

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C12N 15/12

(11) 공개번호 특2001-0024690
(43) 공개일자 2001년03월26일

(21) 출원번호	10-2000-7006105	(87) 국제공개번호	WO 1999/28467
(22) 출원일자	2000년06월03일	(87) 국제공개일자	1999년06월10일
번역문제출일자	2000년06월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/25454		
(86) 국제출원출원일자	1998년12월01일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스 페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모 나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 기네비소 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀 란드 영국 그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이 스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라 트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨 이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터 어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 유고 슬라비아 짐바브웨		
(30) 우선권주장	08/984,638 1997년12월03일 미국(US)		
(71) 출원인	지모제백틱스, 인코포레이티드 리스 데브라 케이. 미국 워싱턴 98102 시애틀 이스트레이크 에버뉴 이스트 1201		
(72) 발명자	세파드 폴 오. 미국 워싱턴 98252 그라니트 폴스 278 드라이브 노스이스트 13532 다이셔 테레사 에이. 미국 워싱턴 98115 시애틀 노스이스트 61 스트리트 6317		
(74) 대리인	장용식		

심사청구 : 없음

(54) 사람 감상선 단백질 Z S I G45 및 그것을 코드화하는 DNA

요약

본 발명은 감상선 및 하수체 샘에서 강하게 발현되는 신규한 사람 단백질인, zsig45 에 대한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 분자에 관한 것이다. 그것들을 코드화하는 폴리펩티드, 및 폴리뉴클레오티드들은 사람 질병 상태와 염색체 이상을 검출하기 위하여, 및 치료제로서 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 zsig45 폴리펩티드에 대한 항체를 포함한다.

색인어

감상선 호르몬, zsig45 폴리펩티드, zsig45NEE, zsig45CEE, 심장 및 뼈 질병, 항염증 효과.

명세서

기술분야

다세포 유기체의 세포의 증식 및 분화는 호르몬 및 폴리펩티드 성장 인자에 의해 조절된다. 이들 확산성 분자들은 세포들이 상호간에 소통되고 세포 증식 및 기관 발생을 조절하기 위하여 서로 협력하여 작용하

는 것과; 손상된 조직의 수복 및 재생을 조절하는 것을 가능하게 한다. 호르몬과 성장 인자들은 수용체에 결합함으로써 세포 대사에 영향을 미친다. 수용체들은 세포내에 있는 신호화 경로에 결합되어 있는 통합 막 단백질일 수 있다. 다른 부류의 수용체는 예컨대 전사 인자와 같은 가용성 분자들이다. 호르몬과 가용성 수용체 상호작용을 포함하여, 호르몬성 효과는 효과적인 갑상선 기능을 위해 필수적이다.

갑상선은 정상적인 사람 성장 및 발생중의 중요한 내분비선이다. 성인에서, 갑상선의 중요한 역할은 주로 갑상선 호르몬 생성 및 조절을 통하여 대사 안정성을 유지하는 것이다. 실제로 신체내에 있는 모든 기관은 갑상선 호르몬에 의하여 영향을 받는다. 그러므로, 갑상선 기능부전은 여러 가지 질병 상태와 결합되어 있다. 갑상선 질병은 비교적 통상적으로, 갑상선의 크기와 모양의 비정상(갑상선종) 및 갑상선 호르몬 분비의 비정상적 형태로 발생한다. 갑상선 기능부전은 또한 비-갑상선 질병 또는 갑상선 생리학을 변경시키는 영양 결핍으로부터도 유발될 수 있다. 통상적인 갑상선 질병의 실례로는 갑상선 종독증, 갑상선 기능부전, 그레이브즈병, 갑상선 기능항진증 및 갑상선 종양이 있다 (일반적인 개관: Felig, P., Baxter, J. D., and Frohman, L. A., (eds.), *Endocrinology and Metabolism*, McGraw Hill, NY, 3rd. ed., 1995, pp. 432-553; Bennett, J. C. and Plum, F., (eds.), *Textbook of Medicine*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 20th ed., 1996, pp. 1227-1245).

가장 광범위하게 연구된 갑상선 호르몬은 티록신 (T4), 트리요오도티로닌 (T3) 및 갑상선 자극 호르몬 (TSH)이다. T4 는 갑상선에서 배타적으로 생성되는 반면, T3 은 갑상선에 의해서 및 T4 의 갑상선-외 효소적 5'-탈요오드화에 의해 생성된다. T3 및 T4 두가지 모두 분비되고 티로글로불린의 효소적 절단으로부터 유도된다; 주요 갑상선 단백질인 티로글로불린은 T4 와 T3 의 세포내 저장형태이다. T3 및 T4 의 생합성 및 분비는 하수체 TSH 에 의해 자극되며; 그것은 계속해서 T3 및 T4 를 조절함에 의해 억제되고, 시상하부 갑상선 자극 호르몬-방출 호르몬 (TRH)에 의해 자극된다.

T3 은 갑상선 호르몬 핵 수용체를 위한 리간드로서 작용하며, 갑상선 호르몬의 모든 공지된 생리적인 작용을 중재한다. 이들 수용체들은 스테로이드 핵 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이며; DNA 에 결합하여 mRNA 전사를 활성화시킨다. 갑상선 수용체는 결합되었을 때나 또는 결합되지 않았을 때나 그것의 산성 T3 리간드에 의해 상이한 활성을 갖는다. 순환계에서, T4 와 T3 은 그것들이 다양한 기관 및 조직에있는 그것들의 작용 부위에 도달할 때까지 여러 가지 상이한 혈청 단백질에 의해 결합된다.

갑상선 호르몬은 다양한 효소의 생성 및 활성, 다른 호르몬의 생성 및 대사, 및 기질, 비타민, 및 미네랄의 활용을 조절함으로써 많은 대사 과정을 조절 (중재)한다. 이들 효과는 모두 T3 의 전사적 조절에 기인하는 것은 아니다. 예를 들어, 비-핵 작용은 림프양 세포에서의 아미노산 및 당 수송 자극, 적혈구 및 심장 세포에서의 칼슘-ATPase 활성, 및 다른 막 상호작용을 포함한다. 갑상선 호르몬의 대사적 효과 및 질병에 대해서는 문헌을 참조한다 (Braverman, L. E. (ed.), *Disease of the Thyroid*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997). 다른 공지된 이펙터들도 이런 복잡한 생리적 개략에 기여한다. 현재 미지의 이펙터들도 또한 아마도 중요하다.

당해 기술분야에는 갑상선-관련 생리학을 한층 더 설명하고 추가의 조절 분자들을 제공할 필요가 남아 있다. 특히 관심있는 것은 추가의 갑상선 호르몬을 포함하여 조절 단백질로, 이것들은 갑상선 기능에 영향을 미치거나 또는 갑상선으로부터 분비되며 흥선 외적 효과를 갖는다. 그러한 호르몬들은 무엇보다도, 다양한 갑상선 질환으로 고생하는 환자에서 정상적인 갑상선 기능을 회복시키기 위하여, 및 작은-분자 약물의 개발을 위한 표적으로서 유용할 것이다. 공지의 갑상선 호르몬들의 증명된 생체내 활성은 다른 갑상선 호르몬들의 수많은 임상적인 잠재력, 및 다른 갑상선 호르몬에 대한 요구, 그것들의 아고니스트 및 길항체를 예시해준다. 본 발명은 본원에 교시된 것으로부터 당업자에게 명백할 이들 및 다른 용도를 위한 그러한 폴리펩티드를 제공한다.

배경기술

한 측면으로, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열; (b) SEQ ID NO: 4 의 아미노산 번호 1 (Met) 부터 아미노산 번호 85 (Asp)까지의 아미노산 서열; (c) SEQ ID NO: 3 의 아미노산 번호 1 (Met) 부터 아미노산 번호 89 (Asp)까지의 아미노산 서열; (d) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 번호 1 (Met) 부터 아미노산 잔기 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 아미노산 잔기 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 1 의 뉴클레오티드 219 부터 뉴클레오티드 422 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (b) SEQ ID NO: 1 의 뉴클레오티드 168 부터 뉴클레오티드 422 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (c) SEQ ID NO: 1 의 뉴클레오티드 156 부터 뉴클레오티드 422 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (d) SEQ ID NO: 1 의 뉴클레오티드 82 부터 뉴클레오티드 422 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (e) (a), (b), (c), 또는 (d) 에 상보하는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구체예에서, 상술된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 15 의 뉴클레오티드 1 부터 뉴클레오티드 342 까지를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상술된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 아미노산 잔기 서열로 구성된다. 또 다른 구체예에서, 상술된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 잔기 서열로 구성된다. 또 다른 구체예에서, 상술된 폴리뉴클레오티드는 모티프 1 부터 5 까지를 함유하는 폴리펩티드를 코드화한다.

두 번째 측면으로, 본 발명은 다음의 작동가능하게 연결되어 있는 요소들: 전사 프로모터; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 절편; 및 전사 터미네이터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 한 구체예에서, 상술된 발현 벡터는 추가로 DNA 절편에 작동가능하게 연결되어 있는 분비 신호 서열을

포함하고 있다. 다른 구체예에서, 상술된 발현 벡터는 (a) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 1 부터 46; (b) SEQ ID NO: 3 의 아미노산 1 부터 21; 및 (c) SEQ ID NO: 4 의 아미노산 1 부터 17 로 이루어지는 군으로부터 선택된 분비 신호 서열을 포함한다.

세 번째 측면으로, 본 발명은 상술된 바와 같은 발현 벡터가 그 안에 도입되어 있는 배양된 세포를 제공하며, 이 세포는 DNA 절편에 의하여 코드화된 폴리펩티드를 발현한다.

네 번째 측면으로, 본 발명은 융합 단백질을 코드화하는 DNA 구성물을 제공하는데, 이 DNA 구성물은 (a) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 1 부터 46; (b) SEQ ID NO: 3 의 아미노산 1 부터 21; 및 (c) SEQ ID NO: 4 의 아미노산 1 부터 17 로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 첫 번째 DNA 절편; 및 추가의 폴리펩티드를 코드화하는 두 번째 DNA 절편을 포함하고 있고, 첫 번째와 두 번째 DNA 절편은 프레임으로 (in-frame) 연결되며, 이 DNA 구성물은 융합 단백질을 코드화한다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp) 까지의 아미노산 서열; (b) SEQ ID NO: 4 의 아미노산 번호 1 (Met) 부터 아미노산 번호 85 (Asp)까지의 아미노산 서열; (c) SEQ ID NO: 3 의 아미노산 번호 1 (Met) 부터 아미노산 번호 89 (Asp)까지의 아미노산 서열; (d) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 번호 1 (Met) 부터 아미노산 잔기 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 아미노산 잔기 서열을 포함하고 있는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 구체예에서, 상술된 단리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 아미노산 잔기 서열로 구성된다. 다른 구체예에서, 상술된 단리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지에 도시된다. 또 다른 구체예에서, 상술된 단리된 폴리펩티드는 모티프 1 부터 5 까지를 함유한다.

다른 측면으로, 본 발명은 그 안에 상술된 바와 같은 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양하고; 세포에 의해 생성된 zsig45 폴리펩티드를 단리하는 것으로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 (a) 9 내지 67 개의 아미노산으로 구성되며, SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 연속되는 아미노산 서열에 최소한 90 % 동일한 폴리펩티드; 및 (b) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드로 동물을 접종하여, 동물에서 상기 폴리펩티드가 항체를 생성하기 위한 면역 반응을 유발시키는 단계; 그리고 동물로부터 항체를 단리하는 단계로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드에 대한 항체의 제조 방법을 제공한다.

다른 측면으로, 본 발명은 zsig45 폴리펩티드에 결합하는, 상술된 방법에 의해 생성된 항체를 제공한다. 한 구체예에서, 상술된 항체는 단클론성 항체이다. 다른 측면으로, 본 발명은 상술된 폴리펩티드에 결합하는 항체를 제공한다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 zsig45-반응성 세포를 zsig45-자극된 세포 경로에 반응하는 리포터 유전자 구성물로 형질전환시키는 단계; 상술된 방법에 의하여 zsig45 폴리펩티드를 생성하는 단계; 시험 샘플이 있을 때와 없을 때 세포에 zsig45 폴리펩티드를 첨가하는 단계; 시험 샘플이 있을 때와 없을 때 생물학적 또는 생화학적 검정에 의해 zsig45 폴리펩티드에 대한 반응 수준을 비교하는 단계; 그리고 상기 비교로부터 시험 샘플중의 zsig45 활성의 길항체의 존재를 측정하는 단계로 이루어지는, 시험 샘플중에서 zsig45 단백질 활성의 길항체의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 zsig45-반응성 세포를 zsig45-자극된 세포 경로에 반응하는 리포터 유전자 구성물로 형질전환시키는 단계; 시험 샘플을 첨가하는 단계; 시험 샘플이 있을 때와 없을 때 생물학적 또는 생화학적 검정에 의해 반응 수준을 비교하는 단계; 그리고 상기 비교로부터 시험 샘플중의 zsig45 활성의 아고니스트의 존재를 측정하는 단계로 이루어지는, 시험 샘플중에서 zsig45 단백질 활성의 아고니스트의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

본 발명의 이들 및 다른 측면들은 다음의 본 발명의 상세한 설명을 참조로 할 때 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 다음의 용어들을 규정하는 것이 본 발명을 이해하는데 도움이 될 것이다.

용어 "친화성 태그" 는 본원에서 두 번째 폴리펩티드의 정제 또는 검출을 제공하기 위하여 또는 기질에 대한 두 번째 폴리펩티드의 부착을 위한 부위를 제공하기 위하여 두 번째 폴리펩티드에 부착될 수 있는 폴리펩티드 절편을 말한다. 원리적으로는, 그것에 대한 항체 또는 다른 특이한 결합제가 활용가능한 것이면 어떠한 펩티드 또는 단백질이든지 친화성 태그로서 사용될 수 있다. 친화성 태그로는 폴리-히스티딘 트랙, 단백질 A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991), 글루타민 S 트랜스페라제 (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), Glu-Glu 친화성 태그 (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-7954, 1985), 물질 P, FlagTM 펩티드 (Hopp et al., Biotechnology 6:1204-1210, 1988), 스트렙타비딘 결합 펩티드, 또는 다른 항원성 에피토프 또는 결합 도메인이 있다 (Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991). 친화성 태그를 코드화하는 DNA 들은 상업적인 공급자들로부터 이용가능하다 (예컨대 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

본원에서 용어 "대립성 변이체" 는 동일한 염색체상의 유전자좌를 차지하는 유전자의 어떠한 둘 또는 그 이상의 교대의 형태를 규정하기 위하여 사용된다. 대립성 변이는 자연적으로 돌연변이를 통하여 발생하

며, 군집내에서 유전형 및 표현형의 다형태를 유발할 수 있다. 유전자 돌연변이는 사일런트성이거나 (코드화된 폴리펩티드에 어떠한 변화도 없음) 또는 변경된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 코드화할 수 있다. 용어 대립성 변이체는 또한 본원에서 유전자의 대립성 변이체에 의해 코드화된 단백질을 규정하기 위해 사용된다.

용어 "아미노-말단" 및 "카르복시-말단" 은 본원에서 폴리펩티드내의 위치를 규정하기 위해 사용된다. 내용이 허락하는 한, 이들 용어는 근접한 또는 상대적인 위치를 규정하기 위하여 폴리펩티드의 특별한 서열 또는 부분을 참조하여 사용된다. 예를 들면, 폴리펩티드내의 참조 서열에 대하여 카르복시-말단쪽으로 위치한 특정 서열은 참조 서열의 카르복시 말단에 근접하여 위치한 것이지만, 반드시 완전한 폴리펩티드의 카르복시 말단에 있는 것은 아니다.

용어 "보체/항-보체 쌍" 은 적절한 조건하에서 비-공유적으로 결합된, 안정한 쌍을 형성하는 동일하지 않은 부분들을 나타낸다. 예를 들어, 비오틴과 아비딘 (또는 스트렙타아비딘)은 보체/항-보체 쌍의 원형적인 구성원이다. 다른 예시적인 보체/항-보체 쌍으로는 수용체/리간드 쌍, 항체/항원 (또는 합텐 또는 에피토프) 쌍, 센스/안티센스 폴리뉴클레오티드 쌍, 등이 있다. 계속해서 보체/항-보체 쌍이 분리되는 것이 바람직하다면, 보체/항-보체 쌍은 $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ 의 결합 친화성을 가지는 것이 바람직하다.

용어 "폴리뉴클레오티드 분자의 보체" 는 상보하는 염기 서열 및 참조 서열과 비교하여 역 배향을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드 분자이다. 예를 들어, 서열 5' ATGCACGGG 3' 은 5' CCCGTGCAT 3' 에 상보한다.

용어 "콘티그" 는 다른 폴리뉴클레오티드에 대하여 동일한 또는 상보하는 서열의 연속적인 스트레치를 가지는 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 연속적인 서열은 전체적으로 또는 폴리뉴클레오티드의 부분적인 스트레치를 따라 폴리뉴클레오티드의 주어진 스트레치를 "오버랩" 한다고도 말할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열 5'-ATGGCTTAGCTT-3' 에 대한 대표적인 콘티그는 5'-TAGCTTgagtct-3' 및 3'-gtcgacTACCGA-5' 이다.

용어 "축퇴성 뉴클레오티드 서열" 은 (폴리펩티드를 코드화하는 참조 폴리뉴클레오티드 분자와 비교하여) 하나 또는 둘 이상의 코돈을 포함하는 뉴클레오티드의 서열을 나타낸다. 축퇴성 코돈은 뉴클레오티드의 상이한 트리플렛을 함유하지만, 동일한 아미노산 잔기를 코드화한다 (즉, GAU 와 GAC 트리플렛은 각각 Asp 를 코드화한다).

용어 "발현 벡터" 는 그것의 전사를 제공하는 추가의 절편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 절편을 포함하는, 선형 또는 원형의 DNA 분자를 나타내기 위하여 사용된다. 그러한 추가의 절편은 프로모터 및 터미네이터 서열을 포함하고, 또한 하나 또는 둘 이상의 복제 기원, 하나 또는 둘 이상의 선택가능한 마커, 인핸서, 폴리아데닐화 신호 등을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 DNA 로부터 유도되거나 또는 둘 다로부터 유도된 엘리먼트를 함유할 수 있다.

용어 "단리된" 은 폴리뉴클레오티드에 적용될 때, 폴리뉴클레오티드가 그것의 천연 유전적 환경으로부터 제거되고 그로써 다른 외인성 또는 원하지 않는 코딩 서열이 없으며, 유전공학적으로 처리된 단백질 제조 시스템내에서 사용하기에 적당한 형태인 것을 나타낸다. 그러한 단리된 분자들은 그것들의 천연 환경으로부터 분리되는 것들이며, 실제로는 cDNA 및 게놈 클론이 있다. 본 발명의 단리된 DNA 분자들은 그것들이 원래 결합되었던 다른 유전자들이 없지만, 자연적으로 발생하는 5' 및 3' 미번역 영역, 예컨대 프로모터와 터미네이터를 포함할 수 있다. 결합된 영역의 확인은 당업자에게는 명백할 것이다 (Dynan and Tijan, Nature 316:774-778, 1985 참조).

"단리된" 폴리펩티드 또는 단백질은 그것의 천연 환경이외의 상태에서, 예컨대 혈액 및 동물 조직으로부터 발견되는 폴리펩티드 또는 단백질이다. 바람직한 형태에서, 단리된 폴리펩티드는 실질적으로 다른 폴리펩티드, 특히 동물 기원의 다른 폴리펩티드가 없다. 폴리펩티드는 고도로 정제된 형태, 즉 95 % 이상 순수하게, 보다 바람직하게는 99 % 이상 순수하게 제공되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단리된" 은 또 다른 물리적 형태의 동일한 폴리펩티드, 예컨대 이량체 또는 달리 글리코실화된 또는 유도된 형태의 폴리펩티드를 배제하지 않는다.

용어 "작동가능하게 연결된" 은 DNA 절편에 적용될 때, 그것들이 그것들의 의도된 목적대로 조화롭게 작용하도록, 예컨대 전사는 프로모터에서 개시하여 코딩 절편을 통하여 터미네이터로 진행되도록 배열되는 것을 나타낸다.

용어 "오르토로그" 는 상이한 종으로부터 유도된 폴리펩티드 또는 단백질의 기능적 대응물인 한 종으로부터 얻어진 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 오르토로그들중의 서열의 차이는 종 분화의 결과이다.

"파라로그" 는 유기체에 의해 만들어진 구별되지만 구조적으로 관련된 단백질이다. 파라로그는 유전자 복제를 통하여 만들어지는 것으로 여겨진다. 예를 들어, α -글로빈, β -글로빈, 및 미오글로빈은 상호간에 파라로그이다.

"폴리뉴클레오티드" 는 5' 단부로부터 3' 단부로 판독되는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일- 또는 이중-가닥의 중합체이다. 폴리뉴클레오티드에는 RNA 및 DNA 가 포함되며, 천연 공급원으로부터 단리되거나, 시험관내에서 합성되거나, 또는 천연 및 합성 분자의 조합으로부터 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 크기는 염기쌍 ("bp" 로 약칭함), 뉴클레오티드 ("nt"), 또는 킬로염기 ("kb")로 표시된다. 본 명세서에서 허용되는 한, 후자의 두가지 용어는 단일-가닥의 또는 이중-가닥의 폴리뉴클레오티드를 설명하기도 한다. 용어가 이중-가닥의 분자에 적용되는 경우, 이 용어는 전체 길이를 나타내기 위하여 사용되고, 용어 "염기쌍" 과 동등한 것으로 이해될 것이다. 당업자에게는 두 가닥의 이중-가닥 폴리뉴클레오티드가 길이에서 약간 차이가 있을 수 있으며, 그것들의 단부는 효소적 절단의 결과로서 어긋나게 될 것이고; 그로써 이중-가닥의 폴리뉴클레오티드 분자내에 있는 모든 뉴클레오티드들이 쌍을 이루지는 않을 것이 인자될 것이다.

"폴리펩티드"는 자연적으로 생성되었는지 또는 합성되었는지에 관계없이 펩티드 결합에 의하여 결합된 아미노산 잔기의 중합체이다. 약 10 아미노산 잔기 이하의 폴리펩티드는 통상 "펩티드"로서 언급된다.

용어 "프로모터"는 본원에서 RNA 중합효소의 결합 및 전사의 개시를 제공하는 DNA 서열을 함유하고 있는 유전자의 부분을 규정하는, 그것의 당해기술분야에서의 인정된 의미로 사용된다. 프로모터 서열은 늘 그런 것은 아니지만, 통상 유전자의 5' 비-코딩 영역에서 발견된다.

"단백질"은 하나 또는 둘 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 거대분자이다. 단백질은 또한 탄수화물 그룹과 같은 비-펩티드성 성분을 포함할 수 있다. 탄수화물 및 다른 비-펩티드성 치환체들은 단백질이 생성되는 세포에 의해 그 단백질에 첨가될 수 있으며, 세포 유형에 따라 달라질 것이다. 단백질은 본원에서 그것들의 아미노산 골격 구조의 견지에서 규정되며; 탄수화물 그룹과 같은 치환체는 일반적으로 특정되지는 않으며, 그러나 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다.

용어 "수용체"는 생체활성 분자 (즉, 리간드)에 결합하여 세포에 미치는 리간드의 효과를 증대하는 세포-결합된 단백질을 나타낸다. 일반적으로, 수용체들은 막 결합될 수 있거나, 시토플라즘에 있거나, 또는 핵에 있다; 단량체이거나 (예컨대 갑상선 자극 호르몬 수용체, 베타-아드레날린성 수용체) 또는 다량체이다 (예컨대 PDGF 수용체, 성장 호르몬 수용체, IL-3 수용체, GM-CSF 수용체, G-CSF 수용체, 에리트로포이에틴 수용체 및 IL-6 수용체). 막-결합된 수용체들은 세포외재성 리간드-결합 도메인과 전형적으로 신호 변환에 포함된 세포내 이펙터 도메인을 포함하고 있는 다중-펩티드 구조인 것을 특징으로 한다. 대부분의 핵 수용체들은 또한 아미노-말단, 트랜스-활성화 도메인, DNA 결합 도메인, 및 리간드 결합 도메인을 포함하여 다중-도메인 구조를 나타낸다. 수용체에 대한 리간드의 결합은 세포내의 이펙터 도메인과 다른 분자(들)사이의 상호작용을 유발하는 수용체의 형태적 변화를 유발한다. 이 상호작용은 계속해서 세포의 대사과정의 변경을 유도한다. 수용체-리간드 상호작용에 연결되어 있는 대사 사건으로는 유전자 전사, 포스포릴화, 탈포스포릴화, 고리형 AMP 생성의 증가, 세포 칼슘의 동원, 막 지질의 동원, 세포 고착, 이노시톨 지질의 가수분해 및 인지질의 가수분해가 있다. 일반적으로, 수용체들은 막 결합되거나, 시토플라즘에 있거나, 또는 핵에 있다; 단량체이거나 (예컨대 갑상선 자극 호르몬 수용체, 베타-아드레날린성 수용체) 또는 다량체이다 (예컨대 PDGF 수용체, 성장 호르몬 수용체, IL-3 수용체, GM-CSF 수용체, G-CSF 수용체, 에리트로포이에틴 수용체 및 IL-6 수용체).

용어 "분비 신호 서열"은 보다 큰 폴리펩티드의 성분으로서, 그것이 합성되는 세포의 분비 경로를 통하여 보다 큰 폴리펩티드를 지정하는 폴리펩티드 ("분비 펩티드")를 코드화하는 DNA 서열을 의미한다. 보다 큰 펩티드는 통상 일시적으로 분비 경로를 통과하는 중에 분비 펩티드가 제거되도록 절단된다.

용어 "스플라이스 변이체"는 본원에서 유전자로부터 전사된 RNA의 또 다른 형태를 규정하기 위해 사용된다. 스플라이스 변이는 전사된 RNA 분자내에 있는 또 다른 스플라이싱 부위를 사용함으로써 자연적으로 발생하거나, 또는 덜 통상적으로는 별도로 전사된 RNA 분자들 사이에서 발생하며, 동일한 유전자로부터 전사된 여러 개의 mRNA를 유발할 수 있다. 스플라이스 변이체들은 변경된 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화할 수 있다. 용어 "스플라이스 변이체"는 또한 유전자로부터 전사된 mRNA의 스플라이스 변이체에 의해 코드화된 단백질을 나타내기 위하여 본원에서 사용된다.

부정확한 분석 방법 (예컨대 겔 전기영동)에 의해 측정된 중합체의 분자량 및 길이는 대략적인 값일 것으로 이해될 것이다. 그러한 값이 "약" X 또는 "대략" X로서 표현될 때, X의 표시된 값은 $\pm 10\%$ 로 정확할 것으로 이해될 것이다.

본 발명은 부분적으로는 분비 신호 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 신규한 DNA 서열의 발견을 토대로 한다. 이 신규한 cDNA에 상응하는 mRNA의 조직내 분포에 대한 분석 결과, 발현이 주로 갑상선에 제한된 것으로 나타났다. 발현은 또한 하수체 및 결장에서도 명백하였다. 이런 조직-특이적 발현은 갑상선 기능에서의 역할을 나타낸다. 폴리펩티드는 zsig45로 표시되었다. 본 발명의 신규한 zsig45 폴리펩티드는 처음에 분비된 단백질을 선택하기 위한 노력으로 분비 신호 서열에 대한 EST 데이터베이스에 의문을 가짐으로써 확인되었다. 이들 서열은 상류체에 있는 메티오닌 출발 부위, 대략 13 개의 아미노산으로 이루어진 소수성 영역, 및 절단 부위를 특징으로 한다. 이러한 연구 기준을 만족하는 EST에 상응하는 폴리펩티드들은 공지의 리간드에 대하여 상동성을 가지고 있는 분비된 단백질을 확인하기 위하여 공지의 서열들과 비교되었다. 하나의 EST 서열이 단리되었고, 그것은 분비된 단백질일 것으로 예상되었다. 전체 길이의 cDNA에 의하여 코드화된 신규한 폴리펩티드는 공지의 단백질과 외관상 상동성 관계를 보이지 않았고, 이것은 새로운 단백질 패밀리의 구성원일 수 있는 완전히 신규한 단백질을 시사한다. 더욱이, 신호 서열, 예상된 작은 크기 (8 kD, 후-번역 변형없이), 조직-특이적 발현, 본원에 개시된 특정한 신규한 모티프, 및 성숙한 단백질의 긴 소수성 절편의 결핍은 분비된 사이토킨-유사 또는 단백질 호르몬-유사 분자의 새로운 부류로서의 가능성을 가지고 있는 작은 분비된 분자를 시사한다.

대표적인 zsig45-코드화 DNA의 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1에 도시되어 있으며, 그것의 추론되는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2에 기재되어 있다. zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO: 1)를 분석한 결과, 46 개의 아미노산 잔기로 된 신호 펩티드 (SEQ ID NO: 2의 잔기 1 (Met)에서부터 잔기 46 (Ala)까지) 및 68 개의 아미노산의 성숙한 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 잔기 47 (Lys)부터 잔기 114 (Asp)까지)를 포함하고 있는 114 개의 아미노산 (SEQ ID NO: 2)을 코드화하는 오픈 리딩 프레임이 나타났다.

zsig45 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1)를 코드화하는 DNA를 분석한 결과, 또한 번역 개시를 가능하게 할 3 개의 잠재적인 메티오닌 출발 부위가 나타났다. 첫 번째는 아미노산 잔기 1이고, 두 번째는 아미노산 잔기 26이며, 세 번째는 아미노산 잔기 30이다 (SEQ ID NO: 2 참조). 그러므로, 상술된 첫 번째 오픈 리딩 프레임 외에, 동일한 폴리뉴클레오타이드에 의해 코드화된 2 개의 다른 오픈 리딩 프레임 (ORF)이 있다. 이들 ORF는 상술된 동일한 성숙한 폴리펩티드를 코드화할 것이다. zsig45 폴리펩티드(SEQ ID NO: 2)를 코드화하는 DNA를 분석한 결과, 21 개의 아미노산 잔기로 된 신호 펩티드 (SEQ ID NO: 3의 잔기 1 (Met)에서부터 잔기 21 (Ala)까지)를 함유하고 있는 89 개의 아미노산 (SEQ ID NO: 3)을 코드화하는

두 번째 오픈 리딩 프레임, 및 17 개의 아미노산으로 된 신호 펩티드 (SEQ ID NO: 4 의 잔기 1 (Met) 부터 잔기 17 (Ala)까지)를 함유하고 있는 85 개의 아미노산 (SEQ ID NO: 4)을 코드화하는 세 번째 오픈 리딩 프레임이 나타났다.

단백질에서, 가변성이 낮은 영역 (예컨대 소수성 클러스터)은 때로 구조적으로 중요한 영역에 보존된다 (Sheppard, P., et al., Gene 150:163-167, 1994). 그러한 가변성이 낮은 영역은 때로 드문 또는 자주 나타나지 않는 아미노산, 예컨대 트립토판을 함유한다. zsig45 의 가변성이 낮은 영역을 조사한 결과, 이하 모티프 1 내지 5 로 언급되는 다음의 5 개의 예상되는 보존된 아미노산의 작은 영역이 나타났다: 모티프 1 (SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 50 부터 56 에 상응함); 모티프 2 (SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 61 부터 66 에 상응함); 모티프 3 (SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 71 부터 76 에 상응함); 모티프 4 (SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 87 부터 92 에 상응함); 모티프 (SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 2 의 아미노산 95 부터 100 에 상응함).

보존된 또는 가변성이 낮은 모티프의 존재는 일반적으로 단백질의 중요한 구조적 영역과 상관관계가 있거나 또는 그러한 영역을 규정한다. 그러한 모티프사이의 영역은 보다 가변적이지만, 때로는 그러한 영역들이 중요한 구조 및 활성, 예컨대 결합 도메인, 생물학적 및 효소적 활성, 신호 변환, 세포-세포 상호 작용, 조직 정위 도메인 등과 상관관계가 있거나 또는 그것들을 규정할 수 있기 때문에 기능적으로 중요하다.

zsig45 의 모티프 1 에서 5 의 고도로 보존된 아미노산은 새로운 패밀리의 구성원을 확인하기 위한 도구로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 조직 공급원 또는 셀라인으로부터 얻어진 RNA 로부터의 보존된 모티프를 코드화하는 서열을 증폭시키기 위하여 역전사-중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)이 사용될 수 있다. 특히, 다음의 모티프 1 에서 5 까지의 zsig45 아미노산 서열로부터 고도로 축퇴성을 나타내는 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 디자인될 수 있다:

a) QEEGDP (모티프 1; SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 10 의 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 및 그것의 보체에 상응함;

b) AMPYWP (모티프 2; SEQ ID NO: 6), SEQ ID NO: 11 의 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 및 그것의 보체에 상응함;

c) DFWNYV (모티프 3; SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 12 의 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 및 그것의 보체에 상응함;

d) QIEDMA (모티프 4; SEQ ID NO: 8), SEQ ID NO: 13 의 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 및 그것의 보체에 상응함;

e) FFAHFP (모티프 5; SEQ ID NO: 9), SEQ ID NO: 14 의 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 및 그것의 보체에 상응함.

상술된 zsig45 폴리펩티드 영역, 도메인, 모티프, 잔기 및 서열들을 코드화하는 상응하는 폴리뉴클레오타이드들을 SEQ ID NO: 1 에 나타낸다.

SEQ ID NO: 15 는 SEQ ID NO: 2 의 zsig45 폴리펩티드 (아미노산 1 - 114)를 코드화하는 모든 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 축퇴성 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 그러므로, SEQ ID NO: 15 의 뉴클레오타이드 1 또는 141 부터 뉴클레오타이드 342 까지의 zsig45-코드화 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 포함된다. 또한 본 발명에는, SEQ ID NO: 15 의 유사한 영역으로부터 형성된 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4 와 관련하여 본원에서 설명된 단편들 및 융합물들이 포함된다. SEQ ID NO: 15 의 기호를 하기 표 1 에 나타낸다.

[표 1]

뉴클레오타이드	레졸루션	보체	레졸루션
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A/G	Y	C/T
Y	C/T	R	A/G
M	A/C	K	G/T
K	G/T	M	A/C
S	C/G	S	C/G
W	A/T	W	A/T
H	A/C/T	D	A/G/T
B	C/G/T	V	A/C/G
V	A/C/G	B	C/G/T
D	A/G/T	H	A/C/T
N	A/C/G/T	N	A/C/G/T

주어진 아미노산에 대한 모든 가능한 코돈을 포함하는, SEQ ID NO: 15 에서 사용된 축퇴성 코돈을 하기

표 2 에 나타낸다.

[표 2]

아미노산	문자	코돈	축퇴성 코돈
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAT	CAR
His	H	CAC CAG	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn/Asp	B		RAY
Glu/Gln	Z		SAR
Any	X		NNN
Gap	-	---	

당업자는 각각의 아미노산을 코드화하는 모든 가능한 코돈을 대표하는 축퇴성 코돈을 결정하는데 약간의 불명확성이 도입되었음을 인지할 것이다. 예를 들어, 세린에 대한 축퇴성 코돈 (WSN)은 어떤 경우에는 아르기닌을 코드화하고 (AGR), 아르기닌에 대한 축퇴성 코돈 (MGN)은 어떤 경우에는 세린을 코드화한다 (AGY). 유사한 관계가 페닐알라닌과 로이신을 코드화하는 코돈 사이에도 존재한다. 그러므로, 축퇴성 서열에 의해 포함되는 일부의 폴리뉴클레오티드는 아미노산 서열 변이체를 코드화할 수 있지만, 당업자는 그러한 변이체 서열을 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4 의 아미노산 서열을 참조하여 쉽게 확인할 수 있다. 그러한 변이체 서열은 본원에서 개시되는 바와 같이 기능성에 대해 시험될 수 있다.

당업자는 또한 상이한 종이 "우선적인 코돈 관계"를 나타낼 수 있음을 인지할 것이다 (Grantham, et al., Nuc. Acids Res., 8:1893-1912, 1980; Haas, et al., Curr. Biol., 6:315-324, 1996; Wain-Hobson, et al., Gene, 13:355-364, 1981; Grosjean, H., and Fiers, W., Gene, 18:199-209, 1982; Holm, L., Nuc. Acids Res., 14:3075-3087, 1986; 및 Ikemura, T., J. Mol. Biol., 158:573-597, 1982). 본원에서 사용되는 바, 용어 "우선적인 코돈 관계" 및 "우선적인 코돈" 은 특정 종의 세포에서 가장 자주 사용되는 단백질 번역 코돈과 관련된 기술분야의 용어이고, 그러므로 각각의 아미노산을 코드화하는 가능한 코돈의 하나 또는 소수의 대표적인 것을 선호한다 (표 2 참조). 예를 들어, 아미노산 트레오닌 (Thr)은 ACA, ACC, ACG 또는 ACT 에 의해 코드화될 수 있지만, 포유동물 세포에서 ACC 는 가장 자주 사용되는 코돈이다; 다른 종에서는 예를 들어, 곤충 세포, 효모, 바이러스 또는 박테리아에서는, 상이한 Thr 코돈이 우선적일 수 있다. 특정 종에 대한 우선적인 코돈은 당해기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 도입될 수 있다. 재조합 DNA 안으로의 우선적인 코돈 서열의 도입은 예를 들면, 특정 세포 유형 또는 종 내에서 단백질 번역을 보다 효과적으로 만듦으로써 단백질의 생성을 증강시킬 수 있다. 그러므로, SEQ ID NO: 15 에 개시된 축퇴성 코돈 서열은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되고 본원에 개시된 다양한 세포 유형 및 종에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 최적화하기 위한 주형으로서 작용한다. 우선적인 코돈을 함유하고 있는 서열은 다양한 종에서의 발현을 위하여 시험되고 최적화될 수 있으며, 본원에서 설명되는 바와 같이 기능성에 대하여 시험될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구체예내에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 엄격한 조건하에서, SEQ ID NO: 1 의 유사한 크기의 영역, 또는 그것에 상보하는 서열에 혼성화할 것이다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 및 pH 에서 특정 서열에 대한 열적 용융 온도 (T_m)보다 5 °C 낮게 선택된다. T_m 은 (규정된 이온 강도 및 pH 하에서) 그 온도에서 표적 서열의 50 % 가 완전하게 매치된 프로브에 혼성화하는 온도이다. 적당하게 엄격한 혼성화 조건은 약 40 내지 50 % 의 포름아미드, 약 5× 까지의 SSC, 약 5× 덴하르트 용액, 약 10 % 까지의 덱스트란 술페이트, 및 약 10 내지 20 µg/ml 의 변성된 상업적으로 구매가능한 담체 DNA 가 포함되어 있는 용액중에서 약 42 °C 에서 약 5 시간 내지 하룻밤동안 인큐베이션하는 것과 동등하다; 혼성화에 이어서 다음 단계로 필터가 약 2× 까지의 SSC 로 세척된다. 예를 들어, 적당한

세척 엄격도는 55 내지 65 °C 에서 0.1× SSC 내지 2× SSC, 0.1 % 의 SDS 와 동등하다. 엄격한 혼성화 및 세척 조건은 T_m 에 반영된 프로브의 길이, 사용된 혼성화 및 세척 용액에 좌우되며, 기본적으로 당업자에 의해 경험적으로 결정된다.

앞서 주지된 바와 같이, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA 를 포함한다. DNA 및 RNA 를 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 일반적으로, RNA 는 대량의 zsig45 RNA 를 생성하는 조직 또는 세포로부터 단리된다. 그러한 조직 및 세포는 노던 블롯팅에 의해 확인되며 (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201, 1980), 실제로 감상선이 있고, 한편으로 DNA 는 또한 다른 조직 또는 셀 라인으로부터 RNA 를 사용하여 제조되거나 또는 게놈 DNA 로서 단리되기도 한다. 총 RNA 는 구아니디움 이소시아네이트 추출과 이어지는 CsCl 구배에서의 원심분리에 의한 단리를 사용하여 제조될 수 있다 (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979). 폴리 (A)+ RNA 는 총 RNA 로부터 아비브와 레더의 방법을 사용하여 제조된다 (Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:1408-1412, 1972). 상보하는 DNA (cDNA)는 폴리(A)+ RNA 로부터 공지의 방법을 사용하여 제조된다. 또 다른 방법으로 게놈 DNA 가 단리될 수 있다. 그런 다음 zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드가 예컨대 혼성화 또는 PCR 에 의하여 확인되고 단리될 수 있다.

zsig45 를 코드화하는 전체길이의 클론은 종래의 클로닝 과정에 의하여 얻어질 수 있다. 상보하는 DNA (cDNA) 클론이 바람직하지만, 어떤 경우에는 (예컨대 트랜스제닉 동물에서의 발현), 게놈 클론을 사용하거나 또는 cDNA 클론이 최소한 하나의 게놈 인트론을 포함하도록 변형되는 것이 바람직할 수도 있다. cDNA 및 게놈 클론을 제조하는 방법은 널리 알려져 있으며, 당업자의 수준내에 있고, 라이브러리의 프로빙 또는 프라이밍에 본원에 개시된 서열, 또는 그것의 부분을 사용하는 것을 포함한다. 발현 라이브러리는 zsig45 수용체 단편, 또는 다른 특이한 결합 파트너에 대한 항체로 프로브될 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 DNA 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 현재 선택되는 방법은 포스포라미디트 방법이다. 만약 화학적으로 합성된 이중 가닥의 DNA 가 유전자 또는 유전자 단편의 합성과 같은 적용에 필요하다면, 그 때에는 각각의 상보하는 가닥이 별도로 만들어진다. 짧은 폴리뉴클레오티드 (60 내지 80 bp)의 제조는 기술적으로 거침이 없으며, 상보하는 가닥을 합성하고 이어서 그것들을 아닐링함으로써 이루어질 수 있다. 그러나, 보다 긴 폴리뉴클레오티드 (>300 bp)의 제조를 위해서는, 화학적인 DNA 합성 중에 각 사이클의 커플링 효율이 좀처럼 100 % 가 되지 않기 때문에 특수한 스트래티지가 통상 사용된다. 이 문제를 극복하기 위하여, 길이가 20 내지 100 뉴클레오티드인 단일-가닥의 잔편들로부터 합성 유전자 (이중-가닥)가 모듈 방식으로 어셈블링된다.

합성 유전자를 구성하기 위한 한 가지 방법은 각각이 20 내지 60 뉴클레오티드 길이를 가지는 상보하는 올리고뉴클레오티드를 중첩시키는 세트를 처음에 제조하는 것을 필요로 한다. 유전자의 각각의 내부 부분은 정확하게 인접한 부분과 염기쌍을 이루도록 디자인된 상보하는 3' 및 5' 말단 연장부분을 갖는다. 그러므로, 유전자가 어셈블링된 후, 과정은 두 개의 가닥의 골격을 따라 있는 Nick(nicks)을 T4 DNA 리가제를 사용하여 매움으로써 완료된다. 단백질 코딩 서열외에, 합성 유전자가 클로닝 벡터의 제한 엔도뉴클레아제안으로의 삽입을 용이하게 하는 말단 서열을 사용하여 디자인될 수 있다.

전체-길이의 유전자를 제조하는 또 다른 방법은 중첩하는 올리고뉴클레오티드 (40 내지 100 뉴클레오티드)의 특수화된 세트를 합성하는 것이다. 3' 및 5' 의 짧은 중첩하는 상보하는 영역이 아닐링된 후에도, 큰 갭은 여전히 남아 있지만, 짧은 염기쌍의 영역들은 함께 구조를 보유하기에 충분히 길고 충분히 안정적이다. 갭이 채워지며 DNA 듀플렉스는 대장균 DNA 중합효소 I 에 의한 효소적 DNA 합성을 통하여 완료된다. 효소적 합성이 완료된 후에, Nick이 메워진다. 이중-가닥의 구성물은 순차적으로 서로서로 연결되어 전체적인 유전자 서열이 형성되고, 그것은 DNA 서열 분석에 의하여 증명된다 (Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Application of Recombinant DNA, (ASM Press, Washington, D.C. 1994); Itakura et al., Annu. Rev. Biochem., 53:323-356, 1984) 및 Climie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:633-637, 1990).

본 발명은 또한 사람으로부터 (파라로그) 및 다른 종으로부터 (오르토로그) 얻어지는 대응 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들 종으로는 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 포유동물, 조류, 양서류, 파충류, 물고기, 곤충 및 다른 척추동물 및 무척추동물 종을 들 수 있다. 특히 관심을 끄는 것은 쥐과, 쥐, 돼지, 양, 소, 개, 고양이, 말 및 다른 영장류 단백질을 포함한 다른 포유동물 종으로부터 얻어지는 zsig45 사람 파라로그 및 폴리펩티드이다. 사람 폴리펩티드의 종 상동체. 사람 zsig45 의 오르토로그는 본 발명에 의해 제공되는 정보 및 조성을 종래의 클로닝 기법과 함께 사용하여 클론될 수 있다. 예를 들어, cDNA 는 본원에서 설명되는 바와 같이 zsig45 를 발현하는 조직 또는 세포 유형으로부터 얻어진 mRNA 를 사용하여 클론될 수 있다. mRNA 의 적당한 공급원은 노던 블롯을 본원에 설명된 서열로부터 디자인된 프로브로 프로빙함으로써 확인될 수 있다. 그런 다음 라이브러리가 포지티브 조직 또는 셀 라인의 mRNA 로부터 제조된다. 그런 다음 zsig45-코드화 cDNA 가 다양한 방법, 예컨대 완전한 또는 부분적인 사람 cDNA 또는 개시된 서열을 토대로 한 축퇴성 프로브의 하나 또는 둘 이상의 세트를 사용하여 프로빙함으로써 단리될 수 있다. cDNA 는 또한 본원에 개시된 대표적인 사람 zsig45 서열로부터 디자인된 프라이머를 사용하는 중합효소 연쇄 반응, 또는 PCR 을 사용하여 클론될 수 있다 (Mullis, 미국 특허 제 4,683,202 호). 추가의 방법에서, cDNA 라이브러리는 숙주 세포를 형질전환하기 위하여 사용될 수 있고, 관심의 cDNA 의 발현은 zsig45 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 유사한 기법이 또한 게놈 클론의 단리에 적용될 수 있다.

당업자는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4 에 나타난 서열이 사람 zsig45 유전자와 폴리펩티드의 단일 대립형질을 나타내고, 대립성 변이 및 대체 스플라이싱이 일어날 것으로 예상되는 것을 인지할 것이다. 이 서열의 대립성 변이체는 표준 과정에 따라 상이한 개체로부터의 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 프로빙함으로써 클론될 수 있다. SEQ ID NO: 1 에 도시된 DNA 서열의 대립성 변이체는 사일런트 돌연변이를 함유하고 있는 것들과 그 돌연변이로 인해아미노산 서열이 변화된 것을 포함하여, 본 발명의 범주내에 있으며, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4 의 대립성 변이체인 단백질들이다.

zsig45 폴리펩티드의 성질을 보유하고 있는, 대체 스플라이싱된 mRNA로부터 생성된 cDNA는, 그러한 cDNA 및 mRNA에 의해 코드화된 폴리펩티드와 같이, 본 발명의 범주내에 포함된다. 이들 서열의 대립성 변이체 및 스플라이스 변이체들은 상이한 개체 또는 조직으로부터 얻어지는 cDNA 또는 게놈 라이브러리, 예컨대 사람 갑상선 cDNA 라이브러리를 당해 기술분야에 공지된 표준 과정에 따라 프로빙함으로써 클론될 수 있다.

본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 및 SEQ ID NO: 4의 폴리펩티드 및 그것들의 사람 파라로그 또는 종 오르토로그에 실질적으로 상동하는 단리된 zsig45 폴리펩티드를 제공한다. 용어 "실질적으로 유사한"은 본원에서 SEQ ID NO: 2에 도시된 서열 또는 그것들의 파라로그 또는 오르토로그에 대해 50%, 바람직하게는 60%, 보다 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성을 가지고 있는 폴리펩티드를 규정하기 위하여 사용된다. 그러한 폴리펩티드들은 보다 바람직하게는 최소한 90%, 가장 바람직하게는 95% 또는 그 이상, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4 또는 그것의 파라로그 또는 오르토로그에 동일할 것이다. % 서열 동일성은 종래 방법에 의하여 측정된다 (예컨대 Altschul et al., Bull. Math. Bio., 48:603-616, 1986 및 Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, 1992). 간단하게 설명하면, 두 개의 아미노산 서열은 10의 갭 오픈링 페널티, 1의 갭 연장 페널티, 및 하기 표 3에 나타낸 바와 같은 헨니코프와 헨니코프의 "불로섬 62" 스코어링 매트릭스를 사용하여 배열 스코어를 최적화하기 위하여 배열된다 (아미노산은 표준 한-문자 코드로 표시된다). 그런 다음 % 동일성이 다음과 같이 계산된다:

$$\frac{\text{총 동일한 매치의 수}}{\text{보다 긴 서열의 길이} + \text{두 개의 서열을 배열하기 위하여 더 긴 서열에 도입된 갭의 수}} \times 100$$

[표 3]

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
R	-1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	-2	0	6	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	-2	-2	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	0	-3	-3	-3	9	0	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
Q	-1	1	0	0	-3	5	0	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
E	-1	0	0	2	-4	2	5	0	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	0	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-4	-4	-4	-4	-4
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-1	-1	-1
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	-1	-1	-1	-1
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	5	-2	-2	-2
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	-4	-3	-2	-2	11	2	2
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

폴리뉴클레오티드 분자의 서열 동일성은 상술된 바와 같은 비율을 사용하여 유사한 방법에 의하여 측정된다.

변이체 zsig45 폴리펩티드 또는 실질적으로 상동하는 zsig45 폴리펩티드는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 가지는 것을 특징으로 한다. 이들 변화는 바람직하게는 미미한 성질의 것, 즉 보존성 아미노산 치환 (표 4 참조) 및 폴리펩티드의 접힘 또는 활성에 유의할만하게 영향을 미치지 않는 다른 치환; 전형적으로 1 내지 약 30 아미노산의 작은 결실; 및 작은 아미노- 또는 카르복시-말단의 연장, 예컨대 아미노-말단 메티오닌 잔기, 약 20 내지 25 잔기까지의 작은 링커 펩티드, 또는 정제를 용이하게 하는 작은 연장 (친화성 태그), 예컨대 폴리-히스티딘 트랙, 단백질 A (Nilsson et al., EMBO J., 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol., 198:3, 1991), 글루타티온 S 트랜스페라제 (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), 말토오스 결합 단백질 (Kellerman and Ferenci, Methods Enzymol., 90:459-463, 1982; Guan et al., Gene 67:21-30, 1987), 티오레독신, 유비퀴틴, 셀룰로오스 결합 단백질, T7 중합효소, 또는 다른 항원성 에피토프 또는 결합 도메인이다 (Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991). 친화성 태그를 코드화하는 DNA는 상업적인 공급자들로부터 이용가능하다 (예컨대 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

그러므로 본 발명은 SEQ ID NO: 2 의 상응하는 영역에 최소한 80 %, 바람직하게는 최소한 90 %, 보다 바람직하게는 95 % 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 약 60 내지 약 150 아미노산 잔기로 이루어진 폴리펩티드를 포함한다. 친화성 태그를 포함하는 폴리펩티드는 나아가 zsig45 폴리펩티드와 친화성 태그 사이에 단백질 가수분해성 절단 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 그러한 부위들로는 트롬빈 절단 부위와 인자 Xa 절단 부위를 포함한다.

[표 4]

보존성 아미노산 치환

염기성	아르기닌 라이신 히스티딘
산성	글루탐산 아스파르트산
극성	글루타민 아스파라긴
소수성	로이신 이소로이신 발린
방향성	페닐알라닌 트립토판 티로신
작은 크기	글리신 알라닌 세린 트레오닌 메티오닌

본 발명의 단백질은 또한 비-천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 비-천연 발생 아미노산으로는 제한 없이, 트랜스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노프롤린, 시스-4-히드록시프롤린, 트랜스-4-히드록시프롤린, N-메틸글리신, 알로-트레오닌, 메틸트레오닌, 히드록시메틸시스테인, 히드록시메틸호모시스테인, 니트로글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, 티아졸리딘 카복실산, 데히드로프롤린, 3- 및 4-메틸프롤린, 3,3-디메틸프롤린, tert-로이신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 및 4-플루오로페닐알라닌이 있다. 단백질안으로 비-천연 아미노산 잔기를 통합시키는 여러 가지 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 넨센스 돌연변이가 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA 를 사용하여 억제되는 시험관내 시스템이 사용될 수 있다. 아미노산을 합성하고 tRNA 를 아미노아실화하는 방법들은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 넨센스 돌연변이를 함유하고 있는 플라스미드의 전사 및 번역은 대장균 S30 추출물 및 상업적으로 활용되는 효소 및 다른 시약을 포함하고 있는 세포-유리 시스템에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피에 의하여 정제된다 (Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Eilman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 359:806-809, 1993; 및 Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-10149, 1993). 두 번째 방법으로, 번역은 돌연변이된 mRNA 와 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA 를 미소주입함에 의해 제노푸스의 난모세포에서 수행된다 (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-19998, 1996). 세 번째 방법으로, 대장균 세포가 대체될 천연 아미노산 (예컨대 페닐알라닌)이 없이, 그리고 원하는 비-천연 발생 아미노산(들) (예컨대 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 또는 4-플로우로페닐알라닌)의 존재하에 배양된다. 비-천연 발생 아미노산은 그것의 천연 대응물 대신에 단백질안으로 통합된다 (Koide et al., Biochem. 33:7470-7476, 1994). 천연적으로 발생하는 아미노산 잔기들은 시험관내 화학적 변형에 의하여 비-천연 발생 종으로 전환될 수 있다. 화학적 변형은 치환의 범위를 추가로 확장시키기 위하여 부위-특정 돌연변이와 조합될 수 있다 (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

제한된 수의 비-보존성 아미노산, 유전자 코드에 의하여 코드화되지 않는 아미노산들, 비-천연적으로 발생하는 아미노산들, 및 비천연 아미노산들이 zsig45 아미노산 잔기대신 치환될 수 있다.

본 발명의 zsig45 폴리펩티드의 필수 아미노산들은 당해 기술분야에 공지되어 있는 과정, 예를 들면 부위-특정 돌연변이 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이생성법에 따라 확인될 수 있다 (Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085, 1989; Bass et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4498-4502, 1991). 후자의 기법에서, 신호 알라닌 돌연변이가 분자내의 매 잔기마다 도입되고, 그 결과 생성된 돌연변이 분자들은 분자의 활성에 중요한 아미노산 잔기들을 확인하기 위하여 하기에서 논의되는 바와 같이 (Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996), 생물학적 또는 생화학적 활성 (예컨대 zsig45 의 제자리 정위 또는 발현; 분비 및 이어지는 항체에 의한 검출; 또는 신호 변환 유형 검정에 의해 측정된 활성)에 대해 시험된다. 리간드-수용체 또는 다른 생물학적 상호작용의 부위들은 또한 구조의 물리적 분석에 의

해, 예컨대 핵 자기 공명, 결정학, 전자 회절 도는 광친화성 표지화와 같은 기법을 추정되는 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 함께 사용하여 측정함으로써 측정될 수 있다 (de Vos et al., Science 255:306-312, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992). 필수 아미노산의 정체는 또한 관련된 패밀리 구성원들과의 상동성의 분석으로부터도 추론될 수 있다.

다중 아미노산 치환이 돌연변이 및 스크리닝법, 예컨대 문헌에 기재되어 있는 공지의 방법들을 사용하여 만들어지고 시험될 수 있다 (Reidhaar-Olson and Sauer, Science 241:53-57, 1988; 또는 Bowie and Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989). 간단하게 설명하면, 상기 저자들은 폴리펩티드의 돌 또는 그 이상의 위치를 동시에 무작위화하고, 기능성 폴리펩티드를 선택한 후, 돌연변이된 폴리펩티드를 서열화하여 각각의 위치에서 허용되는 치환의 스펙트럼을 결정하는 방법을 개시하였다. 사용될 수 있는 다른 방법으로는 파지 디스플레이법 (예컨대 Lowman et al., Biochem. 30:10832-10837, 1991; Lander et al., 미국 특허 제 5,223,409 호; Huse, WIPO 공보 WO 92/06204) 및 영역-특정된 돌연변이 생성법 (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988)이 있다.

개시된 zsig45 DNA 및 폴리펩티드 서열의 변이체들은 문헌에 기재되어 있는 바와 같이 DNA 서플링에 의하여 생성될 수 있다 (Stemmer, Nature 370:389-391, 1994; Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751, 1994 및 WIPO 공보 WO 97/20078). 간단하게 설명하면, 변이체 DNA 는 모 DNA 의 무작위 단편화에 의한 시험관내 동종 재조합과 이어지는 PCR 을 사용하는 재어셈블리에 의해 생성되고, 그 결과 무작위적으로 점 돌연변이가 도입된다. 이 기법은 모 DNA 의 패밀리, 예컨대 상이한 종으로부터 얻어지는 대립성 변이체 또는 DNA 를 사용함으로써 변형되어서, 추가의 가변성이 과정안에 도입될 수 있다. 원하는 활성에 대한 선택 또는 스크리닝과, 이어서 추가의 돌연변이 생성 및 검정의 반복으로, 동시에 불리한 변화도 선택하면서 원하는 돌연변이를 선택함으로써 서열의 신속한 "평가" 가 제공된다.

본원에서 설명되는 것과 같은 돌연변이 생성법은 숙주 세포에서 클론되고 돌연변이된 폴리펩티드의 활성을 검출하기 위한 고-출력의 자동화된 스크리닝법과 조합될 수 있다. 활성 폴리펩티드를 코드화하는 돌연변이된 DNA 분자들 (예컨대 분비되고 항체에 의해 검출된; 또는 신호 변환 유형 검정에 의해 측정된) 은 숙주 세포로부터 회수될 수 있고, 현대적인 장비를 사용하여 신속하게 서열화될 수 있다. 이들 방법으로 관심의 폴리펩티드의 중요한 개별적인 아미노산 잔기의 신속한 측정이 가능해지며, 이들 방법은 미지의 구조를 가지고 있는 폴리펩티드에도 적용될 수 있다.

본원에서 논의되는 방법들을 사용하여, 당업자라면 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 또는 그것들의 대립성 변이체에 실질적으로 상동하고 야생형 단백질의 기능적 및 구조적 성질을 보유하고 있는 다양한 폴리펩티드를 확인하고 및/또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 상술된 방법들을 사용하여, 당업자는 zsig45 상에 있는 수용체 결합 도메인; zsig45 에 대한 수용체의 세포외재성 리간드-결합 도메인; 헤테로이량체성 또는 호모이량체성 결합 도메인; 다른 기능적 또는 구조적 도메인; 친화성 태그; 또는 단백질-단백질 상호작용 또는 신호 변환에 중요한 다른 도메인을 확인할 수 있다. 그러한 폴리펩티드들은 또한 일반적으로 상술된 바와 같은 친화성 태그와 같은 추가의 폴리펩티드 절편을 포함할 수 있다.

본 발명은 나아가 다양한 다른 폴리펩티드 융합물 및 하나 또는 둘 이상의 폴리펩티드 융합물을 포함하고 있는 관련된 다량체 단백질을 제공한다. 예를 들어, zsig45 폴리펩티드는 미국 특허 제 5,155,027 호 및 5,567,584 호에 개시되어 있는 바와 같은 이량체화 단백질에 대한 융합물로서 제조될 수 있다. 이런 견지에서 바람직한 이량체화 단백질로는 면역글로불린의 일정한 영역 도메인이 있다. 면역글로불린 zsig45 폴리펩티드 융합물은 다양한 다량체적인 zsig45 유사체를 생성하기 위하여 유전공학적으로 제조된 세포에서 발현될 수 있다. 보조 도메인들이 그것들을 특이한 세포, 조직, 또는 거대분자 (예컨대 콜라겐)에 대해 표적화하기 위하여 zsig45 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들어, zsig45 폴리펩티드 또는 단백질은 표적 세포의 표면에 있는 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드에 대해 zsig45 폴리펩티드를 융합시킴으로써 예정된 세포 유형에 표적화될 수 있었다. 이런 방법으로, 폴리펩티드와 단백질은 치료 또는 진단 목적을 위해 표적화될 수 있다. zsig45 폴리펩티드는 예컨대 정제를 위한 친화성 태그 및 표적화 도메인과 같은 돌 또는 그 이상의 부분들에 융합될 수 있다. 폴리펩티드 융합은 또한 하나 또는 둘 이상의 절단 부위, 특히 도메인들 사이에 있는 절단 부위를 포함할 수 있다 (Tuan et al., Connective Tissue Research 34:1-9, 1996).

변이체 및 융합 단백질을 포함하여, 어떠한 zsig45 폴리펩티드에 대해서도, 당업자는 상기 표 1 및 2 에 설명된 정보를 사용하여 그 변이체를 코드화하는 전체가 축퇴성인 폴리뉴클레오타이드 서열을 쉽게 생성할 수 있다.

본 발명의 zsig45 폴리펩티드는 전체-길이의 폴리펩티드, 생물학적으로 활성인 폴리펩티드, 및 융합 폴리펩티드를 포함하여 종래 기법에 따라 유전 공학적으로 제조된 숙주 세포에서 생성될 수 있다. 적당한 숙주 세포는 외인성 DNA 로 형질전환될 수 있고, 배양중에 성장할 수 있는 그러한 세포 유형으로, 박테리아, 진균 세포, 및 배양된 고등 진핵 세포를 예로 들 수 있다. 진핵 세포, 특히 다세포 유기체의 배양된 세포가 바람직하다. 클론된 DNA 분자를 조작하고 외인성 DNA 를 다양한 숙주 세포안에 도입시키는 기법은 샌브룩 등에 의해 개시되어 있다 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.).

일반적으로, 본 발명의 zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열은 발현 벡터내에 있는 그것의 발현에 필요한 다른 유전적 알레먼트, 예컨대 통상 전사 프로모터와 터미네이터에 작동가능하게 연결된다. 벡터는 또한 통상적으로 하나 또는 둘 이상의 선택가능한 마아커 및 하나 또는 둘 이상의 복제 기원을 함유하겠지만, 당업자는 특정한 시스템내에서 선택가능한 마아커는 별도의 벡터상에 제공될 수 있고, 외인성 DNA 의 복제는 숙주 세포 계통내로의 통합에 의하여 제공될 수 있음을 인지할 것이다. 프로모터, 터미네이터, 선택가능한 마아커, 벡터 및 다른 알레먼트들의 선택은 당업자의 수준내에 있는 기본적인 디자인의 문제이다. 많은 그러한 알레먼트들이 문헌에 기재되어 있으며, 상업적인 공급자들로부터 이용가능

하다.

zsig45 폴리펩티드를 숙주 세포의 분비 경로안에 특정시키기 위하여, 분비 신호 서열 (또한 분비 펩티드, 리더 서열, 프레프로 서열 또는 프레 서열로서도 공지됨)이 발현 벡터에 제공된다. 분비 신호 서열은 zsig45 폴리펩티드의 분비 신호 서열일 수 있으며, 또는 다른 분비된 단백질 (예컨대 t-PA)로부터 유도되거나 또는 새롭게 합성될 수도 있다. 분비 신호 서열은 zsig45 DNA 서열에 작동가능하게 연결된다. 즉, 두 개의 서열은 정확한 리딩 프레임에 결합되고 새롭게 합성된 폴리펩티드를 숙주 세포의 분비 경로안에 특정시키기 위하여 위치된다. 분비 신호 서열은 통상 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열에 대하여 5' 쪽에 위치하지만, 어떤 분비 신호 서열은 관심의 DNA 서열이 그 밖의 곳에 위치할 수도 있다 (Welch et al., 미국 특허 제 5,037,743 호; Holland et al., 미국 특허 제 5,143,830 호).

또는 달리, 본 발명의 폴리펩티드에 함유된 분비 신호 서열은 분비 경로안에 다른 폴리펩티드를 특정하기 위하여 사용된다. 본 발명은 그러한 신호 융합 폴리펩티드를 제공한다. 신호 융합 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 구성물은 분비 펩티드를 코드화하는 신호 서열이 SEQ ID NO: 2 에 나타난 ORF (SEQ ID NO: 2 의 아미노산 1 부터 46 까지), SEQ ID NO: 3 의 ORF (SEQ ID NO: 3 의 아미노산 1 부터 21 까지), 또는 SEQ ID NO: 4 의 ORF (SEQ ID NO: 4 의 아미노산 1 부터 17 까지)중 어느 하나로부터 유도되고, 당해 기술분야에 공지되어 있고 본원에서 개시된 방법들을 사용하여 다른 폴리펩티드에 작동가능하게 연결되도록 만들어질 수 있다. 본 발명의 융합 폴리펩티드에 함유된 분비 신호 서열은 바람직하게는 분비 경로안에 추가의 펩티드를 특정하기 위하여 추가의 펩티드에 대해 아미노-말단쪽으로 융합된다. 그러한 구성물은 당해 기술분야에서 많이 적용된다. 예를 들어, 이들 신규한 분비 신호 서열 융합 구성물은 정상적으로는 분비되지 않는 단백질의 활성 성분의 분비를 지시할 수 있다. 그러한 융합은 분비 경로를 통하여 펩티드가 지시되도록 시험관내에서 또는 생체내에서 사용될 수 있다.

배양된 포유동물 세포가 본 발명내의 적당한 숙주이다. 외인성 DNA 를 포유동물 숙주 세포안에 도입시키기 위한 방법으로는 인산 칼슘-중재된 형질전환 (Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973), 일렉트로포레이션 (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982), DEAE-덱스트란 중재된 형질전환 (Ausubel et al., 상기 동일), 및 리포솜-중재된 형질전환 (Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al., Focus 15:80, 1993), 및 바이러스 벡터이다 (A. Miller and G. Rosman, BioTechniques 7:980-990, 1989; Q. Wang and M. Finer, Nature Med. 2:714-716, 1996). 배양된 포유동물 세포에서 재조합 폴리펩티드를 제조하는 것은 개시되어 있으며, 예를 들면 레빈슨 등의 미국 특허 제 4,713,339 호; 하겐 등의 미국 특허 제 4,784,950 호; 팔미테르 등의 미국 특허 제 4,579,821 호; 및 링골드 등의 미국 특허 제 4,656,134 호에 의해 개시되어 있다. 적당한 배양 포유동물 세포로는 COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) 및 차이니스 햄스터 난소 (예컨대 CHO-K1; ATCC No. CCL 61) 셀라인이 있다. 추가의 적당한 셀라인은 당해 기술분야에 공지이며, 아메리칸 타이프 컬처 콜렉션 (Manassas, VA)과 같은 공인 기탁기관으로부터 활용가능하다. 일반적으로, 강한 전사 프로모터, 예컨대 SV-40 으로부터의 프로모터 또는 사이토메갈로바이러스로부터의 프로모터가 바람직하다 (미국 특허 제 4,956,288 호 참조). 다른 적당한 프로모터로는 메탈로티오네인 유전자로부터 유도된 프로모터 (미국 특허 제 4,579,821 호 및 4,601,978 호) 및 아데노바이러스 주요 후기 프로모터가 있다.

약물 선택은 일반적으로 그 안에 외래 DNA 가 삽입되어 있는 배양된 포유동물 세포를 선택하기 위하여 사용된다. 그러한 세포들은 통상 "형질전환체" 로 언급된다. 선택제의 존재하에 배양되고 관심의 유전자를 계대시킬 수 있는 세포들은 "안정한 형질전환체"로서 언급된다. 바람직한 선택가능한 마아커는 항생물질 네오마이신에 대한 내성을 코드화하는 유전자이다. 선택은 예컨대 G-418 등과 같은 네오마이신-형 약물의 존재하에 수행된다. 선택 시스템은 또한 "증폭"으로서 언급되는 과정인 관심의 유전자의 발현 수준을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다. 증폭은 형질전환체를 낮은 수준의 선택제의 존재하에 배양한 후 도입된 유전자의 생성물을 높은 수준으로 생성하는 세포에 대하여 선택하기 위한 선택제의 양을 증가시킴으로써 수행된다. 바람직한 증폭가능한 선택가능한 마아커는 디하이드로폴레이트 환원효소로, 이것은 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여한다. 다른 약물 내성 유전자 (예컨대 하이그로마이신 내성, 다중-약물 내성, 퓨로마이신 아세틸트랜스페라제)들도 또한 사용될 수 있다. 변경된 표현형을 도입하는 대체 마아커, 예컨대 녹색 형광 단백질, 또는 세포 표면 단백질, 예를 들어 CD4, CD8, 부류 I MHC, 태반 알칼리성 포스파타제가 형질전환되지 않은 세포로부터 형질전환된 세포를 예컨대 FACS 분류 또는 자기 비드 분리 기법과 같은 수단에 의하여 분리하기 위하여 사용될 수 있다.

식물 세포, 곤충 세포 및 조류 세포를 포함한 다른 고등 진핵 세포들이 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 아그로박테리움 리조게네스를 식물 세포에서 유전자 발현을 위한 벡터로서 사용하는 것이 문헌에 설명되어 있다 (Sinker et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987; WIPO 공보 WO 94/06463). 곤충세포의 형질전환 및 그 안에서의 외래 폴리펩티드의 생성도 역시 문헌에 설명되어 있다 (Guarino et al., 미국 특허 제 5,162,222 호; Bang et al., 미국 특허 제 4,775,624 호; 및 WIPO 공보 WO 94/06463). 식물 세포에서 유전자 발현을 위한 벡터로서의 아그로박테리움 리조게네스의 사용은 싱커 등에 의해 문헌에 기재되어 있다 (Sinker et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987).

효모 세포, 특히 사카로마이세스 속에 속하는 세포들을 포함한 진균 세포들도 또한 본 발명의 범주내에서, 예컨대 zsig45 폴리펩티드, zsig45 폴리펩티드 단편 또는 폴리펩티드 융합물을 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 곤충 세포에 대한 방법은 재조합 배콜로바이러스, 통상적으로는 Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) 로 감염될 수 있다 (King, L.A. and Possee, R.D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R. et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; 및 Richardson, C.D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995). 재조합 zsig45 배콜로바이러스를 제조하는 두 번째 방법은 루코프에 의해 설명된 바와 같이 트랜스포존-기초 시스템을 활용한다 (Luckow, V.A. et al., J. Virol. 67:4566-

4579, 1993). 전달 벡터를 활용하는 이 시스템은 Bac-to-BacTM 키트로서 시판된다 (Life Technologies, Rockville, MD). 이 시스템은 대장균에서 "백미드"로 불리는 큰 플라스미드로서 유지되는 배콜로바이러스 계통안에 zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 를 이동시키기 위한 Tn7 트랜스포존을 함유하고 있는 전달 벡터, pFastBac1TM (Life Technologies)을 활용한다 (Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning, B.C. et al., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; 및 Chazenbalk, G.D., and Rapoport, B., J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995). 또한, 전달 벡터는 발현된 zsig45 폴리펩티드의 C- 또는 N-말단에 에피토프 태그, 예컨대 Glu-Glu 에피토프 태그 (Grussenmyer, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7952-7954, 1985)를 코드화하는 DNA 와의 프레임내 융합을 포함하고 있다. 당해 기술분야에 공지되어 있는 기법을 사용하여 zsig45 를 함유하고 있는 전달 벡터는 대장균안에 형질전환되고, 재조합 배콜로바이러스를 나타내는 게재된 lacZ 유전자를 함유하는 백미드에 대해 스크리닝된다. 재조합 배콜로바이러스 계통을 함유하고 있는 백미드 DNA 가 통상적인 기법을 사용하여 단리되고, Spodoptera frugiperda 세포, 예컨대 Sf9 세포를 형질전환하기 위하여 사용된다. zsig45 를 발현하는 재조합 바이러스가 계속해서 제조된다. 재조합 바이러스 스톱은 통상적으로 사용되는 당해 기술분야의 방법에 의하여 제조된다.

재조합 바이러스는 숙주 세포, 전형적으로는 가을의 조방나방류 유충인 스포돔테라 프루기페르다로부터 유도된 셀라인을 감염시키기 위하여 사용된다 (일반적으로 Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994). 다른 적당한 셀라인은 Trichoplusia ni 로부터 유도된 High Five0 셀라인 (Invitrogen) (미국 특허 제 5,300,435 호)이다. 상업적으로 활용가능한 형질-유리 배지가 세포를 성장시키고 유지시키기 위하여 사용된다. 적당한 배지는 Sf9 세포에 대해서는 Sf900 IITM (Life Technologies) 또는 ESF 921TM (Expression Systems)이고; T. ni 세포에 대해서는 Ex-cell405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 또는 Express Five0TM (Life Technologies)이다. 세포들은 대략 2 내지 5×10^5 세포의 접종 밀도로부터 1 내지 2×10^6 세포의 밀도로 성장되고, 후자의 밀도에 도달되었을 때 재조합 바이러스 스톱이 0.1 내지 10, 보다 전형적으로는 거의 3 의 감염 다중도 (MOI)로 첨가된다. 사용된 과정은 일반적으로 활용가능한 실험실 매뉴얼에 설명되어 있다 (King, L.A. and Possee, R.D., 상기 동일; O'Reilly, D.R., et al., 상기 동일; Richardson, C.D., 상기 동일). 계속해서 상층액으로부터 zsig45 폴리펩티드를 정제하는 것은 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 이루어질 수 있다.

효모 세포를 포함하여 진균 세포가 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 이런 견지에서 특히 관심을 끄는 효모 종으로는 Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, 및 Pichia methanolica 가 있다. 사카로마이세스 세레비시애 세포를 외인성 DNA 로 형질전환시키고 그것으로부터 재조합 폴리펩티드를 제조하는 방법은 문헌에 개시되어 있다 (예를 들면 Kawasaki, 미국 특허 제 4,599,311 호; Kawasaki, 미국 특허 제 4,931,373 호; Brake, 미국 특허 제 4,870,008 호; Welch et al., 미국 특허 제 5,037,743 호; 및 Murray et al., 미국 특허 제 4,845,075 호). 형질전환된 세포들은 선택가능한 마아커, 통상 약물 내성 또는 특정 영양분 (예컨대 로이신)이 없을 때 성장할 수 있는 능력에 의해 측정된 표현형에 의해 선택된다. 사카로마이세스 세레비시애에서 사용하기에 바람직한 벡터 시스템은 가와사키 등의 미국 특허 제 4,931,373 호에 개시되어 있는 POT1 벡터 시스템으로, 이것은 형질전환된 세포가 글루코스-함유 배지에서 성장에 의해 선택되는 것을 가능하게 한다. 효모에서 사용하기에 적당한 프로모터 및 터미네이터로는 당분해 효소 유전자로부터 얻어지는 것들 (예컨대 Kawasaki, 미국 특허 제 4,599,311 호; Kingsman et al., 미국 특허 제 4,615,974 호; 및 Bitter, 미국 특허 제 4,977,092 호) 및 알코올 데히드로게나제 유전자로부터 얻어지는 것들이 있다 (미국 특허 제 4,990,446 호; 5,063,154 호; 5,139,936 호 및 4,661,454 호). 다른 효모들, 예컨대 Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Ustilago maydis, Pichia pastoris, Pichia methanolica, Pichia guilliermondii 및 Candida maltosa 를 위한 형질전환 시스템이 당해 기술분야에 공지되어 있다 (Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986 및 Clegg, 미국 특허 제 4,882,279 호). 아스페르길루스 세포들도 맥나이트 등의 미국 특허 제 4,935,349 호의 방법에 따라 활용될 수 있다. 아크레모니움 크리소게눔을 형질전환시키기 위한 방법은 스미노 등의 미국 특허 제 5,162,228 호에 개시되어 있다. 뉴로스포라를 형질전환시키기 위한 방법은 람보비츠의 미국 특허 제 4,486,533 호에 개시되어 있다.

재조합 단백질의 생성을 위한 숙주로서 피치아 메타놀리카를 사용하는 것은 WIPO 공보 WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, 및 WO 98/02565 에 개시되어 있다. 피치아 메타놀리카를 형질전환시키는 데 사용하기 위한 DNA 분자들은 통상 이중-가닥의 원형 플라스미드로서 제조될 것이며, 그것은 형질전환전에 선형화되는 것이 바람직하다. 피치아 메타놀리카에서 폴리펩티드를 제조하기 위해서는, 플라스미드의 프로모터 및 터미네이터가 피치아 메타놀리카 유전자의 그것들, 예컨대 피치아 메타놀리카 알코올 활용 유전자 (AUG1 또는 AUG2)의 그것들인 것이 바람직하다. 다른 유용한 프로모터로는 디히록시아세톤 합성효소 (DHAS), 포르메이트 데히드로게나제 (FMD), 및 카탈라제 (CAT) 유전자의 프로모터가 있다. DNA 가 숙주 염색체 안으로 통합되는 것을 용이하게 하기 위하여, 숙주 DNA 서열이 양 쪽 단부에 위치한 플라스미드의 완전한 발현 절편을 가지는 것이 바람직하다. 피치아 메타놀리카에서 사용하기에 바람직한 선택가능한 마아커는 피치아 메타놀리카 ADE2 유전자로, 이것은 포스포리보실-5-아미노이미다졸 카르복실라제 (AIRC; EC 4.1.1.21)를 코드화하며, ade2 숙주 세포가 아데닌 없이 성장하는 것을 가능하게 한다. 대규모를 위해서는, 메탄올의 사용을 최소화하는 것이 바람직한 산업 과정의 경우에, 두 개의 메탄올 활용 유전자 (AUG1 및 AUG2)가 결실되어 있는 숙주 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 분비된 단백질의 생성을 위해서는, 공포 (액포)의 프로테아제 유전자 (PEP4 및 PRB1)가 결핍된 숙주 세포가 바람직하다. 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 를 함유하고 있는 플라스미드의 피치아 메타놀리카 세포안으로의 도입을 용이하게 하기 위하여 일렉트로포레이션이 사용된다. 장의 세기가 2.5 내지 4.5 kV/cm, 바람직하게는 약 3.75 kV/cm 이고, 시간 상수 (t)가 1 내지 40 밀리초, 가장 바람직하게는 약 20 밀리초인, 지수적으로 감소하고, 펄스된 전기장을 사용하는 일렉트로포레이션에 의하여 피치아 메타놀리카 세포를 형질전환

하는 것이 바람직하다.

형질전환된 (원핵 또는 진핵) 세포들은 종래 과정을 따라 영양분 및 선택된 숙주 세포의 성장에 필요한 다른 성분들이 함유되어 있는 배양 배지에서 배양된다. 규정된 배지 및 복합 배지를 포함하여, 적당한 배지가 당해 기술분야에 공지되어 있고, 일반적으로 배지는 탄소 공급원, 질소 공급원, 필수 아미노산, 비타민 및 미네랄을 포함하고 있다. 배지는 또한 필요에 따라 성장 인자 또는 혈청과 같은 성분들을 함유할 수 있다. 성장 배지는 일반적으로 외래적으로 첨가된 DNA 를 함유하고 있는 세포들을, 예컨대 약물 선택 또는 발현 벡터상에 운반된 또는 숙주 세포안으로 함께 형질전환된 선택가능한 마아커에 의하여 보존된 필수 영양분의 결핍에 의하여 선택할 것이다. 피치아 메타놀리카 세포는 적당한 탄소, 질소 및 미량 영양소의 공급원을 포함하고 있는 배지에서 약 25 내지 35 °C 의 온도에서 배양된다. 액체 배양물에는 종래 방법에 의해, 예컨대 작은 플라스크의 진동 또는 발효기의 스파징에 의해 충분한 공기가 제공된다. 피치아 메타놀리카에 대하여 바람직한 배양 배지는 YEPD (2 % 의 D-글루코스, 2 % 의 Bacto™ 펩톤 (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1 % 의 Bacto™ 효모 추출물 (Difco Laboratories), 0.004 % 의 아데닌 및 0.006 % 의 L-로이신)이다.

박테리아 대장균, 바실루스 및 다른 속의 스트레인을 포함하여 원핵 숙주 세포가 또한 본 발명내의 유용한 숙주 세포이다. 이들 숙주를 형질전환시키고 그 안에 클론된 외래 DNA 서열을 발현시키는 기법들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (예컨대 Sambrook et al., 상기 동일). 대장균과 같은 박테리아에서 zsig45 폴리펩티드가 발현될 때에는, 폴리펩티드는 세포질안에, 전형적으로는 불용성 과립으로서 보유될 수 있거나, 또는 박테리아 분비 서열에 의하여 말초 공간으로 지정될 수 있다. 전자의 경우, 세포들이 용해되고, 과립이 회수되며, 예를 들어 구아닌딘 이소티오시아네이트 또는 우레아를 사용하여 변성된다. 그런 다음 변성된 폴리펩티드가 다시 접히고 변성제를 희석시킴, 예컨대 우레아 용액 및 환원 및 산화된 글루타티온의 조합에 대하여 투석하고, 이어서 완충된 식염 용액에 대하여 투석함으로써 이량체화될 수 있다. 후자의 경우, 폴리펩티드는 말초 공간으로부터 가용성의 기능적 형태로, 세포를 파괴하여 (예컨대 초음파 처리 또는 삼투 충격에 의하여) 말초 공간의 내용물을 방출시키고, 단백질을 회수함으로써 회수될 수 있고, 이 과정에 의해 변성 및 재접합의 필요가 제거된다.

본 발명의 폴리펩티드는 오염시키는 거대분자, 특히 다른 단백질 및 핵산과 관련하여, 80 % 이상의 순도로, 보다 바람직하게는 90 % 이상의 순도로, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 순도로 정제되는 것이 바람직하며, 특히 바람직하게는 약학적으로 순수한 상태로, 즉 99.9 % 이상 순수하게 정제되는 것이 좋으며, 감염성 병원체 및 발열성 병원체가 없는 것이 좋다. 바람직하게도, 정제된 폴리펩티드는 실질적으로 다른 폴리펩티드, 특히 다른 동물 기원의 폴리펩티드가 없다.

발현된 재조합 zsig45 폴리펩티드 (키메라 또는 융합 zsig45 폴리펩티드를 포함하여)는 분획화 및/또는 종래의 정제 방법 및 배지를 사용하여 정제될 수 있다. 황산 암모늄 침전법 및 산 또는 케이오트로프 추출법이 샘플의 분획화를 위하여 사용될 수 있다. 예시적인 정제 단계로는 히드록시아파타이트, 크기 축출, FPLC 및 역-상 고 성능 액체 크로마토그래피가 있다. 적당한 크로마토그래피 배지로는 유도체화된 덱스트란, 아가로스, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 특수 실리카, 등이 있다. PEI, DEAE, QAE 및 Q 유도체가 바람직하다. 예시적인 크로마토그래피 배지로는 페닐, 부틸, 또는 옥틸기로 유도체화된 배지, 예를 들어 페닐-세파로스 FF (Pharmacia), 도요퍼울 부틸 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), 옥틸-세파로스 (Pharmacia) 등; 또는 폴리아크릴 수지, 예컨대 Amberchrom CG 71 (Toso Haas) 등이 있다. 적당한 고체 지지체로는 유리 비드, 실리카-기초 수지, 셀룰로스성 수지, 아가로스 비드, 교차-결합된 아가로스 비드, 폴리스티렌 비드, 교차-결합된 폴리아크릴아미드 수지 등이 있으며, 이것들은 그것들이 사용될 조건하에서 불용성이다. 이들 지지체는 아미노기, 카르복실기, 술폰히드릴기, 히드록실기 및/또는 탄수화물 부분에 의한 단백질의 부착을 허용하는 반응성 기로 변형될 수 있다. 예시적인 커플링 화학으로는 시아노겐 브로마이드 활성화, N-히드록시숙신이미드 활성화, 에폭시드 활성화, 술폰히드릴 활성화, 히드라지드 활성화, 및 카르보디이미드 커플링 화학을 위한 카르복실 및 아미노 유도체가 있다. 이들 및 다른 고체 배지는 잘 알려져 있으며 당해 기술분야에서 널리 사용되고 있고, 상업적인 공급업자로부터 활용가능하다. 리간드 또는 수용체 폴리펩티드를 지지체 배지에 결합시키는 방법은 당해기술분야에 잘 알려져 있다. 특정 방법의 선택은 기본적인 문제이며, 부분적으로는 선택된 지지체의 성질에 따라 결정된다 (Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988).

본 발명의 폴리펩티드는 그것들의 구조 및 생물학적 성질의 개발에 의하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 단순한 이온 교환 크로마토그래피 및 역-상 HPLC 및/또는 겔 여과 크로마토그래피가 이런 크기와 pI 의 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. 다른 방법들도 사용될 수 있다. 예를 들어, 고정된 금속 이온 흡착 (IMAC) 크로마토그래피가 폴리히스티딘 태그를 포함하고 있는 단백질을 포함하여 히스티딘-풍부 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있다. 간단하게 설명하면, 겔이 먼저 이가의 금속 이온으로 하전되어 킬레이트가 형성된다 (E. Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1-7, 1985). 히스티딘-풍부 단백질은 이 매트릭스에 사용되는 금속 이온에 따라 다른 친화성으로 흡착될 것이고, pH 를 낮추는 경합성 용출, 또는 강한 킬레이트화제의 사용에 의하여 용출될 것이다. 다른 정제 방법으로는 렉틴 친화성 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에 의한 글리코실화된 단백질의 정제가 있다 (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-539). 발명의 추가의 구체예에서, 관심의 폴리펩티드와 친화성 태그 (예컨대 폴리히스티딘, 말토스-결합 단백질, 면역글로불린 도메인)의 융합이 정제를 용이하게 하기 위하여 구성될 수 있다.

더욱이, 당해 기술분야에 기재되어 있는 방법을 사용하여, 폴리펩티드 융합, 또는 하이브리드 zsig45 단백질은 발명의 zsig45 폴리펩티드의 영역 또는 도메인을 다른 사람 2-19 패밀리 단백질 (예컨대 사람 2-19, D87120, 및 쥐의 EF-7)의 영역 또는 도메인과, 또는 이중성 단백질과 함께 사용함으로써 구성된다 (Sambrook et al., 상기 동일; Altschul et al., 상기 동일; Picard. D. Cur. Opin. Biology, 5:511-515, 1994). 이들 방법으로 관심의 폴리펩티드의 더 큰 영역 또는 도메인의 생물학적 중요성을 측정하는 것이 가능해진다. 그러한 하이브리드는 반응 역학, 결합을 변경시키거나, 기질 특이성을 제한 또는 확장

시키거나, 또는 폴리펩티드의 조직 또는 세포내 정위를 변경시키고, 이러한 것은 미지의 구조를 가지는 폴리펩티드에도 적용될 수 있다.

융합 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 방법에 의하여, 각각의 융합 성분을 준비하고 그것들을 화학적으로 결합시킴으로써 제조될 수 있다. 또는 다르게는, 적절한 리딩 프레임내에 있는 융합 단백질의 하나 또는 둘 이상의 성분을 코드화하는 폴리뉴클레오타이드는 공지의 기법에 의하여 생성되고 본원에 기재된 방법에 의하여 발현될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 기능을 부여하는 도메인(들)의 부분 또는 전부가, 다른 패밀리 구성원 또는 이중성 단백질로부터 얻어진 기능적으로 동등한 도메인(들)로 본 발명의 zsig45 과 교체될 수 있다. 그러한 도메인은 그것에 한정되지는 않지만, 다음의 개시된 세가지를 포함한다: 분비 신호 서열, 성숙한 단백질 및 보존된 모티프. 그러한 융합 단백질은 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성되는 융합에 따라 그것들이 융합되는 단백질에 동일한 또는 유사한 생물학적 기능적 프로필을 가지고 있을 것으로 예상된다. 더욱이, 그러한 융합 단백질은 본원에 개시되는 바와 같은 다른 성질을 나타낸다.

표준 분자 생물학 및 클로닝 기법이 zsig45 폴리펩티드와 그것들이 융합될 그런 폴리펩티드 사이에 동등한 도메인을 교환하기 위하여 사용될 수 있다. 일반적으로, 관심의 도메인, 예컨대 본원에 개시된 zsig45 도메인을 코드화하는 DNA 절편은 추가의 폴리펩티드를 코드화하는 최소한 하나의 다른 DNA 절편 (예를 들면 사람 2-19 단백질의 유사한 도메인 또는 영역)에 프레임내에서 작동가능하게 연결되며, 본원에 기술되는 바와 같이 적절한 발현 벡터안에 삽입된다. 일반적으로, DNA 구성물은 폴리펩티드의 상응하는 영역을 코드화하는 여러 개의 DNA 절편이 프레임내에서 완전한 융합 단백질, 또는 그것의 기능성 부분을 코드화하는 단일 구성물을 만들기 위하여 작동가능하게 연결되도록 제조된다. 예를 들어, DNA 구성물은 신호 폴리펩티드와 이어지는 성숙한 폴리펩티드를 포함하고 있는 융합 단백질을 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 코드화할 것이다; 또는 DNA 구성물은 신호 폴리펩티드와, 이어서 그것들이 zsig45 폴리펩티드에 나타난 순서대로 모티프 1 내지 5 를 포함하고 있는 영역, 또는 이중성 단백질, 예컨대 사람 2-19 단백질로부터 얻어지는 동등한 영역을 포함하고 있는 융합 단백질을 N-말단으로부터 C-말단 쪽으로 코드화할 것이다. 그러한 융합 단백질은 본원에서 설명되는 바와 같이 발현되고, 분리되고, 검정될 수 있다.

zsig45 폴리펩티드 또는 그것의 단편은 또한 화학적 합성법을 통하여 제조될 수 있다. Zsig45 폴리펩티드는 단량체일 수도 있고 다량체일 수도 있으며; 글리코실화될 수도 있고 글리코실화되지 않을 수도 있고; 폐길화될 수도 있고 폐길화되지 않을 수도 있으며; 개시 메티오닌 아미노산 잔기를 함유할 수도 그렇지 않을 수도 있다.

본 발명의 분자들의 활성은 갑상선, 심장혈관 및 뼈 기능을 측정하는 다양한 검정에 의해 측정될 수 있다. 특히 관심있는 것은 대사, 갑상선 또는 하수체 호르몬 분비, 및 뼈 흡수 및 형성 검정이다. 그러한 검정은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.

이러한 zsig45 폴리펩티드에 대해 관찰된 조직 분포의 견지에서, 아고니스트 (천연 수용체/ 기질/ 보조인자/ 등을 포함하여) 및 길항체들은 시험관내 및 생체내 적용에 모두 많은 가능성을 가지고 있다. zsig45 폴리펩티드, 그것의 단편 또는 zsig45 아고니스트, 길항체로서 확인된 화합물들은 시험관 내에서의 다양한 세포유형의 성장, 증식 또는 분화를 촉진하고, 생체내에서 갑상선외 또는 갑상선 장애의 치료에 유용할 것이다. 예를 들어, 그러한 화합물들은 규정된 세포 배양 배지의 성분으로서 유용하고, 단독으로 또는 통상 세포 배양에 사용되는 혈청을 대체하기 위한 다른 사이토킨 및 호르몬과 조합되어 사용될 수 있다.

다른 구체예에서, 본 발명에는 zsig45 폴리펩티드에 반응하는 세포를 제공하는 단계, 시험 화합물의 존재하에 세포의 첫 번째 부분을 배양하는 단계, 시험 화합물의 부재하에 세포의 두 번째 부분을 배양하는 단계, 그리고 세포의 두 번째 부분과 비교하여 세포의 첫 번째 부분의 세포성 반응의 증가를 검출하는 단계로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드의 길항체를 확인하는 방법이 제공된다. 다른 구체예에서, 본 발명에는 zsig45 폴리펩티드에 반응하는 세포를 제공하는 단계, zsig45 폴리펩티드의 존재하에 세포의 첫 번째 부분을 배양하는 단계, zsig45 폴리펩티드의 존재하에 세포의 두 번째 부분을 배양하는 단계, 그리고 세포의 첫 번째 부분과 비교하여 세포의 두 번째 부분의 세포성 반응의 감소를 검출하는 단계로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드의 길항체를 확인하는 방법이 제공된다.

본 발명의 분자들은 갑상선, 하수체, 심장에 포함된 수용체, 또는 생체내에서 그것에 zsig45 폴리펩티드가 결합하는 다른 기능을 확인하고 분리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단백질 및 펩티드들은 칼럼위를 가로질러 칼럼 및 막 제제상에 고정될 수 있다 (Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, 195-202). 단백질 및 펩티드들은 또한 방사성 표지되거나 (Methods in Enzymol., vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737) 또는 광친화성 표지되고 (Brunner et al., Ann. Rev. Biochem. 62:483-514, 1993 및 Fedan et al., Biochem. Pharmacol. 33:1167-1180, 1984), 특이한 세포-표면 단백질이 확인될 수 있다.

리간드로서, zsig45 폴리펩티드의 활성은 수용체 결합 및 후속되는 물리적 세포 반응과 관련된 세포외재성 산성화 비율 또는 양성자 배출을 측정하는 실리콘-기초 바이오센서 미소생리측정계에 의해 측정될 수 있다. 예시적인 장치는 Molecular Devices (Sunnyvale, CA)에 의해 제조되는 CytosensorTM Microphysiometer 이다. 다양한 세포성 반응, 예컨대 세포 증식, 이온 수송, 에너지 생성, 염증 반응, 조절 및 수용체 활성화, 등이 이 방법에 의해 측정될 수 있다 (McConnell, H.M. et al., Science 257:1906-1912, 1992; Pitchford, S. et al., Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli, S. et al., J. Immunol. Meth. 212:49-59, 1998; Van Liefde, I. et al., Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998). 미소생리측정계는 점착성 또는 비-점착성 진핵 또는 원핵 세포를 검정하기 위해 사용될 수 있다. 시간의 경과에 따라 세포 배지의 세포외재성 산성화의 변화를 측정함으로써, 미소생리측정계는 zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트, 또는 길항체를 포함하여 다양한 자극에 대한 세포 반응을 직접 측정하게 된다.

다. 바람직하게도, 미소생리적측정계는 zsig45 폴리펩티드에 대하여 반응하지 않는 대조 진핵 세포와 비교하여, zsig45 폴리펩티드에 반응하는 진핵 세포의 반응을 측정하는 데 사용될 수 있다. Zsig45-반응성 진핵 세포로는 zsig45 에 대한 수용체가 형질전환되었고 zsig45 에 대하여 반응하는 세포를 생성하는 세포; 또는 예컨대 다른 것들 중에서도 갑상선, 심장, 하수체, 시상하부, 뼈, 골수 및 골격근 조직으로부터 유도된 세포와 같은 zsig45 에 대하여 자연적으로 반응하는 세포들이다. 변화에 의해 측정된 차이, 예를 들어 zsig45 에 대하여 반응하지 않는 대조표준과 비교하여, zsig45 폴리펩티드에 노출된 세포들의 반응에서 나타나는 세포외재성 산성화의 증가 또는 감소는 zsig45-조절된 세포성 반응의 직접적인 척도이다. 더욱이, 그러한 zsig45-조절된 반응들은 다양한 자극하에 검정될 수 있다. 미소생리적측정계를 사용함으로써, zsig45 폴리펩티드에 대하여 반응하는 세포를 제공하는 단계, 시험 화합물의 부재하에 세포의 첫 번째 부분을 배양하는 단계, 시험 화합물의 존재하에 세포의 두 번째 부분을 배양하는 단계, 그리고 세포의 첫 번째 부분과 비교하여 세포의 두 번째 부분의 세포성 반응의 변화, 예를 들면 증가 또는 감소를 검출하는 단계로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드의 아고니스트를 확인하는 방법이 제공된다. 세포성 반응의 변화는 세포외재성 산성화 비율의 측정가능한 변화로서 나타난다. 더욱이, zsig45 폴리펩티드의 존재하에 및 시험 화합물의 부재하에 세포의 세 번째 부분을 배양하는 것이, zsig45-반응성 세포에 대한 포지티브 대조표준으로서, 및 zsig45 폴리펩티드의 아고니스트 활성과 시험 화합물의 아고니스트 활성을 비교하기 위한 대조표준으로서 사용될 수 있다. 또한, 미소생리적측정계를 사용함으로써, zsig45 폴리펩티드에 대하여 반응하는 세포를 제공하는 단계, zsig45 의 존재하에 및 시험 화합물의 부재하에 세포의 첫 번째 부분을 배양하는 단계, zsig45 의 존재하에 및 시험 화합물의 존재하에 세포의 두 번째 부분을 배양하는 단계, 그리고 세포의 첫 번째 부분과 비교하여 세포의 두 번째 부분의 세포성 반응의 변화, 예를 들면 증가 또는 감소를 검출하는 단계로 이루어지는, zsig45 폴리펩티드의 길항체를 확인하는 방법이 제공된다. 세포성 반응의 변화는 세포외재성 산성화 비율의 측정가능한 변화로서 나타난다. zsig45 폴리펩티드에 대한 길항체 및 아고니스트는 이 방법을 사용하여 신속하게 확인될 수 있다.

더욱이, zsig45 는 zsig45-자극된 경로에 대하여 반응하는 세포, 조직, 또는 셀라인을 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 상술된 미소생리적측정계가 리간드-반응성 세포, 예컨대 본 발명의 zsig45 에 반응하는 세포를 신속하게 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 세포들은 zsig45 폴리펩티드의 존재 또는 부재하에 배양될 수 있다. zsig45 의 존재하에 세포외재성 산성화에 측정가능한 변화를 유도하는 그런 세포들이 zsig45 에 대하여 반응한다. 그러한 셀라인들은 상술된 바와 같이 zsig45 폴리펩티드의 길항체 및 아고니스트를 확인하기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및/또는 항체들은 갑상선 기능장애와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 갑상선, 심장 및 뼈와 같은 다양한 조직에서 병리학적 상태의 발생을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 특히, 어떤 증후군에서는, 질병, 예컨대 본원에 개시된 것들 중에서도 갑상선 질환, 허혈성 재관류 손상, 염증성 질환이 그러한 진단, 치료 또는 예방의 처리를 받기 쉽다.

본 발명의 분자들의 활성은 예를 들어 수용체에 결합시 신호변환, 시험관내 및 생체내 갑상선 호르몬 분비, 뼈 손실, TSH 활성, 또는 항체 결합을 측정하는 다양한 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, zsig45 폴리펩티드는 표지화될 수 있고 특이한 셀라인 또는 세포에 대한 특이적이고 포화시키는 결합에 대해 시험될 수 있다. zsig45 가 결합하는 포지티브 세포의 확인은 방사능 또는 형광-표지된 zsig45 폴리펩티드를 주사하고 zsig45 가 결합하는 곳인 생체내 세포 또는 조직을 가시화하기 위하여 당해 기술분야에서 인지된 면역조직학적 방법을 사용함으로써 이루어질 수 있다. zsig45 가 결합하는 포지티브 세포가 확인된 후, 당해 기술분야에 공지되어 있는 방법을 사용하여 신호 변환 경로의 zsig45-중재된 활성화에 대해 활성이 시험될 수 있다. 예를 들어, 리포터 (예컨대 SRE-루시페라제, STAT-루시페라제, 갑상선 호르몬 반응 요소 (THRE)-루시페라제 등)를 함유하고 있는 벡터 구성물은 포지티브 셀라인에 도입될 수 있고; 그러한 셀라인들은 분비된 zsig45 단백질질을 함유하고 있는 조건 배지에 노출될 때, 측정가능한 리포터의 활성화를 통한 zsig45-중재된 신호 변환 활성을 증명할 것이다. 그러한 검정은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 특정 검정으로는 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 신호 변환을 측정하는 생체내 검정이 있다.

본 발명의 분자들은 그것들의 효과를 갑상선에서 또는 갑상선 외부에서 나타낼 수 있다. 그러므로, zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트 또는 길항체의 활성은 갑상선 기능에 영향을 미칠 것이며, 시험관내에서 갑상선 호르몬을 평가하거나 또는 생체내에서 갑상선 기능을 평가함으로써 측정될 수 있다. 갑상선 호르몬, 및 zsig45 가 있을 때와 없을 때의 갑상선 호르몬 분비의 변화는 당해 기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의하여 검출될 수 있다. 예를 들어, TSH 및 다른 갑상선 호르몬들은 통상 방사성 면역 검정 (RIA), "샌드위치" 형 검정을 사용하는 면역측정 (IMA), 또는 ELISA 에 의하여 측정된다. T3 및 T4 를 포함한 호르몬들은 당해 기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의하여 생체내에서 측정될 수 있다 (Elkines, R., Endocr. Rev., 11:5-46, 1990). 예를 들어, T4 는 방사성측정용¹²⁵I 결합 검정, 투석 및 한외여과를 사용하여 측정될 수 있다 (Braverman, L. E. (Ed.), 상기 동일, p. 35-48).

또한, 본 발명의 zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트 또는 길항체는, T4 를 말초 영역에서 T3 로 전환시키는 혈장 막 단백질인 요오도타이론 5'-모노데이오디나제 타이프-II (5'D-II)를 조절할 수 있다. 그러한 효과는 본원에서 논의된 바와 같이 T4 또는 T3 를 평가함으로써 생체내에서 간접적으로, 또는 5'D-II 활성을 측정함으로써 직접적으로 측정될 수 있다. 더욱이, 간에서의 5'-데이오디나제 타이프-I (5'D-I)에 의한 T3 제거의 효과도 생체내적으로 평가될 수 있다 (Braverman, L.E. (Ed.), 상기 동일, p.49-68).

더욱이, 갑상선 기능에 미치는 zsig45 폴리펩티드의 생체내 효과는 또한 실험 동물 또는 사람에서 초음파, 방사성 요오드 흡수 및 미세한 바늘 흡인 생검에 의해 평가될 수 있다 (Braverman, L.E. (Ed.), 상기 동일, p.35-48).

갑상선 기능부전 및 현재 그것과 관련된 일부의 치료법은 생체내에서 뼈에 불리한 효과를 유도할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 갑상선 및 하수체에서의 위치가 정해지면, 뼈 형성 및/또는 흡수를 측정하는 검정이 zsig45 활성을 평가하는 중요한 검정이다. 한 가지 실예는 칼시토닌 수용체를 발현하는 세포에

대하여 선택적인 칼시토닌 수용체 활성을 가지고 있는 물질의 신속한 확인을 가능하게 하는 검정 시스템이다. 칼시토닌 수용체는 G-단백질 수용체 패밀리의 구성원이고, 아데닐레이트 사이클라제의 활성화를 통하여 신호를 변환시키고, 세포성 cAMP 수준의 상승을 유도한다 (Lin et al., Science 254:1022-1024, 1991). 이 검정 시스템은 칼시토닌 수용체를 자극하고 신호 변환을 개시할 수 있는 다른 분자들을 검출하는 방법으로서 수용체가 cAMP 수준을 상승시킬 수 있는 능력을 이용한다. 뼈 형성 또는 흡수를 측정하는 다른 검정법으로는 두개관 검정, QCT, 및 골아세포의 크기와 수를 측정하는 검정이 있다. 그러한 검정법들은 당해 기술분야에 공지이며, 하기에서 논의된다.

수용체 활성화는 다음과 같이 검출될 수 있다: (1) 아데닐레이트 사이클라제 활성의 측정에 의하여 (Salomon et al., Anal. Biochem. 58:541-548, 1974; Alvarez and Daniels, Anal. Biochem. 187:98-103, 1990); (2) 종래의 방사성 면역검정 방법을 사용하여 세포내 cAMP 수준의 변화를 측정함에 의하여 (Steiner et al., J. Biol. Chem. 247:1106-1113, 1972; Harper and Brooker, J. Cyclic Nucl. Res. 1:207-218, 1975); 또는 (3) cAMP 신틸레이션 근접성 검정 (SPA) 방법을 사용함으로써 (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). 이들 방법이 민감성과 정확성을 제공하긴 하지만, 이 방법들은 검정하기 전에 상당한 샘플의 처리를 포함하고, 시간 소모적이며, 방사성 동위원소를 사용하고, 대규모의 스크리닝 검정에 대해서는 번거로운 것이다.

또 다른 검정 시스템으로는 미국 특허 제 5,622,839 호, 미국 특허 제 5,674,689 호 및 미국 특허 제 5,674,981 호에 설명되어 있는 바와 같이 칼시토닌 수용체 발현이 결핍된 세포에서가 아니라, 칼시토닌 수용체를 발현하는 세포에서 상승된 cAMP 수준의 결과로서, 고리형 AMP 반응 요소 (CRE)-루시페라제 리포터의 발현을 유도할 수 있는 폴리펩티드의 선택이 있다.

잘 정립이 되어 있는 동물 모델은 칼시토닌 수용체와 상호작용하는 zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트 또는 길항체의 생체내 효력을 시험하기 위해 활용될 수 있다. 더욱이, 이들 모델은 칼시토닌 수용체를 통한 것 이외의 뼈에 미치는 zsig45의 효과를 시험하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 저칼슘혈증에 걸린 쥐 또는 마우스 모델이 혈청 칼슘에 미치는 효과를 측정하기 위하여 사용될 수 있고, 저칼슘혈증에 걸린 쥐 또는 마우스가 골다공증에 대한 모델 시스템으로서 사용될 수 있다. 이들 모델 및 사람에게서 볼 수 있는 에스트로겐 결핍의 초기 단계중의 뼈 변화는 정성적으로 유사하다. 칼시토닌은 난소 절제된 여자 및 쥐에서 뼈 손실을 예방하기 위한 효과적인 제제로서 밝혀졌다 (Mazzuoli et al., Calcif. Tissue Int. 47:209-214, 1990; Wronski et al., Endocrinology 129:2246-2250, 1991). 큰 용량의 에스트로겐은 난소절제된 마우스 모델에서 뼈 흡수를 억제하고 뼈 형성을 자극하는 것으로 밝혀졌다 (Bain et al., J. Bone Miner. Res. 8:435-442, 1993).

칼시토닌 수용체와 상호작용하거나, 또는 뼈에 대하여 다른 효과를 나타내는 본 발명의 생물학적으로 활성인 zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트 또는 길항체는, 그러므로 칼시토닌이 유용한 그런 치료적 응용에 대하여 사용하기에 유익한 것으로 예상된다. 그러한 응용은, 예를 들면 골다공증, 변형성 골염, 부갑상선 기능항진증, 골연화증, 유아의 유전자형 고칼슘혈증 및 다른 질환들의 치료가 있다. 추가의 응용으로는 급성 체장염 및 위장 질환의 치료에서 위의 분비를 억제하는 것과, 진통제, 특히 뼈의 고통에 대한 진통제로서의 용도이다.

뼈의 형성율의 변화를 측정하기 위한 생체내 검정은 뼈의 조직학을 수행하는 것 (Recker, R., eds. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. Boca Ration: CRC Press, Inc., 1983)과 정량적으로 계산된 단층 X-선 사진 촬영법 (QCT; Ferretti, J. Bone 17:353S-364S, 1995; Orphanoudakis et al., Investig. Radiol. 14:122-130, 1979; 및 Durand et al., Medical Physics 19:569-573, 1992). 뼈 형성의 변화를 측정하기 위한 생체외 검정의 실례로는 두개관 검정 (Gowen et al., J. Immunol. 136:2478-2482, 1986) 또는 흡수 두개관 검정 (Linkhart, T.A., and Mohan, S., Endocrinology 125:1484-1491, 1989)이 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드는 염증을 변형시키는 능력에 대하여 검정되고 사용될 수 있다. zsig45의 염증전 및 항염증 성질을 측정하는 방법은 당해 기술분야에 공지이고, 본원에서 논의된다. 예를 들어, cAMP 생성의 억제는 항-염증 효과를 나타내는 것이다 (Nihei, Y., et al., Arch. Dermatol. Res., 287:546-552, 1995). 케라틴 생성세포에서 cAMP의 억제 및 IFN- γ 에 의해 유도된 ICAM과 HLA-Dr의 억제는 염증의 억제를 평가하기 위하여 사용될 수 있다. 또는 달리, 이 시스템에서 cAMP 생성의 억제 및 ICAM과 HLA-Dr의 억제는 단백질의 염증전 효과의 척도일 수 있다. zsig45는 마찬가지로 유사한 염증 효과를 나타낼 수 있고, 생체내에서 나타난 바와 같이 (하기 실시예 8), 이들 효과를 그것이 발현되는 조직에서, 또는 다른 조직에서 나타낼 수 있다. 예를 들어, zsig45는 결장에서 발현되고, 이 조직에서 상처를 치유하는 것을 촉진하는데 유용할 수 있으며, 또는 항-박테리아 또는 항-바이러스 효과를 나타낸다. 더욱이, zsig45 또는 그것의 길항체는 염증성 장 질병, 게실염, 장 수술중의 및 후의 염증, 등의 치료에 유용할 수 있다. 또한, 갑상선에서 발현된 zsig45는 갑상선외의 조직, 예컨대 심장, 뇌, 간, 신장 등에서 상처-치유 또는 항미생물성 또는 항바이러스성 작용을 할 수 있다. 더욱이, zsig45 폴리펩티드와 zsig45 항체의 직접적인 측정은 흑색종, 염증성 장 질병, 게실염, 천식, 골반의 염증성 질병, (PID), 건선, 관절염, 재관류 허혈, 및 다른 염증성 질병의 진단에 유용할 수 있다. 더욱이 zsig45, 그것의 길항체는 심근염, 아테로마성 동맥경화증, 골반의 염증성 질병, (PID), 건선, 관절염, 습진, 공피증, 및 다른 염증성 질병의 치료에 유용할 수 있다.

zsig45 폴리펩티드, 그것의 아고니스트 또는 길항체는 그 자체로서 천식 및 관절염과 같은 염증성 질병에서 잠재적인 용도를 가진다. 예를 들어, 만약 zsig45가 전염증성이라면, 그것의 길항체가 천식 치료 또는 림프구의 이동이 손상을 입는 다른 항-염증성 치료에 가치가 있을 것이다. 또한, zsig45는 폐기능, 예를 들면 기관지 확장, 조직 탄성, 폐 기능 및 손상에서 림프구의 회복에 다른 중요한 역할을 수행할 수 있다. 폐세포에서 zsig45의 활성을 평가하기 위한 검정은 문헌에서 논의된다 (Laberge, S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 17:193-202, 1997; Rumsaeng, V. et al., J. Immunol., 159:2904-2910, 1997; 및 Schluesener, H.J. et al., J. Neurosci. Res. 44:606-611, 1996). zsig45, 그것의 아고니스트 또는 그것의 길항체의 전염증성 및 항염증성 성질을 측정하는 방법은 당해 기술분야에 공지이다.

더욱이, 당해 기술분야에 공지이고 본원에서 논의된 다른 분자 생물학적, 면역학적, 및 생화학적 기법들이 zsig45 활성을 측정하고 아고니스트 및 길항제를 단리하기 위해 사용될 수 있다.

더욱이, 감상선에서의 높은 발현을 토대로, zsig45 폴리펩티드는 그것의 숙주 세포 (예컨대 T-세포)상에 있는 수용체(들)를 경유하는 특이한 신호화에 의하여 바이러스 복제를 억제함으로써 항바이러스 활성을 나타낼 수 있다. Zsig45 는 면역 세포 증식 활성을 나타낼 수 있고 (하기 실시예 8), 본원에서 논의되는 바와 같이 이 활성에 대하여 검정될 수도 있으며, 바이러스 감염에 대하여 싸우도록 면역 시스템을 자극할 수도 있다. 더욱이, zsig45 는 CD4 또는 다른 림프구 수용체에 결합하여 예컨대 사람 면역 결핍 바이러스 (HIV) 또는 사람 T-세포 림포트로픽 바이러스 (HTLV)에 대한 항바이러스 효과를 나타낼 수 있다. 또는 달리, zsig45 폴리펩티드는 바이러스 감염을 차단하기 위하여 바이러스 수용체 또는 공동-수용체에 대하여 결합할 수 있다. Zsig45 는 바이러스 감염을 예방하기 위하여 또는 진행중인 바이러스 복제 및 재-감염을 감소시키기 위하여 부모세대에 제공될 수 있다 (Gayowski, T. et al., Transplantation 64:422-426, 1997). 그러므로, zsig45 는 예컨대 바이러스성 백혈병 (HTLV), AIDS (HIV), 또는 예컨대 로타바이러스, 칼리키바이러스 (예컨대 Norwalk Agent) 및 병원성 아데노바이러스의 특정 스트레인에 의해 유발된 위장 바이러스성 감염에 대한 항바이러스성 치료제로서 사용될 수 있다.

Zsig45 조절된 직접 및 간접 염증은 둘 다 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 검정될 수 있다 (Hamada, T. et al., J. Exp. Med. 188:539-548, 1998; Liu, L. et al., J. Immunol. 161:3064-3070, 1998). 예를 들어, zsig45 폴리펩티드의 전염증성 효과는 Transwell™ (Costar)을 사용하는 검정에서 직접적으로 시험될 수 있다. 상기에서 내피 세포는 반-투과성 막위에 놓이고, zsig45 폴리펩티드는 트랜스웰의 낮은 쪽 챔버에 존재하며, Cr⁵¹ 또는 형광-표지된 호중구 (PMN), 림프구, HL60 세포, K562 세포 등이 트랜스웰의 높은 쪽 챔버에 첨가된다. zsig45 폴리펩티드가 있을 때 PMN 등의 트랜스웰의 낮은 쪽 챔버로의 이동은, zsig45 폴리펩티드가 없을 때 (네가티브 대조표준)가 아니라, PMN의 직접적인 화학적 유인제로서 사용되는 zsig45 폴리펩티드를 증명해준다. 더욱이, IL-8 은 이 검정에서 포지티브 대조표준으로서 사용될 수 있다. 염증성 반응의 간접적인 자극제로서의 zsig45 를 시험하기 위하여, 유사한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 실험은 상기와 같이 셋업될 수 있고, 트랜스웰의 낮은 쪽 챔버에 zsig45 가 존재하는 것 외에 섬유아세포 또는 함지방세포가 함께 놓인다. 이런 방법으로, 이들 세포가 PMN의 이동, 즉 염증을 증가시키는 인자들을 분비하도록 유도하는데 zsig45 폴리펩티드의 효과를 측정할 수 있다. bFGF 가 간접적인 검정에 대한 포지티브 대조표준으로서 사용될 수 있다. zsig45 폴리펩티드의 항-염증성 효과가 또한 PMN의 존재하에 위쪽 챔버상에 첨가될 때 당해 기술분야에 공지된 유사한 트랜스웰을 사용하여 측정될 수 있다.

본 발명의 분자들의 활성은 다양한 검정, 예를 들면 zsig45 의 감상선외적인 활성의 잠재적인 효과를 토대로 한 심장 세포의 재생 또는 과형성 (즉 증식)을 측정하는 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드와 관련된 것같은 추가의 활성으로는 직접적으로 또는 간접적으로 다른 성장인자를 통한 내피세포, 심근세포, 섬유아세포, 골격 근세포의 증식; 내피 세포, 섬유아세포 및/또는 식균세포에 대한 화학주성 인자로서의 작용; 골형성 인자; 및 간충직 간세포 및 전구체 집단을 확장시키기 위한 인자가 있다.

증식은 배양된 심장 세포를 사용하여 또는 적절한 동물 모델에 본 발명의 분자들을 투여함에 의해 생체 내적으로 측정될 수 있다. 일반적으로, 증식 효과는 세포수의 증가로서 알 수 있으며, 유사분열의 자극 뿐만 아니라 아포토시스의 억제를 포함할 수 있다. 이들 검정에 사용하기 위한 배양된 세포로는 심장 섬유아세포, 심근세포, 골격 근세포, 및 영양류 배양물로부터 얻은 사람 태정맥 내피 세포가 있다. 적당한 수립된 셀라인은: NIH 3T3 섬유아세포 (ATCC No. CRL-1658), CHH-1 연어 심장 세포 (ATCC No. CRL-1680), H9c2 쥐 심장 근아세포 (ATCC No. CRL-1446), 시오노기 유방 암종 세포 (Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:8928-8932, 1992), 및 LNCap.FGC 전암종 세포 (ATCC No. CRL-1740)이다. 세포 증식을 측정하는 검정은 당해 기술분야에 공지이다. 예를 들어, 증식을 측정하는 검정으로는 중성의 적색 눈에 대한 화학적인 민감도 (Cavanaugh et al., Investigational New Drugs 8:347-354, 1990), 방사성 표지된 뉴클레오티드의 통합 (Cook et al., Analytical Biochem. 179:1-7, 1989), 5-브로모-2'-데옥시우리딘 (BrdU)의 증식하는 세포의 DNA 안으로의 통합 (Porstmann et al., J. Immunol. Methods 82:169-179, 1985), 및 테트라졸리움 염의 사용 (Mosmann, J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983; Alley et al., Cancer Res. 48:589-601, 1988; Marshall et al., Growth Reg. 5:69-84, 1995; 및 Scudiero et al., Cancer Res. 48:4827-4833, 1988)이 있다.

분화는 다능성 간세포로부터 시작하고 마지막으로 분화된 세포에서 끝나는, 점진적이고 역동적인 과정이다. 계통에 대한 관련없이 재생할 수 있는 다능성 간세포는 세포 계통에 관련될 때 손실되는 분화 마아커의 세트를 발현한다. 선구 세포는 세포가 세포 계통 경로가 성숙을 향해 진행됨에 따라 계속해서 발현될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 분화 마아커의 세트를 발현한다. 성숙한 세포에 의해 배타적으로 발현되는 분화 마아커들은 통상 기능적 성질을 가지는 것들, 예컨대 세포 생성물, 세포 생성물을 생성하기 위한 효소, 및 수용체이다. 세포 군집의 분화의 단계는 세포 군집에 존재하는 마아커들의 확인에 의해 모니터링된다. 근세포, 골아세포, 함지방세포, 연골 세포, 섬유아세포 및 세망세포는 공통되는 간충직 간세포로부터 기원하는 것으로 여겨지고 (Owen et al., J. of Cell Sci. 87:731-738, 1987), 그래서 분화는 통상적으로 선구 및 성숙한 세포 단계에서 이루어진다. 초기 단계의 심근세포 선구 세포 (때로는 심근 세포 간세포로도 불림)의 존재는 심사숙고되었지만, 성인의 심장 조직에서는 증명되지 않았다. 본 발명의 신규한 폴리펩티드는 생체내에서 및 생체외에서 모두 간충직 간세포 및 심근세포 선구 세포를 단리하기 위한 연구에 유용할 것이다.

말단 분화 또는 역분화를 향하여 아래쪽으로 향하는 특정 세포를 자극하는 인자들이 공통되는 간세포 또는 선구 세포로부터 기원하는 완전한 세포 집단에 영향을 미치는 것을 시사하는 증거가 있다. 그러므로, 본 발명은 근세포, 평활근세포, 골아세포, 함지방세포, 연골 세포 및 내피 세포의 증식을 자극 또는 억제하는 것을 포함한다. 본 발명의 분자들은 심근세포의 증식 또는 분화를 자극하는 한편으로, 그것들의 공통되는 선구/간세포에 영향을 미침으로써 함지방세포의 증식 또는 분화를 억제한다. 그러므로 본 발명

의 분자들은 연골 육종, 아테로마성 동맥경화증, 재협착증 및 비만을 억제하는데 사용될 수 있다.

분화를 측정하는 검정으로는 예컨대 조직의 단계-특이적 발현과 관련된 세포-표면 마아커를 측정하는 것, 효소적 활성을 측정하는 것, 기능적 활성을 측정하는 것 또는 형태학적 변화를 측정하는 것이 있다 (Watt, FASEB 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989).

심장의 재생 또는 과형성을 평가하기 위한 생체내 검정은 신생 또는 성숙한 쥐를 본 발명의 분자들로 처리하는 것을 포함한다. 동물의 심장 기능은 심박, 혈압 및 좌심실 기능을 측정하기 위한 심장 출력으로서 측정된다. 심장의 쇠약 또는 개선을 평가하기 위한 사후 방법은 증가된 또는 감소된 심장의 중량, 핵/세포질의 부피, 및 증식하는 세포 핵 항원 (PCNA) 대 세포질의 액틴 수준을 측정하기 위한 심장 조직학 부분의 염색을 포함한다 (Quaini et al., Circulation res. 75:1050-1063, 1994 및 Reiss et al., Proc. natl. Acad. Sci. 93:8630-8635, 1996).

Zsig45 폴리펩티드는 또한 zsig45 에피토프, 펩티드 또는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. zsig45 폴리펩티드 또는 그것의 단편은 동물을 접종하고 면역 반응을 유도하기 위한 항원 (면역원)으로서 작용한다. 당업자는 항원 또는 면역원성 에피토프가 약 10 개 이하의 또는 그것보다 긴 아미노산으로부터 거의 완전한 길이의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드에 따라 더 긴 더 긴 폴리펩티드내에 있는 아미노산의 스트레치로 구성된다는 것을 인지할 것이다. 적당한 항원으로는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 번호 47 (Lys) 부터 아미노산 번호 114 (Asp)까지의 아미노산, 또는 그것의 연속되는 9 내지 67 개의 아미노산 단편에 의해 코드화된 zsig45 폴리펩티드를 포함한다. 항원으로서 사용하기에 바람직한 펩티드는 당업자에 의해, 예를 들면 감추어진 G, S, 및 T 잔기와 노출된 H, Y, 및 W 잔기가 무시된 슬라이딩 6-잔기 윈도우를 토대로 한, 후프/우즈 소수성 프로필, 또는 친수성 도메인, 모티프 1 내지 5, 또는 본원에 개시된 모티프 1 부터 5 까지 사이의 영역으로부터 측정되는 친수성 도표로부터 예상되는 그러한 것들이다. 이 면역 반응으로부터 생성된 항체들은 본원에서 기술되는 바와 같이 분리되고 정제될 수 있다. 다클론성 및 단클론성 항체를 제조하고 분리하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al., (eds.), National Institute of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 및 Hurrell, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982).

당업자에게 명백하게 되는 것과 같이, 항체는 다양한 온혈 동물, 예컨대 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 토끼, 마우스 및 쥐를 zsig45 폴리펩티드 또는 그것의 단편으로 접종하는 것으로부터 생성될 수 있다. zsig45 폴리펩티드의 면역원성은 보조제, 예컨대 알룸 (수산화 알루미늄) 또는 프로인트 완전 또는 불완전 보조제의 사용을 통하여 증가될 수 있다. 면역화에 유용한 폴리펩티드로는 또한 융합 폴리펩티드, 예컨대 zsig45 또는 그것의 부분과 면역글로불린과 또는 말토스 결합 단백질과의 융합 폴리펩티드가 있다. 폴리펩티드 면역원은 전체 길이의 분자 또는 그것의 부분일 수 있다. 만약 폴리펩티드 부분이 "합텐-유사" 한 것이라면, 그러한 부분은 면역화를 위해 유익하게도 거대분자 담체 (예를 들어 키호울림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 파상풍 독소)와 결합되거나 또는 그것에 연결될 수 있다.

본원에서 사용되는 용어 "항체" 는 다클론성 항체, 친화성-정제된 다클론성 항체, 단클론성 항체 및 항원-결합 단편, 예컨대 F(ab')₂ 및 Fab 단백질 가수분해성 단편을 포함한다. 유전공학적으로 무성인 항체 또는 단편들, 예컨대 키메릭 항체, Fv 단편, 단일 사슬 항체 등과, 뿐만 아니라 합성 항원-결합 펩티드 및 폴리펩티드도 또한 포함된다. 비-사람 항체는 비-사람 CDR 을 사람 프레임워크 및 불변 영역위에 이식함으로써, 또는 완전한 비-사람 가변성 도메인을 통합시킴으로써 (임의로 그것들을 노출된 잔기의 대체에 의해 사람-유사 표면으로 "클로킹"한다, 그 결과는 "갈치레 (veneered)" 항체이다) 인간화될 수 있다. 어떤 경우에는, 인간화된 항체가 적절한 결합 특성을 증강시키기 위하여 사람 가변성 영역 프레임워크 도메인안에 비-사람 잔기를 보유할 수도 있다. 항체를 인간화하는 것을 통해서, 생물학적 반감기가 증가될 수 있으며, 사람에게 대한 투여시 불리한 면역 반응의 가능성이 감소된다.

본원에 유용한 항체를 생성하거나 또는 선택하기 위한 또 다른 기법들로는 zsig45 단백질 또는 펩티드에 대한 림프구의 시험관내 노출, 및 파지 또는 유사한 벡터에서 항체 디스플레이 라이브러리의 선택 (예를 들면, 고정된 또는 표지된 zsig45 단백질 또는 펩티드의 사용을 통하여)이 있다. 잠재적인 zsig45 폴리펩티드 결합 도메인을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 유전자들은 파지상에 나타난 (파지 디스플레이) 또는 대장균과 같은 박테리아상에 나타난 무작위 펩티드 라이브러리를 스크리닝함에 의해 얻어질 수 있다. 폴리펩티드를 코드화하는 뉴클레오타이드 서열은 많은 방법, 예를 들면 무작위 돌연변이생성 및 무작위 폴리뉴클레오타이드 합성을 통하여 얻어질 수 있다. 이들 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리들은 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있는 공지의 표적, 예컨대 리간드 또는 수용체, 생물학적 또는 합성 거대분자, 또는 유기 또는 무기 물질과 상호반응하는 펩티드를 스크리닝하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 기법은 문헌에 공지이며 (Lander et al., 미국 특허 제 5,223,409 호; Lander et al., 미국 특허 제 4,946,778 호; Lander et al., 미국 특허 제 5,403,484 호 및 Lander et al., 미국 특허 제 5,571,698 호), 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리 및 그러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 키트는 상업적으로, 예컨대 Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (Beverly, MA) 및 Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ)로부터 활용 가능하다. 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리는 zsig45 에 결합하는 단백질을 확인하기 위하여 본원에 개시된 zsig45 서열을 사용하여 스크리닝될 수 있다. zsig45 폴리펩티드와 상호작용하는 이들 "결합 단백질" 은 세포를 표적화하기 위하여; 친화성 정제에 의하여 상동체 폴리펩티드를 분리하기 위하여 사용될 수 있고; 직접 또는 간접적으로 약물, 독소, 방사성 핵종 등에 포함될 수 있다. 이들 결합 단백질은 또한 발현 라이브러리를 스크리닝하고 활성을 중성화하기 위한 것과 같은 분석적 방법에 사용될 수 있다. 결합 단백질들은 또한 폴리펩티드의 순환하는 수준을 측정하기 위한; 잠재적인 병원학 또는 질병이 마아커로서 가용성 폴리펩티드를 검출 또는 정량하기 위한 진단용 검정에 사용될 수 있다. 이들 결합

단백질은 또한 zsig45 결합을 차단하고 시험관내 및 생체 내에서의 신호 변환을 차단하기 위한 zsig45 "길항체"로서 작용할 수 있다. 이들 항-zsig45 결합 단백질은 염증 또는 다른 zsig45 활성을 억제하는데 유용할 것이다.

항체들은 만약 1) 그것들이 결합 활성의 역치 수준을 나타내거나 및/또는 2) 그것들이 관련된 폴리펩티드 분자와 유의할만하게 교차-반응하지 못한다면 특이적으로 결합하는 것으로 측정된다. 첫째, 본원의 항체들은 본원에서 만약 그것들이 zsig45 폴리펩티드, 펩티드 또는 에피토프와, 대조 (비-zsig45) 폴리펩티드에 대한 결합 친화성보다 최소한 10-배 더 큰 친화성으로 결합한다면 특이적으로 결합한다. 항체는 10^6 M^{-1} 이상, 바람직하게는 10^7 M^{-1} 이상, 보다 바람직하게는 10^8 M^{-1} 이상, 가장 바람직하게는 10^9 M^{-1} 이상의 결합 친화성 (K) 을 나타내는 것이 바람직하다. 항체의 결합 친화성은 당업자에 의해, 예를 들면 스캐처드 분석에 의하여 쉽게 측정될 수 있다 (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949).

둘째, 항체는 만약 그것들이 관련된 폴리펩티드와 유의할만하게 교차-반응하지 않는다면 특이적으로 결합하는 것으로 측정된다. 항체는 예를 들어 만약 그것들이 표준 웨스턴 블롯 분석 (Ausubel et al., 상기 동일)을 사용하여 zsig45 를 검출하긴 하지만, 공지의 관련된 폴리펩티드를 검출하지 못한다면 관련된 폴리펩티드 분자와 유의할만하게 교차-반응하지 않는다. 공지의 관련된 폴리펩티드의 실예로는 오르토로그, 단백질 패밀리의 구성원인 동일한 종으로부터의 단백질 (예컨대 IL-16), zsig45 폴리펩티드 및 비-사람 zsig45 가 있다. 더욱이, 항체는 본 발명의 폴리펩티드에 특이하게 결합하는 군집을 분리하기 위한 공지의 관련된 폴리펩티드"에 대하여 스크린" 될 수 있다. 예를 들어, zsig45 에 대해 발생한 항체는 불용성 매트릭스에 고정된 관련된 폴리펩티드에 흡착되고; zsig45 에 특이적인 항체들은 적절한 완충 조건하에서 매트릭스를 통해 흐를 것이다. 그러한 스크리닝으로 밀접하게 관련된 폴리펩티드와 교차반응하지 않는 다클론성 및 단클론성 항체들의 단리가 가능해진다 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al., (eds.), National Institute of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). 특이한 항체의 스크리닝 및 단리는 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. rev. Immunol. 2:67-101, 1984).

당업자들에게 공지되어 있는 다양한 검정법들이 zsig45 단백질 또는 펩티드에 특이하게 결합하는 항체를 검출하는데 활용될 수 있다. 예시적인 검정법은 문헌에 기재되어 있다 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). 그러한 검정법의 대표적인 실예로는 다음과 같은 것들이 있다: 동시발생적인 면역 전기영동, 방사성 면역검정, 방사성 면역-침전, 효소-결합된 면역 흡착 검정 (ELISA), 닷트 블롯 또는 웨스턴 블롯 검정, 억제 또는 경합 검정, 및 샌드위치 검정. 또한, 항체들은 야생형 때 돌연변이 zsig45 단백질 또는 폴리펩티드에 대한 결합에 대하여 스크린될 수 있다.

zsig45 에 대한 항체는 zsig45 를 발현하는 세포를 태그화하기 위하여; 친화성 정제에 의하여 zsig45 를 분리하기 위하여; zsig45 폴리펩티드의 순환하는 수준을 측정하기 위한 진단용 검정을 위하여; 잠재적인 병리학 또는 질병의 마아커로서 가용성 zsig45 를 검출 또는 정량하기 위하여; FACS 를 사용하는 분석학적 방법에서; 발현 라이브러리를 스크리닝하기 위하여; 항-유전자형 항체를 생성하기 위하여; 및 시험관내에서 및 생체 내에서의 zsig45 활성을 차단하기 위한 중화 항체로서 또는 길항체로서 사용될 수 있다. 적당한 직접적인 태그 또는 표지로는 방사성핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광 마아커, 화학발광 마아커, 자성 입자 등이 있으며; 간접적인 태그 또는 표지는 중간체로서 비오틴-아비딘 또는 다른 보체/항-보체 쌍의 사용을 특징으로 한다. 본원의 항체는 또한 약물, 독소, 방사성 핵종 등에 직접 또는 간접적으로 포함될 수 있으며, 이들 포함체는 생체내 진단용으로 또는 치료적 응용에 사용된다. 더욱이, zsig45 또는 그것의 단편에 대한 항체들은 시험관내에서 검정, 예를 들면 웨스턴 블롯 또는 다른 당해 기술분야에 공지되어 있는 검정에서 변성된 zsig45 또는 그것의 단편을 검출하기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명의 분자들은 감상선, 하수체, 심장 또는 다른 기능에 포함된, 생체내에서 그것에 zsig45 폴리펩티드가 결합하는 수용체를 확인하고 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단백질 및 펩티드들은 칼럼위를 가로질러 칼럼 및 막 제제상에 고정될 수 있다 (Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp.195-202). 단백질 및 펩티드들은 또한 방사성 표지되거나 (Methods in Enzymol., vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737) 또는 광친화성 표지되고 (Brunner et al., Ann. Rev. Biochem. 62:483-514, 1993 및 Fedan et al., Biochem. Pharmacol. 33:1167-1180, 1984), 특이한 세포-표면 단백질이 확인될 수 있다.

더욱이, 상술된 방법들은 항-zsig45 결합 단백질을 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 길항체들은 분리되고, 예를 들면 황문근육종, 심장 점액종, 골아세포 기원의 뼈 암, 및 소인증, 관절염, 인대 및 연골의 수복의 치료에, 단독으로, 또는 다른 치료법과 결합하여 사용될 수 있다.

본 발명의 분자들은 다양한 감상선 질병, 뼈 질병, 월경 문제, 심장 질병, 뼈, 결장, 하수체 및 감상선 암의 설명과 예방에 유용할 것이다. 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및/또는 항체는 감상선 기능장애와 관련된 질병의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 감상선 활성을 조절하기 위하여 또는 감상선, 심장 및 뼈와 같은 다양한 조직에서 병리학적 상태의 발생을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 특히, 어떤 증후군 및 질병은 그러한 진단, 치료 또는 예방을 받기 쉽다.

본 발명은 또한 포유동물의 세포성 대사를 연구하는 방법을 제공한다. 그러한 본 발명의 방법은 연구대상인 세포, 예컨대 사람 심장 내피 세포를 zsig45 폴리펩티드, 단클론성 항체, 그것의 아고니스트 또는 길항체와 함께 또는 그것들 없이 인큐베이션하는 단계와 지방세포 생성, 당신생, 글리코겐 가수분해, 지

질생성, 글루코스 흡수, 등을 관찰하는 단계를 포함한다.

본 발명의 다른 측면으로, 정제된 zsig45 폴리펩티드를 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 포함하고 있는 약학 조성물이 제공된다. 이 약학 조성물은 포유동물에서 에너지 평형을 조절하기 위하여 또는 내피 세포를 손상으로부터 보호하기 위하여 사용될 수 있다.

본원의 항체 또는 폴리펩티드는 또한 직접 또는 간접적으로 약물, 독소, 방사성 핵종 등에 포함될 수 있으며, 이들 포함체는 생체내 진단용으로 또는 치료 목적으로 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체는 상응하는 항-상보 분자 (각각 예를 들면 수용체 또는 항원)를 발현하는 조직 또는 기관을 확인 또는 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, zsig45 폴리펩티드 또는 항-zsig45 항체, 또는 그것의 생체내 활성 단편 또는 부분들은 검출가능한 또는 세포독성 분자와 커플링될 수 있으며, 항-보체 분자를 발현하는 세포, 조직 또는 기관을 가지고 있는 포유동물에 전달된다.

적당한 검출가능한 분자들은 폴리펩티드 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있으며, 그러한 것의 실예로는 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광 마아커, 화학발광 마아커, 자성 입자 등이 있다. 적당한 세포독성 분자들은 폴리펩티드 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있으며, 그러한 것의 실예로는 박테리아 또는 식물 독소 (예를 들어 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 리신, 아브린 등)와, 뿐만 아니라 치료용 방사성 핵종, 예를 들면 요오드-131, 레늄-188 또는 이트륨-90 (이것들은 직접적으로 폴리펩티드 또는 항체에 부착되거나, 또는 간접적으로 예를 들면 킬레이트화 부분에 의하여 부착된다)이 있다. 폴리펩티드 또는 항체는 또한 세포독성 약물, 예컨대 아드리아마이신에 포함될 수 있다. 검출가능한 또는 세포독성 분자의 간접적인 부착을 위하여, 검출가능한 또는 세포독성 분자는, 보체/항-보체 쌍의 한 구성원과 포함될 수 있고, 이 때 다른 구성원은 폴리펩티드 또는 항체 부분에 결합한다. 이들 목적에 대해서, 비오틴/스트렙타비딘이 예시적인 보체/항-보체 쌍이다.

다른 구체예에서, 폴리펩티드-독소 융합 단백질 또는 항체-독소 융합 단백질은 표적화된 세포 또는 조직 억제 또는 제거에 사용될 수 있다 (예를 들면, 암세포 또는 조직을 치료하기 위하여). 또는 달리, 만약 폴리펩티드가 다중 기능 도메인 (즉 활성화 도메인 또는 리간드 결합 도메인과 표적화 도메인)을 가지고 있다면, 표적화 도메인만을 포함하고 있는 융합 단백질이 검출가능한 분자, 세포독성 분자 또는 관심의 세포 또는 조직 유형에 상보하는 분자를 지정하는데 적당할 것이다. 융합 단백질이 상보하는 분자를 포함하고 있는 경우에는, 항-상보성 분자가 검출가능한 또는 세포독성 분자에 포함될 수 있다. 그러한 도메인-상보하는 분자 융합 단백질은 따라서 유전적 항-상보성-검출가능한/세포독성 분자 포함체의 세포/조직-특이적 전달을 위한 유전적 표적화 비히클을 대표한다.

다른 구체예에서, zsig45-사이토킨 융합 단백질 또는 항체-사이토킨 융합 단백질은, 만약 zsig45 폴리펩티드 또는 항-zsig45 항체가 과잉증식성 혈액 또는 골수 세포를 표적화한다면, 표적 조직 (예를 들면 혈액 및 골수암)의 생체내 박멸을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다 (Hornick et al., Blood 89:4437-4447, 1997). 호르닉 등은 원하는 작용 부위에 사이토킨을 표적화할 수 있고, 그로써 사이토킨의 상승된 국소 농축을 제공하는 융합 단백질을 기술하였다. 적당한 zsig45 폴리펩티드 또는 항-zsig45 항체는 바람직하지 못한 세포 또는 조직 (즉 종양 또는 백혈병)을 표적화하고, 융합된 사이토킨은 이펙터 세포에 의한 개선된 표적 세포 용해를 중재하였다. 이런 목적에 적당한 사이토킨으로는 인터류킨 2 및 과립구-마кро파지 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)를 예로 들 수 있다.

다른 구체예에서, zsig45 폴리펩티드 또는 항-zsig45 항체는 심장 세포 또는 조직을 표적화할 수 있다. 그러한 폴리펩티드 또는 항체는 재혈착증을 감소시키기 위하여 방사성 핵종과, 특히 베타선-발광 방사성 핵종과 포함될 수 있다. 그러한 치료적 접근법은 방사성 치료법을 투여하는 임상에게는 덜 위험한 것 같다. 예를 들어, 원하는 방사선량이 전달될 때까지 환자의 스텐트 삽입된 혈관에 놓여진 이리듐-192 침지된 리본은, 위 (placebo) 리본을 받은 대조군에 비교하여 감소된 혈관내 조직 성장을 보였고, 더 큰 내강 직경을 나타냈다. 나아가, 재혈관신생 및 스텐트 혈전증은 처리군에서 상당히 더 낮았다. 유사한 결과가 본원에 기술된 바와 같은 방사성 핵종을 함유하고 있는 생체활성 포함체의 표적화시에 예상된다.

본원에서 설명된 생체활성 폴리펩티드 또는 항체 포함체는 정맥내로, 동맥내로 또는 혈관내로 전달될 수 있으며, 또는 원하는 작용 부위에 국소적으로 도입될 수 있다.

더욱이, 상술된 방법은 항-zsig45 결합 단백질을 단리하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 길항체들은 단리되고, 예를 들면 황문근육종, 심장 점액종, 골아세포 기원의 뼈 암, 및 소인증, 관절염, 인대 및 연골의 수복의 치료에, 단독으로, 또는 다른 치료법과 결합하여 사용될 수 있다.

본 발명의 분자들은 다양한 갑상선 질병, 염증, 뼈 질병, 월경 문제, 심장 질병, 뼈, 결장, 하수체 및 갑상선 암의 설명과 예방에 유용할 것이다.

zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드들은 zsig45 활성이 증가되거나 또는 억제되는 것이 바람직한 유전자 치료법 적용내에서 유용하다. 만약 포유동물이 돌연변이된 zsig45 유전자를 가지고 있거나 또는 zsig45 유전자가 없다면, zsig45 유전자는 포유동물의 세포안에 도입될 수 있다. 한 구체예에서, zsig45 폴리펩티드를 코드화하는 유전자는 생체내에서 바이러스 벡터안에 도입된다. 그러한 벡터들은 감되던 또는 결핍성 DNA 바이러스, 예컨대 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 단순 포진 바이러스 (HSV), 유두종 바이러스, 엡스타인 바르 바이러스 (EBV), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 등이 있다. 전체적으로 또는 거의 전체적으로 바이러스 유전자가 없는 결핍성 바이러스가 바람직하다. 결핍성 바이러스는 세포안에 도입된 후에는 감염성이지 않다. 결핍성 바이러스의 사용으로 세포를 특이하고, 국소화된 영역에, 다른 세포는 감염시키지 않으면서 투여하는 것이 가능해진다. 특별한 벡터의 실예로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 결핍성 단순 포진 바이러스 1 (HSV1) 벡터 (Kaplitt et al., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330, 1991); 감되던 아데노바이러스 벡터, 예컨대 문헌에 기재된 것과 같은 벡터 (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90:626-630, 1992); 및 결핍성 아데노-관련 바이러스 벡터 (Samulski et al., J. Virol. 61:3096-3101, 1987; Samulski et al., J. Virol. 63:3822-3828, 1989)가 있다.

다른 구체예에서, zsig45 유전자는 레트로바이러스 벡터안에, 예컨대 문헌에 설명되어 있는 바와 같이 도입될 수 있다 (Anderson et al., 미국 특허 제 5,399,346 호; Mann et al., Cell 33:153, 1983; Temin et al., 미국 특허 제 4,650,764 호; Temin et al., 미국 특허 제 4,980,289 호; Markowitz et al., J. Virol. 62:1120, 1988; Temin et al., 미국 특허 제 5,124,263 호; Dougherty et al., 1995 년 3 월 16 일에 공개된 국제 특허 공보 WO 95/07358; Kuo et al., Blood 82:845, 1993). 또는 달리, 벡터는 리포솜을 사용하는 생체내 리포펙션에 의하여 도입될 수 있다. 합성 양이온성 지질이 마아커를 코드화하는 유전자의 생체내 형질전환을 위한 리포솜을 제조하기 위하여 사용될 수 있다 (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1987; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-8031, 1988). 외인성 유전자를 생체내에서 특이한 기관안에 도입시키기 위하여 리포펙션을 사용하는 것은 실제로 어떤 장점을 갖는다. 특이한 세포에 대한 리포솜의 분자상 표적화는 한 영역의 장점을 나타낸다. 보다 구체적으로, 특정한 세포에 대하여 형질전환을 지시하는 것은 한 영역의 장점을 나타낸다. 예를 들어, 특정한 세포 유형에 대하여 형질전환을 지시하는 것은 세포 이중성을 가지고 있는 조직, 예컨대 채장, 간, 신장, 및 뇌에서 특히 유익할 것이다. 지질은 표적화 목적에 대해 화학적으로 다른 분자와 결합할 수 있다. 표적화된 펩티드 (예컨대 호르몬 또는 신경 전달 물질), 항체와 같은 단백질, 또는 비-펩티드 분자는 리포솜에 화학적으로 결합될 수 있다.

표적 세포를 신체로부터 네이키드 DNA 플라스미드로서 벡터를 도입시키기 위하여; 그런 다음 형질전환된 세포를 신체안에 재-이식하기 위하여 제거하는 것이 가능하다. 유전자 치료법을 위한 네이키드 DNA 벡터는 원하는 숙주 세포안에, 당해 기술분야에 공지된 방법들, 예컨대 형질전환, 일렉트로포레이션, 미소주입, 변환, 세포 융합, DEAE 텍스트란, 인산 칼슘 침전, 유전자 총의 사용 또는 DNA 벡터 트랜스포터의 사용에 의해 도입될 수 있다 (Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621-14624, 1988).

안티센스 방법론이 zsig45 유전자 전사를 억제하기 위하여, 예컨대 생체내에서 세포 증식을 억제하기 위하여 사용될 수 있다. zsig45-코드화 폴리뉴클레오타이드 (예컨대 SEQ ID NO: 1 에 표시된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드)의 절편에 상보하는 폴리뉴클레오타이드들이 zsig45-코드화 mRNA 에 결합하여 그러한 mRNA 의 번역을 억제하기 위하여 디자인된다. 그러한 안티센스 폴리뉴클레오타이드들은 세포 병양물 또는 환자에게서 zsig45-폴리펩티드-코드화 유전자의 발현을 억제하기 위하여 사용된다.

zsig45 유전자를 발현하도록 유전공학적으로 처리된, "트랜스제닉 마우스"로서 언급되는 마우스, 및 완전히 zsig45 유전자 기능을 보이지 않는, "녹아웃 마우스"로서 언급되는 마우스들이 또한 제조될 수 있다 (Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366: 740-742, 1993; Capecchi, M.R., Science 244:1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. et al., Annu. Rev. Genet. 20:465-499, 1986). 예를 들어, 도처에서 또는 조직-특이적 또는 조직-제한된 프로모터하에서 zsig45 를 과잉-발현하는 트랜스제닉 마우스들이 과잉-발현이 표현형을 유발하는 지의 여부를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 야생형 zsig45 폴리펩티드, 그것의 폴리펩티드 단편 또는 돌연변이체의 과잉-발현은 정상적인 세포 과정을 변경시킬 수 있고, 그 결과 zsig45 발현이 기능적으로 연관되어 있고 zsig45, 그것의 아고니스트 또는 길항체에 대한 치료적 표적을 나타낼 수 있는 조직을 확인하는 표현형이 초래된다. 예를 들어, 엔지니어에게 바람직한 트랜스제닉 마우스는 성숙한 zsig45 폴리펩티드를 과잉-발현하는 마우스이다. 더욱이, 그러한 과잉-발현은 사람 질병과 유사성을 보이는 표현형을 초래할 수 있다. 유사하게, 녹아웃 zsig45 마우스는 zsig45 가 절대적으로 생체내에서 필요한 지를 측정하는데 사용될 수 있다. 녹아웃 마우스의 표현형은 본원에서 설명된 것과 같은 zsig45 길항체의 표현형이 가질 수 있는 생체내 효과를 예상하게 해준다. 사람 zsig45 cDNA 는 쥐의 zsig45 mRNA, cDNA 및 게놈 DNA 를 분리하는데 사용될 수 있고, 상기의 것들은 계속해서 녹아웃 마우스를 제조하는데 사용된다. 이들 마우스들은 zsig45 유전자와 그로써 생체내 시스템 안에 코드화된 단백질을 연구하기 위하여 사용될 수 있고, 상응하는 사람 질병에 대한 생체내 모델로서 사용될 수 있다. 더욱이, zsig45 안티센스 폴리뉴클레오타이드 또는 본원에 기술된, zsig45 에 대하여 지정된 리보자임의 트랜스제닉 마우스에서의 발현은 유사하게 상술된 녹아웃 마우스에 대하여 사용될 수 있다.

zsig45 를 사용하는 다른 진단용 적용도 사용될 수 있다. 예를 들어, zsig45 유전자, zsig45 DNA 또는 RNA 또는 그것의 서열을 포함하고 있는 프로브는, zsig45 유전자가 질병에 걸린 조직에서 상이하게 발현되는 지의 여부를 측정하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 다른 질병들중에서도, zsig45 는 특정 채장, 전립선, 장, 인후 및 폐 암에서 발현될 수 있으며, 또는 상기 조직과 관련된 다른 질병에서도 발현될 수 있다. 또는 달리, 특정 조직에서의 zsig45 의 발현은 정상과 관련하여 특정 질병 상태에서 감소될 수 있다.

에너지 평형을 조절하는 것과 관련하여, zsig45 폴리펩티드는 세포성 대사 반응을 조절하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 대사 반응으로는 지방 세포 생성, 당신생, 글리코겐 가수분해, 지질 생성, 글루코스 흡수, 단백질 합성, 열발생, 산소 활용 등이 있다. zsig45 폴리펩티드의 발현 패턴은 주요 대사 기관, 즉 갑상선에서의 발현을 나타내고, 내피세포 조직에 대하여 갑상선-내 및 갑상선-외 효과를 나타낼 수 있다. 그러한 효과는 갑상선 또는 다른 조직의 보호, 재생, 성장 및 발생을 포함한다.

내피세포 보호와 관련하여, zsig45 폴리펩티드는 기관 보존, 예를 들면 허혈 및/또는 염증으로 인한 손상을 예방하기 위한 수술 전처리를 위하여 저온 보존에, 또는 유사한 과정에 사용될 수 있다. 이런 견지에서, zsig45 폴리펩티드는 증명된 바와 같이, 예컨대 뇌 등에서의 2-데옥시-글루코스 흡수에 의하여 영양분 흡수를 조절하는데에도 사용될 수 있다.

zsig45 폴리펩티드는 포유동물의 에너지 평형을 조절할 수 있다. zsig45 의 갑상선 발현 패턴은 zsig45 가 글루코스 흡수에 대하여, 예컨대 GLUT-1 및 열발생을 통하여 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 당해 기술분야에 공지된 또는 본원에서 설명된 다른 방법들 중에서, 포유동물의 에너지 평형은 하나 또는 둘 이상의 하음의 대사 기능을 모니터링함으로써 평가될 수 있다: 지방세포 생성, 당신생, 글리코겐 가수분해, 지질 생성, 글루코스 흡수, 단백질 합성, 열발생, 산소 활용 등. 이들 대사 기능은 당업자에게 공지되어 있는 기법들 (검정 또는 동물 모델)에 의하여 모니터링되고, 하기에서 보다 더 상세하게 설명된

다. 예를 들어, 인슐린의 당조절 효과는 간, 골격근 및 지방 조직에서 우선적으로 나타난다. 인슐린은 이들 세 가지 조직에 있는 그것의 세포성 수용체와 결합하여 조직-특이적 작용을 개시하고, 그 결과 예컨대 글루코스 생성의 억제 및 글루코스 활용의 자극이 초래된다. 간에서는, 인슐린은 글루코스 흡수를 자극하고, 당신생과 글리코겐 가수분해를 억제한다. 골격근 및 지방 조직에서는, 인슐린은 글루코스의 흡수, 저장 및 활용을 자극하는 작용을 한다.

zsig45 폴리펩티드는 갑상선에서 발현되지만, 대사 기능에 영향을 미치는 기관에서 갑상선외적인 활성을 나타낼 수 있다. 그러므로, 본 발명의 약학적 조성물은 체장 질병의 예방 또는 치료에 유용할 것이다. 예를 들어, zsig45는 IDDM, 체장암 등에서 증명되는 바, 체장의 신경분비 및 외분비 세포의 확장의 병리학적 조절과 결합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 혈액내 글루코스 수준, 인슐린 내성 또는 소화 기능의 병리학적 조절과 결합된 기능부전을 특징으로 하는 체장 질환의 예방 또는 치료에 포함될 수 있다.

기술분야에서 인지된 방법들은 상기에서 인용된 모든 대사적 기능을 모니터링하기 위하여 존재한다. 그러므로, 당업자는 zsig45 폴리펩티드, 그것의 단편, 융합 단백질, 항체, 아고니스트 및 길항체를 대사 조절 기능에 대하여 평가할 수 있다. 예시적인 조절 기법을 하기에서 설명한다.

지방 세포 생성, 당신생 및 글리코겐 가수분해는 포유동물의 에너지 평형의 성분과 상관관계가 있는데, 에너지 평형은 예를 들면 ob/ob 마우스들 또는 db/db 마우스들을 사용하여 공지된 기법들에 의하여 평가될 수 있다. ob/ob 마우스들은 ob (비만) 유전자좌에서의 비활성화 돌연변이를 위하여 동형접합식으로 동계교배된 마우스들이다. 그러한 ob/ob 마우스들은 비정상적으로 많이 먹고 대사기능이 저하되며, 순환하는 OB 단백질의 생성이 결핍된 것으로 여겨진다. db/db 마우스들은 db (당뇨) 유전자좌에서의 비활성화 돌연변이를 위하여 동형접합식으로 동계교배된 마우스들이다. db/db 마우스들은 ob/ob 마우스들과 유사한 표현형을 나타내는데, 단 db/db 마우스들은 보다 심각한 당뇨성 표현형을 나타내기도 한다. 그러한 db/db 마우스들은 순환하는 OB 단백질의 효과에 대하여 내성인 것으로 여겨진다. 또한 이들 파라미터들을 평가하는 다양한 시험관내 방법들도 당해 기술분야에 공지이다.

인슐린-자극된 지질 생성은 예를 들면 ¹⁴C-아세테이트의 트리글리세리드 안으로의 통합 (Mackall et al., J. Biol. Chem. 251: 6462-6464, 1976) 또는 트리글리세리드 축적 (Kletzien et al., Mol. Pharmacol. 41: 393-398, 1992)을 측정함으로써 모니터링될 수 있다.

글루코스 흡수는 예를 들면 인슐린-자극된 글루코스 수송에 대한 검정법으로 평가될 수 있다. 형질전환되지 않고, 분화된 L6 근관 (G418 없이 유지됨)이 1 g/l의 글루코스, 0.5 또는 1.0 %의 BSA, 20 mM의 Hepes, 2 mM의 글루타민이 첨가되어 있는 DMEM에 넣어진다. 2 내지 5 시간동안 배양된 후에, 배지는 0.5 또는 1.0 %의 BSA, 20 mM의 Hepes, 1 mM의 피루브산염, 및 2 mM의 글루타민이 함유되어 있는 새로운, 글루코오스가 없는 DMEM 배지로 교체된다. 여기에 적절한 농도의 인슐린 또는 IGF-1, 또는 시험 물질의 일련의 희석액이 첨가되고, 세포는 20 내지 30 분동안 인큐베이션된다. ³H 또는 ¹⁴C-표지된 데옥시글루코스가 약 50 nM 최종 농도로 첨가되고, 세포는 대략 10 내지 30 분동안 인큐베이션된다. 그런 다음 세포는 저온 완충액 (예컨대 PBS)으로 빠르게 세정된 후, 적당한 용해제 (예컨대 1 % SDS 또는 1 N NaOH)로 용해된다. 그런 다음 세포 용해물이 신틸레이션 카운터에서 카운팅됨으로써 평가된다. 세포-결합된 방사능은, 세포를 글루코스 수송의 억제제인 시토크라신 b의 존재하에 인큐베이션함으로써 측정되는 바와 같은 비-특이적인 결합을 뺀 후의 글루코스 수송의 척도로서 취한다. 다른 방법들로는 문헌에 설명된 방법들이 있다 (Manchester et al., Am. J. Physiol. 266 (Endocrinol. Metab. 29): E326-E333, 1994 (인슐린-자극된 글루코오스 수송)).

단백질 합성은 예를 들면, 시험 세포를 ³⁵S-메티오닌 및 잠정적인 단백질 합성의 조절제와 함께 인큐베이션한 후에 ³⁵S-메티오닌-표지된 단백질의 침전을 비교함으로써 평가될 수 있다.

열발생은 문헌에 발표된 방법들에 의하여 평가될 수 있다 (B. Stanley in The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides, W. Colmers and C. Wahlestedt (eds.), Humana Press, Ottawa, 1993, pp. 457-509; C. Billington et al., Am. J. Physiol. 260: R321, 1991; N. Zarjevski et al., Endocrinology 133: 1753, 1993; C. Billington et al., Am. J. Physiol. 266: R1765, 1994; Heller et al., Am. J. Physiol. 252(4 Pt 2): R661-667, 1987; 및 Heller et al., Am. J. Physiol. 245(3): R321-328, 1983). 또한, 다양한 기법에 의해 측정될 수 있는 대사율은 열발생의 간접적인 척도이다.

산소 활용은 헬러 등의 방법에 의하여 평가될 수 있다 (Heller et al., Pflugers Arch 369(1): 55-59, 1977). 이 방법은 또한 시상하부의 온도 및 대사 열 발생의 분석을 포함한다. 산소 활용 및 열조절은 또한 문헌에 소개된 바와 같이 사람에게서 평가되었다 (Haskell et al., J. Appl. Physiol. 51(4): 948-954, 1981).

본 발명의 zsig45 폴리펩티드는 신경내분비/외분비 세포 운명 결정 경로에서 작용을 할 것이고, 그러므로 체장의 신경 내분비 및 외분비 세포의 확장을 조절할 수 있다. 그러한 한 가지 조절적인 용도는 성세포 재생의 조절이다. 또한, IDDM을 야기하는 자가면역성은 자궁에서 출발하고, zsig45 폴리펩티드는 세포 구획화에 포함된 발생적인 유전자인 것으로 가설화되어 있다. 외분비/신경 내분비 세포 계통 결정을 모니터링하고, 체장 세포 평형을 관찰하고, 상술된 질환의 예방 또는 치료에서 zsig45 폴리펩티드, 단편, 융합 단백질, 항체, 아고니스트 또는 길항체를 평가하기 위한 검정 및 동물 모델이 당해 기술분야에 공지되어 있다.

당해 기술분야에 공지된 또는 본원에서 설명되는 다른 방법들중에서도, 포유동물의 내피 세포 조직 보호는 내피 조직의 기능을 모니터링함으로써 평가될 수 있다. 예를 들어, 심장 (대동맥)의 기능은 아세틸콜린 방출, 노르에피네프린 방출 또는 유사한 파라미터의 모니터링에 의해 평가될 수 있다. 이들 파라미터들은 하기에서 상세하게 설명되는 바와 같이, 당업자에게 공지된 기법들 (검정 또는 동물 모델)에 의하

여 모니터된다.

아세틸콜린 및 노르에피네프린 방출은 HPLC 에 의하여 모니터될 수 있다. 레비는 관상 동 (coronary sinus) 유출물에서의 노르에피네프린을 측정하는 것에 대하여 설명하였다 (Levy, *Electrophysiology of the Sinoatrial and Atrioventricular Nodes*, Alan R. Liss, Inc., 187-197, 1998). 또한, 동물들은 전기적으로 심장 박동이 조율되고, 그 결과는 문헌에 설명된 바와 같이 모니터된다 (Elsner, *European Heart Journal* 16 (Supplement N) 52-58, 1995, Reiffel and Kuehnert, *PACE* 17(Part 1):349-365, 1994).

zsig45 폴리펩티드는 또한 결장에서 발현된다. 그러므로, 본 발명의 zsig45 폴리펩티드 약학 조성물은 또한 GI 트랙의 소화성 질환, 예컨대 병리학적 분비 세포 확대 또는 분화와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용할 것이다. 그러한 확대 또는 분화를 모니터하고, 그것의 예방 또는 치료에 사용되는 폴리펩티드 단편, 용합 단백질, 항체, 아고니스트 및 길항체를 포함하여 zsig45 폴리펩티드를 평가하기 위한 검정 및 동물 모델이 당해 기술분야에 공지되어 있다.

더욱이, 장의 세가지 (trefoil) 인자가 소화관의 점막 안정화 및 급성 손상과 관련된 수복 과정, 특히 내피 복구에 포함된 것으로 알려졌다 (Poulsom, R., *Bail. Clin. Gastro.*, 10:113-134, 1996; Sands, B.E., and Podolsky, D.K., *Annu. Rev. Physiol.*, 58:253-273, 1996). 또한, 세 가지 단백질이 장의 염증성 질병에 의해 유발된 상처의 치유, 및 점막 분비 관계를 경유하는 미생물의 침입에 대항하는 데 역할을 담당하는 것으로 여겨진다 (Palut, A.G., *New Eng. J. Med.*, 336:5-6-507, 1997; Playford, R.J., *J. Royal Coll. Phys. London*, 31:37-41, 1997). 내피 성장 인자 (EGF) 수용체 리간드는 소화관에서 세 가지 활성을 증가시키는데 역할을 담당할 것이다; 그러나, 점막 손상의 수복은 소화관의 주요 내인성 EGF 수용체 리간드, TNF- α 에 좌우되지 않으며, 이것은 다른 발견되지 않은 리간드의 역할을 시사한다 (Cook, G.A., et al., *Am. Physiol. Soc.*, G1540-G1549, 1997). 예를 들어, zsig45 폴리펩티드는 그러한 리간드, 조절 단백질 또는 세 가지 경로의 다른 인자로서 작용할 수 있고, 따라서 소화관 및 점막 내피와 관련된 질병 및 손상에서 중요한 치료적 역할을 한다.

EGF 는 또한 갑상선에서 발현되고 갑상선 세포의 시험관 내에서의 성장 및 분화를 조절한다 (Dagogo-Jack, S., *Afr. J. Med. Sci.*, 24:211-217, 1995). 그러므로, EGF 수용체와의 zsig45 의 상호작용은 또한 갑상선 기능에 영향을 줄 것이고, 따라서 갑상선 질병, 또는 갑상선 기능부전과 관련된 질병의 치료적 역할을 담당한다. 많은 성장 인자들이 갑상선 조직에서 검출되며 (Dagogo-Jack, S., 상기 동일); zsig45 는 하나 또는 둘 이상의 다른 인자들의 활성 또는 생리적 경로에 영향을 미친다.

zsig45 의 갑상선 발현은 본 발명의 폴리펩티드가 갑상선외 조직의 세포막에 대한 작용에 의해 공지의 갑상선 호르몬과 유사할 수 있음을 시사한다. 그러므로, 본 발명의 폴리펩티드는 세포막에 대하여 비-핵 효과를 발휘할 수 있고, 심장 및 림프관 조직과 같은 조직에서 치료적 적용시 유용할 것이다. 예를 들어, 막 효과는 심근의 Na⁺-채널의 비활성화 또는 적세포 Ca²⁺-ATPase 활성의 자극을 포함할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 zsig45 펩티드는 심장 질병 또는 심근 수축성이 기능부전의 치료에, 또는 용질 수송 및 이온 채널과 관련된 다른 질병, 예컨대 당뇨병, 뼈 질병, 조혈 장애, 면역 장애, 백혈병, 고혈압, 심장 비대, 다른 심장 질환 및 신경 질병과 같은 유전적 및 다른 사람 질병 상태와 관련된 신장, 골수, 근육 및 다른 신경의 병리학의 치료에 사용될 수 있다.

심장 기능에 미치는 갑상선 기능의 효과는 문헌에 잘 정립되어 있다 (Lompre, A., et al., *J. Mol. Cell Cardiol.*, 26:1109-1121, 1994). 동물에서, 증가된 수축 및 완화 속도는 갑상선 기능 항진증과 관련이 있고, 감소된 수축성은 갑상선 기능부전과 관련이 있다. 이들 효과는 심근의 근소포체에서 발견되는 Ca²⁺-ATPase 를 통하여 중재될 수 있다. 그러한 효과는 쉽게 하기에서 개시되는 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

본 발명의 분자들의 심장 활성은 랑겐도르프 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 이 바람직한 검정은 실험 동물에 대하여 생체외에서 심장 기능을 측정하며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 실험 동물은 예를 들면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 쥐, 토끼 및 기니아 피그이다. 심장 조직에 미치는 만성 효과는 시험 동물을 zsig45 폴리펩티드로 1 내지 7 일동안, 또는 그 이상 처리한 후 측정될 수 있다. 대조 동물은 단지 완충액만을 받을 것이다. 처리후, 심장이 제거되고 대동맥을 통하여 거꾸로 관류된다. 관류되는 동안, 여러 가지의 파라미터가 측정된다: 시간당 관상동맥의 혈류, 좌심실 (LV)압력, 및 심박. 이들 파라미터들은 심장 기능을 직접적으로 반영한다. 이들 파라미터의 변화는 랑겐도르프 검정에 의해 측정되는 바, 대조 동물에 대한 zsig45 폴리펩티드를 이용한 생체내 처리에 이어서 심장 기능에 대한 폴리펩티드의 만성 효과를 나타낸다. 더욱이, 랑겐도르프 검정은 또한 심장에 미치는 zsig45 폴리펩티드의 급성 효과를 측정하기 위해서도 사용될 수 있다. 그러한 적용에서, 처리되지 않은 동물로부터의 심장이 사용되고, zsig45 폴리펩티드가 검정에 관수하기 위하여 첨가된다. 상기에서 평가된 파라미터들은 측정되고, zsig45 폴리펩티드가 관수에서 생략된 대조 심장으로부터의 결과와 비교된다. 심박의 차이, 시간당 혈압의 변화, 및/또는 관상동맥의 혈류는 본 발명의 분자들의 심장 기능에 미치는 급성 효과를 가리킨다.

본 발명의 분자들의 효과는 또한 이온 채널 활성을 측정하는 다양한 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특히 관심있는 것은 세포막을 가로지르는 이온 채널을 측정하는 것이다. 그러한 검정은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 신규한 이온 채널 또는 그것들의 조절제의 활성을 평가하기 위한 특이한 검정으로는, 그것에 한정되는 것은 아니지만, 제노푸스 래비스의 난모세포에서 전압-의존성 콘덕턴스를 측정하는 생체검정이 있다 (Rudy, B., Iverson, L.E., eds., *Meth. Enzymol.*, vol. 207, Academic Press, San Diego, CA, 1992; Hamill, O.P. et al., *Pfluegers Arch.* 391:85-100, 1981; Moorman, J.R. et al., *J. Biol. Chem.* 267:14551-14554, 1992; Durieux, M.E. et al., *Am. J. Physiol.* 263:C896-C900, 1992). 이 방법은 시험관내 발현된 mRNA 를 단리된 난모세포안에 주입하고, 패취-클램프 기술을 사용하여 전압-의존성 콘덕턴스를 평가하는 것을 포함한다. 이온 채널 또는 그것의 조절제는 이 검정 시스템에서 전압-의

존성 콘덕턴스를 증가시킬 것이다. 이 시스템은 다른 세포 유형, 예를 들면 곤충 및 포유동물 세포에도 적용될 수 있다 (Rudy, B., Iverson, L.E., eds., 상기 동일). 다른 검정은 포유동물 또는 다른 세포 타입에서 칼레이터 염료, 예컨대 Fura2 를 사용함으로써 이온 채널 활성을 간접적으로 측정하는 것을 포함한다 (James-Kracke M. R., J. Gen. Physiol. 99:41-62, 1992; Raugh, P. et al., Gene, 190:151-156, 1997). 다른 검정은 이온 플럭스 또는 이온 채널 포스포릴화에 의해 신호화된 포유동물 세포에서의 유전자 발현의 변화를; 예를 들면 본원에 개시된 적당한 프로모터하에서 측정가능한 리포터 유전자, 예컨대 루시페라제의 발현을 유도함으로써 측정하는 것을 포함한다.

본 발명의 분자들은 심장 조직 세포, 예컨대 심근 또는 근아세포; 골격근세포 또는 근아세포 및 평활근 세포; 크론드로사이트; 내피 세포; 항지방세포 및 골아세포의 시험관 내에서의 증식에 유용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 분자들은 규정된 세포 배양 배지의 성분으로서 유용하며, 단독으로 또는 세포 배양에 통상적으로 사용되는 혈청을 대신하기 위한 다른 사이토킨 및 호르몬과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 특히 배양중의 근세포의 성장 및/또는 발생을 특이하게 촉진하는데 유용하며, 또한 심장의 근세포 과형성 및 재생의 연구에 유용할 것이다.

본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및/또는 항체는 심근 경색, 울혈성 심장 질환, 비대성 심근증 및 팽창된 심근증과 관련된 질병의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 또한 심장 쇼크후 경색의 크기를 제한하기 위하여, 심장 이식후 회복을 도와주는데, 혈관형성술 및 혈관성형 또는 동맥내막 절제술 후의 상처 치유를 촉진하는데, 관상동맥의 측 순환을 발생시키기 위하여, 눈의 혈관 이식을 위하여, 당뇨병 발케양과 같은 불량한 순환과 관련된 합병증에 대하여, 약리학적 방법을 사용한 관상동맥 재관류후의 스트로크에 대하여, 및 혈관형성이 유익한 다른 징후에 대하여 유용할 수 있다. 본 발명의 분자들은 심근세포 신생 및/또는 과형성을 유도함에 의해, 또는 관상동맥의 측 발생을 유도함에 의해, 또는 괴사 심근 영역의 재모델링을 유도함에 의해 심장의 기능을 개선하는데 유용할 수 있다. 본 발명에 대한 다른 치료적 용도로는 골격근 신생 및/또는 과형성, 시장 재생의 유도 및/또는 전신성 및 폐 고혈압의 치료가 있다.

zsig45 유도된 관상동맥 측 발생은 토끼, 개, 또는 돼지에게서 관상 동맥 폐색 모델을 사용하여 측정된다 (Landau et al., Amer. Heart. J. 29:924-931, 1995; Sellke et al., Surgery 120(2):182-188, 1996; Lazarous et al., 1996, 상기 동일). 스트로크를 치료하기 위한 zsig45 효력은 쥐에서 쌍방의 경동맥 폐색을 활용하고, 조직학적 변화와 메이즈 (당황함) 성능을 측정함으로써 생체내에서 시험된다 (Gage et al., Neurobiol. Aging 9:645-655, 1988). 고혈압에서의 zsig45 효력은 전신적인 고혈압에 대한 자생적인 고혈압 쥐 (SHR)를 활용하여 생체내에서 시험된다 (Marche et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 1:S114-116, 1995).

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 질병 또는 다른 사람 특색과 관련된 사람 염색체 2 상의 이상을 검출하기 위하여 사용된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 사람 염색체 2 상에 2q37.3 영역에 대해 지도화한다. zsig45 유전자는 WICGR 방사선 하이브리드 지도상의 사람 염색체 2 연결기의 상부로부터 1086.2cR_3000 에 위치한다. 근위 및 원위 프레임워크 마아커는 각각 WI-6310 (D2S2704) 및 D2S2585 였다. 주변을 둘러싼 마아커들의 사용은 zsig45 유전자를 통합된 LDB 염색체 2 지도상의 2q37.3 영역에 위치시킨다.

본 발명은 또한 진단용 적용에 사용될 시약을 제공한다. 예를 들어, zsig45 유전자, zsig45 DNA 또는 RNA 를 포함하고 있는 프로브, 또는 그것의 서열이 zsig45 유전자가 염색체 2 상에 존재하는지 또는 돌연변이가 일어났는지의 여부를 측정하는데 사용될 수 있다. zsig45 유전자 유전자좌에서 검출가능한 염색체상의 변형으로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 이수체, 유전자 복사수 변화, 삼입, 결실, 제한 부위 변화, 및 재배열이 있다. 그러한 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 사용하여, 분자 유전학 기법, 예컨대 제한 단편 길이 다형태 (RFLP) 분석, PCR 기법을 사용하는 짧은 텐덤 반복 (STR) 분석, 및 당해 기술분야에 공지되어 있는 다른 유전자 결함 분석 기법을 사용함으로써 검출될 수 있다 (Sambrook et al., 상기 동일; Ausubel et al., 상기 동일; Marian, A.J., Chest, 108:255-265, 1995).

Zsig45 폴리뉴클레오티드 프로브는, 사람 게놈의 2q37.3 영역에 대한 지도 뿐만이 아니라 사람 질병 상태에서 그 자체가 나타나는, 2q37.3 과 관련된 또는 그곳에 위치한 비정상 또는 유전형형을 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 공적으로 활용가능한 WWW 서버상에서 염색체 2 의 이 영역에 대해서는 온라인 멘델리안 인헤리턴스 오브 맨 (OMIM)을 참조한다 (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Omim/getmap?chromosom=2q37.3>). 그 자체가 사람 질병 상태에서 나타나는 이들 모두는 zsig45 유전자와 동일한 염색체상의 영역에 대한 결함을 보이는 유전되는 질병에 대한 가능한 후보 유전자로서 작용한다.

유사하게, zsig45 유전자좌 자체의 결핍이 유전되는 사람 질병 상태를 초래할 수도 있다. 본 발명의 분자들, 예컨대 본 발명의 폴리펩티드, 길항체, 아고니스트, 폴리뉴클레오티드 및 항체들은 zsig45 유전자 결핍과 관련된 검출, 진단, 예방, 및 치료에 도움을 줄 것이다.

zsig45 를 사용하는 다른 진단용 적용도 사용될 수 있다. 예를 들어, zsig45 DNA 또는 RNA 를 포함하고 있는 zsig45 유전자 프로브는, zsig45 유전자가 질병에 걸린 조직에서 상이하게 발현되는 지를 측정하기 위하여 사용될 수 있다. 그러므로, 그러한 zsig45 프로브는 감상선 기능을 평가하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 다른 질병중에서도, zsig45 는 특정 감상선, 하수체, 결장, 뼈 및 내분비 암, 또는 상기 조직과 관련된 다른 질병에서 발현될 수 있다. 또는 달리, 특정 조직에서의 zsig45 발현은 정상과 관련된 특정 질병 상태에서 감소될 수 있다.

약학적 사용을 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 종래의 방법을 따라 비경구용으로, 특히 정맥내 또는 피하 전달을 위해 제형될 수 있다. 정맥내 투여는 1 내지 수 시간의 전형적인 시간에 걸친 거한 주사 또는 주입에 의한 것일 것이다. 국소적인 효과가 바람직한 적용에 대해서, 예를 들어 국소화된 (예컨대 감상선) 간세포로부터의 선속한 세포의 특정 유형의 형성에 영향을 주기 위해서는, 국소 투여를 위해 디자인된 제형이 바람직하다. 그러한 약학적 조성물은 예를 들면 이식 또는 다른 국소적인 전달 방법에 잘 적응되며, 추가로 지속된 방출을 위해 제형될 수 있다. 다양한 투여 방식에 대하여 약학적 조성물을 제형하는

것은 당업자의 수준내에 있다.

일반적으로, 약학적 제형에는 zsig45 폴리펩티드가 약학적으로 허용되는 부형제, 예컨대 식염수, 완충 식염수, 물 중의 5 % 덱스트로스 등과 함께 포함될 것이다. 제형에는 또한 추가로 하나 또는 둘 이상의 부형제, 보존제, 용해제, 완충제, 바이러스 표면상에서 단백질 손실을 방지하기 위한 알부민 등이 포함될 수 있다. 제형 방법은 당해 기술분야에 공지이며, 예를 들면 문헌에 설명되어 있다 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995). 치료적 용량은 일반적으로 허용된 기준을 따라, 치료될 질환의 성질 및 심각도, 환장의 특징 등을 고려하여 임상적에 의해 결정될 것이다. 용량의 결정은 당업자의 수준내에 있다. 폴리펩티드는 급성 치료에 대해, 1 주일 또는 그것보다 적은 시간, 때로는 하루에서 3 일의 기간에 걸쳐 투여될 수 있으며, 또는 만성 치료의 경우 여러 달 또는 여러 해 동안 사용될 수 있다.

본 발명을 하기의 비-제한 실시예에 의하여 한층 더 설명하기로 한다.

실시예

실시예 1 : zsig45 의 확인

A. 전체-길이의 zsig45 를 얻기 위한 EST 서열의 사용

의문의 대상으로서 신호 트랩을 사용하여, 번역된 인-하우스 하수체 라이브러리 DNA 데이터베이스를 스캐닝한 결과, 사람 분비 신호 서열에 상동하는 것으로 밝혀진 발현된 서열 태그 (EST) 서열을 확인하였다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 상기 확인된 EST 의 서열로부터 디자인하였다. 프라이머를 사람 하수체 cDNA 라이브러리로부터 전-길이의 클론을 분리하기 위하여 EST 내에서 내부적으로 프라이밍하기 위하여 사용하였다.

B. 전 길이의 zsig45 cDNA 의 분리:

전-길이의 cDNA 를 얻기 위하여, 3' RACE 를 사용하였다. 3' RACE 생성물은 주형으로서 사람 하수체 cDNA 라이브러리를 사용하고 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 ZC 694 (SEQ ID NO: 16) 및 ZC 14,030 (SEQ ID NO: 17)을 사용하여 제조하였다. 이 첫 번째 라운드의 3' RACE PCR 반응을 다음과 같이 수행하였다: 94 °C 에서 5 분 동안 1 사이클; 94 °C 에서 30 초동안, 55 °C 에서 30 초동안, 그리고 72 °C 에서 3 분동안 35 사이클.

그 결과 생성된 DNA 생성물을 1.5 % 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고, 대략 650 bp 에서 두드러진 밴드를 볼 수 있었다. DNA 밴드를 겔 정제하였고, PCR-블렌트 단위™의 벡터 (Invitrogen, San Diego, CA) 안에 하위클론하였다. 하위클론의 서열 분석 결과, DNA 서열이 EST DNA 서열을 포함하고 있는 것으로 나타났다.

이 650 bp 삽입물을 EcoRI 을 사용하는 제한 효소 소화에 의하여 벡터로부터 자유롭게 하고, 1 % 아가로스 겔상에서 전기영동하였다. 단편을 상업적으로 활용가능한 겔 추출 키트 (QiaexII™; Qiagen Inc., Chatsworth, CA)를 사용하여 정제한 후, 프라임-It II , 무작위 프라임 표지화 시스템 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)을 사용하여, 제조업자의 명세를 따라 ³²P-dCTP 로 방사성 표지하였다. 그런 다음 프로브를 Nuc-Trap™ 칼럼 (Stratagene)을 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA) 용액을 예비혼성화에 대하여 및 사람 하수체 라이브러리의 콜로니 리프트에 대한 혼성화 용액으로서 사용하였다. 혼성화는 65 °C 에서 5×10^6 cpm/ml 의 표지된 프로브를 사용하여 하룻밤동안 일어났다. 그런 다음 콜로니 리프트를 $2 \times$ SSC/1 % SDS 에서 65 °C 에서 세척한 후, 이어서 $0.1 \times$ SSC/0.1 % SDS 에서 55 °C 에서 세척하였다. 혼성화 클론을 분리하였고, 이것이 zsig45 단백질을 코딩하는 전-길이의 cDNA 를 함유하고 있는 것으로 발견되었다.

실시예 2 : 조직 분포

사람 다중 조직 블롯 (MTN I, MTN II, 및 MTN III)을 사용하여 노던 블롯 분석을 수행하였다. 실시예 1 에서 설명된 650 bp 의 클론된 삽입물을 함유하고 있는 벡터를 제한 효소로 소화시키고, 1 % 아가로스 겔 상에서 전기영동하였다. 650 bp 단편을 상업적으로 활용가능한 키트 (QiaexII™; Qiagen)를 사용하여 정제한 후, 프라임-It II , 무작위 프라임 표지화 시스템 (Stratagene Cloning Systems)을 사용하여, 제조업자의 명세를 따라 ³²P-dCTP 로 방사성 표지하였다. 그런 다음 프로브를 Nuc-Trap™ 칼럼 (Stratagene)을 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA) 용액을 예비혼성화에 대하여 및 노던 블롯에 대한 혼성화 용액으로서 사용하였다. 혼성화는 65 °C 에서 5×10^6 cpm/ml 의 표지된 프로브를 사용하여 하룻밤동안 일어났다. 그런 다음 블롯을 $2 \times$ SSC/1 % SDS 에서 65 °C 에서 세척한 후, 이어서 $0.1 \times$ SSC/0.1 % SDS 에서 55 °C 에서 세척하였다. 하나의 전사물 크기는 대략 650 bp 에서 검출되었다. 신호 세기는 감상선에 대해 가장 높았다. 650 bp 에서의 신호는 블롯상에 나타난 어떠한 다른 조직에서도 존재하지 않았다.

돗트 블롯을 또한 사람 RNA Master Blot™ (Clontech)을 사용하여 수행하였다. 돗트 블롯에 대한 방법 및 조건은 상술된 다중 조직 블롯에 대한 것과 동일하였다. 강한 신호 세기가 감상선, 및 하수체 선에서 존재하였다. 덜 강한 신호는 결장에서 나타났다.

실시예 3 : zsig45 유전자의 PCR 을 기초로 한 염색체 지도화

상업적으로 활용가능한 "유전자 브릿지 4 방사선 하이브리드 패널" (Research Genetics, Inc.,

Huntsville, AL) 을 사용하여 zsig45 를 염색체 2 에 대해 지도화하였다. 유전자 브릿지 4 방사선 하이브리드 패널은 93 개의 방사선 하이브리드 클론의 각각으로부터 유도된 DNA 와, 두 개의 대조 DNA (HFL 공여체 및 A23 수용체)를 함유하고 있다. 공개적으로 활용가능한 WWW 서버 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>)로, 유전자 브릿지 4 방사선 하이브리드 패널을 사용하여 구성된 사람 게놈의 게놈 리서처 방사선 하이브리드 지도 ("WICGR" 방사선 혼성화 지도)에 대한 화이트 헤드 인스티튜트/MIT 센터에 대하여 지도화하는 것이 가능해진다.

"유전자 브릿지 4 RH 패널" 을 사용하여 zsig45 를 지도화하기 위해서는, 20 μ l 의 반응액을 96-웰의 미수적정 플레이트 (Stratagene, La Jolla, CA)에 셋업하고, "로보사이클러 그라디언트 96" 열 사이클러 (Stratagene)에서 사용하였다. 95 개의 PCR 반응액의 각각은 2 μ l 의 10 \times KlenTaq PCR 반응 완충액 (Clontech), 1.6 μ l 의 dNTP 혼합물 (각각 2.5 mM, Perkin-Elmer, Foster City, CA), 1 μ l 의 센스 프라이머, ZC 15,414 (SEQ ID NO: 18), 1 μ l 의 안티센스 프라이머, ZC 15,413 (SEQ ID NO: 19), 2 μ l 의 "RediLoad" (Research Genetics, Inc.), 0.4 μ l 의 50 \times 어드밴티지 KlenTaq 중합효소 혼합물 (Clontech), 개별적인 하이브리드 클론 또는 대조표준으로부터의 25 ng 의 DNA 및 총 부피를 20 μ l 로 맞추기 위한 이차 증류수로 구성되었다. PCR 사이클러 조건은 다음과 같았다: 95 $^{\circ}$ C 에서 5 분동안 변성시키는 초기 1 사이클; 95 $^{\circ}$ C 에서 1 분동안 변성시키고 62 $^{\circ}$ C 에서 1 분동안 아닐링한 후, 72 $^{\circ}$ C 에서 1.5 분동안 연장시키는 사이클 40 회; 이어서 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 에서 7 분동안 연장시키는 1 사이클. 반응물을 2 % 아가로스 겔 상에서의 전기영동 (Life Technologies, Gaithersburg, MD)에 의해 분리하였다.

그 결과는 zsig45 가 WICGR 방사선 하이브리드 지도상의 사람 염색체 2 결합기의 상부로부터 1086.2 cR_3000 의 위치에 있는 것으로 나타났다. 근위 및 원위 프레임워크 마아커는 각각 WI-6310 (D2S2704) 및 D2S2585 였다. 주변을 둘러싼 마아커들의 사용은 zsig45 유전자를 통합된 LDB 염색체 2 지도상의 2q37.3 영역에 위치시킨다 (유전자 위치 데이터베이스, 싸우스햄프턴 대학, WWW 서버: <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public.html/>).

실시예 4 : zsig45 아미노 말단 Glu-Glu 태그부착된 및 카르복시 말단 Glu-Glu 태그 부착된 효모 발현 벡터의 제조 및 발현

피치아 메타놀리카에서의 zsig45 의 발현은 WIPO 공보 WO 97/17450 에서 설명된 발현 시스템을 활용한 다. ZSIG45 를 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 전부 또는 부분적으로 함유하고 있는 발현 플라스미드는 동종 재조합을 통하여 제조된다. 발현 벡터는 C-말단 Glu-Glu-태그 부착된 (CEE), 또는 N-말단 Glu-Glu-태그 부착된 (NEE) zsig45 폴리펩티드를 발현하기 위하여 pCZR204 로부터 만들어졌다. pCZR204 벡터에는 AUG1 프로모터와, 이어서 α Fpp 리더 서열, N-말단의 Glu-Glu-태그, 불린트-단부의 Sma I 제한 부위, 카르복시-말단의 펩티드 태그 (Glu-Glu), 번역 중지 코돈, 그리고 이어서 AUG1 터미네이터, ADE2 선택가능한 마아커, 및 마지막으로 AUG1 3' 미번역 영역이 함유되어 있다. 또한 이 벡터에는 맥주효모균에서의 선택 및 복제에 필요한 URA3 및 CEN-ARS 서열, 및 대장균에서의 선택 및 복제에 필요한 Amp^r 및 colE1 ori 서열이 포함된다. 이들 벡터에 삽입된 zsig45 서열은 zsig45 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 2)의 잔기 47 (Lys) 에서 시작한다.

각각의 구성물에 대하여 두 개의 링커를 제조하고, zsig45 를 따라 상술된 효모 발현 벡터안에 동종 재조합하였다. 태그가 없는 N-말단 링커 (SEQ ID NO: 20)는 한 쪽 단부상에 있는 알파 인자 프레스프로 (α Fpp) 코딩 서열의 70 염기쌍에 걸쳐 있고, 그것을 다른 쪽에 있는 성숙한 zsig45 서열로부터의 아미노-말단 코딩 서열의 70 염기 쌍에 결합시킨다. NEE-태그 부착된 링커 (SEQ ID NO: 21)는 α Fpp 코딩 서열과 zsig45 서열 사이에 Glu-Glu 태그 (SEQ ID NO: 22)를 결합시킨다. 태그가 부착되지 않은 C-말단 링커 (SEQ ID NO: 23)는 70 염기쌍의 AUG1 터미네이터 서열을 한 쪽 단부에 가지고 있는 zsig45 의 카르복시 말단 코딩 서열의 약 70 염기쌍에 걸쳐 있다. CEE-태그 부착된 링커 (SEQ ID NO: 24)는 zsig45 의 C-말단 단부와 AUG1 터미네이터 영역 사이에 Glu-Glu 태그 (SEQ ID NO: 22)를 삽입시킨다. NEE-태그 부착된 zsig45 를 만들기 위해서는, NEE-태그 부착된 링커와 태그가 부착되지 않은 C-말단 링커를 동종 재조합 사건에 사용하였다; CEE-태그 부착된 zsig45 를 만들기 위해서는, CEE-태그 부착된 링커와 태그가 부착되지 않은 N-말단 링커를 동종 재조합 사건에 사용하였다.

NEE-태그 부착-zsig45 플라스미드의 제조

NEE-태그 부착-zsig45 플라스미드를, 100 ng 의 Sma I 소화된 pCZR204 수용체 벡터, 1 μ g 의 Eco RI-BamHI zsig45 cDNA 공여 단편, 1 μ g 의 NEE-태그 부착-zsig45 링커 (SEQ ID NO: 21) 및 1 μ g 의 C-말단 태그 미부착 링커 (SEQ ID NO: 23) 을 맥주효모균 (SF838-9D)내에서 동종 재조합시킴으로써 제조하였다 (Rothman, J. et al., EMBO J. 8:2057-2065, 1989).

NEE-zsig45 링커를 PCR 반응에 의하여 합성하였다. 100 μ l 의 최종 반응 부피에 센스 및 안티센스 중심 올리고, ZC13,731 (SEQ ID NO: 25) 및 ZC15,264 (SEQ ID NO: 26) 을 각각 1 pmol 씩, 센스 및 안티센스 올리고 프라이머 ZC13,497 (SEQ ID NO: 27) 및 ZC15,272 (SEQ ID NO: 28) 를 각각 100 pmol 씩, 10 μ l 의 10 \times PCR 완충제 (Boehringer Mannheim), 1 μ l 의 Pwo 중합효소 (Boehringer Mannheim), 10 μ l 의 0.25 mM 뉴클레오티드 트리포스페이트 믹스 (Perkin Elmer) 및 dH₂O 를 첨가하였다. PCR 반응을 94 $^{\circ}$ C 에서 30 초동안, 50 $^{\circ}$ C 에서 1 분 및 72 $^{\circ}$ C 에서 1 분동안을 10 회 반복하고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 에서 6 분간 연장시켰다. 그 결과 생성된 388 bp 의 이중 가닥, NEE-태그 부착된 링커를 SEQ ID NO: 21 에 표시한다.

C-말단 태그 미부착 zsig45 링커는 상술된 바와 같이, 센스 및 안티센스 중심 올리고, 각각 ZC15,725 (SEQ ID NO: 29) 및 ZC15,633 (SEQ ID NO: 30); 및 센스 및 안티센스 올리고 프라이머, ZC15,271 (SEQ ID NO: 31) 및 ZC13,734 (SEQ ID NO: 32) 를 사용하여 PCR 반응에 의하여 만들었다. 그 결과 생성된 290 bp 의 이중 가닥, C-말단 태그 미부착 링커를 SEQ ID NO: 23 에 표시한다.

CEE-zsig45 플라스미드의 제조

CEE-zsig45 플라스미드를, 100 ng 의 Sma I 소화된 pCZR204 수용체 벡터, 1 μ g 의 Eco RI-Bam HI zsig45