(도 2C).

### 센스/안티센스 EPR-1 전사체의 조직 배치의 치우침

단일 가닥-특이적인 프로브로 노던 블랏을 하면 센스 또는 안티센스 EPR-1 전사체가 발현되었는지를 조사할 수 있다. 접합된 EPR-1 메세지(Altieri, D.C., FASEB J (1995) 9:860-865)의 크기와 일치하면, EPR-1 가닥 특이적인 프로브는 검사된 모든 성인 최종적으로 분화된 사람 조직에서 추출한 mRNA ~1.2kb 밴드를 감지한다(도 3A). 대조적으로, 동일한 실험조건에서 성인 조직에서 EPR-1 안티센스-특이적인 단일 가닥 프로브와 하이브리드되는 특정 밴드는 없다(도 3B). 태아 신장에서 단일 가닥 EPR-1-특이적인 프로브는 비슷한 ~1.2kb 밴드를 감지하고, 태아 간, 폐, 뇌에서도 이보다는 더 약한 정도로 감지한다(도 3A). 성인 조직에서 하이브리드가 없는 것과는 일치하지 않지만, EPR-1 안티센스-특이적인 프로브는 태아 간에서 ~1.9kb 밴드와 불완전하게 프로세스된 전사체 크기에 상응하는 더 큰 크기의 3.2kb 종을 인지하며, 태아 신장, 폐, 뇌에서도 더 약한 하이브리드 밴드를 볼 수 있다(도 3B). 악틴 프로브로 하이브리드된 기준으로 성인 또는 태아 샘플에서 mRNA의 비교할정도의 로딩/loading)을 확인할 수 있다(도 3C).

### 안티센스 EPR-1 유전자 산물의 특징

안티센스 EPR-1 유전자에 있는 5' CpG 섬을 조사하면, 2811 위치에 가상 ATG 코돈이 있는 것을 알 수 있는데, 서열로는 (CGGC **ATG** G)이고, 이는 진핵세포에서 해독 개시 표준 서열에 따른다는 것이다(Kozak, M., Nucleic Acids Res (1984) 12:857-872). 5' → 3' 방향으로 안티센스 EPR-1 서열을 분석하면, 인트론-엑손 경계 위치에서 모두 4개 엑손으로 펼쳐진 426bp 오픈 리딩 프레임이 있고, 엑손 4에의 12042 위치에 TGA 코돈으로 끝난다는 것을 알 수 있다. 13166 위치에는 표준 폴리아데닐반응 시그날(AATAAA)이 발견되었다. EPR-1 "sense" 올리고뉴클레오티드로 프라임된 역전사된 HeLa cell RNA로부터 증폭된 PCR 생성물은 게놈 서열과 완전하게 일치되고, 오픈 리딩 프레임 및 예측된 인트론-엑손 경계를 확인하였다(나타내지 않음).

EPR-1 cDNA와 HEL 라이브리리로 하이브리드하여 분리된 두 개 λgt11 cDNA 또한 표준 게놈 서열과 일치하고, 폴리아 테닐반응 시그날로부터 하류 14bp위치인 13186에서 안티센스 EPR-1 가닥에 동종폴리머 A 꼬리가 있어, 3'말단의 해독 안되는 1144bp를 만들게 된다. 이들 클론에서, 시작되는 ATG로부터 상류의 5' 해독안되는 부분은 게놈 서열의 2762위치에서 시작하여 49bp가 되는데, 여기에는 인프레임에 종료 코돈을 포함한다. 안티센스 EPR-1 오픈 리딩 프레임이 해독되면 142개 아미노산의 새로운 단백질이 되는데, 예상 분자량은 16,389이고, 산상 pH는 5.74이고, 막에 삽입되기 위해서 필요한 아미노-말단 시그날 웨티드 또는 카르복시 말단 소수성 부분은 부족하다(도 4A).

코일드 코일(coiled coil)은 마지막 40 카르복시 말단 잔기가 된다(Lupas, A. et al., Science (1991) 252:1162-1164). BLAST 데이터 베이스를 사용하여 조사하면, 안티센스 EPR-1 유전자의 잔기 18-88와 아폽토시스 저해물질에서 IAP 족에 있는 BIR 모듈 산에 상당히 유사한 것으로 나타났다(Birnbaum, M.J. et al., J Virology (1994) 68:2521-2528; Clem, R.J. et al., Mol Cell Biol (1994) 14:5212-5222). 이와 같은 유사성으로 인하여, 안티센스 EPR-1 유전자 생성물을 설바이빈으로 명명한다. 다른 IAP 단백질과는 달이, 설바이빈에는 유전자의 처음 세 개 엑손에 의해 인코드되는 한 개 BIR만을 가지고, 카르복시 말단 RING 팽거가 부족하고, 이 도메인을 인코드하는 또다른(추가) 엑손이 없다(도 1C).

도 4B에는 설바이빈 BIR과 다른 공지의 IAP 단백질간에 배열을 Clustal 방법으로 나타내었다. 표준 서열이 전반적으로 일치하고, 몇 가지 치환체가 보존되었지만, 계통학적으로 분석하면 설바이빈은 분명히 IAP 족의 관련 요소이고, RING 팽거가 부족한 NAIP에 가장 근접하다(도 4B, 짙게 나타낸 부분)(Roy, N. et al., Cell (1995) 80:167-178).

JC700으로 지정한 토끼 다클론성 항혈청은 설바이빈의 A<sup>3</sup>PTLPPAWQPFLKDHRI<sup>19</sup>[서열 3] 잔기에 대해 만들어진 것으로 웨티드-Sepharose 컬럼에서 친화력 크로마토그래피로 정제하고, 웨스턴 블랏에 이용하였다. 설바이빈의 예상 분자량과 일치하고, JC700 항체는 B 임파종 Daudi & JY, T 백혈병 Jurkat, MOLT13, 단핵구 THP-1, 적혈구백혈병 HEL(도 4C)를 포함하는 검사된 모든 형질변환된 세포주의 계면활성제에 용해된 추출물에서 ~16.5kDa 단일 밴드에 이뮤노블랏팅되었다.

분리된 말초 혈액 단핵세포(PBMC)에서도 설바이빈이 발견되었다. 대조적으로 형질변환된 Lu-18 사람 폐 섬유아세포 또는 사람 배꼽 정맥 내피 세포(HUVEC)에서는 설바이빈이 발현되지 않는 것으로 밝혀졌다(도 4C). 동일한 실험 조건하에서 기준인 비-면역 토끼 IgG에 의해서는 이뮤노블랏이 되지 않은 것을 알 수 있다(도 4C).

### EPR-1 유전자의 전사를 조절하는 물질의 확인

통상적인 기술을 이용하여 EPR-1 유전자의 전사를 증가시키는 물질을 확인할 수 있다. 적절하게는 이와 같은 가능성이 있는 물질을 EPR-1 유전자 생성물을 발현시키는 세포와 접촉시키고, 이 생성물의 발현 수준 또는 전사 수준을 조사하여, EPR-1 유전자의 전사를 증가시키는 또는 감소시키는 물질을 확인할 수 있다. 또는, EPR-1 전사 조절 원소를 CAT 또는 β-갈락토시다제와 같은 리포터 유전자의 상류에 위치시킬 수 있다.

### 실시예 10; 세포 생장/분화에 의해 설바이빈 발현의 조절

형질변환된 세포주에서 설바이빈 발현과 일치하게(도 4C), 분화안된 활성적으로 증식하는 골수세포 HL-60 세포는 설바이빈을 구조적으로 다양 발현하는데, 이는 JC700 항체가 한 개의 ~16.5kDa 밴드에 이뮤노블랏팅하고, 단일 가닥-특이적인 프로브와 1.9kb 전사체의 노던 하이브리드 반응으로 알 수 있다(도 5). 대조적으로 동일한 실험 조건하에서 기준이 되는 비-면역 토끼 IgG에 의해 인지되는 특정 밴드는 없다(도 5).

HL-60 세포가 비타민 D<sub>3</sub>-유도된 말단 분화에 의해 성숙한 단세포 표현형으로 되면 이들 세포의 생장이 멎추고, 분화특이적인 표식을 새로 유도한다 유동 세포측정계에 의해 감지되는 임파세포 CD11b/CD18 인테그린의 발현이 ~200배 증가되고, 이는 기준의 관찰과 일치한다(Hickstein, D.D. et al., J Immunol (1987) 138:513-519). 이들 실험 조건하에, 항-설바이빈 JC700 항체는 비타민 D<sub>3</sub>-처리된 HL-60 추출물에서 특정 밴드에 이뮤노블랏되지 못하였고, 단일-가닥 특이적인 프로브와 노던 하이브리드를 하여도 설바이빈 전사체가 감지되지 않았다(도 5).

대조적으로, 항-EPR-1 단클론성 항체는 동일한 실험 조건하에서 비타민 D<sub>3</sub>-분화된 HL-60 추출물에 있는 EPR-1에 상응하는 한 개의 ~62kDa 밴드에 이뮤노블랏한다(나타내지 않음). 또한, 비타민 D<sub>3</sub>-분화된 HL-60 세포에서 설바이빈이 하향 조절되면, 이들 세포에서 5- 내지 10-배정도 EPR-1의 표면 발현이 증가되었는데, 이는 항-EPR-1 단클론 항체 B6 또는 12H1와 유동 세포 측정계로 감지할 수 있다(도 8).

도 16에서 볼 수 있는 것과 같이, 사이토킨 γ인터페론 및 종양 괴사 인자 α를 복합하면 설바이빈이 하향 조절되나 이들 사이토킨을 단독으로 사용할 경우에는 하향 조절되지 않는다. 유사하게, 3T3 세포에 c-myc 온코젠을 트랜스펙션하면, 노던 블랏으로 감지하여 보면 설바이빈 mRNA가 상향 조절되었음을 알 수 있다.

### 실시예 11: 설바이빈으로 아폽토시스를 촉진

쥐 또는 햄스터 세포주(NIH 3T3, CHO)에 설바이빈 cDNA를 트랜스펙션시키는 것은 이들 세포에 면역화학적으로 구별할 수 없는 내생 상동체가 존재하는 경우에는 적합하지 않다(나타내지 않음). 유사하게, 안정적인 안티센스 트랜스펙턴트에 있는 설바이빈 유전자를 표적으로 하는 초기 시도는 세포 생장이 느리고, 생존능이 급격하게 상실되기 때문에 성공하지 못하였다(나타내지 않음). EK라서, 설바이빈<sup>+</sup> HeLa 세포에는 메탈로티오닌-유도성 프로모터(Lukashev, M.E. et al., J Biol Chem (1994) 269:18311-18314) 조절하에 EPR-1 cDNA 3' 말단(설바이빈 안티센스)로 트랜스펙트시키고, 하이그로마이신에서 선택하고, Zn<sup>2+</sup> 의존성 전사 활성을 시킨 후에 아폽토시스 및 세포 증식에 대해 분석하였다.

형질변환된 세포주에서 설바이빈이 발현되는 것과 일치하게(도 4C), JC700 항체는 벡터 단독으로 트랜스펙트된 기준 HeLa 세포 추출물에서 단일 분자 종의 ~16.5kDa에 이뮤노블랏된다(도 7A). 대조적으로 EPR-1 cDNA(설바이빈 안티센스)으로 트랜스펙트된 메탈로티오닌-유도된 HeLa 세포에서 JC700 항체가 인지하는 특정 밴드는 없었다(도 7A). 이들 실험 조건하에, AptoTag 착색으로 뉴클레오좀간의 DNA 분절 *in situ* 분석을 하면, 혈청이 없는, Zn<sup>2+</sup> 유도된 기준 벡터 HeLa 세포에서는 단지 몇 개의 아폽토시스 세포만이 발견되었다(도 7B).

상기에서 논의된 것과는 대조적으로, Zn<sup>2+</sup> 유도된 안티센스 HeLa 세포 트랜스펙턴트에서 설바이빈 발현을 저해하면 검사된 대부분 세포에서 주로 핵이 착색되었다(도 7B). 디옥시제닌-라벨된 dUTP에 TdT 꼬리가 없는 것에서는 핵 착색이 나타나지 않았다(나타내지 않음). 상당수의 아폽토시스 몸체 등을 포함하는 일반적인 아폽토시스의 형태학적 특징은 헤마토실린/에오신 착색에 의해 유도된 안티센스 HeLa 세포 트랜스펙턴트에서 설명되는데, 동일한 실험 조건하에서 기준 벡터 HeLa 배양물에서는 간헐적으로 아ປ토시스 몸체가 발견되었다(도 7B).

세포 생장에 있어서, 설바이빈의 잠재적인 영향을 또한 조사하였다. 이들 실험에서, 메탈로티오닌-조절된 EPR-1 의존성 설바이빈 발현을 방해하면 혈청-의존성 HeLa 세포 증식이 상당히 감소된다(도 7C). Zn<sup>2+</sup>으로 유도후 3일째에, 기준 벡터 HeLa 배양물에 있는 세포 수가 288% 증가되었는데, 이는 동일한 실험 조건하에서 설바이빈 안티센스 트랜스펙턴트가 20%만 증가된 것과는 상반되는 것이다(도 7C).

### 실시예 12: 설바이빈의 구조-기능간의 상관관계

한 개 설바이빈 BIR(베쿨로바이러스 IAP 반복체) 모듈에서 진화론적으로 가장 보존된 잔기중 Ala 치환체의 돌연변이 발생 방법으로 설바이빈에 의한 아ປ토시스를 방해하는데 관련되는 최소 구조상의 조건을 확인하였다. 이들 잔기에는 설바이빈 BIR의 아미노-말단 절반 Arg<sup>18</sup>, Phe<sup>22</sup>, Trp<sup>25</sup>, Pro<sup>26</sup>, Pro<sup>35</sup>, Ala<sup>39</sup>, Ala<sup>41</sup>, Gly<sup>42</sup>, and Cys<sup>46</sup>이 포함된다. 설바이빈 BIR의 카르복시-말단 절반에는 Cys<sup>57</sup>X<sub>2</sub>Cys<sup>60</sup>X<sub>16</sub>His<sup>77</sup>X<sub>6</sub>Cys<sup>84</sup> 가상 아연 결합 모티프에 있는 Ala 돌연변이를 처음 표적으로 하였다. 돌연변이 발생 표적이 되는 추가 보존된 잔기에는 Asp<sup>53</sup>, Leu<sup>64</sup>, Trp<sup>67</sup>, Pro<sup>69</sup>, Asp<sup>71</sup>, Asp<sup>72</sup>, Pro<sup>73</sup>이 포함된다.

설바이빈 돌연변이는 안정된 일시적으로 트랜스펙트된 세포, IL-3 의존선 BaF3 세포, NIH3T3 등이 있다. 이들 점 돌연변이에 추가하여, 카르복시-말단 RING 핑거를 포함하는 설바이빈 키메라 분자를 만들고, 아ປ토시스 저해에 대해 조사하였다(RING 핑거는 대부분의 다른 IAP 단백질에서는 발견이 되나, 설바이빈에서는 발견되지 않음). 둘째, 코일드 코일 구조

를 가질 것으로 예상되는 마지막 40개 카르복시말단 잔기를 잘라내어 절두형 설바이빈을 만든다. 도 12에서 나타낸 것과 같이, 설바이빈에서 주요 보존된 잔기 Trp<sup>67</sup>-Pro<sup>73</sup>-Cys<sup>84</sup>를 Ala 치환하면, IL-3를 회수함으로써 유도되는 아폽토시스로부터 BaF3를 보호하는 능력이 부족한 재조합 분자를 만들게 된다.

### 실시예 13: 설바이빈의 세포 보호 효과

아폽토시스에 의해 안정된 세포 집단에서 세포를 손상시키는 전통적인 예로는 임파세포에 침윤함으로써 동종이식편 거부, 알즈마이어 질병, 심근경색에 따른 재활류 손상 등이 속한다. 암에서 발현되어, 암세포의 생장에 유익한 인자로 기능하는 것에 추가하여, 설바이빈의 표적 발현은 아폽토시스 및 다른 세포 손상으로부터 안정된 세포 집단을 보호하는데 이용할 수 있다. 전통적으로 아폽토시스를 유도하는 자극에 이용되는 과산화수소( $H_2O_2$ )에 의해 손상된 사람의 내피 세포 단층에 정제된 재조합 설바이빈을 농도를 증가시키면서 첨가하여, 설바이빈을 이용하는 것에 대해 테스트하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다. 첨가된 설바이빈의 농도를 증가시키면 처리된 세포의 생존능을 상당히 증가시키는데, 이는 기준이 되는 단백질 미오글로빈으로 처리한 기준 배양물의 경우와 반대가 된다. 유사하게, 도 17에서 볼 수 있는 것과 같이 lacZ 리포터 유전자로 일시적으로 공동 트랜스펙트한 후에 과산화수소에 의해 유도된 아폽토시스로부터 설바이빈이 NIH3T3 세포를 보호한다.

### 실시예 14: 예상되는 예후 인자로써 설바이빈

설바이빈은 신경아세포종, 비-호드킨 임파종, 다른 암에서 예후를 나타내는 음성적인 인자로 이용된다.

**신경아세포종:** 다중 중심적 연구에서 여러 가지 일련의 신경아세포종 경우(72경우)에 대해 설바이빈이 발현되는지를 스크린하였다. 도 14에서 볼 수 있는 것과 같이, 환자가 공격적이고 급작스럽게 진행되는 질병에 대해 적어도 한가지 음성적인 예후를 나타내는 인자를 가지고 있는 경우에는 설바이빈의 발현이 갑자기 증가하게 된다. 둘째, 설바이빈의 발현은 좀더 공격적이고 나쁜 조직학과 상당한 관련이 있다. 중요한 것은 설바이빈 발현이 단순한 조직학보다는 좀더 민감한 예후 지수를 가진다. 초기에 진단되는 조직학을 가지는 설바이빈-양성인 경우 질병이 진행되고 퍼지는데 대해 적어도 한가지 음성적인 예후 인자를 가지는 것으로 나타났다.

**호드킨(Hodgkin) 임파종:** 비슷한 다중 중심 연구에서 높은 정도의 비-호드킨 임파종(n=48)에서 설바이빈 발현을 분석하였다. 그 결과는 신경아세포종의 경우와 유사하였다. 도 15에서 볼 수 있는 것과 같이, 설바이빈 발현은 IV 단계에서 질병이 더 많이 변진 것과 상당한 관련이 있었다. 임상적으로, 설바이빈-발현 환자는 설바이빈-음성 환자의 경우와 비교하였을 경우에, 질병이 완전하게 완쾌된 수가 적고, 완쾌되지 않는 경우가 더 많다.

**관련 가능성:** 두가지 배 발생학적으로 다른 형태의 암에서 음성 예후 인자로 설바이빈의 역할을 설명하면 이 분자를 이용하여 질병의 진행을 모니터하고, 치료 반응을 모니터할 수 있는 진단 도구이다. 설바이빈은 다단계 목적에 이용될 수 있고, 다중 약물 저항성(완치되지 않은 또는 완치가 완전히 안된 집단)에 걸리기 쉬운 환자 집단을 확인하는데 이용할 수 있다. 또한, 설바이빈 유전자의 완전한 서열로부터 설바이빈 유도된 프라이머를 스크리닝 도구로 이용하여 설바이빈이 결손된 또는 돌연변이된 암을 확인할 수 있다. 이와 같은 경우는 설바이빈 유전자만을 비활성화시키면, 약물-저항 유전자를 제거한 암 환자에 유익한 예후 인자가 된다. 설바이빈 유전자를 비활성화시키는 돌연변이는 Ala-돌연변이를 스크린할 때 확인된 동일한 주요 잔기를 표적으로 하거나 해독을 불완전하게 끝내는 이상 또는 절두형 단백질이 만들어진다.

### 실시예 15: 설바이빈 암 백신

다양한 암 형태에서 발견된 설바이빈에 대한 백신을 개발할 수 있는데, 이는 다른 질병과 연관된 세포내 단백질을 목표로 하는 것일 수 있다. 이와 같은 기술은 통상적으로 이용할 수 있고, 그중 대표적인 방법은 하기에서 언급한 문헌에서 설명하고 있다. 백신에는 설바이빈 웹티드 단편을 전신으로 투여하는 시스템을 포함할 수 있고, 표적이 되는 종양 세포에 설바이빈 웹티드를 인코드하는 미니-유전자를 전달하는 백터를 사용하는 것도 생각할 수 있다. 상기에서 언급한 것과 같이 설바이빈은 정상 세포에서는 발현되지 않고, 골수에서는 증식하는 간세포에서조차도 발현되지 않는다. 이는 설바이빈에 대한 면역반응이 상당히 감응성이 있고, 특이적이고 정상 세포와는 관계하지 않는다는 것을 말한다.

### 폴리웹티드계 백신의 개발 및 투여

단가 또는 다가 암 면역치료법-백신 생성물에서 웹티드 성분을 이용하는 방법에 대해서는 Nardi, N. et al., Mol. Med. (1995) 1(5):563-567에서 설명한다. 다른 암 백신 및 암 면역치료법에 대해서 논의하는 다른 문헌에는 N.P. Restifo and

M. Sznol "Cancer Vaccines," in DeVita's Cancer: Principles & Practice of Oncology 3023-3043 (Lippincott-Raven, Philadelphia; 1997); J. Galea-Lauri et al., Cancer Gene Ther. (1996) 3(3): 202-214; D.C. Linehan et al., Ann. Surg. Oncol. (1996) 3(2):219-228; and J. Vieweg et al., Cancer Invest. (1995) 13(2): 193-201를 포함한다.

전술한 방법과 상응하게, 설바이빈 폴리펩티드 또는 전체 길이 설바이빈은 공지의 기술을 이용하여 화학적으로 합성을 하거나 진핵 또는 원핵 세포에서 적절한 cDNAs를 발현시켜 재조합에 의해 합성을 할 수 있다. 이렇게 생산된 설바이빈 단백질을 혈청 또는 세균성 단백질등과 같은 다른 불순물 단백질을 제거할 필요가 있을 때에는 정제한다. 설바이빈은 또한 설바이빈에 결합하는 항체 가령 단클론항체 JC700 또는 설바이빈을 인지하고 이에 결합하는 항체 8E2(둘 다 위에서 설명했음)를 포함하는 컬럼을 이용하여 추가 정제할 수 있다. 항체를 이용한 백신을 정제할 경우에는 재조합에 의해 생산된 설바이빈은 항체에 결합되고, 다른 단백질 및 세포 찌꺼기는 췄거나갈 것이다. 설바이빈 폴리펩티드를 분리하여 원하는 강도로 농축시킬 수 있다.

또는 설바이빈 폴리펩티드는 한가지 이상의 프로테아제(가령 트립신)로 고유 설바이빈을 절단하여 만들 수 있다. SDS-PAGE, 고해상/고압력 분리 기술 또는 역상 HPLC. See R.J. BEYNON AND J.S. BOND, PROTEOLYTIC ENZYMES: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, New York 1989)를 이용하여, 단백질분해된 단편을 분리하고, 회수한다. 이와 같이 분리된 펩티드는 최종적으로 원하는 농도로 농축시킨다.

일단 정제한 후에, 설바이빈 폴리펩티드 또는 전체 길이의 설바이빈 분자는 어쥬번트를 포함하는 에멀젼에 둔다. 설바이빈에 이용할 수 있는 어쥬번트에는 알루미늄 어쥬번트, 플루언트 어쥬번트, 오일/물 에멀젼(튜베를 바실러스, 인터루킨2(IL-2)포함)등이 포함된다. 추가로 제조물에는 설바이빈 폴리펩티드와 다른 적절한 종양-관련 항원 복합물 선택적으로는 사이토킨과 같은 면역조절 물질이 복합된다. 다른 적절한 담체 또는 부형제를 이용할 수 있는데, 예를 들면, 소 혈청 알부민, 설바이빈 펩티드에 헵тен을 결합, 키홀 림페트 헤모시아닌, 오브알부민, 튜베르큘린 정제된 단백질 유도체등이 있다. 펩티드는 ED HARLOW AND DAVID LANE, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)에서 설명하는 기술을 이용하여 담체에 결합할 수 있다.

사람 개체에 백신은 피하, 진피 또는 근육(IM)을 통하여 에멀젼 형태로 투여할 수 있다; 경구로 투여할 수 있도록 조제할 수도 있다. 어쥬번트를 포함하는 백신의 경우에는 백신은 일반적으로 델토이드(deltoid)를 이용하여 IM으로 제공한다.

환자에게 투여할 설바이빈 백신 또는 설바이빈 펩티드의 양은 다른 암 백신에 이용되는 일반적인 값에 상응한다. 약량은 하루에 0.25g 내지 약 1000g 정도가 된다. 좀더 바람직한 약량은 하루에 약 10 $\mu$ g 내지 약 500 $\mu$ g 범위가 된다.

### 실시예 16: 항-설바이빈 항체를 진단에 이용

종양 세포로부터 종양 관련된 항원(TAA)이 주변 혈장 또는 혈액으로 방출된다. 그 결과, TAA는 환자의 혈액, 혈액 샘플에서 흔히 발견되는데, 이를 이용하여 암이 존재하는지를 감지할 뿐만 아니라 암의 진행 단계(I, II, III, IV 기)를 알려주는 인자로 이용된다. 설바이빈은 TAA와 같은 항원의 하나로, 건강한 정상 개체에서는 설바이빈이 발현되지 않는다. 몇 가지 암을 연구한 결과를 보면, 설바이빈(또는 설바이빈 단편)이 존재한다는 것은 공격적이고 또는 전이될 수 있는 질병이 있다는 것을 예측하여준다. 설바이빈 또는 설바이빈 단편을 감지하고, 이의 수준을 정량화하는 유사한 방법을 이용하면, 암 치료를 위해 화학요법 또는 방사선 요법을 받고 있는 암 환자에 있는 남아있는 종양의 양을 알 수 있다. 설바이빈의 수준이 상승되었거나 증가되었다면 신조직 형성 질환 말기라는 것을 나타낸다.

진단용으로 이용하는 경우에, 암이 있는 것으로 알려진 또는 암이 있을 것으로 보이는 환자로부터 공지의 방법으로 피를 뽑는다. 혈액 샘플은 공지의 방법으로 준비하고, 이 샘플은 선택적으로 라벨된 설바이빈에 대한 항체에 결합할 수 있는지를 테스트한다. 이와 같은 일반적인 항체 감지 방법 및 이와 관련된 시약은 당분야에 잘 알려져 있다. 정액, 오줌, 침과 같은 다른 생물학적 유체를 이용하여 설바이빈이 존재하는지에 대해 모니터할 수 있다. 이와 같은 진단 기술을 이용하여 질병의 진행 및 개별 치료법에 대한 반응을 모니터할 수 있다. 이와 같은 방법은 암 진행 및 치료를 추적하는데 상대적으로 비-침투적인 방법이 된다.

### 실시예 17: 면역조사에 의한 설바이빈 감지

환자 혈액에 설바이빈이 존재하는지를 테스트하는 면역생검사는 설바이빈에 대한 단클론 항체가 설바이빈에 결합하고, 면역흡착에 의해 용액으로부터 감지가능한 설바이빈을 제거하는 능력에 따라 달라진다. 이와 같은 면역생검을 이용하여 의

심이 가는 암 환자에서 설바이빈이 감지되는지를 확인하고 분절화된 컬럼으로부터 용출된 분취물을 감지한다. 각 환자 샘플을 설바이빈을 특이적으로 인지하고 결합하는 Mab 8E2와 같은 단클론 항체와 4°C에서 2시간동안 배양시킨다. 단클론 항체는 항-쥐 IgG 아가로즈 비드(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)에서 용해시킨다.

아가로즈 비드를 0.01M 인산완충액(pH 7.2)과 0.25M NaCl를 포함하는 결합 완충액으로 우선 세척하고, 그 다음 비드를 설바이빈 단클론 항체와 18시간동안 4°C에서 배양하여 아가로즈 비드 항-쥐(IgG(H + L))-설바이빈 복합체를 준비한다. 그 다음 아가로즈 비드는 30초간 16,000 x g에서 원심분리에 의해 침전시키고, 비-특이적 부위는 2% 탈지 우유를 포함하는 0.5M NaCl-TMK에 30분간 4°C에서 배양시켜 차단시킬 수 있다. 차단 후에, 비드는 0.5M NaCl-TMK로 3회 세척하고, 동량의 완충액으로 재현탁시킨다. 20:1 아가로즈 비드-단클론 항체 복합물은 각 250:1 환자 테스트 샘플로 4°C에서 2시간동안 배양시킨다. 환자 테스트 샘플에 존재하는 임의 설바이빈은 비드에 있는 설바이빈 단클론 항체에 의해 발견된다. 설바이빈이 결합된 비드 복합체는 16,000 x g에서 30초간 원심분리하여 제거한다. 그 다음 상청액은 하기에서 설명하는 것과 같이 설바이빈 활성에 대해 조사하였다. 기준 샘플은 설바이빈 단클론 활성이 부족한 차단된 비드로 처리한 것으로 생검에서 설바이빈 활성에 대해 테스트한다.

#### 실시예 16: 직접적인 ELISA 테스트를 이용하여 설바이빈 감지

정상 혈장(기준) 샘플과 암 환자의 혈장 샘플을 인산완충염(PBS)으로 1:1로 희석한다. 10kD 분자량으로 제한되는 센트리 콘-10 필터에 각 혼합물 1 용적을 첨가하여 1시간동안 5000xg(7000 rpm)에서 원심분리한다. 보유액에 1 용적의 PBS를 첨가하고 30분간 원심분리하였다. 최종 희석비는 약 1:3이다. ELISA 플레이트 웰은 중탄산염(pH9.6)에서 최종 희석비를 1:6, 1:12, 1:24, 1:48, 1:96로 한 보유액으로 하룻밤동안 4°C에서 피복하였다. 그 다음 플레이트는 인산완충염에 있는 5% Tween 20을 포함하는 세척 완충액으로 2회 세척한다. 남아있는 결합부위는 웰당 300μg으로 4% 소 혈청 알부민(BSA)으로 2시간동안 차단시킨다. 그 다음 플레이트는 세척 완충액으로 2회 세척한다. 그 다음 설바이빈을 특이적으로 인지하여 결합하는 100μl 단클론항체 가령 Mab 8E2를 1% BSA에 1:200로 희석하여 첨가하고, 1시간동안 교반하면서 배양한다. 글레이트는 세척 완충액으로 5회 세척한다. 그 다음, 100μl 양고추냉이 과산화효소 공액된 2차 항체를 첨가하는데 일반적으로 각 웰에 1:2,000 희석비로 첨가하고, 1시간동안 배양한다. 플레이트는 세척 완충액으로 다시 5회 세척한다. 그 다음 5μg 설바이빈을 포함하는 기질 100μl/웰과 5μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10ml 구연산염-인산 완충액을 각 웰에 첨가하고, 5분간 배양한다. 효소 반응은 50μl/well 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 첨가하여 중단시킨다. EIA 판독기로 492nm에서 빛의 흡수도를 읽는다. 설바이빈을 포함하는 환자 샘플은 양성으로 나오는 반면에 설바이빈을 포함하지 않는 샘플에서는 음성으로 나타난다.

#### 실시예 18: 설바이빈 단편, 웨티드 및 작은 분자 길항체

상기에서 설명한 것과 같이, 아폽토시스에 요구되는 설바이빈에 있는 주요 기능 잔기를 확인하였다. 이들 데이터는 합성 웨티드 및 소분자 길항체 및 경쟁적인 설바이빈 저해물질을 만드는 주형으로 제공한다. 적절하게는 웨티드는 고유 설바이빈으로부터 생산되거나 또는 기능상으로 관련이 있는 Trp<sup>67</sup>-Pro<sup>73</sup>-Cys<sup>84</sup>을 포함하는 고유 설바이빈 웨티드 기본구조 치환체를 포함한다. 고유 설바이빈의 웨티드 단편은 단백질 다이제스트 등을 포함하는 표준 기술을 이용하여 만들 수 있다. 설바이빈과 경쟁하는 단편을 측정하는 방법은 상기에서 설명하는 아폽토시스 측정 시스템 및 아폽토시스 검사 시스템을 이용하는 것이다. 그 결과는 아폽토시스를 저해하는데 필수적인 설바이빈에서 분리된 선형 서열을 확인할 수 있는 유일한 기회를 제공한다.

IAP 단백질을 이용한 아폽토시스를 저해하는 일반적인 전형과 일치하게, 항-아폽토시스 기능에 요구되는 분자에서 구조적 부분은 다른 분자(결합작)과 상호작용하는 부위로 예상할 수 있다. 돌연변이발생 데이터를 기초하여 설바이빈에 있는 기능상으로 관련이 있는 웨티드 서열은 EGWEPPDDPIEEHKKHSSGC[서열 4]이다. 밑줄친 잔기를 Ala로 치환하는 경우에 트랜스펙트된 세포에서 설바이빈의 기능이 완전히 상실된다. 이와 같은 선형 서열을 합성하고, 이를 염격한 특이적인 시약으로 사용하여 표준 생화학적 친화력 크로마토그래피 과정을 이용하여 관련 분자를 분리하거나 이스트 이중-하이브리드 시스템용 미끼로 사용한다.

또한, 적절하게는 설바이빈의 βCOOH 코일드-코일 부분이 설바이빈 단편 및 웨티드에 포함된다. 최근 데이터에 따르면, 이와 같은 설바이빈 도메인은 설바이빈의 항-아폽토시스 기능에 중요한 것으로 나타났다. 코일드-코일 도메인으로 구성된 마지막 40βCOOH 말단 아미노산이 없는 절두형 재조합 설바이빈을 만들었다. 이와 같은 절두형을 NIH3T3 세포에 야생형 설바이빈 및 또다른 IAP 유전자 족의 성분인 XIAP와 함께 lacZ 플라스미드를 이용하여 공동 트랜스펙트시킨다. 도 17에서 볼 수 있는 것과 같이, 그 결과를 보면, 절두형 설바이빈은 과산화수소에 의해 유도된 트랜스펙트된 세포에서 아폽토시스를 방해하는데 세포보호성 효과의 대부분(~80%)를 상실한 것으로 나타났다. 이 시스템에서 설바이빈은 아폽토시스를 저해하는데 있어서 NAIP보다 강하다.

설바이빈의 작용제 및 길항제는 통상적인 기술을 이용하여 확인할 수 있다. 고유 선형 서열에 기초한 고안된 합성 펩티드 또한 설바이빈의 상호작용의 경쟁적인 저해물질로 기능을 한다. 그러나, 이와 같은 저해는 설바이빈의 항-아폽토시스 기능을 차단시킬 수 있을 정도로 충분해야 한다.

in vitro 및 in vivo에서 아폽토시스로부터 세포를 보호하기 위해 카스파제 활성을 차단시키는데 유사한 펩티드를 이용한 방법이 성공하였다(Milligan, C.E. et al., (1995) Neuron 15:385-393).

### 실시예 19: 안티센스 설바이빈 DNA의 치료요법적 용도

상기에서 설명한 것과 같이, 설바이빈 안티센스 서열이 전사되면 EPR-1/설바이빈 유전자 균형이 변화된다. 이는 HeLa 세포 트랜스펙턴트에서 설명할 수 있는데, EPR-1 "센스" 가닥이 메탈로티오닌에 의해 유도되어 전사되면 설바이빈의 발현을 억제하고, 이는 아폽토시스/세포 증식에 상당한 영향을 준다. 또한,  $\beta$ -갈락토시다제 발현시키는 세포에서 48시간 트랜스펙트시킨 후에, lacZ가 있는 플라스미드와 설바이빈 안티센스 구조를 일시적으로 동시에 트랜스펙트시키면, 설바이빈 안티센스 트랜스펙션의 생존성을 감소시킨다. 따라서, EPR-1 센스 가닥 DNA를 세포 또는 조직에 트랜스펙트시켜, 설바이빈을 발현시키는 세포 또는 조직 가령 종양에서 설바이빈 발현 수준이 감소된다. 또는 설바이빈 안티센스를 인코드하는 DNA를 이용하여 표적 세포 또는 조직에 트랜스펙트시킨다. 이와 같은 치료법은 설바이빈을 인코드하는 mRNA이 설바이빈 단백질로 해독되는 것을 효과적으로 감소시킨다.

### 실시예 20: 아폽토시스에 대한 보호 물질로 설바이빈을 이용

과산화수소에 노출된 또는 일반적으로 아폽토시스를 유도하는 물질에 노출된 세포에 설바이빈을 투여하였을 경우에 설바이빈이 세포를 아폽토시스로부터 보호하는 것으로 나타났다. 아폽토시스를 감소시키는데 효과가 있는 설바이빈 또는 설바이빈 단편을 수송하기 위해서는 일시적인 방법으로 세포 침투능을 증가시킬 필요가 있다. 일시적인 대사 저해 또는 일시적인 하이폭시아(hypoxia)에 관련되는 특정 조건은 추가 외부 물질 없이 세포 침투성을 증가시키는 것이다. 적절한 물질에는 2-데옥시글루코즈 및 아지드나트륨과 같은 대사 저해물질을 포함한다. 그러나, 세포 침투능을 일시적으로 증가시키는 동안에 세포보호를 중개하는 설바이빈의 능력은 심근경색 및 발작동안에 재환류손상 및 세포 손상을 감소시키기 위해 재조합 설바이빈을 치료요법적으로 주입할 수 있는 가능성을 제공한다. 이와 같은 과정은 아폽토시스로 인하여 조직 손상이 증가된다. 설바이빈으로 처리하면 손상된 조직의 정도 및 그 크기를 줄일 수 있을 것이다.

다양한 아폽토시스 관련된 징후를 치료하거나 감소시키기 위해 아폽토시스와 연관된 세포 죽음을 조절하거나 예방하는데 설바이빈 또는 설바이빈 대립유전자 변이체를 이용할 수 있다. 이와 같은 징후에는 노화에 따른 피부학적인 영향(가령, 모소낭 세포의 아폽토시스에 의해 대머리), 면역억제, 위장 혼란과 같은 질병 및 질환(위장 라이닝 손상, 궤양, 방사선 또는 화학요법에 의해 유도된 손상), 심장맥관 질환, 아폽토시스 관련된 재환류 손상(예를 들면 관상동맥 폐색, 뇌 경색, 척수/머리 외상 및 동시에 심각한 마비, 동상 또는 화상으로 인한 손상, SOD(superoxide dismutase)로 치료할 수 있는 것으로 보이는 임의 징후, 조직 이식 거부(가령, 이식편 숙주 거부 반응), 알즈하이어 질환 등을 포함하나 이게 국한시키지는 않는다. 설바이빈을 투여하면 화학요법 또는 방사능에 의해 유도된 아폽토시스에 대해 세포를 보호할 수 있다.

여기에서 설명하는 cDNA를 이용하여 상기에서 설명한 것과 같이 투여용 설바이빈 단백질을 만들 수 있다. 제약학적으로 투여하기 위해 단백질을 정제할 수 있고, 이와 같은 정제 단계에는 상기에서 설명하는 것과 같이 단클론 항체 분리 및 정제 기술을 이용하는 것이 바람직하다.

임상적으로 세팅된 경우에, 설바이빈을 환자에게 제약학적으로 효과적인 약량을 투여하는데, 이 약량은 몇 가지 경로를 통하여 아폽토시스 수준 또는 그 정도를 줄이는데 효과가 있는 양을 말한다. 예를 들면, 아폽토시스와 연관된 피부 질병을 치료하기 위해서는 설바이빈을 연고, 크림, 고약, 분말형으로 투여할 수 있다. 국소적인 조성물에는 보습제, 습윤제, 향 변형제, 완충액, 안료, 보존제, 비타민(가령 A, C, E), 에멀젼제, 분산제, 가습제, 안정화제, 추진제, 항균제, 썬스크린, 효소 등의 추가 제약학적 또는 미용상의 조성물을 포함할 수 있다. 환자에게 투여할 수 있는 설바이빈의 일반적인 약량은 0.01% 내지 1.0%가 된다. 추가 국소적인 제약학적 조성물은 S. Nakai et al., U.S. Patent No. 5,672,603에서 설명하고 있다.

설은 치료될 상태에 따라 알약, 용액, 혼탁액, 에멀젼, 과립 또는 캡슐등의 형태로 투여할 수 있다. 설바이빈을 경구로 투여 할 수 있고; 용액 단독 또는 장관외로 투여하기 위한 통상적인 유체와 혼합할 수 있는데(포도당, 아미노산등을 포함하는 유체); 근육내, 피하내, 진피내, 복막 내로 주사하거나; 좌약을 이용하여 투여하거나 안약등으로 투여할 수 있다. 또한 설바이빈은 방출 지연된 담체 가령, 아폽토시스 관련된 세포 죽음을 예방하기 위해 치료할 조직에 근접 하에 배치될 수 있는 리포

좀, 마이크로스폰지, 마이크로스페어, 마이크로캡슐을 이용하여 투여할 수 있다. 국소 투여이외의 다른 경로를 통하여 투여될 설바이빈 또는 설바이빈의 기능을 갖고 있는 대립유전자 변이체 농도는 투여 경로에 따라 하루에 약  $10\mu\text{g}$  내지 약 25 mg 약량 범위가 된다. 물론, 의사등의 당업자는 특정 환자에 필요한 양을 변경시킬 수 있을 것이다.

### 서열표 리스트

#### (1) 일반정보

(i) 출원인;

(A) 이름; Yale University

(B) 거리; 451 Colleage Street

(C) 도시; New Haven

(D) 주; CT

(E) 나라; USA

(F) 우편코드; 06510

(ii) 발명의 명칭; 세포 아포트포시스를 저해하는 설바이빈 단백질 및 이를

조절하는 방법{Survivin, a protein that inhibit cellular apoptosis, and its modulation}

(iii) 서열의 수; 35

(iv) 컴퓨터 판독 형태

(A) 매체 형태; 디스크

(B) 컴퓨터; IBM 호환성

(C) 작동시스템; PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어; Patent In Release #1.0, Version #1.30

(v) 현재 출원 자료

(A) 출원번호; PCT/US97/21880

(B) 출원일; 1997년 11월 20일

(vi) 우선 출원 자료

(A) 출원 번호; US 60/031,435

(B) 출원일; 1996년 11월 20일

(2) 서열 1에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 19bp

(B) 형태; 핵산

(C) 가닥; 단일가닥

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 다른 핵산

(A) 설명;/desc="올리고뉴클레오티드"

(xi) 서열 1

### 【서열 1】

TGCTGGCCGC TCCTCCCTC

19

(2) 서열 2에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 18bp

(B) 형태; 핵산

(C) 가닥; 단일가닥

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 다른 핵산

(A) 설명; /desc="올리고뉴클레오티드"

(xi) 서열 2

### 【서열 2】

ATGACCTCCA GAGGTTTC

18

(2) 서열 3에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 17개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 펩티드

(xi) 서열 3

### 【서열 3】

Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg  
1 5 10 15

Ile

## (2) 서열 4에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 20개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; 펩타드

## (xi) 서열 4

## 【서열 4】

Glu	Gly	Trp	Glu	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro	Ile	Glu	Glu	His	Lys	Lys	His
1				5				10		15					
Ser	Ser	Gly	Cys												
				20											

## (2) 서열 5에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 27bp

(B) 형태; 핵산

(C) 가닥; 단일가닥

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; DNA(genomic)

## (xi) 서열 5

【서열 5】

GCGGGTGAGC TGTCCTTGC AGATGGC

27

(2) 서열 6에 대한 정보

(i) 서열특징

- (A) 길이; 27bp
  - (B) 형태; 핵산
  - (C) 가닥; 단일가닥
  - (D) 위상; 선형
- (ii) 문자형; DNA(개념)

(xi) 서열 6

【서열 6】

CCATGTAAGT TGATTTTCT AGAGAGG

27

(2) 서열 7에 대한 정보

(i) 서열특징

- (A) 길이; 27bp
- (B) 형태; 핵산
- (C) 가닥; 단일가닥
- (D) 위상; 선형

(ii) 문자형; DNA(genomic)

(xi) 서열 7

**【서열 7】**

AATTGTATGT CTTTATTTCC AGGCAAA

27

(2) 서열 8에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 45 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 8

**【서열 8】**

Glu	Glu	Ala	Arg	Leu	Val	Thr	Phe	Gln	Asn	Trp	Pro	Asp	Ala	Phe	Leu
1								10							15
Thr	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly
								25						30	
Asp	Gln	Val	Gln	Cys	Phe	Ala	Cys	Gly	Gly	Lys	Leu	Ala			
								40						45	

(2) 서열 9에 대한 정보

(i) 서열특징

(A)길이; 45개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 9

### 【서열 9】

Glu	Glu	Ala	Arg	Phe	Leu	Thr	Tyr	Ser	Met	Trp	Pro	Leu	Ser	Phe	Leu
						5			10				15		
1															
Ser	Pro	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Ala	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Pro	Gly
									25			30			
20															
Asp	Arg	Val	Ala	Cys	Phe	Ala	Cys	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser			
									40			45			
35															

(2)서열 10에 대한 정보

(i)서열특징

(A)길이; 45개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 10

### 【서열 10】

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile  
 1 5 10 15

Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu  
 20 25 30

Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala  
 35 40 45

## (2) 서열 11에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 분자형; 단백질

## (xi) 서열 11

## 【서열 11】

Glu Glu Val Arg Leu Asn Thr Phe Glu Lys Trp Pro Val Ser Phe Leu  
 1 5 10 15

Ser Pro Glu Thr Met Ala Lys Asn Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Ser  
 20 25 30

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Met  
 35 40 45

## (2) 서열 12에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 12

**【서열 12】**

Lys Ala Ala Arg Leu Gly Thr Tyr Thr Asn Trp Pro Val Gln Phe Leu  
1                       5                   10                   15

Glu Pro Ser Arg Met Ala Ala Ser Gly Phe Tyr Tyr Leu Gly Arg Gly  
20                   25                   30

Asp Glu Val Arg Cys Ala Phe Cys Lys Val Glu Ile Thr  
35                   40                   45

(2)서열 13에 대한 정보

(i)서열특징

(A)길이; 47개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 13

**【서열 13】**

Glu Glu Ala Arg Leu Ala Ser Phe Arg Asn Trp Pro Phe Tyr Val Gln  
 1 5 10 15

Gly Ile Ser Pro Cys Val Leu Ser Glu Ala Gly Phe Val Phe Thr Gly  
 20 25 30

Lys Gln Asp Thr Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly Cys Leu Gly  
 35 40 45

## (2) 서열 14에 대한 정보

## (i) 서열 특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 14

## 【서열 14】

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile  
 1 5 10 15

Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu  
 20 25 30

Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala  
 35 40 45

## (2) 서열 15에 대한 정보

## (i) 서열 특징

(A) 길이; 46개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 15

【서열 15】

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

(2) 서열 16에 대한 정보

(i) 서열 특징

(A) 길이; 46개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 16

【서열 16】

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

## (2) 서열 17에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; α-미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 분자형; 단백질

## (xi) 서열 17

## 【서열 17】

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

## (2) 서열 18에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 18

**【서열 18】**

```

Glu Glu Ala Arg Phe Leu Thr Tyr His Met Trp Pro Leu Thr Phe Leu
1           5          10          15

Ser Pro Ser Glu Leu Ala Arg Ala Gly Phe Tyr Tyr Ile Gly Pro Gly
20          25          30

Asp Arg Val Ala Cys Phe Ala Cys Gly Gly Lys Leu Ser
35          40          45

```

(2) 서열 19에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이]; 46개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 19

**【서열 19】**

Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr Ala His  
 1 5 10 15

Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr Gly Ile  
 20 25 30

Gly Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys  
 35 40 45

## (2) 서열 20에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 45개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; 단백질

## (xi) 서열 20

## 【서열 20】

Glu Ala Asn Arg Leu Val Thr Phe Lys Asp Trp Pro Asn Pro Asn Ile  
 1 5 10 15

Thr Pro Gln Ala Leu Ala Lys Ala Gly Phe Tyr Tyr Leu Asn Arg Leu  
 20 25 30

Asp His Val Lys Cys Val Trp Cys Asn Gly Val Ile Ala  
 35 40 45

## (2) 서열 21에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 21

【서열 21】

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

(2) 서열 22에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 22

【서열 22】

Tyr Val Asp Arg Asn Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Arg Cys Trp Glu Pro Gly Asp Asp Pro Trp Ile Glu His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Phe Pro Arg Cys Glu Phe Leu Ile Arg Met Lys Gly Gln Glu Phe  
 35 40 45

Val Asp  
 50

## (2) 서열 23에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 23

## 【서열 23】

Tyr Gln Lys Ile Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly  
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Trp Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Ser Pro Lys Cys Gln Phe Val Leu Leu Ala Lys Gly Pro Ala Tyr  
 35 40 45

Val Ser  
 50

## (2) 서열 24에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A)길이; 49개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 24

**【서열 24】**

Tyr	Thr	Gly	Tyr	Gly	Asp	Asn	Thr	Lys	Cys	Phe	Tyr	Cys	Asp	Gly	Gly
1								10							15
Leu	Lys	Asp	Trp	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Pro	Trp	Glu	Gln	His	Val	Arg
								25							30
Trp	Phe	Asp	Arg	Cys	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Asp	Tyr
35							40								45

Val

(2)서열 25에 대한 정보

(i)서열특징

(A)길이; 49개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 25

## 【서열 25】

Tyr Thr Gly Gln Gly Asp Lys Thr Arg Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Lys Asp Trp Glu Pro Asp Ala Pro Trp Gln Gln His Ala Arg  
 20 25 30

Trp Tyr Asp Arg Cys Glu Tyr Val Leu Val Lys Gly Arg Asp Phe  
 35 40 45

Val

## (2) 서열 26에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; 단백질

## (xi) 서열 26

## 【서열 26】

Tyr Thr Gly Ile Lys Asp Ile Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly Cys  
 1 5 10 15

Leu Glu Lys Trp Gln Glu Gly Asp Asp Pro Leu Asp Asp His Thr Arg  
 20 25 30

Cys Phe Pro Asn Cys Pro Phe Leu Gln Asn Met Lys Ser Ser Ala Glu  
 35 40 45

Val Thr  
 50

## (2) 서열 27에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 분자형; 단백질

## (xi) 서열 27

## 【서열 27】

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

## (2) 서열 28에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산p

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 28

## 【서열 28】

Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly  
 1               5               10               15

Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His Ala Lys  
 20              25              30

Trp Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Glu Gln Lys Gly Gln Glu Tyr  
 35              40              45

Ile Asn  
 50

(2) 서열 29에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; 단백질

(xi) 서열 29

## 【서열 29】

Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Asp Glu Lys Gly Gln Glu Tyr  
 35 40 45

Ile Asn  
 50

(2) 서열 30에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

(ii) 문자형; 단백질

(xi) 서열 30

【서열 30】

Tyr Val Gly Asn Ser Asp Asp Val Lys Cys Phe Cys Cys Asp Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Arg Cys Trp Glu Ser Gly Asp Asp Pro Trp Val Gln His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Phe Pro Arg Cys Glu Tyr Leu Ile Arg Ile Lys Gly Gln Glu Phe  
 35 40 45

Ile Arg  
 50

(2) 서열 31에 대한 정보

(i) 서열특징

(A)길이; 50개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 31

### 【서열 31】

```

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

```

(2)서열 32에 대한 정보

(i)서열특징

(A)길이; 50개 아미노산

(B)형태; 아미노산

(C)가닥;

(D)위상; 선형

(ii)분자형; 단백질

(xi)서열 32

## 【서열 32】

Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Glu Gln Lys Gly Gln Glu Tyr  
 35 40 45

Ile Asn  
 50

## (2) 서열 33에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 50개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; 단백질

## (xi) 서열 33

## 【서열 33】

Tyr Gln Lys Ile Gly Asp Gln Val Arg Cys Phe His Cys Asn Ile Gly  
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Trp Gln Lys Glu Asp Glu Pro Trp Phe Glu His Ala Lys  
 20 25 30

Trp Ser Pro Lys Cys Gln Phe Val Leu Leu Ala Lys Gly Pro Ala Tyr  
 35 40 45

Val Ser  
 50

## (2) 서열 34에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 142개 아미노산

(B) 형태; 아미노산

(C) 가닥;

(D) 위상; 선형

## (ii) 문자형; 단백질

## (xi) 서열 34

## 【서열 34】

```

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1           5          10          15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20          25          30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35          40          45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50          55          60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65          70          75          80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85          90          95
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100         105         110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115         120         125
Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
130         135         140

```

## (2) 서열 35에 대한 정보

## (i) 서열특징

(A) 길이; 14796bp

(B) 형태; 핵산

(C) 가닥; 단일가닥

(D) 위상; 선형

(ii) 분자형; DNA(genomic)

(xi) 서열 35

## 【서열 35】

TCTAGACATG CGGATATATT CAAGCTGGGC ACAGCACAGC AGCCCCACCC CAGGCAGCTT	60
GAAATCAGAG CTGGGGTCCA AAGGGACCAC ACCCCGAGGG ACTGTGTGGG GGTCGGGGCA	120
CACAGGGCAC TGCTTCCCC CGTCTTTCTC AGCCATTCCCT GAAGTCAGCC TCACTCTGCT	180
TCTCAGGGAT TTCRAATGTG CAGAGACTCT GGCACACTTTC TAGAAGCCCC TTCTGGTCCT	240
AACTTACACC TGGATGCTGT GGGGCTGCAG CTGCTGCTCG GGCTCGGGAG GATGCTGGGG	300
GCCCCGGTGCC CATGAGCTTT TGAAGCTCTT GGAACCTCGGT TTTGAGGGTG TTCAGGTCCA	360
GGTGGACACC TGGGCTGTCCC TTGTCATGC ATTGATGAC ATTGTGTGCA GAAGTGAAAAA	420
GGAGTTAGGC CGGGCATGCT GGCTTATGCC TGTAATCCCA GCACCTTGGG AGGCTGAGGC	480
GGGTGGATCA CGAGGTCAGG AGTTCAATAC CAGCCTGGCC AAGATGGTGA AACCCCGTCT	540
CTACTAAAAA TACAAAAAAA TTAGCCGGGC ATGGTGGGG GCGCATGTAA TCCCAGCTAC	600
TGGGGGGGCT GAGGCAGAGA ATTGCTGGAA CCCAGGGAGAT GGAGGTTGCA GTGAGCCAAG	660
ATTGTGCCAC TGCACTGCAC TCCAGCCTGG CGACAGAGCA AGACTCTGTC TCAAAAAAAA	720
AAAAAAAGG TGAAAAGGAG TTGTTCCCTT CCTCCCTCCT GAGGGCAGGC AACTGCTGCG	780
GTTGCCAGTG GAGGTGGTGC GTCCCTGGTC TGTGCCTGGG GGCCACCCCA GCAGAGGCCA	840
TGGTGGTGCC AGGGCCCGGT TAGCGAGCCA ATCAGCAGGA CCCAGGGCG ACCTGCCAAA	900
GTCAACTGGA TTTGATAACT GCAGCGAAGT TAAGTTTCCCT GATTTGATG ATTGTGTTGT	960
GGTTGTGTAAGA GAGAATGAAG TATTCGGGG TAGTATGGTA ATGCCTTCAA CTTACAAACG	1020

GTTCGGTAA ACCACCCATA TACATACATA TACATGCATG TGATATATAC ACATACAGG 1080  
 ATGCTGT GTTCACATAT ATGAGGGGAG AGAGACTAGG GGAGAGAAG TAGGTTGGGG 1140  
 AGAGGGAGAG AGAAAGGAAA ACAGGAGACA GAGAGAGGC GGGGAGTAGA GAGAGGAAG 1200  
 GGGTAAGAGA GGGAGAGGAG GAGAGAAAGG GAGGAAGAAG CAGAGAGTGA ATGTTAAAGG 1260  
 AACACGGCAA AACATAAACAA GAAAATCTGG GTGAAGGGTA TATGAGTATT CTTTGACTA 1320  
 TTCTTGCAAT TATCTTTAT TAAATTGAC ATCGGGCCGG GCGCAGTGGC TCACATGTGT 1380  
 AATCCCAGCA CTTTGGGAGG CCGAGGCAGG CAGATCACTT GAGGTAGGA GTTGAGACC 1440  
 AGCCTGGCAA ACATGGTAA ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAAAATTA GCCTGGTGTG 1500  
 GTGGGTGCATG CCTTTAATCT CAGCTACTCG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 1560  
 CGTGGGGGGG AGCAGGGTCC AGTGAGCTGA GATCATGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGGGA 1620  
 TAGAGGAGA CTCAGTTCA AATAAATAAA TAAACATCAA AAAAAAAAGT TACTGTATTA 1680  
 AAGAATGGGG GCGGGGTGGG AGGGGTGGGG AGAGGTTGCA AAAATAAATA AATAAATAAA 1740  
 TAAACCCCAA AATGAAAAAG ACAGTGGAGG CACCAGGCCT GCCTGGGGCT GGAGGGCTAA 1800  
 TAAGGCCAGG CCTCTTATCT CTGGCCATAG AACCAAGAGAA GTGAGTGGAT GTGATGCCA 1860  
 GCTCCAGAAG TGACTCCAGA ACACCCCTGTT CCAAAGCAGA GGACACACTG ATTTTTTTT 1920  
 TAATAGGCTG CAGGACTTAC TCTTGGTGGG ACGCCCTGCT TTGCGAAGGG AAAGGAGGAG 1980  
 TTTGCCCTGA GCACAGGCC CCACCCCTCCA CTGGGCTTTC CCCAGCTCCC TTGCTTCTT 2040  
 ATCACGGTAG TGGCCCCAGTC CCTGGCCCT GACTCCAGAA GGTGGCCCTC CTGGAAACCC 2100  
 AGGTCTGCA GTCAACGATG TACTGCCCG GACACGGATG TCTGCTGCAC TCCATCCCTC 2160  
 CCCTGTTCAT TTGTCTTCA TGCCCGTCTG GAGTAGATGC TTTTGCAGA GGTGGCACCC 2220  
 TGTAAGCTC TCCGTCTGA CTTTTTTTT TTTTTAGAC TGAGTTTGC TCTTGTGCC 2280  
 TAGGCTGGAG TGCATGGCA CAATCTCAGC TCACTGCACC CTCTGCCTCC CGGGTCAAG 2340  
 CGATTCTCCT GCCTCAGCCT CCCGAGTAGT TGGGATTACA GGCACTGCACC ACCACGCCA 2400  
 GCTAATTTTT GTATTTTAG TAGAGACAAG GTTTCACCGT GATGGCCAGG CTGGTCTGA 2460  
 ACTCCAGGAC TCAAGTGTATG CTCCCTGCTA GCCCTCTAA AGTGTGGGA TTACAGGGGT 2520  
 GAGCCACTGC ACCCGGGCCTG CACGCCCTCT TTGAAAGCAG TCGAGGGGGC GCTAGGTGTG 2580  
 GGCAGGGACG AGCTGGCGCG GCGTCGCTGG GTGCACCGCG ACCACGGGCA GAGCCACGCC 2640  
 GCGGGGAGAC TACAACCTCC GGCACACCCC GCGCCCCCCC GCCTCTACTC CCAGAAGGCC 2700  
 GCGGGGGGTG GACCGCTAA GAGGGCGTGC GCTCCCGACA TGCCCCGCGG CGCGCCATTA 2760  
 ACCGCCAGAT TTGAATCGCG GGACCCGTTG GCAGAGGTGG CGCGGGCGGC ATGGGTGCC 2820  
 CGACGTTGCC CCCTGCCTGG CAGCCCTTTC TCAAGGACCA CGGCATCTCT ACATTCAAGA 2880

ACTGGCCCTT	CTTGGAGGGC	TGCGCCTGCA	CCCCGGAGCG	GGTGAGACTG	CCCGGCCTCC	2940
TGGGGTCCCC	CACGCCCGCC	TTGCCCCTGTC	CCTAGCGAGG	CCACTGTGAC	TGGGCCTCGG	3000
GGGTACAAGC	CGCCCTCCCC	TCCCCGTCT	GTCCCCAGCG	AGGCCACTGT	GGCTGGGCC	3060
CTTGGGTCCA	GGCCGGGCTC	CCCTCCCTGC	TTTGTCCCCA	TCGAGGCCTT	TGTGGCTGGG	3120
CCTCGGGGTT	CCGGGCTGCC	ACGTCCACTC	ACGAGCTGTG	CTGTCCCTTG	CAGATGGCCG	3180
AGGCTGGCTT	CATCCACTGC	CCCACGTGAGA	ACGAGCCAGA	CTTGGCCCAG	TGTTTCTTCT	3240
GCTTCAAGGA	GCTGGAAGGC	TGGGAGCCAG	ATGACGACCC	CATGTAAGTC	TTCTCTGGCC	3300
AGCCTCGATG	GGCTTTGTTT	TGAACGTAGT	TGTCAAAAGA	TTTGAGTTGC	AAAGACACTT	3360
AGTATGGGAG	GGTTGCTTTC	CACCCCTCATT	GCTTCTTAAA	CAGCTGTTGT	GAACGGATAC	3420
CTCTCTATAT	GCTGGTGCCT	TGGTGTGATGCT	TACAACCTAA	TAAATCTCA	TTGACCAAA	3480
ATGCCTTGGG	GTGGACGTA	GATGCCTGAT	GCCTTTCATG	TTCAACAGAA	TACATCAGCA	3540
GACCCCTGTTG	TTGTGAACCTC	CCAGGAATGT	CCAAGTGTCT	TTTTTGAGAT	TTTTAAAAAA	3600
ACAGTTTAAT	TGAAATATAA	CCTACACAGC	ACAAAAAATTA	CCCTTGAAA	GTGTGCACCT	3660
CACACTTCG	GAGGCTGAGG	CGGGCGGATC	ACCTGAGGTC	AGGAGTTCAA	GACCTGCCTG	3720
GCCAACCTGG	CGAAACCCCC	TCTCTACTAA	AAATACAAAA	ATTAGCCGGG	CATGGTAGCG	3780
CACGCCCGTA	ATCCCAGCTA	CTCGGGAGGC	TAAGGCAGGA	GAATCGCTTG	AACCTGGGAG	3840
CGGGAGGTTG	CAGTGAGCCG	AGATTGTGCC	AATGCACTCC	AGCCTCGCG	ACAGAGCGAG	3900
ACTCCGTAT	AAAAATAAAA	AATTGAAAAA	AAAAAAAGAA	AGAAAGCATA	TACTTCAGTG	3960
TTGTTCTGGA	TTTTTTCTT	CAAGATGCCT	AGTTAATGAC	AATGAAATTC	TGTACTCGGA	4020
TGGTATCTGT	CTTTCCACAC	TGTAATGCCA	TATTCTTTTC	TCACCTTTT	TTCTGTCGGA	4080
TTCAGTTGCT	TCCACAGCTT	TAATTTTTT	CCCCCTGGAGA	ATCACCCAG	TTGTTTTCT	4140
TTTGGCCAG	AAGAGAGTAG	CTGTTTTTT	TCTTAGTATG	TTGCTATGG	TGTTTATACT	4200
GCATCCCCGT	AATCACTGGG	AAAAGATCG	TGGTATTCTT	CTTGAAAATG	ATAAAGTGT	4260
ATGATATTTT	CAGATTAGAG	TTACAACCTGG	CTGTCTTTT	GGACTTTGTG	TGGCCATGTT	4320
TTCATTGTA	TGCACTCTG	GTAACGGTGA	TAGTCAGTTA	TACAGGGAGA	CTCCCCCTAGC	4380
AGAAAATGAG	AGTGTGAGCT	AGGGGGTCCC	TTGGGGAACC	CGGGGCAATA	ATGCCCTTCT	4440
CTGCCCTTAA	TCCTTACAGT	GGGCCGGCA	CGGTGGCTTA	CGCCTGTAA	ACCAGCACTT	4500
TGGGAGGCCG	AGGCCGGCCG	ATCACGAGGT	CAGGAGATCG	AGACCATCTT	GGCTAATACG	4560
GTGAAACCCCC	GTCTCCACTA	AAAATACAAA	AAATTAGCCG	GGCGTGGTGG	TGGGCGCCTG	4620
TAGTCCCAGC	TACTCGGGAG	GCTGAGGCAG	GAGAATGGCG	TGAACCCAGG	AGGCAGGAGCT	4680

TGCAGTGAGC CGAGATTGCA CCACTGCACT CCAGCCTGGG CGACAGAATG AGACTCCGTC	4740
TCAAAAAAAA AAAAAAAAGA AAAAAATCTT TACAGTGGAT TACATAACAA TTCCAGTGA	4800
ATGAAATTAC TCACAAACAGT TCCCTTGAGAA TGTTGGAGGG ATTTGACATG TAATTCCCTT	4860
GGACATATAC CATGTAACAC TTTTCCAAC T ATTGCTAACG GAAGTCCAGA TAAAATAGAT	4920
ACATTAGCCA CACAGATGTG GGGGGAGATG TCCACAGGGAGAGAAGGGT GCTAAGAGGT	4980
GCCATATGGG AATGTGGCTT GGGCAAAGCA CTGATGCCAT CAACTTAGA CTTGACCGTCT	5040
TACTCCTGAG GCAGAGCAGG GTGTGCCTGT GGAGGGCGTG GGGGGTGGC CCGTGGGGAG	5100
TGGACTGCCG CTTTAATCCC TTCAGCTGCC TTTCCGCTGT TGTTTGATT TTTCTAGAGA	5160
GGAACATAAA AAGCATTGCTT CCGGTTGCCG TTTCTTCT GTCAAGAACG AGTTTGAAGA	5220
ATTAACCCCTT GGTGAATTT TGAAACTGGA CAGAGAAAGA GCCAAGAACAA AATTGTATG	5280
TATTGGGAAT AAGAACTGCTT CAAACCCGTG TCAATGTCTT TAGCACTAAA CTACCTAGTC	5340
CCTCAAAGGG ACTCTGTGTT TTCCCTCAGGA AGCATTTTTT TTTTTTCTT GAGATAGAGT	5400
TTCACTCTTG TTGCCAGGC TGGAGTGAA TGGTGAATC TTGGCTCACT GCAACCTCTG	5460
CCTCTGGGT TCAAGTGATT CTCCCTGCC AGCCTCCCAA GTAAGGGAA TTACAGGGAA	5520
GTGCCACCAC ACCCAGCTAA TTTTGTATT TTTAGTAGAG ATGGGGTTTC ACCACATTG	5580
CCAGGCTGGT CTTGAACTCC TGACCTCGTG ATTGCCAAC CTTGGCTCC CAAAGTGTG	5640
GGATTACAGG CGTGAACACC CACGCCCTGGC TTTTTTTTT TTGTTCTGAG ACACAGTTTC	5700
ACTCTGTAC CCAGGCTGGA GTAGGGTGGC CTGATCTCGG ATCACTGCAA CCTCCGCCCTC	5760
CTGGGCTCAA TGAGATTGCC TGCTTCAGCC TCCCAGTAG CCGAGATTAC AGGCATGTG	5820
CACCAACCCC AGGTAAATTT TGTTTTTG GTAGAGACGA GGTTCACCA TGTTGCCAG	5880
GCTGGTTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CCACCCGCT CAGCCTCCCA AAGTGTGAG	5940
ATTATAGGTG TGAGCCACCA CACCTGGCCT CAGGAAGTAT TTTTATTTT AAATTTATT	6000
ATTTATTTGA GATGGAGTCT TGCTCTGTGG CCCAGGCTAG AGTGCAGCGA CGGGATCTCG	6060
GCTCACTGCA AGCTCCGCC CCCAGGTTCA AGCCATTCTC CTGCCTCAGC CTCCCGAGTA	6120
GCTGGGACTA CAGGCAGCCCG CCACACACC CGGCTAATTT TTTGTATTT TTAGTAGAGA	6180
CGGGTTTCA CGTGTGTTAGC CAGGAGGGTC TTGATCTCTT GACCTCGTGA TCTGCCTGCC	6240
TCGGCCTCCC AAAGTGTGCTGG GATTACAGGT GTGAGGCCACC ACACCCGGCT ATTTTATTT	6300
TTTTGAGACA GGGACTCACT CTGTCACCTG GGCTGCAGTG CAGTGGTACA CCATAGCTCA	6360
CTGCAGCCTC GAACTCCTGA GCTCAAGTGA TCCCTCCACC TCATCCTCAC AAGTAATTGG	6420
GACTACAGGT GCACCCACCC ATGCCACCT AATTTATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT	6480
CATAGAGATG AGGGTTCCCT GTGTTGTCCA GGCTGGTCTT GAACTCCTGA GCTCACGGGA	6540

TCCCTTGCC	TGGGCCTCCC	AAAGTGCTGA	GATTACAGGC	ATGAGCCACC	GTGCCAGCT	6600
AGGAATCATT	TTAACGCC	CTAGGATGTC	TGTGTGATT	AAAGCTCCT	GGAGTGTGGC	6660
CGGTATAAGT	ATATACCGGT	ATAAGTAAAT	CCCACATTT	GTGTCAGTAT	TTACTAGAAA	6720
CTTAGTCATT	TATCTGAAGT	TGAAATGTAA	CTGGGCTTTA	TTTATTTATT	TATTTATTAA	6780
TTTATTTTA	ATTTTTTTT	TTGAGACAG	TCTCACTTG	TCACCCAGGC	TGGAGTGCAG	6840
TGGCACGATC	TCGGCTCACT	GCAACCTCTG	CCTCCGGGG	TCAAGCGATT	CTCCCTGCCCT	6900
AGCCTCCCGA	GTAGCTGGGA	CTACAGGCAC	GCACCAACCAT	GCCTGGCTAA	TTTTGTATT	6960
TTTAGTAGAC	GGGGTTTCAC	CATGCTGGCC	AAGCTGGTCT	CAAACCTCTG	ACCTTGTGAT	7020
CTGCCCGCTT	TAGCCTCCA	GAGTGCTGGG	ATTACAGGCA	TGAGCCACCA	TGCGTGGTCT	7080
TTTAAATT	TTTGATTTT	TTTTTTTTT	GAGACAGAGC	CTTGCTCTGT	CGCCCAGGCT	7140
GGAGTGCAGT	GGCACGATCT	CAGCTCACTA	CAAGCTCCGC	CTCCCGGGTT	CACGCCATTC	7200
TTCTGCCTCA	GCCTCCTGAG	TAGCTGGAC	TACAGGTGCC	CACCAACAGC	CCTGGCTAAT	7260
TTTTTTGGT	ATTTTATTA	GAGACAAGGT	TTCATCATGT	TGGCCAGGCT	GGTCTCAAAC	7320
TCCTGACCTC	AAGTGTACTG	CCTGCCCTGG	CCTCCCAAAG	CGCTGAGATT	ACAGGTGTGA	7380
TCTACTGCGC	CAGGCCCTGGG	CGTCATATAT	TCTTATTGTC	TAAGTCTGGC	AGCCCCACAC	7440
AGAATAAGTA	CTGGGGGATT	CCATATCCTT	GTAGCAAAGC	CCTGGGTGGA	GAGTCAGGAG	7500
ATGTTGTAGT	TCTGCTCTG	CCACTTGCA	ACTTTGAGTT	TAAGCCAGTC	GTGCTCATGC	7560
TTCCCTTGCT	AAATAGAGGT	TAGACCCCT	ATCCCATGGT	TTCTCAGGTT	GCTTTTCAGC	7620
TTGAAAATTG	TATTCCTTG	TAGAGATCAG	CGTAAAATAA	TTCTGCTTT	ATATGTGGCT	7680
TTATTTAAAT	TTGAGACAGA	GTGTCACTCA	GTGCCCCAGG	CTGGAGTGTG	GTGGTGCAG	7740
CTTGGCTCAC	TGGCACCTCC	ACCTCCCAGG	TTCAAGCGAT	TCTCGTGCCT	CAGGCTCCCA	7800
AGTAGCTGAG	ATTATAAGTG	TGTGCCACCA	GGCCAGCTA	ACTTTGTAT	TTTAGTAGA	7860
GACAGGGTTT	TGCCATGTTG	GCTAAGCTGG	TCTCGAACTC	CTGGCCTCAA	GTGATCTGCC	7920
CGCCTTGGCA	TCCCAAAGTG	CTGGGATTAC	AGGTGTGAAC	CACCAACCT	GGCCTCAATA	7980
TAGTGGCTTT	TAAGTGCTAA	GGACTGAGAT	TGTGTTTGT	CAGGAAGAGG	CCAGTTGTGG	8040
GTGAAGCATG	CTGTGAGAGA	GCTTGTCA	TGGTGAGGT	TGTGGGAGCT	GCAGCGTGGG	8100
AACTGGAAAG	TGGGCTGGGG	ATCATCTTT	TCCAGGTCA	GGGTCAGCCA	GCTTTCTGC	8160
AGCGTGCCAT	AGACCATCTC	TTAGCCCTCG	TGGGTCAAGAG	TCTCTGTG	ATATTGTCTT	8220
TTGTTGTTT	TCACAACCTT	TTAGAAACAT	AAAAAGCATT	CTTAGCCCGT	GGGCTGGACA	8280
AAAAAAAGGCC	ATGACGGGCT	GTATGGATT	GGCCCAGCAG	GCCCTTGCTT	GCCAAGCCCT	8340

GTTTTAGACA AGGAGCAGCT TGTGTGCCTG GAACCACAT CAT GGGCACAGGG GAGGAGCAGA	8400
GTGGATGTGG AGGTGTGAGC TGGAACCAAG GTCCCAGAGC GCTGAGAAAG ACAGAGGGTT	8460
TTTGCCTTG CAAGTAGAGC AACTGAAATC TGACACCATC CAGTCCAGA AAGCCCTGAA	8520
GTGCTGGTGG ACGCTGCCGG GTGCTCCGCT CTAGGGTTAC AGGGATGAAG ATGCAGTCTG	8580
GTAGGGGGAG TCCACTCACC TGTTGGAAGA TGTGATTAAG AAAAGTAGAC TTTCAGGGCC	8640
GGGCATGGTG GCTCACGCCT GTAATCCCAG CACTTTGGGA GGCGGAGGCG GGTGGATCAC	8700
GAGGTCAAGA GATCGAGAAC ATCCCTGGCTA ACATGGTGAAC ACCCCGTTT TACTAAAAAT	8760
ACAAAAAAATT AGCTGGCGT GGTGGCGGGC GCCTGTAGTC CCAGCTACTC GGGAGGCTGA	8820
GGCAGGAGAA TGGCGTGAAC CTGGGAGGTG GAGCTTGCTG TGAGCCGAGA TCGCGCCACT	8880
GCACACTCCAGC CTGGCGACAA GAGCGAGACT CCGTCTCAA AAAAAGAAAAAA AAAGTAGGCT	8940
TTCATGATGT GTGAGCTGAA GGCGCAGTAG GCAGAAGTAG AGGCCTCAGT CCCTGCAGGA	9000
GACCCCTCGG TCTCTATCTC CTGATAGTC GACCCAGCCA CACTGGAAAG AGGGGAGACA	9060
TTACAGCCTG CGAGAAAAGT AGGGAGATT AAAAAGTGT TGGCTTTAT TTGAACTGT	9120
TTTTTTGTT TGTTTGTGTT CCCAATTCA GAATACAGAA TACTTTATG GATTGTTTT	9180
TATTACTTTA ATTTGAAAC AATAATATCT TTTTTTGTT GTTTTTGAA GACAGGGTCT	9240
TACTCTGTCA CCCAGGCTGA GTGCAGTGGT GTGATCTGG CTCACCTCAG CCTCGACCCC	9300
CTGGGCTCAA ATGATTCTCC CACCTCAGCT TCCCAAGTAG CTGGGACAC AGGTGCGTGT	9360
GTTGGCCTAT ACAAACTCTG AAGACAAGGA TGCTGTTGCT GGTGATGCTG GGGATTCCCA	9420
AGATCCCAGA TTGATGGCA GGATGCCCT GTCTGCTGCC TTGCCAGGGT CCCAGGAGGG	9480
CGCTGCTGTG GAAGCTGAGG CCCGGCCATC CAGGGCGATG CATTGGGCC TGATTCTGT	9540
TCCTGCTGCT GCCTCGGTGC TTAGCTTTG AAAACATGAA ATAAATTAGA ACCAGTGTGA	9600
AAATCGATCA GGGAAATAAT TTAAATGIGA AATAAACTGA ACAACTTAGT TCTTCATAAG	9660
AGTTTACTTG GTAAATACTT GTGATGAGGA CAAACAGAAG CACTAGAAGG AGAGGCGAGT	9720
TGTAGACCTG GGTGGCAGGA GTGTTTGTGTT TGTTTCTTT GGCAGGGTCT TGCTCTGTTG	9780
CTCAGGCTGG AGTACAGTGG CACAATCACA GCTCACTATA GCCTCGACCT CCTGGACTCA	9840
AGCAATCCTC CTGCGCTAGC CTCCCCAGTAG CTGGGACTAC AGGCGCATGC CACCATGCC	9900
GGCTAATTTT AAATTTTTT TTTCCTCTTT TTGAGATGG AATCTCACTC TGTCGCCAG	9960
GCTGGAGTGC AGTGGCGTGA TCTCGCTGA CGCGAAGCTC CGCCTCCAG GTTCACTCCA	10020
TTCCGCCTGCC TCAGCCTCCC AAGTAGCTGG GACTACAGGC GCTGGGATTAA CAAACCCAAA	10080
CCCCAAAGTGC TGGGATTACA GGCGTGAGCC ACTGCACCCCG GCCTGTTTG TCTTCATAA	10140
GCAAGAGTTG TGTTTGCTTC GCCCCTACCT TTAGTGGAAA AATGTATAAA ATGGAGATAT	10200

TGACCTCCAC ATTGGGGTGG TAAATTATA GCATGTATGC AAAGG~~G~~CTT CCCTAATTAA 10260  
 AGGCTTTTT GAAAGAGAAG AACTGAATA ATCCATGTGT GTATA~~T~~AT TTTAAAGCC 10320  
 ATGGTCATCT TTCCATATCA GTAAAGCTGA GGCTCCCTGG GACTGCAGAG TTGTCCATCA 10380  
 CAGTCCATTA TAAGTGCCTG GCTGGCCAG GTGCAGTGGC TTGTGCCTGA ATCCCAGCAC 10440  
 TTTGGGAGGC CAAGGCAGGA GGATTCAATTG AGCCCAGGAG TTTGAGGCG ACCCTGGGCA 10500  
 ATGTGGCCAG ACCTCATCTC TCACAAAAAT ACACAAAAAA TTAGCCAGGC ATGGTGGCAC 10560  
 GTGCCCTGTAG TCTCAGTAC TCAGGAGGCT GAGGTGGGAG GATCACTTG AGCCTTGCAG 10620  
 GTCAAAGCTG CAGTAAGCCA TGATCTTGCC ACTGCATTCC AGCCTGGATG ACAGAGCGAG 10680  
 ACCCTGTCTC TAAAAAAA AAAAACAAA CGGTGCACTG TTTCTTTT TCTTATCAAT 10740  
 TTATTATTT TAAATTAAAT TTCTTTAA TAATTATAA ATTATAAATT TATATTAAAA 10800  
 AATGACAAAT TTTTATTACT TATACATGAG GTAAACCTTA GGATATATAA AGTACATATT 10860  
 GAAAAGTAAT TTTTGGCTG GCACAGTGGC TCACACCTGT AAACCCAGCA CTTTGGGAGG 10920  
 CCCTGGGGG CAGATCACAT GAGATCATGA GTTCGAGACC AACCTGACCA ACATGGAGAG 10980  
 ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAAATTAG CCGGGGTGGT GGCGCATGCC TGTAATCCCA 11040  
 GCTACTCGGG AGGCTGAGGC AGGAGAATCT CTTGAACCCG GGAGGCAGAG GTTGCAGGTGA 11100  
 GCCAAGATCG TGCCTTGC CACCAAGCTA GGCAACAAAGA GCGAAAGTCC GTCTAAAAA 11160  
 AAAAGTAATT TTTTTAAGT TAACCTCTGT CAGCAAACAA ATTAAACCCA ATAAAGGTCT 11220  
 TTGTTTTTA ATGTAGTAGA GGAGGTTAGGG TTATAAAAAA ATATGGTAGG GAAGGGGGTC 11280  
 CCTGGATTTG CTAATGTAT TGTCATTGG CCCTTAGGAG AGAGCTCTGT TAGCAGAATG 11340  
 AAAAAATTGG AAGCCAGATT CAGGGAGGGC CTGGAAGC AAAGAATTCT GTTGCAGGAA 11400  
 GAGCCTGATG TTTGCCAGGG TCTGTTAAC TGGACATGAA GAGGAAGGCT CTGGACTTC 11460  
 CTCCAGGAGT TTCAGGAGAA AGTAGGGCA GTGGTTAAGA GCAGAGCTCT GCCTAGACTA 11520  
 GCTGGGGTGC CTAGACTAGC TGGGGTGCCTC AGACTAGCTG GGGTGCCTAG ACTAGCTGGG 11580  
 TACTTTGAGT GGCTCCTTCA GCCTGGACCT CGGTTCCCTC ACCTGTATAG TAGAGATATG 11640  
 GGAGCACCCA GCGCAGGATC ACTGTGAACA TAAATCAGTT AATGGAGGAA GCAGGTAGAG 11700  
 TGGTGCTGGG TGCATACCAA GCACTCCGTC AGTGTTCCTT GTTATTCGAT GATTAGGAGG 11760  
 CAGCTTAAAC TAGAGGGAGT TGAGCTGAAT CAGGATGTT GTCCCAGGTA GCTGGGAATC 11820  
 TGCCCTAGCCC AGTCCCCAGT TTATTTAGGT GCTCTCTCAG TGTTCCCTGA TTGTTTTTC 11880  
 CTTTGTATC TTATCTACAG GATGTGACTG GGAAGCTCTG GTTTCAGTGT CATGTGTCTA 11940  
 TTCTTTATTT CCAGGCAAAG GAAACCAACA ATAAGAAGAA AGAATTGAG GAAACTGCGA 12000

AGAAAGTGGCG\_CCGTGCCATG GAGCAGCTGG CTGCCATGGA TTGAGGCCTC TGGCCGGAGC 12060  
 TGCCTGGTCC CAGAGTGGGC GCACCACTTC CAGGGTTAT TCCTCTGGTC CACAGCCTT 12120  
 CCTGTGGGCC CCTTAGCAAT GTCTTAGGAA AGGAGATCAA CATTTCAAA TTAGATGTTT 12180  
 CAACTGTGCT CCTGTTTGT CTTGAAAGTG GCACCAGAGG TGCTTCTGCC TGTGCAGCGG 12240  
 GTGCTGCTGG TAACAGTGGC TGCTCTCTC TCTCTCTC TTTTTGGGG GCTCATTTT 12300  
 GCTGTTTGA TTCCCGGGCT TACCAAGTGA GAAGTGAGGG AGGAAGAAGG CAGTGTCCC 12360  
 TTTGCTAGAG CTGACAGCTT TGTTGCGGTG GGCAGACCTC TCCACAGTGA ATGTGTCTGG 12420  
 ACCTCATGTT GTGAGGCTG TCACAGTCTC GAGTGTGGAC TTGGCAGGTG CCTGTTGAAT 12480  
 CTGAGCTGCA GTTCCCTTAT CTGTCACACC TGTGCCTCTC CAGAGGACAG TTTTTGTT 12540  
 GTTGTGTTT TTTGTTTTT TTTTTGTTA GATGCATGAC TTGTGTGTA TGAGAGAATG 12600  
 GAGACAGAGT CCCTGGCTCC TCTACTGTTT ACAACATGG CTTCTTATT TTGTTGAAT 12660  
 TGTAAATTCA CAGAATAGCA CAAACTACAA TTAAAACCAA GCACAAAGCC ATTCTAACGTC 12720  
 ATTGGGAAA CGGGGTGAAC TTCAGGTGGA TGAGGAGACA GAATAGAGTG ATAGGAAGCG 12780  
 TCTGGCAGAT ACTCCTTTG CCACTGCTGT GTGATTAGAC AGGCCCAGTG AGCCGGGGGG 12840  
 CACATGCTGG CCGCTCCCTC CTCAGAAAAA GGCAGTGGCC TAAATCCTT TAAATGACT 12900  
 TGGCTCGATG CTGTGGGGGA CTGGCTGGGC TGCTGCAGGC CCGTGTGTCG TCAGCCCAAC 12960  
 CTTCACATCT GTCACGTTCT CCACACGGGG GAGAGACGCA GTCCGCCAG GTCCCCGCTT 13020  
 TCTTGGAGG CAGCAGCTCC CGCAGGGCTG AAGTCTGGC TAAGATGATG GATTGATTC 13080  
 GCCCTCCCTC CTGTCATAGA GCTGCAGGGT GGATTGTTAC AGCTTCGCTG GAAACCTCTG 13140  
 GAGGTCACTC CGGCTGTTCC TGAGAAATAA AAAGCCTGTC ATTTCAAACA CTGCTGTGGA 13200  
 CCCTACTGGG TTTTAAAT ATTGTCAGTT TTTCATGTC GTCCTAGCC TGCCAACAGC 13260  
 CATCTGCCCA GACACCCGA GTGAGGATGA GCGTCCTGGC AGAGACGAG TTGTCCTCTGG 13320  
 GCGCTTGCCA GAGCACGAA CCCAGACCT GTTGTATCA TCCGGCTCC TTCCGGGAG 13380  
 AAACAACTGA AAATGCACTT CAGACCCACT TATTTATGCC ACATCTGAGT CGGCCTGAGA 13440  
 TAGACTTTTC CCTCTAAACT GGGAGAAAT CACAGTGGTT TTTGTTAGCA GAAAATGCAC 13500  
 TCCAGCCCTCT GTAACATCTT AAGCTGCTTA TTTTGATAT TTGTGTCACT CTGAAATGG 13560  
 ATACTTCACT TTAATAACTG TTGCTTAGTA ATTGGCTTG TAGAGAAGCT GGAAAAAAAT 13620  
 GGTTTTGCTC TCAACTCCCT TGCTGCCAG GCGGTGATGT GGATCTCGGC TTCTGTGAGC 13680  
 CTGTCGTGTC GGCAGGGCTG AGCTGGAGCC GCCCCCTCTCA GCCCCGCCCTGC CACGGCCTTT 13740  
 CCTTAAAGGC CATCCTTAAA ACCAGACCCCT CATGGCTGCC AGCACCTGAA AGCTTCCCTCG 13800  
 ACATCTGTTA ATAAAGCCGT AGGCCCTGTG CTAAGCGAA CGGCCTAGAC TTTCTTCAG 13860  
 ATACATGTCC ACATGTCCAT TTTTCAGGTT CTCTAAAGTTG GAGTGGAGTC TGGGAAGGGT 13920  
 TGTGAATGAG GCTTCTGGGC TATGGGTGAG GTTCAATGG CAGGTTAGAG CCCCTCGGGC 13980  
 CAAACTGCCAT CCTGGAAAGT AGAGACAGCA GTGCCCGCTG CCCAGAAGAG ACCAGCAAGC 14040  
 CAAACTGGAG CCCCCATTGC AGGCTGTCGC CATGTGGAAA GAGTAACCTCA CAATTGCCAA 14100  
 TAAAGTCTCA TGTGGTTTA TCTACTTTT TTTCTTTT CTTTTTTT GAGACAAGGC 14160  
 CTTGCCCTCC CAGGCTGGAG TGCACTGGAA TGACCAACAGC TCACCGCAAC CTCAAATTCT 14220  
 TGCCTTCAG TGAAACCTCCC ACTTTAGCCT CCCAAGTAGC TGGGACTACA GGCGCACGCC 14280  
 ATCACACCCG GCTAATTGAA AAATTTTTT TTTGTTTAG ATGGAATCTC ACTTTGTTGC 14340  
 CCAGGCTGGT CTCAAACCTCC TGGGCTCAAG TGATCATCCT GCTTCAGGCT CCGACTTGTG 14400  
 GGTATTATAG GCGTGAGCCA CTGGGCTGA CCTAGCTACC ATTTTTTAAT GCAGAAATGAA 14460  
 AGACTTGTAG AAATGAAATA ACTTGCTCAG GATAGTCGAA TAAGTAACCTT TTAGAGCTGG 14520  
 GATTGAAACC CAGGCAATCT GGCTCCAGAG CTGGGCCCTC ACTGCTGAAG GACACTGTCA 14580  
 GCTTGGGAGG GTGGCTATGG TCGGCTGTCT GATTCTAGGG ACTGAGGGCT GTCTTTAAAG 14640  
 CACCCCATTC CATTTCAGA CAGCTTGTC AGAAAGGCTG TCATATGGAG CTGACACCTG 14700  
 CCTCCCCAAG GCTTCCATAG ATCCTCTCTG TACATTGTA CTTTTTATTT TGAAATGAAA 14760  
 ATTACACAGGA AGTTGTAAGG CTAGTACAGG GGATCC 14796

(57) 청구의 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.

서열 EGWEPDDPIEEHKKHSSGC 및 이의 보존적으로 치환된 동족체를 포함하는 폴리펩티드.

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.

SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 인코드하는 분리된 핵산 분자.

청구항 62.

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275, 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12041이 연속적으로 신장되어진 것을 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 63.

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275, 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12044가 연속적으로 신장되어진 것을 포함하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 64.**

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275 및 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12041로 이루어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 65.**

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275 및 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12044로 이루어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 66.**

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 설바이빈 오플리딩 프레임을 포함하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 67.**

제 61 항에 있어서, SEQ ID NO: 35의 설바이빈 오플리딩 프레임으로 이루어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 68.**

SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275 및 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12041로 이루어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 69.**

SEQ ID NO: 35의 뉴클레오티드 2811-2921, 이 뉴클레오티드 2811-2921에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 3174-3283, 이 뉴클레오티드 3174-3283에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 5158-5275 및 이 뉴클레오티드 5158-5275에 직접 부착되어진 뉴클레오티드 11955-12044로 이루어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 70.**

제 61 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 71.**

제 70 항의 벡터를 함유하도록 감염되어진 숙주 세포.

**청구항 72.**

제 61 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산이 DNA 또는 상보 DNA(cDNA)인 분리된 핵산 분자.

### 청구항 73.

제 71 항에 있어서, 원핵 숙주 세포 및 진핵 숙주 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 숙주 세포.

### 청구항 74.

제 73 항에 따른 숙주 세포를 설바이빈 단백질이 발현되는 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는 포유류 설바이빈 단백질의 제조방법.

### 청구항 75.

제 61 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서, 프레임내에 융합 짹의 핵산 서열을 융합시키는 분리된 핵산 분자.

### 청구항 76.

제 61 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 발현 조절요소에 작동가능하도록 연결되어진 분리된 핵산 분자.

### 청구항 77.

제 76 항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

### 청구항 78.

제 77 항의 벡터를 함유하도록 감염되어진 숙주 세포.

### 청구항 79.

제 78 항에 있어서, 원핵 숙주 세포 및 진핵 숙주 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 숙주 세포.

### 청구항 80.

제 79 항의 숙주 세포를 설바이빈 융합 단백질이 발현되는 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는 설바이빈 융합 단백질의 제조방법.

### 청구항 81.

SEQ ID NO:34를 포함하는 설바이빈 단백질의 단일 BIR 및  $\beta$ COOH 코일드-코일 영역을 포함하는 폴리펩티드를 인코드하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 82.**

삭제

**청구항 83.**

삭제

**청구항 84.**

제 81 항에 있어서, 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어지는 분리된 핵산 분자.

**청구항 85.**

제 84 항의 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 86.**

제 85 항의 벡터를 함유하도록 감염되어진 숙주 세포.

**청구항 87.**

제 86 항에 있어서, 원핵 숙주 세포 및 진핵 숙주 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 숙주 세포.

**청구항 88.**

제 87 항의 숙주 세포를 설바이빈 단백질 단편이 발현되는 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는 설바이빈 단백질 단편의 제조방법.

**청구항 89.**

제 61 항에 있어서, 상기 분리된 핵산 문자가 인간 설바이빈 단백질을 인코드하는 분리된 핵산 문자.

**청구항 90.**

제 61 항의 분리된 핵산 문자에 의해 인코드된 IAP 족의 분리된 포유류 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 단일 BIR 및  $\beta$ -COOH 코일드-코일 영역을 포함하고, SDS PAGE에 의해 측정되어질 때 16.5 KDa의 문자량을 가지고 또한 아폽토시스를 저해하는 IAP 족의 분리된 포유류 폴리펩티드.

**청구항 91.**

제 90 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 인간 폴리펩티드인 제 61 항의 분리된 핵산 문자에 의해 인코드된 IAP 족의 분리된 포유류 폴리펩티드.

**청구항 92.**

제 90 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 SEQ ID NO:34에 나타내어진 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 제 61 항의 분리된 핵산 분자에 의해 인코드된 IAP 족의 분리된 포유류 폴리펩티드.

**청구항 93.**

제 90 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 SEQ ID NO:34에 나타내어진 바와 같은 아미노산 서열로 이루어지는 제 61 항의 분리된 핵산 분자에 의해 인코드된 IAP 족의 분리된 포유류 폴리펩티드.

**청구항 94.**

SEQ ID NO:34의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

**청구항 95.**

삭제

**청구항 96.**

삭제

**청구항 97.**

삭제

**청구항 98.**

삭제

**청구항 99.**

삭제

**청구항 100.**

삭제

**청구항 101.**

제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈의 단일 BIR 및  $\beta$ COOH 코일드-코일 영역을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

**청구항 102.**

삭제

**청구항 103.**

삭제

**청구항 104.**

삭제

**청구항 105.**

SEQ ID NO:34에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 치환되어져 SEQ ID NO:34와 다른 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이 폴리펩티드로서, 상기 적어도 하나의 아미노산 잔기가 Pro<sup>26</sup>, Leu<sup>64</sup>, Trp<sup>67</sup>, Pro<sup>73</sup> 및 Cys<sup>84</sup>로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 돌연변이 폴리펩티드.

**청구항 106.**

제 105 항에 있어서, 적어도 하나의 잔기가 Ala으로 치환되어지는 돌연변이 폴리펩티드.

**청구항 107.**

제 18 항, 제 90 항 내지 제 94 항 및 제 101 항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

**청구항 108.**

제 18 항, 제 90 항 내지 제 94 항 및 제 101 항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 및 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 109.**

제 18 항, 제 90 항 내지 제 94 항 및 제 101 항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 110.**

삭제

**청구항 111.**

SEQ ID NO: 34로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어지는 분리된 폴리펩티드.

**청구항 112.**

삭제

**청구항 113.**

SEQ ID NO: 34의 아미노산 서열을 포함하는 설바이빈 폴리펩티드에 결합하는 분리된 항체.

**청구항 114.**

제 113 항에 있어서, 상기 설바이빈 폴리펩티드가 SEQ ID NO: 35에 의해 인코드되는 항체.

**청구항 115.**

삭제

**청구항 116.**

제 113 항 또는 제 114 항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 항체인 항체.

**청구항 117.**

제 116 항에 있어서, 상기 단클론성 항체가 인체에 적응되어진 항체.

**청구항 118.**

제 113 항 또는 제 114 항에 있어서, 상기 항체가 다중클론성 항체인 항체.

**청구항 119.**

삭제

**청구항 120.**

삭제

**청구항 121.**

삭제

**청구항 122.**

삭제

**청구항 123.**

삭제

**청구항 124.**

삭제

**청구항 125.**

삭제

**청구항 126.**

삭제

**청구항 127.**

SEQ ID NO:34를 포함하는 설바이빈 폴리펩티드에 결합하는 단클론성 항체.

**청구항 128.**

삭제

**청구항 129.**

삭제

**청구항 130.**

삭제

**청구항 131.**

삭제

**청구항 132.**

삭제

**청구항 133.**

삭제

**청구항 134.**

설바이번 핵산 분자를 포함하는, 샘플에서 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이번 단백질의 존재를 검출하기 위한 키트.

**청구항 135.**

삭제

**청구항 136.**

제 90 항 내지 제 93 항 및 제 101 항 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질.

**청구항 137.**

제 136 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 IAP 단백질의 C-말단 RING 평거를 더 포함하는 융합 단백질.

**청구항 138.**

SEQ ID NO:34로 이루어지는 폴리펩티드에 결합하는 단클론성 항체.

**청구항 139.**

제 138 항에 있어서, 인체에 적응되어진 단클론성 항체.

**청구항 140.**

제 113 항에 있어서, 항체가 APTLPPAWQPFLKDHRI로 이루어지는 폴리펩티드에 결합하는 항체.

**청구항 141.**

인간 설바이번에 결합하는 분리된 항체로서, 상기 항체는 동물을 APTLPPAWQPFLKDHRI로 이루어지는 설바이번 폴리펩티드로 면역화함으로써 제조되는 분리된 항체.

**청구항 142.**

동물을 APTLPPAWQPFLKDHR로 이루어지는 웨პ티드로 면역화함으로써 제조되는 분리된 항체.

### 청구항 143.

제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈에 결합하는 항체.

### 청구항 144.

제 143 항의 항체의 단편으로서, 상기 단편이 Fab, Fab' 및  $F(ab')_2$ 으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 항체의 단편.

### 청구항 145.

제 113 항, 제 114 항 및 제 140 항 내지 제 143 항 중 어느 한 항의 항체 및 담체를 포함하는 조성물.

### 청구항 146.

제 113 항, 제 114 항 및 제 140 항 내지 제 143 항 중 어느 한 항의 항체를 제조하는 하이브리도마 세포주.

### 청구항 147.

a) 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈, 또는 EGWEPDDPIEEHKHSSGC 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 단일 BIR 및  $\beta$ -COOH 코일드-코일 영역을 포함하는 폴리펩티드 및 결합 짹을 테스트할 물질과 함께 배양하는 단계; 및

b) 상기 물질이 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈의 상기 설바이빈 결합 짹에의 결합을 차단하는지를 결정하는 단계를 포함하는 설바이빈과 설바이빈 결합 짹과의 상호작용을 차단하는 물질을 확인하기 위한 방법.

### 청구항 148.

설바이빈 단백질 또는 설바이빈 핵산이 샘플에 존재하는지를 결정하는 단계를 포함하는 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈 단백질 또는 제 61 항의 설바이빈 핵산의 존재에 대한 분석 방법.

### 청구항 149.

제 148 항에 있어서, 상기 샘플은 조직 생검, 변, 혈액, 오줌 및 침으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 150.

제 148 항에 있어서,

a) 상기 샘플에서 세포의 추출물을 준비하는 단계; 및

b) 상기 세포의 추출물에서 단백질을 검사하여 설바이빈 단백질의 존재를 결정하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 151.

제 148 항에 있어서,

- a) 상기 샘플에서 세포의 추출물을 준비하는 단계; 및
- b) 상기 세포의 추출물에서 mRNA를 검사하여 mRNA를 인코드하는 설바이빈의 존재를 결정하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 152.

제 148 항에 있어서, 상기 방법이 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈 단백질의 발현 수준을 종양 생장 가능성을 나타내는 기준 샘플과 서로 관련시킴으로써 종양 세포의 생장 가능성을 결정하는데 사용되어지는 방법.

### 청구항 153.

샘플을 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈을 인식하고 이에 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; 및

상기 샘플에서 항체가 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈을 인식하고 이에 결합하는지를 결정하고 설바이빈의 존재는 암이 존재한다는 것을 예측하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 154.

제 153 항에 있어서, 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈의 존재가 말기 종양성 질병(neoplastic disease)을 예측하는 방법.

### 청구항 155.

아폽토시스를 감소시키는데 효과적인 제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈의 양을 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 배양물에서 세포의 생장을 보존하기 위한 방법.

### 청구항 156.

제 61 항의 핵산 분자에 의해 인코드되는 설바이빈에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 샘플에서 설바이빈의 존재를 검출하기 위한 키트.

### 청구항 157.

샘플에 있는 설바이빈의 존재를 결정하기 위해서 제 61 항의 설바이빈 핵산 분자를 샘플과 접촉하는 단계를 포함하고, 샘플에서의 설바이빈의 존재는 암의 존재를 예측하는 암을 검출하거나 모니터링하는 방법.

### 청구항 158.

SEQ ID NO: 34를 포함하는 설바이빈을 결합하는 물질을 샘플과 접촉시켜 샘플에서 설바이빈을 검출하는 단계를 포함하는 샘플에서 설바이빈을 검출하는 방법.

### 청구항 159.

제 61 항의 설바이빈 핵산을 결합하는 적어도 하나의 핵산을 샘플과 접촉시켜 샘플에서 설바이빈을 검출하는 단계를 포함하는 샘플에서 설바이빈 핵산을 검출하는 방법.

### 청구항 160.

제 61 항의 설바이빈 핵산을 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 프라이머를 설바이빈 핵산과 증폭시켜 샘플에서 설바이빈을 검출하는 단계를 포함하는 샘플에서 설바이빈 핵산을 검출하는 방법.

### 청구항 161.

제 157 항 내지 제 160 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플이 생물학적 유체를 포함하는 방법.

### 청구항 162.

제 161 항에 있어서, 상기 생물학적 유체가 오줌인 방법.

### 청구항 163.

제 158 항에 있어서, 상기 물질이 항체인 방법.

### 청구항 164.

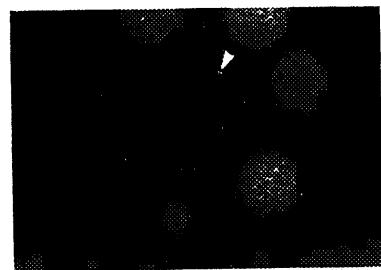
제 163 항에 있어서, 상기 물질이 단클론성 항체인 방법.

### 청구항 165.

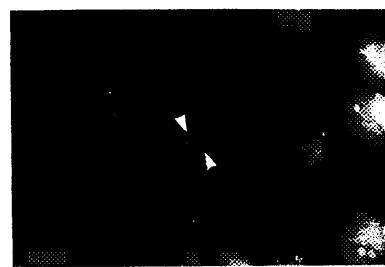
제 159 항에 있어서, 상기 핵산이 프로브 또는 프라이머인 방법.

도면

도면1a



도면1b



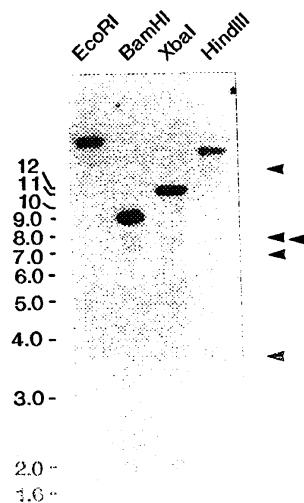
도면1c



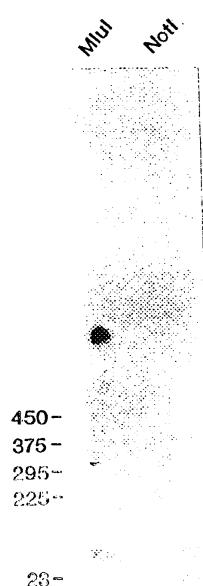
도면1d

5' Exon	Intron	3' Exon
(2918) GCGG   GTGAG -----	(3161) CTGTCCCTTGAG   ATGGC	
(3280) CCAT   GTAAG -----	(5145) TTGATTTTCTAG   AGAGG	
(5272) AATT   GTATG -----	(11942) TCTTATITCCAG   GCAAA	

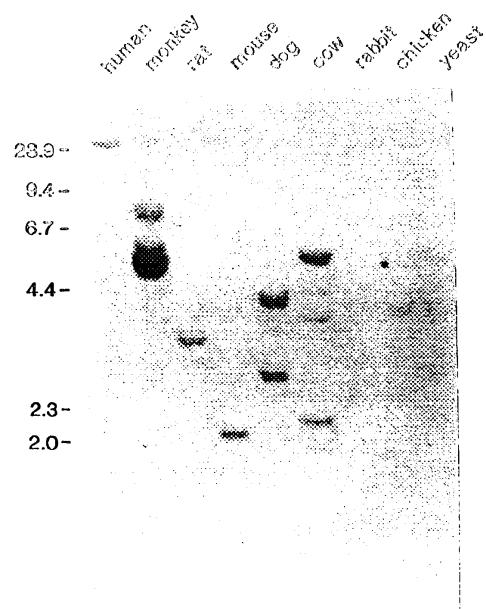
도면2a



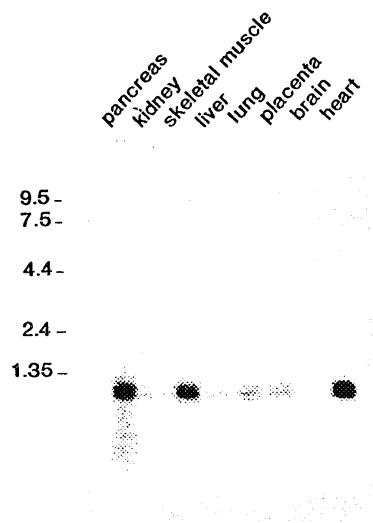
도면2b



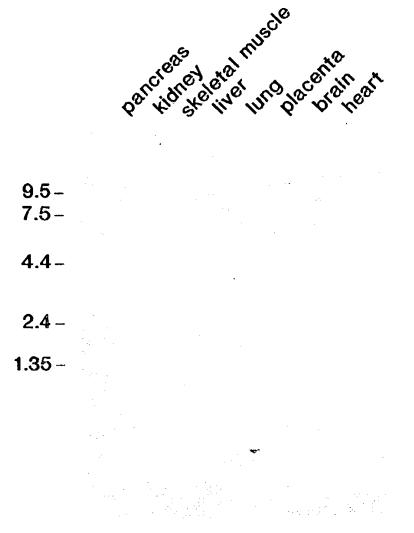
도면2c



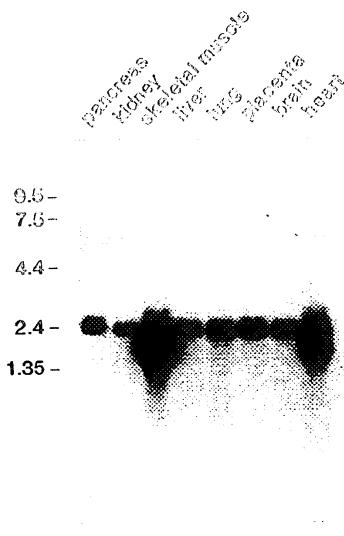
도면3a



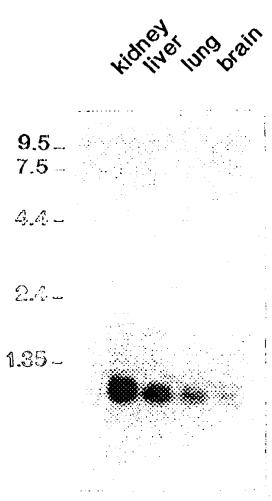
도면3b



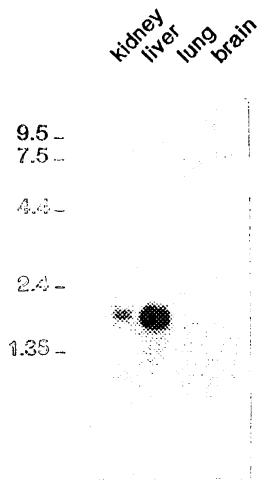
도면3c



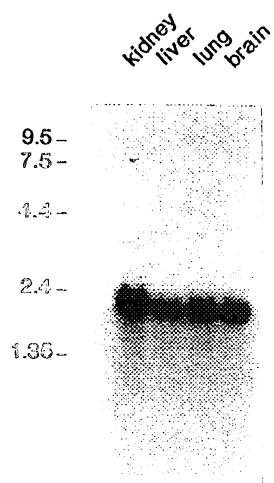
도면3d



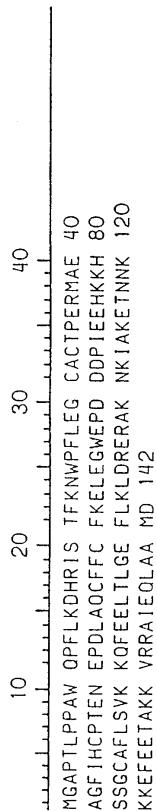
도면3e



도면3f



도면4a

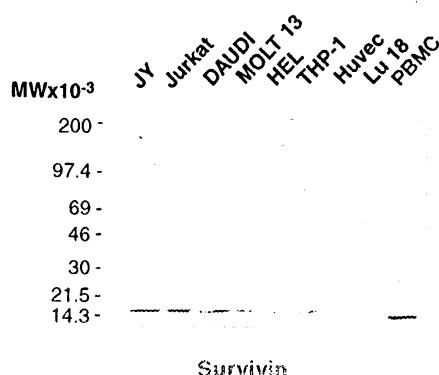


## 도면4b-1

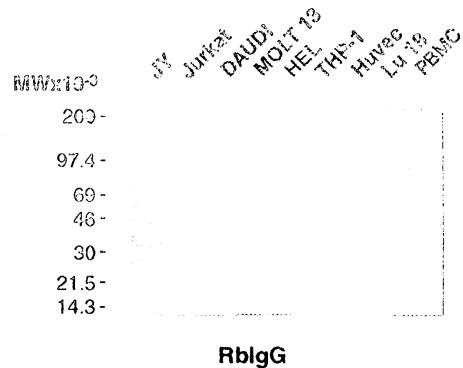
	EARLVITFQNWPD-AFL---TPOELAKAGFYYLGRGDOVQCACGGKLA	Majority
210		250
220		
230		
240		
177 113 7 18 159 113 163 163 163 169 184 163 113 15	<b>E</b> EARLF <b>L</b> TYSN <b>M</b> -LSEL----S <b>P</b> AEL <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> GR <b>D</b> Q <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> GG <b>K</b> LA <b>E</b> ANR <b>I</b> TV <b>T</b> E <b>K</b> D <b>M</b> N-P <b>N</b> I----TPOAL <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LN <b>R</b> IL <b>H</b> JK <b>C</b> U <b>M</b> N <b>G</b> V <b>I</b> A <b>E</b> EV <b>R</b> IN <b>T</b> E <b>K</b> M <b>P</b> V-S <b>F</b> I----S <b>P</b> E <b>T</b> MA <b>N</b> AG <b>F</b> Y <b>Y</b> LC <b>R</b> S <b>D</b> E <b>R</b> CA <b>F</b> CK <b>V</b> E <b>I</b> M <b>K</b> A <b>R</b> I <b>C</b> ITY <b>T</b> N <b>M</b> P <b>V</b> -Q <b>F</b> L----E <b>P</b> S <b>R</b> MA <b>S</b> AG <b>F</b> Y <b>Y</b> LC <b>R</b> G <b>D</b> E <b>R</b> CA <b>F</b> CK <b>V</b> E <b>I</b> T <b>F</b> EAR <b>A</b> SE <b>R</b> M <b>B</b> E <b>K</b> V <b>O</b> C <b>S</b> PC <b>Y</b> ----I <b>S</b> E <b>A</b> GE <b>V</b> E <b>Z</b> Y <b>Y</b> LC <b>R</b> G <b>D</b> E <b>R</b> CA <b>F</b> CK <b>V</b> E <b>I</b> S <b>F</b> ANR <b>I</b> TV <b>T</b> E <b>K</b> D <b>M</b> N-P <b>N</b> I----TPOAL <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LN <b>R</b> IL <b>H</b> JK <b>C</b> U <b>M</b> N <b>G</b> V <b>I</b> A <b>F</b> EAR <b>A</b> SE <b>R</b> M <b>B</b> E <b>K</b> V <b>O</b> C <b>S</b> PC <b>Y</b> ----T <b>P</b> RE <b>A</b> S <b>A</b> G <b>L</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> DO <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> KK <b>I</b> K <b>F</b> EAR <b>A</b> SE <b>R</b> M <b>B</b> E <b>K</b> V <b>O</b> C <b>S</b> PC <b>Y</b> ----T <b>P</b> RE <b>A</b> S <b>A</b> G <b>L</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> DO <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> KK <b>I</b> E <b>F</b> ANR <b>I</b> TV <b>T</b> E <b>K</b> D <b>M</b> N-P <b>N</b> I----SPTD <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> DO <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> KK <b>I</b> S <b>F</b> EAR <b>A</b> SE <b>R</b> M <b>B</b> E <b>K</b> V <b>O</b> C <b>S</b> PC <b>Y</b> ----S <b>P</b> SE <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> DO <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> KK <b>I</b> S <b>F</b> EAR <b>A</b> SE <b>R</b> M <b>B</b> E <b>K</b> V <b>O</b> C <b>S</b> PC <b>Y</b> ----T <b>P</b> RE <b>A</b> S <b>A</b> G <b>L</b> Y <b>Y</b> LG <b>G</b> DO <b>V</b> Q <b>C</b> AC <b>G</b> KK <b>I</b> K <b>F</b> ANR <b>I</b> TV <b>T</b> E <b>K</b> D <b>M</b> N-P <b>N</b> I----TPOAL <b>A</b> RAG <b>F</b> Y <b>Y</b> LN <b>R</b> IL <b>H</b> JK <b>C</b> U <b>M</b> N <b>G</b> V <b>I</b> A <b>K</b> D <b>H</b> R <b>I</b> S <b>T</b> E <b>K</b> M <b>P</b> F-L <b>E</b> Q-C <b>A</b> CT <b>P</b> ER <b>M</b> A <b>E</b> G <b>H</b> I-----HC-----H <b>C</b> ----- 	<b>L</b> 49433 . PRO <b>L</b> 49441 . PRO <b>P</b> 41436 . PRO <b>P</b> 41437 . PRO <b>U</b> 19251 . PRO <b>U</b> 32373 . PRO <b>U</b> 32974 . PRO <b>U</b> 36842 . PRO <b>U</b> 45878 . PRO <b>U</b> 45879 . PRO <b>U</b> 45880 . PRO <b>U</b> 45881 . PRO <b>SURVIVIN . PRO</b>

### 도면4b-2

도면 4c-1

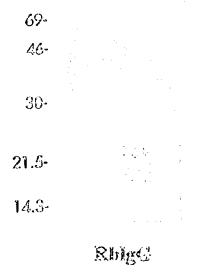


## 도면4c-2



## 도면5a

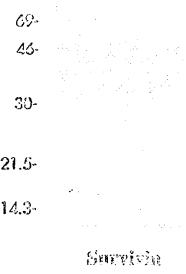
MW $\times 10^{-3}$       HL-60      VIT.D3-treated



Immunoblotting

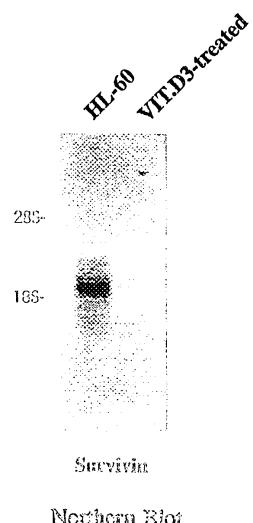
## 도면5b

MW $\times 10^{-3}$       HL-60      VIT.D3-treated



Immunoblotting

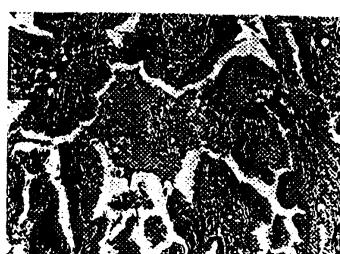
도면5c



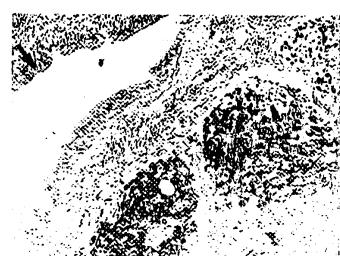
도면6a



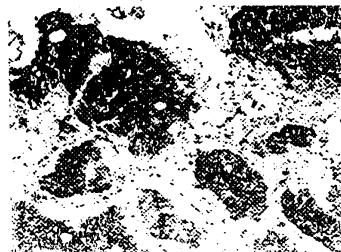
도면6b



도면6c



도면6d



도면6e



도면6f



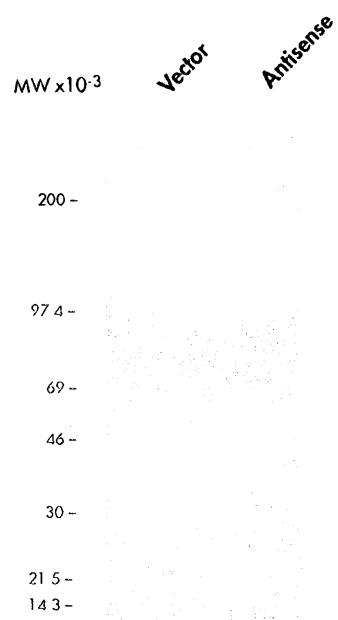
도면6g



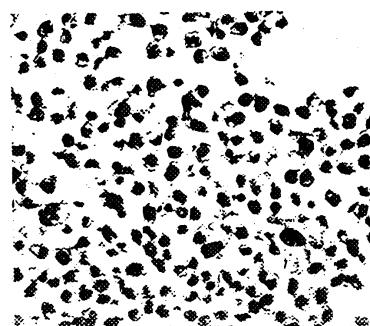
도면6h



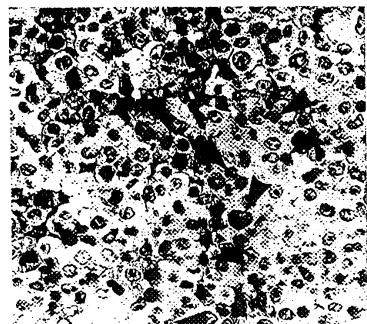
도면7a



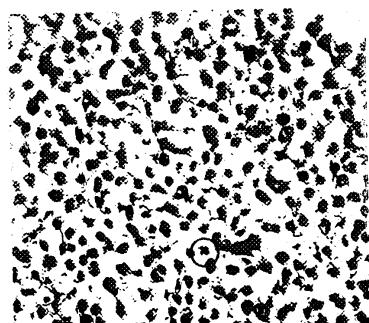
도면7b-1



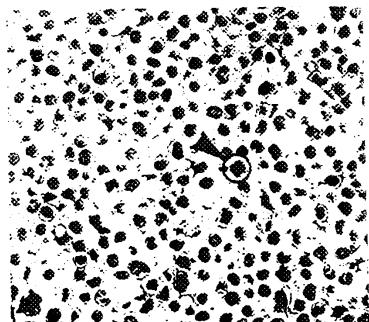
도면7b-2



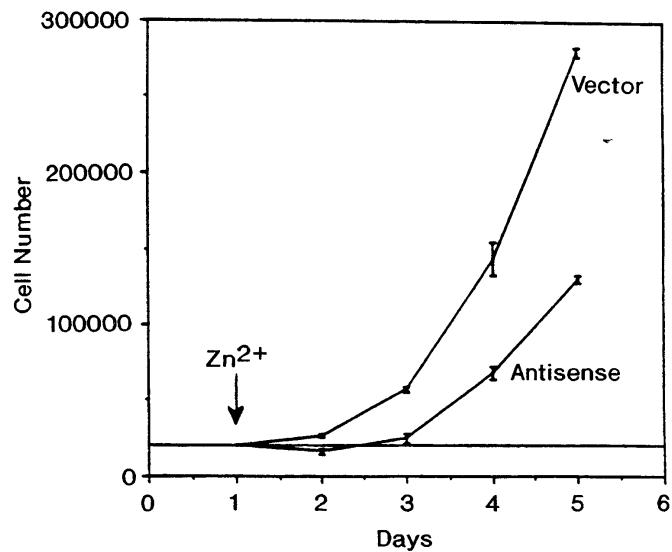
도면7b-3



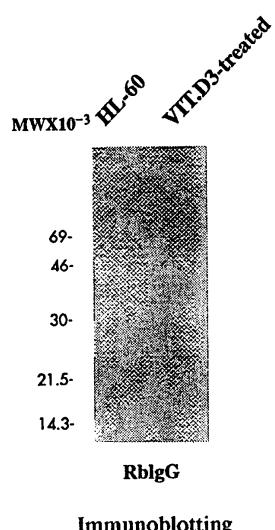
도면7b-4



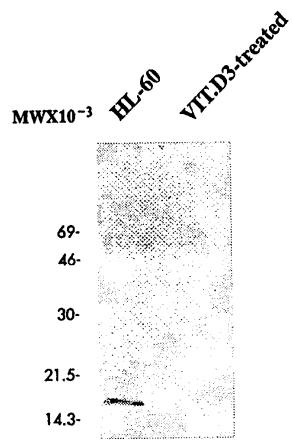
도면7c



도면8a

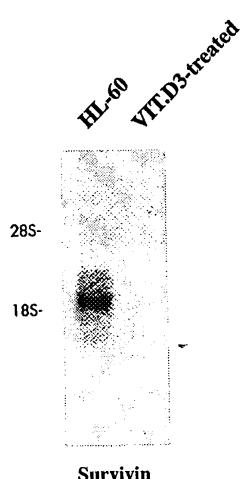


도면8b



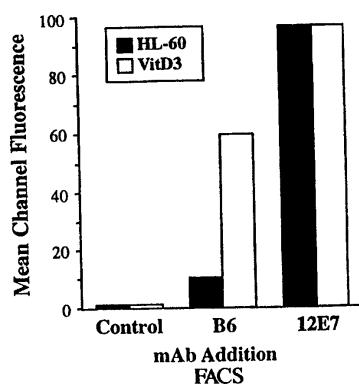
Immunoblotting

도면8c

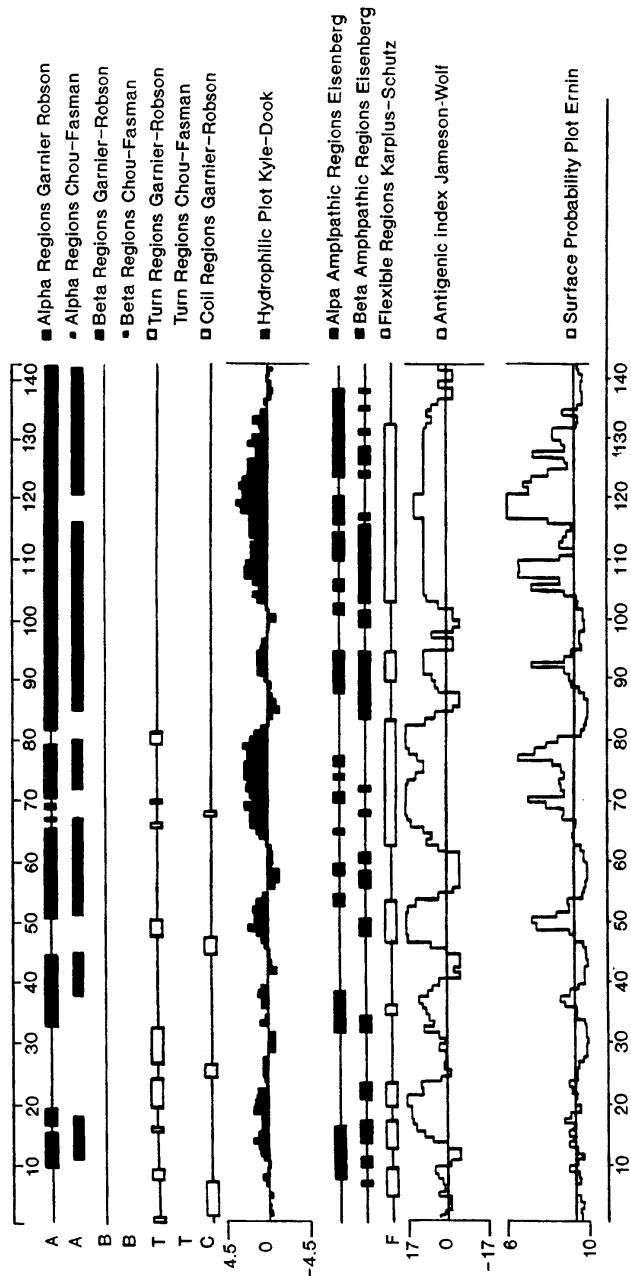


Northern Blot

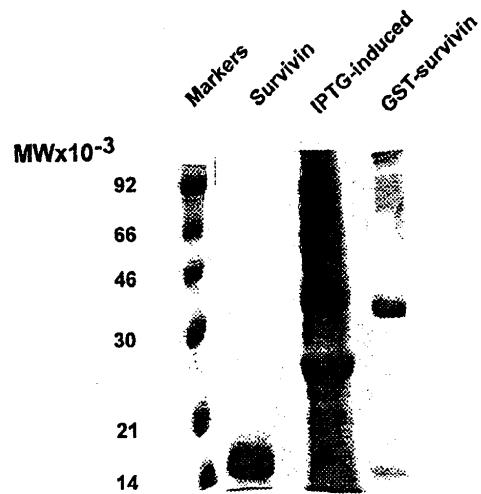
도면8d



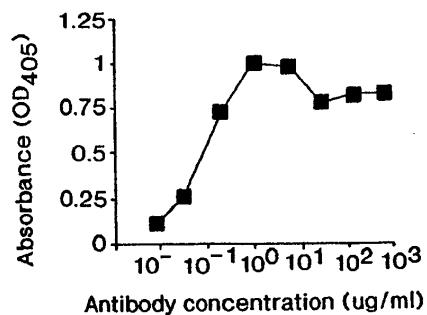
## 도면9



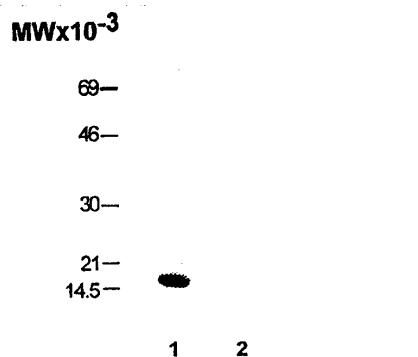
도면10a



도면10b



도면10c



도면10d

삭제

도면10e

삭제

도면10f

삭제

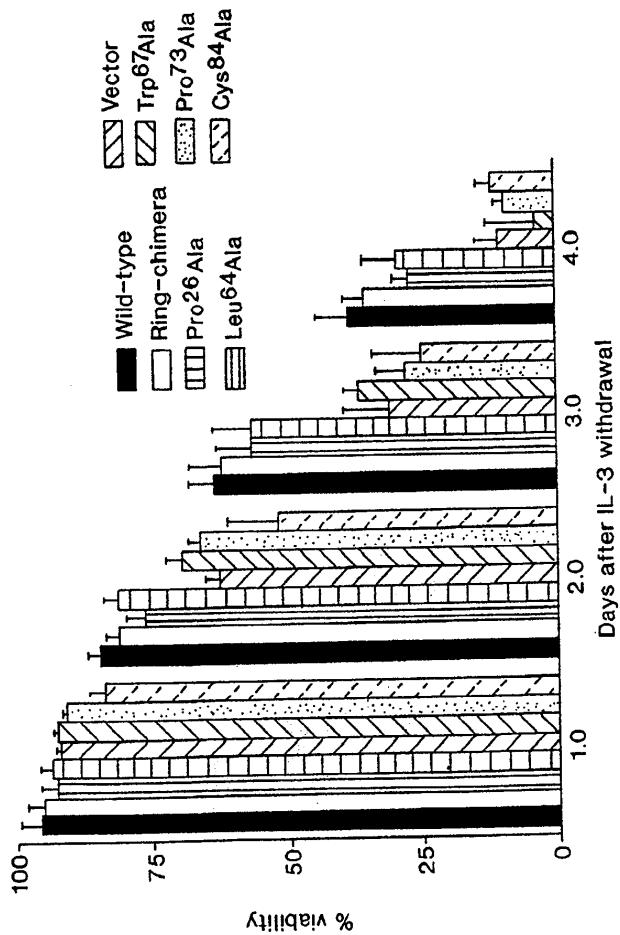
도면10g

삭제

도면10h

삭제

도면11



도면11a

삭제

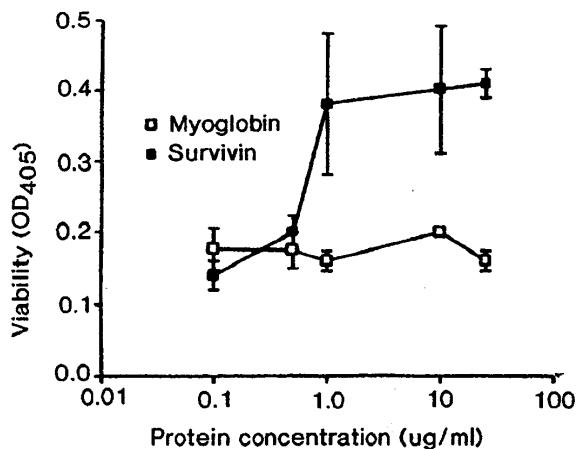
도면11b

삭제

도면11c

삭제

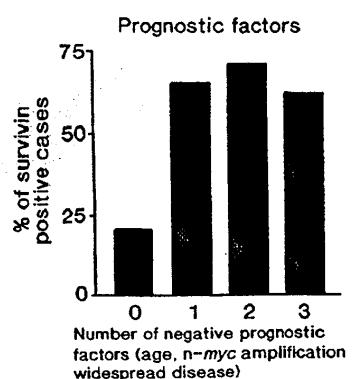
도면12



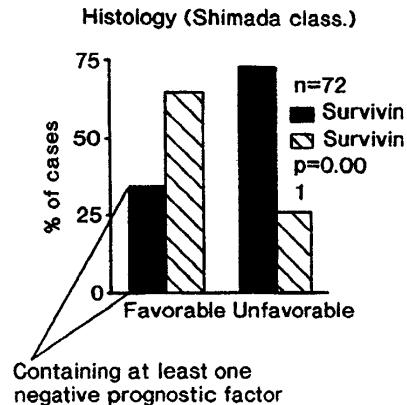
도면13

삭제

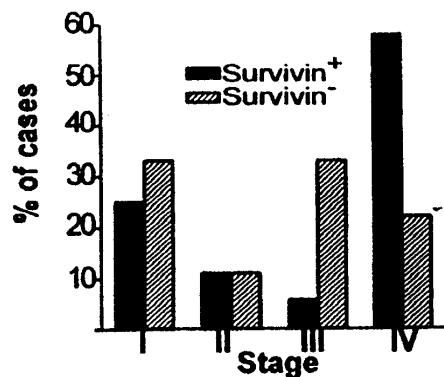
도면13a



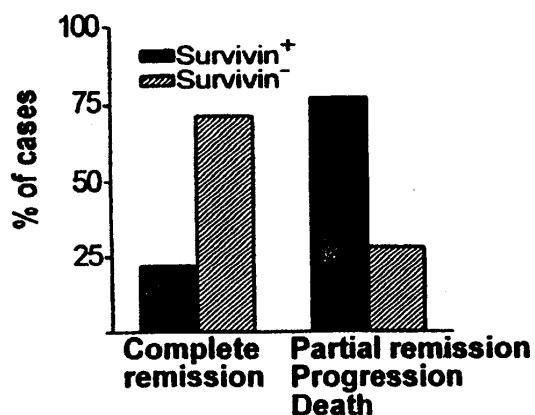
도면13b



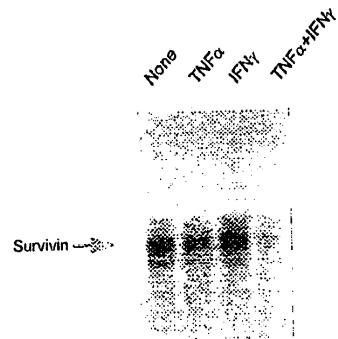
도면14a



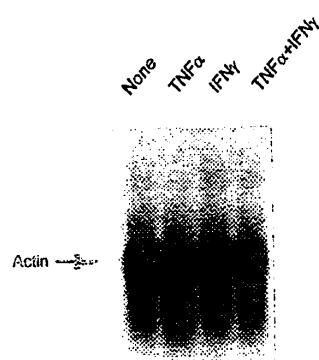
도면14b



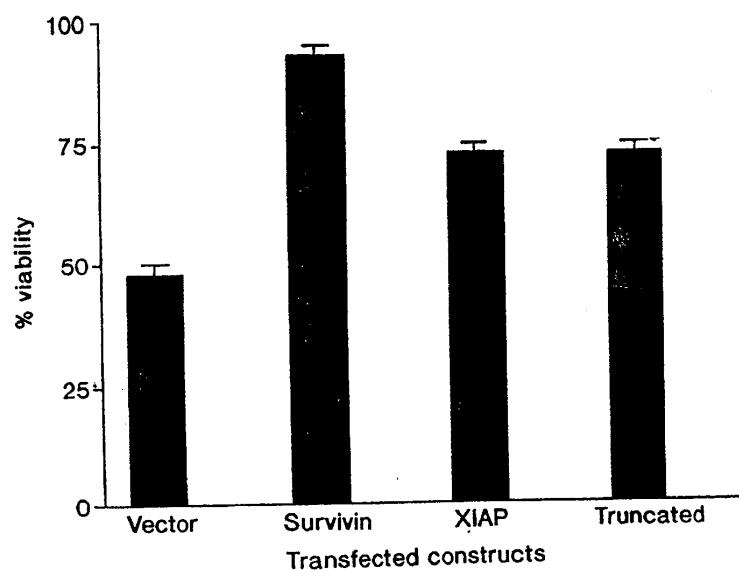
도면15a



도면15b



도면16



도면16a

삭제

도면16b

삭제

도면17

삭제