(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/00

(45) 공고일자 1999년07월01일
(11) 등록번호 10-0206524
(24) 등록일자 1999년04월08일

(21) 출원번호	10-1993-0700092	(65) 공개번호	특1993-0701596
(22) 출원일자	1993년01월13일	(43) 공개일자	1993년06월12일
번역문제출일자	1993년01월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 91/04986	(87) 국제공개번호	WO 92/01049
(86) 국제출원일자	1991년07월15일	(87) 국제공개일자	1993년09월30일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 및 리히텐스타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 룩셈브르크 네덜란드 스웨덴 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국		
(30) 우선권주장	7/553,759 1990년07월13일 미국(US)		

(73) 특허권자 더 제너럴 하스피털 코포레이션 어니스트 엠. 해데드
미합중국 메사추세츠 02129 챨스토운 슈트 1101빌딩 149 써틴스 스트리트

(72) 발명자 씨이드 브라이언
미합중국 메사츄세츠 02114 보스턴 조이 스트리트 47 에이
아루포 알레잔드로
미합중국 워싱턴 98020 에드몬드 스푸르스 스트리트 1012
아미오트 마틴

(74) 대리인 미합중국 메사츄세츠 02114 보스턴 웰만 빌딩 메사츄세츠 제너럴 하스피틀
황광현

심사관 : 안소영

(54) 씨디 53 세포 표면 항원 및 그를 암호화하는 재조합 디엔에이

요약

본 발명은 포유동물 숙주세포내의 일시적 형질발현을 기초로 하여 포유동물의 형질발현 라이브러리로부터 cDNAs를 클로닝 하는 간단하고 고도로 효율적인 방법에 관한 것이다. 포유동물의 cDNA 라이브러리의 고도로 효율적인 구성을 할 수 있게하는 새로운 형질발현 벡터에 대하여도 기술되어 있다. 인체 림프구의 세포 표면 항원에 대한 유전자를 클로닝하는데 사용되어온 본 발명의 클로닝 방법은 유전자를 클로닝하는데 일반적으로 응용하고 있다. 본 발명에 따라 클로닝 된 세포 표면 항원을 정제하고 그의 뉴클레오티드 시퀀스와 아미노산 시퀀스를 결정하였다. 이들 항원은 사람을 포함한 포유동물에서의 면역 중재된 전염병의 진단 및 치료 유용성을 갖는다.

대표도

```
   1  GGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
  51  TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GAACTGGCTT
 101  CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
 151  GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA
 201  ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG
 251  GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA
 301  CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA
 351  CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG
 401  GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC
 451  GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC
 501  GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG
 551  GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCCGAATTA CCGCGGTCTT
 601  TCTCAACGTA ACACTTTACA GCGGCGCGTC ATTTGATATG ATGCGCCCCG
 651  CTTCCCGATA AGGGAGCAGG CCAGTAAAAG CATTACCCGT GGTGGGGTTC
 701  CCGAGCGGCC AAAGGGAGCA GACTCTAAAT CTGCCGTCAT CGACTTCGAA
 751  GGTTCGAATC CTTCCCCCAC CACCATCACT TTCAAAAGTC CGAAAGAATC
 801  TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG GAGGTCGCTG AGTAGTGCGC GAGTAAAATT
 851  TAAGCTACAA CAAGGCAAGG CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT
 901  TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC TGCTTCGCGA TGTACGGGCC AGATATACGC
 951  GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA
1001  TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC TTACGGTAAA
1051  TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA
1101  TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA
1151  TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA
1201  TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG
1251  CCTGGCATTA TGCCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG
1301  TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC GGTTTTGGCA
1351  GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC
1401  TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG
1451  GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG
1501  AATTCCTGGG CGGGACTGGG GAGTGGCGAG CCCTCAGATG CTGCATATAA
1551  GCAGCTGCTT TTTGCCTGTA CTGGGTCTCT CTGGTTAGAC CAGATCTGAG
1601  CCTGGGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAA GCCTCAATAA
1651  AGCTTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGAGGGA TCTTCCATAC CTACCAGTTC
```

명세서

[발명의 명칭]

CD53세포 표면 항원 및 그를 암호화하는 재조압 DNA

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 계류중인 1988년 2월 25일자 미국 특허 출원 번호 제160,416호의 일부 계속 출원인, 계류중인 1989년 7월 13일자 미국 특허 출원 번호 제379,076호의 일부 계속 출원인, 계류중인 1990년 3월 23일자 미국 특허 출원 번호 제498,809호의 일부 계속 출원이다.

[발명의 배경]

재조합 유전학 분야의 기본 수단은 폴리(A)+ mRNA를 이중 가닥(이하 ds라 함) cDNA로 전환시켜 그것을 클로닝 벡터에 삽입하고 적당한 숙주 세포에서 형질발현시키는 것입니다. ds cDNA의 분자 클로닝 방법은 예를들어 Williams, The Preparation and Screening of a cDNA Clone Band, in Willaimson, ed. Genetic Engineering, Vol, 1, p. 2, Academic Press, New York(1981); Maniatis, Recombinant DNA, in Prescott, ed., Cell Biology, Academic Press, New York(1980); 및 Efstratiadis 등의, Cloning of Double-Stranded DNA, in Stelo 등의 Genetic Engineering, Vol, 1, p. 15, Plenum Press, New York(1979) 문헌에서 검토되어 왔다.

특정 유전자 및 cDNA 클로닝 방법의 성공적인 클로닝에 영향을 미치는 상당한 변수는 조심스럽게 선택되어야 한다. 많은 cDNA 콜로닝 방법에 있어서, 공통적인 방법은 관심있는 유기체 세포에서 유도된 전체 폴리(A)+ mRNA로부터 유도된 cDNA클론의 집합인 cDNA 라이브러리의 구성과 관련이 있다.

포유동물의 세포는 30,000개 이내의 상이한 mRNA 서열을 함유하고, 예를 들어 양의 풍부하지 않는 mRNA를 수득하는데 필요한 클론의 수는 훨씬 더 많아야 할 것이다. 람다박테리오 파지, 코스미드 및 바이러스 벡터들을 포함하는 상이한 형질 발현 벡터내의 진핵세포 게놈 DNA 라이브러리를 구성하는 방법은 공지되어

있다. 일반적으로 사용되는 몇몇 방법들은 예를들어, Maniatis 등의, Molecμlar Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, publisher, Cold Spring Harbor, New York(1982)문헌에 기술되어 있다.

일단 게놈 cDNA 라이브러리가 구성되면, 관심있는 특정 인체 유전자를 함유한 세포를 수천의 숙주 세포로부터 분리할 필요가 있다. cDNA 라이브러리로부터 표적 유전자를 분리하는 많은 상이한 방법들을 계속 변화시키면서 이용하였다. 이러한 방법에는 예를들어, 표적 유전자의 DNA 서열에 상보적인 핵산 서열을 가지는 표지된 mRNA단편인 핵산 프로브를 이용하는 방법이 포함된다. 이 방법을 형질 전환된 박테리아 숙주내의 풍부한 mRNA의 cDNA 클론에 적용하였을 때 이 프로브에 강하게 혼성화하는 군체들은 표적 DNA 서열을 포함하는 것 같다. 그 클론의 확인은 예를 들어 원위치 혼성화/선택법 [Goldberg 등의, Methods Enzymol., 68:206(1979) 문헌 참조]. 혼성 저해 번역법 [Paterson 등의, Proceedings of the National Academay of Sciences, 74:4370(1977) 문헌 참조] 또는 직접적인 DNA 서열결정법 [Maxam 및 Gilbert, Proceedings of the National Academy of Sciences, 74:560(1977) 및 Maat 및 Smith, Nucleic Acids Res., 5:4537(1978) 문헌 참조]에 의해 이루어질 수 있다.

그러나, 그러한 방법들은 그 목적이 cDNA 라이브러리로부터 비교적 풍부하지 않는 mRNA를 복제시키려 할 때 주된 약점을 갖는다. 예를들어, 직접적인 원위치 군체 혼성화벌을 이용하면 200의 1부 미만 정도의 초기 라이브러리 집단에 존재하는 mRNA종에 상보적인 cDNA를 함유한 클론을 검출하기란 매우 어렵다. 결과적으로, 전체 집단내의 mRAN를 풍부하게 하는 다양한 방법들(예를들어, 크기 분획법, 합성 올리고데옥시뉴클레오티드를 사용하는 방법. 차등혼성화법 또는 면역정제법)이 개발되었고 풍부하지 않은 mRAN를 복제시킬 때 자주 사용된다. 이러한 방법은 예를 들어, Maniatis 등의 Molecμlar Cloning : A Laboratory Manual, 상기 문헌에 기술되어 있다.

다수의 기능성 진핵 단백질은 초기에 그의 N-말단부에서 리더 서열 또는 시그널 서열을 함유한 전구체 분자의 형태로 존재한다. 이들 리더 서열은 세포막에 결합하고 시그널 서열이 시그널 펩티다제 효소에 의해 단백질로부터 절단된 후, 지질 이중층을 통해 잔여 단백질을 끌어당긴다. 이런 식으로 단백질이 세포로부터 분비되거나(예를들어, 인슐린, 혈청 알부민, 항체 및 소화관 효소) 그 단백질이 세포막의 외부 표면에 결합된 후(예를들어, 조직적합성 항원)에만 기능을 수행한다.

세포 표면 항원 특성을 가진 포유동물의 T 림프구는 세포 표면에 결합하는 단백린의 부가적인 예이다. 포유동물에서, 성숙한 골수에서 림프구로 유도된 모든 세포는 흉선, 지라, 림프절 및 임파성 집합체를 포함하는 림프 기관에 존재하고 혈액 및 림프계를 통해 활발히 순환하기도 한다. 성숙한 림프구 세포는 흉선-의존(T) 림프구 및 흉선-비의존(B) 림프구의 두 집단으로 나누어질 수 있다. T림프구는 흉선의 내부로 이동하여 거기에서 분화증식된다. 분화과정 중에 T 림프구는 Thy-1, TLA, gv-1, Ly-1, Ly-2, Ly-3 및 Ly-5를 포함하는 특징적인 세포 표면막 동종항원을 형질발현다. T림프구가 성숙함에 따라, T림프구는 재순환 T림프구의 전형적인 막 입체형태를 취하면서 TLA 항원 및 Thy-1항원 중 일부를 상실하고 조직적합성 항원을 얻는다. 이것에 대하여는 예를들어, Mota, Activity of Immune Cells, in Bier 등의 , eds., Fundamentals of Immunology, 2d Ed., Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-62(1986) 문헌에 기술되어 있다.

T림프구는 항체 형성 활성도에 간접적으로 관련되어 있으므로 단순 항체 적정 측정보다는 오히려 세포 기능의 복합적인 분석을 필요로 하였다. 이 때문에 부분적으로는 면역적응 개발에 있어서의 그들의 중요성은 비교적 최근까지 인식되지 않았다. 성숙 T림프구는 T헬퍼 세포, T억제 세포 및 T세포독성 세포를 포함하는 다른 T림프구 부집단들을 확인하기 위한 표지물 역할을 독특한 유형의 당단백질 표면항원을 합성하고 형질발현한다. 이들 각각의 부집단은 면역계를 조절함에 있어 매우 중요한 역할을 한다(Mota의 상기 문헌 참조).

인체에서 기능성이고 표현형인 이형의 T림프구가 잘 받아들여진다. 두 개의 주된 부집단인, 세포의 면역성을 중재하는 작동 T세포 및 헬퍼 T림프구오 억제 T림프구를 함유하는 조절 T세포가 공지되어 있다 : 이들 두 부집단은 세포 표면 항원에 향하고 있는 이형항혈청, 자가항체 및 모노클로날 항체로 한정되어졌다. 예를들어, 형성 초기에는 흉선에서의 인체 림프 세포들이 분화 2의 균주군(CD2)이라 명명된 모노클로날 항체에 강하게 반응하는 T11이라 명명된 항원을 형질발현하고, 세포 표면 항원 T1에 대한 모노 클로날 항체 CD5와 약하게 반응한다. 성숙되는 동안, 이들 세포는 T11(CD2)을 상실하고 모노클로날 항체 CD4, CD8 및 CD1으로 한정된 세 개의 새로운 항원을 수득한다. 더욱 성숙되면서, 흉선세포는 모노클로날 항체 CD1과 반응하는 세포 표면 항원을 형질발현하고 모노클로날 항체 CD3와 반응하는 T3 항원을 형질발현하는 것을 끝낸 다음 T4(CD4)또는 T8(CD8)항원을 형질발현하는 두 부집단으로 분리된다. 면역적응은 이 단계에서 수득되지만 흉선림프구가 흉선 외부로 이동할때까지 완전히 발달하지는 않는다(Mota 의 상기문헌 참조). 대부분의 흉선과는 대조적으로, 순환 T림프구는 T1(CD5) 및 T3(CD3)항원을 형질발현한다. T4(CD4) 항운은 약 55-65%의 말초 T림프구상에 존재하는 반면에, T8(CD8) 항원은 20-30%의 말초 T림프구 상에 존재한다. 이들 두부집단은 각각 헬퍼 T세포, 억제 T세포 및 세포독성 T세포에 해당한다.

T림프구 부집단을 구별하는 편리한 방법을 제공하는 것 이외에, 이들 세포 표면항원은 성숙 T세포 활성화 및 작동 기능을 위해 중요하다. T세포 활성화는 T세포 특히항원에 T세포 수용체가 결합하는 이외에 T세포와 표적 세포 또는 자극 세포 사이의 복합적인 일련의 세포 표면상호 작용과 관련이 있다.

예를 들어, 인체의 T세포 적혈구 수용체인 CD2는 흉선세포 및 T-림프구를 표적 세포(예를 들어, 적혈구) 및 흉선 상피에 접착하도록 한다. 이것은 인체에서 광범위하게 분포된 표면 항원인 LFA_3라 명명된 CD2의 특정 분자 리간드를 통해 발생한다. 이 현상은 오랫동안 양의 적혈구에 대한 항체를 생성하는 인체 세포를이미 감지, 분석 및 정제하는데 사용되어 왔고, Zaaalberg, Nature 202 : 1231(1964)문헌에 의해 처음으로 기술된 E-로제트 실험의 기초역할을 한다. CD2/LFA-3상호작용은 세포 용해성 표적 접합[Shaw 등의 Nature 323 : 262-264(1986)참조] 및 혼합된 림프구 반응[Martin 등의 J. Immunol. 131 : 180-185(1983) 참조]을 중재하는 것으로 나타났다. 항-CD2 모노클로날 항체는 CD2에 대해 더 폭넓은 면역 조절 역할을 나타내는 항원-독립 경로 [Meuer 등의 Cell 36 : 897-906 (1984) 문헌 참조]를 통해 말초 T-림프구를 직접적으로 활성화시킬 수 있다.

T림프구가 세포-증재 면역성의 주된 작동인자이고 면역 반응을 조절함에 있어 헬퍼 T세포 또는 억제 T세

포로서 관련되기도 한다는 인식은 임상 면역학을 의약에 실용적으로 응용하는 것을 증가시키는데 상당히 기여하는 결과를 낳았다. 본 출원의 범위네는 감염증에 대항하는 방어작용, 면역법, 기관이식, 혈액 저장에 의한 질병의 예방 및 면역계의 결합치료 및 면역학적 메카니즘에 의해 중재된 다양한 질병의 치료를포함한다. 더구나, 면역학적 기술은 호르몬과 약물측정시 임상 실험실에서 흔히 이용된다. 예를들어, 임상 면역학은 Weir, ed., Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes : Volume 4 : Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences, 4th Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford(1986) ; Boguslaski 등의 eds., Clinical Immunochemistry : Principles of Methods and Applications, Little, Brown Co., Bostion(1984); Holborow 등의, eds., Immunology in Medicine : A Comprehensive Guide to Clinical Immunology, 2d Ed., Grune Stratton, Londown (1983); 및 Petersdorf 등의 eds., Harrison's Principles of Internal Medicine, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Publisher, pp. 344-391(1983) 문헌에 기술되어 있다. 분명히, 면역계를 조정하는 단백질을 더욱 완전히 이해하는 것은 임상 면역학에 있어 상당히 가치가 있다.

상기한 바와 같이 포유동물의 단백을 암호화하는 cDNA를 분리하기 위한 포유동물의 형질발현 라이브러리의 사용은 몇 가지 잇점을 제공하였다. 예를 들어, 포유동물의 숙주세포에서 형질발현된 단백질은 기능성이어야 하고 모든 정상적인 번역후 변형을 진행할 것이다. 세포내 막계를 통해 수송되는 단백질은 대체로 완전한 수송 과정을 거쳐야 한다. 또한 포유동물의 형질발현계는 세포내의 수송 메카니즘과 세포 표면 단백질을 막에 부착시키고 삽입하는 메카니즘을 연구할 수 있게 하였다.

COS 세포라 불리우는 포유동물의 일반적인 숙주 세포는, 시미안 바이러스 균주 40(SV 40) 이라 명명되고 초기 및 후기의 기능성 유전자를 가지지만 기능성 복제 기원이 결여된 돌연변이 바이러스성 벡터로 원숭이의 신장 세포를 감염시킴으로써 형성된다. SV 40T 항원이 COS 세포내에 존재하기 때문에 SV 40 복제 기원을 포함하는 벡터상에 클로닝된 모든 외부 DNA는 COS세포에서 복제될 것이다. 외부 DNA는 세포성 DNA에 독립적이고 일시적으로 복제될 것이다.

최근 몇몇 림포킨을 제외하고 cDNA는 COS 세포내 형질 발현에 의해 분리되었으나 [Wong, G.G. 등의 Science 228 : 810-815(1985) ; Lee, F. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 2061-2065(1986) ; Yokota, T. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 5894-5898(1986) ; Yang, Y. 등의 Cell 47 : 3 - 10(1986) 참조], 일반적으로 포유동물의 형질발현 라이브러리로부터 분리되는 cDNA는 거의 없다. 이것에 대한 두가지 주요한 이유가 있는 것으로 나타났다. : 첫째로는, 큰 플라즈미드 라이브러리의 구성을 위한 현존 기술(Okayama, H. 등의 Mol. Cell, Biol. 2 : 161-170(1982) 문헌 참조]을 터득하기가 어렵고, 파지 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있는 라이브러리 크기는 좀처럼 연구되지 않는다는 것이다[Huynh, T. 등의 In : DNA Cloning Vol. I, A Practical Approach, Glover, D.M.(ed.), IRL Press, Oxford(1985), pp. 49-78 문헌 참조]. 둘째로는, 현존 벡터들이 예외적으로 특히 COS 세포내에서 높은 수준의 형질발현을 위해 불완전하게 적응된다는 것이다 [Wong G. G. 등의 Science 228 : 810-815(1985)문헌 참조]. 이들 cDNA가 특히 형질발현 라이브러리로부터 분리되기 쉽기 때문에 림포킨 cDNA와 관련하여 보고된 성공은 사용된 방법이 일반적으로 적합함을 시사하는 것은 아니다. 림포킨 생물검정은 매우 민감하고[Wong, G.G.등의 Science 228 : 810-815(1985); Lee, F. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 2061-2065(1986) ; Yokota, T. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 5894-5898 (1986) ; Yang, Y. 등의 Cell 47 : 3-10(1986) 문헌 참조], mRNA는 전형적 으로 풍부하고 짧다[Wong, G.G 등의 Science 228 : 810-815(1985) ; Lee, F. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 2061-2065(1986) ; Yokota, T. 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83 : 5894-5898(1986) ; Yang, Y. 등의 Cell 47 : 3-10(1986) 문헌 참조].

그러므로, 포유동물 숙주에서의 형질 발현은 보다 전통적인 클로닝 방법으로 분리된 유전자에 의해 암호화된 단백질을 확인하는 다양한 방법으로서만 이전에 가장 흔히 사용되어왔다. 예를 들어, Stuve 등의 J. Virol. 61(2) : 327-335(1987) 문헌에서 E. coli JM101감응 세포를 형질전환 시키는데 사용되는 M13을 기초로한 재조합 파지 벡터를 플라크 혼성화합으로써 헤르페스 단순형 II 균주 333(herpes simplex Type II strain 333)의 당단백질 gB2에 대한 유전자를 클로닝하였다. 그리하여 분리된 클론에 의해 암호화된 단백질의 동질성은 포유동물의 COS세포와 차이니즈 햄스터 난소(CHO)세포를 형질감염시킴으로써 입증되었다. 형질발현은 면역형광법 및 방사능 면역침전법에 의해 입증되었다.

Oshima등은 인체 태반의 베타-글루쿠로니다제를 암호화하는 유전자에 대한 파지 람다 gtll cDNA 라이브러리를 선별하기 위해 플라크 혼성화법을 사용하였다[Oshima 등의 Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 84 : 685-689(1987) 참조]. 분리된 cDNA클론의 동질성은 SV 40후 작동자를 이용하여 클로닝된 삽입물로 형질감염시킨 COS-7세포에 의해 형질발현 단백질의 면역침전법으로 입증하였다. 포유동물세포내의 일시적인 형질발현은 다른 선별 방법에 의해 예전에 분리된 유전자의 동질성을 확인하는 수단으로 사용되어 왔다. Gerald 등의 Journal of General Virology 67 : 2695-2703(1986) 문헌을 참조하라. Mackenzie, Journal of Biological Chemistry 261 : 14112-14117(1986); Sief 등의 Gene 43 : 1111-1121(1986) ; Orkin 등의 Molecμlar and Cellμlar Biology 5(4) : 762-767(1985) 문헌도 참조하라. 이 방법들은 흔히 효과적이지 못하고 지루하며 충분한 길이 의 클론 또는 증복된 클론을 확인하기 위해 여러 차례의 선별과정을 필요로 한다. 융합 단밸질의 형질 발현에 기초를 둔 선행 선별 방법들은 효과적이지 못하고 다량의 모노클로날 항체를 필요로 한다. 그러한 약점은 효과 적이지 않은 형질발현 벡터를 이용함으로써 가중되며, 결국 효과적인 선택을 하기에 부적합한 단백질 형질발현 수준이 된다.

[발명의 요약]

본 발명은 세포 표면 항원을 암호화하는 cDNA, 분리된 뉴클레오티드 서열 및 그의 암호화된 산물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 세포 표면 항원을 암호화하는 cDNA를 클로닝하는 새롭고 강력한 방법 및 진핵 숙주 세포내에서 고도로 형질발현되기에 특히 적합한 고효율의 형질발현 벡터에 대한 cDNA라이브러리를 구성하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 고도의 효율적인 클로닝 방법은 진핵 세포내의 항원의 일시적인 형질발현 및 배양 접시와 같은 항원 코팅물질에 접착시킴으로써 항원을 형질발현하는 세포를 물리적으로 선택하는 것에 기초를 두고 있

다. 본 발명의 방법은 진핵 세포의 세포 표면막에 수송되고 형질발현될 수 있는 모든 단백질의 분리 및 분자 클로닝에 유용하다.

본 발명의 세포 표면 항원을 암호화하는 cDNA를 클로닝하는 방법은 cDNA 라이브러리를 제조하고, 이 cDNA 라이브러리를 진핵 포유동물 세포, 바람직하게는 조직 배양 세포에 도입하고, 이 세포 표면 항원이 형질발현될 수 있는 조건하에서 이들 세포를 배양하고 이 세포 표면 항원에 향해 있는 항테 또는제1항체에 이 세포들을 노출시켜서 세포 표면 항원-제1항체 복합체를 형성하고, 후속적으로 이 세포들을 제1항체에 향해 있는 제2항체로 코팅된 기질에 노출시켜서 세포표면 항원을 형질발현하는 세포들을 세포 표면 항원-제1항체-제2항체 복합체의 형성을 통해 기질에 접착하게 하고, 그 접착물을 접착되지 않은 세포로부터 분리하는 것을 포함한다.

본 발명의 클로닝 방법을 이용하여, 다음과 같은 세포 표면항원을 암호화하는 유전자를 분리하고 분자 클로닝 할 수 있었다 : CD1a, CD1b, CD1c, CD2, CD6, CD7, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD26, CD28, CD31, CDw32a, CDw32b, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD43, CD44, CD53, ICAM, LFA-3, FcRia, FcRib, TliSa 및 Leu8 항원. 본 발명의 방법에 의해 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열이 결정되었고 암호화된 단백질의 아미노산 서열이 확인되었다. CD1a, CD1b, CD1c, CD2, CD6, CD7, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD26, CD28, CD31, CDw32a, CDw32b, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD43, CD44, CD53, ICAM, LFA-3, FcRLa, FcRJb, TliSa 및 LEU8을 암호화하는 클로닝된 유전자 또한 본 발명의 당면 과제이다.

일단 항원을 암호화하는 유전자가 본 발명의 방법에 따라 클로닝되면, 그 유전자는 자연계에는 존재하지 않는 실질적인 순수형으로 그의 부분 또는 암호화된 단백질을 생성하기 위해 원핵 또는 진핵 숙주 세포내에서 형질발현될 수 있다. 본 발명의 양상은 실질적으로 순수한 세포 표면 항원들, 특히 CD1a, CD1b, CD1c, CD2, CD6, CD7, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD26, CD28, CD31, CDw32a, CDw32b, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD43, CD44, CD53, ICAM, LFA-3, FcRIa, FcRIb, TliSa 및 Leu8 항원 및 그의 기능성 유사체 및 동등물에 관한 것이다. CD1a, CD1b, CD1c, CD2, CD7, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD27, CD28, CDw32a, CDw32b, CD33, CD34, CD40, CD44, CD53, ICAM, LFA-3, FcRIa, FcRIb, TliSa 및 Leu8 항원의 일차 아미노산 서열이 결정되었다. 그리하여 본 발명은 또한 이들 항원의 아미노산 서열 및 이들의 기능성 동등물 및 이들 항원을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

또한 본 발명은 매우 큰 포유동물의 형질발현 라이브러리를 형성하고 포유동물의 숙주 세포에서 다량의 단백질을 산출하여 효율적인 선택을 하게 하는 효율이 높은 cDNA, 형질발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명의 특별한 유형에서, cDNA 형질발현 벡터는 억제 tRNA유전자; SV 40 기원; HIV LTR-60 내지 +80 서열에 융합된 직접적인 초기 인핸서 시퀀서인 인체 시토메가로바이러스 AD169로 구성된 키메라 프로모터를 포함하며, 억제 tRNA 유전자와 SV 40기원 사이에 삽입되어 있는 합성 전사 단위; 복제가능한 DNA서열에 의해 분리되고 × bal 부위에 의해 측면에 위치한 두 Bst XI부위를 포함하는 폴리일커; 및 SV40 소형 t항원 스플라이스 폴리아데닐화 신호 초기 부위를 포함한다.

본 발명의 다른 양상은 HIV LTR-60 내지 +80 서열에 융합된 직접적인 초기 인핸서 시퀀서인 인체 시토메가로바이러스 AD 169로 구성된 키메라 프로모터를 포함하며 cDNA 형질발현 벡터에 사용하기 위한 합성 전사 단위를 포함한다. 본 발명의 cDNA 형질발현 벡터 서열의 작은 크기 및 특정 배열은 COS세포와 같은 숙주 포유동물 조직 배양 세포내에서 복제가 효율적으로 이루어지게 한다. 더구나, 이 벡터는 짧은 복제가능한 DNA 단편에 의해 분리된 두 개의 전환된 Bst XI 부위를 함유하는 폴리링커를 사용하여 매우 효과적인 올리고뉴클레오티드를 바탕으로한 cDNA삽입 방법을 사용할 수 있게 한다.

본 발명의 또다른 양상은 짧은 복제가능한 DNA 단편에 의해 분리되는, 각각에 대하여 방향을 바꾼 두 개의 동일한 Bst XI 부위를 포함하는 벡터를 포함한다. 본 발명의 또다른 양상은 위에서 언급한 바와 같은 폴리링커를 포함한다.

본 발명의 다른 양상은 벡터에 삽입하고자 하는 cDNA단편에 본 발명의 폴리링커의 짧은 복제가능한 DNA단편과 유사한 말단 서열을 제공하는 합성 DNA 올리고뉴클레오티드를 결합시키고, 그 결과 생기는 cDNA 단편과 합성 DNA 올리고뉴클레오티드 말단 서열을 이미 짧은 복제가능한 DNA 단편이 제거된 그 벡터의 폴리링커에 삽입시키는 것을 포함하는 올리고 뉴클레오티드를 바탕으로한 cDNA삽입 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법에 따라 cDNA 라이브러리를 제조함에 있어서, 대식 세포 및 림프구에 의해 많은 종양 세포들이 대량 침투되어 통상적으로 사용되는 종양 세포주 대신에 상당한 효과를 내기 위해 대식세포 또는 림프구 전사물의 원료로서 사용될 수 있음을 발견해내었다. 그러므로 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 방법에 의해 사용될 cDNA 라이브러리를 제조하기 위해 종양 세포, 특히 인체의 종양 세포를 사용하는 것과 관련이 있다.

본 발명의 강력한 선택 시스템의 다른 잇점은 cDNA를 직접적으로 삽입할 필요가 없다는 것이다. 본 발명의 방법은 람다 gt10 및 람다 gt11과 같은 파지 벡터들에 대해 기술된 효율과 같은 라이브러리 구성 효율의 결과가 생기며 본발명의 방법에 따라 생성된 클론이 조작되기 쉽다는 부가적인 잇점을 갖는다.

본 발명의 면역학적 선택 기술은 비교적 소량의 절대량으로 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있는 항체를 효율적으로 사용하게 한다. 또한 본 발명의 방법은 매우 신속하다. 일반적으로, 세 개 또는 몇몇 사이클의 면역학적 선택 및 구출은 표면 cDNA 클론을 분리하는데 필요하다. 그리하여, 본 발명의 방법은 또한 세포 표면항원을 암호화하는 유전자를 클로닝할 때 노동 및 재료를 효율적으로 사용하는 결과가 된다. 상기한 바와 같이, 본 발명의 방법은 포유동물의 T 림프구와 결합한 세포 표면항원(예를 들어, 항원 CD1a, CD1b, CD1c, CD2, CD6, CD7, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD22, CD26, CD28, CD31, CDw32a, CDw32b, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD43, CD44, CD53, ICAM, LFA-3, FcRIa, FcRIb, TliSa 및 Leu8)을 암호화하는 유전자를 성공적으로 클로닝하는데 사용되었다.

본 발명의 정제된 유전자 및 정제된 단백질은 면역 중재감염증, 질병 및 사람을 포함한 동물의 질환을 진단하고 치료하는 것을 포함하는 면역진단과 면역치료의 적용에 있어 유용하다. 또한 본 발명의 정제된 유전자 및 정제된 단백질은 다른 항체 및 항원을 확인, 분리 및 정제하는데 사용될 수 있다. 그러한 진단

및 치료 용도는 아직 본 발명의 다른 양상에 포함되지 않는다. 더구나, 본 발명의 실질적으로 순수한 단백질은 치료학적 투여를 위한 의약 또는 제약학적 조성물로서 제조될 수 있다. 더 나아가 본 발명은 그러한 의약 및 제약학적 조성물에 관한 것이다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 piH3 형질발현 벡터의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 도면이다. 뉴클레오티드 1-589는 pMB 1기원(pBR 322 유래) 으로부터 유도된다; 뉴클레오티드 590-597은 SacII 링커 (ACCGCGT)로부터 유도된다; 뉴클레오티드 598-799는 합성 티로신 억제 tRNA 유전자(supF 유전자)로부터 유도된다; 뉴클레오티드 800-947은 ASV LTR단편의 잔존물로부터 유도된다(Pvu II 내지 MIu 1); 뉴클레오티드 948-1500은 인체의 시토메가로바이러스 AD 169 인핸서로부터 유도된다; 뉴클레오티드 1501-1650은 HIV TATA 및 tat-반응요소들로부터 유도된다; 뉴클레오티드 1651-1716은 piLNXAN 폴리링커로부터 유도된다(Hind III 내지 툠); 뉴클레오티드 1717-2569는 스플라이스와 폴리-부가 신호를 위해 pSV로부터 유도된다; 뉴클레오티드 2570-2917은 SV40의 복제 기원으로부터 유도된다. (pvu II 내지 Hind III); 및 뉴클레오티드 2918-2922는 폴리링커로부터의 R1 부위의 잔여물인 piVX로부터 유도된다.

제2도는 CD2 cDNA 삽입물의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 도면이다. 뉴클레오티드 숫자는 오른쪽에 괄호로 표시하고 아미노산 숫자는 왼쪽에 표시하였다. 아스파라긴-연관 탄수화물(CHO)을 부가하기에 가능한 부위의 위치가 예상되는 트랜스막(TM) 서열과 함께 나타나 있다. 아미노산 서열은 분비 시그널 서열의 계획된 절단 부위로부터 번호를 매겼다.

제3도는 CDM8 형질발현 벡터의 제한 지도를 나타낸 도면이다. CDM8 벡터는 마우스와 원숭이 세포에서 고효율의 형질발현을 위해 선택된 돌연변이 폴리오마바이러스 초기 부위의 삭제된 전환물을 포함한다. 실질적으로 인체의 면역결핍성 프로모터 부위 전체는 인체의 시토메가로바이러스의 직접적인 초기 프로모터와 기원이 같은 서열로 대체되었고, 진핵 프로모터 및 cDNA 삽입 부위 사이의 박테리오 파지 T7 프로모터의 함유물에 의해 대체되었다. 화살표는 전사 방향을 나타낸다.

제4도는 phI3M 벡터의 제한 지도를 나타낸 도면이다. 전사의 방향은 화살표로 나타내었다. Bst XI 클로닝 부위 측면에 있는 제한 엔도뉴클레아제 부위가 나타나 있다.

제5도는 piH3M 벡터의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 도면이다. 7개의 단편이 존재한다. 잔기 1-587 은 pBR322의 복제 기원으로부터 유도된 것이고 잔기 588-1182는 M13기원에서, 잔기 1183-1384 는 supF 유전자로부터, 1385-2238은 키메라 시토메가로바이러스/인체 면역결핍 바이러스 프로모터로부터, 2239-2647은 복제가능한 단편으로부터, 2648-3547은 플라즈미드 pSV2(스플라이스 및 폴리아데닐화 신호)로부터, 3548-3900은 SV40바이러스 기원에서 유도되었다.

제6도는 CD40의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 도면이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 세포 표면 항원을 암호화하는 cDNA를 클로닝하기 위한 새로운 방법 및 cDNA 라이브러리를 구성하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 분리된 특정 cDNA 형질발현 벡터 및 그의 구성요소, 뉴클레오티드 서열 또는 유전자, cDNA 단편에 의해 암호화된 실질적으로 순수한 세포 표면 항원에 관한 것이다. 또한 본 발명은 그 분리된 뉴클레오티드 서열 및 암호화된 산물을 이용하는 방법에 관한 것이다.

다음의 상세한 설명은 본 재조합 유전학 분야의 숙련자에게 공지된 다양한 방법학을 참고로 할 것이다. 참고로한 공지된 방법학이 설명된 간행물과 그외의 재료는 본 명세서에서 그 전체가 참고문헌으로 인용된다. 재조합 DNA기술의 일반적인 원칙에 따라 설정된 표준 참고 문헌에는 Darnell, J.E. 등의 Molecμlar Cell Biology, Scientific American Books, Inc., publisher, New York, N.Y.(1986); Lewin, B.M., Genes II, John Wiley Sons, publisher, New York, N.Y.(1985); Old, R.W.등의 Principles of Gene Manipμlation: An Introduction to Genetic Englineering, 2d edition, University of California Press, Berkeley, CA(1981) ; 및 Maniatis, T. 등의 Molecμlar Cloning : A Laboratroy Manual, Cold Spring Harbor, NY(1982)문헌이 포함된다.

클로닝이란 시험관내 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자 또는 다른 DNA서열을 벡터 분자에 삽입하는 것을 의미한다. 원하는 유전자를 성공적으로 클로닝하기 위해, DNA단편을 형성시키고 그 단편을 벡터 분자와 결합시켜 복합 DNA분자를 그 분자가 복제할 수 있는 숙주 세포에 도입하고 수용체 숙주 세포들로부터 표적 유전자를 갖는 클론을 선택하는 방법을 사용할 필요가 있다.

cDNA란 RNA 의존 DNA 폴리메라제(역전사효소)의 작용에 의해 RNA 주형으로부터 생성된 상보적 또는 복사 DNA를 의미한다. 그러므로 cDNA 클론은 클로닝 벡터에 운반되는, 목적한 RNA 분자에 상보적인 이중 DNA 서열을 의미한다.

cDNA 라이브러리란 유기체의 전체 게놈을 함께 포함하는 cDNA 삽입물을 함유한 재조합 DNA분자의 집합을 의미한다. 그러한 cDNA 라이브러리는 이미 기술된 본 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있는데 예를 들어, Maniatis 등의 Molecμlar Cloning : A Laboratory Manual, 상기 문헌에 기술되어 있다.

일반적으로, RNA는 우선 특정 유전자를 클로닝하고나 하는 유기체 세포의 게놈으로부터 분리된다. 본 발명의 목적을 위해서는 포유동물의 세포주 특히, 인체의 세포주가 바람직하다. 더욱바람직한 것은 인체 종양 세포주 HPB-ALL 및 인체 림프아세포 세포주 JY이다. 택일적으로, RNA는 동물의 종양으로부터 유도된 종양세포로부터 분리될 수 있고, 바람직하게는 인체의 종양세포로부터 분리될 수 있다. 그러므로, 라이브러리는 예를들어 인체의 부신 종양으로부터 제조될 수 있으나 그 외의 모든 종양도 사용될 수 있다.

본 발명의 면역선택 클로닝 방법은 세포로부터 특정 유전자를 포함하는 전체 RNA를 추출하고, 그 RNA로부터 일련의 상보가졌인 이중 가닥 cDNA단편을 합성하고, 이들 cDNA 단편을 조직 배양물내에서 포유동물 세포에 도입함으로써 cDNA라이브러리를 제조하는 방법을 포함한다. 포유동물세포는 단백질(즉, 세포 표면항원)을 형질발현하게 하는 조건하에서 보존된다. 그 결과 생성된 세포는 세포표면 항원에 향해 있는 제1항

체 또는 항체균에 노출된다. 그 결과 세포 표면항원-제1항체 복합체가 형성된다. 이 복합체는 제1항체에 향해 있는 제2항체에 코팅되거나 결합된 기질에 노출되어 있다. 세포 표면 항원을 형질 발현시키는 세포는 기질에 부착되어 있다(왜냐하면 세포 표면 항원-제1항체-제2항에 복합체가 형성되기 때문이다).

[전체 RNA의 분리]

전체 RNA를 분리하는 방법은 구아니디움 티오시아네이트/염화세슘(이하 Gu SCN/CsC1이라 함) 방법이 바람직하다. 더욱 바람직한 것은 부가적인 용량 및 속도를 갖는 Gu SCN/CsCl 방법의 Gu SCN/LiCl 변형체이다. 간략하게, 목적한 혼합물 각 ㎖에 대해 0.5g의 Gu SCN을 0.58㎖의 25% LiCl (0.45마이크론필터를 통해 여과된 저장액)에서 용해시키고 20㎕의 머캅토 에탄올을 첨가하였다. 세포를 조금씩 꺼내어 쓰고 펠릿은 가볍게 쳐서 벽에 분산시키고 5 x 107 세포까지 되도록 1㎖의 용액을 첨가한다. 그 결과 생긴 혼합물을 비점성상태가 될 때까지 폴리트론으로 잘라낸다. 소규모 제조(108미만의 세포)의 경우, 잘라낸 혼합물의 층 2㎖를 1.5㎖의 5.7M CsCl(RNase 없음 ; 1.26g의 CsCl을 10nm EDTA pH 8의 각 ㎖에 첨가한다)에 가하고, RNase가 없는 물로 덮어 SW55 50 K rpm에서 2시간동안 회전시켰다. 대규모 제조의 경우, 층 25㎖를 SW28 시험관내의 12㎖ CsCl에 가하여, RNase가 없는 물로 덮고 SE55 24 K rpm에서 8시간동안 회전시켰다. 진공 플라스크에 연결시킨 멸균 파스퇴르 피펫으로 내용물을 조심스럽게 흡입한다. CsCl계면을 일단 지나치면 시험관 벽상의 층이 흘러 내리는 것을 방지하기 위해 피펫 끝으로 시험관 주변의 밴드를 긁어낸다. 남아 있는 CsCl 용액을 흡입한다. 펠릿을 물에 흡수시킨다(재용해시키지는 않는다). 1/10 부피의 NaOAc 및 3 부피의 EtOH를 첨거하고 최종 혼합물을 회전시켰다. 필요하다면, 펠릿을 물(예를 들어, 70℃에 재현탁시킨다. 농도를 1mg/㎖로 조절하고 냉동시킨다. 작은 RNA(예를들어, 5S)는가라앉지 않는다. 소량의 세포의 경우, 부피를 줄이고 RNase가 없는 물로 기울기실으로 Gu SCN을 덮는다(RNA가 묽을 때는 침전법은 효과적이지 못하다).

[폴리 A^+ RNA의 제조]

폴리 A^+ RNA 는올리고 dT 선택 방법에 의해 바람직하게 제조할 수 있다. 간략하게, 일회용 폴리프로필렌 칼럼을 5M NaOH로 세척한 다음 RNase가 없는 물로 수세함으로써 제조한다. 전체 RNA의 각 밀리그램에 대해 약 0.3㎖(최종 패킹 베드)의 올리고 dT 셀룰로오스를 사용한다. 올리고 dT셀룰로오스는 1㎖의 0.1M NaOH에 약 0.5㎖의 건조 분말을 재현탁시키고, 그것을 칼럼에 옮기거나 이전에 사용한 칼럼(컬럼은 여러 차례 재사용할 수 있다)을 통해 0.1M NaOH를 여과함으로써 제조한다. 이것은 수배 칼럼부피의 RNase가 없는 물로 pH가 중성이 될 때까지 세척하고 2-3㎖의 적하 완충액으로 수세한다. 칼럼 베드를 4-6㎖의 적하 완충액을 사용하여 15㎖의 멸균 시험관에 버린다. 전체 RNA를 70℃에서 2-3분간 두고, RNase가 없는 저장액의 LiCl을 첨가하고 (0.5M이 되게 함), 15㎖의 시험관에서 올리고 dT 셀룰로오스와 혼합하였다. 그런다음 10분동안 와동시키거나 교반한다. 그 결과 생긴 생성물을 칼럼에 The고 3㎖의 적하 완충액으로 수세한 다음 3㎖의 중간 수세 완충액으로 세척하였다. mRNA는 1.5㎖의 2mM EDTA, 0.1% SDS로 SW 55 시험관내로 직접 용리하였다; 처음 두방울 또는 세 방울은 버렸다.

용리된 mRNA는 1/10 부피의 3M NaOAc를 첨가하고 EtOH로 시험관을 채움으로써 침전시켰다. 그런다음, 이것은 혼합하고 -20℃에서 30분동안 냉각시켜 5℃에서 30분간 50 K rpm으로 회전시켰다. EtOH을 부어버리고 시험관을 공지증에 건조시켰다. mRNA 펠릿은 50-100㎕의 RNase가 없는 물에서 재현탁시켰다. 약 5㎕를 MOPS/EDTA)포름알데히드에서 70℃로하여 용융시키고 RNase가 1% 아가로즈 겔 상에 런닝시켜 질을 검사한다.

[cDNA 합성]

다음으로부터 cDNA를 합성한다. 바람직한 cDNA의 합성 방법은 Gubler 및 Hoffman에 의해 기술된 다양한방법이 있다[Gene, 25 : 263-269(1982) 문헌 참조]. 이 방법은 다음과 같이 실시한다 :

a. 첫 번째 가닥 제조

4㎍의 mRNA를 준비하고 그것을 30초간 마이크로퓨즈 시험관내에서 약 100℃로 가열하고 얼음에서 식혔다. 부피는 RNAse가 없는 물로 70㎕가 되도록 조절하였다. 그런 다음 20㎕의 RT1 완충액, 2㎕의 RNAse 저해제(뵈링거에서 구입, 36u/㎕), 5㎍/㎕의 올리고 dT(콜라보래이티브리서치에서 구입, 1㎕,) 및 20mM dXTP's(울트라퓨어에서 구입, 2.5㎕), 1M DTT 1㎕, 4㎕의 RT-LX(라이프사이언스에서 구입, 24u/㎕)를 첨가하였다. 그 결과 생긴 혼합물을 42℃에서 40분간 항온하였다. 그런 다음 불활성이 되도고 열을 가하였다(70℃에서 10분간).

b. 두 번째 가닥 제조

320㎕의 RNAse가 없는 물, 80㎕의 RT2 완충액, 5 ㎕의 DNA 폴리메라제 I(뵈링거에서 구입, 5u/㎕), 2㎕의 RNAse H(BRL에서 구입, 2u/㎕)를 준비한다. 이것은 15℃에서 1시간, 22℃에서 1시간 항온하였다. pH8.0의 0.5M EDTA 20㎕를 첨가하고, 페놀 추출하고 NaCl을 0.5M 의 곧은 폴리아크릴아미드(캐리어) 20㎍/㎖에 첨가하여 EtOH침전시키고 EtOH을 시험관에 채운다. 마이크로퓨즈 시험관에서 2-3분간 회전시키고 그런다음 시험관 벽의 높은 곳에 있는 침전물을 제거하기 위해 와동시키고 1분간 재회전시킨다.

c. 어댑터 제조

침전된 cDNA를 240㎕의 TE(10/1)에 재현탁시켰다. 30㎕의 10 X저염 완충액, 30㎕의 10 X 결합 첨가물, 3㎕(2.4㎍)의 키나제 처리를 한 12-량체 어댑터, 2㎕(1.6㎍)의 키나제 처리를 한 8-량체 어댑터 및 1㎕의 T4 DNA 리가제(바이오랩스에서 구입, 400u/㎕ 또는 뵈링거에서 구입, 1바이스 단위/㎖)를 첨가하였다. 그런다음 15℃에서 밤새도록 항온하였다. 위에서 언급한 바와 같이 페론추출 및 EtOH 침전시키고(여분의 캐리어는 이제 필요없다), 100㎕의 TE에 재현탁시켰다.

[형질발현 벡터에 대한 cDNA단편의 이용]

본 발명의 Bst XI를 바탕으로한 cDNA형질발현 벡터(이하 참조)와 함께 사용하기 위해 그 벡터상의 Bst XI 부위에 상응하는 말단 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 단편을 삽입하고자 하는 cDNA단편에 결합시켰

다. 그 결과 생긴 단편을 분획화함으로써 풀을 제조하였다. 바람직한 방법은 다음과 같다 :

20%의 앰, 2mM의 EDTA, 1㎍/㎖의 EthBr 용액과 5%의 KOAc, 2mM EDTA, 1㎍/㎖ EthBr 용액을 제조한다. 2.6㎖의 20% KOAc 용액을 저 기울기 표식을 가진 백챔버에 첨가한다. 용액을 전방 챔버에 흐르게 한 다음 뒤로 기울임으로써 두 개의 챔버를 연결하는 시험관으로부터 공기 방울을 제거한다. 챔버사이의 통로를 막고 2.5㎖의 5% 용액을 전방 챔버에 첨가한다. 이전의 런닝으로 시험관에 액체가 있다면 시험관 끝에 5%의 용액을 런닝시킨 다음, 챔버에 되돌아오게 한다. 장치를 교반판 위에 놓고 가능한한 빨리 움직이는 교반 막대를 고정시키고 두 챔버를 연결하는마개를 연 다음 전방의 마개를 연다. KOAc 용액을 폴리알로머 시험관 바닥에서부터 채운다. 100㎕의 c움 용액으로 기울기를 덮는다. 평형 시험관을 제조하고 의 22℃에서 3시간동안 그 기울기를 회전시킨다. 그 기울기로부터 분획을 수집하기 위해, SW55 시험관의 바닥에 가까운 버터플라이 인퓨즌 세트(잘라앤 루에르 허브를 가지고 있음)를 가진 SW55시험관을 관통시키고 세 개의 0.5㎖분획을 수집한 다음 0.25㎖분획 6개를 마이크퓨즈 시험관(각각 22방울 및 11방울)에 넣는다. 곧은 폴리아크릴아미드를 20㎍/㎖첨가함으로써 분획을 EtOH 침전시키고 ETOH 을 시험관 끝까지 채운다. 시험관을 냉각한 후 그것을 3분간 마이크로퓨즈에서 회전시킨다. 그런 다음 와동시키고 1분간 재회전시킨다. 펠릿을 70%의 EtOH 로 수세한다(재회전). 완전히 건조시키진 말라. 10㎕의 TE에 각 0.25㎖의 분획을 재현탁시킨다. 1%의 아가로즈 미니 겔상에 1㎕를 런닝시킨다. 처음 세개의 분획을 모으고, 마지막 여섯 개의 분획은 1kb 보다 더 작은 물질을 포함하지 않는다.

억제 tRNA 플라즈미드는 공지된 방법에 의해 증식시킬 수 있다. 본 발명의 바람직한방법에서 supF 플라즈미드는 제2의 플라즈미드인 p3그러나 포함하는 비억제 숙주에서 선택될 수 있으며 암베르 돌연변이된 암피실린(amp) 및 테트라사이클린(tet) 약물 저항성의 요소를 포함한다(Seed, 1983 문헌참조). PR1으로부터 유도된 p3 플라즈미드는 길이가 57kb이고, 안정하게 유지되는 단일 복사 에피좀이다. 이 플라즈미드의 암피실린 저항성은 고속으로 복귀되므로, 보통 ampr플라즈미드는 p3-함유 균주에 사용될 수 없다. tet에만 저항성인 플라즈미드를 선택하는 것은 대개 amp+tet저항성인 플라즈미드를 선택하는 것만큼 좋다. 그러나, 염색체 억제 tRNA 돌연변이의 자연발생적 출현은 이 시스템에서 피할 수 없는 이면(약 10^{-9} 빈도)을 나타낸다. 자연발생적인 억제 돌연변이로부터 생긴 군체는 보통 플라즈미드 형질전환으로부터 생기는 군체보다 더 크다. 전형적으로 억제 플라즈미드는 12.5㎍/㎖의 amp와 7.5㎍/㎖의 tet를 함유하는 LB배지에서 선택된다. 대규모의 플라즈미드 제조의 경우, 글리세롤(0.85)을 함유하는 M9 카사미노산 배지를탄소원으로 사용될 수 있고, 박테리아는 포화상태로 성장한다.

벡터 DNA는 공지된 방법에 의해 분리될 수 있다. 다음의 방법은 포화된 세포 1리터로부터 플라즈미드를 분리하는바람직한 방법이다 :

1리터의 J6병에 있는 세포를 4.2K rpm으로 25분간 회전시킨다. pH 8의 10mM EDTA 40 ㎖에 재현탁시킨다. (부드럽운 표면에 탁탁 친다). 0.2M NaOH 80㎖ 1% SDS를 첨가하고 투명하게 점성이 될 때까지 돌려준다. pH4.7의 5Mk(2.5) 40㎖를 첨가하고 반점성이 되도록(덩어리 크기가 2-3mm가 될 때까지)흔들어 준다. 1리터의 J6병에서 4.2K rpm으로 5분간 회전시킨다. 상청액을 올리 성긴 얇은 무명을 통과시켜 250㎖ 병에 붓는다. 이소프로필 알콜로 병을 채운다. 그런다음 1리터의 J6병에서 4.2K rpm으로 하여 5분간 회전시킨다. 병의 액체를 부어버리고 70%의 EtOH로 서서히 세척한다(펠릿이 부서지지 않도록 한다). 병을 뒤집어서 미량의 EtOH을 침화이프로 제거한다. 3.5㎖의 티르스 염기/EDTA 20mM/ 10mM에 재현탁시킨다. 3.75㎖의 재현탁된 펠릿을 4.5g의 CsCl에 첨가한다. 10mg/㎖의 EtBr 0.75를 첨가하고 혼합한다. 그 용액을 VTi 80 시험관에 채운다. 80rpm의 속도로 2.5시간 또는그 이상의 시간동안 작동시킨다. 가시광선에 의해 나타낸 밴드를 1㎖주사기와 20 또는 그 이하의 게이지를 가진 바늘로 밴드를 추출해낸다. 시험관 윗부분을 잘라내고, 시험관에 대해 약 30℃의 각도에서 시험관의 위쪽으로 바늘을 삽입(즉, 가능한한 얇게)하고 밴드의 약 3mm바로밑 지점에서 바늘을 사선으로 한다. 밴드를 제거한 후, 시험관 내용물을 표백제에 붓는다. 13㎖의 사르스테트(Sarstedt)시험관에 추출한 밴드를 둔다. 1M의 NaCl로 포화시킨 n-부탄올을 시험관에 채워서 추출한다. 대량의 DNA가 수득되면 재추출한다. 5M NaOH를 함유하는 트랩내로 부탄올을 빨아드린다(에티디움을 파괴하기 위함). 거의 동일한 부피의 1M아세트산 암모늄을 DNA에 첨가한다(분출병). 약 2부피의 95% 에탄올을 첨가한다. 10K rpm에서 5분간 회전시킨다. J2-21, 펠릿을 70%의 에탄올로 조심스럽게 세척한다. 면봉으로 건조시키거나 동결건조시킨다.

클로닝하기 위해 공지된 방법으로 벡터를 제조할 수 있다. 바람직한 방법은 100 단위의 Bst XI(미국 뉴욕 바이오랩스에서 구입)를 가진 200㎕의 반응물에서 20㎍의 벡터를 절단하기 시작하여 자동 온도 조절 장치가 부착된수조(즉, 순환 구조)에서 50℃로 하여 밤새도록 절단하는 것이다. 상기한 바와 같이 SW 55시험관에서 5-20% 기울기로 2KOAc를 제조한다. 절단된 벡터 100㎕를 각 시험관에 첨가하고 50K rpm의 22℃로 하여 3시간 동안 런닝시킨다. 300nm의 자외선에서 시험관을 조사한다. 목적한 밴드는 그 시험관 길이의 2/3 정도에 이동해 있을 것이다. 밴드 수단의 앞쪽으로 기울기를 과부하한다. 1㎖의 주사기와 20게이지의 바늘로 밴드를 제거한다. 곧은 폴리아크릴아미드를 첨가하고 3부피의 EtOH을 첨가하여 플라즈미드를 침전시킨다. 50 ㎕의 TE에 재현탁시킨다. 일정량의 벡터와 cDNA의 양을 증가시켜 결합시킨다. 이러한결합 시도를 기초로하여, 대규모로 결합시키는데, 이것은 공지된 방법에 의해 실시될 수 있다. 보통 전체 cDNA제조시 1-2㎍의 절단 벡터를 필요로 한다.

어댑터는 공지된 방법에 의해 제조될 수 있지만 조(crude) 어댑터를 1㎍/㎕의 농도로 재현탁시키고, $MgSO_4$를 10mM첨가하고, 5부피의 EtOH을 첨가하여 침전시킨다. 70%의 EtOH로 세척하고 1㎍/㎕의 농도로 TE에 재현탁시킨다. 25㎕의 재현탁된 어댑터를 갖는키나제에 3㎕의 10X 키나제 완충액과 20단위의 키나제를 첨가하고, 37℃에서 밤새도록 항온하였다.

본 발명의 바람직한 방법 중 상기 상세한 설명에서 언급된 완충액의 제조 방법은 본 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 편의상, 바람직한 완충 조성물은 다음과 같다 :

적하 완충액 : 0.5M LiCl, 10mM 트리스 pH 7.5, 1mM EDTA 0.1% SDS.

중간 세청 완충액 : 0.15M LiCl, 10mM 트리스 pH 7.5, 1mM EDTA 0.1% SDS.

Rt 1 완충액 : 0.25M 트리스 pH 8.8(42℃에서는 pH 8.2), 0.25M KCl, 30mM $MgCl_2$.

RT 2 완충액 : 0.1M 트리스 pH 7.5, 25mM $MgCl_2$, 0.5M KCl, 0.25㎎/㎖ BSA, 50mM DTT.

10X 저염 완충액 : 60mM 트리스 pH 7.5, 60mM $MgCl_2$, 50M NaCl, 2.5㎎/㎖ BSA, 70mM Me.

10X 결합 첨가물 : 1mM ATP, 20mM DTT, 1㎎/㎖ BSA, 10mM 스페르미딘.

10X 키나제 완충액 : 0.5M 트리스 pH 7.5, 10mM ATP, 20mM DTT, 10mM 스페르미딘, 1㎎/㎖ BSA 100mM $MgCl_2$.

벡터란 플라즈미드 또는 박테리오파지로부터 파생되며 DNA단편이 삽입되거나 클로닝될 수 있는 DNA 분자를 의미한다. 벡터는 하나 이상의 독특한 제한 부위를 포함하고 클로닝된 서열이 복제될 수 있도록 한정된 숙주 또는 운반 유기체에서 자가복제될 수 있다. 그러므로, DNA 형질발현 벡터란 부가적인 서열의 DNA가 자가 요소의 게놈에 삽입된 후 그 숙주의 염색체를 갖는 숙주내에서 독립적으로 복제될 수 있는 모든 자가 요소를 의미한다. 그러한 DNA 형질발현 벡터는 박테리아의 플라즈미드오 파지를 포함한다.

본 발명의 목적을 위해 바람직한 것은 시미안 바이러스 균주 40(SV40)으로부터 유도된 것과 같은 바이러스 벡터이다. SV40은 분자량이 28Mdal이고, 그 바이러스의 전체 게놈을 포함하는 3Mdal의 분자량을 갖는 이중가닥 환상 DNA 분자를 포함하는 파포바바이러스이다. 이 단일의 작은, 공유결합 폐환상 DNA 분자의 전체 뉴클레오티드 서열이 결정되었다. Fiers등의 Nature 273 : 113-120(1978) ; Reddy 등의 Science 200 : 494-502(1978)문헌을 참조하라. SV40의 바이러스성 DNA는 대량 수득될 수 있고 다양한 바이러스 기능을 담당하는 게놈 부위는 DNA의 상세한 물리적 지도에 정확하게 위치하고 있다. Fiers등의 상기문헌; Reddy 등의 상기문헌을 참조하라. SV40의 바이러스 게놈은 무성적으로 증식할 수 있거나 세포 염색체의 완전한 부분으로서, 풍부한 정보가 이 게놈의 복제 및 형질발현시 존재한다.

또한 본 발명의 목적을 위해 바람직한 것은 약 6.5kb의 폐환상 DNA게놈을 갖는 M13이라 명명된 단일 가닥 박테리오 파지 클로닝 운반체이다. 클로닝 운반체로서 M13을 이용할 때의 잇점은 감염된 세포에서 방출된 파지입자가 클로닝된 DNA의 상보적인 두 가닥 중 한 가닥과 상동인 단일 가닥 DNA를 포함하므로 DNA 서열 결정 분석을 위한 주형으로 사용될 수 있다는 점이다.

본 발명의 목적을 위해 더욱 더 바람직한 것은 미국 매릴랜드 20852 록크빌레 파크로운 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)에 기탁된형질 발현벡터 piH3, piH3M 및 CDM8이다. piH3는 1988년 2월 24일자 ATCC 제67634로호 기탁되어 있다. piH3M은 1988년 2월 24일자 ATCC 제 67633호로 기탁되어 있다. CDM8 은 1988년 2월 24일자 ATCC 제67635로호 기탁되어 있다.

조직 배양의 이란 세포 구조물 또는 관능기 또는 그 둘다를 더 분화시키고 보존하도록 시험과내에서 동물 조직 세포를 존속 또는 성장시키는 것을 의미한다. 일차 조직 세포란 유기체에서 동일한 기능을 수행하는 동종의 세포로 구성된 집단에서 직접 얻어진 것을 말한다. 단백질 가수분해 효소인 트립신으로 그러한 조직 세포를 처리하는 경우를 예로들면, 배양 평판상에 고밀도로 심을 때 잘 자라는 각각의 일차 조직 세포에 그것을 해리시킨다. 조직 배양물내의 일차 조직 세포를 증식시켜 생겨난 세포 배양물은 이차 세포 배양물이라 일컫는다. 대부분의 이차 조직 세포는 한정된 횟수만큼 분열한 다음 죽는다. 그러나 몇몇 이차 세포들은 분리 시기를 지나 계속적인 세포주를 형성하도록 비한정적으로 증식 될 수 있다. 흔히 세포주는 여분의 염색체를 포함하고 보통 다른 관점에서는 비정상적이도 하다. 이들 세포의 영속성은 암세포가 공통적으로 갖는 특징이다.

본 발명에 따라 조직 배양 세포로 사용되기에 바람직한 세포주는 COS라 명명된 원숭이 신장 세포주를 포함한다. COS세포는 바이러스성 DNA복제의 불완전한 기원을 제외한 기능성 초기 유전자 부위를 포함하는 SV40 DNA에 의해 형질전환된 세포이다. COS 세포클론 M6는 특히 본 발명의 방법에 사용되기에
바람직하다. 또한 본 발명의 목적을 위해 바람직한 것은 NIH 3T3 세포가 폴리오마기원 결실 DNA로 형질감염된 마우스의 WOP 세포이다. cDNA는 본 기술분야의 공지된 방법에 의해 본 발명의 숙주조직 배양 세포에 도입될 수 있다. 형질 감염은 예를들어, 원형질 융합, 구형질 융합 또는 DEAE 덱스트란 방법[Sussma등의 Cell. Biol. 4 : 1641-1643(1984)문헌 참조]에 의해 실시될 수 있다.

구형질 융합법을 사용한다면, Sandri-Goldrin 등의 Mol. Cell Bio. 1 : 743-752(1981)에 근거한 다음의 변형법이 바람직한 방법이다. 예를들어, 간단히 말하자면 여섯번 융합으로 이루어진 한 세트는 육즙에서 100㎖의 세포를 필요로 한다. 증식가능한 플라즈미드를 포함하는 세포를 OD 600=0.5가 되도록 LB에서 성장시킨다. 100㎍/㎖의 스펙티노마이신(또는 150㎍/㎖의 클로람페니콜)을 첨가한다. 10-16시간동안 흔들어 주면서 37℃로 계속 항온한다(스펙티노마이신 또는 클로람페니콜 배지에서 연장 항온하면서 세포를 용해시키기 시작한다). 100㎖의 배양물(JA 14/GSA 로터, 250㎖ 병)을 10,000rpm으로 5분간 회전시킨다. 잘 따뤄내고, 5㎖의 차가운 20% 수크로즈, pH 8.0의 50mM트리스-염산으로 병에서 펠릿을 재현탁시킨다. 얼음에서 5분간 항온한다. pH 8.0의 차가운 0.25M EDTA 2㎖를 첨가하고 37℃(수조)에서 5분간 항온한다. 얼음위에 놓고 현미경으로 구형질의 전환 백분율을 검사한다. 유동 후드에서, 20㎖의 차가운 DME/10%수크로즈/10mM MgCl2를 천천히 첨가한다(초당 약 2방울씩 점적). 전일에 60cm접시에 평판화한 세포로부터 배지를 제거한다(50% 융합). 구형질 현탁액 5㎖를 각 접시에 첨가한다. 날개달린 버킷이 있는 원심 분리기 내의 시험관 운반체 상부에 접시를 놓는다. 6개 정도의 접시가 한번에 편리하게 준비될 수 있다. 접시를 다른 접시위에 쌓을 수 있으나 3개를 쌓으면 상부 접시위에 있는 구형질층이 자주 찢어지거나 원심분리된 후 분리되므로 바람직하지 못하다. 1000xg에서 10분간 회전시킨다. 평판바닥에 대한 반지름을 기초로하여 힘을 계산한다. 접시로부터 유체를 조심스럽게 흡입한다. 1.5-2㎖의 50%(w/w) PEG 1450(또는 PEG 1000)/50% DM(무혈청)를 접시의 중심에 피펫으로 옮긴다. 필요하다면, PEG가 접시에 방사상으로 평평하게 펴지도록 피펫 끝 주변을 깨끗하게 한다. PEG를 마지막 접시에 첨가한 후 PEG 용액이 바닥에 모이도록 모든 접시를 막대로 받쳐놓는다. 그런다음 PEG를 흡입한다. 세포 표면에 잔존하는 PEG 박충은 융합을 촉진하기에 충분하며, 잔존하는 PEG 박층은 세척하기에 용이하고 PEG원액이 뒤에 남겨지는 경우보다 더 좋은 세포의 생존성이 수득될 수 있다. PEG 용액과 접촉시킨 후 90 내지 120초(PEG 1000) 또는 120 내지 150초(PEG 1450)만에 1.5㎖의 DME(무혈청)를 접시 중앙에 피펫으로 옮긴다. PEG층을 DME를 방사상으로 세척한다. 접시를

비스듬히 기울이고 흡입한다. DME로 반복 세척한다. 15㎍/㎖의 황산 젠타마이신을 함유하는 3㎖의 DME/10% 혈청을 첨가한다. 배양기에서 4~6시간 동안 항온한다. 배지와 잔존 박테리아 현탁액을 제거하고 배지를 더 첨가하여 2-3일간을 항온한다. PEG를 제거하기 위한 세포층알 과잉 세척은 실질적인 아무런 이득이 없이 많은 세포들만 제저시킨다. 만일 세포를 제2의 DME로 몇분간 세척하도록 놔둔다면 대부분의 구형질층은 자연적으로 생겨날 것이다. 그러나 간단히 세척하고 완전 배지에서 37℃로 하여 종결시키는 것이 바람직하다.

PEG용액은 PEG가 그러나 든 신선한 병을 60℃로 용융시키고 50㎖의 원심분리 시험관을 이용하여 약 50㎖의 분취량을 예비칭량한 병에 부음으로써 편리하게 제조될 수 있다. 분취한 PEG를 암실에서 5℃로 저장한다. 신선한 병을 제조하기 위해 분취량을 칭량하고 재용융시키고 동일한 부피의 DME(무혈청)를 첨가한다. 필요하다면, 7.5%의 중탄산나트륨 용액으로 pH를 조절하고 여과 멸균한다. 그 결과 생긴 PEG 용액은 감지할만한 반대의 결과없이 실온에서 3개월까지 저장될 수 있다.

형질감염된 숙주 세포는 cDNA 클론에 의해 암호화된 단백질을 형질발현시키고 후속적인 면역선택에 이용할 수 있는 절대수의 세포를 증가시키기 위해 본 발명에 따라 배양될 것이다. 본 기술분야의 숙련자는 본 발명의 목적에 알맞은 방법 및 배지를 인지할 수 있을 것이며, 일반적으로 고려되는 세포 유형 및 그외의 변수들을 참작할 수 있을 것이다. 예를들어, COS 세포는 10%의 우 혈청 및 황산 젠타마이신을 보충한 둘베코의 변형된 이글 배지(DME)에서 배양될 수 있다. 정상적으로 형질감염된 세포의 일시적인 형질 발현은 48 내지 72시간내에 후형질감염을 예상할 수 있다. 그러나, 이 시기는 사용된 숙주 세포의 유형 또는 균주와 세포 배양 조건에 따라 변할 것이며 이것은 숙련된 기술자들에게 자명할 것이다.

본 발명의 방법에 따라 클로닝된 유전자의 면역침전, 블로킹 및 cDNA 서열검정은 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 편리한 모든 방법으로 실시될 수 있다. 예를들어, Clark 등의 Leukocyte Typing II. Vol. II, pp. 155-167(1986)문헌에 기술된 면역침전 프로토콜이 바람직하다. 본 기술분야의 공지된 서던, 노던 또는 다른 블로트 분석방법이 사용되는데, Hu 등의 [Gene 18 : 271-277(1982) 문헌 참조] 방법과 같이 공지된 방법에 의해 제조된 혼성 프로브를 사용한다. 또한, cDNA 서열 결정은 Sanger 등의 Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 74 : 5463-5467(1977) 문헌의 디데옥시뉴클레오티드 방법을 포함하는 공지된 방법에 의해 실시될 수 있다.

본 발명에 따라 사용된 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 이러한 항체는 본 발명의 방법에 의해 목적한 항원 또는 항원을 형질발현하는 세포의 면역선택에 영향을 미치도록 단독으로 또는 다른 폴리클로날 또는 모노클로날 항체와 연합하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 항체 또는 그의 단편을 제조하는 방법은 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

면역학의 일반 지침을 설정해 놓은 표준 참고 문헌은 Klein, J., Immunology : The Science of Self-nonself Discrimination, John Wiley * Sons, publisher, New York(1982) ; Kennett, R. 등의 eds., Monoclonal Atibodies, Hybridoma : A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, publisher, New York(1980) ; Campbell, A., Monoclonal Antibody Technology in Burdedn, R. 등의 ds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecμlar Biology, Vol. 13, Elsevere, publisher, Amsterdam(1984) 문헌을 포함한다.

항체란 예를 들어, Fab 및 F(ab)'2 난편과 같은 항원에 결합할 수 있는 본래의 분자 이외에 그의 단편을 의미한다. 폴리클로날 항체 제제는 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 모든표준 프로토콜을 이용하여 목적한 항원 또는 그의 단편으로 면역화시킨 후 알맞은 동물 종의 혈액으로부터 직접 유도해낼 수 있다. 이와 유사하게, 모노클로날 항체는 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다 [Kohler 등의 Eur. J. Immunol. 6 : 292(1976) 문헌 참조]. 모노클로날 항체는 본 발명의 목적을 위해 바람직하게 사용된다.

본 발명에 따른 면역 선택의 목적을 위해, 표적 세포 표면 항원에 대한 항체에 노출된 조직 배양 숙주 세포는항원에 대한 항체에 대항하여 항체로 코팅된 기질상에 그 세포들을 분포시밈으로써 표적항원을 형질발현시키지 않는 숙주 세포로부터 분리된다. 패닐이란 기술은 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있고, 예를들어, Mage 등의 J. Immunol. Meth. 15 : 47-56(1977) 및 Wysocki 와 Sato 의 Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 75 : 2844-2848(1978)문헌에 의해 기술되어 있다.

본 발명의 방법에 따른 패닝은 다음과 같이 실시될 수 있다 :

a. 항체-코팅한 접시. 박테리오로지칼 60mm 평판, 팔콘 1007이나 동등물 또는 휘셔 8-757-12와 같은 10cm 접시를 사용할 수 있다. 양의 항-마우스 친화 정제된 항체[예를들어, 쿠우퍼 바이오메디칼(카펠)에서 구입]는 pH 9.5의 50mM트리스 HCl에서 10㎍/㎖로 희석시킨다. 6cm 접시당 3㎖를 첨가하거나 10cm 접시당 10㎖를 첨가한다. 1시간 반동안 조심스럽게 놔두고 다음 접시로 옮겨 1시간 반동안 놔둔 다음 세 번째 접시에 옮긴다. 0.15M의 NaCl로 평판을 3 x 세척하고 (이 경우에는 세척병이 편리하다) PBS내의 1mg/㎖의 BSA 3㎖에서 밤새도록 배양하고, 흡입하여 냉동시킨다.

b. 패닝 : 세포는 60mm 접시에 있을 것이다. 배지를 접시로부터 흡입하고 2㎖의 PBS/0.5mM EDTA/0.02%아지드를 첨가하여 37℃에서 30분간 접시를 배양하여 접시로부터 세포를 떼어낸다. 짧은 파스퇴르 피펫으로 세포를 세개 부수고 각 접시로부터의 세포를 원심분리 시험관에 수집한다. 2.5(200xg)로 (5분간) 고정시켜 4분간 회전시킨다. 0.5~1.0㎖의 PBS/EDTA/아지드/5% FBS에 세포를 재현탁시키고 항체를 첨가한다. 얼음에서 최소한 30분간 항온한다. 동일한 부피의 PBS/EDTA/아지드를 첨가하고 3㎖의 PBS/EDTA/아지드/2%피콜상에 조심스럽게 층을 만들고 2.5로 고정시켜 4분간 회전시킨다. 조심스럽게 상청액을 흡입한다. PBS/EDTA/아지드 0.5 ㎖에 세포를 흡수하고 100마이크론의 나일론 망(테트코에서 구입)을 통해 피펫으로 옮김으로써 3㎖의 PB/EDTA/아지드/5% FBS를 함유하는 항체-코팅 접시에 분취량을 첨가한다. 많아야 두 60mm접시로부터 항체-코팅된 하나의 60mm평판에 세포를 첨가한다. 1-3시간동안 실온에 놔둔다. 접시에 접착되지 않은 과잉의 세포는 PB/5%혈청 또는 배지로 조심스럽게 세척하여 제거한다. 보통 3㎖의 2회 또는 3회 세척하면 충분하다.

c. 힐트(Hirt) 상청액, Hirt의 J. Molec. Biol. 26 : 365-369(1967) 문헌의 바람직한 변형 방법은 다음과 같다 : 0.4㎖의 0.6% SDS. 10mM EDTA를 패닝된 평판에 첨가한다. 20분간 놔둔다(평판상에 실제로 세포가

없다면 1분정도 놔둘 수 있다). 점성의 혼합물을 마이크로퓨즈 시험관에 피펫으로 옮긴다. 0.1㎖의 5M NaCl을 첨가하고 혼합하여 최소한 5시간 정도 얼음에 놔둔다. 혼합물을 가능한한 차갑게 놔두는 것은 힐트 상청액의 질을 개선시켜 주는 것 같다. 4분간 회전시키고 상청액을 조심스럽게 제거하여 페놀 추출하고(첫번째 계면이 깨끗하지 않다면 두 번실시), 10㎍의 곧은 폴리아크릴아미드(또는 다른 캐리어)를 첨가하고 EtOH로 시험관을 꽉 채우고 침전시켜 0.1㎖에 재현탁시킨다. 3부피의 EtOH/NaOAc를 첨가하여 재침전시켜 0.1㎖에 현탁시킨다. 3부피의 EtOH/NaOAc를 첨가하여 재침전시키고 0.1㎖에 재현탁시킨다. 이후에 기술될 고율의 프로토콜을 이용하여 MC 1061/p3에 바람직하게 형질전환시킨다. DNA부피가 2%의 감응세포 분취량을 초과한다면, 형질전환 효율은 나빠질 것이다. 5%는 2.5%와 동일한 균체의 수를 나타낸다(효율은 반감된다).

본 발명의 양상을 위해 배양 배지에서 차단제를 사용하는 것이 바람직하다. 비특이 단백질, 단백질 가수분해 효소 또는 항체가 존재하는 것이 확실한 차단제는 기질 또는 숙주 세포 표면에 존재하는 항체를 파괴하거나 그 항체와 교차 결합하지 않으며 허위양성 또는 허위음성의 결과를 낳는다. 차단제의 선택은 본 발명의 면역선택단계의 특이성을 실질적으로 개선시킬 수 있다. 예를들어, 면역선택 단계에서 사용되는 것과 같은 형 또는 아형(이소타입)(예를들어, IgG_1, IgG_2A, IgGm등)의 많은 비 특이 모노클로날 항체가 차단제로 사용될 수 있다. 차단제 농도(보통 1-100㎍/㎕)는 원하지 않는 간섭을 억제하는 적당한 민감도를 유지하는 것이 중요하다. 또한 본 기술분야의 숙련자는 배양에 사용되는 완충계가 차단 작용을 최적이 되게하고 비특이적 결합을 감소시키기 위해 선택될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

우선 표적 세포 표면 항원을 형질 발현하는 세포에 대해 패닝된 세포 집단을 트립신이 없는세포 배양 접시(배양된 것)로부터 떼어낸다. 그런다음 세포를 관련 항원족 또는 목적한 항원에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 항테인 제1 항체에 노출시켰다. 이 초기 단계에서, 하나의 항체 또는 항체 집단이 사용될 수 있으며 표적 항원의 성질에 의존하는 선택문제, 예상 빈도 및 다른 변수는 본 기술분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 숙주 세포의 표면에서 형질발현된 표적 항원은 항원-항체 복합체를 형성할 것이다.

후속적으로 그 세포를 제2항체 또는 항체군으로 미리 코팅한 배양 접시, 필터 디스크, 또는 유사물과 같은 기질의 가까이에 병치시킨다. 이 제2항체는 제1항체에 향해 있을 것이고, 예를들어 제1항체가 생성되는 동물을 선택하는 문제는 통상의 지식을 가진자가 규정할 것이다. 예를들어, 제1항체가 마우스에서 생성된다면 제2항체는 염소 또는 양에서 생긴 마우스의 면역글로불린에 향해 있을 것이다. 표적 항원을 형질발현시키는 세포는 항원, 제1항체 및 제2항체 사이에 형성된 복합체를 경유하여 기질에 접착될 것이다. 그런 다음, 접착세포는 세척하여 접착되지 않은 세포에서 분리할 수 있다. 표적 항원을 암호화하는 DNA는 Hirt의 J.Molec. Biol. 26 : 3650369(1967)문헌의 방법과 같이 공지된 방법으로 접착 세포로부터 제조한다. 이 DNA는 후속적인 융합 및 선택을 위해 대장균 또는 다른 알맞은 숙주 세포에 형질전환시켜 목적한 정도로 풍부하게 수득한다.

평상의 경우에, 처음 1회의 면역선택은 표적 항원이 속하는 항원족에 공통인 에피토프 또는 에피토프군에 향해 있는 제1항체 패널을 사용할 것이다. 이것은 다음번 면역선택을 위한 클론 수를 상당히 축소시키기에 충분할 것이다. 보통 이러한 2회의 면역선택이 알맞은 것으로 나타났으나 상기한 바와 같이 면역선택의 횟수는 변할 수 있다. 그후에, 1회의 선택은 표적 항원만을 인지하는 제1항체군 또는 하나의 제1항체를 사용하여 실시될 수 있다.

기질이란 본 발명에 의한 면역선택시에 항체가 결합할 수 있는 고체 표면을 의미한다. 공지된 적당한 기질은 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 덱스트란, 나일론 및 그외의 재료가 포함한다. 그러한 재료로 코팅되거나 그 재료로부터 형성된 시험관, 구슬, 미량역가 평판, 박테리아 배양접시 및 그 유사물이 사용될 수 있다. 항체는 아미드를 통한 공유 결합 또는 에스테르 결합, 또는 흡수에 의한 공지된 방법에 의해 공유결합적으로 또는 물리적으로 결합될 수 있다. 본 기술분야의 숙련자는 다른 많은 적당한 기질 및 그 기질상의 항체를 고정시키는 방법을 알거나, 전형적인 실험만을 이용하는 기질 및 방법을 확인할 수 있을 것이다.

본 발명에 따라 바람직하게 이용하기 위한 숙주 조직 배양세포는 패닝에 사용되는 항체가 비감염 세포상의 결정기를 인지하는 상태를 피하도록 선택되어야 한다. 따라서 COS세포는 특정 표면 항원의 일시적인 형질발현에 바람직한 한편, 더욱 바람직한 것은 마우스의 WOP 세포이다. 쥐의 WOP 세포 중에서 WOP 3027 세포가 더욱 바람직하다. WOP 세포는 쥐의 항체와 쥐의 세포 표면 결정기 사이의 교차 반응이 드물기 때문에, 사실상 모든 항체를 사용할 수 있다.

재조합 DNA 분자의 삽입 크기는전체 암호화 서열의 수득 가능성을 최대화하도록 선택되어져야 한다. 본 기술분야의 숙련자는 주어진 유전자의 선결된 최적 삽입 크기를 결정하는 다양한 방법을 알 것이다.

[벡터 구성 및 cDNA 삽입]

포유동물의 조직 배양 세포에서 cDNA를 형질발현시키기에 적합한 벡터는 공지된 방법에 의해 구성할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 바람직한 것은 SV40 기원을 포함하는 형질발현 벡터이다. 벡터는 자연적으로 유도되거나 합성 전사 기원 및 SV40 초기 부위 프로모터를 포함할 수 있다. 보다 바람직한 것은 인체의 시토메가로바일스의 직접적인 초기 인핸서 서열로 구성된 키메라 프로모터이다. 또한, 다양한 인핸서 서열은 SV 40벡터와 함께 사용될 수 있다. 이러한 내용은 예를들어, Banerji 등의 Cell 27 : 299-308(1981); Levinson 등의 Nature 295 : 568-572(1982); 및 Conrad 등의 Mol. Cell. Biol. 2 : 949-965(1982)문헌에 기술되어 있다.

본 발명의 벡터로의 cDNA 삽입은 예를 들어, 말단 트랜스퍼라제를 가진 단독중합체 말단 부위에 의해 발생할 수 있다. 그러나, cDNA 삽입물에 대해 5'에 위치한 단독중합체 관은 시험관내 및 생체내 형질발현을 억제시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명의 목적을 위해 바람직한 것은 짧은 복제 가능한 DNA 단편에 의해 분리되는 역위된 동일한 절단부위를 이용하는 것이다. 그러한 역위된 동일한 절단부위는 바람직하게 Bst XI 제한 엔도뉴클레아제를 사용하며, 벡터의 복재가능한 단편과 유사한 말단을 제공하는 cDNA합성 올리고뉴클레오티드와 병행하여 사용할 수 있다. 이러한 방식으로, cDNA는 그 자체에는 결합시킬 수 없으나 벡터에는 결합시킬 수 있다. 이것은 cDNA와 벡터 둘다를 가장 효율적으로 사용할 수 있게 한다.

본 발명의 다른 유형은 벡터에 cDNA를 삽입하는 것을 촉진하기에 충분한 상기의 올리고뉴클레오티드를 바탕으로한 상기 방법이다. 본 발명의 piH3M이 바람직하고 역위된 엔도뉴클레아제 부위를 사용한다. 이 벡터는 복제의 SV40 기원을 포함할 수 있으나 더욱 바람직한 유형은 M13기원을 포함한다. M13기원을 포함하는 벡터는 조절하에 있는 암호화 서열을 COS 세포에서 높은 수준으로 형질발현할 수 있게 한다. 또한 그 플라즈미드내의 크기가 작고 배열이 특별한 서열은 COS세포에서 높은 수준으로 복제되도록 한다.

세포 표면 항원이란 세포내 막 시스템을 통해 세포 표면으로 수송된 모든 단백질을 의미한다. 그러한 항원은 보통 막의 지질층에 놓여 있는 소수성 아미노산을 함유하는 카르복시 말단 도메인을 통해 세포 표면막에 접착되어 있고 거기에서 생물학적인 항원 효과를 발휘한다. T-림프구와 유사한 항원은 특히 본 발명의 방법에 의한 유전자 클로닝에 적합하다. 그러나, 모든 세포의 세포 표면항원은 본 발명의 방법에 따라 클로닝될 수 있다. 더구나 보통 세포 표면상에서 형질발현되지 않은 단백질들은 예를들어, 세포내 항원을 형질발현하는 고정 세포가 풍부해지도록 형광 세포분석분류장치(FACS)를 이용하는 본 발명의 방법에 따라 클로닝될 수 있다.

실질적으로 순수하다란 본 발명의 모든 항원 또는 그러한 항원을 암호화하는 모든 유전자가 보통 자연적으로 함께 발견되는 다른 오염물이나 다른 항원 또는 유전자가 실질적으로 없으며 자연에서 발견되지 않는 유형으로 존재하는 것을 의미한다. 기능성 유도체란 분자의 단편, 변형체, 유사체 또는 화학적 유도체를 의미한다. 본 발명의 모든 항원과 같은 분자의 단편은 분자의 모든 폴리펩티드 부분집합을 의미한다. 그러한 분자의 변형체는 전체 분자 또는 그의 단편과 실질적으로 유사한 자연 발생적인 분자를 의미한다. 분자의 유사체는 전체 분자 또는 그의 단편과 실질적으로 유사한 비-자연적인 분자를 의미한다.

항원의 단편, 변형체, 유사체 및/또는 화학적 유도체는 두분자의 아미노산 서열이 실질적으로 유사한, 즉 약 50% 이상의 상동성을 갖고 두 분자가 유사한 생물학적 활성도를 갖는 경우 단편, 변형체, 유사체, 화학적 유도체 및/ 또는 항원과 실질적으로 유사하다고 말한다. 만일 두 서열이 실질적으로 유사한, 즉, 제1의 뉴클레오티드 서열이 제2의 튜클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열과 약 50%이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단편, 변형체, 유사체, 화학적 유도체를 암호화하고, 그 제1의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 단편, 변형체, 유사체, 화학적 유도체 및/또는 항원이 제1의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 단편, 변형체, 유사체, 화학적 유도체 및/또는 항원의 생물학적 활성도와 유사한 생물학적 활성도를 갖는 경우에 한 뉴클레오티드 서열은 다른 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 유사하다고 말한다. 그러므로 두 개의 분자가 유사한 생물학적 활성도를 가지는 경우에는 그 분자 하나가 다른 분자에서 발견되지 않는 부가적인 아미노산 잔기를 포함하거나 아미노산 잔기의 서열이 동일하지 않은 경우에라도 이 용어가 사용되면 그것들은 변형체로 간주한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 분자가 보통 분자의 부분이 아닌 부가적인 화학적 전기를 포함할 때 그 분자는 다른 분자의 화학적 유도체라고 말한다. 그러한 화학적 잔기는 분자의 용해성, 흡수성, 생물학적 반감기등을 개선사킬 수 있다. 그 화학적 잔기는 그 분자의 독성을 감소시키거나 그 분자의 원하지 않는 모든 부작용을 제거 또는 약화시킬 수 있다. 그러한 작용을 증재할 수 있는 화학적 잔기는 예를들어, Remington's pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn.(1980)문헌에 기술되어 있다.

이와 유사하게, 본 발명의 모든 항원의 유전자인 기능성 유도체는뉴클레오티드 서열에서 실질적으로 유사하다고 할 수 있고 유사 활성도를 갖는 분자를 암호화하는 그 유전자의 단편, 변형체, 또는 유사체를 포함한다는 것을 의미한다.

항원, 단편, 변형체, 유사체, 및/또는 화학적 유도체는 전자가 후자의 생물학적 활성도의 약 25% 이상을 갖는 경우, 다른 항원, 단편, 변형체, 유사체 및/또는 화학적 유도체에 대해 유사한 생물학적 활성도를 갖는다고 말한다. 생물학적 활성도는 생명체의 특성인 작용, 기은 또는 과정이다. 또한 생물학적 활성도는 항체 생산을 유도하기 위해 실험동물에 인위적으로 항원, 단편, 변형체, 유사체 및/또는 화학적 유도체를 삽입할 때 생물학적 활성도가 나타나도록 시험관내 또는 비-자연계에 대한 생체 과정의 재생, 연장 또는 적응을 포함할 수 있다. 항원, 단편, 변형체, 유사체 및/또는 화학적 유도체는 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성도를 가질 수 있다. 생물학적 활성도는 그 활성도에 대해 특징적인 방법 또는 분석법에 의해 감지되거나 측정될 수 있다. 항원의 생물학적 활성도와 유사한 생물학적 활성도를 가지는 기능성 유도체는 그 활성도에 대한특징적인 분석법으로 측정되고 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 바와 같은 항원 활성도의 약 25% 이상의 생물학적 활성도를 가져야한다.

본 발명의 방법에 의해 형질발현된 실질적으로 순수한 항원은 방사성 면역측정법(RIAs).효소 면역 측정법(EIAs) 및 효소결합 면역흡착 검사법(ELISAs)을 포함하는 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 면역 진단 분석법에 사용될 수 있다. 가용형의 본 발명의 실질적으로 순수한 단백질은 사람을 포함하는 동물의 면역 관련질병 및 장애를 치료하기 위해 림포카인 및 모노카인 또는 약물을 포함하는 다른 약제 또는 본 발명의 다른 항원과 함께 또는 단독으로 투여할 수 있다. 본 발명의 실질적으로 순수한 단백질로 치료하여 이로울 수 있는 장애의 예로서는 면역 결핍증과 급성 과민증, 천식, 과민성 폐렴, 면역복합체병, 맥관염, 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 면역병리학적 신장장애, 급만성 염증, 용혈성 빈혈, 혈소판 장애, 혈장 및 다른 세포 종양, 아밀로이드증, 기생충증, 다발성 경화증, 귈랑-바레 증후군, 급성 및 아급성의 근장애성 마비, 중증근 무력증, 내분비 질환 및 조직과 기관 이식 거부를 들 수 있으며 이들 모두는 Petersdorf 등의 eds., Harrison's Principles of Internal Medicine, 상기문헌에 기술되어 있다. 또한 Weir, ed., 상기 문헌 ; Boguslaski 등의 eds., 상기문헌; 및 Holborow 등의 eds., 상기문헌도 참조하라.

면역 치료에 사용될 때, 본 발명의 항원은 치료제로 표지되거나 표지되지 않을 수 있다. 면역치료를 위해 본 발명의 항원과 결합될 수 있는 치료제의 예로서는 약물, 방사성 동위원소, 렉틴 및 독소이다.

본 발명의 항원을 투여하기 위한 선량의 범위는 목적한 면역치료 효과를 보일 정도로 크지만 원하지 않는 교차 반응 과민반응과 같은 부작용을 일으킬 정도로는 크지1 않다. 일반적으로 사용 선량은 환자의 나이, 상태, 성별 및 질병의 정도에 따라 달라질 것이다. 또한, 역징후(만일 있다면), 면경 관용 및 그외의 변수도 적정 선량에 영향을 미칠 것이다. 투여는 주사 또는 시간에 따른 점차적인 관류에 의해 비경구 투여될 수 있다. 또한, 정맥내, 피하, 근육내, 복강내 또는 경피 투여될 수 있다.

비경구 투여용 제제는 멸균 수용액 또는 비-수용액, 현탁액 및 에멀션을 포함한다. 비-수용성 용매의 예로서는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리부유와 같은식물성 기름 및 올레산에틸과 같은 주입가능한 유기 에스테르를 포함한다. 수용성 담체는 물, 알콜용액, 수용액, 에멀션 또는식염 및 완충배지를 함유하는 현탁액을 포함한다. 비경구 부형제는 염화나트륨용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 락테이티드 링거스(lactated Ringer's)또는 비휘발성 오일을 포함한다. 정맥내 부형제는 링거 덱스트로스에 기초한 유체 및 영양 보충물, 전해질 보충물 등을 포함한다. 또한 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성가스 및 그 유사물과 같은 방부제 및 그외의 첨가제가 있다. 그러한 제제 및 그의 제조방법은 예를들어, Remingtion's PharmacuticalScience, 16th ed., 상기문헌에 기술되어 있다.

또한 본 발명의 항원은 항원 단독으로 또는 림포카인, 모노카인 및 약물, 사람을 포함하는 동물의 치료에 사용되는 의약, 면역관련 지시약과 같은 그외의 약제 또는 다른 항원과 함께 연합하여 의약 또는 제약학적 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 항원은 단독 투여될 수 있지만, 제약학적 조성물로 투여되는 것이 바람직하다. 본 발명의 제약학적 조성물은 최소한 하나의 항원 또는 제약학적으로 용인가능한 그의 염, 하나 이상의 담체 및 임의의 다른 치료제를 포함한다. 용인가능한이란 그 약제 또는 담체가 제약학적 조성물의 다른 성분과 양립하고 환자에게 피해를 주지 않는다는 것을 의미한다. 조성물은 구강, 직장, 코, 국소(볼 및 혀를 포함). 질 또는 비경구 투여하기에 적합한 것을 포함한다. 조성물은 편리하게 단위 투여형이고 제약 분야에서 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 그러한 방법은 활성 성분과 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체를 결합 시키는 것을 포함한다. 일반적으로 조성물은 액체 담체 또는 미세하게 분쇄한 고체 담체 또는 둘다와 활성 성분을 결합시키고, 필요한 경우 그에 의해 형성된 산물을 성형함으로써 균일하게 제조한다.

본 발명에 따라 경구 투여된 제약학적 조성물은 각각 선결된 양의 활성 성분을 포함하는 캡슐, 카세제 또는 정제를 포함하는 모든 편리한 유형일 수 있다. 또한, 수용성 또는 비수용성 액체 또는 수증유의 액체 에멀션, 또는 유중수의 액체 에멀션내의 용액 또는 현액 이외의 분말 또는 과립도 가능하다. 또한 활성 성분은 환괴, 지제 또는 연고로서 제시될 수 있다.

지금까지 기술해온 본 발명은 어떠한 방식으로도 본 발명의 법위를 제한하지 않는 다음의 실시예를 참고로하여 더욱 충분히 이해될 것이다.

[실시예 1]

[인체 CD2 항원의 분리, 분자 클로닝 및 구조]

[cDNA 형질발현 벡터 piH3]

COS세포 형질발현 벡터는 억제자 tRNA 유전자와 SV40 기원 사이에 합성 전사 단위를 삽입함으로써 piSV로부터 구성한다 [Luttle 등의 Mol. Biol. Med.1 : 473-488(1983) 문헌 참조]. 그 전사 단위는 HIV LTR-67 내지 +80 서열에 융합된 인체의 시토메가로바이러스 AD169 직접 초기 인핸서 서열로 구성된 키메라 프로모터로 구성되어 있다. HIV STR+80 서열로부터 직접적인 하루에는 350bp의 스타퍼(stuffer)에 의해 분리된 두 Bst X1부위를 포함하는 폴리링커가 삽입되어 있다 : Bst X1부위 측면에는 삽입물을 삭제하는데 사용할 수도 있는 X bal부위가 있다. 폴리링커 하류에는 SV 40의 작은 t항원 스플라이스 및 pSV2로부터 유도된 초기부위 폴리아데닐화 신호가 있다. 그 형질 발현 벡터의 뉴클레오티드 서열은 제1도에 나타나 있다.

[cDNA 라이브러리 구성]

RNA는 상기한 구아니디움 티오시아네이트/CsCl 방법에 의해 HPB-ALL세포로부터 제조할 수 있다. 폴리 A+ RNA는 올리고 dt선택에 의해 전체 RNA로부터 제조한다. Maniatis 등의 Molecμlar Cloning : A Laboratory Manual, 상기문헌을 참조하라. cDNA SMS gUBLER 및 Hoffman[Gene 25 : 263-269(1982)문헌]의 방법으로 합성한다. Bst XI 어댑터는 cDNA에 결합하고 그 반응 산물은 SW55 로터에서 50k rpm으로 3시간 동안 1mM EDTA를 포함하는 5㎖ 의 20%아세트산 칼륨 기울기를 통해 원심분리하여 분획화하였다. 시험관의 만곡부 바로위에 삽입한 주사기 바늘 또는 버터플라이를 통해 수동으로 수집하였다. 개별 분획은 곧은 폴리아크릴아미드를 첨가한 후 에탄올 침전시켜[Stra uss 및 Varshavsky 의 Cell 37 : 889-901(1984)문헌 참조]20㎍/㎖가 되게한다. 700bp보다 큰 cDNA를 함유하는 분획을 모으고 기울기 정제시킨 Bst X1절단 piH3벡터에 결합시킨다. 결합시킨 DNA는 다음의 프로토콜에 의해 알맞게 제조된 E. coli MC1061/p3내로 형질정환시킨다: 목적한 균주를 LB평판상에 줄을 긋는다. 다음날 250㎖의 플라스크에 든 20㎖의 TYM육즙(제조방법은 아래에 기술되어 있다)에 하나의 군체를 접종한다. 세포를 미드로그(midlog)단계(0d600은 약 0.2-0.8)로 성장시키고 100㎖의 TYM 육즙을 포함하는 21개의 플라스크에 The고 세포가 0.5-0.90D로 성장할때까지 세개 흔든 다음 동일한 용기에서 500㎖로 다시 희석한다. 세포가 OD 600 0.6으로 성장하였을 때 플라스크를 빙수에 놓고 급속히 냉각되도록 서서히 흔들어준다. 배양물을 식힐 때 4.2K rpm에서 15분간(J6)회전시킨다. 상청액을 버리고 얼음상에서 서서히 흔들어주어 약 100㎖의 차가운 TfB I(하기참조)에 그 펠릿을 재현탁시킨다. 그런다음 동일한 병에서 4.2K rpm으로하여 8분간(J6)재회전시킨다. 상청액은 버리고 펠릿은 얼음상에서 서서히 흔들어주어 20㎖의 차가운 TfB II에 재현탁시킨다. 0.1 내지 0.5㎖의 분취량을 예비냉장시킨 마이크로퓨즈 시험관에 넣고 액화질소에서 냉각시키고 -70℃에서 저장한다. 형질전환을 위해 분취량을 제거하고 용융될때까지 실온에서 해빙시키고 얼음에 둔다. DNA를 첨가하고 얼음상에 15-30분간 놔두고 37℃에서 5분간(0.5㎖분취량의 경우 6분간)항온한다. 그런다음 DNA를 포함하는 현탁액을 LB에서 1 : 10으로 희석하고 평판화 또는 항생제 선택을 적용하 기전 90분동안 성장시킨다. 택일적으로, 열-진동 형질전환 혼합물은 박층(4-5㎖)의 무항생제 LB 아가를 평판화하기 직전에 붓는 생제 평판에 직접적으로 평판화한다.

[배지 및 완충제]

TYM : 2%의 박토-트립톤, 0.5%의 효모 추출물, 0.1M NaCl, 10mM MgSO4(를 오토클레이브하기 전에 첨가할 수 있다).

TfB I : 30mM KOAc, 50mM $MnCl_2$, 100mM KCl, 10mM $CaCl_2$, 15%(v/v)글리세롤.

TfB II : 10mM Na-MOPS, pH 7.0, 75mM $CaCl_2$, 10mM KCl, 15% 글리세롤.

[패닝에 의한 cDNA 클론의 회수]

패닝을 위한 생물학적 배양 접시(팔콘 1007)는 그 접시를 PBS 대신에 세척병에 든 0.15M NaCl로 세척하고 반응되지 않은 부위를 1 mg/㎖ 의 BSA를 포함하는 PBS에서 밤새도록 배양하여 차단시키는 것을 제외하고는 친화 정제된 양의 항-마우스 IgG항체르 Wysocki 및 Sato[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 2844-2848(1978)문헌]가 기술한 바와 같이 코팅함으로써 제조하였다. 전형적으로 접시는 PBS/BSA의 흡입 후 대량으로 제조하고 냉동 보관한다. 1회의 선별과정에서 24.6cm접시의 50% 융합 COS세포를 Sandri-Goldrin 등의 Mol. Cell Biol. 1 : 743-752(1981)문헌에 기술된 방법에 따라 원형질 융합시킴으로써 형질감염시킨다. 72시간의 후융합을 한세포는 PBS/1mM EDTA/0.02% 아지드화 나트륨에서 37℃로 하여 30분간 배양함으로써 분리시킨다. 분리시킨 세포를 한데 모아 원심분리하고, 제조업자에 의해 제시된 농도의 통상적인 시약 뿐만 아니라 1 : 1000으로 희석된 복수로서의 모노클노날 항체를 포함하는 차가운 PBS/EDTA/5% 우태아혈청에서 재현탁시킨다. 얼음에 1시간 놔둔후 세포를 PBS/EDTA/D아지드로 1 : 1 희석하고 2% 피콜 400을 포함하는 10㎖의 PB/EDTA/아지드에 층을 형성시킨다. 원심분리(400 x g, 5분)한 후,상청액을 조심스럽게 흡입하고 펠릿을 소량의 PBS/EDTA/5% FBS에 세포를 재현탁시키고, 세포를 3㎖의 PB/EDTA/5%륜를 포함하는 패닝 평판에 분포시킨다. 그런 다음, 평판을 반드시 Wysocki 및 Sato의 Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 2844-2848(1978)문헌에서 기술한대로 처리한다. 에피솜 DNA를 Hirt[J. Mol.Biol. 26 : 365-269(1967)문헌]의 방법에 의해 접착 세포로부터 회수하고 MC 1061/p3내로 형질전환시킨다.

[세포주 및 세포 배양물]

COS 세포 클론 M6세포는 10%우혈청 및 15㎍/㎖의 황산 젠타마이신(ME/10% 우혈청)을 보충한 둘베코의 변형된 이글 배지에서 증식시킨다. 세포는 6cm의 접시에서 형질감염시키기 전날에 세포를 손상시키는 일 없이 가능한한 조밀하도록 저장 평판으로부터 약 1 : 8 의 비로 분할한다. T 세포주는 상기한 바와 같이 젠타마이신을 포함하는 이스코브의 변형된 둘베코 배지(IMD) 및 뉴시럽(NuSerum)(콜라보래이티브 리서치에서 구입)또는 10% 우태아혈청에서 성장시킨다.

[면역형광 실험을 위한 COS세포 형질감염]

6cm접시에서 50% 융합된 COS세포를 10% 뉴시럼(콜라보래이티브 리서치에서 구입). 400㎍/㎖ DEAE덱스트란, 10uM 이인산 클로로퀸 및 1 ㎍/㎖ DNA를 포함하는 DME또는 IMDM 배지로 구성된 칵테일 1.5㎖의 부피에 형질감염시킨다. 37℃에서 4시간(또는 세포의 상태가 안 좋으면 더 빨리)이 경과한 후, 그 형질감염 혼합물을 제거하고 세포를 PBS에서 10% DMSO로 2분간 처리한다[Sussman 및 Milman의 Cell Biol. 4 : 1641-1643(1984)문헌 참조]. 그런다음 세포가 48 내지 72시간동안 DME/10%우혈청에서 형질발현하게 한다.

[면역침전, 노던 및 서던 블로트 분석]

T세포는 락토퍼옥시다제로 처리하여 표지하고 용해시키고, 통상적으로 이용가능한 염소의 항-마우스 IgG 아가로스 구슬(쿠퍼 바이오메디칼에서 구입)을 이용하여 Clark 및 Einfeld[Leukocyte Typing II, Vol. II, pp. 155-167(1986)문헌]의 방법에 따라 면역침전시켰다. COS세포는 DEAE덱스트란 방법으로 형질감염시키고 트립신화하여 희석시킴이 없이 형질 감염후 24시간만에 새로운 평판에 통과시켰다. 36시간 후 세포를 상기한 바와 같이 PBS/EDTA에 노출시킴으로써 분리하고, 원심분리하고, 락토퍼옥시데이트 방법으로 표지하였다. T세포 면역침전의 경우, 투명 용해물을 제조하였다. 단, 용해 완충액은 1mM PMSF를 포함하며 제1항체와의 항온은 4℃에서 2시간 동안만 실시한다.

용리 시료는 Laem㎖i[Nature 227 : 680-685(1970)문헌]의 완층계를 이용한 11.25%의 불연속 폴리아크릴아미드 겔 상에 분획화하였다.

노던 블로트 분석은 DMSO를 적하 완충액에서 제거하고, 70℃에서 5분간 변성시키고, 겔이 6%보다는 0.6%의 포름알데히드를 포함한다는 점을 제외하고는 실질적으로 Maniatis등의 Molec㎕ar Cloing, a Laboratory Manual(1982)문헌에 기술된 대로 실시하였다. 1㎍/㎖의 에티디움 브로마이드를 포함하는 2부피의 물에서 겔을 염색하고 사진을 찍고 염색액에서 나일론[진스크린(Gene Screen), 듀폰에서 구입]에 전이시켰다. 전이된 RNA는 0.22mW/cm2의 유량(254nm에서 측정)에서 5분간 사란 랩(Saran Wrap)[Church 및 Gilbert의 Proc. Natl. AKSGcad. Sci. USA 8 : 1991-1995(1984)문헌 참조]을 통해 살균력이 있는 램프에 노출시킴으로써 조사(照射)하였다. 서던 블로트 분석은 Reed 및 Mann[Nucl. Acids Res. 13 : 7207-7221(1986)문헌]이 기술한 바와 같이 나일론(진스크린, 듀폰에서 구입)에 알칼린 전이시킴으로써 실시하였다. 혼성화 프로브는 Hu acl Messing[Gene 18 : 271-277(1992) 문 헌]의 방법에 의해 제조하고 블로트를 M13 mp 19파지의 10DNA ㎍동등물을 포함하는 SDS/인산염 완충액 [Church 및 Gilbert의 Preoc. Natl. Acad. Sci. USA 8 : 1991-1995(1984)문헌 참조]에서 예비혼성화하였다.

[적혈구 로제팅(Erythrocyte Rosetting)]

적열부는 PBS에서 세 번 원심분리하여 총 혈액으로부터 제조하였다. COS세포는 DEAE방법에 의해 CD2 또는 다른 표면 항원 형질발현 클론을 가진 6cm의 접시에 형질감염시켰다. 배지를 흡입하고 2㎖의 PBS/5% FDS/아지드를 각 평판에 첨가하여 48 내지 72시간동안 후형질감염시킨후, PBS 내의 20% 현탁액으로서 적당한 적혈구 시료 0.4㎖를 첨가하였다. 실온에서 1시간 후, 비접착 적혈구를 서서히 세척 해내고 평판을 실험하였다.

CD2항원 결정기를 암호화하는 cDNA를 다음 방법으로 분리하였다. cDNA는 인체의 T세포 종양주 HPB-ALL에서 추출한 RNA로부터 제조하고 상기한 바와 같은 SV40 기원을 바탕으로한 형질발현 벡터 piH3에 삽입시켰다. 약 $3x10^5$재조합 cDNA라이브러리를 구성하고, 그 라이브러리를 원형질융합에 의해 COS 세포에 도입하였다. 3일후 세포를 EDTA에 노출시켜 분리해내고 CD2항원 결정기에 향해 있는 세 개(OKT 11, Leu 5b 및 Co

㎕ter TII)의 모노클로날 항체의 풀로 처리한다. 항체로 처리한 세포는 친화 정제된 양의 항-마우스 IgG 항체로 코팅한 접시에 분포시켜 접착되게 하고 가볍게 세척하여 접착되지 않는 세포로부터 분리하였다. 풍부하게하는 이 방법은 면역학적 문헌에 공지되어 있다 [Mage등의 J.Immunol. Methodds15 : 47-56(1977)문헌 참조].

그 결과 생성된 군체를 한데 모으고 COS세포에 융합시키고 이전과 같이 2회의 패닝을 실시한다. 3회에서 떼어낸 세포의 부분을 CD2에 대해 특이적인 세 개의 모노클로날 항체 혼합물로 처리하고, Hirt상청액을 다시 생성시켜 E.coli 형질전환시켰다. 8개의 최종 군체로부터 DNA를 제조하고 COS세포에 형질감염시켰다. 3일 후, 8개의 형질감염된 접시중 6개에서 간접적으로 면역형광에 의해 CD2항원의 표면 형질발현을 검출하였다. 상응하는 플라즈미드 DNA의 제한 효소 절단으로 모두 6개의 분리체내 1.5kb의 삽입물을 밝혀냈다.

여섯개의 클론 중 한 개는 후속 분석을 위해 대량으로 제조하였다. COS세포에 형질감염시킨 후, 백혈구 분화 항원에 대한 제3의 국제 연구 집화에 의해 제공된 항체의 부분적 패널과의 직접적인 면역형광 분석은, 제공된 모든 항체가 피토헤마글루티닌 활성 T림프구와 반응하지도 못한 한 시료를 제외하고는 양성 반응을 보임을 나타내었다. 시험한 17개의 항체중에서 적어도 8개의 구별가능한 그룹은 다양한 영장류 림프구와의 반응 유형을 달리함으로써 한정되었다[Jonker 및 Nooij 의 Leukocyte Typing II, Vol. I, pp. 373-387(1986)문헌 참조].

[cDNA 시퀀스 분석]

CD2 cDNA 삽입물은 두 방향으로 M 13mp 19[Vieira 및 Messing의 Gene 19 : 259-268(1982)문헌 참조]에 서브클로닝하고, 디데옥시뉴클레오티드 방법에 의해 그 서열을 결정하였다.(제2도 참조) [Sanger 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463-5467(1977)문헌 참조]. 전사 해독 프레임은 번역 개시 코돈에 대한 Kozak [Microbiol. Rev. : 1-47 : 45(1983) 문헌]의 컨센서스 기준을 만족시키는 ATG트리플렛으로부터 연장된 360잔기가 관찰되었다(제1도 참조). 예상되는 아미노산 서열은 훨씬 큰 세포질내 도메인에 있는 소수성 부분을 스페닝 하는 단일막을 가진 막 통합 단백질을 유발한다. N-말단 아미노산 서열과 Heijne [Nucl. Acids Res. 14 : 4683-4690(1986)문헌]에 의해 구성된 서그널 서열 잔기 빈도 매트릭스를 비교하면 성숙한 CD2 펩티드가 19번(Ser) 및 20번(Lys)잔기 사이에 있는 전구체 펩티드를 절단시킴으로써 형성됨을 알 수 있었다.

본 서열의 놀랍고도 예상치 못한 특징은 제안된 절단 부위에 대해 가까운 임의의 N-결합 글리코실레이션 부위가 존재한다는 것이다. 최종 폴리펩티드 골격은 질량 21.9kd의 외부 도메인과 질량 14.6kd의 세포질 도메인으로 나누어진 38.9kd의 예상 분자량을 갖는다. 세 개의 N-결합글리코실레이션 부위는 세포의 도메인에 존재한다.

막 스패닝 도메인은 지배적인 소수성을 갖는 26개의 불변 잔기를 포함한다. 즉각적으로 잇따르는 9개의 잔기에는 라이신 또는 아르기닌의 염기성 잔기 7개가 있다. 염기성 잔기가 잇따르는 소수성 잔기의 현저한 출현은 카르복시 말단부분을 갖는 막내외 단백질의 공통적인 조직상의 특징이다.

막내외 도메인의 다른 놀라운 특징은 소수성 잔기(측면 베타 턴에서 흔히 발견된다) 측면에 있는 베타 탄 모티브[Chou 및 Fasman의 Annual Review of Biochemistry 47 : 251-276(1978)문헌 참조] cys-gly-gly-gly의 출현을 들 수 있다. 이론적으로는 알파 나선구조에 배열된 20개의 잔기만이 3nm의 막이중층을 횡행하는데 필요하고 [Tanford의 Science 200 : 1012-1018(1978)문헌 참조], 14개의 소수성 잔기 정도가 막통합 단백질을 삽입 및 방출할 수 있게 하고[Adams 및 Rose의 cell 41 : 1007-1015(1985)문헌 참조]. CD2 항원의 막내외 단편은 굴곡 또는 엉클림을 포함할 수 있다.

크기가 다소 큰 세포질 도메인은 CD2가 고유의 효소 활성도를 갖는 가능성을 갖게한다. 세포질 도메인은 매우 풍부하고 높은 회전 가능성을 갖는 세 개의 부위를 프롤린에 포함한다.

그 아미노산 서열과 NBRF 데이터베이스의 비교에서는 다른 단백질과의 실질적인 유사성을 나타내지 않았다. 특히, T세포 수용체의 알파 또는 베타 사슬과의 유사성은 관찰되지 않았으며, CD2가 최초의 T세포 수용체라는 가능성이 배제되었다[Milanese 등의 Science 231 : 1118-1122(1986)문헌 참조].

세포질면 바로 내부에 있는 단백질은 EGF수용체 및 부 류 I조직적합성 유전자(class I histocompatibility gene)와 단백질 키나제 C에 의한 생체내(EGF) 및 시험관내(HLA)인산화 또는 사이클릭 AMP_의존 단백질 키나제 각각에 대한 공지된 부위내의 동일한 지점에서 발견되는 유형과 세린 잔기가 잇따르는 염기성 단백질의 종류이다. Hunter 등의 Nature 311 : 480-482(1984) ; Davis 및 Czech의 Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 1974-1978(1985); Guild 및 Strominger 의 J.Biol. Chem. 259 : 9235-9240 및 13504-13510(1984)문헌을 참조하라. 유사한 부위는 인터루킨 2 수용체의 세포질내 도메인에서 발견되고, 단백질 키나제 C에 의해 생체내에서 인산화된다. Leonard등의 Nature 311 : 626-631(1984); Nikaido등의 Nature 311 : 631-635(1984); Shackelford 및 Tarowbridge의 J. Biol. Chem. 259 : 11706-(1984)문헌을 참조하라.

[형질감염된 세포에 의해 형질발현된 CD2 항원의 면역침전]

COS세포를 CD2형질발현 플라즈미드로 형질감염시키고 형질감염 후 60기간만에 락토퍼옥시다제 방법으로써 표면을 125_I로 표지하였다. 세포 용해물을 준비하고 모노클로날 항-CD2항체(OKT 11) 또는 외래의 항체(OKT 4; 항-CD4)와 함께 4℃에서 2시간 항온하였다. 세파로스와 결합한 항-마우스 항체를 첨가하고 몇차례 세척한 후, 흡착된 단백질을 용리하고, 피토헤마글루티닌에 의해 활성화된 T림프구, cDNA제공주 HPB-ALL또는 본 실험실에서 생성시킨 장기 T세포주로부터 유사하게 제조한 면역침전물로 11.25%의 아크릴아미드겔 전기영동하였다. 오토래디오그래피로 면역 반응물질의 현저한 밴드는 대조에 의해서가 아니라 항-CD2 항체에 의해 형질감염된 COS세포로부터 침전됨을 입증하였다. COS 세포물질의 산출된 평균 분자량은 51kd이며, 이것은 T아세포 및 T세포주 물질에 대한 평균 분자량인 54kd과 비교된다; HPB-ALL세포로부터의 항원은 분자량이 약 61kd인 것으로 밝혀졌다. 크기면에서 관찰된 차이점은 상이한 세포 유형에서 발생하는 상이한 유형의 글리코실화 때문인 것으로 생각된다. 겉보기 분자량이 38kd인 소수 밴드는 T세포 또는 HPB-

ALL세포가 아닌 COS세포로부터 면역침전된 물질에 존재한다. 이 종의 크기는 오차 이내에서 글리코실화되지 않는 성숙 펩티드의 예상 분자량인 39kd과 일치한다.

[양의 적혈구 로제트를 형성하는 CD2형질발현 COS세포]

CD2형질발현 클론을 형질감염시킨 COS세포를 1㎍/㎖농도의 정제된 MT910(IgG, 카파) 항-CD2 항체[Rieber 등의 Leukocyte Typing II, Vol. I, pp. 233-242(1986)문헌 참조] 또는 1㎍/㎖농도의 정제된 MB40.5[IgGI, 카파 ; Kawata등의 J Exp. Med. 160 : 633-651(1984)문헌 참조] 항체로 1시간 처리한다. MB40.5는 단형성의 HLA-ABC결정기를 인식하고 아프리카 녹색 원숭이의 조직적합성 항원과 교차 반응한다.; 형질감염 세포에 의해 형질발현된 CD2항원과 거의 유사한 정도로 풍부한 표면항원을 인식하는 이소타임-항체를 나타내기 때문에 그것을 선택한다. 양의 적혈구 로제트는 MT910이 아닌 MB40.5의 존재하에 관찰된다. 로제트 저해는 OKT11항체로 관찰되며, 그외의 다양한 대조 항체로는 관찰되지 않았다.

[다른 동물의 적혈구 로제트를 형성하는 형질 감염된 COS 세포]

양의 적혈구 이외에도 인체의 T세포는 마우스 또는 래트의 적혈구가 아닌 말, 돼지, 개, 염소 및 토끼의 적혈구 로제트를 형성하는 것으로 알려졌다. Johansen등의 J. Allergy Clin, Immunol. 54 : 86-94(1974) ; Amiot등의 in, A. Bernard등 eds., Springer, publisher, New York, N.Y., pp. 281-293(1984) ; Nalet 및 Fournier, Cell. Immunol. 96 : 126-136(1985)문헌을 참조하라. 인체의 적혈구와 흉선세포 사이의 오토로제트[Baxley등 Clin. EXP. iMMUNOL. 15 : 385-393(1983)문헌 참조]또한 보고되었다. CD2형질발현 클론으로 형질감염시킨 COS세포를 MT910 또는 대조 항체 MB40.5로 처리하고 상기 종으로부터의 적혈구에 노출시킨다. 로제트는 말, 돼지, 개, 염소, 양, 토끼 및 인체의 적혈구와 함께 관찰되지만 마우스 또는 래트의 적혈구와 함께 관찰되지는 않는다. 로제트 형성은 MB40.5가 아린 MT910을가진 형질감염된 COS세포를 예비처리함으로써 차단한다. 이 실험에서는 보통 말의 적혈구가 밀집 로제트를 형성하고 염소의 적혈구가 다소 빈약한 로제트를 형성하는데, 이것은 아마도 그들의 작은 크기가 세척에 더욱 민감하도록 만들기 때문이라는 점이 주목할만하다. 마우스의 적혈구는 래트의 적혈구가 모든 종류의 감지할만한 결합을 보이지 않은 반면에, 예비처리한 MT910 및 MB40.5세포이외에 배양접시에 약하게 자발적으로 결합한다.

[LFA3항체에 의해 차단되는 인체 적혈구의 결합]

FLA3가 CD2항체에 대한 표적 구조물이라는 항체 차단 연구를 기초로하여 제안되어왔기 때문이 [Shaw 등의 Nature 323 : 262-264(1986)문헌 참조], 로제트 형성을 차단하는 항-LFA3항체의 능력이 연구되었다. 형질감염된 세포는 1 : 1000으로 희석시킨 복수(ascites)로서 항-SFA3(IgGI. 카파)또는 LFA3 : G10/B11 및 D10, 항-K14 항원, D6, 항-Wr^b항원암큼 유력하거나 그보다 더 유력한 인체 적혈구 항원에 향해 있는 4개의 이소타입 비응집 항체 각각의 10㎍/㎖농도로 2시간동안 예비처리한 인체의 적혈구에 노출시킨다 [Nichols 등의 Sang, in press참조]. 적혈구를 과잉의 LFA3 항체가 없도록 세척하지만, 항원 차단력의 가능한 상실을 탈착에 의해 보호하기 위해 대조 항체의 존재하에 로제트를 형성하도록 한다. 로제트 형성은 네 개의 대조 항체의 존재하에 관찰되지만 항 -LFA3로 예비처리한 적혈구와는 함께 관찰되지 않는다.

[로제트를 형성하지 않는 다른 T세포 항원 형질발현 COS세포]

많은 클론은 CD2를 클로닝하는데 사용하는 것과 같은 형질발현 기술에 의해 분리되고 항체 반응성, 핵산 제한 및 서열 분석 및 면역침전에 의해 정도를 변화시키는데 특징이 있다. 대표적인 클론은 COS세포에 형질감염되고 로제트 형성을 유지하는 능력을 분석한다. CD1a, CD1b, CD1c, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 및 CD28(Tp 44)클론은 인체의 적혈구를 가진 로제트를 형성하지 않았다.

[RNA 블로트 분석법]

CD2항원을 형질발현하거나 결여된 세포형으로부터 제조한 동일한 양의 전체 PNA를 변형시킨 아가로즈 겔을 통해 전기영동하고 나일론에 전이시킨다. CD2 cDNA 삽입물을 포함하는 M13 클론으로부터 제조한 가닥 선택적 프로브와 그 이동시킨 RNA와의 혼성화 [Hu 및 Messing 의 Gene 17 : 271-277(1982) 문헌 참조]로 인해 흉선세포, 활성 T세포 및 노화된 T세포 집단으로부터 유도된 RNA에 존재하는유력한 1.65kb 및 1.3kb의 전사물이 존재함을 알게되었다. cDNA 제공주인 HPB-ALL 로부터 추출한 RNA에서 보다 작은 양이 발견되고 MOLT4로부터도 추출된다; 겨우 감지할만한 수준이 HSB-2 주로부터의 RNA에 기록되어 있다. Namalwa(버킷 림프종), U937(조직구 백혈병), HuT-78(성인 T세포 백혈병), PEER(T세포 백혈병)또는 저캣 클론 37(Jurkat clone J3R7)(T 세포 백혈병)주로부터의 RNA와는 반응성이 관찰되지 않았다. 반응성의 유형은 CD2항원의 공지되거나 측정된 형질발현 유형과 상응하는데, Namalwa, *937, HuT-78, J3R7, PEER 및 HSB-2 세포주상에는 없거나 검출불가능하며 MOLT4에는 약하게 존재하고, EPB-ALL에는 좀더 강하게 존재하고, 활성화된 T세포에 가장 강하게 존재한다. 또한 흉선세포는 CD2항원을 높은 수준으로 형질발현시키는 것으로 알려져 있다. cDNA클론 염기서열의 시험은 1.3kb의 RNA가 cDNA염기서열의 위치 1085 지점에 있는 규범적인 폴리아데닐화 신호 AATAAA에 대해 말단부위에 있는 택일적인 3' 말단을 형성함으로써 생긴다고 제안되었다. 이러한의견을 실험하기 위해, HPB-ALL 및 활성화된 T 세포로부터의 RNA를 노던 블로트 분석하고 완전한 cDNA 프로브 또는 뉴클레오티드 1131 말단 cDNA의 3' 부분으로부터 유도된 프로브로 혼성화시킨다. 후자의 프로브가 단지 1.65kb의 종과 반응하는반면에, 전자의 프로브는 제4도에서 관찰할 수 있는 반응 유형과 유사하게 나타났다. 그 결과는 1.3kb의 전사물을 갖는 제안된 기원과 일치한다.

활성화되고 노화된 T 세포 RNA 제제에서 약 0.75kb의 약하게 혼성화하는 전사물이 검출되었다. 이 RNA의 기원은 현재 알려져 있지 않다.

[CD2 유전자의 게놈 구성]

태반, 말초 혈액 림프구, T 세포, HeLa 세포 또는 RNA 분석에 사용한 종양주로부터의 게놈 DNA를 서던 블로트 분석하여 동일한 BamHI 절단 유형을 보였는데, 이것은 성장증에 CD2 유전자의 정상적인 형질발현과는 무관하다는 것을 나타내는 것이다. 유사하게, 큰게놈의 변형은 실험한 T세포 종양주가 CD2 항원을 형질발현시키지 못하도록 진행되지 않는다. CD2 서열을 갖는 하나의 파지 재조합체의 불완전한 수집물로 행한 예비 결과 이외에 많은 다른효소를 가진 전체 게놈 DNA의 제한분석으로 그 유전자가 적어도 네 개의

엑손으로 나누어지는 것을 알았다.

[실시예 2]

[CD36의 클로닝, 염기서열 및 형질발현]

CD36을 암호화하는 cDNA 클론을 분리하기 위해, 인체의 태반 cDNA [Simmons 및 Seed(1988) Nature 333 : 568-570문헌 참조]를 촉진제로서의 DEAE-덱스트란을 이용하여 COS세포에 전이시켰다. [실시예 1. 상기문헌 참조]. 후형질감염 48시간만에 세포를 트립신없이 접시에서 떼어내고, 모노클로날 항-CD36 항체 5F1과 함께 항온시키고 [Bernstein 등의 (1982) J. Immunol. 128 : 876-881; Andrews등의 (1984) J. Immunol. 128 : 398-404 문헌참조]염소의 항-마우스 면역글로불린 항체로 코팅한 접시위에 패닝하였다. 접착되지 않는 세포는 조심스럽게 세척하여 제거하고, 접착된 세포는 용해시키고 그 세포로부터 회수한 애피솜 플라즈미드를 정제하여 E. Coli에 형질전환 시킨다. 구형질 융합이후에 따르는 유사한 2회의 첨가 이후에, 무작위로 선택한 군체 12개중 11개로부터 회수한 플라즈미드 DNA는 형질감염된 COS 세포엣의 CD36결정기의 출현을 지시하는 것으로 밝혀졌다.

두 개의 클론을 후속 분석을 위해 무작위로 선택하였다. 약 1.9kb의 두 구멍 삽입물과 동일한 제한 효소 단편유형을 보였다. COS세포는 모노클로날 항체 5F1 및 F13과 반응한 클론과 OKM5(미국 뉴저지 라리탄에 소재하는 오프트에서 구임)로 형질감염시킨다. 항-CD36항체 풀로 형질감염시킨 세포를 면역침전시켜 83kd의 분자는 형질감염된 COS 세포 및 C32흑색종 세포상에 존재하고 대조(CD25로 형질감염된) COS세포에는 결여되어 있다는 것을 알아내었다. 이량체 CD36같은 고분자량의 종을 C32 흑색종 세포 용해물로부터가 아닌 형질감염된 COS 세포 용해물로부터 면역침전시켰다. 그 뉴클레오티드 서열은 표 1에 나타나 있다. 표 1에서, 뉴클레오티드 서열의 번호는 각줄이 시작하는 왼쪽 여백에 나타나 있다. 추론된 아미노산 서열은 암호화하는 뉴클레오티드 트리플렛 각각의 시작 부분 밑의 단일 문자코드로 나타나 있고 개시 메티오닌은 개시 코돈 위에 숫자 1로 나타나 있다. 유도된 아미노산 서열내에서 N-결합 글리코실화된 유력한 부위는 하나의 점선으로 그어져 있다. 추정상의 막내외 도메인은 이중의 점선으로 그어져 있다. 두 개의 컨센서스 폴리아데닐화(AATAAA)특색이 cDNA에서 발견되었다 할지라도, 폴리(A) 말단은 없고 만일 그 전사물이 클론에서 관찰되는 것과 같은 대략의 5'말단을 가진다면, 블로트 혼성화에 의해 관찰된 RNA 종의 어느것도 이 부위에서 폴리아데닐화에 상응할 정도로 짧지않다. 추정된 개시 코돈은 그 콜론내에서 발견된 첫번째 ATG 가 아니지만 이전의 두 개는 골격내 종결 코돈이 밀접하게 뒷따른다. 예정된 개시 메티오닌 다음에는 분비성 시그널 서열을 닮은 짧은 소수성 부위가 뒤따르지만, 절단 부위를 분명히 확인할 수는 없었다. 최근 결정된 표 1에서 아미노 말단의 36 아미노산 사열[Tandon등 J. Biol. Chem. 264 : 7570-7575(9189)문헌 참조]은 성숙 폴리펩티드가 개시 메티오닌에 즉시 뒤따르는 아미노산 잔기에서 시작된다는 것을 지적해준다. 소수성 부위에 선행하는 하나의 Arg 잔기가 아미노 말단을 막에 부착시키기에 충분한지는 분명하지 않다. 그 결과 생긴 폴리펩티드는 약 53kd의 예상 분자량을 가진471개의 잔기를 갖는다. 제안된 세포의 도메인 다음에는 막내외 도메인에 상응하는 27개의 극 소수성 잔기 및 얇은 세포내 도메인에 상응하는 6개의 잔기(그중 3개는 염기성이다)가 뒤따른다.

[표 1]



10개의 유력한 N-결합 글리코실화 부위의 존재는 면격침전에 의해 발견되는 83kd의 종과 예상 폴리펩티드 사이의 분자량에서의 불일치를 설명하기에 충분한 것으로 나타났다. 공지된 단백질의 다양한 데이터베이스에 대한 전체 서열의 후속 비교 결과 주요한 상동성은 감지되지 않았다. 그러나 몇몇 내부 구조가 드러났다. 세포외 도메인 에서의 모든 시스테인 잔기는 뉴클레오티드 서열 중 937내지 1209잔기에 의해 한정된 도메인으로 극한되어진다. 가이드로서 시스테인을 배치하면 세포외 도메인은 세개의 단편으로 나누어

질 수 있는데, 거기에서 시스테인이 없는 두개의 도메인이 선행하고 시스테인이 풍부한 단편이 뒤따른다. 그러나 이들 단편들의 서열 비교는 존재하는 데이터베이스의 다른 분자, 특히 트롬보스폰딘에 대한 중요한 관련성을 전혀 나타내지 않았다.

CD36 단백질은 면역침전에 의해 정제하였다. 신속한 면역 선택 클로닝 방법은 형질감염된 COS 세포의 형질발현에 의존하기 때문에, CD36 cDNA 가 클로닝된 동일한 세포주를 그 형질발현된 단백질의 원료로 사용할 수도 있었다.

C32 흑색종 세포, CD36으로 형질감염된 COS 세포 및 CD25(대조)로 형질감염된 COS 세포는 NaI 로 표면 표지하고, 1Mm 페닐메틸술포닐 플루오라이드, 0.5% NP 40 및 0.1% 도데실황산나트륨을 포함하는 인산 완충 식염수 용액에서 용해시킨다. 항 CD36 모노클로날항체를 첨가하고 4℃ 에서 12 시간동안 그 용해물에 흡수 되도록 한 후, 염소의 항 마우스 면역글로불린 구슬(카펠)을 첨가하고 2시간동안 혼합하고 Clark 및 Einfeld의 J. Immunol. 135 : 155 167(1986) 문헌에 기술된 바와 같이 세척한다. 면역친화 컬럼 정제에 의해 형질감염된 COS 세포 용해물로부터 다량의 단백질을 정제된 유형으로 수득할 수도 있다. CD36에 대한 다른 항체를 CD36 단백질을 이용하여 수득할 수 있으며 이미 기술된 바와 같이 면역원으로서 형질발현되고/되거나 정제된다.

CD36은 열대열원충 (Plasmodum falciparum) 이 기생하는 적혈구의 세포접착을 위한 결합부위로서 본 발명자와 Ockenhouse, C.D. 등의 (1989) Science 243 : 1469 1741 문헌에 의해 확인되었다. 기생충에 감염된 적혈구의 세포접착은 CD36에 대한 모노클로날 항체에 의해 차단되는 것으로 나타났다. CD36 cDNA로 형질감염시킨 COS 세포와 감염된 적혈구를 항온할 때 명백한 세포접착을 나타내었다. 열대열원충이 기생하는 적혈구가 말초 혈관상에 접착함으로써 비장 청소율을 회피하는 능력을 열대열말라리아의 병원성에 중요한 역할을 수행하고, 뇌의 작은 관의 폐색을 유발함으로써 뇌 말라리아의 치사 증후에 관여하는 것으로 생각된다. 그러므로, 본 발명의 cDNA 및 정제 단백질은 치료학적 모노클로날 항체를 만들기에 충분한 정제된 CD36 가 제공될 경우에 유용하다.

[실시예 3]

[T 림프구 TliSA 항원을 암호화하는 cDNA의 분리 및 클로닝]

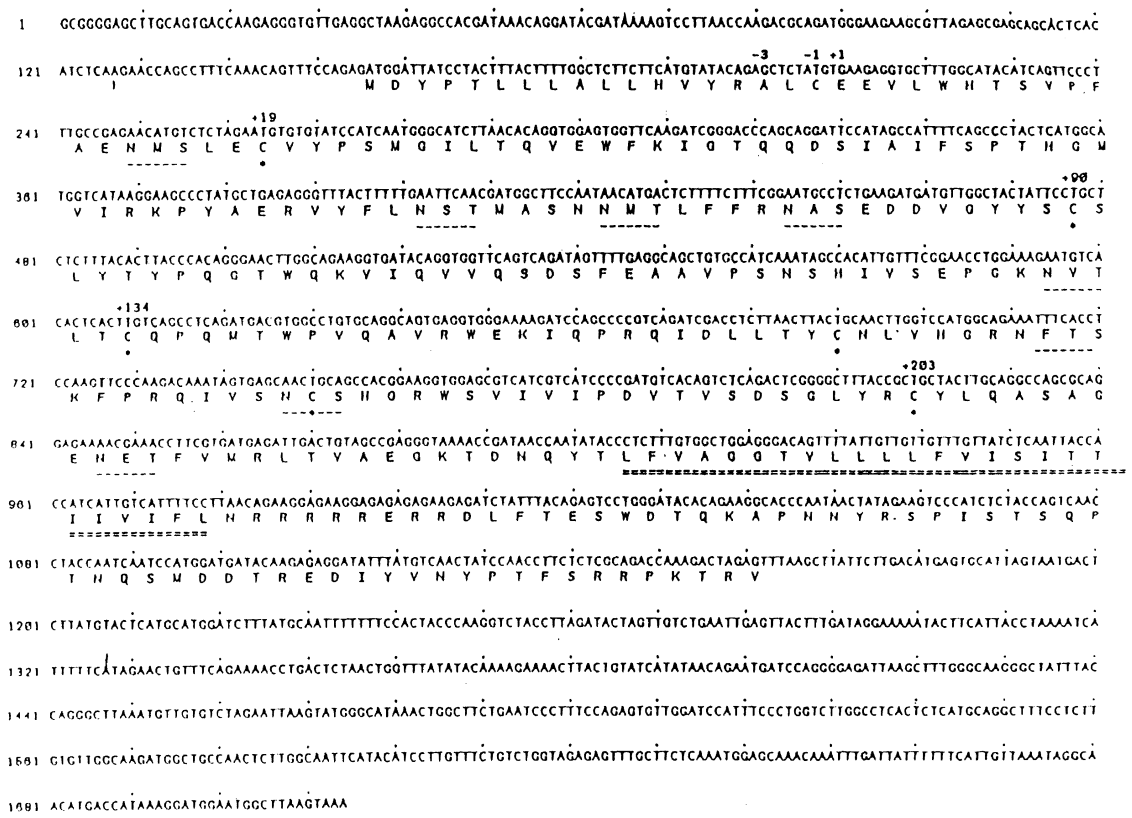
TliSA1 을 암호화하는 cDNA 클론은 상기한 바와 같이 COS 세포에 전이시킨 인체에 T 세포 cDNA 라이브러리로부터 수득하고 본 발명의 신속한 면역선택 클로닝 방법을 실시한다. 모노클로날 항체 ACT T SET TliSA1 (미국 메사츄세츠 캠브릿지 T - 세포 사이언스 코포레이션에서 구입) 은 양성 간접면역형광에 의해, 클로닝된 cDNA를 형질발현하는 형질감염된 COS 세로를 감자하는데 사용하였다. 그 양성 플라즈미드는 1.7kb의 삽입물에 함유되어 있다.

TliSA 단백질은 실시예 2 에서 기술한 면역침전법으로 분리하였다. 그 단백질은 겔 전기영동에 의해 측정한약 50kb 의 분자량을 가진다.

cDNA의 뉴클레오티드 서열은 상기한 바와 같은 디데옥시뉴클레오티드 사슬 종결에 의해 결정된다. 표 2 에는 1714 잔기를 가진 뉴클레오티드 서열과 각각의 암호화 트리플렛의 첫번째 뉴클레오티드 아래에 단일 문자 코드로 표시된 추정된 아미노산 서열이 나타나 있다. 추정된 개시 메티오닌을 암호화하는 ATG 다음에는 분비성 시그널 서열과 일치하는 짧은 소수성 부위가 오고, 반드시 절단되는 부위는 전사 해독 프레임내의 19 잔기이다. 그 결과 생기는 폴리펩티드는, 더 이상 가공되지 않는다면, 약 36kd 의 예상 분자량을 갖는 317개의 잔기를 가진다. 제안된 세포외 도메인 다음에는 세포내 도메인에 상응하는 25개의 극소수성 잔기가 따른다 (표 2 에 이중선으로 나타나 있다). 9개의 유력한 N 결합 글리코실화부위의 존재는 (표 2 에서 하나의 점선으로 나타나 있다) 예상된 폴리펩티드와 면역침전에 의해 발견된 50kd 의 종 사이의 분자량의 차이를 설명하기에 충분한 것으로 나타났다.

TliSA 는 T 세포가 IL 2 유도에 의해 세포 용해형으로 분화되는 것을 중재하는데 관계한다. TLiSA에 대한 항체는 IL 2 에 의해 자극된 T 세포 분화를 방지하고 치료시 IL 2 의 역효과를 조절하는데 유용하다.

[표 2]



[실시예 4]

[T 림프구 특이적 CD27 항원을 암호화하는 cDNA의 분리 및 분자 클로닝]

CD27을 암호화는 cDNA 클론은 COS 세포에 전이시킨 인체 T 림프구 cDNA로부터 수득하였고 본 발명의 방법에 의해 면역 선택하였다. 구아니디움 티오시아네이트를 이용하는 1㎍/㎖의 피토헤마글루티닌 (PHA)을 포함하는 배지에서 4일간 배양한 후 1 유닛의 혈액으로부터 유도된 단핵세포에서 RNA를 추출하였다. 전체 RNA는 폴리 A로 선택하였다. cDNA를 제조하고, CDM 8 내로 클로닝하여 COS 세포에 형질감염시키고 CD27 cDNA를 Seed 및 Aruffo 의 Proc. Natl. Aci. Sci. 84 : 8573 8577(1987) ; 및 Aruffo 및 Seed 의Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3365 3369 (1987) 문헌에서 기술된 바와 같이 제공된 모노 클로날 항체 OKT 18a 및 CLB 9F4로 면역선택하였다. 그 백터는 1,2kb의 cDNA 삽입물을 함유하였다.

cDNA의 뉴클레오티드 서열은 상기문헌에 기술된 바와 같이 디데옥시뉴클레오티드 사슬 종결에 의해 결정하였다. 1203개 잔기의 서열 및 추정된 아미노산 서열을 표 3 에 나타나 있다. 개시 메티오닌은 개시 코돈 위에 숫자 1 로 나타나 있다. 추정된 CD27 폴리펩티드는 유형 1 의 막 통합 단백질의 전형적인 특징을 말해준다. 그것은 분비성 시그널 서열과 일치하는 20개의 아미노산으로된 소수성 부위로 시작한다. 이 소수성 부위 다음에는 171잔기의 세포외 도메인, 20 잔기의 소수성 막스패닝 도메인 (이중선으로 나타나 있다) 및 양하전된 정지전이 서열로 시작하는 49 아미노산의 세포질 도메인이 뒤따른다. 폴리(A) 말단은 없다.

추정된 CD27 아미노산 서열은 제6도에 기술되어 있는 B림프구 및 암 항원 CD40에 대해 전체 길이에 걸쳐 매우 상동이다. 또한 CD27 은 세포외 도메인 및 트랜스 막 도메인에 걸쳐 신경 성장 인자에 대한 수용체(NGFR)에 매우 상동이다 [Stamenkovie 등의 EMBO J. 8 : 1403 1410(1989) ; Johnson 등의 Cell 47 : 545 554(1989) 문헌 참조].

[표 3]

```
1     GGGGTGCAAA GAAGAGACAG CAGCGCCCAG CTTGGAGGTG CTAACTCCAG AGGCCAGCAT CAGCAACTGG GCACAGAAAG

                          1
81    GAGCCGCCTG GGCAGGGACC ATGGCACGGC CACATCCCTG GTGGCTGTGC GTTCTGGGGA CCCTGGTGGG GCTCTCAGCT
                          M  A  R  P  H  P  W  W  L  C  V  L  G  T  L  V  G  L  S  A

161   ACTCCAGCCC CCAAGAGCTG CCCAGAGAGG CACTACTGGG CTCAGGGAAA GCTGTGCTGC CAGATGTGTG AGCCAGGAAC
      T  P  A  P  K  S  C  P  E  R  H  Y  W  R  Q  G  K  L  C  C  Q  M  C  E  P  G  T

241   ATTCCTCGTG AAGGACTGTG ACCAGCATAG AAAGGCTGCT CAGTGTGATC CTTGCATACC GGGGGTCTCC TTCTCTCCTG
       F  L  V  K  D  C  D  Q  H  R  K  A  A  Q  C  D  P  C  I  P  G  V  S  F  S  P  D

321   ACCACCACAC CCGGCCCCAC TGTGAGAGCT GTCGGCACTG TAACTCTGGT CTTCTCGTTC GCAACTGCAC CATCACTGCC
       H  H  T  R  P  H  C  E  S  C  R  H  C  N  S  G  L  L  V  R  N  C  T  I  T  A

401   AATGCTGAGT GTGCCTGTCG CAATGGCTGG CAGTGCAGGG ACAAGGAGTG CACCGAGTGT GATCCTCTTC CAAACCCTTC
      N  A  E  C  A  C  R  N  G  W  Q  C  R  D  K  E  C  T  E  C  D  P  L  P  N  P  S

481   GCTGACCGCT CGGTCGTCTC AGGCCCTGAG CCCACACCCT CAGCCCACCC ACTTACCTTA TGTCAGTGAG ATGCTGGAGG
       L  T  A  R  S  S  Q  A  L  S  P  H  P  Q  P  T  H  L  P  Y  V  S  E  M  L  E  A

561   CCAGGACAGC TGGGCACATG CAGACTCTGG CTGACTTCAG GCAGCTGCCT GCCCGGACTC TCTCTACCCA CTGGCCACCC
       R  T  A  G  H  M  Q  T  L  A  D  F  R  Q  L  P  A  R  T  L  S  T  H  W  P  P

641   CAAAGATCCC TGTGCAGCTC CGATTTTATT CGCATCCTTG TGATCTTCTC TGGAATGTTC CTTGTTTTCA CCCTGGCCGG
      Q  R  S  L  C  S  S  D  F  I  R  I  L  V  I  F  S  G  M  F  L  V  F  T  L  A  G
                                    ========  ==========  ==========  ==========  ==========

721   GGCCCTGTTC CTCCATCAAC GAAGGAAATA TAGATCAAAC AAAGGAGAAA GTCCTGTGGA GCCTGCAGAG CCTTGTCGTT
       A  L  F  L  H  Q  R  R  K  Y  R  S  N  K  G  E  S  P  V  E  P  A  E  P  C  R  Y
      ==========  ===

801   ACAGCTGCCC CAGGGAGGAG GAGGGCAGCA CCATCCCCAT CCAGGAGGAT TACCGAAAAC CGGAGCCTGC CTGCTCCCCC
       S  C  P  R  E  E  E  G  S  T  I  P  I  Q  E  D  Y  R  K  P  E  P  A  C  S  P
       I

881   TGAGCCAGCA CCTGCGGTAG CTGCACTACA GCCCTGGCCT CCACCCCCAC CCCGCCGACC ATCCAAGGGA GAGTGAGACC
      *
961   TGGCAGCCAC AACTGCAGTC CCATCCTCTT GTCAGGGCCC TTTCCTGTGT ACACGTGACA GAGTGCCTTT TCGAGACTGG

1041  CAGGGACGAG GACAAATATG GATGAGGTGG AGAGTGGGAA GCAGGAGCCC AGCCAGCTGC GCGCGCGTGC AGGAGGCGG

1121  GGGCTCTGGT TGTAAGGCAC ACTTCCTGCT GCGAAAGACC CACATGCTAC AAGACGGGCA AAATAAAGTG ACAGATGACC

1201  ACC
```

이들 세 단백질에서 발견되는 대부분의 보존된 구조적 특색은 세포외 부위내 시스테인 또는 히스티딘의 풍요성에 있다. 이것은 이 구조물을 아연 이온에 결합시키는데 사용하는 단백질에서 나타나는 배열과 유사한 두개 또는 네개의 개재 아미노산 잔기에 의해 분리된 쌍에서 흔히 발견된다. 시스테인과 히스티딘이 풍부한 부위 다음에는 생확학적으로 확인된 O 결합 글리칸이 NGFR에 첨가된 부위라고 제안되었던 세린, 트레오닌 및 프롤린이 풍부한 막 근접 도메인이 뒤따른다 [Johnson 등의 (1989). 상기문헌 ; Grob 등의 J.Biol. Chem. 260 : 8049 (1985) 문헌참조].

항 CD27 항체로 형질감염된 COS 세포를 면역침전시킨 후 겔 전기영동시킴으로써 환원시키지 않았을때의 110 kd의 종과 환원제의 존재하에 55kd 의 단일 밴드의 존재를 밝혔다. 이것은 형질감염된 COS 세포상에서, CD27은 T 림프구로부터 침전된 유형과 유사한 55kd의 단량체를 포함하는 이황화 결합된 동종이량체라는 것을 지적해준다 [Bigler 등의 J. Immunol. 141 : 21 28 (1988) ; Stockinger 등이 Leukocyte Typing II, Vol. I : 513 529 (1986) ; Van Lier 등의 Eur. J. Immunol. 18 : 811 816 (1987) 문헌 참조].

CD27 은 T 림프구 활성 항원이다. 그 구조는 그것이 림포킨 또는 성장인자에 대한 수용체 기능을 할 수 있음을 시사한다. CD27 의 인식은 T 세포의 증식을 야기 하고 그 T 세포의 보조자 기능과 효과기 기능을 위해 필요한 특정 유전자의 형질발현을 증가시킨다. T 세포상에서의 CD27의 형질발현은 피토헤마글루티닌(PHA) 또는 항 CD3 모노클로날 항체에 의한 자극을 두배 내지 다섯배로 증가시키고, 최소한 하나의 CD 27 모노클로날 항체를 첨가하여 PHA에 의해 자극된 T 세포의 증식을 증대시킬 수 있다 [Bigler 및 Chiorazzi 의 Leukocyte Typing II, Vol. I : 503 512(1986) ; Van Lier의 (1987) 문헌 참조]. CD27에 대해 양성인 T 세포는 IgM 합성을 위해 B 세포를 돕고, 알맞게 자극되었을 때 IL 2를 분비하는 것으로 밝혀졌다 [Van Lier 등의. Eur. J. Immunol. 18 : 811 816 (1988) 문헌참조].

항원 제시 세포와 CD27 양성 T 세포의 결합을 방해하는 능력, 또는 림프구 세포이외의 표면상에서 그러한 결합이 일어나게 하는 능력은 진단과 치료에 있어 유용할 수 있다. 예를 들어, CD27 의 융합 단백질과 기질에 고정된 수용체리간드는 체액내의 특정 항원의 존재를 감지하는데 유용할 것이다. 가용성 CD27 융합 단백질은 예를들어 특정한 자가면역 질병에서 원하지 않는 T 세포 증식을 막는데 유용할 것이다.

[실시예 5]

[CD53 항원을 암호화하는 cDNA의 분리 및 분자 클로닝]

항체 MEM-53[Hadam, M.R. 의 (1989) Leucocyte Typing IV. Knapp. B. 등(eds.) Oxford Univ. Press. p. 674참조], HD77, HI 29 및 HI 36 및 63-5A3에 의해 인식된 항원인 CD53은 극히 제한적이긴 하지만 조혈생성 계통의 핵 세포들 중에서 광범위하게 분포된 당단백질이다[Stevanova, I. 등의(1989) Leucocyte Typing IV. Knapp. B. 등(eds.) Ocford Univ, Press, p. 678 참조]. CD53은 단구와 대식세포, 과립구,

수지상 돌기세포, 파골 세포와 조골 세포 및 분화의 모든 단계에 있는 T 및 B세포에 의해 형질발현된다.

CD53을 암호화하는 cDNA 클론을 수득하기 위해, 말초 혈액 림프구로부터 cDNA 라이브러리를 구성하고 전골수구 종양 세포 주 HL 60을 상기문헌에 기술되어 있는 바와 같은 DEAE-덱스트란 방법에 의해 COS세포에 형질감염시켰다. 감염후 48 시간만에 그 세포를 한데모으고, 모노클로날 항체 MEM-53과 함께 항온하여 Seed 및 Aruffo의 Proc. Natl. Acad. S챠. USA 84 : 3365-3369(1987)문헌에 기술되어 있는 바와 같이 패닝하였다. 구형질융합 이후에 후속적으로 2회 강화시킨 다음, 하나의 군체분리체로부터 회수한 플라즈미드 DNA를 COS세포에 형질감염시키고 면역형광에 의해 CD53의 형질발현 정도를 기록하였다.

여덟 개의 형질감염물 중 두 개는 양성인데, 그 각각은 약 1.5kb의 삽입물을 가지고 있다. 그중 하나의 클론으로 형질감염시킨 COS세포를 각각의 항체 MEM-53, HI 29, HI 36 및 63-5A3와 반응시켰다.

비교를 목적으로 말초 혈액 림프구와 형질감염된 COS세포로부터 CD53를 분리하기위해, 그 림프구와 형질감염된 COS세포는 락토퍼옥시다제 및 HO를 이용하여 125로 표면 표지하고, 1% NP40, 150mM 염화나트륨, 5mM 염화마그네슘, 5mM염화칼륨, 둘째mM 요오드아세트아미드 및 1mM 페닐메틸 술포닐 플루오라이드를 함유하는 pH 8.0, 50mM 트리스-염산의 용해 완충액에 용해시킨다. 그 세포를 용해 완충액에서 2.5 x10tpvh/㎖의 농도로 45분간 가용화한 다음 12,000g에서 원심분리한다. 염소의 항-마우스 면역글로볼린 구슨(미국 펜실바니아 멜번에 소재하는 카펠에서 구입)로 안정성을 미리 확인한 후, 면역침전은 Schneider 등[J. Biol. Chem. 257 : 10766(1982) 문헌]에 의해 기술된 바와 같이 모노클로날 항체MEM 53 또는 63-5A3과 단백질 A-세파로스-CL-4B(미국 미주리 세인트루이스에 소재하는 시그마에서 구입)를 가지고 실시하였다. 면역침전물은 SDS 표본 완충액내에서 용리되고 도데실황산 나트륨을 함유하는 12.5%의 아크릴아미드 겔 상에서 분석 하였다.

34kd 내지 42kd의 질량 범위에 있는 방사성 요오드화된 단백질의 넓은 밴드는 MEM-53 또는 63-5A3 모노클로날 항체와 함께 말초 혈액 림프구로부터 수득되며, 36kd 내지 46kd에 연장되어 있는 CD53에 의해 형질감염된 COS세포로부터 수득한 밴드와 비교할 만하다. 형질감염된 COS세포로부터 회수한 세포 표면 단백질은 보통 cDNA 클론이 기원된 세포상에서 발견되는 분자량보다 낮거나 같은 분자량을 보이기 때문에 전형적이지 못하다[Aruffo 및 Seed의 Proc. Natl. Acad. S챠. USA 84 : 3365-3369(1987) 문헌 참조]. 약 15kd의 집단은 엔도글리코시다제 F(N-글리카나제)로 절단하면 당단백질로부터 방출되는 반면에 뉴라미나다제 및 O-글리카자네로 처리하면 겉보기 분자량에 영향을 미치지 않는다[Hadam, M.R, (1989) Leucocyte Typing IV. Knapp, B.등(eds.) Oxford Univ. Press, p. 674 ; Stevanova등의 Leucocyte Typing IV. Knapp, B. 등(eds). Oxford Univ. Press, p. 678 문헌참조] 글리코실화되지 않은 전구체인 20kd의 부가적인 흐릿한 밴드는 형질감염된 COS 세포의 면역침전물에서 감지되지만, 말초 혈액 림프구의 면역침전물에는 존재하지 않았다.

몇몇 효소로 절단한 T 세포주 PEER로부터의 게놈 DNA의 블로트 혼성화는 하나의 복제 유전자와 일치하는 유형을 밝혀내었다. RNA 블로트 분석은 B, T 및 골수 세포주와 말초 혈액 림프구로부터 유도된 1.8kb의 하나의 mRNA를 밝혀내었다. 형질발현 수준은 CD53 mRNA를 거의 갖지 않은 THP1 세포주를 제외한 다음 세포주에서 비교할만하다. CD53 전사물이 배양 세포주에서 보다는 말초 혈액 림프구에서 더욱 풍부한데, 이것은 이들 세포증에서 CD53 의 더 높은 표면형질발현과 일치한다.

CD53 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 상기문헌에 기술된 바와 같은 디데옥시뉴클레오티드 사슬 종결에 의해 결정하였다. CD53 삽입물의 서열은 1452개의 뉴클레오티드로 구성되어 있고(표 4), 두 개의 중첩하는 AATAAA 모티프(단일선으로 나타나 있다)에 근접하여 종결한다. 3'의 비암호화 서열은 ATTTA서열의 세가지 예를 포함하는데(인용 부호로 나타나 있다), 그것은 mRNA의 불안정성을 나타내는 것이다 [Shaw 및 Kamen의 Cell 46 : 659(1986) 문헌참조]. 잔기 74에서 시작하는 전사 해독프레임은 24,340kd 의 예상 분자량을 가진 219 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화한다. 예상된 폴리펩티드는 구이 네 개의 주된 소수성 단편(이중선으로 나타나 있다)을 가지고 있으며, 이들 중 세 개는 그 분자의 아미노 말단 가까이에 근접하게 된다는 점에서 이례적이다. 첫 번째 소수성 단편은 시그널 서열 또는 단순한 트랜스막 알파 나선에 대해 비전형적으로 길고, 중간에 위치한 세 개의 시스테인 잔기와 글리신을 포함한다. 시스테인과 글리신은 시그널 절단 부위 바로 앞에 위치하는 것으로 밝혀졌는데 [Heijne 의 Nucleic Acids Res. 14 : 4683(1986) 문헌 참조], 이것은 성국 단백질의 아미노 말단이 첫 번째 소수성 도메인 중간에서 시작된다는 것을 시사하는 것이다. 이러한 견해를 지지하는 것은, 아래에서 논의된 관련 유형 III의 막 통합 단백질인 ME491의 폴리펩티드 골격의 크기가 시그널 펩티드를 절단한 결과로서 cDNA 염기서열로부터 예상된 크기보다 더 작다는 사실을 발견함으로써 제공된다. 세 번째와 네 번째의 소수성 단편 사이에 위치한, N-결합 글리칸을 첨가하기 위한 두 개의 유력한 부위만이 있기 때문에, 그 카르복시 말단은 두 번째와 세 번째의 소수성 단편 사이에 있는 짧은 친수성 부분이외에 그 세포 내부에 놓여 있어야 한다. 만일 그 아미노말단이 가공되지 않는다면, 그 역시 세포내에 남아 있어야 한다.

CD53은 다음과 같은 세 개의 다른 막 단백질과 관련된 유형 III의 막 통합 단백질이다 : 종양의 진행과 깊은 관련이 있으며, 형질발현이 증가된 흑색종 단백질인 ME491 항원[Hotta 등의, Cancer Res. 48 : 2955(1988) 문헌참조]; B세포 결합에 특이적이진 않지만 주로 B 세포상에서 형질 발현되고 광범위하게 글리코실화된 항원인 CD37[Schwartz등 J. Immun, 140 : 905 (1988) 참조] ; 및 조혈 결합의 세포상에서 폭넓게 형질발현된 글리코실화되지 않은 항원인 S5.7[Pressano 등 Cancer Res. 43 : 4812(1983) 문헌참조]. 또한, CD53은 락토오스가 박테리아 세포에 운반하는 유형 III 의 막 통합 단백질인 E. coli lac Y 퍼미아제와 간접적으로 관련이 있다. 말초 혈액 림프구내의 CD53 전사물은 PHA에 의한 유사분열 자극후 보급면에서 증가하는데, 이것은 그 단백질이 세포 증식을 위해 필수적인 인자를 수송하는 것과 관련이 있음을 제시해주는 것이다.

조혈계내에서 광범위한 반응성을 갖는 분자들 중 CD53은 현재 조혈 세포에 대해 가장 엄밀한 제한을 할 뿐만 아니라 가장 광범위한 반응성을 지닌다. 항-CD53 항체는 조혈 신생물을 확인하는 유용한 도구이며 예를들어, 비장 또는 골수의 일차 배양물에서와 같은 형태학적으로 불완전하게 한정된 세포를 확인하는데 도움을 줄 수 있다.

[표 4]

```
1     CTCAAGGATA ATCACTAAAT TCTGCCGAAA GGACTGAGGA ACGGTGCCTG GAAAAGGGCA AGAATATCAC GGCATGGGCA
                                                                                   M  G  M

81    TGAGTAGCTT GAAACTGCTG AAGTATGTCC TGTTTTTCTT CAACTTGCTC TTTTGGATCT GTGGCTGCTG CATTTTGGGC
       S  S  L   K  L  L   K  Y  V  L   F  F  F   N  L  L   F  W  I  C   G  C  C   I  L  G
      ||            ====== ========== ========== ========== ========== ========== ==========

161   TTTGGGATCT ACCTGCTGAT CCACAACAAC TTCGGAGTGC TCTTCCATAA CCTCCCCTCC CTCACGCTGG GCAATGTGTT
      F  G  I  Y   L  L  I   H  N  N   F  G  V  L   F  H  N   L  P  S   L  T  L  G   N  V  F
      ========== ==========                                                            =====

241   TGTCATCGTG GGCTCTATTA TCATGGTAGT TGCCTTCCTG GGCTGCATGG GCTCTATCAA GGAAAACAAG TGTCTGCTTA
       V  I  V   G  S  I  I   M  V  V   A  F  L   G  C  M  G   S  I  K   E  N  K   C  L  L  M
      ========== ========== ========== ========== ========== =======                 =======

321   TGTCGTTCTT CATCCTGCTG CTGATTATCC TCCTTGCTGA GGTGACCTTG GCCATCCTGC TCTTTGTATA TGAACAGAAG
       S  F  F   I  L  L   L  I  I  L   L  A  E   V  T  L   A  I  L  L   F  V  Y   E  Q  K
      ========== ========== ========== ========== ========== ========== ==========

401   CTGAATGAGT ATGTGGCTAA GGGTCTGACC GACAGCATCC ACCGTTACCA CTCAGACAAT AGCACCAAGG CAGCGTGGGA
      L  N  E  Y   V  A  K   G  L  T   D  S  I  H   R  Y  H   S  D  N   S  T  K  A   A  W  D

                                                  --C HO--
481   CTCCATCCAG TCATTTCTGC AGTGTTGTGG TATAAATGGC ACGAGTGATT GGACCAGTGG CCCACCAGCA TCTTGCCCCT
       S  I  Q   S  F  L  Q   C  C  G   I  N  G   T  S  D  W   T  S  G   P  P  A   S  C  P  S

                     --CHO- -
561   CAGATCGAAA AGTGGAGGGT TGCTATGCGA AAGCAAGACT GTGGTTTCAT TCCAATTTCC TGTATATCGG AATCATCACC
        D  R  K   V  E  G   C  Y  A  K   A  R  L   W  F  H   S  N  F  L   Y  I  G   I  I  T
                                                                  ==== ========== ==========

641   ATCTGTGTAT GTGTGATTGA GGTGTTGGGG ATGTCCTTTG CACTGACCCT GAACTGCCAG ATTGACAAAA CCAGCCAGAC
      I  C  V  C   V  I  E   V  L  G   M  S  F  A   L  T  L   N  C  Q   I  D  K  T   S  Q  T
      ========== ========== ========== ========== ==========

721   CATAGGGCTA TGATCTGCAG TAGTTCTGTG GTGAAGAGAC TTGTTTCATC TCCGGAAATG CAAAACCATT TATAGCATGA
       I  G  L   *                                                          """" ""

801   AGCCCTACAT GATCACTGCA GGATGATCCT CCTCCCATCC TTTCCCTTTT TAGGTCCCTG TCTTATACAA CCAGAGAAGT

881   GGGTGTTGGC CAGGCACATC CCATCTCAGG CAGCAAGACA ATCTTTCACT CACTGACGGC AGCAGCCATG TCTCTCAAAG

961   TGGTGAAACT AATATCTGAG CATCTTTTAG ACAAGAGAGG CAAAGACAAA CTGGATTTAA TGGCCCAACA TCAAAGGGTG
                                                                  """""
1041  AACCCAGGAT ATGAATTTTT GCATCTTCCC ATTGTCGAAT TAGTCTCCAG CCTCTAAATA ATGCCCAGTC TTCTCCCCAA

1121  AGTCAAGCAA GAGACTAGTT GAAGGGAGTT CTGGGGCCAG GCTCACTGGA CCATTGTCAC AACCCTCTGT TTCTCTTTGA

1201  CTAAGTGCCC TGGCTACAGG AATTACACAG TTCTCTTTCT CCAAAGGGCA AGATCTCATT TCAATTTCTT TATTAGAGGG

1281  CCTTATTGAT GTGTTCTAAG TCTTTCCAGA AAAAAACTAT CCAGTGATTT ATATCCTGAT TTCAACCAGT CACTTAGCTG
                                                        """" "

1361  ATAATCACAG TAAGAAGACT TCTGGTATTA TCTCTCTATC AGATAAGATT TTGTTAATGT ACTATTTTAC TCTTCAATAA
                                                                                      -----

1441  ATAAAACAGT TT    1452
```

[상당물]

본 기술분야의 숙련자는 본원에서 언급된 본 발명의 특이 형태에 대한 많은 상당물을 일상의 실험만을 이용하여 인식하거나 평가할 수 있을 것이다. 그러한 상당물을 본 발명의 범위내에 포함하고자 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

표 4에 제시된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 CD53세포 표면 항원을 암호화하는 재조합 DNA.

청구항 2

표 4 에 제시된 아미노산 서열을 갖는 실질적으로 순수한 CD53 단백질.

도면

도면1a

```
   1  GGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
  51  TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GAACTGGCTT
 101  CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
 151  GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA
 201  ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG
 251  GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA
 301  CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA
 351  CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG
 401  GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC
 451  GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC
 501  GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG
 551  GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCCGAATTA CCGCGGTCTT
 601  TCTCAACGTA ACACTTTACA GCGGCGCGTC ATTTGATATG ATGCGCCCCG
 651  CTTCCCGATA AGGGAGCAGG CCAGTAAAAG CATTACCCGT GGTGGGGTTC
 701  CCGAGCGGCC AAAGGGAGCA GACTCTAAAT CTGCCGTCAT CGACTTCGAA
 751  GGTTCGAATC CTTCCCCCAC CACCATCACT TTCAAAAGTC CGAAAGAATC
 801  TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG GAGGTCGCTG AGTAGTGCGC GAGTAAAATT
 851  TAAGCTACAA CAAGGCAAGG CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT
 901  TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC TGCTTCGCGA TGTACGGGCC AGATATACGC
 951  GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA
1001  TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC TTACGGTAAA
1051  TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA
1101  TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA
1151  TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA
1201  TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG
1251  CCTGGCATTA TGCCCAGTAC ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG
1301  TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC GGTTTTGGCA
1351  GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC
1401  TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG
1451  GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG
1501  AATTCCTGGG CGGGACTGGG GAGTGGCGAG CCCTCAGATG CTGCATATAA
1551  GCAGCTGCTT TTTGCCTGTA CTGGGTCTCT CTGGTTAGAC CAGATCTGAG
1601  CCTGGGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAA GCCTCAATAA
1651  AGCTTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGAGGGA TCTTCCATAC CTACCAGTTC
```

도면1b

```
1701  TGCGCCTGCA GGTCGCGGCC GCGACTCTAG AGGATCTTTG TGAAGGAACC
1751  TTACTTCTGT GGTGTGACAT AATTGGACAA ACTACCTACA GAGATTTAAA
1801  GCTCTAAGGT AAATATAAAA TTTTTAAGTG TATAATGTGT TAAACTACTG
1851  ATTCTAATTG TTTGTGTATT TTAGATTCCA ACCTATGGAA CTGATGAATG
1901  GGAGCAGTGG TGGAATGCCT TTAATGAGGA AAACCTGTTT TGCTCAGAAG
1951  AAATGCCATC TAGTGATGAT GAGGCTACTG CTGACTCTCA ACATTCTACT
2001  CCTCCAAAAA AGAAGAGAAA GGTAGAAGAC CCCAAGGACT TTCCTTCAGA
2051  ATTGCTAAGT TTTTTGAGTC ATGCTGTGTT TAGTAATAGA ACTCTTGCTT
2101  GCTTTGCTAT TTACACCACA AAGGAAAAAG CTGCACTGCT ATACAAGAAA
2151  ATTATGGAAA AATATTCTGT AACCTTTATA AGTAGGCATA ACAGTTATAA
2201  TCATAACATA CTGTTTTTTC TTACTCCACA CAGGCATAGA GTGTCTGCTA
2251  TTAATAACTA TGCTCAAAAA TTGTGTACCT TTAGCTTTTT AATTTGTAAA
2301  GGGGTTAATA AGGAATATTT GATGTATAGT GCCTTGACTA GAGATCATAA
2351  TCAGCCATAC CACATTTGTA GAGGTTTTAC TTGCTTTAAA AAACCTCCCA
2401  CACCTCCCCC TGAACCTGAA ACATAAAATG AATGCAATTG TTGTTGTTAA
2451  CTTGTTTATT GCAGCTTATA ATGGTTACAA ATAAAGCAAT AGCATCACAA
2501  ATTTCACAAA TAAAGCATTT TTTTCACTGC ATTCTAGTTG TGGTTTGTCC
2551  AAACTCATCA ATGTATCTTA TCATGTCTGG ATCCTGTGGA ATGTGTGTCA
2601  GTTAGGGTGT GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA
2651  GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCAGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC
2701  CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAT
2751  AGTCCCGCCC CTAACTCCGC CCATCCCGCC CCTAACTCCG CCCAGTTCCG
2801  CCCATTCTCC GCCCCATGGC TGACTAATTT TTTTTATTTA TGCAGAGGCC
2851  GAGGCCGCCT CGGCCTCTGA GCTATTCCAG AAGTAGTGAG GAGGCTTTTT
2901  TGGAGGCCTA GGCTTTTGCA AAAAGCTAAT TC
```

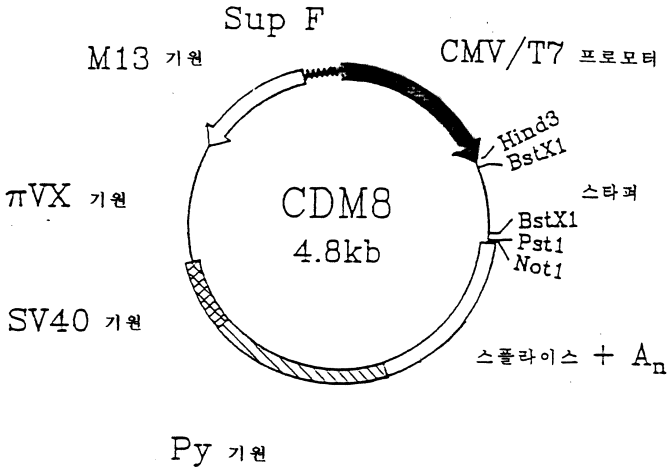
도면2a

```
      CCTAAGATGAGCTTTCCATGTAAATTTGTAGCCAGCTTCCTTCTGATTTTCAATGTTTCT   (60)
            METSERPHEPROCYSLYSPHEVALALASERPHELEULEUILEPHEASNVALSER

      TCCAAAGGTGCAGTCTCCAAAGAGATTACGAATGCCTTGGAAACCTGGGGTGCCTTGGGT  (120)
      SERLYSGLYALAVALSERLYSGLUILETHRASNALALEUGLUTHRTRPGLYALALEUGLY
            1
      CAGGACATCAACTTGGACATTCCTAGTTTTCAAATGAGTGATGATATTGACGATATAAAA  (180)
20    GLNASPILEASNLEUASPILEPROSERPHEGLNMETSERASPASPILEASPASPILELYS

      TGGGAAAAAACTTCAGACAAGAAAAAGATTGCACAATTCAGAAAAGAGAAAGAGACTTTC  (240)
40    TRPGLULYSTHRSERASPLYSLYSLYSILEALAGLNPHEARGLYSGLULYSGLUTHRPHE

      AAGGAAAAAGATACATATAAGCTATTTAAAAATGGAACTCTGAAAATTAAGCATCTGAAG  (300)
60    LYSGLULYSASPTHRTYRLYSLEUPHELYSASNGLYTHRLEULYSILELYSHISLEULYS
                                    ---CHO---
      ACCGATGATCAGGATATCTACAAGGTATCAATATATGATACAAAAGGAAAAAATGTGTTG  (360)
80    THRASPASPGLNASPILETYRLYSVALSERILETYRASPTHRLYSGLYLYSASNVALLEU

      GAAAAAATATTTGATTTGAAGATTCAAGAGAGGGTCTCAAAACCAAAGATCTCCTGGACT  (420)
100   GLULYSILEPHEASPLEULYSILEGLNGLUARGVALSERLYSPROLYSILESERTRPTHR

      TGTATCAACACAACCCTGACCTGTGAGGTAATGAATGGAACTGACCCCGAATTAAACCTG  (480)
120   CYSILEASNTHRTHRLEUTHRCYSGLUVALMETASNGLYTHRASPPROGLULEUASNLEU
            ---CHO---                 ---CHO---
      TATCAAGATGGGAAACATCTAAAACTTTCTCAGAGGGTCATCACACACAAGTGGACCACC  (540)
140   TYRGLNASPGLYLYSHISLEULYSLEUSERGLNARGVALILETHRHISLYSTRPTHRTHR

      AGCCTGAGTGCAAAATTCAAGTGCACAGCAGGGAACAAAGTCAGCAAGGAATCCAGTGTC  (600)
160   SERLEUSERALALYSPHELYSCYSTHRALAGLYASNLYSVALSERLYSGLUSERSERVAL

      GAGCCTGTCAGCTGTCCAGAGAAAGGTCTGGACATCTATCTCATCATTGGCATATGTGGA  (660)
180   GLUPROVALSERCYSPROGLULYSGLYLEUASPILETYRLEUILEILEGLYILECYSGLY
                                    ------------------------
      GGAGGCAGCCTCTTGATGGTCTTTGTGGCACTGCTCGTTTTCTATATCACCAAAAGGAAA  (720)
200   GLYGLYSERLEULEUMETVALPHEVALALALEULEUVALPHETYRILETHRLYSARGLYS
      ----------TM-------------------------------------
      AAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGGAGCTGGAGACAAGAGCCCACAGAGTAGCTACT  (780)
220   LYSGLNARGSERARGARGASNASPGLUGLULEUGLUTHRARGALAHISARGVALALATHR

      GAAGAAAGGGGCCGGAAGCCCCAACAAATTCCAGCTTCAACCCCTCAGAATCCAGCAACT  (840)
240   GLUGLUARGGLYARGLYSPROGLNGLNILEPROALASERTHRPROGLNASNPROALATHR

      TCCCAACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATCGTTCCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCG  (900)
260   SERGLNHISPROPROPROPROPROGLYHISARGSERGLNALAPROSERHISARGPROPRO

      CCTCCTGGACACCGTGTTCAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCGGGCACA  (960)
280   PROPROGLYHISARGVALGLNHISGLNPROGLNLYSARGPROPROALAPROSERGLYTHR
```

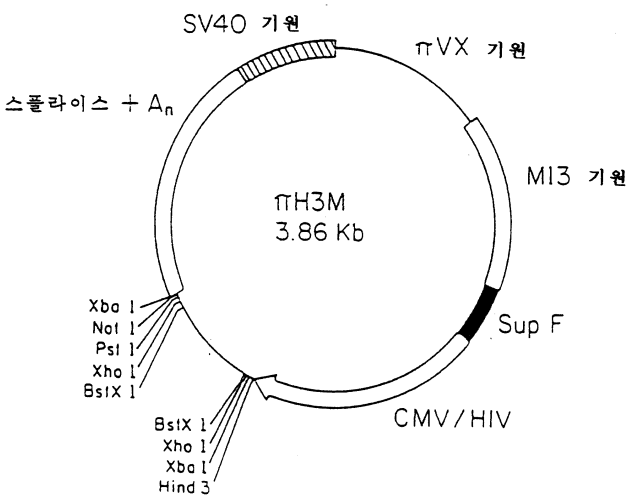
도면2b

```
                CAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCCCCTCCCCAGACCTCGAGTTCAGCCAAAACCTCCC   (1020)
300             GLNVALHISGLNGLNLYSGLYPROPROLEUPROARGPROARGVALGLNPROLYSPROPRO
                CATGGGGCAGCAGAAAACTCATTGTCCCCTTCCTCTAATTAAAAAAGATAGAAACTGTCT   (1080)
320             HISGLYALAALAGLUASNSERLEUSERPROSERSERASNEND
                TTTTCAATAAAAAGCACTGTGGATTTCTGCCCTCCTGATGTGCATATCCGTACTTCCATG   (1140)
                AGGTGTTTTCTGTGTGCAGAACATTGTCACCTCCTGAGGCTGTGGGCCACAGCCACCTCT   (1200)
                GCATCTTCGAACTCAGCCATGTGGTCAACATCTGGAGTTTTTGGTCTCCTCAGAGAGCTC   (1260)
                CATCACACCAGTAAGGAGAAGCAATATAAGTGTGATTGCAAGAATGGTAGAGGACCGAGC   (1320)
                ACAGAAATCTTAGAGATTTCTTGTCCCCTCTCAGGTCATGTGTAGATGCGATAAATCAAG   (1380)
                TGATTGGTGTGCCTGGGTCTCACTACAAGCAGCCTATCTGCTTAAGAGACTCTGGAGTTT   (1440)
                CTTATGTGCCCTGGTGGACACTTGCCCACCATCCTGTGAGTAAAAGTGAAATAAAAGCTT   (1500)
                TGAC  (1504)
```

도면3



도면4



도면5a

```
   1  GGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
  51  TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT
 101  TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA
 151  GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC TCGCTCTGCT
 201  AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
 251  GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA
 301  ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA
 351  ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG
 401  GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG
 451  CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT ATAGTCCTGT
 501  CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG
 551  GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCAAGCTA GCTTCTAGCT
 601  AGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT
 651  AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT
 701  AAATCAAAAG AATAGCCCGA GATAGGGTTG AGTGTTGTTC CAGTTTGGAA
 751  CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA
 801  CCGTCTATCA GGGCGATGGC CGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCAAATCA
 851  AGTTTTTTGG GGTCGAGGTG CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG
 901  GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA
 951  AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA
1001  GCGGTCACGC TGCGCGTAAC CACCACACCC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT
1051  ACAGGGCGCG TACTATGGTT GCTTTGACGA GCACGTATAA CGTGCTTTCC
```

도면5b

```
1101  TCGTTGGAAT CAGAGCGGGA GCTAAACAGG AGGCCGATTA AAGGGATTTT
1151  AGACAGGAAC GGTACGCCAG CTGGATCACC GCGGTCTTTC TCAACGTAAC
1201  ACTTTACAGC GGCGCGTCAT TTGATATGAT GCGCCCCGCT TCCCGATAAG
1251  GGAGCAGGCC AGTAAAAGCA TTACCCGTGG TGGGGTTCCC GAGCGGCCAA
1301  AGGGAGCAGA CTCTAAATCT GCCGTCATCG ACTTCGAAGG TTCGAATCCT
1351  TCCCCCACCA CCATCACTTT CAAAAGTCCG AAAGAATCTG CTCCCTGCTT
1401  GTGTGTTGGA GGTCGCTGAG TAGTGCGCGA GTAAAATTTA AGCTACAACA
1451  AGGCAAGGCT TGACCGACAA TTGCATGAAG AATCTGCTTA GGGTTAGGCG
1501  TTTTGCGCTG CTTCGCGATG TACGGGCCAG ATATACGCGT TGACATTGAT
1551  TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC
1601  CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTGG
1651  CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC GTCAATAATG ACGTATGTTC
1701  CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT GACGTCAATG GGTGGACTAT
1751  TTACGGTAAA CTGCCCACTT GGCAGTACAT CAAGTGTATC ATATGCCAAG
1801  TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCATTATG
1851  CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
1901  TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACATCAATGG
1951  GCGTGGATAG CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG
2001  ACGTCAATGG GAGTTTGTTT TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA
2051  TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA ATGGGCGGAA TTCCTGGGCG
2101  GGACTGGGGA GTGGCGAGCC CTCAGATGCT GCATATAAGC AGCTGCTTTT
2151  TGCCTGTACT GGGTCTCTCT GGTTAGACCA GATCTGAGCC TGGGAGCTCT
2201  CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTAAGC CTCAATAAAG CTTCTAGAGA
2251  TCCCTCGACC TCGAGATCCA TTGTGCTGGC GCGGATTCTT TATCACTGAT
```

도면5c

2301 AAGTTGGTGG ACATATTATG TTTATCAGTG ATAAAGTGTC AAGCATGACA
2351 AAGTTGCAGC CGAATACAGT GATCCGTGCC GCCCTAGACC TGTTGAACGA
2401 GGTCGGCGTA GACGGTCTGA CGACACGCAA ACTGGCGGAA CGGTTGGGGG
2451 TTCAGCAGCC GGCGCTTTAC TGGCACTTCA GGAACAAGCG GGCGCTGCTC
2501 GACGCACTGG CCGAAGCCAT GCTGGCGGAG AATCATAGCA CTTCGGTGCC
2551 GAGAGCCGAC GACGACTGGC GCTCATTTCT GACTGGGAAT GCCCGCAGCT
2601 TCAGGCAGGC GCTGCTCGCC TACCGCCAGC ACAATGGATC TCGAGGGATC
2651 TTCCATACCT ACCAGTTCTG CGCCTGCAGG TCGCGGCCGC GACTCTAGAG
2701 GATCTTTGTG AAGGAACCTT ACTTCTGTGG TGTGACATAA TTGGACAAAC
2751 TACCTACAGA GATTTAAAGC TCTAAGGTAA ATATAAAATT TTTAAGTGTA
2801 TAATGTGTTA AACTACTGAT TCTAATTGTT TGTGTATTTT AGATTCCAAC
2851 CTATGGAACT GATGAATGGG AGCAGTGGTG GAATGCCTTT AATGAGGAAA
2901 ACCTGTTTTG CTCAGAAGAA ATGCCATCTA GTGATGATGA GGCTACTGCT
2951 GACTCTCAAC ATTCTACTCC TCCAAAAAAG AAGAGAAAGG TAGAAGACCC
3001 CAAGGACTTT CCTTCAGAAT TGCTAAGTTT TTTGAGTCAT GCTGTGTTTA
3051 GTAATAGAAC TCTTGCTTGC TTTGCTATTT ACACCACAAA GGAAAAAGCT
3101 GCACTGCTAT ACAAGAAAAT TATGGAAAAA TATTCTGTAA CCTTTATAAG
3151 TAGGCATAAC AGTTATAATC ATAACATACT GTTTTTTCTT ACTCCACACA
3201 GGCATAGAGT GTCTGCTATT AATAACTATG CTCAAAAATT GTGTACCTTT
3251 AGCTTTTTAA TTTGTAAAGG GGTTAATAAG GAATATTTGA TGTATAGTGC
3301 CTTGACTAGA GATCATAATC AGCCATACCA CATTTGTAGA GGTTTTACTT
3351 GCTTTAAAAA ACCTCCCACA CCTCCCCCTG AACCTGAAAC ATAAAATGAA
3401 TGCAATTGTT GTTGTTAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT
3451 AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT

도면5d

3501 TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGGAT
3551 CCTGTGGAAT GTGTGTCAGT TAGGGTGTGG AAAGTCCCCA GGCTCCCCAG
3601 CAGGCAGAAG TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT
3651 GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA GCATGCATCT
3701 CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC ATCCCGCCCC
3751 TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT
3801 TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC TATTCCAGAA
3851 GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA AAGCTAATTC

도면6

```
   1  GCCTCGCTCG GGCGCCCAGT GGTCCTGCCG CCTGGTCTCA CCTCGCCATG
  51  GTTCGTCTGC CTCTGCAGTG CGTCCTCTGG GGCTGCTTGC TGACCGCTGT
 101  CCATCCAGAA CCACCCACTG CATGCAGAGA AAAACAGTAC CTAATAAACA
 151  GTCAGTGCTG TTCTTTGTGC CAGCCAGGAC AGAAACTGGT GAGTGACTGC
 201  ACAGAGTTCA CTGAAACGGA ATGCCTTCCT TGCGGTGAAA GCGAATTCCT
 251  AGACACCTGG AACAGAGAGA CACACTGCCA CCAGCACAAA TACTGCGACC
 301  CCAACCTAGG GCTTCGGGTC CAGCAGAAGG GCACCTCAGA AACAGACACC
 351  ATCTGCACCT GTGAAGAAGG CTGGCACTGT ACGAGTGAGG CCTGTGAGAG
 401  CTGTGTCCTG CACCGCTCAT GCTCGCCCGG CTTTGGGGTC AAGCAGATTG
 451  CTACAGGGGT TTCTGATACC ATCTGCGAGC CCTGCCCAGT CGGCTTCTTC
 501  TCCAATGTGT CATCTGCTTT CGAAAAATGT CACCCTTGGA CAAGCTGTGA
 551  GACCAAAGAC CTGGTTGTGC AACAGGCAGGC ACAAACAAGA CTGATGTTGT
 601  CTGTGGTCCC CAGGATCGGC TGAGAGCCCT GGTGGTGATC CCCATCATCT
 651  TCGGGATCCT GTTTGCCATC CTCTTGGTGC TGGTCTTTAT CAAAAAGGTG
 701  GCCAAGAAGC CAACCAATAA GGCCCCCCAC CCCAAGCAGG AACCCCAGGA
 751  GATCAATTTT CCCGACGATC TTCCTGGCTC CAACACTGCT GCTCCAGTGC
 801  AGGAGACTTT ACATGGATGC CAACCGGTCA CCCAGGAGGA TGGCAAAGAG
 851  AGTCGCATCT CAGTGCAGGA GAGACAGTGA GGCTGCACCC ACCCAGGAGT
 901  GTGGCCACGT GGGCAAACAG GCAGTTGGCC AGAGAGCCTG GTGCTGCTGC
 951  TGCAGGGGTG CAGGCAGAAG CGGGGAGCTA TGCCCAGTCA GTGCCAGCCC
      CTC
```