(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/12

(45) 공고일자 2005년02월02일
(11) 등록번호 10-0468978
(24) 등록일자 2005년01월20일

(21) 출원번호	10-2001-7007461	(65) 공개번호	10-2001-0101224
(22) 출원일자	2001년06월15일	(43) 공개일자	2001년11월14일
번역문 제출일자	2001년06월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/028634	(87) 국제공개번호	WO 2000/36102
(86) 국제출원출원일자	1999년12월01일	(87) 국제공개일자	2000년06월22일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 그레나다, 크로아티아, 헝가리, 이스라엘, 인도네시아, 아이슬란드, 인도, 일본, 대한민국, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 라트비아, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 폴란드, 루마니아, 러시아, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 뉴질랜드, 아랍에미리트, 가나, 감비아, 짐바브웨, 수단, 스웨덴, 아르메니아, 오스트리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 스위스, 독일, 덴마크, 코스타리카, 스페인, 핀랜드, 케냐, 북한, 카자흐스탄, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 몰도바, 말라위, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 우간다, 미국, 도미니카연방, 남아프리카, 포르투칼, 키르기즈, 영국, 탄자니아, 모로코,

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장

60/112,851	1998년12월16일	미국(US)
60/113,145	1998년12월16일	미국(US)
60/113,511	1998년12월22일	미국(US)
60/115,565	1999년01월12일	미국(US)
60/115,558	1999년01월12일	미국(US)
60/115,733	1999년01월12일	미국(US)
60/119,341	1999년02월09일	미국(US)
60/119,537	1999년02월10일	미국(US)
60/119,965	1999년02월12일	미국(US)
PCT/US99/12252	1999년06월02일	미국(US)

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자
보츠타인,데이비드
미국94002캘리포니아주벨몬트서머셋드라이브2539

데스노이어스,루크
미국94133캘리포니아주샌프란시스코스탁턴스트리트2050

페라라,나폴레옹
미국94109캘리포니아주샌프란시스코퍼시픽애비뉴#7042090

퐁,셔만
미국94502캘리포니아주알라메다베이신사이드웨이19

가오,웨이-퀴앙
미국94404캘리포니아주포스터시티필그림드라이브641

고다드,오드리
미국94131캘리포니아주샌프란시스코콩고스트리트110

거니,오스틴,엘.
미국94002캘리포니아주벨몬트데비레인1

판,제임스
미국94002캘리포니아주벨몬트코로넷불바드2705

로이,마가렛,안
미국94123캘리포니아주샌프란시스코웹스터스트리트#42960

스튜워트,티모시,에이.
미국94114캘리포니아주샌프란시스코더글라스스트리트465

투마스,다니엘
미국94563캘리포니아주오린다래애비뉴3

와따나베,콜린,케이.
미국94556캘리포니아주모라가콜리스드라이브128

우드,윌리엄,아이.
미국94010캘리포니아주힐스버로우사우쓰다운코우트35

(74) 대리인 주성민
김영

심사관 : 조명선

(54) 분비 및 막횡단 폴리펩티드, 및 이를 코딩하는 핵산

요약

본 발명은 신규 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 또한, 본원에서는 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 이종 폴리펩티드 서열과 융합된 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드 분자, 본 발명의 폴리펩티드와 결합하는 항체 및 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공된다.

색인어

세포외 단백질, 분비 폴리펩티드.

명세서

기술분야

본 발명은 신규 DNA의 확인 및 단리, 및 이 DNA에 의해 코딩되는 신규 폴리펩티드의 재조합적 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

세포외 단백질은 무엇보다도 다세포 생물의 형성, 분화 및 유지에 있어 중요한 역할을 한다. 많은 개별 세포의 운명, 예를 들어 증식, 이동, 분화 또는 다른 세포와의 상호작용은 통상적으로 다른 세포 및(또는) 인접 환경으로부터 받은 정보에 의해 좌우된다. 흔히, 이러한 정보는 분비된 폴리펩티드(예를 들어, 유사분열촉진 인자, 생존 인자, 세포독성 인자, 분화 인자, 뉴로펩티드 및 호르몬)에 의해 전달되어, 다양한 세포 수용체 또는 막결합 단백질에 의해 수용되고 해독된다. 이들 분비 폴리펩티드 또는 신호전달 분자는 일반적으로 세포의 분비 경로를 통해 세포외 환경에 있는 그의 작용 부위에 도달하게 된다.
분비 단백질은 약제, 진단, 바이오센서 및 생물반응기를 비롯한 다양한 산업적 용도를 갖는다. 혈전용해제, 인터페론, 인터루킨, 에리트로포이에틴, 콜로니 촉진 인자 및 그밖의 다양한 사이토킨과 같이 현재 이용할 수 있는 대부분의 단백질 약물은 분비 단백질이다. 또한, 이들의 수용체인 막 단백질도 치료제 또는 진 단제로서의 가능성을 갖는다. 새로운 천연 분비 단백질을 찾아내려는 노력이 산업계와 학계 모두에 의해 이루어지고 있다. 이러한 노력의 많은 부분이 포유동물 재조합 DNA 라이브러리를 스크리닝하여 신규 분비 단백질의 코딩 서열을 찾아내는데 집중되어 있다. 스크리닝 방법 및 기술의 예는 문헌[예를 들어, 클라인(Klein) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. , 93:7108-7113 (1996)] 및 미국 특허 제5,536,637호]를 참조]에 기재되어 있다.
막결합 단백질 및 수용체는 무엇보다도 다세포 생물의 형성, 분화 및 유지에 있어 중요한 역할을 할 수 있다. 많은 개별 세포의 운명, 예를 들어 증식, 이동, 분화 또는 다른 세포와의 상호작용은 통상적으로 다른 세포 및(또는) 인접 환경으로부터 받은 정보에 의해 좌우된다. 흔히, 이러한 정보는 분비된 폴리펩티드(예를 들어, 유사분열촉진 인자, 생존 인자, 세포독성 인자, 분화 인자, 뉴로펩티드 및 호르몬)에 의해 전달되어, 다양한 세포 수용체 또는 막결합 단백질에 의해 수용되고 해독된다. 이러한 막결합 단백질 및 세포 수용체에는 사이토킨 수용체, 수용체 키나제, 수용체 포스파타제, 세포-세포 상호작용에 관여하는 수용체, 및 셀렉틴 및 인테그린과 같은 세포 어드헤신 분자가 포함되지만 이것으로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 세포 성장 및 분화를 조절하는 신호의 도입은 부분적으로 여러 세포 단백질의 인산화에 의해 조절된다. 이 과정을 촉진시키는 효소인 단백질 티로신 키나제는 성장인자 수용체로 작용할 수도 있다. 그 예에는 섬유아세포 성장인자 수용체 및 신경 성장인자 수용체가 포함된다.
막결합 단백질 및 수용체 분자는 약제 및 진단제를 비롯한 다양한 산업적 용 도를 갖는다. 예를 들어, 수용체 이뮤노어드헤신은 수용체-리간드 상호작용을 차단하는 치료제로 사용될 수 있다. 또한, 막결합 단백질은 관련된 수용체/리간드 상호작용에 대한 잠재적인 펩티드 또는 작은 분자 억제제를 스크리닝하는데 사용될 수도 있다.
신규 천연 수용체 또는 막결합 단백질을 찾아내려는 노력이 산업계와 학계 모두에 의해 이루어지고 있다. 이러한 노력의 많은 부분이 포유동물 재조합 DNA 라이브러리를 스크리닝하여 신규 수용체 또는 막결합 단백질의 코딩 서열을 찾아내는데 집중되어 있다.

1. PRO1800

Hep27 단백질은 부티레이트 처리에 의해 유도되는 성장 정지 후에 인간 간모세포종 세포(HepG2 세포)의 핵내에서 합성 및 축적된다[가브리엘리(Gabrielli) 등의 문헌[Eur. J. Biochem. 232:473-477 (1995)]]. 부티레이트에 의한 차단에서 벗어난 세포에서 Hep27의 합성은 억제되며, 이로서 DNA의 합성은 재개된다. Hep27 단백질 서열은 공지된 단쇄의 알콜 디히드로게나제(SCAD) 단백질 족과의 큰 상동성을 나타내며 이는 Hep27이 SCAD 단백질 족의 새로운 일원임을 시사한다. 핵내 배치에 따라, Hep27은 두부분으로 된 핵내 표적화 서열과 유사한 영역을 가지며, Hep27 mRNA의 발현 및 단백질 합성은 전사-후 수준에서의 조절이 있음을 시사한다.
본원에서 본 발명자들은 Hep27 단백질과 상동성이 있는 신규 폴리펩티드(본원에서 PRO1800 폴리펩티드로 명명)의 확인 및 특성화에 대해 설명하고 있다.

2. PRO539

다세포 생물의 성장은 적어도 부분적으로는 세포, 조직 또는 기관을 패턴화하는 위치 정보를 지정, 지시 또는 유지하는 메카니즘에 따라 달라진다. 변형 성장 인자-베타(TGF-β), Wnt, 섬유아세포 성장 인자 및 헤지호그(Hedgehog) 족의 요소와 같은 다양한 분비성 신호전달 분자는 초파리 및 척추동물에서 각종 세포 및 구조의 패턴화 활성과 관계가 있다[페리몬(Perrimon)의 문헌[Cell 80:517-520 (1995)]].
코스탈(Costal)-2는 헤지호그 신호전달 경로의 새로운 키네신계 단백질이다. 폭넓은 다양한 발달 단계에서 기능을 하는[페리몬(Perrimon)의 문헌[supra]] 헤지호그(*Hh*)는 유전자 스크리닝에 의해 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)의 세그먼트-폴라러티(segment-polarity) 유전자인 것으로 처음 확인되었다[누슬라인-폴하르트(Nusslein-Volhard) 등의 문헌[Roux.Arch.Dev.Biol. 193:267-282 (1984)]]. 초파리 *Hh* 유전자는 하나만이 확인되었지만, 포유동물의 *Hh* 상동체는 소닉(Sonic) *Hh* (*SHh*), 데저트(Desert) *Hh* (*DHh*) 및 인디안(*Indian*) *Hh* (*IHh*)의 세가지가 단리되었다[에첼라드(Echelard) 등의 문헌[Cell 75:1417-30 (1993)] 및 리들(Riddle) 등의 문헌[Cell 75:1401-16 (1993)]]. *SHh* 는 발달중인 척추동물의 배아의 척삭 및 저판에서 높은 수준으로 발현된다. 트랜스제닉 동물에서 시험관내 외식편 분석 및 *SHh* 의 변위(ectopic) 발현은 *SHh* 가 신경관의 패턴화에서 중심 역할을 한다는 것을 보여준다[에첼라드(Echelard) 등의 문헌[supra], 크라우스(Krauss) 등의 문헌[Cell 75, 1432-44 (1993)], 리들(Riddle) 등의 문헌[Cell 75:1401-16 (1993)], 로엘링크(Roelink) 등의 문헌[Cell 81:445-55 (1995)]].

트 랜스제닉 동물에서 시험관내 외식편 분석 및 SHh의 변위 발현은 SHh가 신경관 패턴화에서 중심 역할을 한다는 것을 나타낸다[에첼라드(Echelard) 등의 문헌[(1993), supra], 에릭슨(Ericson) 등의 문헌[Cell 81:747-56 (1995)], 마르티(Marti) 등의 문헌[Nature 375:322-5 (1995)], 로엘링크(Roelink) 등의 문헌[(1995), supra], 하인스(Hynes) 등의 문헌[Neuron 19:15-26 (1997)]]. 또한, *Hh* 는 사지의 발달[크라우스(Krauss) 등의 문헌[Cell 75, 1431-44 (1993)] 및 라우퍼(Laufer) 등의 문헌[Cell 79, 993-1003 (1994)]], 체절의 발달[판(Fan) 및 테시어-라비네(Tessier-Lavigne)의 문헌[Cell 79, 1175-86 (1994)] 및 존슨(Johnson) 등의 문헌[Cell 79:1165-73 (1994)]], 폐의 발달[벨루시(Bellusci) 등의 문헌[Develop. 124:53-63 (1997)]] 및 피부의 발달[오로(Oro) 등의 문헌[Science 276:817-21 (1997)]]에 있어서의 역할도 한다. 마찬가지로, *IHh* 및 *DHh* 는 뼈, 장 및 생식 세포의 발달에 관여한다[아펠크비스트(Apelqvist) 등의 문헌[Curr.Biol. 7:801-4 (1997)], 벨루시(Bellusci) 등의 문헌[Suppl. 124:53-63 (1997)], 비트굿(Bitgood) 등의 문헌[Curr.Biol. 6:298-304 (1996)] 및 로버츠(Roberts) 등의 문헌[Development 121:3163-74 (1995)]]. *SHh* 녹아웃 마우스는, *SHh* 가 척추동물의 발달의 많은 측면에 있어서 중요하다는 생각을 추가로 뒷받침한다[치앙(Chiang) 등의 문헌[Nature 383:407-13 (1996)]]. 이들 마우스는 척삭 및 저판과 같은 중심 구조물이 결손되어 있고, 신경관의 배쪽 세포 유형이 없고, 말단 사지 구조가 없으며, 단안증(cyclopia), 및 척주 및 늑골 대부분이 없는 것으로 나타났다.

세포 표면에서, Hh 신호는 패치화(*Ptch*) 12-막횡단 도메인 단백질[후퍼(Hooper) 및 스코트(Scott)의 문헌[Cell 59:751-65 (1989)] 및 나까노(Nakano) 등의 문헌[Nature 341:508-13 (1989)]] 및 활면(*Smo*) G-단백질 연결 유사 수용체[알세도(Alcedo) 등의 문헌[Cell 86:221-232 (1996)] 및 반 덴 휴벨(van den Heuvel) 및 잉검(Ingham)의 문헌[Nature 382:547-551 (1996)]]에 의해 전달되는 것으로 생각된다. 유전적 및 생화학적 증거는 모두, *Ptch* 및 *Smo* 가 다성분 수용체 복합체의 부분인 수용체 모델을 뒷받침한다[첸(Chen) 및 스트룰(Struhl)의 문헌[Cell 87:553-63 (1996)], 마리고(Marigo) 등의 문헌[Nature 384:176-9 (1996)] 및 스톤(Stone) 등의 문헌[Nature 384:129-34 (1996)]]. *Hh* 가 *Ptch* 와 결합한 다음, *Smo* 에 대한 *Ptch* 의 정상적인 억제 효과가 저감됨으로써, *Smo* 는 원형질막을 통하여 *Hh* 신호를 전달할 수 있게 된다. *Ptch* 유전자의 기능 상실 돌연변이는 다발성 기저세포암(BCC)을 특징으로 하는 유전 질환인 기저세포모반증후군(BCNS)에 걸린 환자에서 확인되었다. 또한, 기능장애성 *Ptch* 유전자 돌연변이는 대부분의 산발성 기저세포암종과 상관관계가 있다[키담바람(Chidambaram) 등의 문헌[Cancer Research 56:4599-601 (1996)], 가일라니(Gailani) 등의 문헌[Nature Genet. 14:78-81 (1996)], 한(Hahn) 등의 문헌[Cell 85:841-51 (1996)], 존슨(Johnson) 등의 문헌[Science 272:1668-71 (1996)], 언덴(Unden) 등의 문헌[Cancer Res. 56:4562-5] 및 비킹(Wicking) 등의 문헌[Am.J.Hum.Genet. 60:21-6 (1997)]]. *Ptch* 기능의 상실은 기저세포암에서 조절되지 않는 Smo 신호전달을 유발하는 것으로 생각된다. 마찬가지로, *Smo* 돌연변이를 활성화하는 것은 산발성 BCC 종양에서 확인되었으며[크시(Xie) 등의 문헌[Nature 391:90-2 (1998)]], 이는 *SHh* 에 대한 수용체 복합체에서 신호전달 서브유닛으로서의 *Smo* 의 역할을 강조한다. 그러나, *Ptch* 가 *Smo* 의 활성을 조절하는 정확한 메카니즘은 아직 밝혀지지 않고 있으며, *Hh* 신호가 수용체로부터 하류의 표적으로 전달되는 신호전달 메카니즘도 설명되지 않고 있다. 초파리에서 유전자의 상위(epistatic) 분석 결과, *Hh* 신호 전달 경로의 성분으로 작용하는 것으로 보이는 몇몇 세그먼트-폴라러티 유전자가 확인되었다[잉검(Ingham)의 문헌[Curr.Opin.Genet.Dev. 5:492-8 (1995)] 및 페리몬(Perrimon)의 문헌[supra]]. 이러한 유전자에는 키네신-유사 분자, 코스탈-2(*Cos* -2)[로빈스(Robbins) 등의 문헌[Cell 90:225-34 (1997)] 및 시손(Sisson) 등의 문헌[Cell 90:235-45 (1997)]], *fused* 로 명명된 단백질[프리트(Preat) 등의 문헌[Genetics 135:1047-62 (1990)], 테론드(Therond) 등의 문헌[Proc.Natl.Acad Sci. USA 93:4224-8 (1996)]], *Suppressor of fused* 로 명명된 기능이 알려지지 않은 새로운 분자[팜(Pham) 등의 문헌[Genetics 140:587-98 (1995)] 및 프리트(Preat)의 문헌[Genetics 132:725-36 (1996)]], 및 아연 핑거 단백질 *Ci.* [알렉산더(Alexandre) 등의 문헌[Genes Dev. 10:2003-13 (1996)], 도밍게쯔(Dominguez) 등의 문헌[Science 272:1621-5 (1996)] 및 오레닉(Orenic) 등의 문헌[Genes Dev. 4:1053-67 (1990)]]이 포함된다. *Hh* 신호전달에 관련된 다른 요소에는 전사 인자 CBP[아끼마루(Akimaru) 등의 문헌[Nature 386:735-738 (1997)]], 네가티브 조절자 *slimb* [지앙(Jiang) 및 스트룰(Struhl)의 문헌[Nature 391:493-496 (1998)]] 및 *SHh* 반응 요소 COUP-TFII[크리쉬난(Krishnan) 등의 문헌[Science 278:1947-1950 (1997)]]가 포함된다.

Cos-2 의 돌연변이체는 배아에 치명적이며, 각 세그먼트의 중심 요소의 중복 및 *Hh* 반응성 유전자의 확장 도메인을 비롯한 *Hh* 의 과다발현과 유사한 형질을 나타낸다. 대조적으로, fused 및 Ci에 대한 돌연변이체 배아는 각 세그먼트의 후부의 결실, 전부 또는 각 세그먼트의 거울상 중복의 대체, 및 전부의 거울상 중복의 대체를 비롯한 *Hh* 의 기능 상실과 유사한 형질을 나타낸다[부손(Busson) 등의 문헌[Roux.Arch.Dev.Biol. 197:221-230 (1998)]]. Ci의 분자적 특징은 그가 *Wingless* 및 *Dpp* 와 같은 *Hh* 반응성 유전자를 직접 활성화하는 전사 인자임을 시사한다[알렉산더(Alexandre) 등의 문헌[(1996) supra] 및 도밍게쯔(Dominguez) 등의 문헌[(1996) supra]]. 마찬가지로, *fused* 의 분자적 분석 결과, 그가 세린 트레오닌 키나제와 구조적으로 관련이 있으며 적절하게 기능하기 위해서는 무손상 N-말단 키나제 도메인 및 C-말단 조절 영역이 모두 필요한 것으로 밝혀졌다[프리트(Preat) 등의 문헌[Nature 347:87-9 (1990)], 로빈스(Robbins) 등의 문헌[(1997) supra], 테론드(Therond) 등의 문헌[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:4224-8 (1996)]]. Cos-2 및 *fused* 의 추정의 반대 기능과 일치하는 것으로, *fused* 돌연변이는 Cos-2 돌연변이체뿐 아니라 *Suppressor of fused* 돌연변이체에 의해서도 억제된다[프리트(Preat) 등의 문헌[Genetics 135:1047-62 (1993)]]. 그러나, *fused* 널(null) 돌연변이 및 N-말단 키나제 도메인 돌연변이는 *Suppressor of fused* 돌연변이에 의해서 완전히 억제될 수 있지만, fused의 C-말단 돌연변이는 *Suppressor of fused* 배경량에서 강력한 Cos-2 형질을 나타낸다. 이는, *Suppressor of fused* 가 존재하지 않는 경우에, 융합된 키나제 도메인이 *SHh* 신호전달의 구성적인 활성자로 작용할 수 있음을 시사한다. 최근의 연구 결과, 92 kDa의 초파리 *fused* , *Cos-2* 및 Ci가 미세소관 결합 다중단백질 복합체에 존재하며 Hh 신호전달이 이 복합체를 미세소관으로부터 분리시키는 것으로 밝혀졌다[로빈스(Ro

bbins) 등의 문헌[Cell 90:225-34 (1997)] 및 시손(Sisson) 등의 문헌[Cell 90:235-45 (1997)]]. *fused* 및 Cos-2는 둘다 *Hh* 처리에 반응하여 인산화되며[로빈스(Robbins) 등의 문헌[supra] 및 테론드(Therond) 등의 문헌[Genetics 142:1181-98 (1996)]], 이 활성을 일으키는 키나제는 특성화되었다. 최근까지, 이들 성분에 대해 유일하게 알려져 있는 척추동물의 상동체는 *Gli* 단백질 족의 요소들(예를 들어, *Gli-1* , *Gli-2* 및 *Gli-3*)이다. 이들은 *Ci* 와 구조적으로 관련이 있는 아연 핑거인 추정의 전사 인자이다. 이들 중에서, *Gli-1* 은 *SHh* 신호의 후보 매개자인 것으로 밝혀졌으며[하인스(Hynes) 등의 문헌[Neuron 15:35-44 (1995)], 리(Lee) 등의 문헌[Development 124:2537-52 (1997)] 및 알렉산더(Alexandre) 등의 문헌[Genes Dev. 10:2003-13 (1996)]], 이는 *Hh* 에 반응하는 유전자 활성의 메카니즘이 파리 및 척추동물사이에서 보존될 수 있음을 시사한다. *Hh* 캐스케이드내의 다른 신호전달 요소가 진화과정에서 보존되었는지를 결정하고, *Hh* 신호전달 캐스케이드에서 fused의 기능을 생화학적 수준에서 조사하기 위해, 본 발명자들은 인간 *fused* cDNA를 단리하여 특성화하였다. 마우스에서의 조직 분포는 fused가 *SHh* 반응성 조직에서 발현됨을 나타낸다. 생화학적 연구 결과, *fused* 는 기능성 키나제임이 증명되었다. 기능에 대한 연구 결과, fused는 *Gli* 의 활성자이며 우성 네가티브 형태의 *fused* 는 제노푸스(*Xenopus*) 배아에서 *SHh* 신호전달을 차단할 수 있음이 입증되었다. 이들 데이타를 종합한 결과, Cos-2 및 *fused* 는 둘다 *Hh* 신호전달에 직접 관여하는 것으로 증명되었다.

코스탈-2 단백질에 관한 다른 참고문헌으로는, 심슨(Simpson) 등의 문헌[Dev.Biol. 122:201-209 (1987)], 그라우(Grau) 등의 문헌[Dev.Biol. 122:186-200 (1987)], 프리트(Preat) 등의 문헌[Genetics 135:1047-1062 (1993)], 시손(Sisson) 등의 문헌[Cell 90:235-245 (1997)] 및 로빈스(Robbins) 등의 문헌[Cell 90:225-234 (1997)]을 참조한다.

본원에서, 발명자들은 인간 코스탈-2 동족체 폴리펩티드(본원에서 PRO539로 명명)를 코딩하는 cDNA를 확인 및 설명하고 있다.

3. PRO982

산업계와 학계 모두가 신규 천연 분비 단백질을 찾아내기 위한 노력을 기울이고 있다. 신규 분비 단백질에 대한 코딩 서열을 찾아내기 위해 포유동물의 재조합 DNA 라이브러리를 스크리닝하는 것에 많은 노력이 집중되어 있다. 본원에서, 발명자들은 신규 분비 폴리펩티드(본원에서 PRO982 폴리펩티드로 명명)의 확인 및 특성화에 대해 설명하고 있다.

4. PRO1434

넬(nel) 유전자는 닭의 신경 조직에서 발현되는 단백질을 코딩하는 것으로 알려져 있다[와따나베(Watanabe) 등의 문헌[Genomics 38(3):273-276 (1996)]]. 최근에, 닭의 넬 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 상동성이 있는 폴리펩티드를 코딩하며 6개의 EGF-유사 반복부를 포함하는 두가지 새로운 인간 cDNA(NELL1 및 NELL2로 명명)가 확인 및 특성화되었다[와따나베(Watanabe) 등의 문헌[supra]]. 이러한 유전자가 신경-특이적으로 발현되는 경우, 이들 유전자는 신경 발달에 있어서의 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서, 넬과 상동성이 있는 신규 폴리펩티드인 NELL1 및 NELL2를 확인 및 특성화하는 것에 대한 상당한 관심이 있다.

본원에서, 발명자들은 넬 단백질(본원에서 PRO1434 폴리펩티드로 명명)과 상동성이 있는 신규 폴리펩티드를 확인 및 특성화하는 것에 대해 설명하고 있다.

5. PRO1863

산업계와 학계 모두가 신규 천연 막횡단 단백질을 찾아내기 위한 노력을 기울이고 있다. 신규 막횡단 단백질에 대한 코딩 서열을 찾아내기 위해 포유동물의 재조합 DNA 라이브러리를 스크리닝하는 것에 많은 노력이 집중되어 있다. 본원에서, 발명자들은 신규 막횡단 폴리펩티드(본원에서 PRO1863 폴리펩티드로 명명)의 확인 및 특성화에 대해 설명하고 있다.

6. PRO1917

이노시톨 포스파타제의 특성화는, 그가 소포체로부터 Ca^{2+} 의 방출을 자극하는 신호전달 활성을 이해하는데 기초가 되므로 관심의 대상이 된다. 분자적 클로닝에 의해 신장 및 간에서 고도로 발현되는 다중 이노시톨 폴리포스페이트 포스파타제를 확일 할 수 있다[크랙스톤(Craxton) 등의 문헌[(1997) Biochem J. 328:75-81]].

7. PRO1868

염증성 반응은 복잡하며 비만세포, 신경 말단, 혈소판, 백혈구 및 보체 활성화에 의해 국소적으로 생성되는 다양한 신호전달 분자에 의해 매개된다. 이들 신호전달 분자 중 몇몇은 내피세포층을 보다 다공성으로 만들고(만들거나) 내피세포층이, 특정 탄수화물을 인식하여 백혈구를 인식 및 유인하는 세포 표면 분자로 작용하는 셀렉틴을 발현시키게끔 만들기도 한다. 더 강한 백혈구 결합은 내피를 통한 백혈구 이동을 매개하는 인테그린에 의해 매개된다. 다른 신호전달 분자는 주화성물질(chemoattractant)로 작용하여, 결합된 백혈구가 주화성물질의 공급원을 향해 움직이도록 만든다. 염증성 반응의 과정 중에 생산되는 다른 신호전달 분자는 혈중에서 이탈하여 골수를 자극함으로써 더 많은 백혈구를 생산하고 이들을 혈류로 방출시킨다.

통상적으로, 염증은 실제로 면역반응을 개시할 수 있는 임의 분자일 수 있는 항원에 의해 개시된다. 정상적인 생리학적 조건하에서는 이들은 외래 분자이지만, 생물체 자체에 의해 생성된 분자도 각종 질환의 증상에서 나타날 수 있는 것으로 알려진 촉매로 작용할 수 있다.

T-세포 증식은 혼합 림프구의 배양이거나 또는 혼합 림프구 반응(MLR)은 면역계를 자극하는 화합물의 능력에 대한 확립된 지침이다. 염증성 반응에서, 반응하는 백혈구는 호중구, 호산구, 단핵구 또는 림프구일 수 있다. 환부 조직에 대한 조직 검사는 면역 자극 또는 억제 반응의 증거를 제공한다[문헌[Current Protocols in Immunology, ed John E. Coligan, 1994, John Wiley and Sons, Inc.] 참조].

염증성 장질환(IBD)은 궤양성 결장염(UC) 및 크론(Crohn's)병(이들은 둘다 별개의 질환으로 분류되지만, 공통되는 특징이 있으며 증상이 공통될 수도 있음)을 비롯한 장 질환을 총체적으로 설명하기 위해 사용되는 용어이다. 일반적인 진단 기준으로는 환자가 상기 두가지 질환(각 질환의 병변의 유형 및 위치는 통상적으로 다름) 중 어느 것에 걸렸는지를 정확하게 결정하기는 어렵다. UC 병변의 특징은 점막의 표층성 궤양이며, 직장 근처의 결장에서 나타난다. CD 병변의 특징은 광범위한 선형 열창이며, 경우에 따라 위, 식도 및 십이지장을 비롯한 장의 어느 곳에서도 나타날 수 있다.

IBD에 대한 통상적인 치료에는 일반적으로 대상의 고통을 부분적으로만 덜어주는 항염증성 물질 또는 면역억제성 물질, 예를 들어 술파살라진, 코르티코스테로이드, 6-머캅토퓨린/아자토프린, 또는 시클로스포인을 투여하는 것이 포함된다. 그러나, 항염증요법/면역억제요법이 실패하는 경우, 결장절제술이 마지막 방어선이 된다. CD 환자의 약 30%는 진단 후 1년 내에 수술받아야 하며, 수술 처치에 대한 가능성은 그 후 매년 약 5%씩 증가한다. 불행하게도, CD는 또한 수술 첫해 이후에 환자의 약 5%가 재수술받아야하는 것처럼 높은 재발률을 나타낸다. 또한, UC 환자는 실제로 결장직장암의 발병 위험이 높다. 아마도, 이는 상피가 손상된 다음 재성장하는 재발 주기로 인한 것일 수 있으며, 이러한 재발 주기는 종양성 변형의 위험을 지속적으로 증가시킨다.

연결 부착 분자(Junctional Adhesion Molecule, JAM)로 알려진 최근에 밝혀진 이뮤노글로불린 거대족의 한 요소가, 기원이 다른 내피세포 및 상피세포의 세포간 연결부에 선택적으로 집중되어 있는 것으로 밝혀졌다[마틴-파두라(Martin- Padura, I.) 등의 문헌[J.Cell Biol. 142(1):117-27 (1998)]]. JAM은 V-타입의 두개의 세포외 쇄내 디술피드 루프를 갖는 타입 I 내재성 막 단백질이다. JAM은 A33 항원(도 1 또는 도 18)과 실제로 상동성이 있다. JAM으로 지시되는 모노클로날 항체는 시험관내에서 자발적인 케모카인-유도된 단핵구의 내피세포 단층의 통과를 억제하는 것으로 밝혀졌다[마틴-파두라(Martin-Padura)의 문헌[supra]].

JAM의 발현은 결장염에 걸린 CRF2-4 -/- 마우스의 결장에서 증가하는 것으로 최근에 밝혀졌다. CRF2-4 -/-(IL-10R 서브유닛 녹아웃 마우스)는 림프구, 단핵구 및 호중구에 의해 매개되는 자발성 결장염을 발병한다. 그 결과, 본 발명의 화합물은 염증성 장질환, 다른 염증성 장질환 및 결장직장암과 같은 인간의 질병에서 발현 수준이 증가하거나 또는 이러한 질병과 관련이 있다는 것을 예측할 수 있다.

본 발명의 화합물은 또한 공지된 결장직장암-관련 마커인 A33 항원과 상당한 상동성을 나타낸다. A33 항원은 일차 또는 전이성 결장암 및 정상적인 결장의 상피의 90% 이상에서 발현된다. 결장의 점막에서 발생하는 종양에 있어서, A33 항원은 모든 경우의 95% 이상에서 균일하게 발현된다. 그러나, A33 항원은 넓은 범위의 다른 정상 조직에서는 검출되지 않는데, 즉 그의 발현은 장기 특이적인 것으로 보인다. 따라서, A33 항원은 결장직장암의 유도에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

결장암은 빈번한 질환이기 때문에, 초기 진단 및 치료는 의학적으로 중요한 목표이다. 형광성, 핵자기성 또는 방사활성 태그를 갖기 때문에 특이적이라 할 수 있는 모노클로날 항체(mAb)를 사용하여 결장암의 진단 및 치료를 수행할 수 있다. 방사활성 유전자, 독소 및(또는) 약물 태그된 mAb를 사용하여 초기 증상의 환자를 치료할 수 있다. 또한, mAb를 사용하여 결장암의 진단 및 치료 동안에 진단용으로 사용할 수도 있다. 예를 들어, 환자의 A33 항원의 혈청 수준이 증가하는 경우, 수술 후의 이 수준의 저하는 종양의 절제가 성공적임을 나타낸다. 한편, 수술 후의 혈청내 A33 항원 수준의 증가는 최초 종양이 전이될 수 있거나 또는 새로운 원발성 종양이 나타날 수 있음을 암시한다.

이러한 모노클로날 항체는 수술 대신으로, 또는 수술 및(또는) 다른 화학요법과 병용할 수 있다. 예를 들어, A33에 대한 mAb를 사용하여 결장직장암에 감염된 환자를 임상전 분석하고 국소적으로 연구하는 것은 웰트(Welt) 등의 문헌[J.Clin.Oncol. 8:1894-1906 (1990)] 및 벨트(Welt) 등의 문헌[J.Clin.Oncol. 12:1561-1571 (1994)]에 기재되어 있으며, 미국 특허 제4,579,827호 및 U.S.S.N. 제424,991호(유럽 특허 제199,141호)는 모노클로날 항체의 치료적 투여에 관한 것이며, 이들 중 후자는 항-A33 mAb의 사용에 관한 것이다.

본원에서, 본 발명자들은 A33 항원 단백질(본원에서 PRO1868 폴리펩티드로 명명)과 상동성이 있는 신규 폴리펩티드를 확인 및 특성화하는 것에 대해 설명하고 있다.

8. PRO3434

산업계와 학계 모두가 신규 천연 분비 단백질을 찾아내기 위한 노력을 기울이고 있다. 신규 분비 단백질에 대한 코딩 서열을 찾아내기 위해 포유동물의 재조합 DNA 라이브러리를 스크리닝하는 것에 많은 노력이 집중되어 있다. 본원에서, 발명자들은 신규 분비 폴리펩티드(본원에서 PRO3434 폴리펩티드로 명명)의 확인 및 특성화에 대해 설명하고 있다.

9. PRO1927

단백질은 막결합 글리코실트랜스퍼라제에 의해 매개되는 복잡한 반응 세트에 의해 글리코실화된다. 합성된 탄수화물 구조를 배열시키는 수많은 여러가지 글리코실트랜스퍼라제가 존재한다. N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 단백질은 포유동물 생물체에서 다양한 중요한 생물학적 기능을 제공하는 일군의 글리코실트랜스퍼라제를 포함한다. 예로서, UDP-N-아세틸글루코사민:알파-3-D-만노시드 베타-1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 I은 만노스-고함유 N-글리칸의 하이브리드 복합 N-글리칸으로의 전환에서 필수적인 제1 단계를 촉매하는 글리코실트랜스퍼라제이다[사카르(Sarkar) 등의 문헌[Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 88:234-238 (1991)]]. UDP-N-아세틸글루코사민:알파 1,3-D-만노시드 베타-1,4-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제는 트리- 및 테트라-안테나형 아스파라긴-연결 당쇄의 생산에 있어 필수적인 효소이며, 최근에 cDNA 클로닝을 이용하여 소의 소장에서 정제하였다[미노바(Minowa) 등의 문헌[J.Biol.Chem. (1998) 273(19):11556-62]]. N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 단백질 족의 다른 요소를 확인 및 특성화하는 것, 보다 일반적으로는 신규 글리코실트랜스퍼라제를 확인하는 것은 관심의 대상이다.

<발명의 개요>

1. PRO1800

본 발명자들은 Hep27 단백질을 코딩하는 핵산과 상동성이 있으며 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO1800'으로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA35672-2508)을 찾아냈다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열을 갖는 PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 1(서열 1)의 뉴클레오티드 약 36 또는 약 81과 약 869 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203538호(DNA35672-2508)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 핵산 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203538호(DNA35672-2508)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 230개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열을 갖는 PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 2(서열 2)의 서열에서 아미노산 위치 약 1로부터 약 15에 걸쳐 있는 것으로 확인되었다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 2(서열 2)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것 으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1800 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이며, 도 1(서열 1)에 나타낸 뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1800 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1800 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 2(서열 2)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1800 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 2(서열 2)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1800 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열을 포함하는 단리된 PRO1800 폴리펩티드, 또는 항-PRO1800 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1800 단편은 천연 PRO1800 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 2(서열 2)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 16 내지 약 278의 서열을 갖는 PRO1800 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1800 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1800 항체이다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1800 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1800 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1800 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것 이다.

2. PRO539

본 발명자들은 코스탈-2 단백질을 코딩하는 핵산과 상동성이 있으며 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO539'으로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA47465-1561)을 찾아냈다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 약 1 내지 약 830의 서열을 갖는 PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 3(서열 6)의 뉴클레오티드 약 186과 약 2675 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203661호(DNA47465-1561)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 핵산 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203661호(DNA47465-1561)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 1 내지 약 830의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 100개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 1 내지 약 830의 서열을 갖는 PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 4(서열 7)의 잔기 1 내지 약 830의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하 게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO539 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이며, 도 3(서열 6)에 나타낸 뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO539 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO539 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 4(서열 7)의 잔기 1 내지 약 830을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 1 내지 약 830의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO539 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 4(서열 7)의 잔기 1 내지 약 830의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아 미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO539 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 1 내지 약 830의 서열을 포함하는 단리된 PRO539 폴리펩티드, 또는 항-PRO539 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO539 단편은 천연 PRO539 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 4(서열 7)의 아미노산 잔기 약 1 내지 약 830의 서열을 갖는 PRO539 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO539 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO539 항체이다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO539 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO539 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 생물학적 활성이란 미세소관과 결합하는 능력 또는 fused 및 큐비터스 인터럽터스(cubitus interruptus)와 복합체를 이루는 능력을 말한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO539 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO539에 의한 헤지호그 신호전달의 조절에 대항하는 길항제 및 이 조절을 촉진하는 아고니스트를 개발하기 위한 화합물 및 방법을 제공한다. 특히, *SH* 신호전달 경로에서 PRO539의 정상 기능을 차단, 방해, 억제 및(또는) 상실시키는 척추동물 PRO539의 길항제에는 작은 생물유기 분자 및 안티센스 뉴클레오티드가 둘다 포함된다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 선택적으로 스플라이싱된 인간 PRO539 변이체를 제공한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO539에 의한 헤지호그 신호전달의 조절을 변경하는 분자를 확인하는 스크리닝 방법 또는 분석 방법을 제공한다. 바람직하게는, 이 분자는 PRO539와 그와 결합하여 복합체을 이루는 단백질(예를 들어, fused 또는 큐비터스 인터럽터스)과의 상호작용을 방해하거나 또는 복합체의 분리를 방해 또는 억제한다. 이 분석에는 PRO539 및 기질을 포함하는 혼합물을 후보 분자와 함께 인큐베이션하는 것 및 후보 분자의 PRO539 헤지호그 신호전달을 조절하는 능력을 조사하는 것이 포함된다. 스크리닝된 분자는 바람직하게는 작은 분자인 약물 후보이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명의 방법은 (a) 시험 세포 또는 조직을 배양하 는 단계, (b) PRO539에 의해 조절되는 헤지호그 신호전달을 억제할 수 있는 화합물을 투여하는 단계 및 (c) 헤지호그 신호전달이 조절되는지를 결정하는 단계를 포함하는, 특정 질환이 헤지호그 신호전달에 의해 조절되는지를 결정하기 위한 진단 기술에 관한 것이다.

3. PRO982

본 발명자들은 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO982'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA57700-1408)을 찾아냈다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열을 갖는 PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 5(서열 8)의 잔기 약 89와 약 400 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에서 일어난다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203583호(DNA57700-1408)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203583호(DNA57700-1408)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 약 50개 이상, 바람직하게는 약 100개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열을 갖는 PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 6(서열 9)의 서열에서 아미노산 위치 약 1로부터 약 21에 걸쳐 있는 것으로 확인되었다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 6(서열 9)의 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO982 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 정의된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO539 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO982 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 6(서열 9)의 잔기 1 또는 약 22 내지 125를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO982 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 6(서열 9)의 잔기 1 또는 약 22 내지 125의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO982 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열을 포함하는 단리된 PRO982 폴리펩티드, 또는 PRO982 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는,

PRO982 단편은 천연 PRO982 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 6(서열 9)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 22 내지 약 125의 서열을 갖는 PRO982 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.

4. PRO1434

본 발명자들은 넬 단백질을 코딩하는 핵산과 상동성이 있으며 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO1434'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA68818-2536)을 찾아냈 다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열을 갖는 PRO1434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 7(서열 10)의 뉴클레오티드 약 581 또는 약 662과 약 1555 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1434 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203657호(DNA68818-2536)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 핵산 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203657호(DNA68818-2536)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 65개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열을 갖는 PRO1434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1434 폴리펩티드 및 그의 가용성 변이체(즉, 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 실활화됨)를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 8(서열 11)의 서열에서 아미노산 위치 약 1로부터 약 27에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 8(서열 11)의 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포 함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1434 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이며, 도 7(서열 10)에 나타낸 뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1434 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1434 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 8(서열 11)의 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1434 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 8(서열 11)의 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1434 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열을 포함하는 단리된 PRO1434 폴리펩티드, 또는 항-PRO1434 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1434 단편은 천연 PRO1434 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 8(서열 11)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 28 내지 약 325의 서열을 갖는 PRO1434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한

조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1434 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1434 항체이다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1434 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1434 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1434 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

5. PRO1863

본 발명자들은 새로운 막횡단 폴리펩티드(본원에서 'PRO1863'으로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA59847-2510)을 찾아냈다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1863 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열을 갖는 PRO1863 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 9(서열 15)의 뉴클레오티드 약 17 또는 약 62와 약 1327 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1863 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203576호(DNA59847-2510)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 핵산 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203576호(DNA59847-2510)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 345개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열을 갖는 PRO1863 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1863 폴리펩티드 및 그의 가용성 변이체(즉, 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 실활화됨)를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 10(서열 16)의 서열에서 아미노산 위치 약 1로부터 약 17에 걸쳐 있는 것으로 확인되었다. 실험에 의해 막횡단 도메인은 PRO1863 아미노산 서열(도 10, 서열 16)에서 아미노산 위치 약 243으로부터 약 260에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 10(서열 16)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1863 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이며, 도 9(서열 15)에 나타낸 뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1863 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1863 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 10(서열 16)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1863 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 10(서열 16)의 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437 의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1863 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열을 포함하는 단리된 PRO1863 폴리펩티드, 또는 항-PRO1863 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1863 단편은 천연 PRO1863 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 10(서열 16)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 16 내지 약 437의 서열을 갖는 PRO1863 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1863 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1863 항체이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1863 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1863 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1863 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

6. PRO1917

본 발명자들은 이노시톨 포스파타제와 상동성이 있는 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO1917'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA76400-2528)을 찾아냈다.

한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열을 갖는 PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 11(서열 17)의 잔기 약 96과 약 1466 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203573호(DNA76400-2528)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203573호(DNA76400-2528)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 약 50개 이상, 바람직하게는 약 100개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열을 갖는 PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 12(서열 18)의 서열에서 아미노산 위치 1로부터 약 30에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 12(서열 18)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1917 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1917 폴리펩티드를 제공한다.

특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1917 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 12(서열 18)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서 열을 포함하는 단리된 PRO1917 폴리펩티드에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 12(서열 18)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1917 폴리펩티드에 관한 것이다.

또다른 측면으로, 본 발명은 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열을 포함하는 단리된 PRO1917 폴리펩티드, 또는 항-PRO1917 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1917 단편은 천연 PRO1917 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 12(서열 18)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 487의 서열을 갖는 PRO1917 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1917 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1917 항체이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1917 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1917 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1917 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

7. PRO1868

본 발명은 인간을 비롯한 포유동물의 염증성 질환의 진단 및 치료용 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 포유동물에서 면역 반응을 자극 또는 억제하는 단백질(아고니스트 및 길항제 항체를 포함)을 확인하는 것에 기초를 두고 있다. 염증성 질환은 염증성 반응을 억제함으로써 치료할 수 있다. 염증성 반응을 증가시키는 분자는 항원에 대한 면역 반응을 자극 또는 증가시킨다. 염증성 반응을 억제하는 것이 이로울 경우에는 염증성 반응을 자극하는 분자를 억제할 수 있다. 염증성 반응을 증가시키는 것이 이로울 경우에는 염증성 반응을 자극하는 분자를 치료에 사용할 수 있다. 염증성 반응을 억제하는 것이 유용할 경우에는 이러한 자극성 분자를 억제할 수도 있다. 중화 항체는 면역 자극 활성을 갖는 분자를 억제하는 분자의 예이며, 이 항체는 염증성 질환의 치료에 있어서 이로울 것이다. 염증성 반응을 억제하는 분자를 (단백질을 직접 또는 항체 아고니스트의 사용을 통해) 이용하여 염증성 반응을 억제함으로써 염증성 질환을 개선시킬 수도 있다.

따라서, 본 발명의 단백질은 면역 관련 질환의 진단 및(또는) 치료(예방 포 함)에 있어서 유용하다. 자극성 단백질과 결합하는 항체는 염증성 반응을 억제하는데 유용하다. 억제성 단백질과 결합하는 항체는 염증성 반응 및 면역계를 자극하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 단백질 및 항체는 염증 및 면역 관련 질환의 치료를 위한 약품 및 약물을 제조하는데 유용하다.

한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드의 한가지 이상의 기능 또는 활성을 억제하는 PRO1868 폴리펩티드의 길항제 및 아고니스트에 관한 것이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드를 포함하는 것으로 추정되는 세포를 항-PRO1868 항체에 노출시키는 것 및 항체와 세포의 결합을 결정하는 것을 포함하는, PRO1868 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 시료 및 (b) 동일한 세포 유형의 알려진 정상 조직 세포의 대조 시료에서 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 염증 관련 질환의 진단 방법에 관한 것으로, 여기서 시험 시료에서 높은 수준의 발현은 대상 포유동물에 염증성 질환이 존재함을 나타낸다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) 항-PRO1868 항체를 포유동물로부터 얻은 조직 배양 세포의 시험 시료와 접촉시키는 것 및 (b) 상기 항체와 PRO1868 폴리펩티드의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 염증성 질환을 진단하는 방법에 관한 것이다. 검출 방법은 정성적 또는 정량적일 수 있으며, 동일한 세포 유형의 알려진 정상 조직 세포의 대조 시료에서 복합체의 형성을 모니터링한 것과 비교하여 수행할 수 있다. 시험 시료에서 형성된 다량의 복합체는 시험 조직 세포를 얻은 포유동물에 종양이 존재함을 나타낸다. 항체는 바람직하게는 검출가능한 표지를 포함한다. 복합체의 형성은 예를 들어 광학현미경, 유동세포계수법(flow cytometry), 형광측정법, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 시험 시료는 일반적으로 염증성 반응과 관련된 결핍증 또는 이상증에 걸린 것으로 추정되는 개체로부터 얻는다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 항-PRO1868 항체 및 담체(예를 들어, 완충제)를 적절한 용기내에 포함하는 진단 킷트에 관한 것이다. 이 킷트는 바람직하게는 PRO1868 폴리펩티드를 검출하는 항체를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하고 있다.

다른 한 실시태양에서, 본 발명은 컨테이너; 컨테이너 상의 표지; 및 컨테이너내에 포함된 활성 물질을 포함하는 조성물을 포함하는 제품에 관한 것이며, 여기서 상기 조성물은 포유동물에서 염증성 반응을 자극 또는 억제하는데 효과적이고, 컨테이너 상의 표지는 상기 조성물을 사용하여 염증성 질환을 치료할 수 있음을 나타내며, 조성물내의 활성 물질은 PRO1868 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 자극 또는 억제하는 물질이다. 바람직한 측면으로, 활성 물질은 PRO1868 폴리펩티드 또는 항-PRO1868 항체이다.

다른 한 실시태양은, 후보 화합물 및 PRO1868 폴리펩티드가 상호작용하기에 충분한 조건하의 시간 동안에 후보 화합물과 PRO1868 폴리펩티드를 접촉시킴으로써 PRO1868 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 억제할 수 있는 화합물을 확인하는 방법에 관한 것이다. 특정 측면으로, 후보 화합물 또는 PRO1868 폴리펩티드는 고상 지지체에 고정되어 있다. 다른 측면으로, 비-고정 성분은 검출가능한 표지를 포함 하고 있다.

또다른 측면으로, 본 발명은, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 루프스, 류마티스성 관절염, 연소자성 만성 관절염, 척추관절증, 전신성 경화증(경피증), 특발성 염증성 근질환(피부근염, 다발성근염), 쇼그렌(Sjogren's) 증후군, 전신성 소포염, 유사 육종증, 자가면역성 용혈성 빈혈(면역성 전혈구감소증, 발작성 야행성 헤모글로빈뇨증), 자가면역성 혈소

판감소증(특발성 혈소판감소증 자반병, 면역-매개성 혈소판감소증), 갑상선염증(그레이브(Grave's)병, 하시모또(Hashimoto's) 갑상선염증, 연소자성 림프종성 갑상선염증, 위축성 갑상선염증), 당뇨병, 면역-매개성 신장병(사구체신염, 세뇨관간질성 신장염), 다발성 경화증과 같은 중추 및 말초 신경계의 탈수질성 질환, 특발성 다발성 신경병증, 감염성 간염(A, B, C, D, E형 간염 및 다른 비-간친화성 바이러스성 간염)과 같은 간담즙성 질환, 자가면역성 만성 활동성 간염, 원발성 담낭 경변증, 육아종성 간염, 및 경화성 담관염, 염증성 및 섬유성 폐 질환(예를 들어, 낭성 섬유증, 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유증 및 과민성 폐렴), 글루텐-감응성 장질환, 휘플(Whipple's) 병, 수포성 피부 질환, 홍반 다형성 및 접촉성 피부염을 비롯한 자가면역성 또는 면역-매개성 피부 질환, 건선, 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유증 및 과민성 폐렴과 같은 폐의 알레르기성 질환, 이식 거부반응 및 이식편대숙주반응을 비롯한 이식 관련 질환으로부터 선택된 질환을 치료하기 위해, 필요로 하는 대상에게 치료 유효량의 PRO1868 길항제를 투여함으로써 염증성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 시료 및 (b) 동일한 세포 유형의 알려진 정상 조직 세포의 대조 시료에서 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 종양의 진단 방법을 제공하며, 여기서 시험 시료에서 높은 수준의 발현은 시험 조직 세포를 얻은 포유동물에 종양이 존재함을 나타낸다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) 항-PRO1868 항체를 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 시료와 접촉시키는 것 및 (b) 시험 시료에서 항-PRO1868과 PRO1868 폴리펩티드의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서 종양을 진단하는 방법을 제공한다. 검출 방법은 정성적 또는 정량적일 수 있으며, 동일한 세포 유형의 알려진 정상 조직 세포의 대조 시료에서 복합체의 형성을 모니터링한 것과 비교하여 수행할 수 있다. 시험 시료에서 형성된 다량의 복합체는 시험 조직 세포를 얻은 포유동물에 종양이 존재함을 나타낸다. 항체는 바람직하게는 검출가능한 표지를 포함한다. 복합체의 형성은 예를 들어 광학현미경, 유동세포계수법, 형광측정법, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 모니터링할 수 있다. 바람직하게는, 시험 시료는 종양 세포(예를 들어, 암 세포)가 성장 또는 증식하는 것으로 추정되는 포유동물 개체로부터 얻는다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 항-PRO1868 항체 및 담체(예를 들어, 완충제)를 적절한 용기내에 포함하는 암 진단 킷트를 제공한다. 이 킷트는 바람직하게는 PRO1868 폴리펩티드를 검출하는 항체를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하고 있다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드를 과다발현하는 세포를, PRO1868 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 억제하는 유효량의 물질에 노출시 키는 것을 포함하는, 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 이 물질은 바람직하게는 항-PRO1868 폴리펩티드, 작은 유기 및 무기 펩티드, 포스포펩티드, 안티센스 또는 리보자임 분자, 또는 삼중 나선형 분자이다. 특정 측면으로, 이 물질, 예를 들어 항-PRO1868 항체는 세포사를 유도한다. 다른 측면으로, 종양 세포는 또한 방사선 처리 및(또는) 세포독성 물질 또는 화학치료 물질에 노출된다.

다른 한 실시태양에서, 본 발명은 컨테이너; 컨테이너 상의 표지; 및 컨테이너내에 포함된 활성 물질을 함유하는 조성물을 포함하는 제품에 관한 것이며, 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장을 억제하는데 효과적이고, 컨테이너 상의 표지는 상기 조성물을 사용하여 PRO1868 폴리펩티드의 과다발현을 특징으로 하는 증상을 치료할 수 있음을 나타내며, 상기 조성물내의 활성 물질은 PRO1868 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 억제하는 물질이다. 바람직한 측면으로, 활성 물질은 항-PRO1868 항체이다.

본 발명자들은 A33 항원을 코딩하는 핵산과 상동성이 있으며 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO1868'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA77624-2515)을 찾아냈다.

한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열을 갖는 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직 하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 13(서열 19)의 뉴클레오티드 약 51 또는 약 141과 약 980 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203553호(DNA77624-2515)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 핵산 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203553호(DNA77624-2515)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 390개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열을 갖는 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1868 폴리펩티드 및 그의 가용성 변이체(즉, 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 실활화됨)를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 14(서열 20)의 서열에서 아미노산 위치 1로부터 약 30에 걸쳐있는 것으로 확인되었다. 실험에 의해 막횡단 도메인은 PRO1868 아미노산 서열(도 14, 서열 20)에서 아미노산 위치 약 243으로부터 약 263에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 14(서열 20)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1868 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이며, 도 13(서열 19)에 나타낸 뉴클레오티드 서열로부터 유도될 수 있다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1868 폴리펩티드를 제공한다.

특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1868 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 14(서열 20)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1868 폴리펩티드에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 14(서열 20)의 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1868 폴리펩티드에 관한 것이다.

또다른 측면으로, 본 발명은 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열을 포함하는 단리된 PRO1868 폴리펩티드, 또는 항-PRO1868 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1868 단편은 천연 PRO1868 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 14(서열 20)의 아미노산 잔기 약 1 또는 약 31 내지 약 310의 서열을 갖는 PRO1868 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1868 폴리펩티드의 아고니스트 및길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1868 항체이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1868 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1868 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1868 폴리펩티드, 또는 아고니스트 또는 길항제 항체를 담체 또는 부형제와의 혼합물로서 함유하는 조성물을 제공한다. 한 측면으로, 이 조성물은 치료 유효량의 펩티드 또는 항체를 함유한다. 다른 측면으로, 조성물이 염증 자극성 분자를 함유하는 경우, 이 조성물은 (a) 필요로 하는 포 유동물의 조직내의 염증성 세포의 침윤을 증가시키는데, (b) 필요로 하는 포유동물에서 면역 반응을 자극 또는 증가시키는데 또는 (c) 필요로 하는 포유동물에서 항원에 대한 반응으로 T-림프구의 증식을 증가시키는데 유용하다. 다른 측면으로, 조성물이 염증 억제성 분자를 함유하는 경우, 이 조성물은 (a) 필요로 하는 포유동물의 조직내의 염증성 세포의 침윤을 감소시키는데, (b) 필요로 하는 포유동물에서 면역 반응을 억제 또는 감소시키는데 또는 (c) 필요로 하는 포유동물에서 항원에 대한 반응으로 T-림프구의 증식을 감소시키는데 유용하다. 다른 측면으로, 조성물은 예를 들어 다른 항체, 또는 세포독성 물질 또는 화학치료 물질일 수 있는 추가의 활성 성분을 함유한다. 바람직하게는, 조성물은 무균성이다.

다른 한 실시태양에서, 본 발명은 항-PRO1868 항체를 코딩하는 핵산, 및 이 핵산을 포함하는 벡터 및 재조합 숙주 세포에 관한 것이다. 또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 항체를 코딩하는 핵산에 의해 형질전환된 숙주 세포를, 상기 항체가 발현되는 조건하에 배양하고, 세포 배양물로부터 상기 항체를 회수함으로써 상기 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

8. PRO3434

본 발명자들은 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO3434'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA77631-2537)을 찾아냈다.

한 실시태양에서, 본 발명은 PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열을 갖는 PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 15(서열 21)의 잔기 약 46 또는 약 94와 약 3132 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203651호(DNA77631-2537)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203651호(DNA77631-2537)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 약 460개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열을 갖는 PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 16(서열 22)의 서열에서 아미노산 위치 1로부터 약 16에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.
다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 16(서열 22)의 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO3434 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO3434 폴리펩티드를 제공한다.
특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO3434 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 16(서열 22)의 잔기 1 또는 약 17 내지 1029를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO3434 폴리펩티드에 관한 것이다.
다른 측면으로, 본 발명은 도 16(서열 22)의 잔기 1 또는 약 17 내지 1029의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO3434 폴리펩티드에 관한 것이다.
또다른 측면으로, 본 발명은 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열을 포함하는 단리된 PRO3434 폴리펩티드, 또는 항-PRO3434 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO3434 단편은 천연 PRO3434 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.
또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 16(서열 22)의 아미노산 잔기 1 또는 약 17 내지 약 1029의 서열을 갖는 PRO3434 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO3434 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO3434 항체이다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO3434 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO3434 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO3434 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

9. PRO1927

본 발명자들은 글리코실트랜스퍼라제와 상동성이 있는 새로운 폴리펩티드(본원에서 'PRO1927'로 명명)를 코딩하는 cDNA 클론(DNA82307-2531)을 찾아냈다.
한 실시태양에서, 본 발명은 PRO1927 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 이 단리된 핵산은 (a) 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 약 548의 서열을 갖는 PRO1927 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 17(서열 23)의 잔기 약 120과 약 1694 사이의 핵산의 상보체와 혼성화하는 DNA를 포함하는, PRO1927 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 혼성화는 엄격 혼성화 및 세척 조건하에 일어난다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) ATCC 기탁번호 제203537호(DNA82307-2531)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 DNA를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 ATCC 기탁번호 제203537호(DNA82307-2531)의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 약 548의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 폴리펩티 드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 약 50개 이상, 바람직하게는 약 100개 이상의 뉴클레오티드를 가지며, 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 약 548의 서열을 갖는 PRO1927 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키고, 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, 시험 DNA 분자를 단리함으로써 생산되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

특정 측면으로, 본 발명은 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 있거나 없는 PRO1927 폴리펩티드 및 그의 가용성 변이체(즉, 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 실활화됨)를 코딩하는 DNA를 포함하거나 또는 이러한 코딩 핵산 분자와 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실험에 의해 신호 펩티드는 도 18(서열 24)의 서열에서 아미노산 위치 1로부터 약 23에 걸쳐있는 것으로 확인되었다. 실험에 의해 타입 II 막횡단 도메인은 PRO1927 아미노산 서열(도 18, 서열 24)에서 아미노산 위치 약 6으로부터 약 25에 걸쳐있는 것으로 확인되었다.

다른 측면으로, 본 발명은 (a) 도 18(서열 24)의 잔기 1 또는 약 24 내지 약 548의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 (b) 상기 (a)의 DNA의 상보체를 포 함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

다른 실시태양은 혼성화 프로브로 사용할 수 있는 PRO1927 폴리펩티드 코딩 서열의 단편에 관한 것이다. 이 핵산 단편은 뉴클레오티드 약 20 내지 약 80개, 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 60개, 보다 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20개 내지 약 50개, 가장 바람직하게는 뉴클레오티드 약 20 내지 약 40개 길이이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 확인된 단리된 핵산 서열 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO1927 폴리펩티드를 제공한다.

특정 측면으로, 본 발명은 단리된 천연 서열 PRO1927 폴리펩티드를 제공하는데, 몇몇 실시태양에서 이 폴리펩티드는 도 18(서열 24)의 잔기 1 또는 약 24 내지 548을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 548의 서열과의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1927 폴리펩티드에 관한 것이다.

다른 측면으로, 본 발명은 도 18(서열 24)의 잔기 1 또는 약 24 내지 548의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO1927 폴리펩티드에 관한 것이다.

또다른 측면으로, 본 발명은 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 548의 서열을 포함하는 단리된 PRO1927 폴리펩티드, 또는 항-PRO1927 항체에 대한 결합 부위를 제공하기에 충분한 그의 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO1927 단편은 천연 PRO1927 폴리펩티드의 질적인 생물학적 활성을 보유한다.

또다른 측면으로, 본 발명은 (i) 엄격 조건하에 시험 DNA 분자를 (a) 도 18(서열 24)의 아미노산 잔기 1 또는 약 24 내지 약 548의 서열을 갖는 PRO1927 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와 혼성화시키는 단계, 및 시험 DNA 분자의 상기 (a) 또는 (b)와의 서열 동일성이 약 80 % 이상, 바람직하게는 약 85 % 이상, 보다 바람직하게는 약 90 % 이상, 가장 바람직하게는 약 95 % 이상일 경우, (ii) 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 시험 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (iii) 세포 배양물로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계에 의해 생산되는 폴리펩티드를 제공한다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1927 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO1927 항체이다.

다른 실시태양에서, 본 발명은 천연 PRO1927 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 상기 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링함으로써 천연 PRO1927 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO1927 폴리펩티드, 또는 상기 정의된 아고니스트 또는 길항제를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

10. 추가의 실시태양

본 발명의 다른 실시태양에서, 본 발명은 본원에서 상기 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 이러한 임의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 예로서, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 효모일 수 있다. 또한, 본원에 기재한 임의 폴리펩티드를 생산하는 방법이 제공되며, 이 방법에는 목적 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하고 세포 배양물로부터 목적 폴리펩티드를 회수하는 것이

포함된다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열과 융합된 본원에 기재된 임의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 제공한다. 이러한 키메라 분자의 예에는 에피토프 태그 서열 또는 이뮤노글로불린의 Fc 영역과 융합된 본원에 기재된 임의 폴리펩티드가 포함된다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 또는 하기의 폴리펩티드 중 임의의 것과 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 인간화 항체, 항체 단편 또는 단쇄 항체이다.
또다른 실시태양에서, 본 발명은 게놈 및 cDNA 뉴클레오티드 서열을 단리하는데 또는 안티센스 프로브로 유용한 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하는데, 이러한 프로브는 상기 또는 하기의 뉴클레오티드 서열 중 임의의 것으로부터 유도될 수 있다.
다른 실시태양에서, 본 발명은 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
한 측면으로, 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 아미노산 서열, 또는 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 단백질의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열의 구체적으로 정의된 임의 다른 단편을 갖는 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
다른 측면에서, 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 PRO 폴리펩티드 cDNA의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 PRO 폴리펩티드의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같은, 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인의 코딩 서열 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열의 구체적으로 정의된 임의 다른 단편의 코딩 서열을 포함하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
추가의 한 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같은 ATCC에 기탁된 사람 단백질 cDNA 중 임의의 것에 의해 코딩되는 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자의 상보체와의 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
또다른 측면에서, 본 발명은 막횡단 도메인이 결실 또는 실활화된 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 또는 이러한 코딩 뉴클레오티드 서열과 상보성이 있는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 이 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 본원에 개시되어 있다. 따라서, 본원에 기재된 PRO 폴리펩티드들의 가용성 세포외 도메인은 고려 대상이다.
또다른 실시태양은 예를 들어 혼성화 프로브로 사용하거나, 항-PRO 항체에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 임의로 코딩할 수 있는 PRO 폴리펩티드의 단편을 코딩하거나 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 프로브로 사용할 수 있는 PRO 폴리펩티드 코딩 서열의 단편 또는 그의 상보체에 관한 것이다. 이러한 핵산 단편의 길이는 일반적으로 뉴클레오티드 약 20개 이상, 바람직하게는 약 30개 이상, 더 바람직하게는 약 40개 이상, 더 바람직하게는 약 50개 이상, 더 바람직하게는 약 60개 이상, 더 바람직하게는 약 70개 이상, 더 바람직하게는 약 80개 이상, 더 바람직하게는 약 90개 이상, 더 바람직하게는 약 100개 이상, 더 바람직하게는 약 110개 이상, 더 바람직하게는 약 120개 이상, 더 바람직하게는 약 130개 이상, 더 바람직하게는 약 140개 이상, 더 바람직하게는 약 150개 이상, 더 바람직하게는 약 160개 이상, 더 바람직하게는 약 170개 이상, 더 바람직하게는 약 180개 이상, 더 바람직하게는 약 190개 이상, 더 바람직하게는 약 200개 이상, 더 바람직하게는 약 250개 이상, 더 바람직하게는 약 300개 이상, 더 바람직하게는 약 350개 이상, 더 바람직하게는 약 400개 이상, 더 바람직하게는 약 450개 이상, 더 바람직하게는 약 500개 이상, 더 바람직하게는 약 600개 이상, 더 바람직하게는 약 700개 이상, 더 바람직하게는 약 800개 이상, 더 바람직하게는 약 900개 이상, 더 바람직하게는 약 1000개 이상이며, 여기서 용어 '약'은 언급한 뉴클레오티드 서열 길이에 이 길이의 10%를 더하거나 뺀 길이를 의미한다. PRO 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 신규 단편은, 잘 알려진 많은 서열 정렬 프로그램 중 임의의 것을 이용하여 PRO 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 다른 공지 뉴클레오티드 서열을 정렬시키고, PRO 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 단편이 신규한 것인지를 결정하는 통상의 방식에 의해 결정될

수 있다. 이러한 모든 PRO 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 본원에서 고려 대상이다. 또한, 이 뉴클레오티드 분자 단편에 의해 코딩되는 PRO 폴리펩티드 단편, 바람직하게는 항-PRO 항체에 대한 결합 부위를 포함하는 PRO 폴리펩티드 단편들도 고려 대상이다.

또다른 실시태양에서, 본 발명은 상기에서 확인된 단리된 핵산 서열들 중 임의 것에 의해 코딩되는 단리된 PRO 폴리펩티드를 제공한다.

특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은, 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 단백질의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열의 구체적으로 정의된 임의 다른 단편을 갖는 PRO 폴리펩티드와의 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO 폴리펩티드에 관한 것이다.

추가의 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 ATCC에 기탁된 사람 단백질 cDNA 중 임의의 것에 의해 코딩되는 아미노산 서열과의 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO 폴리펩티드에 관한 것이다.

추가의 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 아미노산 서열, 또는 본원에 개시된 바와 같은, 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 단백질의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열의 구체적으로 정의된 임의 다른 단편을 갖는 PRO 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교했을 때 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81% 이상, 더욱 바람직하게는 약 82% 이상, 더욱 바람직하게는 약 83% 이상, 더욱 바람직하게는 약 84% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85% 이상, 더욱 바람직하게는 약 86% 이상, 더욱 바람직하게는 약 87% 이상, 더욱 바람직하게는 약 88% 이상, 더욱 바람직하게는 약 89% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 91% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92% 이상, 더욱 바람직하게는 약 93% 이상, 더욱 바람직하게는 약 94% 이상, 더욱 바람직하게는 약 95% 이상, 더욱 바람직하게는 약 96% 이상, 더욱 바람직하게는 약 97% 이상, 더욱 바람직하게는 약 98% 이상, 더욱 바람직하게는 약 99% 이상이 포지티브인 것으로 기록되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 PRO 폴리펩티드에 관한 것이다.

특정 측면에서, 본 발명은 상기한 바와 같은 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되며, N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌을 갖지 않는 단리된 PRO 폴리펩티드를 제공한다. 또한, 본원에는 상기 단리된 PRO 폴리펩티드의 제조 방법도 기재되어 있으며, 이 방법에는 적합한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를, PRO 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 배양하고, 세포 배양물로부터 PRO 폴리펩티드를 회수하는 것이 포함된다.

또다른 측면에서, 본 발명은 막횡단 도메인이 결실 또는 실활화된 단리된 PRO 폴리펩티드를 제공한다. 또한, 본원에는 상기 단리된 PRO 폴리펩티드의 제조 방법도 기재되어 있으며, 이 방법에는 적합한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를, PRO 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 배양하고, 이 세포 배양물로부터 PRO 폴리펩티드를 회수하는 것이 포함된다.

또 다른 실시태양에서, 본 발명은 상기 정의한 바와 같은 천연 PRO 폴리펩티드의 아고니스트 및 길항제에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 아고니스트 또는 길항제는 항-PRO 항체 또는 작은 분자이다.

다른 한 실시태양에서, 본 발명은 PRO 폴리펩티드를 후보 분자와 접촉시키고 이 PRO 폴리펩티드에 의해 매개되는 생물학적 활성을 모니터링하는 것을 포함하는, PRO 폴리펩티드에 대한 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, PRO 폴리펩티드는 천연 PRO 폴리펩티드이다.

또다른 한 실시태양에서, 본 발명은 PRO 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 바와 같은 PRO 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다. 임의로, 담체는 제약상 허용되는 담체이다.

본 발명의 또다른 실시태양은 PRO 폴리펩티드, 그의 아고니스트 또는 길항제, 또는 항-PRO 항체에 대해 반응성인 증상의 치료에 유용한 약물의 제조에 있어서 PRO 폴리펩티드, 상기한 바와 같은 그의 아고니스트 또는 길항제, 또는 항-PRO 항체의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 천연 서열 PRO1800 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 1)을 나타내며, 여기에서 서열 1은 본원에서 'DNA35672-2508'로 지칭되는 클론이다.

도 2는 도 1에 나타낸 서열 1의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 2)을 나타낸다.

도 3은 천연 서열 PRO539 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 6)을 나타내며, 여기에서 서열 6은 본원에서 'DNA47465-1561'로 지칭되는 클론이다.
도 4는 도 3에 나타낸 서열 6의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 7)을 나타낸다.
도 5는 천연 서열 PRO982 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 8)을 나타내며, 여기에서 서열 8은 본원에서 'DNA57700-1408'로 지칭되는 클론이다.
도 6은 도 5에 나타낸 서열 8의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 9)을 나타낸다.
도 7은 천연 서열 PRO1434 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 10)을 나타내며, 여기에서 서열 10 는 본원에서 'DNA68818-2536'으로 지칭되는 클론이다.
도 8은 도 7에 나타낸 서열 10의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 11)을 나타낸다.
도 9는 천연 서열 PRO1863 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 15)을 나타내며, 여기에서 서열 15은 본원에서 'DNA59847-2510'으로 지칭되는 클론이다.
도 10은 도 9에 나타낸 서열 15의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 16)을 나타낸다.
도 11은 천연 서열 PRO1917 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 17)을 나타내며, 여기에서 서열 17는 본원에서 'DNA76400-2528'로 지칭되는 클론이다.
도 12는 도 11에 나타낸 서열 17의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 18)을 나타낸다.
도 13은 천연 서열 PRO1868 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 19)을 나타내며, 여기에서 서열 19은 본원에서 'DNA77624-2515'로 지칭되는 클론이다.
도 14는 도 13에 나타낸 서열 19의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 20)을 나타낸다.
도 15는 천연 서열 PRO3434 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 21)을 나타내며, 여기에서 서열 21은 본원에서 'DNA77631-2537'로 지칭되는 클론이다.
도 16은 도 15에 나타낸 서열 21의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 22)을 나타낸다.
도 17은 천연 서열 PRO1927 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열 23)을 나타내며, 여기에서 서열 23는 본원에서 'DNA82307-2531'로 지칭되는 클론이다.
도 18은 도 17에 나타낸 서열 23의 코딩 서열로부터 유도된 아미노산 서열(서열 24)을 나타낸다.

<바람직한 실시태양의 상세한 설명>

Ⅰ. 정의

'PRO 폴리펩티드' 및 'PRO'란 본원에서 사용된 바와 같이 바로 뒤에 숫자가 붙어서 다양한 폴리펩티드를 의미하는데, 여기서 완전한 명칭(즉, PRO/숫자)은 본원에 기재된 특정 폴리펩티드 서열을 의미한다. 본 명세서에 사용된 'PRO/숫자 폴리펩티드' 및 'PRO/숫자'(여기서, 숫자 부분은 실제 수로 나타냄)는 천연 서열 폴리펩티드 및 폴리펩티드 변이체(본원에서 추가로 정의됨)를 포함하는 용어이다. 본원에 기재된 PRO 폴리펩티드는 인간 조직 유형 또는 다른 출처와 같은 다양한 출 처로부터 단리할 수 있거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조할 수 있다.

'천연 서열 PRO 폴리펩티드'는 자연으로부터 유도된 대응하는 PRO 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연 서열 PRO 폴리펩티드는 자연으로부터 단리할 수 있거나 재조합 또는 합성 방법으로 제조할 수 있다. 용어 '천연 서열 PRO 폴리펩티드'는 구체적으로는 특정 PRO 폴리펩티드의 천연 말단 절단(truncated) 또는 분비 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 이러한 폴리펩티드의 천연 변이체 형태(예를 들어, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 천연 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 여러 실시태양에서, 본원에서 설명된 천연 서열 PRO 폴리펩티드는 수반하는 도면에 나타낸 전장 아미노산 서열을 포함하는 성숙 또는 전장 천연 서열 폴리펩티드이다. 개시 및 종결 코돈은 도면에서 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된다. 그러나, 본원에서 수반하는 도면에 개시된 PRO 폴리펩티드는 도면에서 아미노산 위치 1로 지칭되는 메티오닌 잔기로 시작하는 것으로 나타나 있지만, 도면에서 아미노산 위치 1로부터 위쪽 또는 아래쪽에 위치한 다른 메티오닌 잔기가 PRO 폴리펩티드에 대한 출발 아미노산 잔기로 이용될 수 있음을 생각할 수 있으며 또한 가능하다.

PRO 폴리펩티드의 '세포외 도메인' 또는 'ECD'란 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 없는 PRO 폴리펩티드의 형태를 의미한다. 통상적으로, PRO 폴리펩티드 ECD는 막횡단 및(또는) 세포질 도메인을 1% 미만으로 포함하며, 바람직하게는 상기 도메인들을 0.5% 미만으로 포함한다. 본 발명의 PRO 폴리펩티드에서 확인된 임의 막횡단 도메인은 당업계에서 소수성 도메인 유형을 밝히는데 통상적으로 사용 되는 기준에 따라 확인된 것임을 알 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계선은 다를 수 있지만, 대부분은 본원에서 처음 확인된 도메인의 말단에서 약 5개의 아미노산에만 존재할 뿐이다. 따라서, PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인은 경우에 따라 실시예 및 상세한 설명에서 확인된 막횡단 도메인/세포외 도메인 경계의 양측에 약 5개 이하의 아미노산을 포함할 수 있고, 연결된 신호 펩티드가 있거나 없는 이러한 폴리펩티드, 및 이들을 코딩하는 핵산은 본 발명에 포함된다.

본원에 개시된 다양한 PRO 폴리펩티드의 '신호 펩티드'의 대략적인 위치는 발명의 상세한 설명 및(또는) 수반하는 도면에 나타나 있다. 그러나, 신호 펩티드의 C-말단의 경계는 다를 수 있지만, 대부분은 본원에서 처음 확인된 신호 펩티드의 C-말단부 경계의 양측에서 약 5개의 아미노산에만 있을 뿐임을 주목해야 하며, 여기서 신호 펩티드의 C-말단 경계는 당업계에서 아미노산 서열 요소의 타입을 확인하는데 통상적으로 이용되는 기준에 따라 확인할 수 있다[예를 들어, 니엘센(Nielsen) 등의 문헌[Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)] 및 하이네(von Heinje) 등의 문헌[Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)]]. 게다가, 어떤 경우에는 분비 폴리펩티드에 있는 신호 서열의 절단이 전체적으로 동일하지 않아 한가지 이상의 분비 폴리펩티드가 생성된다는 것을 알아야 한다. 본원에서 확인된 신호 펩티드의 C-말단부 경계의 양측에 있는 약 5개의 아미노산에서만 신호 펩티드가 절단되는 폴리펩티드, 및 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 포함된다.

'PRO 폴리펩티드 변이체'는, 본원에 개시된 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 전장 PRO 폴리펩티드 서열의 임의 다른 단편과 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는, 상기 또는 하기에 정의된 활성 PRO 폴리펩티드을 의미한다. 이러한 PRO 폴리펩티드 변이체로는 예를 들어 전장 천연 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 부가되거나 결실된 PRO 폴리펩티드가 포함된다. 통상적으로, PRO 폴리펩티드 변이체는 본원에 개시된 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 전장 PRO 폴리펩티드 서열의 구체적으로 정의된 임의 다른 단편과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상, 바람직하게는 약 81 % 이상, 더 바람직하게는 약 82 % 이상, 더 바람직하게는 약 83 % 이상, 더 바람직하게는 약 84 % 이상, 더 바람직하게는 약 85 % 이상, 더 바람직하게는 약 86 % 이상, 더 바람직하게는 약 87 % 이상, 더 바람직하게는 약 88 % 이상, 더 바람직하게는 약 89 % 이상, 더 바람직하게는 약 90% 이상, 더 바람직하게는 약 91 % 이상, 더 바람직하게는 92 % 이상, 더 바람직하게는 약 93 % 이상, 더 바람직하게는 약 94 % 이상, 더 바람직하게는 약 95% 이상, 더 바람직하게는 약 96 % 이상, 더 바람직하게는 약 97 % 이상, 더 바람직하게는 약 98 % 이상, 가장 바람직하게는 약 99 % 이상이다. 통상적으로, PRO 변이체 폴리펩티드는 그 길이가 약 10개 이상의 아미노산, 흔히 약 20개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 30개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 40개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 50개 이상의 아미노산, 더 흔히 는 약 60개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 70개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 80 개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 90 개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 100 개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 150 개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 200 개 이상의 아미노산, 더 흔히는 약 300 개 이상의 아미노산 또는 그 이상이다.

본원에서 밝혀진 PRO 폴리펩티드 서열에 대한 '아미노산 서열 동일성(%)'은 특정 PRO 폴리펩티드 서열과 그와 아미노산 잔기가 동일한 후보 서열을 정렬하고, 필요한 경우 서열 동일성 비율의 최대치를 얻기 위해 갭을 도입한 후, 어떠한 보존적 치환도 동일한 서열 부분으로 간주하지 않은 상태에서, 특정 PRO 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열의 아미노산 잔기의 비율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 비율을 측정하기 위한 정렬은 당업계의 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업계의 숙련가라면 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대로 정렬시키는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬을 측정하기 위해 적합한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상 아미노산 서열 동일성 값(%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 구하며, 여기서 ALIGN-2 프로그램에 대한 완전한 원시 코드는 하기 표 1에 제공되어 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨텍, 인크사(Genentech, Inc.)가 개발하였으며, 하기 표 1에 나타낸 원시 코드는 미국 저작권청(20559 워싱톤 D.C.에 소재)의 사용자 문서로 보관되어 있으며, 상기 코드는 미국 저작권 등록번호 제TXU510087호로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨 텍, 인크사(캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재)를 통해 공개적으로 이용할 수 있거나, 하기 표 1에 기재된 원시 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체체, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D에서 편집되어 이용될 수 있다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 바뀌지 않는다.

ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성(%)(이는 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 어느 정도의 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 달리 표현할 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

$X/Y \times 100$

여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 A와 B의 프로그램 정렬에서 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성(%)이 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성(%)과 같지 않음은 물론이다. 이 방법을 이용한 아미노산 서열 동일성(%) 계산의 예로서, 하기 표 2 및 3은 'PRO'로 지칭되는 아미노산 서열에 대한 '비교 단백질'로 지칭하는 아미노산 서열의 아미노산 서열 동일성(%)을 계산하는 방법을 나타내는데, 여기서 'PRO'는 추정의 당해 PRO 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내고, '비교 단백질'은 당해 'PRO' 폴리펩티드가 비교되는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내며, 'X,' 'Y' 및 'Z'는 각각 상이한 추정의 아미노산 잔기를 나타낸다.

달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 본원에 이용된 모든 아미노산 서열 동일성 값(%)은 바로 앞선 단락에 기재된 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 얻는다. 그러나, 아미노산 서열 동일성 값(%)은 하기에 기재된 바와 같이 WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램[알츠슐(Altschul) 등의 문헌[Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)]]을 이용하여 구할 수도 있다. WU-BLAST-2 검색 파라미터 대부분은 디폴트값으로 설정된다. 디폴트값으로 설정하지 않은 것들 즉, 조정가능한 파라미터는 다음 값으로 설정된다: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, 및 scoring matrix = BLOSUM62. WU-BLAST-2가 사용되는 경우, 아미노산 서열 동일성 값(%)은, (a) 천연 PRO 폴리펩티드로부터 유도된 서열을 갖는 당해 PRO 폴리펩티드의 아미노산 서열과 당해 비교 아미노산 서열(즉, 당해 PRO 폴리펩티드가 비교되는 서열은 PRO 변이체 폴리펩티드일 수 있음) 사이의 매치되는 동일한 아미노산 잔기의 수를 WU-BLAST-2에 의해 결정하여 얻고, 이를 (b) 당해 PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수로 나누어 결정한다. 예를 들어, 아미노산 서열 B와 80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 A를 포함하는 폴리펩티드'라는 말에서, 아미노산 서열 A는 당해 비교 아미노산 서열이고 아미노산 서열 B는 당해 PRO 폴리펩티드의 아미노산 서열이다.

아미노산 서열 동일성(%)은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2를 이용하여 계산할 수도 있다[알츠슐(Altschul) 등의 문헌[Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)]]. 이 NCBI-BLAST2 서열 비교 프로그램은 웹 사이트(http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)로부터 다운로드 받을 수 있다. NCBI-BLAST2는 몇가지 검색 파라미터를 이용하는데, 여기서 예를 들어, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 및 scoring matrix = BLOSUM62를 포함한 모든 검색 파라미터는 디폴트 값으로 설정된다.

NCBI-BLAST2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성(%)(또는, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 어느 정도의 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현할 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

X/Y ×100

여기서, X는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에 의해 A와 B의 프로그램 정렬에서 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성(%)이 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성(%)과 같지 않음은 물론이다.

'PRO 변이체 폴리뉴클레오티드' 또는 'PRO 변이체 핵산 서열'은 하기 정의된 바와 같은 활성 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자로서, 본원에 개시된 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 PRO 폴리핍티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 서열이 있거나 없는 PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 전장 PRO 폴리펩티드 서열의 임의 다른 단편을 코딩하는 핵산 서열과의 핵산 서열 동일성이 약 80 % 이상인 핵산 분자이다. 통상적으로, PRO 변이체 폴리뉴클레오티드는, 본원에 개시된 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 서열이 있거나 없는 PRO 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 전장 PRO 폴리펩티드 서열의 임의 다른 단편을 코딩하는 핵산 서열과의 핵산 서열 동일성이 약 80 % 이상, 더 바람직하게는 약 81 % 이상, 더 바람직하게는 약 82 % 이상, 더 바람직하게는 약 83 % 이상, 더 바람직하게는 약 84 % 이상, 더 바람직하게는 약 85 % 이상, 더 바람직하게는 약 86 % 이상, 더 바람직하게는 약 87 % 이상, 더 바람직하게는 약 88 % 이상, 더 바람직하게는 약 89 % 이상, 더 바람직하게는 약 90 % 이상, 더 바람직하게는 약 91 % 이상, 더 바람직하게는 약 92 % 이상, 더 바람직하게는 약 93 % 이상, 더 바람직하게는 약 94 % 이상, 더 바람직하게는 약 95 % 이상, 더 바람직하게는 약 96 % 이상, 더 바람직하게는 약 97 % 이상, 더 바람직하게는 약 98 % 이상이고, 가장 바람직하게는 약 99 % 이상일 것이다. 변이체들은 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

통상적으로, PRO 변이체 폴리뉴클레오티드는 그 길이가 약 30개 이상의 뉴클 레오티드, 흔히는 약 60 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 90 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 120 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 150 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 180 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 210 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 240 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 270 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 300 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 450 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 600 개 이상의 뉴클레오티드, 더 흔히는 약 900 개 이상의 뉴클레오티드, 또는 그 이상이다.

본원에서 확인된 PRO-코딩 핵산 서열에 대한 '핵산 서열 동일성(%)'은 당해 PRO 핵산 서열과 후보 서열을 정렬시키고, 필요한 경우 서열 동일성의 최대치를 얻기 위해 갭을 도입한 후, 당해 PRO 핵산 서열의 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열의 뉴클레오티드의 비율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성(%)을 측정하기 위한 정렬은 당업자에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상 핵산 서열 동일성 값(%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 얻을 수 있으며, 여기서 ALIGN-2 프로그램에 대한 완전한 원시 코드는 하기 표 1에 기재되어 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨텍, 인크사가 개발하였으며, 하기 표 1에 나타낸 원시 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱톤 D.C.에 소재)의 사용자 문서로 보관되어 있는데, 이 코드는 미국 저작권 등록번호 제TXU510087호로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨텍, 인크사 (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재)를 통해 공개 적으로 이용할 수 있거나, 하기 표 1에 기재된 원시 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체체, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D에서 편집되어 사용될 수 있다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 바뀌지 않는다.

ALIGN-2가 핵산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 주어진 핵산 서열 D와의, 또는 주어진 핵산 서열 D에 대비한 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성(%)(또는, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 주어진 핵산 서열 D와의, 또는 주어진 핵산 서열 D에 대비한 어느 정도의 핵산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C로 표현할 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

W/Z ×100

여기서, W는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 C와 D의 프로그램 정렬에서 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D의 뉴클레오티드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 같지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성(%)이 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성(%)과 같지 않음은 물론이다. 핵산 서열 동일성(%) 계산의 예로서, 하기 표 4 및 5는 '비교 DNA'로 지칭되는 핵산 서열과 'PRO-DNA'로 지칭되는 핵산 서열의 핵산 서열 동일성(%)을 계산하는 방법을 나타내는데, 여기서 'PRO-DNA'는 추정의 당해 PRO-코딩 핵산 서열을 나태니고, '비교 DNA'는 당해 'PRO-DNA' 핵산 분자가 비교되는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 나타내며, 'N,' 'L' 및 'V'는 각각 상이한 추정의 뉴클레오티드를 나타낸다.

달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 본원에 이용된 모든 핵산 서열 동일성 값(%)은 바로 앞선 단락에 기재된 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 구한다. 그러나, 핵산 서열 동일성 값(%)은 하기에 기재된 바와 같이 WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 구할 수도 있다[알츠슐(Altschul) 등의 문헌[Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)]. WU-BLAST-2 검색 파라미터 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 디폴트값으로 설정하지 않은 것들 즉, 조정가능한 파라미터는 다음 값으로 설정된다: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, 및 scoring matrix = BLOSUM62. WU-BLAST-2가 사용되는 경우, 핵산 서열 동일성 값(%)은, (a) WU-BLAST-2에 의해 천연 서열 PRO 폴리펩티드-코딩 핵산으로부터 유도된 서열을 갖는 당해 PRO 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 핵산 서열과 당해 비교 핵산 분자(즉, 당해 PRO 폴리펩티드-코딩 핵산 분자가 비교되는 서열은 변이체 PRO 폴리뉴클레오티드일 수 있음) 사이의 매치되는 동일한 뉴클레오티드의 수를 결정하고, 이를 (b) 당해 PRO 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 뉴클레오티드의 총 수로 나누어 결정한다. 예를 들어, '핵산 서열 B와 80% 이상의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산 서열 A를 포함하는 단리된 핵산 분자'라는 말에서, 핵산 서열 A는 당해 비교 핵산 서열이고 핵산 서열 B는 당해 PRO 폴리펩티드-코딩 핵산 분자의 핵산 서열이다.

핵산 서열 동일성(%)은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2를 이용하여 계산할 수도 있다[알츠슐(Altschul) 등의 문헌[Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)]]. 상기 NCBI-BLAST2 서열 비교 프로그램은 웹 사이트(http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)로부터 다운로드 받을 수 있다. NCBI-BLAST2는 몇가지 검색 파라미터를 이용하는데, 여기서 예를 들어 unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 및 scoring matrix = BLOSUM62를 포함한 모든 검색 파라미터는 디폴트 값으로 설정된다.

NCBI-BLAST2가 서열 비교에 사용되는 경우, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 주어진 핵산 서열 D와의, 또는 주어진 핵산 서열 D에 대비한 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성(%)(또는, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 주어진 핵산 서열 D와의, 또는 주어진 핵산 서열 D에 대비한 어느 정도의 핵산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C로 표현할 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

$$W/Z \times 100$$

여기서, W는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에 의해 C와 D의 프로그램 정렬에서 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 뉴클레오티드의 수이고, Z는 D의 뉴클레오티드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 같지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성(%)이 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 (%)과 같지 않음은 물론이다.

다른 실시태양에서 PRO 변이체 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 전장 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 (바람직하게는, 엄격 혼성화 조건 및 세척 조건에서) 혼성화할 수 있는, 활성 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자이 다. PRO 변이체 폴리펩티드는 PRO 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

상기한 바와 같이 수행되는 서열 비교와 관련하여 '포지티브'라는 용어는 동일하지는 않으나 유사한 특성을 갖는 비교되는 서열의 잔기를 포함한다는 의미이다(예를 들어, 보존적 치환의 결과로는 하기 표 6 참조). 본원의 목적을 달성하기 위해, 포지티브 값(%)은 (a) 천연 PRO 폴리펩티드 서열로부터 유도된 서열을 갖는 당해 PRO 폴리펩티드 아미노산 서열과 당해 비교 아미노산 서열(즉, PRO 폴리펩티드 서열이 비교되는 아미노산 서열) 사이에서 포지티브 값을 기록한 아미노산 잔기의 수를 WU-BLAST-2의 BLOSUM 62 매트릭스에서 결정한 후, 이를 (b) 당해 PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수로 나누어 결정한다.

달리 구체적으로 언급하지 않는 한, 포지티브 값(%)은 바로 앞선 단락에 기재된 바와 같이 계산한다. 그러나, 상기 ALIGN-2 및 NCBI-BLAST2에 대해 기재한 바와 같이 수행되는 아미노산 서열 동일성의 비교에는 동일할뿐 아니라 유사한 특성을 갖는 비교되는 서열의 아미노산 잔기가 포함된다. 당해 아미노산 잔기에 대해 포지티브 값을 기록하는 아미노산 잔기는 당해 아미노산 잔기와 동일한 잔기이거나 또는 당해 아미노산 잔기의 바람직한 치환체(하기 표 6에 기재되어 있음)인 잔기이다.

ALIGN-2 또는 NCBI-BLAST2를 이용한 아미노산 서열 비교의 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 포지티브 값(%)(주어진 아미노산 서열 B에 대 한, B와의, 또는 B에 대비한 어느 정도의 포지티브 값(%)을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 달리 표현할 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

$$X/Y \times 100$$

여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2 또는 NCBI-BLAST2에 의해 A와 B의 프로그램 정렬에서 상기 정의된 포지티브 값을 기록하는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않는 경우, B에 대한 A의 포지티브 값(%)이 A에 대한 B의 포지티브 값(%)과 같지 않음은 물론이다.

본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 기술하기 위해 사용된 '단리된'은 그의 자연 환경 요소로부터 확인, 분리 및(또는) 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 폴리펩티드의 자연 환경의 오염 요소는 통상적으로 이 폴리펩티드의 진단 또는 치료적 사용을 방해하는 물질로서, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질 등이 있을 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로 정제되거나, 또는 (2) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색(silver stain)을 사용하여 비환원 조건 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에서 하나의 밴드만 나타날 정도로 정제된다. 자연 환경에는 PRO 폴리펩티드의 요소가 한가지 이상 존재하지 않을 것이기 때문에, 단리된 폴리펩티드는 재조합 세포 내에 존재하는 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 단리된 폴리펩티드는 통상적으로 하나 이상의 정제 단계에 의해 얻어질 것이다.

'단리된' PRO 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 통상적으로 천연 출처의 PRO 폴리펩티드 핵산과 관계가 있는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 상태와는 다르다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 천연 세포내에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와는 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자에는 예를 들어 천연 세포의 염색체와 상이한 염색체 위치에 존재하며 통상적으로 상기 폴리펩티드를 발현하는 세포에 포함된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자가 포함된다.

용어 '조절 서열'이란 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열이다. 원핵생물에 적합한 조절 서열에는 예를 들어 프로모터, 경우에 따라 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위가 포함된다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 '작동가능하게 연결'되는 것이다. 예를 들면, 전서열(presequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 그가 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 DNA와 작동가능하게 연결된 것이고, 프로모터 또는 인핸서는 그가 코딩 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이며, 리보솜 결합 부위는 그가 번역을 촉진하게끔 배치되는 경우 코딩 서열과 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, '작동가능하게 연결된'은 연결될 DNA 서열들이 인접하고 있음을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 위치하며 리딩 부위내에 있 음을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하고 있을 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.

용어 '항체'는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 예를 들어 한가지 항-PRO 모노클로날 항체 (아고니스트, 길항제 및 중화 항체를 포함), 폴리에피토프 특이성이 있는 항-PRO 항체 조성물, 단쇄 항-PRO 항체, 및 항-PRO 항체 단편(하기 참조)을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 '모노클로날 항체'는 사실상 동종 항체들의 집단으로부터 얻은 항체, 즉, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외한, 한 집단을 이루는 개별 항체를 의미한다.

혼성화 반응의 '엄격도'는 당업자가 용이하게 결정할 수 있으며, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도, 염 농도에 따라 달라지는 실험적 계산값이다. 일반적으로 보다 긴 프로브는 적절한 어닐링을 위해 보다 높은 온도를 필요로하며, 보다 짧은 프로브는 보다 낮은 온도를 필요로 한다. 일반적으로, 혼성화는 상보적 가닥이 그의 용융 온도 미만의 환경에 존재할 때의 변성된 DNA의 리어닐링 능력에 따라 달라진다. 프로브와 혼성화가능한 서열 사이의 원하는 상동성의 정도가 높을수록, 이용할 수 있는 상대 온도가 높아진다. 그 결과, 더 높은 상대 온도에서 반응 조건은 더욱 엄격해지는 반면, 더 낮은 상대 온도에서 반응조건은 덜 엄격해진다. 혼성화 반응의 엄격도에 관한 더 자세한 정보 및 설명은 아우수벨(Ausubel) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)]을 참조한다.

본원에서 정의되는 '엄격 조건' 또는 '고 엄격 조건'이란 (1) 세척시 이온 농도가 낮고 온도는 높은 조건, 예를 들면 50 ℃에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1 % 소듐 도데실 술페이트를 사용하는 조건, (2) 혼성화 동안 예를 들어 42 ℃에서 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨이 함유된 0.1 % 소 혈청 알부민/0.1 % 피콜(Ficoll)/0.1 % 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.5)과 함께 50 % (v/v) 포름아미드와 같은 변성제를 사용하는 조건, 또는 (3) 42 ℃에서 50 % 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1 % 피로인산 나트륨, 5 x 덴하르트(Denhardt's) 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 μg/ml), 0.1 % SDS, 및 10 % 덱스트란 술페이트를 사용하고, 42 ℃에서 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨) 및 55 ℃에서 50 % 포름아미드 중에 세척한 다음, 55 ℃에서 EDTA 함유 0.1 x SSC로의 고-엄격 세척을 수행하는 것이다. '중간 엄격 조건'이란 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual , New York: Cold Spring Harbor Press 1989]에 기재된 바와 같고, 상기한 것보다 엄격성이 낮은 세척 용액 및 혼성화 조건(예를 들어, 온도, 이온 농도 및 %SDS)의 사용을 포함한다. 중간 엄격 조건의 예로는 20 % 포름아미드, 5 x SSC(150 mM NaCl, 15 mM 트리소듐 시트레이트), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트(Denhardt) 용액, 10% 덱스트란 술페이트 및 변성된 잘린 연어 정액 DNA 20 mg/ml을 포함하는 용액 중에서 37℃로 밤새 인큐베이션한 후 필터를 약 37 내지 50℃에서 1 x SSC로 세척하는 조건을 들 수 있다. 당업계의 숙련가라면 프로브 길 이 등과 같은 인자를 맞추기 위해 필요한 온도, 및 이온 농도 등을 조절하는 방법을 잘 알 것이다.

본원에 사용된 '에피토프 태그된'이란 용어는 '태그 폴리펩티드'와 융합된 PRO 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 의미한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 만들어질 수 있게 하는 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 갖지만 충분히 짧아서 그가 융합되는 폴리펩티드의 활성을 방해하지는 않는다. 또한, 태그 폴리펩티드는 매우 특이적이어서 그에 대한 항체가 실제로 다른 에피토프와는 교차반응하지 않는 것이 바람직하다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기를 가지며, 통상적으로 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기(바람직하게는 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

본원에 사용된 용어 '이뮤노어드헤신'은 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 이종 단백질 (어드헤신)의 결합 특이성을 겸비한 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로는, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 부위 및 결합 부위가 아닌(즉, 이종의), 소정의 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 통상적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 IgG-1, IgG-2, IgG-3 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2를 포함), IgE, IgD 또는 IgM과 같은 임의 이뮤노글로불린으로부터 얻을 수 있다.

본원에서 사용된 용어 '활성의' 또는 '활성'은 천연 또는 자연-발생 PRO의 생물학적 활성 및(또는) 면역학적 활성을 보유하는 PRO 폴리펩티드의 형태를 의미하는데, 여기서 '생물학적' 활성이란, 천연 또는 자연-발생 PRO가 보유하는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유도하는 능력이 아니라, 천연 또는 자연-발생 PRO에 의해 유발된 생물학적

기능(억제 또는 촉진 기능)을 말하며, '면역학적' 활성이란 천연 또는 자연발생 PRO가 보유하는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유도하는 능력을 말한다.
용어 '길항제'는 가장 넓은 의미로 사용되며, 본원에 개시된 천연 PRO 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화시키는 임의 분자를 포함한다. 마찬가지로, 용어 '아고니스트'도 가장 넓은 의미로 사용되며, 본원에 개시된 천연 PRO 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방한 임의 분자를 포함한다. 적합한 아고니스트 또는 길항제 분자에는 특히 아고니스트 또는 길항제 항체 또는 항체 단편, 천연 PRO 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 유기분자 등이 포함된다. PRO 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법에는 PRO 폴리펩티드를 후보 아고니스트 분자 또는 후보 길항제 분자와 접촉시키고, 통상적으로 PRO 폴리펩티드와 관련된 한가지 이상의 생물학적 활성에서 검출가능한 변화를 측정하는 것이 포함될 수 있다.
'치료'는 대상의 병리학적 증상 또는 질환을 예방하거나 또는 늦추기(완화하기) 위한 목적으로 수행되는 치료 처치 및 예방 또는 방지 조치를 의미한다. 치료를 요하는 대상에는 이미 질병을 앓고 있는 대상뿐 아니라 질병에 걸리기 쉬운 대 상 또는 질병을 예방하고자 하는 대상도 포함된다.
'만성' 투여란 급성 방식과 반대로 연속 방식으로 물질을 투여하여, 초기 치료 효과 (활성)를 장기간 동안 유지하는 것을 말한다. '간헐적' 투여는 중단없이 계속해서 행하는 것이 아니라 사실상 주기적으로 이루어지는 처치를 의미한다.
치료를 위한 '포유동물'은 사람, 가축 및 사육 동물, 및 동물원용, 경기용 또는 애완용 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소 및 토끼 등을 포함하는 포유동물로서 분류되는 임의 동물을 말한다. 바람직한 포유동물은 사람이다.
한가지 이상의 다른 치료제와 '병용하여' 투여한다는 것은 동시(함께) 투여하거나 임의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다.
본원에서 사용되는 '담체'에는 사용되는 투여량 및 농도에 노출되는 세포 또는 포유동물에 대해 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제가 포함된다. 생리학상 허용되는 담체는 흔히 pH 완충 수용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예에는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산을 포함한 항산화제; 저분자량(잔기가 약 10개 미만인) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜; 나트륨과 같은 염-형성 카운터이온; 및(또는) 트윈(TWEEN), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 플루로닉 스(PLURONICS, 등록상표)와 같은 비이온성 계면활성제가 포함된다.
'항체 단편'에는 온전한 항체의 일부, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역이 포함된다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체[자파타(Zapata) 등의 문헌[Protein Eng. 8 (10):1057-1062 (1995)], 단쇄 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.
항체를 파파인(Papain) 분해하면 동일한 항원 결합 단편 두가지, 즉 단일 항원-결합 부위가 있는 'Fab' 단편, 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하여 명명된 나머지 'Fc' 단편이 생성된다. 펩신으로 처리하면, 두개의 항원 결합 부위가 있으며 항원과 교차결합할 수도 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.
'Fv'는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 포함하는 최소의 항체 단편이다. 이 영역은 단단하게 비공유결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인의 이합체로 이루어진다. 이 형태에서 각 가변 도메인의 CDR 3개가 상호작용하여 V_H-V_L 이합체의 표면에 항원-결합 부위를 형성한다. 결론적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도, 전체 결합 부위보다 친화성은 낮지만 항원을 인식하여 그와 결합하는 능력을 갖는다.
또한, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함한다. Fab 단편은 항체의 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하 는 중쇄의 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기가 부가되어 있다는 점에서 Fab' 단편과 다르다. 본원에서 Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 지칭한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인이 있는 몇쌍의 Fab' 단편으로 생산되었다. 또한, 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.
임의의 척추동물 종으로부터의 항체(이뮤노글로불린)의 '경쇄'는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 분명하게 다른 두가지 타입 중의 하나에 속할 수 있다.
이뮤노글로불린은 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 다른 군에 속할 수 있다. 이뮤노글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5가지 주요 군이 있으며, 이들 중 몇몇은 하위군(이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 더 분류될 수 있다.
'단쇄 Fv' 또는 'sFv' 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇄에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는, sFv가 항원의 결합에 요구되는 구조를 형성할 수 있게끔 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다[sFv에 대해서는 플룩턴(Pluckthan)의 문헌[The Pharmacology of Monoclonal Antibodies , vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조].
용어 '디아바디 (diabody)'는 동일한 폴리펩티드 쇄 (V_H-V_L) 내에 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 말한다. 너무 짧아서 동일 쇄 상의 2개의 도메인을 연결시킬 수 없는 링커를 사용하여, 도메인을 다른 쇄의 상보적 도메인과 연결시킴으로써 2개의 항원-결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는 예를 들어 유럽 특허 제404,097호, WO93/11611 및 홀링거(Hollinger) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

'단리된' 항체란 그의 자연 환경의 요소로부터 확인, 분리 및(또는) 회수된 항체이다. 자연 환경의 항체 오염 요소는 항체의 진단 또는 치료적 사용을 방해하는 물질로서, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정한 바로는 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상으로, (2) 스피닝 컵(spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산의 잔기 15개 이상을 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 조건 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 하나의 밴드로 정제될 것이다. 단리된 항체에는 자연 환경에 한가지 이상의 항체 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 항체가 포함된다. 그러나, 단리된 항체는 통상적으로 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

본원에 사용된 '표지 (label)'라는 용어는 항체와 직접 또는 간접적으로 복합체를 이루어 '표지된' 항체를 생성시키는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 말한 다. 표지는 그 자체(예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광성 표지)로 검출되거나 또는 효소 표지인 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉진시킬 수 있다.

'고상(solid phase)'은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함된 고상의 예에는 부분 또는 전체가 유리(예를 들어, 조절된 공극 유리), 다당류(예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘을 소재로 형성된 것들이 포함된다. 어떤 실시태양에서, 상황에 따라 고상이 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있으며, 다른 실시태양에서는 고상은 정제 컬럼(예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼)이다. 또한, 이 용어는 미국 특허 제4,275,149호에 기재된 것과 같은 비연속적 고상의 개별 입자를 포함한다.

'리포좀'은 약물 (예를 들어, PRO 폴리펩티드 또는 그에 대한 항체)을 포유동물에게 전달하는데 유용한 여러 형태의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 이루어진 작은 소포(vesicle)이다. 리포좀 성분은 통상적으로 생체막의 지질 배열과 유사하게 이중층 형태로 배열된다.

본원에서 '작은 분자'는 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 정의된다.

[표 1a]

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int     _day[26][26] = {
/*      A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */    { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0, _M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */    { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2, _M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */    {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4, _M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */    { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2, _M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */    { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1, _M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */    {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4, _M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */    { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0, _M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */    {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2, _M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2, _M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1, _M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */    {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0, 3, 6, 4,-3, _M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2, 2, 0,-1,-2},
/* M */    {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2, _M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2, _M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, _M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1, _M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1, _M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0, _M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2, _M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4, _M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2, _M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

[표 1b]

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

Page 1 of nw.h

[표 1c]

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                    main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                    /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();           /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();     /* get the actual jmps */
        print();        /* print stats, alignment */

        cleanup(0);     /* unlink any tmp files */
}
```

Page 1 of nw.c

[표 1d]

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;

        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

[표 1e]

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

Page 3 of nw.c

[표 1f]


```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}
```

[표 1g]

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                         print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
}
```

[표 1h]

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;

        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;

        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

[표 1i]

```
        fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);                    ...getmat
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);

        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                                                    pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];
        }                                                                     Page 3 of nwprint.c
```

[표 1j]

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;

                        more++;

                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;

                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
        register  i;

        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

dumpblock

[표 1k]

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                                    nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;

        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                                 putline
        int     ix;
{                                                                   Page 5 of nwprint.c
```

[표 1l]

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                          stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

[표 1m]

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

stripname

[표 1n]

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;

int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;

        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

Page 1 of nwsubr.c

[표 1o]

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);

        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}

char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                   g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();

        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                              readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register  i, j, xx;

        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

[표 1p]


```
                        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
                        }
                        else
                                break;
                }
                if (i >= JMPS) {
                        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                        cleanup(1);
                }
                if (j >= 0) {
                        siz = dx[dmax].jp.n[j];
                        xx = dx[dmax].jp.x[j];
                        dmax += siz;
                        if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                                pp[1].n[i1] = -siz;
                                xx += siz;
                                /* id = xx - yy + len1 - 1
                                 */
                                pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                                gapy++;
                                ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                                siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                                i1++;
                        }
                        else if (siz > 0) {  /* gap in first seq */
                                pp[0].n[i0] = siz;
                                pp[0].x[i0] = xx;
                                gapx++;
                                ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                                siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                                i0++;
                        }
                }
                else
                        break;
        }

        /* reverse the order of jmps
         */
        for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
                i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
                i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
        }
        for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
                i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
                i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
        }
        if (fd >= 0)
                (void) close(fd);
        if (fj) {
                (void) unlink(jname);
                fj = 0;
                offset = 0;
        }
}
```

[표 1q]

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```


[표 2]

PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(아미노산 15개 길이)
비교 단백질	XXXXXYYYYYYY	(아미노산 12개 길이)

아미노산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 폴리펩티드 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 아미노산 잔기의 수) ÷ (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)=

5 ÷ 15 = 33.3%

[표 3]

PRO	XXXXXXXXXX	(아미노산 10개 길이)
비교 단백질	XXXXXYYYYYYZZYZ	(아미노산 15개 길이)

아미노산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 폴리펩티드 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 아미노산 잔기의 수) ÷ (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)-

5 ÷ 10 = 50%

[표 4]

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNN	(뉴클레오티드 14개 길이)
비교 DNA	NNNNNNLLLLLLLLL	(뉴클레오티드 16개 길이)

핵산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 핵산 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 뉴클레오티드의 수) ÷ (PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)=

6 ÷ 14 = 42.9%

[표 5]

PRO-DNA	NNNNNNNNNNN	(뉴클레오티드 12개 길이)
비교 DNA	NNNNLLLVV	(뉴클레오티드 9개 길이)

핵산 서열 동일성(%)=

(ALIGN-2에 의해 두 핵산 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 뉴클레오티드의 수) ÷ (PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)=

4 ÷ 12 = 33.3%

II. 본 발명의 조성물 및 방법

A. 전장 PRO 폴리펩티드

본 발명은 본원에서 PRO 폴리펩티드로 언급된 폴리펩티드를 코딩하는 새로이 확인되고 단리된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 특히, 하기 실시예에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 각종 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA를 확인하고 단리하였다. 별도의 발현 라운드에서 생산된 단백질의 PRO 숫자는 다를 수 있지만 UNQ 수는 임의의 주어진 DNA 및 그로부터 코딩된 단백질 특유의 것이며, 변하지 않을 것이다. 그러나, 본원에서는 간단하게, 본원에 개시된 전장의 천연 핵산 분자에 의해 코딩된 단백질, 및 상기 정의에 포함된 PRO의 다른 천연 동족체 및 변이체를 이들의 출처 및 제조 방식과 상관없이 'PRO/숫자'로 언급할 것이다.

하기 실시예에 기재된 바와 같이, 여러가지 cDNA 클론을 ATCC에 기탁하였다. 당업자라면 당업계의 일반적인 방법을 이용하여 기탁된 클론의 서열을 분석함으로써 상기 클론의 실제 뉴클레오티드 서열을 쉽게 결정할 수 있다. 일반적인 기술을 사용하여 뉴클레오티드 서열로부터 예상된 아미노산 서열을 결정할 수 있다. 본원에 기재된 PRO 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 핵산의 경우, 본 발명자들은 당시 이용할 수 있었던 서열 정보를 사용하여 가장 잘 확인할 수 있는 리딩 프레임으로 여겨지는 것을 확인하였다.

1. 전장 PRO1800 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 전장 천연 서열 PRO1800(도 2 및 서열 2에 나타냄)의 일부가 인간 Hep27 단백질(HE27_HUMAN)과 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO1800은 새로이 확인된 Hep27 동족체이며 이 단백질의 전형적인 활성을 가지는 것으로 현재 생각된다.

2. 전장 PRO539 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 전장 천연 서열 PRO539(도 4 및 서열 7에 나타냄)의 일부가 드로소필라 멜라노가스터의 키네신계 단백질(AF019250_1)의 일부와 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO539는 헤지호그(Hedgehog) 신호전달 경로의 단백질 족의 새로이 확인된 일원이며 초파리 코스탈(Costal)-2 단백질의 전형적인 활성을 가지는 것으로 현재 생각된다.

3. 전장 PRO982 폴리펩티드

알려진 바로는, DNA57700-1408 서열은 본원에서 PRO982로 지칭되는 새로운 분비 인자를 코딩한다. WU-BLAST 2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용한 결과, 공 지 단백질과 다소의 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다.

4. 전장 PRO1434 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 전장 천연 서열 PRO1434(도 8 및 서열 11에 나타냄)의 일부가 마우스 넬(nel) 단백질 전구체(NEL_MOUSE)와 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO1434는 새로이 확인된 넬 동족체이며 넬 단백질 족의 전형적인 활성을 가질 수 있는 것으로 현재 생각된다.

5. 전장 PRO1863 폴리펩티드

DNA59847-2510 클론을 인간의 전립선 조직 라이브러리로부터 단리하였다. 알려진 바로는, DNA59847-2510 서열은 본원에서 PRO1863으로 지칭되는 새로운 인자를 코딩하며, WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용한 결과, 임의 공지 단백질과의 서열 동일성은 크지 않음을 밝혀내었다.

6. 전장 PRO1917 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, PRO1917(도 12 및 서열 18에 나타냄)의 아미노산 41 내지 487이 데이호프 데이타베이스에서 'AF012714_1'로 지칭되는 이노시톨 포스파타제와 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO1917은 이노시톨 포스파타제 족의 새로이 확인된 일원이며 이노시톨 포스파타제의 전형적인 효소 활성을 가질 수 있는 것으로 현재 생각된다.

7. 전장 PRO1868 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 전장 천연 서열 PRO1868(도 14 및 서열 20에 나타냄)의 일부가 인간 A33 항원 단백질(P_W14146)과 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO1868은 A33 항원 단백질의 전형적인 활성 및(또는) 발현 패턴을 가질 수 있는 새로이 확인된 A33 항원 동족체인 것으로 현재 생각된다. PRO1868 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같은 염증성 질환 및 직장결장암의 치료 처치에 사용할 수 있다.

8. 전장 PRO3434 폴리펩티드

분비 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 선별하는 트랩핑 기술을 사용하여 DNA77631-2537 클론을 인간의 대동맥 조직의 라이브러리로부터 단리하였다. 알려진 바로는, DNA77631-2537 서열은 본원에서 PRO3434로 지칭되는 새로운 인자를 코딩하며, WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용한 결과, 임의 공지 단백질과의 서열 동일성은 크지 않음을 밝혀내었다.

9. 전장 PRO1927 폴리펩티드

본 발명자들은 WU-BLAST2 서열 정렬 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 전장 천연 서열 PRO1927(도 18, 서열 24)이 데이호프 데이타베이스에서 'AB000628_1'로 지칭되는 단백질의 아미노산 서열과 어느 정도 아미노산 서열 동일성이 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본원에 개시된 PRO1927은 글리코실트랜스퍼라제 단백질 족의 새로이 확인된 일원이며 글리코실화 활성을 가질 수 있는 것으로 현재 생각된다.

B. PRO 폴리펩티드 변이체

본원에 기재된 전장 천연 서열 PRO 폴리펩티드에 더하여, PRO 변이체를 제조할 수 있는 것으로 생각된다. PRO 변이체는, 적합한 뉴클레오티드 변화를 PRO DNA에 도입하고(하거나) 목적 PRO 폴리펩티드를 합성하여 제조할 수 있다. 당업자라면 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변경 또는 막 앵커링 특성의 변화와 같은 아미노산 변화가 RPO의 번역후 프로세싱을 변경시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

본원에서 설명되는 전장 천연 서열 PRO 또는 PRO의 여러 도메인에서의 변이는 예를 들어 미국 특허 제5,364,934호에 개시된 보존적 및 비보존적 돌연변이에 대한 임의 기술 및 지침을 사용하여 제조할 수 있다. 변이는 천연 서열 PRO와 비교시에 PRO의 아미노산 서열을 변화시키는, PRO를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 경우에 따라서는, 변이는 PRO의 하나 이상의 도메인 내의 하나 이상의 아미노산을 임의 다른 아미노산으로 치환함으로써 생성된다. 원하는 활성에 유해한 효과를 주지 않으면서 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는 아미노산 잔기는 PRO의 서열을 공지의 상동 단백질 분자의 서열과 비교하고 상동성이 높은 영역에서 생성된 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써 결정할 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조 및(또는) 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환, 예를 들어 루이신의 세린으로의 치환, 즉 아미노산의 보존적 치환의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산에서 발생할 수 있다. 허용되는 변이는 서열 내에 아미노산을 체계적으로 삽입, 결실 또는 치환시키고, 전장 또는 성숙 천연 서열에 의해 나타나는 생성된 변이체의 활성을 시험함으로써 정할 수 있다.

본원은 PRO 폴리펩티드 단편들을 제공한다. 예를 들어 전장 천연 단백질과 비교하는 경우, 이 단편들은 N-말단 또는 C-말단이 잘릴 수 있거나 또는 내부 잔기가 결손될 수 있다. 몇몇 단편은 본 발명의 PRO 폴리펩티드의 원하는 생물학적 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기가 결손되어 있다.

PRO 단편은 많은 통상의 기술 중 임의의 기술에 의해 제조할 수 있다. 원하는 펩티드 단편은 화학적으로 합성할 수 있다. 다른 방법은 효소적 분해 방법, 예를 들어 이 단백질을, 특정 아미노산 잔기에 의해 정해진 부위에서 단백질을 자르는 것으로 알려진 효소로 처리하거나 또는 이 DNA를 적합한 제한 효소로 잘라냄으로써 PRO 단편을 생성하는 단계 및 이 원하는 단편을 단리하는 단계를 포함한다. 그러나 또다른 적합한 기술은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 원하는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 단리하고 증폭하는 단계를 포함한다. DNA 단편의 원하는 말단부를 정하는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머로 사용된다. 바람직하게는, PRO 폴리펩티드 단편은 본원에서 개시된 천연 PRO 폴리펩티드와 한가지 이상의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 공유한다.

구체적인 실시태양에서, 목적물의 보존적 치환은 바람직한 치환이라는 표제로 표 6에 나타내었다. 이러한 치환에 의해 생물학적 활성이 변화하는 경우, 하기 표 6에서 치환예로서 명명되거나 또는 아미노산 종류에 대해서 하기에서 보다 상세하게 설명된 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝하였다.

[표 6]

본래 잔기	치환예	바람직한 치환예
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, lys, arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro, ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe, norleucine	leu
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala, phe	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe,ala, norleucine	leu

PRO 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서의 폴리펩티드 백본의 구조를, 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서 유지하거나, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성을 유지하거나, 또는 (c) 대부분의 측쇄를 유지하는 그의 효과를 상당히 변경시키는 치환을 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 다음과 같은 군으로 구분된다:
(1) 소수성: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
(2) 중성 친수성: cys, ser, thr;
(3) 산성: asp, glu;
(4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
(5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및
(6) 방향족; trp, tyr, phe.
비보존적 치환은 상기 한 종류의 구성 성분을 다른 종류의 것으로 교환시킬 것이다. 또한, 이렇게 치환되는 잔기는 보존적 치환 부위에 도입될 수 있거나 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비보존) 부위에 도입될 수 있다.
변이는 올리고뉴클레오티드-매개 (위치-지정) 돌연변이 유발법, 알라닌 스캐닝법 및 PCR 돌연변이유발법과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수있다. 위치-지정 돌연변이유발법 [카터(Carter) 등의 문헌[Nucl. Acids Res. , 13 :4331 (1986)], 졸러(Zoller) 등의 문헌[Nucl. Acids Res. , 10 :6487 (1987)]], 카세트 돌연변이유발법 [웰스(Wells) 등의 문헌[Gene , 34 :315 (1985)]], 제한 선택 돌연변이유발법 [웰스(Wells) 등의 문헌[Philos. Trans. R. Soc. London SerA , 317 :415 (1986)]] 또는 다른 공지의 기술을 클로닝된 DNA에 실시하여 본 발명의 PRO 변이체 DNA를 제조할 수 있다.
또한 스캐닝 아미노산 분석법을 사용하여 인접 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 확인할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산은 비교적 작은 중성 아미노산이다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 통상적으로, 알라닌은 베타-탄소 밖의 측쇄를 제거하고 변이체의 주쇄 배열을 변경시킬 가능성이 적기 때문에 바람직한 스캐닝 아미노산이다[커닝햄(Cunningham) 및 웰스(Wells)의 문헌[Science , 244 : 1081-1085 (1989)]]. 또한,

알라닌은 통상적으로 가장 흔한 아미노산이기 때문에 바람직하다. 또한, 알라닌은 파묻힌 위치 및 노출된 위치 모두에서 빈번하게 발견된다 [크레이크턴(Creighton)의 문헌[The Proteins , (W.H. Freeman amp; Co., N.Y.)]; 및 코티아(Chothia)의 문헌[J. Mol. Biol. , 150 :1 (1976)]]. 알라닌 치환이 적당한 양의 변이체를 생성시키지 않으면, 동배체(isoteric) 아미노산을 사용할 수 있다.

C. PRO의 변형

PRO의 공유결합 변형은 본 발명의 범위에 포함된다. 공유결합 변형의 한 형태는 PRO의 선택된 측쇄, 또는 N-말단 또는 C-말단의 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 PRO 폴리펩티드의 표적 아미노산 잔기를 반응시키는 것을 포함한다. 이관능성 작용제를 사용한 유도체화는 예를 들어 항-PRO 항체 정제 방법에 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 PRO를 가교결합시키거나 그 반대로 가교결합시키는데 유용하다. 통상 사용되는 가교결합제에는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스테르, 3,3'-디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트)와 같은 디숙신이미딜 에스테르를 포함하는 동종이관능성 이미도에스테르, 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 이관능성 말레이미드 및 메틸-3[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질이 포함된다.

다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 대응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화[크레이크턴(T.E. Creighton)의 문헌[Proteins: Structure and Molecular Properties , W.H. Freeman amp; Co., San Francisco, pp. 79-86(1983)]], N-말단 아민의 아세틸화 및 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

본 발명의 범위 내에 포함되는 PRO 폴리펩티드의 공유결합 변형의 다른 유형에는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴의 변화를 포함한다. '천연 글리코실화 패턴의 변화'는 천연 서열 PRO에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실(잠재적인 글리코실화 부위를 제거하거나 또는 화학적 및(또는) 효소적 방법에 의해 글리코실화를 결실시킴으로써) 및(또는) 천연 서열 PRO에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 의미한다. 또한, 이 용어는 존재하는 다양한 탄수화물 잔기의 특성 및 비율의 변화를 비롯한 천연 단백질의 글리코실화에 있어 질적 변화를 포함한다.

PRO 폴리펩티드에 대한 글리코실화 부위의 부가는 아미노산 서열의 변화에 의해 달성될 수 있다. 변화는 예를 들어 천연 서열 PRO에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결 글리코실화 부위의 경우). PRO 아미노산 서열은 특히 목적 아미노산으로 번역되는 코돈을 생성시키도록 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 미리 선택된 염기에서 돌연변이시킴으로써 DNA 수준에서의 변화를 변화를 통하여 임의로 변화시킬 수 있다.

PRO 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 수를 증가시키는 다른 수단은 글리코시드를 폴리펩티드에 화학적으로 또는 효소에 의해 커플링시키는 것이다. 이러한 방법은 예를 들어 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330 및 어플린(Aplin) 및 리스턴(Wriston)의 문헌[CRC Crit. Rev. Biochem. , pp. 259-306 (1981)]]에 기재되어 있다.

PRO 폴리펩티드에 존재하는 탄수화물 잔기의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해 또는 글리코실화 표적으로 기능하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이에 의한 치환에 의해 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 하키무딘(Hakimuddin) 등의 문헌[Arch. Biochem. Biophys. , 259 :52(1987)] 및 에지(Edge) 등의 문헌[Anal. Biochem. , 118 :131(1981)]]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 효소에 의한 절단은 다양한 엔도글리코시다제 및 엑소글리코시다제를 사용하여 달성할 수 있다 [토타쿠라(Thotakura) 등의 문헌[Meth. Enzymol. , 138 :350(1987)]].

PRO의 공유결합 변형의 다른 종류는 미국 특허 제4,640,835호, 동 제4,496,689호, 동 제4,301,144호, 동 제4,670,417호, 동 제4,791,192호 또는 동 제4,179,337호에 기재된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 PRO 폴리펩티드를 연결시키는 것을 포함한다.

또한, 본 발명의 PRO는 다른 이종성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 PRO를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다.

한 실시태양에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 PRO의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 PRO의 아미노 또는 카르복실 말단에 위치한다. 상기 에피토프 태그를 갖는 형태의 PRO의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 도입하면 항-태그 항체 또는 에피토프 태그와 결합하는 다른 종류의 친화성 매트릭스를 사용한 친화성 정제에 의해 PRO를 용이하게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드 및 이들의 각각의 항체는 당업계에 공지되어 있다. 그 예로는 폴리-히스티딘(poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (poly-his-gly) 태그, flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [필드(Field) 등의 문헌[Mol. Cell. Biol. , 8 :2159-2165 (1988)]], c-myc 태그 및 이에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [에반(Evan) 등의 문헌[Molecular and Cellular Biology , 5 :3610-3616 (1985)]], 및 단순포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [파보르스키(Paborsky) 등의 문헌[Protein Engineering , 3 (6):547-553 (1990)]]을 들 수 있다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [호프(Hopp) 등의 문헌[BioTechnology , 6 :1204-1210 (1988)]], KT3 에피토프 펩티드 [마틴(Martin) 등의 문헌[Science , 255 :192-194 (1992)]], 알파-튜불린 에피토프 펩티드 [스키너(Skinner) 등의 문헌[J. Biol. Chem. , 266 :15163-15166 (1991)]] 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [루쯔-프러이러무쓰(Lutz-Freyermuth) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 87 :6393-6397 (1990)]]를 포함한다.

다른 실시태양에서, 키메라 분자는 PRO와 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 특정 영역의 융합체를 포함한다. 키메라 분자의 2가 형태('이뮤노어드헤신'으로 언급하기도 함)의 경우, 융합체는 IgG 분자의 Fc 영역일 수 있다. 이 Ig

융합체는 바람직하게는 Ig 분자내 1개 이상의 가변성 영역의 부위를 PRO 폴리펩티드의 가용성(결실 또는 실활화된 막횡단 도메인) 형태로 치환한 것을 포함한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 이뮤노글로불린 융합체는 IgG1 분자의 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체를 생 산하는 방법으로는 , 1995년 6월 27일 허여된 미국 특허 제5,428,130호를 참조한다.

D. PRO의 제조

이하에 설명되는 내용은 주로 PRO 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 트랜스펙션된 세포를 배양함으로써 PRO를 제조하는 방법에 관한 것이다. 물론, 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 PRO를 제조할 수 있다. 예를 들어, PRO 서열 또는 그의 단편은 고상 기술을 사용하는 직접 펩티드 합성법에 의해 제조할 수 있다 [스튜워트(Stewart) 등의 문헌[Solid-Phase Peptide Synthesis , W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)] 및 메리필드(Merrifield)의 문헌[J. Am. Chem. Soc. , 85 :2149-2154 (1963)]을 참조한다]. 시험관 내 단백질 합성은 수동 방법 또는 자동 방법에 의해 수행될 수 있다. 자동 합성법은 예를 들어 Applied Biosystems Peptide Synthesizer (미국 캘리포니아주 포스터시티 소재)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 수행할 수 있다. PRO의 여러 부분을 별도로 화학적으로 합성하고 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합함으로써 전장 PRO를 제조할 수 있다.

1. PRO를 코딩하는 DNA의 단리

PRO를 코딩하는 DNA는 PRO mRNA를 보유하여 그를 검출가능한 수준으로 발현할 것으로 생각되는 조직으로부터 제조한 cDNA 라이브러리로부터 수득할 수 있다. 따라서, 인간 PRO DNA는 실시예에서 설명되는 바와 같이 인체 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 수득할 수 있다. PRO 코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 수득하거나 또는 공지된 합성 방법(예를 들어, 자동 핵산 합성 방법)에 의해 수득할 수도 있다.

라이브러리는 목적 유전자 또는 이 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 확인하기 위해 고안된 프로브 (예를 들어, PRO에 대한 항체 또는 약 20 내지 80개 이상의 염기로 구성된 올리고뉴클레오티드)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 스크리닝은 예를 들어 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Haror Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다. PRO를 코딩하는 유전자를 단리하는 다른 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 [샘브룩(Sambrook) 등의 상기 문헌 ; 디펜바흐(Dieffenbach) 등의 문헌[PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Haror Laboratory Press, 1995)]].

하기 실시예는 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 기술을 설명한다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오티드 서열은 가양성 결과를 최소화하기 위해서 충분한 길이를 갖고 충분히 분명한 서열이어야 한다. 올리고뉴클레오티드는 스크리닝되는 라이브러리에서의 DNA와 혼성화될 때 검출될 수 있도록 표지되는 것이 바람직하다. 표지 방법은 당업계에 공지되어 있고, ^{32}P-표지된 ATP와 같은 방사성 표지, 비오티닐화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중간정도 엄격성 및 높은 엄격성을 포함하는 혼성화 조건은 문헌 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에서 제공된다.

상기 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 GenBank와 같은 공용 데이타 베이스 또는 다른 독점 서열 데이타베이스에 기탁되고 입수할 수 있는 다른 공지의 서열과 비교하여 정렬시킬 수 있다. 분자의 한정된 영역 내 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서)은 선행 기술의 공지된 방법 및 본원에서 설명된 방법을 이용하여 결정할 수 있다.

단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 먼저 본원에서 개시된 추정 아미노산 서열을 사용하고, 필요한 경우 전구체를 검출하기 위해 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에 기재된 통상의 프라이머 연장 방법을 사용하여 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하고, cDNA로 역전사되지 않는 mRNA의 중간체를 프로세싱함으로써 수득할 수 있다.

2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

숙주 세포는 PRO 생산을 위해 본원에서 설명한 발현 또는 클로닝 벡터로 트랜스펙션 또는 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택 또는 목적 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하게끔 개질된 통상의 영양 배지 중에서 배양된다. 당업자라면 과도한 실험을 수행하지 않고서도 배지, 온도 및 pH 등과 같은 배양 조건을 선택할 수 있다. 일반적으로, 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실시되는 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach , M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에서 찾을 수 있다.

진핵세포 트랜스펙션 방법 및 원핵세포 형질전환 방법, 예를 들어 $CaCl_2$, $CaPO_4$, 리포좀-매개 방법 및 일렉트로포레이션은 당업계의 숙련가에게 공지되어 있 다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적합한 표준 기술을 사용하여 수행된다. 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에 기재된 염화칼슘법을 이용하는 칼슘 처리 또는 일렉트로포레이션은 일반적으로 원핵세포에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 사용한 감염은 쇼우(Shaw) 등의 문헌[Gene , 23 :315(1983)] 및 1989년 6월 29일 공개된 WO 89/05859에 기재된 바와 같이 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다. 이러한 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, 그라함(Graham) 및 반 데르 에브(van der Eb)의 문헌[Virology , 52 :456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전법을 사용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템의 트랜스펙션의 일반적인 특징은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모 내로의 형질전환은 일반적으로 반 솔링겐(Van Solingen) 등의 문헌[J. Bact. , 130 :946(1977)] 및 히시아오(Hsiao) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) , 76 :3829(1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 세포 내로 DNA를 도입하는 다른 방법, 예를 들어 핵내 미세주입, 일렉트로포레이션, 원형 세포와 박테리아 원형질체의 융합, 또는 다원양이온(polycation), 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴도 사용할 수 있다. 포유동물 세포의 형질전환을 위한 여러 기술에 대해서는 케원(Keown) 등의 문헌[Methods in Enzymology , 185:527-537 (1990)] 및 만소워(Mansour) 등의 문헌[Nature , 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

본원에서 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포에는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포가 포함된다. 적합한 원핵세포는 진정세균, 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 생물, 예를 들어 엔테로박테리아세애(Enterobacteriaceae), 예를 들어 이. 콜라이를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다양한 이. 콜라이 균주, 예를 들어 이. 콜라이 K12 균주 MM294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 이. 콜라이 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)는 용이하게 입수할 수 있다. 다른 적합한 원핵생물 숙주 세포는 에셔리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터 (Enterobacter), 에르위니아 (Erwinia), 클렙시엘라 (Klebsiella), 프로테우스 (Proteus), 살모넬라 (Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피무리움 (typhimurium), 세라티아 (Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스 (marcescans) 및 시겔라 (Shigella), 및 바실러스 (Bacillus), 예를 들어 비. 서브틸리스 (subtilis) 및 비. 리체니포르미스 (licheniformis) (예를 들어 1989년 4월 12일자로 공고된 DD 266,710호에 기재된 비. 리체니포르미스 41P), 슈도모나스 (Pseudomonas), 예를 들어 피. 아에루기노사 (aeruginosa) 및 스트렙토마이세스 (Streptomyces)를 포함한다. 이러한 예는 단지 예시적인 것으로서 이에 제한되는 것은 아니다. 균주 W3110은 그가 재조합 DNA 산물 발효에 통상적인 숙주 균주이기 때문에 특히 바람직한 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주의 내생 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이를 초래하도록 변형될 수 있으며, 이러한 숙주의 예는 완전한 유전자형 *tonA* 를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2, 완전한 유전자형 *tonA ptr3* 을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4, 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r} 를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244), 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r} 를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 37D6, 비-카나마이신 내성 *degP* 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 이. 콜라이 W3110 균주 40B4 및 1990년 8월 7일 허여된 미국 특허 제4,946,783호에 개시된 페리플라즘 프로테아제 변이체를 갖는 이. 콜라이 균주를 포함한다. 별법으로, 시험관내 클로닝 방법, 예를 들어 PCR 또는 다른 핵산 중합효소 반응이 적합하다.

원핵세포 외에, 섬유상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 PRO-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현 숙주로서 적합하다. 사카로마이세스 세레비지애 (Saccharomyces cerevisiae)는 일반적으로 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 미생물에는 시조사카로마이세스 폼베 (Schizosaccharomyces pombe)[비치(Beach) 및 너스(Nurse)의 문헌[Nature , 290: 140 [1981]]; 1985년 5월 2일 공고된 유럽 특허 제139,383호]; 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) 숙주 [미국 특허 제4,943,529호; 플리어(Fleer) 등의 문헌[Bio/Technology , 9:968-975 (1991)], 예를 들어 케이. 락티스(lactis)[MW98-8C, CBS683, CBS4574; 로우벤코우트(Louvencourt) 등의 문헌[J. Bacteriol. , 154(2): 737-742 [1983]], 케이. 프라길리스 (fragilis) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(bulgaricus) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미 (wickeramii) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이 (waltii) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (drosophilarum) [ATCC 36,906; 반 덴 베르그(Van den Berg) 등의 문헌[Bio/Technology , 8:135(1990)], 케이. 테르모톨레란스 (thermotolerans) 및 케이. 막시아누스 (marxianus); 야로위아 (yarrowia) (유럽 특허 제402,226호); 피키아 파스토리스 (Pichia pastoris) [유럽 특허 제183,070호; 스리크리쉬나(Sreekrishna) 등의 문헌[J. Basic Microbiol. , 28:265-278 [1988]]; 칸디다 (Candida); 트리코데르마 레에시아 [유럽 특허 제244,234호]; 뉴로스포라 크라사 (Neurospora crassa)[케이스(Case) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 76:5259-5263 [1979]]; 시와니오마이세스 (Schwanniomyces), 예를 들어 시와니오마이세스 옥시덴탈리스 (occidentalis) (1990년 10월 31일 공고된 유럽 특허 제394,538호); 및 섬유상 진균, 예를 들어 뉴로스포라, 페니실리움 (Penicillium), 톨리포클라디움 (Tolypocladium) (1991년 1월 10일 공개된 WO 91/00357) 및 아스퍼길러스 (Aspergillus) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (nidulans)[밸런스(Ballance) 등의 문헌[Biochem. Biophys. Res. Commun. , 112:284-289 [1983]; 틸번(Tilburn) 등의 문헌[Gene , 26:205-221 [1983]; 옐턴(Yelton) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 81: 1470-1474 [1984]] 및 에이. 니게르 (niger)[켈리(Kelly) 및 하인스(Hynes)의 문헌[EMBO J. , 4: 475-479 [1985]]가 포함된다. 메틸 영양요구성 효모가 적합하고, 한세눌라 (Hansenula), 칸디다 (Candida), 클로엑케라 (Kloeckera), 피키아, 사카로마이세스, 토룰롭시스(Torulopsis) 및 로도토룰라(Rhodotorula)로 이루어지는 속으로부터 선택된, 메탄올 상에서 성장할 수 있는 효모를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이들 종류의 효모의 예인 구체적인 종의 목록은 안토니(C. Anthony)의 문헌[The Biochemistry of Methylotrophs , 269 (1982)]]에 기재되어 있다.

글리코실화 PRO의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래한다. 무척추동물 세포의 예에는 초파리 S2 및 스포도프테라 Sf9와 같은 곤충 세포 및 식물 세포가 포함된다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 및 COS 세포를 포함한다. 보다 구체적인 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651), 인간 배아의 신장 세포주 (293 세포 또는 현탁 배양액 중의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, 그라함(Graham) 등의 J. Gen Virol. , 36:59(1997)), 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 얼라우브(Urlaub) 및 카신(Chasin), Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 77:4216 (1980)), 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 마터, Biol. Reprod. , 23:243-251 (1980)), 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065) 및 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL 51)을 포함한다. 당업계의 숙련가라면 적합한 숙주 세포를 용이하게 선택할 수 있다.

3. 복제가능 벡터의 선택 및 사용

PRO를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터에 삽입된다. 다양한 벡터를 용이하게 구할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태로 존재할 수 있다. 적합한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해 벡터 내에 삽입될 수 있다. 일반적으로, 당업계에 공지된 기술을 사용하여 DNA를 적합한 제한 엔도뉴클레아제 부위내에 삽입한다. 벡터 성분은 일반적으로 하나 이상의 신호 서 열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 하나 이상의 상기 성분을 포함하는 적합한 벡터의 제조는 당업계의 숙련가에게 공지된 표준 라이게이

션 기술을 사용한다.
PRO는 직접 재조합 방법에 의해 생산될 수 있을 뿐만 아니라 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N 말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드 또는 신호 서열일 수 있는 이종 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분이거나 또는 벡터 내로 삽입된 PRO-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택되는 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, α 인자 리더 (사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 α-인자 리더 (미국 특허 제5,010,182호에 기재됨)) 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 (C. albicans) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일 공고된 EP 362,179) 또는 1990년 11월 15일 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열, 예를 들어 동일하거나 관련된 종의 분비 폴리펩티드로부터의 신호 서열 및 바이러스 분비 리더를 사용하여 단백질의 분비를 지시할 수 있다.
발현 및 클로닝 벡터는 둘다 벡터가 1종 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제할 수 있도록 만드는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322의 복제 기점은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 2μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 다양 한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는데 유용하다.
발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 선택가능한 마커로도 불리우는 선택 유전자를 함유할 것이다. 대표적인 선택 유전자, 예를 들어 바실러스의 경우 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라싸이클린에 대한 내성을 부여하는 단백질, (b) 영양요구성 결함을 보완하는 단백질 또는 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요한 영양물질을 공급하는 단백질을 코딩한다.
포유동물 세포에 적합한 선택가능한 마커의 예는 PRO-코딩 핵산을 수용할 수 있는 세포의 동정을 가능하게 하는 마커, 예를 들어 DHFR 또는 티미딘 키나제이다. 야생형 DHFR이 이용될 경우, 적합한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주이고, 얼라우브(Urlaub) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 77:4216 (1980)]]에 기재된 바와 같이 제조 및 증식된다. 효모에 사용하는데 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 [스틴크콤브(Stinchcomb) 등의 문헌[Nature , 282:39 (1979)]; 킹스맨(Kingsman) 등의 문헌[Gene , 7:141 (1979)]; 츠켐퍼(Tschemper) 등의 문헌[Gene , 10:157 (1980)]]. trp1 유전자는 트립토판을 이용하여 성장할 수 없는 효모의 변이주 (예를 들어, ATCC 44076 또는 PEP4-1)에 대한 선택 마커를 제공한다 [존스(Jones)의 문헌[Genetics , 85: 12 (1977)]].
발현 및 클로닝 벡터는 mRNA 합성을 지시하는 PRO 코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 공지되어 있다. 원핵생물 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터는 β-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 [창(Chang) 등의 문헌[Nature , 275:615 (1978)]; 괴델(Goeddel) 등의 문헌[Nature , 281:544 (1979)]], 알칼리 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 [괴델(Goeddel)의 문헌[Nucleic Acid Res. , 8:4057 (1980); EP 36,776]], 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 프로모터 [데보에르(deBoer) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 80:21-25 (1983)]]를 포함한다. 또한, 박테리아 시스템에서 사용되는 프로모터는 PRO를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.
효모 숙주에 사용하기 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 [히쯔만(Hitzeman) 등의 문헌[J. Biol. Chem. , 255:2073 (1980)]] 또는 다른 해당 효소 [헤스(Hess) 등의 문헌[J. Adv. Enzyme Reg. , 7:149 (1968); Holland, Biochemistry , 17:4900 (1978)]], 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 디카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.
성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가 이점을 갖는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 디히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사에 관여하는 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 작용하는 효소에 대한 프로모터 영 역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 추가로 유럽 특허 제73,657호에 기재되어 있다.
포유동물 숙주 세포내의 벡터로부터 PRO의 전사는 바이러스, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스 (1989년 7월 5일 공고된 UK 제2,211,504호), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 게놈, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열-충격 프로모터로부터 얻어진, 숙주 세포계에 적합성인 프로모터에 의해 조절된다.
고등 진핵생물에 의한 PRO를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인핸서는 전사를 증가시키기 위해 프로모터에 대해 작용하는, 일반적으로 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-작용성 성분이다. 현재, 많은 인핸서 서열은 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-페토단백질 및 인슐린)로부터 유래하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 통상적으로는 진핵생물 세포의 바이러스로부터 유래한 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 뒷부분에 있는 SV40 인핸서 (bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 뒷부분에 있는 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 인핸서는 PRO 코딩 서열에 5' 또는 3' 위치에서 벡터에 스플라이싱될 수 있지만, 프로모터로부터 5' 부위에 위치하는 것이 바람직하다.
또한, 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세 포 생물로부터 유래한 다핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 포함할 수 있을 것이다. 그러한 서열은 통상적으로 진핵 세포, 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5', 경우에 따라 3'의 비번역 영역으로부터 확보된다. 이들 영역은 PRO를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로 전사되는 뉴클레오티드 단편을 함유한다.

재조합 척추동물 세포의 배양에서 PRO의 합성에 적용하는데 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포는 게팅(Gething) 등의 문헌[Nature , 293:620-625 (1981)]; 만테이(Mantei) 등의 문헌[Nature , 281:40-46 (1979)]; 유럽 특허 제117,060호 및 유럽 특허 제117,058호에 기재되어 있다.

4. 유전자 증폭/발현의 검출

유전자 증폭 및(또는) 발현은 예를 들어 통상의 서던 블롯팅, mRNA의 전사를 정량하기 위한 노던 블롯팅 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 77:5201-5205 (1980)], 도트 블롯팅 (DNA 분석) 또는 본원에서 제공된 서열을 기초로 한 적절하게 표지된 프로브를 사용하여 계내(in situ) 혼성화에 의해 시료에서 직접 측정할 수 있다. 별법으로, DNA 이중쇄, RNA 이중쇄 및 DNA-RNA 하이브리드 이중쇄 또는 DNA-단백질 이중쇄를 포함하여 특정 이중쇄를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 바꾸어 말하면, 항체를 표지하고, 상기 이중쇄를 표면에 결합시키고, 표면 상에 이중쇄가 형성될 때 이중쇄와 결합한 항체의 존재를 검출할 수 있는 분석을 수행할 수 있다.

별법으로, 유전자 발현은 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학적 염색과 같 은 면역학적 방법 및 유전자 산물의 발현을 직접 정량하기 위한 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 측정할 수 있다. 면역조직화학적 염색 및(또는) 시료 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조할 수 있다. 편리하게는, 천연 서열 PRO 폴리펩티드 또는 본원에서 제공되는 DNA 서열을 기초로 한 합성 펩티드 또는 PRO DNA에 융합되고 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대한 항체를 제조할 수 있다.

5. 폴리펩티드의 정제

PRO의 형태는 배양 배지 또는 숙주 세포 용균액으로부터 회수될 수 있다. 막에 결합하는 경우, 적합한 디터전트 용액(예를 들어, Triton-X 100)을 사용하거나 효소의 절단에 의해 막으로부터 방출될 수 있다. PRO의 발현에 사용되는 세포는 동결-해동 싸이클, 초음파처리, 기계적 분쇄 또는 세포 용균제와 같은 다양한 물리적 또는 화학적 수단에 의해 분쇄시킬 수 있다.

재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 PRO를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 적합한 정제 방법의 예는 이온 교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온 교환 수지, 예를 들어 DEAE 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 예를 들어 Sephadex G-75를 사용한 겔 여과, IgG와 같은 오염물질을 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 컬럼 및 PRO의 에피토프 태그된 형태를 결합시키기 위한 금속 킬레이팅 컬럼이다. 다양한 단백질 정제 방법을 사용할 수 있으며, 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Deutscher, Methods in Enzymology , 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice , Springer-Verlag, New York (1982)]에 기재되어 있다. 선택되는 정제 단계(들)은 예를 들어 사용되는 생산 방법 및 생산되는 특정 PRO의 특성에 따라 결정될 것이다.

E. PRO의 용도

PRO를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(또는 그의 상보체)은 혼성화 프로브로서의 용도를 비롯한 분자생물학 분야, 염색체 및 유전자 맵핑, 및 안티센스 RNA 및 DNA의 제조에서 다양한 용도를 갖는다. 또한, PRO 핵산은 본원에서 설명되는 재조합 기술에 의한 PRO 폴리펩티드의 제조에도 유용할 것이다.

전장 천연 서열 PRO 유전자 또는 그의 단편은 본원에서 개시된 천연 PRO 서열과 목적하는 서열 동일성을 갖는 전장 PRO cDNA 또는 다른 cDNA (예를 들어, PRO의 천연 변이체 또는 다른 종으로부터의 PRO를 코딩하는 유전자)를 단리하기 위한 cDNA 라이브러리에 대한 혼성화 프로브로 사용할 수 있다. 임의로, 프로브의 길이는 약 20 내지 약 50개의 염기일 것이다. 혼성화 프로브는 전장 천연 뉴클레오티드 서열의 새로운 영역(여기서, 이 영역은 과도한 실험 없이도 결정할 수 있음)의 적어도 일부, 또는 천연 서열 PRO의 프로모터, 인핸서 성분 및 인트론을 포함하는 게놈 서열로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 스크리닝 방법은 약 40 염기의 선택된 프로브를 합성하기 위해서 공지의 DNA 서열을 사용하여 PRO 유전자의 코딩 영역을 단리하는 것을 포함할 것이다. 혼성화 프로브는 ^{32}P 또는 ^{35}S와 같은 방사성 뉴클레오티드 또는 아비딘/비오틴 연결 시스템을 통해 프로브에 연결된 알칼리 포스 파타제와 같은 효소 표지를 비롯한 다양한 표지에 의해 표지할 수 있다. 본 발명의 PRO 유전자의 서열과 상보적인 서열을 갖는 표지된 프로브를 사용하여 인간 cDNA, 게놈 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 스크리닝함으로써 프로브가 혼성화하는 상기 라이브러리의 구성원을 결정할 수 있다. 혼성화 기술은 하기 실시예에서 보다 상세하게 설명된다.

본원에 개시된 임의의 EST 서열은 본원에서 설명된 방법을 사용하여 프로브로 유사하게 사용될 수 있다.

다른 유용한 PRO 핵산의 단편에는 표적 PRO mRNA(센스) 또는 PRO DNA(안티센스) 서열과 결합할 수 있는 단일-가닥 핵산 서열(RNA 또는 DNA)을 포함하는 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 본 발명에 따른 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 PRO DNA의 코딩 영역의 단편을 포함한다. 이 단편은 일반적으로 약 14개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 14개 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 주어진 단백질을 코딩하는 cDNA 서열을 토대로 한 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드를 유도하는 능력은 예를 들어 문헌 [Stein and Cohen(Cancer Res. 48:2659, 1988) 및 van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988)]에 기재되어 있다.

안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 서열의 결합은 이중쇄의 강화된 분해, 전사 또는 번역의 조기 종결을 비롯한 여러 방법 또는 다른 방법 중 하나에 의해 표적 서열의 전사 또는 번역을 차단하는 이중쇄를 형성시킨다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 PRO 단백질의 발현을 차단할 수 있 다. 또한, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 당-포스포디에스테르 백본 (또는 다른 당 연쇄, 예를 들어 WO 91/06629에 개시된 당 연쇄)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 이러한 당 연쇄는 내부의 뉴클레아제에 대한 내성이 있다. 내성이 있는 당 연쇄를 갖는 이러한 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 안정(즉, 효소 분해에 대해 내성이 있음)하지만, 표적 뉴클레오티드 서열과 결합할 수 있는 서열 특이성을 보유한다.

센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 다른 예에는 유기 잔기, 예를 들어 WO 90/10048에 개시된 잔기, 및 표적 핵산 서열에 대한 올리고뉴클레오티드의 친화성을 증가시키는 다른 잔기, 예를 들어 폴리-(L-라이신)과 공유적으로

연결되는 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 또한, 엘립티신과 같은 인터칼레이트제, 및 알킬화제 또는 금속 복합체를 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 연결하여 표적 뉴클레오티드 서열에 대한 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드의 결합 특이성을 변화시킬 수 있다.

예를 들어, $CaPO_4$-매개 DNA 트랜스펙션, 일렉트로포레이션을 비롯한 임의의 유전자 전달 방법에 의하거나 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스와 같은 유전자 전달 벡터를 사용함으로써 표적 핵산 서열을 포함하는 세포에 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드를 도입할 수 있다. 바람직한 방법으로는, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드를 적합한 레트로바이러스 벡터에 삽입한다. 표적 핵산 서열을 포함하는 세포는 생체내 또는 생체외에서 재조합 레트로바이러스 벡터와 접촉시킨 다. 적합한 레트로바이러스 벡터에는 쥐과 레트로바이러스 M-MuLV, N2(M-MuLV로부터 유도된 레트로바이러스), 또는 DCT5A, DCT5B 및 DCT5C(WO 90/13641을 참조한다)로 명명된 이중 카피 벡터로부터 유도된 벡터가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

또한, WO 91/04753에 개시된 바와 같이, 리간드 결합 분자와 복합체를 형성함으로써 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포에 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입할 수 있다. 적합한 리간드 결합 분자에는 세포 표면 수용체, 증식 인자, 다른 사이토킨, 또는 세포 표면 수용체와 결합하는 다른 리간드가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 리간드 결합 분자의 연결은, 리간드 결합 분자가 상응하는 분자 또는 수용체와 결합하는 능력을 실제적으로 방해하지 않거나, 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 그의 복합체 형태의 세포내 진입을 차단하지 않는다.

별법으로, WO 90/10448에 개시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드-지질 복합체를 형성함으로써 표적 핵산 서열을 포함하는 세포내에 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입할 수 있다. 이러한 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드-지질 복합체는 바람직하게는 세포내에서 내부 리파제에 의해 분리된다.

안티센스 또는 센스 RNA 또는 DNA 분자는 일반적으로 길이가 약 5개의 염기, 약 10개의 염기, 약 15개의 염기, 약 20개의 염기, 약 25개의 염기, 약 30개의 염기, 약 35개의 염기, 약 40개의 염기, 약 45개의 염기, 약 50개의 염기, 약 55개의 염기, 약 60개의 염기, 약 65개의 염기, 약 70개의 염기, 약 75개의 염기, 약 80개의 염기, 약 85개의 염기, 약 90개의 염기, 약 95개의 염기, 약 100개의 염기 또는 그 이상이다.

또한, 프로브를 PCR 기술에서 사용하여 밀접하게 관련된 PRO 코딩 서열의 확인을 위한 일군의 서열을 생성시킬 수도 있다.

또한, PRO를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 사용하여 PRO를 코딩하는 유전자의 맵핑 및 유전 질환이 있는 개체의 유전자 분석을 위한 혼성화 프로브를 제조할 수 있다. 본원에서 제공되는 뉴클레오티드 서열은 계내 혼성화, 공지의 염색체 마커에 대한 연결 분석 및 라이브러리를 사용한 혼성화 스크리닝과 같은 공지의 기술을 사용하여 염색체 및 염색체의 특정 영역에 맵핑시킬 수 있다.

PRO의 코딩 서열이 다른 단백질과 결합하는 단백질을 코딩하는 경우(예를 들어, 여기서 PRO는 수용체임), PRO는 이러한 결합 상호작용에 관여하는 다른 단백질 또는 분자를 확인하기 위한 분석에 사용될 수 있다. 이 방법에 의해, 수용체/리간드 결합 상호작용의 저해제도 확인할 수 있다. 또한, 상기 결합 상호작용에 관여하는 단백질을 사용하여 펩티드 또는 결합 상호작용의 작은 분자 저해제 또는 아고니스트를 스크리닝할 수 있다. 또한, 수용체 PRO를 사용하여 유사한 리간드를 단리할 수 있다. 스크리닝 분석을 설계하여 천연 PRO 또는 PRO에 대한 수용체의 생물학적 활성을 모방하는 리드 화합물을 발견할 수 있다. 이러한 스크리닝 분석은 화학 물질 라이브러리에 대한 고처리 스크리닝 분석을 포함하며, 특히 작은 분자인 약물 후보물질을 확인하는데 적합할 것이다. 작은 분자는 합성 유기 또는 무기 화합물을 포함한다. 분석은 당업계에 특성화된 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석 및 세포 기초 분석을 비롯한 다양한 포맷으로 수행될 수 있다.

또한, PRO 또는 그의 변이체를 코딩하는 핵산을 사용하여 유용한 치료제의 개발 및 스크리닝에 유용한 트랜스제닉 동물 또는 '녹 아웃(knock out)' 동물을 생성시킬 수 있다. 트랜스제닉(transgenic) 동물 (예를 들어, 마우스 또는 랫트)은 형질도입유전자(transgene)를 포함하는 세포를 갖는 동물인데, 형질도입유전자는 태아기, 예를 들어 배 단계에서 동물 또는 그 동물의 조상에 도입된다. 형질도입유전자는 세포의 게놈내에 통합되는 DNA이며, 이 세포로부터 트랜스제닉 동물이 발달한다. 한 실시태양에서, PRO를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 PRO를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있고, 이 게놈 서열을 사용하여 PRO를 코딩하는 DNA를 발현하는 세포를 포함하는 트랜스제닉 동물을 생성시킬 수 있다. 특히, 마우스 또는 랫트와 같은 트랜스제닉 동물을 생성시키는 방법은 당업계에서 통상적인 방법이며, 예를 들어 미국 특허 제4,736,866호 및 동 제4,870,009호에 기재되어 있다. 통상적으로, 조직 특이적 인핸서를 갖춘 PRO 형질도입유전자의 도입에는 특정 세포가 표적이 된다. 배 단계에서 동물의 생식 라인에 도입된 PRO를 코딩하는 한 카피의 형질도입유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물을 사용하여 PRO를 코딩하는 DNA의 발현 증가 효과를 조사할 수 있다. 이러한 동물은 예를 들어 PRO 폴리펩티드의 과다발현과 관련된 병리학적 증상으로부터 보호할 것으로 생각되는 시약에 대한 시험 동물로서 사용할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따라, 상기 시약으로 동물을 처리하면, 형질도입유전자를 보유하는 미처리 동물에 비해 병리학적 증상의 발생은 저하되며, 이는 상기 병리학적 증상에 대한 잠재적인 치료적 개 입을 나타낸다.

별법으로, PRO의 비인간 동족체를 사용하여 PRO를 코딩하는 내인성 유전자와 이 동물의 배간세포에 도입된 PRO를 코딩하는 변형된 게놈 DNA 사이의 상동 재조합의 결과로서 PRO를 코딩하는 결함 또는 변형 유전자를 갖는 PRO '녹아웃' 동물을 만들 수 있다. 예를 들어, PRO를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 PRO를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있다. PRO를 코딩하는 게놈 DNA의 일부는 결실되거나, 통합을 모니터하기 위해 사용될 수 있는 선택적 마커를 코딩하는 유전자와 같은 다른 유전자로 치환될 수 있다. 일반적으로, 수천개의 염기의 비변형된 플랭킹 DNA (5' 및 3' 말단 모두에서)가 벡터내에 포함된다 (예를 들어, 상동성 재조합 벡터에 대해서는 문헌 (Thomas and Capecchi, Cell , 51:503 (1987))을 참조한다). 이 벡터는 (예를 들어, 일렉트로포레이션에 의해) 배간세포주에 도입

되고, 도입된 DNA와 내인성 DNA가 상동 재조합된 세포가 선택된다 (예를 들어, 문헌 (Li et al., Cell , 69:915 (1992))을 참조한다). 선택된 세포는 이어서 동물 (예를 들어 마우스 또는 랫트)의 배반포에 주입되어 응집 키메라를 형성한다 (예를 들어, 문헌(Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152)을 참조한다). 이어서, 키메라 배를 적합한 가임신 대리모 동물에 이식하여 '녹 아웃' 동물을 생성시켰다. 생식 세포 내에 상동 재조합 DNA를 보유하는 자손체를 표준 기술로 확인하고 그를 사용하여 동물의 모든 세포가 상동성 재조합 DNA를 함유하는 동물을 육종할 수 있다. 녹 아웃 동물은 예를 들어 특정 병리학적 증상에 대한 방어 능력 및 PRO 폴리펩티드의 부재로 인한 병리학적 증상의 발생을 특징으로 한다.
PRO 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 유전자 치료법에도 사용될 수 있다. 유전자 치료법에 사용될 경우, 유전자는 치료상 유효한 유전자 산물의 생체내 합성을 달성하기 위해, 예를 들면 결함있는 유전자를 대체하기 위해 세포내로 도입된다. '유전자 치료법'은 단일 처치에 의해 지속적인 효과가 달성되는 전통적인 유전자 치료법 및 치료상 유효한 DNA 또는 mRNA의 일회 또는 반복 투여를 포함하는 유전자 치료제의 투여를 모두 포함한다. 안티센스 RNA 및 DNA는 생체내에서 특정 유전자의 발현을 차단하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다. 세포막을 통한 짧은 안티센스 올리고뉴클레오티드의 흡수가 제한적이어서 이런 올리고뉴클레오티드의 세포내 농도가 낮음에도 불구하고, 이들이 세포내로 도입되면 저해제로 작용할 수 있음이 이미 밝혀져 있다 (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad., Sci. USA 83, 4143-4146 (1986)). 이러한 올리고뉴클레오티드는 변형, 예를 들어 이들의 음으로 대전된 포스포디에스테르기를 비대전 기로 치환함으로써 올리고뉴클레오티드의 흡수를 증대시킬 수 있다.
핵산을 살아있는 세포로 도입하는데 사용될 수 있는 다양한 기술이 있다. 이 기술은 핵산을 시험관내에서 배양된 세포로 전달하는지 또는 생체내의 목적하는 숙주의 세포로 전달하는지에 따라 달라진다. 시험관내 포유동물 세포로 핵산을 전달하는데 적합한 기술은 리포좀, 일렉트로포레이션, 미세주입, 세포 융합, DEAE-덱스트란 및 인산칼슘 침전법 등을 포함한다. 생체내 유전자 운반 기술로 현재 바람직한 것으로는 바이러스 (통상 레트로바이러스) 벡터를 사용한 트랜스펙션 및 바이 러스 코트 단백질-리포좀 매개 트랜스펙션이 포함된다 (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)). 어떤 경우에는, 표적 세포를 표적화하는 작용제, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체 및 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 공급원에 제공하는 것이 바람직하다. 리포좀이 사용되는 경우에는, 엔도사이토시스에 관련된 세포 표면 막 단백질과 결합하는 단백질을 표적화에 사용하고(하거나) 흡수를 촉진시킬 수 있는데, 그러한 단백질의 예로는, 특정 세포 유형에 향성(向性)이 있는 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환시 내부화를 경험하는 단백질에 대한 항체, 세포내 위치를 표적화하고 세포내 반감기를 증대시키는 단백질이 있다. 수용체 매개 엔도사이토시스 기술은 예를 들면 문헌 (Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987), 및 Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990))에 기재되어 있다. 유전자 마킹 및 유전자 치료법 프로토콜의 검토를 위해서는, 문헌 (Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992))을 참조한다.
본원에 개시된 PRO 폴리펩티드를 단백질 전기영동을 위한 분자량 마커로 사용할 수도 있으며, 단리된 핵산 서열은 이들 마커를 재조합적으로 발현시키는데 사용할 수 있다.
본원에 개시된 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 또는 그의 단편은 염색체의 확인에 유용하다. 이런 점에서, 새로운 염색체 마커를 확인할 계속적인 필요가 있는데, 이는 실제 서열 데이타를 토대로 한 이용가능한 염색체 마킹 시약이 현재로서는 비교적 적기 때문이다. 본 발명의 PRO 핵산 분자 각각은 염색체 마커로 사용할 수 있다.
본 발명의 PRO 폴리펩티드 및 핵산 분자는 조직 유형분류(tissue typing)에 사용할 수도 있으며, 여기서 본 발명의 PRO 폴리펩티드는 다른 조직에 비해 한 조직에서 차별적으로 발현될 수 있다. PRO 핵산 분자는 PCR, 노던 분석, 서던 분석 및 웨스턴 분석용 프로브를 생성하는데 사용될 것이다.
본원에 개시된 PRO 폴리펩티드를 치료제로 사용할 수도 있다. 공지된 방법에 따라 본 발명의 PRO 폴리펩티드를 제제화하여 제약상 유용한 조성물을 제조할 수 있는데, 여기서 이 PRO 생성물은 제약상 허용되는 담체 비히클과 배합된다. 치료 제형은 바람직한 순도를 갖는 활성 성분을 임의의 생리적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 수용액 형태의 보관용으로 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량과 농도에서 투여 대상에게 무독성이며, 인산염, 시트르산염 및 다른 유기산, 아스코르브산 등의 항산화제, 저분자량 (잔기가 약 10개 미만인) 폴리펩티드, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린 등의 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신 등의 아미노산, 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 비롯한 그밖의 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트제, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜, 나트륨과 같은 염-형성 카운터이온, 및(또는) 트윈 (Tween, 등록상표), 플루로닉스 (Pluronics, 등록상표) 또는 PEG와 같은 비이온성 계면활성제 등이 있다.
생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균처리되어야 한다. 이는 동결건조 및 녹이기 전 또는 후에 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.
본원의 치료 조성물은 일반적으로 멸균 접근 출입구가 있는 용기, 예를 들면 정맥내 용액제 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개가 달린 바이알에 담을 수 있다.
투여 경로는 공지된 방법, 예를 들면 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내 또는 병소내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 또는 서방계에 의한 방법이 있다.
본 발명의 약제 조성물의 투여량 및 목적하는 약물 농도는 계획된 특정 용도에 따라 변할 수 있다. 적합한 투여량 및 투여 경로의 결정은 당업자라면 잘 아는 것이다. 동물 실험 결과는 인간 치료에 효과적인 투여량을 결정하는데 믿을 만한 지침을 제공한다. 종 사이의 효과적인 투여량의 척도화는 문헌 (Mordenti, J. and Chappell, W. 'The use of interspecies scaling in toxicokinetics' In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96)의 원리에 따라 수행될 수 있다.

PRO 폴리펩티드 또는 그의 아고니스트 또는 길항제가 생체내에 투여되는 경우, 일반적인 투여량은 투여 경로에 따라 다르며, 포유동물의 체중 1 kg당 약 10 ng 내지 100 mg, 또는 일당으로는 바람직하게는 약 1 μg/kg 내지 10 mg/kg 일 수 있다. 특정 투여량 및 전달 방법에 대한 지침은 문헌, 예를 들어 미국 특허 제4,657,760호, 동 제5,206,344호 또는 동 제5,225,212호에 제시되어 있다. 다른 치료 화합물 및 다른 질환에 대해서는 다른 제제가 효과적일 수 있으며, 한가지 기관 또는 조직을 표적으로 하는 투여는 예를 들어 또다른 기관 또는 조직에 대한 투여와는 다른 방식으로의 전달을 필요로 할 것으로 예상된다.

PRO 폴리펩티드의 서방성 투여가 PRO 폴리펩티드의 투여를 필요로 하는 질병 또는 장애의 치료에 적합한 방출 특성을 갖는 제제에 요구되는 경우, PRO 폴리펩티드의 마이크로캡슐화가 고려된다. 지연 방출을 위한 재조합 단백질의 마이크로캡슐화는 인간 성장 호르몬 (rhGH), 인터페론 (rhIFN), 인터루킨-2 및 MN rgp120을 사용하여 성공적으로 수행되었다 (Johnson et al., Nat. Med. , 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther. , 27:1221-1223(1993); Hora et al., Bio/Technology , 8:755-758(1990); Cleland, 'Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems,' in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach , Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462: WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 및 미국 특허 제5,654,010호).

상기 단백질의 서방성 제제는 생체적합성 및 광범위한 생분해성 특성으로 인해 폴리-락트산-co-글리콜산 (PLGA) 중합체를 써서 개발되었다. PLGA의 분해 산물인 락트산 및 글리콜산은 인체내에서 신속하게 제거될 수 있다. 또한, 상기 중합체의 분해능은 그의 분자량 및 조성에 따라 수개월 내지 몇년으로 조정될 수 있다 (Lewis, 'Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer,' in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41).

본 발명은 PRO 폴리펩티드를 흉내내거나 (아고니스트) PRO 폴리펩티드의 영향을 차단하는 (길항제) 화합물 확인하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 길항제 약물 후보에 관한 스크리닝 분석법을 설계하여 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩된 PRO 폴리펩티드와 결합하거나 복합체를 이루거나, 또는 코딩된 폴리펩티드와 다른 세포내 단백질의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하였다. 이러한 스크리닝 분석법은 화학 물질 라이브러리에 대해 고처리 스크리닝할 수 있는 분석법을 포함하며, 이는 작은 분자 약물 후보를 확인하는데 특히 적합할 것이다.

상기 분석법은 당업계에서 특성화된 단백질-단백질 결합 분석법, 생화학적 스크리닝 분석법, 면역분석법 및 세포 기초 분석법을 비롯한 다양한 포맷으로 수행할 수 있다.

길항제에 관한 모든 분석법의 공통점은 본원에서 확인된 핵산에 의해 코딩된 PRO 폴리펩티드와 후보 약물을, 이들이 서로 상호작용하기에 충분한 조건과 시간하에 접촉시켜야 한다는 점이다.

결합 분석법에서 상호작용은 결합하는 것이며, 형성된 복합체는 단리하거나 반응 혼합물에서 검출할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩된 PRO 폴리펩티드 또는 약물 후보는 공유적 부착 또는 비공유적 부착에 의해 고체상, 예를 들어 마이크로타이터 플레이트에 고정된다. 비공유적 부착은 일반적으로 고체 표면을 PRO 폴리펩티드의 용액으로 코팅하고 건조함으로써 달성된 다. 별법으로, 고정화 항체, 예를 들어 고정된 PRO 폴리펩티드에 특이적인 모노클로날 항체를 사용하여 그를 고체 표면에 앵커링시킬 수 있다. 이 분석은 검출가능한 표지에 의해 표지될 수 있는 비고정 성분을 고정 성분, 예를 들어 앵커링된 성분을 포함하는 코딩된 표면에 부가함으로써 수행된다. 반응이 종결되었을 때, 반응하지 않은 성분은 예를 들어 세척에 의해 제거되며, 고체 표면에 앵커링된 복합체는 검출된다. 본래 고정되지 않은 성분이 검출가능한 표지를 포함하는 경우, 표면에 고정된 표지의 검출은 복합화 반응이 일어났음을 나타낸다. 본래 고정되지 않은 성분이 표지를 포함하지 않는 경우, 예를 들어 고정된 복합체와 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용하여 복합화 반응을 검출할 수 있다.

후보 화합물이 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩된 특정 PRO 폴리펩티드와 상호작용하지만 결합하지 않는 경우, 후보 화합물과 이 폴리펩티드의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용을 검출하는 잘 알려진 방법에 의해 분석할 수 있다. 이러한 분석법에는 통상의 방법, 예를 들어 가교형성법, 공동면역침전법, 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 공동정제법이 포함된다. 또한, 단백질-단백질 상호작용은 문헌 [Fields and co-workers(Fields and Song, Nature(London) , 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 89:5789-5793 (1991)]에 기재된 효모-기초 유전자 시스템을 사용하여 모니터링할 수 있다. 많은 전사 활성자, 예를 들어 효모 GAL4는 물리적으로 구별되는 2개의 모듈형 도메인으로 이루어져 있는데, 한 도메인은 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 나머지 한 도메인은 전사-활성 도메인으로 작용한다. 상기 간행물에 기재된 효모 발현계(일반적으로, '2-하이브리드계'로 언급됨)는 이러한 특성을 이용하며, 2가지 하이브리드 단백질을 사용하는데, 이 중 하나는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인과 융합된 것이며, 다른 하나는 후보 활성 단백질이 활성 도메인과 융합된 것이다. GAL4-활성 프로모터의 조절하에 GAL1-lacZ 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 따라 달라진다. 상호작용 폴리펩티드를 포함하는 콜로니는 β-갈락토시다제에 대한 색소생산성 기질을 사용하여 검출한다. 2-하이브리드 기술을 사용하여 2종의 특이적인 단백질사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하는 완성형 키트(MATCHMAKER, 등록상표)는 클론테크사에서 구입할 수 있다. 또한, 이 시스템을 확장하여 특이적 단백질 상호작용에 관여하는 단백질 도메인을 매핑할 수 있을뿐 아니라, 이러한 상호작용에 결정적인 아미노산 잔기의 위치를 정확하게 나타낼 수 있다.

하기의 방법으로, 본원에서 확인된 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 유전자와 다른 세포내 또는 세포외 성분의 상호작용을 방해하는 화합물을 시험할 수 있다. PRO 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 산물과 세포내 또는 세포외 성분을 포함하는 반응 혼합물을 두 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 및 시간하에 제조하였다. 결합을 저해하는 후보 화합물의 능력을 시험하기 위해, 시험 화합물의 존재 및 부재하에 반응을 수행하였다. 또한, 양성 대조군 역할을 하는 제3의 반응 혼합물에 위약을 첨가할 수 있다. 시험 화합물과 혼합물에 존재하는 세포내 또는 세포외 성분사이의 결합

(복합체 형성)을 상기 기재된 바와 같이 모니터링하였다. 대조 반응물에서는 복합체가 형성되었으나 시험 화합물을 포함하는 반응 혼합물에서 복합체가 형성되지 않은 것은, 시험 화합물이 시험 화합물과 그의 반응 대응물의 상호작용을 방해한다는 사실을 나타낸다.

길항제를 분석하기 위해, PRO 폴리펩티드를 화합물과 함께 세포에 첨가하여 특정 활성을 스크리닝할 수 있었으며, PRO 폴리펩티드의 존재하에 목적 활성을 저해하는 화합물의 능력은 이 화합물이 PRO 폴리펩티드에 대한 길항제임을 나타내었다. 별법으로, 경쟁적 저해 분석을 위해 적절한 조건하에 PRO 폴리펩티드 및 잠재적인 길항제를 막-결합 PRO 폴리펩티드 수용체 또는 재조합 수용체와 함께 결합시킴으로써 길항제를 검출할 수 있었다. PRO 폴리펩티드를 예를 들어 방사 활성 동위원소로 표지하여, 수용체와 결합하는 PRO 폴리펩티드 분자의 수를 이용하여 잠재적인 길항제의 효과를 결정할 수 있었다. 당업자에게 공지된 여러 방법, 예를 들어 리간드 패닝법 및 FACS 분류법 (Coligan et al., Current Protocols in Immun. , 1(2): Chapter 5 (1991))에 의해 수용체를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있었다.

바람직하게는, 발현 클로닝법이 사용되는데, 여기서 폴리아데닐화 RNA는 PRO 폴리펩티드에 대해 반응성인 세포로부터 제조되며, 이 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리는 푸울로 분류되어 PRO 폴리펩티드에 대해 비반응성인 COS 세포 또는 다른 세포를 트랜스펙션시키는데 사용된다. 글래스 슬라이드에서 증식하는 트랜스펙션된 세포는 표지된 PRO 폴리펩티드에 노출시킨다. 부위-특이적 단백질 키나제에 관한 인식 부위의 요오드화 또는 봉입화를 비롯한 여러 방법에 의해 PRO 폴리펩티드를 표지할 수 있었다. 고정화하고 인큐베이션한 다음, 슬라이드를 오토라디오그래피법 으로 분석하였다. 양성 푸울을 동정하여 서브-푸울을 제조하고, 상호작용성 서브-푸울링 및 재스크리닝 방법을 이용하여 다시 트랜스펙션시킴으로써, 결국 추정의 수용체를 코딩하는 단일 클론을 산출하였다.

수용체를 확인하는 다른 방법으로, 표지된 PRO 폴리펩티드를 세포막 또는 수용체 분자를 발현시키는 추출물 시료와 함께 광친화성-연결할 수 있었다. PAGE에 의해 가교 물질을 분석하고 엑스선 필름에 노출시켰다. 수용체를 포함하는 표지 복합체를 자르고 펩티드 단편으로 분해하여 단백질 마이크로-시퀀싱처리할 수 있었다. 마이크로-시퀀싱으로부터 얻어진 아미노산 서열을 사용하여 축퇴성 올리고뉴클레오티드 프로브의 한 세트를 설계함으로써 cDNA 라이브러리를 스크리닝하고 추정의 수용체를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있었다.

다른 길항제 분석 방법으로, 후보 화합물의 존재하에 수용체를 발현하는 포유동물 세포 또는 막 시료를 표지된 PRO 폴리펩티드와 함께 인큐베이션하였다. 그 후에, 상기 상호작용을 강화 또는 차단하는 화합물의 능력을 측정할 수 있었다.

잠재적인 길항제의 보다 구체적인 예에는 이뮤노글로불린과 PRO 폴리펩티드의 융합체와 결합하는 올리고뉴클레오티드, 및 특히 폴리- 및 모노클로날 항체, 및 항체 단편, 측쇄 항체, 항-유전형 항체, 및 이러한 항체 또는 그의 단편의 키메라 형태 또는 인간화 형태, 및 인간 항체 및 항체 단편을 비롯한 항체가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 또는, 잠재적인 길항제는 밀접하게 관련된 단백질, 예를 들어 수용체를 인식하지만 영향을 주지는 않으며, 따라서 PRO 폴리펩티드의 작용을 경쟁적으로 저해하는 PRO 폴리펩티드의 변이된 형태일 수 있다.

또다른 잠재적인 PRO 폴리펩티드 길항제는 안티센스 기술을 사용하여 제조한 안티센스 RNA 또는 DNA 작제물인데, 여기서 안티센스 RNA 또는 DNA 분자는 표적 mRNA와 혼성화하여 단백질 번역을 방지함으로써 mRNA의 번역을 직접 차단하는 작용을 한다. 안티센스 기술을 사용하여 삼중나선 형성 또는 안티센스 DNA 또는 RNA를 통한 유전자 발현을 조절할 수 있는데, 이 방법들은 모두 폴리뉴클레오티드와 DNA 또는 RNA의 결합을 기초로 한다. 예를 들어, 본원에서 성숙 PRO 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 5'코딩 부분을 사용하여 염기쌍 약 10 내지 40개 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 설계할 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드는 전사에 관여하는 유전자의 영역에 대해 상보적이게끔 설계하여(삼중나선-문헌(Lee et al., Nucl. Acids Res. , 6:3073 (1979); Cooney et al,, Science , 241:456(1988); Dervan et al., Science , 251:1360 (1991))을 참조한다) 전사 및 PRO 폴리펩티드의 생산을 방지하였다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 그의 mRNA와 혼성화하여 mRNA 분자의 PRO 폴리펩티드로의 번역을 차단하였다(antisense - Okano, Neurochem. , 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). 또한, 상기 기재된 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달하여 안티센스 RNA 또는 DNA를 생체내에서 발현시킴으로써 PRO 폴리펩티드의 생산을 억제할 수 있었다. 안티센스 DNA가 사용되는 경우, 전사-개시 부위, 예를 들어 표적 유전자 뉴클레오티드 서열의 약 -10 내지 +10 사이의 위치로부터 유도된 올리고데옥시리보뉴클레오티드가 바람직하였다.

잠재적인 길항제에는 활성 부위, 수용체 결합 부위와 결합하는 작은 분자, 또는 PRO 폴리펩티드의 증식 인자 또는 다른 관련 결합 부위와 결합하여 PRO 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성을 차단하는 작은 분자가 포함된다. 작은 분자의 예에는 작은 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 바람직하게는 가용성 펩티드, 및 합성 비펩티딜 유기 또는 무기 화합물이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

리보자임은 RNA의 특이적인 절단을 촉매할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 리보자임은 그와 상보적인 표적 RNA와 서열-특이적 혼성화한 다음, 엔도누클레아제에 의해 절단됨으로써 작용한다. 공지된 기술로 잠재적인 RNA 표적내의 특이적인 리보자임 절단 부위를 확인할 수 있었다. 보다 자세한 사항은 예를 들어 문헌 (Rossi, Current Biology , 4: 469-471 (1994) 및 PCT publication No. WO 97/33551(published September 18, 1997))을 참조한다.

전사를 억제하는데 사용되는 삼중나선 형태의 핵산 분자는 단일-가닥이어야하며, 데옥시뉴클레오티드로 이루어져야 한다. 이러한 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 그가 Hoogsteen 염기쌍 규칙을 통해 삼중나선 형성을 촉진하게끔 설계되어 있는데, 삼중나선 형성에는 일반적으로 이중쇄 중 한 쇄에 상당한 크기의 퓨린 또는 피리미딘 스트레치가 있어야 한다. 보다 자세한 사항은 예를 들어 문헌 (PCT publication No. WO 97/33551, supra.)을 참조한다.

상기 작은 분자들은 상기 기재된 임의의 한가지 이상의 스크리닝 분석법 및(또는) 당업자에게 잘 알려진 임의의 다른 스크리닝 기술에 의해 확인할 수 있다.

F. 항-PRO 항체

본 발명은 추가로 항-PRO 항체를 제공한다. 항체의 예는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적 및 이종접합(heteroconjugate) 항체를 포함한다.

1. 폴리클로날 항체

항-PRO 항체는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다. 폴리클로날 항체의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 예를 들어 면역화제 및 필요한 경우 보조제를 1회 이상 주사함으로써 포유동물에서 생성시킬 수 있다. 일반적으로, 면역화제 및(또는) 보조제는 피하 또는 복강내 수회 주사하는 방법으로 포유동물에 주사될 것이다. 면역화제는 PRO 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 면역처리되는 포유동물에서 면역원성인 것으로 알려진 단백질에 면역화제를 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 상기 면역원성 단백질의 예에는 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 및 대두 트립신 저해제가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 보조제의 예는 프로이드 완전 보조제 및 MPL-TDM 보조제 (모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역처리 방법은 과도한 실험 없이도 당업계의 숙련가에 의해 선택될 수 있다.

2. 모노클로날 항체

항-PRO 항체는 별법으로 모노클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 항체는 콜러(Kohler) 및 밀스타인(Milstein)의 문헌[Nature , 256 :495 (1975)]에 기재된 바와 같은 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물을 통상적으로 면역화제로 면역처리하여 면역화제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 별법으로, 림프구는 시험관 내에서 면역처리할 수 있다.

면역화제에는 일반적으로 PRO 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질이 포함된다. 일반적으로, 인체 기원의 세포를 원하는 경우, 말초 혈액 림프구 ('PBL')가 사용되나, 인간 이외의 포유동물 공급원을 원하는 경우에는 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합제를 사용하여 림프구와 불멸화된 세포주를 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다[고딩(Goding)의 문헌[Monoclonal Antibodies: Principle and Practice , Academic Press, (1986) pp. 59-103]]. 불멸화된 세포주는 대체로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인체 기원의 골수종 세포이다. 일반적으로, 랫트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불멸화된 세포의 증식 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양시킬 수 있다. 예를 들면, 모세포 중에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우, 하이브리도마용 배양 배지 ('HAT 배지')는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 증식을 억제시킨다.

바람직한 불멸화된 세포주는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 생산을 높은 수준으로 안정하게 유지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 보다 바람직한 불멸화된 세포주는 예를 들어 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리 포니아주 샌디에고) 및 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 마나사스)으로부터 입수가능한 쥐과 골수종 세포주이다. 또한, 인간 골수종 세포주 및 마우스-사람 헤테로골수종 세포주가 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 기술되었다 [Kozbor, J. Immunol., 133 : 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications , Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 PRO에 대항해 지시된 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전법에 의해, 또는 방사성 면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡수 분석법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석에 의해 측정하였다. 이러한 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 스카트카르트(Scatchard) 분석[문손(Munson) 및 폴라드(Pollard)의 문헌[Anal. Biochem. , 107 :220 (1980)]에 의해 측정할 수 있다.

원하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝시키고 표준 방법 [고딩(Goding), 상기문헌]에 의해 배양시켰다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지에는 예를 들면, 둘베코스 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또는, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 복수종양으로서 생체내 배양시킬 수 있다.

서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들면, 단백질 A-세파로스, 히드록실아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피 와 같은 통상의 이뮤노글로불린 정제 방법에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리 및 정제시킬 수 있다.

또한, 모노클로날 항체는 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 방법을 이용하여 (예를 들면, 쥐과 동물 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써) 쉽게 단리하여 서열분석할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 백터 내에 넣은 다음, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 다른 방법으로는 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포를 발현 벡터로 트랜스펙션시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성시킬 수 있다. 또한, DNA는 예를 들어 상동성 쥐과 동물 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환하거나 (미국 특허 제4,816,567호; 모리슨(Morrison) 등, 상기 문헌), 또는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수 있다. 그러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 본 발명의 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 본 발명의 항체의 한 항체-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여 키메라 2가 항체를 생성시킬 수 있다.

항체는 1가 항체일 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 한 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형 중쇄의 재조합 발현 을 포함한다. 중쇄 가교결합을 방지하기 위해서 중쇄는 일반적으로 Fc 영역의 임

의의 지점에서 말단이 절단된다. 또는, 관련 시스테인 잔기는 가교결합을 방지하기 위해서 다른 아미노산 잔기로 치환되거나 또는 결실된다.
또한, 시험관내 방법도 1가 항체의 제조에 적합하다. 항체 단편, 특히 Fab 단편을 제조하기 위한 항체의 분해는 당업계에 통상적으로 알려진 기술을 사용하여 수행할 수 있다.
3. 인간 항체 및 인간화 항체
또한, 본 발명의 항-PRO 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비-인간(예를 들어, 쥐과 동물) 항체의 인간화 형태는 키메라 이뮤노글로불린, 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유도된 최소의 서열을 포함하는 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 또는 항체의 다른 항원 결합성 작은 서열)이다. 인간화 항체는, 수용체의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기를 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 랫트 또는 토끼와 같은 인간 이외의 종 (공여 항체)의 CDR로부터의 잔기로 치환시킨 인간 이뮤노글로불린 (수용 항체)을 포함한다. 몇몇 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 대응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체에도 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열에도 존재하지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 일반적으로 둘 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인 간 이뮤노글로불린의 영역에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 영역에 해당한다. 또한, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간 이뮤노글로불린 영역의 일부를 포함할 것이다[존스(Jones) 등의 문헌[Nature , 321 : 522-525 (1986)]; 리치만(Riechmann) 등의 문헌[Nature , 332 : 323-329 (1988)]; 및 프레스타(Presta)의 문헌[Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596 (1992)]].
비인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 '임포트(import)' 잔기로 언급되며, 통상적으로 '임포트' 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 본질적으로 윈터 (Winter) 등의 방법 [존스(Jones) 등의 문헌[Nature , 321 : 522-525 (1986)]; 리치만(Riechmann) 등의 문헌[Nature , 332 : 323-327 (1988)]; 베르호이엔(Verhoeyen) 등의 문헌[Science , 239 : 1534-1536 (1988)]에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 그러한 '인간화' 항체는 실질적으로 보다 적은 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종 유래의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 통상적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기를 설치류 항체에서 유사한 부위의 잔기로 치환시킨 인간 항체이다.
인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 당업계에 공지된 여러 기 술을 사용하여 제조할 수도 있다 [호겐붐(Hoogenboom) 및 윈터(Winter, J.)의 문헌[Mol. Biol. , 227 : 381 (1991)]; 마크(Marks) 등의 문헌[J. Mol. Bio. , 222 : 581 (1991)]]. 또한, 코울 등 및 보에르너 등의 기술도 인간 모노클로날 항체의 제조에 사용할 수 있다[콜(Cole) 등의 문헌[Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy , Alan R. Liss, p. 77 (1985)] 및 보에르너(Boerner) 등의 문헌[J. Immunol. , 147(1) :86-95 (1991)]]. 마찬가지로, 유전자도입 동물, 예를 들어 마우스에 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 도입함으로써 인간 항체를 제조할 수 있는데, 여기서 내부 이뮤노글로불린 유전자는 부분적으로 또는 완전히 실활화된다. 항원투여 후에, 인간 항체 생산이 관찰되었는데, 이는 유전자 재배열, 조립 및 항체 목록을 비롯한 모든 점에서 인간에서 관찰되는 항체와 매우 유사하였다. 상기 사항은 예를 들어 문헌 (미국 특허 제5,545,807호, 동 제5,545,806호, 동 제5,569,825호, 동 제5,625,126호, 동 제5,633,425호, 동 5,661,016호) 및 과학 간행물[마크(Marks) 등의 문헌[Bio/Technology 10 , 779-783 (1992)]; 론베르그(Lonberg) 등의 문헌[Nature 368 , 856-859 (1994)], 모리슨(Morrison)의 문헌[Nature 368 , 812-13 (1994)]; 피쉬빌트(Fishwild) 등의 문헌[Nature Biotechnology 14 , 845-51 (1996)]; 너이베르거(Neuberger)의 문헌[Nature Biotechnology 14 , 826 (1996)]; 론베르그(Lonberg) 및 후스자(Huszar)의 문헌[Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)]에 기재되어 있다.
4. 이중특이적 항체
이중특이적 항체는 2종 이상의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 모노 클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다. 이 경우에, 결합 특이성 중의 하나는 PRO에 대한 것이고, 다른 하나는 임의 다른 항원, 바람직하게는 세포 표면 단백질 또는 수용체 또는 수용체 서브유닛에 대한 것이다.
이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 이중 특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄/경쇄-중쇄 쌍의 동시발현에 기초하며, 여기에서, 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 [밀스타인(Millstein) 및 쿠엘로(Cuello)의 문헌[Nature , 305 : 537-539 (1983)]]. 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 10가지 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하며, 이중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 정확한 분자의 정제는 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행된다. 유사한 방법이 WO 제93/08829호(1993년 5월 13일에 공개됨) 및 트라우네커(Traunecker) 등의 문헌[EMBO J. , 10: 3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다.
원하는 결합 특이성을 갖는 항체의 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킬 수 있다. 이 융합은 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이 바람직하다. 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체, 및 원한다면 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별도의 발현 벡터에 삽입하고, 적합한 숙주 생물에 공동-트랜스펙션시킨다. 이중특이적 항체를 생산하기 위한 보 다 상세한 내용은 예를 들면, 수레쉬(Suresh) 등의 문헌[Methods in Enzymmology , 121 : 210(1986)]을 참조한다.

WO 96/27011에 개시된 다른 방법에 따르면, 한쌍의 항체 분자사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 헤테로이합체의 비율을 최대화할 수 있다. 바람직한 인터페이스는 항체 불변 도메인의 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체하였다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄와 동일하거나 또는 유사한 크기의 보충의 '공동(cavity)'을 제2 항체 분자의 인터페이스에 생성시켰다. 이는 헤테로이합체의 수율을, 호모이합체와 같은 다른 원치 않는 최종-생성물의 수율 이상으로 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들어, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로 제조할 수 있다. 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 브레난(Brennan) 등의 문헌[Science 229:81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질 가수분해로 잘라서 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 방법이 기재되어 있다. 이러한 단편은 디티올 복합 물질인 소듐 아르세니트의 존재하에 환원되어 근처 디티올을 안정화하고 분재내 디술피드의 형성을 방지한다. 그 후에, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환시켰다. 그 후에, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캅토에틸아민을 사용하여 환원시킴으로써 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시켰다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로 사용할 수 있다.

이. 콜라이로부터 Fab' 단편을 직접 회수하여 화학적으로 연결시킴으로써 이중특이적 항체를 형성시켰다. 샬라비(Shalaby) 등의 문헌[J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자가 개시되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 이 콜라이로부터 별도로 분비되었으며 지시된 시험관내의 화학적 방법으로 연결하여 이중특이적 항체를 형성시켰다. 이와 같이 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현시키는 세포 및 정상적인 인간 T 세포와 결합할 수 있을뿐 아니라, 인간 유방암 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 개시할 수 있었다.

또한, 재조합 세포 배양으로부터 직접 이중특이적 항체 단편을 만들고 단리하는 여러 기술이 개시되어 있다. 예를 들어, 루신 지퍼를 사용하여 이중 특이적 항체를 제조하였다[코스텔니(Kostelny) 등의 문헌[J. Immunol . 148(5):1547-1553 (1992)]]. 유전자 융합에 의해, Fos 및 Jun 단백질로부터의 루신 지퍼 펩티드를 2종의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결하였다. 항체 호모이합체의 힌지 영역을 환원시켜 단량체를 형성한 다음, 재산화시켜 항체 헤테로이합체를 형성시켰다. 또한, 이 방법은 항체 호모이합체를 생산하기 위한 방법으로 이용할 수도 있다. 홀 링거(Hollinger) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 '디아바디(diabody)' 기술은 이중특이적 항체 단편을 만드는 다른 메카니즘을 제공한다. 이 단편은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함하는데, 이 링커는 너무 짧아서 상기 두 도메인을 동일 쇄로 짝지을 수 없다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 다른 단편의 상보적인 V_H 및 V_L 도메인과 쌍을 이루게 되며, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단쇄 Fv(sFv) 이합체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 만드는 또다른 전략이 보고되었다[그루버((Gruber) 등의 문헌[J. Immunol. 152:5368 (1994)]을 참조한다]. 2가 이상의 결합가를 갖는 항체도 고려 대상이다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 만들 수 있다[투트(Tutt) 등의 문헌[J. Immunol. 147:60 (1991)]].

전형적인 이중특이적 항체는 본원에서 제공된 PRO 폴리펩티드의 2종의 상이한 에피토프와 결합할 수 있다. 또는, 특정 PRO 폴리펩티드를 발현시키는 세포에 대한 세포내 방어 메카니즘에 초점을 맞추기 위해, 항-PRO 폴리펩티드 팔을, 백혈구 상 개시 분자, 예를 들어 T-세포 수용체 분자(예를 들어, CD2, CD3, CD28 또는 B7), 또는 IgG의 Fc 수용체(Fcγ R), 예를 들어 Fcγ RI(CD64), Fcγ RII(CD32) 및 Fcγ RIII(CD16)와 결합하는 팔과 연결할 수 있다. 또한, 이중특이적 항체를 사용하여 특정 PRO 폴리펩티드를 발현시키는 세포에 세포독성 물질을 국소화할 수 있다. 이러한 항체는 PRO-결합 팔과, 세포독성 물질 또는 방사성핵종 킬레이트제, 예를 들어 EOTUBE, DPTA, DOTA 또는 TETA와 결합하는 팔을 가지고 있다. 목적하는 또다 른 이중특이적 항체는 PRO 폴리펩티드와 결합하며 추가로 조직 인자(TF)와 결합한다.

5. 이종접합 항체

이종접합 항체도 본 발명의 범위에 포함된다. 이종접합 항체는 2개의 공유결합된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 제91/00360호, 동 제92/200373호, 및 EP 제03089호) 제안되었다. 이종접합 항체는 가교결합제를 포함하는 방법을 비롯한 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내에서 제조할 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들어, 면역독소는 디술피드 교환 반응 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약은 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트 및 미국 특허 제4,676,980호에 개시된 시약을 포함한다.

6. 효과기 기능 조작

효과기 기능에 대해 본 발명의 항체를 변형하여 예를 들어 암치료에 있어 항체의 효과를 증대하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기를 Fc 영역에 도입하여 이 영역내에서 쇄 사이의 디술피드 결합을 형성시킬 수 있다. 이와 같이 생성된 호모이합체 항체는 내부화 능력을 향상시키고(시키거나) 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포내 세포독성(ADCC)을 증대시킨다[카론(Caron) 등의 문헌[J. Exp Med. , 176:1191-1195 (1992)] 및 쇼프(Shopes)의 문헌[J. Immunol. , 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다]. 또한, 볼프(Wolff) 등의 문헌[Cancer Research , 53 : 2560-2565 (1993)]에 기재된 헤테로이관능성 가교를 사용하여 증대된 항-종양 활성을 지닌 호모이합체 항체를 제조할 수 있다. 또는, 이중의 Fc 영역을 갖는 항체를 조작하여 보체 용균성 및 ADCC 능력을 증대시킬 수 있다[스티븐슨(Stevenson) 등의 문헌[Anti-Cancer Drug Design , 3:219-230 (1989)]을 참조한다].

7. 면역복합체

또한, 본 발명은 세포독성 물질, 예를 들어 화학치료제, 독소(예를 들어, 효소적으로 활성인 박테리아, 진균, 식물 또는 동물성 독소, 또는 그의 단편) 또는 방사활성 동위원소(즉, 방사성복합체)와 결합된 항체를 포함하는 면역복합체에 관한 것이다.
상기 면역복합체의 생성에 유용한 화학치료제는 상기에 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄(슈도모나스 애루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 쓴 멜론(momordica charantia) 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테세네스가 포함된다. 여러 방사성핵종을 방사 복합체 항체의 제조에 이용할 수 있다. 예에는 ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y 및 ^{186}Re가 포함된다.
다양한 이관능성 단백질-연결 물질, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체와 세포독성 물질의 복합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 비테타(Vitetta) 등의 문헌[Science , 238 :1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 리신 면역독소를 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성뉴클레오디드와 항체를 연결하는 전형적인 킬레이트제이다(WO 94/11026을 참조한다).
또다른 실시태양으로, 항체를 종양 예비표적화에 이용되는 '수용체'(예를 들어, 스트렙타비딘)와 연결할 수 있는데, 여기서 항체-수용체 복합체를 투여한 다음, 킬레이트제를 사용하여 순환으로부터 결합하지 않은 복합체를 제거하고 세포독성 물질(예를 들어, 방사성뉴클레오티드)과 결합하는 '리간드'(예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

8. 면역리포좀

본원에서 개시된 항체를 면역리포좀으로 제제화할 수도 있다. 이 항체를 포함하는 리포좀은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 엡스타인(Epstein) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)]; 후앙(Hwang) 등의 문헌[Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 제4,485,045호 및 동 제4,544,545호에 기재된 방법으로 제조할 수 있다. 순환 시간이 증대된 리포좀은 문헌 (미국 특허 제5,013,556호)에 개시되어 있다.
특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성할 수 있다. 정해진 공극 크기의 필터를 통해 리포좀을 밀어내어 소정의 직경을 갖는 리포좀을 수득하였다. 마틴(Martin) 등의 문헌[J. Biol. Chem. , 257 :286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 디술피드-상호교환 반응을 통해 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 리포좀에 연결할 수 있다. 화학요법제(예를 들어, 독소루비신(Doxorubicin))은 임의로 리포좀내에 포함된다[가비즌(Gabizon) 등의 문헌[J. National Cancer Inst. , 81 (19):1484 (1989)]을 참조한다].

9. 항체 제약 조성물

각종 질환을 치료하기 위해, 본원에서 확인된 PRO 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체 및 상기 기재된 스크리닝 분석에 의해 확인된 다른 분자를 제약 조성물 형태로 투여할 수 있다.
PRO 폴리펩티드가 세포내에 있고 항체 전부가 저해제로 사용되는 경우, 내부 화 항체가 바람직하다. 그러나, 또한 리포펙션 또는 리포좀을 사용하여 항체 또는 항체 단편을 세포내에 전달할 수 있다. 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인과 특이적으로 결합하는 최소의 저해성 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변-영역의 서열을 토대로, 표적 단백질의 서열과 결합하는 능력을 지닌 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성하고(하거나) 재조합 DNA 기술에 의해 제조할 수 있다[예를 들어, 마라스코(Marasco) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 90:7889-7893 (1993)]을 참조한다]. 또한, 본원의 제형은 치료할 특정 증상에 있어 필요에 따라 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 상보적인 활성을 지닌 화합물을 포함할 수도 있다. 별법으로, 또는 추가로, 이 조성물은 그의 기능을 증대시키는 물질, 예를 들어 세포독성 물질, 사이토킨, 화학요법제, 또는 성장-억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 배합된다.
활성 성분은 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀젼 중에서 예를 들어 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 각각 제조된 마이크로캡슐에 담을 수 있다. 상기 기술은 레밍턴(Remington's)의 문헌[Pharmaceutical Sciences , 상기 문헌]에 개시되어 있다.
생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균처리되어야 한다. 이것은 멸균 여과막 을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다.
서방성 제제도 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예에는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 매트릭스가 포함된다. 서방성 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT(등록상표)(락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주입가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 분자를 방출시키지만, 어떤 히드로겔은 보다 짧은 기간 동안 단백질을 방출시킨다. 캡슐화된 항체가 오랫 동안 체내에 남아있는 경우, 그는 37 ℃에서 습기에 노출된 결과, 변성 또는 응집되

어 생물 활성이 감소되어 면역원성이 변화될 수 있다. 안정화를 위해 관련된 메카니즘에 따라 합리적인 전략을 설계할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디술피드 상호교환을 통한 분재내 S-S 결합의 형성인 것으로 밝혀진 다면, 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적인 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 안정화를 달성할 수 있다.

G. 항-PRO 항체의 용도

본 발명의 항-PRO 항체는 다양한 유용성을 갖는다. 예를 들어, 항-PRO 항체 는 PRO에 대한 진단 분석, 예를 들어 특정 세포, 조직 또는 혈청에서 PRO의 발현을 검출하는데 사용할 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 진단 분석 기술, 예를 들어 이종상 또는 동종상에서 수행되는 경쟁적 결합 분석, 직접 또는 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석[졸라(Zola)의 문헌[Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques , CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]]을 사용할 수 있다. 진단 분석에 사용되는 항체를 검출가능한 잔기로 표지할 수 있다. 검출가능한 잔기는 직접 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성시킬 수 있어야 한다. 예를 들어, 검출가능한 잔기는 방사성 동위 원소, 예를 들어 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S 또는 ^{125}I, 형광 또는 화학발광 화합물, 예를 들어 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린, 또는 효소, 예를 들어 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 양고추냉이 페록시다제일 수 있다. 헌터(Hunter) 등의 문헌[Nature , 144 :945(1962)]; 데이비드(David) 등의 문헌[Biochemistry , 13 :1014 (1974)]; 파인(Pain) 등의 문헌[J. Immunol. Meth. , 40 :219 (1981)]; 및 니그렌(Nygren)의 문헌[J. Histochem. and Cytochem. , 30 :407 (1982)]에 기재된 방법을 비롯하여, 항체와 검출가능한 잔기를 결합시키기 위한 당업계에 공지된 임의 방법을 사용할 수 있다.

또한, 항-PRO 항체는 재조합 세포 배양 또는 천연 공급원으로부터 PRO를 친화성 정제하는데 유용하다. 이 과정에서, PRO에 대한 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세파덱스 수지 또는 여과지와 같은 적합한 지지체에 고정된다. 그 후에, 고정된 항체는 정제될 PRO를 함유하는 시료와 접촉시킨 후, 고정된 항체에 결합한 PRO를 제외한 시료내의 모든 물질을 실질적으로 제거하는 적합한 용매로 세척한다. 마지막으로, 지지체를 다른 적합한 용매로 세척하여 항체로부터 PRO 폴리펩티드를 방출시킨다.

다음의 실시예는 단지 예시를 목적으로 제공될 뿐이며, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 한정하려는 것이 아니다.

이 명세서에 인용된 모든 특허와 문헌은 그를 거명함으로써 그 전체가 본원에 도입된다.

실시예

실시예에서 언급한 시판 시약들은 달리 지시하지 않는 한 제조업자의 지시에 따라 사용하였다. 하기 실시예와 명세서 전반에서 ATCC 기탁 번호로 확인되는 세포들의 입수원은 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, 메릴랜드주 록빌)이다.

실시예 1: 신규 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 cDNA를 확인하기 위한 세포외 도메인 상동성 스크리닝

스위스-프롯(Swiss-Prot) 공용 데이타베이스로부터 얻은 약 950개의 공지된 분비 단백질의 세포외 도메인 (ECD) 서열 (분비 신호 서열이 존재하는 경우에는 분비 신호 서열을 포함)을 사용하여 EST 데이타베이스를 조사하였다. EST 데이타베이스는 공용 데이타베이스 (예를 들면, 데이호프(Dayhoff), 젠뱅크(GenBank))와 독점 데이타베이스 (예를 들면, LIFESEQ™ (인사이트 파마슈티칼스(Incyte Pharmaceuticals, 캘리포니아주 팔로 알토))를 포함한다. EST 서열의 6 프레임 번역과 ECD 단백질 서열의 비교하는 검색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST-2 [알츠슐(Altschul) 등의 문헌[Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)]]를 이용하여 수행하였다. 공지된 단백질을 코딩하지 않는 70 (또는 어떤 경우 90) 이상의 블라스트(Blast) 스코어를 나타내는 비교물을 모으고, 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington 워싱턴주 시애틀 소재)을 사용하여 컨센서스 DNA 서열로 조립하였다.

상기 세포외 도메인의 상동성 스크린을 이용하여, phrap을 사용한 확인된 다른 EST 서열에 대해 컨센서스 DNA 서열을 조립하였다. 또한, 종종 (항상은 아니지만) 상기 논의한 EST 서열원을 사용하여 컨센서스 서열을 가능한 한 길게 연장시키기 위해 BLAST 또는 BLAST-2와 phrap의 반복 사이클을 이용하여 얻어진 컨센서스 DNA 서열을 연장시켰다.

이어서, 상기한 바와 같이 수득한 컨센서스 서열을 기초로, 올리고뉴클레오티드를 합성하여 목적 서열을 포함하는 cDNA 라이브러리를 PCR로 확인하는데 사용하고 PRO 폴리펩티드에 대한 전장 코딩 서열의 클론을 단리하기 위한 프로브로 사용하였다. 전방향 및 역방향 PCR 프라이머는 일반적으로 뉴클레오티드 20 내지 30개 범위이고, 종종 약 100 내지 1000 bp 길이의 PCR 산물을 제공하도록 설계된다. 프로브 서열의 길이는 통상적으로 40 내지 55 bp이다. 경우에 따라, 컨센서스 서열이 약 1 내지 1.5 kbp보다 길면, 추가의 올리고뉴클레오티드가 합성된다. 전장 클론에 대한 몇몇 라이브러리를 스크리닝하기 위해, PCR 프라이머 쌍을 사용하여 아우수벨(Ausubel) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology]에 따라 PCR로 증폭시켜 라이브러리로부터 DNA를 스크리닝하였다. 이어서, 프로브 올리고뉴클레오티드 및 프라이머 쌍들 중 하나를 이용하여 목적 유전자를 코딩하는 클론을 단리하는 데 포지티브 라이브러리를 사용하였다.

cDNA 클론을 단리하기 위해 사용되는 cDNA 라이브러리는 인비트로젠(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에고 소재)으로부터 구입한 시약들과 같은 시판되는 시약을 사용하여 표준 방법으로 제작하였다. cDNA를, NotI 부위를 포함하는 올리고 dT로 프라이밍시키고, 헤미키나제화된 SalI 어댑터에 평활 말단으로 연결시킨 후 NotI으로 절단하고, 겔 전기영동법으로 크기에 따라 적당하게 분류한 다음 적합한 클로닝 벡터[예를 들면, pRKB 또는 pRKD와 같은 벡터; pRK5B는 SfiI 부위를 포함하지 않는 pRK5D의 전구체임; 호움스(Holmes) 등의 문헌[Science , 253 : 1278-1280 (1991)]을 참조]내의 단일한 XhoI 및 NotI 부위에 정해진 방향으로 클로닝하였다.

실시예 2: 아밀라제 스크리닝에 의한 cDNA 클론의 단리

1. 올리고 dT 프라이밍된 cDNA 라이브러리의 제조
인비트로젠 (캘리포니아주, 샌디에고)사의 시약 및 프로토콜 (Fast Track 2)을 사용하여 대상 인간 조직으로부터 mRNA를 단리하였다. 미국 메릴랜드주 게티스버그 소재의 라이프 테크놀러지(Life Technologies)사의 시약 및 프로토콜 (Super Script Plasmid System)을 이용하여, 벡터 pRK5D내에 올리고 dT 프라이밍된 cDNA 라이브러리를 생성시키는데 상기 RNA를 사용하였다. 이 과정에서, 이중 가닥 cDNA 의 크기를 1000 bp보다 크도록 선택하고, SalI/NotI 연결된 cDNA를 XhoI/NotI 절단 벡터에 클로닝하였다. pRK5D는 sp6 전사 개시 부위, SfiI 제한 효소 부위, XhoI/NotI cDNA 클로닝 부위를 순서대로 포함하는 클로닝 벡터이다.
2. 랜덤 프라이밍된 cDNA 라이브러리의 제조
1차 cDNA 클론의 5' 말단을 우선적으로 제공하기 위해 2차 cDNA 라이브러리를 생성시켰다. 1차 라이브러리 (상기한 바와 같음)로부터 Sp6 RNA를 생성시키고, 라이프 테크놀러지사의 시약 및 프로토콜 (Super Script Plasmid System, 상기한 바와 같음)을 이용하여 벡터 pSST-AMY.0내에 랜덤 프라이밍된 cDNA 라이브러리를 생성시키는데 상기 RNA를 사용하였다. 이 과정에서, 이중가닥 cDNA를 500 내지 1000 bp의 크기로 만들고, NotI 어댑터에 평활 말단으로 연결시키고, SfiI로 절단하여 SfiI/NotI 절단 벡터에 클로닝하였다. pSST-AMY.0은 효모 알콜 탈수소효소 프로모터, cDNA 클로닝 부위 및 마우스 아밀라제 서열 (성숙 서열, 분비 신호 없음), 효모 알콜 디히드로게나제 전사종결자를 순서대로 포함하는 클로닝 벡터이다. 따라서, 프레임내에 아밀라제 서열과 융합된, 상기 벡터 내에 클로닝된 cDNA는 적절하게 트랜스펙션된 효모 콜로니로부터 아밀라제를 분비시킨다.
3. 형질전환 및 검출
상기 단락 2에 기재된 라이브러리로부터의 DNA를 빙냉시키고 여기에 전기수용성(electrocompetent) DH10B 박테리아 (Life Technologies) 20 ml을 첨가하였다. 이어서, 박테리아 및 벡터 혼합물을 제조자의 권고대로 일렉트로포레이션시켰다. 이어서, SOC 배지 (Life Technologies) 1 ml을 첨가하고 혼합물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 형질전환체를 암피실린 함유 표준 150 mm LB 플레이트 20개에 플레이팅하고 37℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 포지티브 콜로니를 플레이트로부터 분리하고 표준 프로토콜(예를 들어, CsCl-구배법)을 사용하여 박테리아 펠렛으로부터 DNA를 단리하였다. 정제된 DNA를 다음과 같은 효모 프로토콜에서 사용하였다.
효모 방법은 다음 세 부분으로 나뉜다: 1) 플라스미드/cDNA 조합 벡터를 사용한 효모의 형질전환, 2) 아밀라제를 분비하는 효모 클론의 검출 및 단리, 및 3) 효모 콜로니로부터 직접 삽입체를 PCR 증폭 및 서열분석 및 추가로 분석하기 위한 DNA 정제.
사용된 효모는 HD56-5A (ATCC-90785)이었다. 이 균주는 MAT 알파, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, MAL $^{+}$, SUC $^{+}$, GAL $^{+}$ 의 인자형을 갖는다. 바람직하게는, 번역 후 경로에 결함이 있는 효모 변이체를 사용할 수 있다. 이러한 변이체는 sec71, sec72, sec62에서 전좌(translocation)로 인한 결손 대립유전자를 가질 수 있으며, 말단이 잘린 sec71이 가장 바람직하다. 별법으로, 상기 유전자의 정상적인 작동을 방해하는 길항제(안티센스 뉴클레오티드 및(또는) 리간드 포함), 상기 번역 후 경로에 관여하는 다른 단백질 (예를 들어 SEC61p, SEC72p, SEC62p, SEC63p, TDJ1p 또는 SSA1p-4p) 또는 이들 단백질의 복합체 형태를 아밀라제-발현 효모와 함께 사용하는 것이 바람직할 수도 있다.
형질전환은 문헌 [Gietz et al., Nucl. Acid. Res., 20 :1425 (1992)]에 개관 된 프로토콜에 기초하여 수행하였다. 이어서, 형질전환된 세포를 아가로부터 YEPD 복합 배지 브로쓰 100 ml에 접종하고 30℃에서 밤새 배양하였다. YEPD 브로쓰를 문헌 [Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics , Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994)]에 기재된 바와 같이 제조하였다. 밤새 배양한 배양액을 새 YEPD 브로쓰 500 ml에 약 2 x 10^{6} 세포/ml (약 OD_{600} = 0.1)로 희석하여 약 1 x 10^{7} 세포/ml (약 OD_{600} = 0.4 - 0.5)로 재배양하였다.
세포를 회수한 다음, Sorval GS3 로터의 GS3 로터 바틀로 옮겨서 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고, 무균수에 재현탁시켜 Beckman GS-6KR 원심분리기에서 3,500 rpm에서 50 ml 들이 팔콘 튜브에서 재원심분리하였다. 상청액을 버리고, 세포를 LiAc/TE (10 ml, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH7.5, 100 mM Li_2OOCCH_3)로 세척한 다음 LiAc/TE (2.5 ml)에 재현탁시켜 형질전환을 준비하였다.
미세원심분리 튜브내에서 준비한 세포 100 ㎕를 새 변성된 단일 가닥의 연어 고환 DNA (미국 메릴랜드주 게티스버그 소재 Lofstrand Lab)와 형질전환 DNA 1 μg (부피 < 10 ㎕)과 혼합하여 형질전환을 수행하였다. 혼합물을 볼텍싱에 의해 잠깐 혼합한 후, 40% PEG/TE 600 ㎕ (40% 폴리에틸렌 글리콜-4000, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Li_2OOCCH_3, pH 7.5)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 천천히 혼합하고 30분 동안 교반하면서 30℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 이어서 42℃에서 15 분 동안 열 쇼크를 가하고, 반응 용기를 미세원심분리기로 12,000 rpm에서 5 내지 10초 동안 원심분리하여 상청액을 버리고 TE 500 ㎕ (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH7.5)에 재현탁시킨 다음 재원심분리하였다. 세포를 TE 1 ml에 희석시켜 분취액 200 ㎕를 150 mm 성장 플레이트 (VWR)에서 미리 제조한 선택 배지 상에 도말하였다.
별법으로, 수회의 소규모 반응 대신에, 시약량을 증가시키면서 1회의 대규모의 반응에 의해 형질전환을 수행하였다. 사용된 선택 배지는 문헌 [Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics , Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)]에 기재된 바와 같이 제조된, 우라실이 결여된 합성 완전 덱스트로스 아가 (SCD-Ura)이었다. 형질전환체를 30℃에서 2 내지 3일 동안 배양하였다.
아밀라제를 분비하는 콜로니의 검출은 선택 배양 배지 중에 적색 전분을 넣어 수행하였다. 문헌 [Biely et al., Anal. Biochem. , 172 :176-179 (1988)]에 기재된 방법에 따라 전분을 적색 염료(반응성 Red-120, Sigma)와 연결시켰다. 적색 염료가 연결된 전분을 최종 농도 0.15% (w/v)로 SCD-Ura 아가 플레이트에 첨가하고, 인산 칼륨을 사용하여 pH 7.0으로 완충시켰다 (최종 농도 50 내지 100 mM).

포지티브 콜로니를 선택하여 새로운 선택 배지 (150 mm 플레이트)에 스트리킹한 결과, 잘 단리된 동정가능한 단일 콜로리를 수득하였다. 적색 전분을 완충된 SCD-Ura 아가에 직접 첨가하여 아밀라제 분비에 대해 포지티브인 잘 단리된 단일 콜로니를 검출하였다. 전분을 분해하여 포지티브 콜로니 주위에 눈으로 직접 볼 수 있는 투명한 원광(halo)을 생성시키는 능력에 의해 포지티브 콜로니를 결정하였다.

4. PCR 증폭에 의한 DNA의 단리

포지티브 콜로니를 단리하는 경우, 그 일부를 이쑤시개로 떠내어 96웰 플레이트 내의 무균수 30 μℓ 중에 희석하였다. 이때, 포지티브 콜로니를 동결시켜 후속 분석을 위해 보관하거나 즉시 증폭시켰다. 세포의 분취액 5 μℓ를 주형으로 사용하여 Klentaq (미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 Clontech) 0.5 μℓ, 10 mM dNTP 4.0 μℓ(Perkin Elmer-Cetus), Kentaq 완충액 (Clontech) 2.5 μℓ, 전방향 올리고뉴클레오티드-1 0.25 μℓ, 역방향 올리고뉴클레오티드-2 0.25 μℓ, 증류수 12.5 μℓ를 포함하는 25 μℓ 부피로 PCR 반응을 수행하였다. 전방향 올리고뉴클레오티드-1의 서열은 다음과 같다:

5'-tgtaaaacgacggccagt taaatagacctgcaattattaatct -3' (서열 25)

역방향 올리고뉴클레오티드-2의 서열은 다음과 같다:

5'-caggaaacagctatgacc acctgcacacctgcaaatccatt -3' (서열 26)

이어서, PCR을 다음과 같이 수행하였다.

a. 92℃에서 5분 동안 변성시킴,
b. 92℃에서 30초 동안 변성, 59℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 60초간 연장시키는 과정을 3회 실시,
c. 92℃에서 30초 동안 변성, 57℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 60초간 연장시키는 과정을 3회 실시,
d. 92℃에서 30초 동안 변성, 55℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 60초간 연장시키는 과정을 25회 실시,
e. 4℃에서 유지시킴.

올리고뉴클레오티드의 밑줄친 영역을 ADH 프로모터 영역 및 아밀라제 영역에 각각 어닐링시키고, 삽입체가 존재하지 않을 경우 벡터 pSST-AMY.O으로부터 307 bp 영역을 증폭시켰다. 통상적으로, 상기 올리고뉴클레오티드의 5' 말단의 처음 18개의 뉴클레오티드는 서열 분석 프라이머에 대한 어닐링 부위를 포함하였다. 따라서, 공(empty) 벡터로부터의 PCR 반응의 총 생성물은 343 bp이었다. 그러나, 신호 서열이 융합된 cDNA는 상당히 긴 뉴클레오티드 서열을 생성시켰다.

PCR 후에, 반응액의 분취액 5 μℓ를 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 Tris-Borate-EDTA (TBE) 완충 시스템을 사용하여 1% 아가로스 겔에서의 아가로스 겔 전기영동에 의해 조사하였다. 400 bp보다 큰 하나의 강력한 PCR 생성물을 생성시키는 클론을 96 Qiaquick PCR 클린업 컬럼 (미국 캘리포니아주 채스워쓰 소재의 Qiagen Inc.)으로 정제한 후 DNA 서열 분석에 의해 추가로 분석하였다.

실시예 3: 신호 알고리즘 분석을 이용한 cDNA 클론의 단리

제넨테크, 인크(Genentech, Inc., South San Franscisco, CA)사에서 개발한 독점적인 신호 서열 검색 알고리즘을 사용하여, 공용(예를 들어, Genbank) 및(또는) 독점(LIFESEQ(등록상표), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) 데이타베이스로부터의 EST 및 밀집된 조립 EST 단편에서 다양한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 확인하였다. 신호 서열 알고리즘은 고려 대상 서열 또는 서열 단편의 5'-말단에서 첫번째 및 임의로 두번째 메티오닌 코돈(ATG) 주변의 DNA 뉴클레오티드의 특성을 기초로 분비 신호 점수를 계산하였다. 첫번째 ATG 다음의 뉴클레오티드는 임의 종결 코돈이 없는 35개 이상의 분명한 아미노산을 코딩해야만 한다. 첫번째 ATG가 소정의 아미노산을 갖는 경우, 두번째 ATG는 조사하지 않았다. 이 요건을 충족시키지 못하는 경우, 후보 서열의 점수는 계산하지 않았다. EST 서열이 분명한 신호 서열을 포함하는지를 결정하기 위해, 분비 신호와 관련된 것으로 알려진 7개의 센서(평가 파라메타)의 한 세트를 사용하여 이 DNA 및 상응하는 ATG 코돈 주변의 아미노산 서열의 점수를 매겼다. 이 알고리즘을 사용하여 많은 폴리펩티드-코딩 핵산 서열을 확인하였다.

실시예 4: 인간 PRO1800을 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 프랩(phrap)을 이용하여 다른 EST 서열에 대한 컨센서스 DNA 서열을 조립하였다. 본원에서는 이 컨센서스 서열을 DNA30934로 명명하였다. DNA30934 컨센서스 서열을 기초로, 올리고뉴클레오티드를 합성하여 1) PCR에 의해 목적 서열을 포함하는 cDNA 라이브러리를 확인하였고, 2) 프로브로 사용하여 PRO1800에 대한 전장 코딩 서열의 클론을 단리하였다.

PCR 프라이머(전방향 및 역방향)를 합성하였다.

전방향 PCR 프라이머(30934.f1) 5'-gcataatggatgtcactgagg-3' (서열 3)

역방향 PCR 프라이머(30934.r1) 5'-agaacaatcctgctgaaagctag-3' (서열 4)

또한, 하기 뉴클레오티드 서열을 갖는 컨센서스 DNA30934 서열로부터 합성 올리고뉴클레오티드 혼성화 프로브를 만들었다.

혼성화 프로브(30934.p1)

5'-gaaacgaggaggcggctcagtggtgatcgtgtcttccatagcagcc-3' (서열 5)

cDNA 라이브러리를 만들기 위한 RNA는 인간 태아의 간 조직으로부터 단리하였다. 상기 기재된 바와 같이 단리된 클론의 DNA 서열분석 결과, PRO1800에 대한 전장 DNA 서열(본원에서 DNA35672-2508(도 1, 서열 1)로 명명) 및 PRO1800에 대한 추정 단백질 서열이 밝혀졌다.

DNA35672-2508의 전체 뉴클레오티드 서열은 도 1(서열 1)에 나타나 있다. 클론 DNA35672-2508은 뉴클레오티드 위치 36 내지 38의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 870 내지 872의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 1)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 아미노산 278개 길이를 갖는다(도 2). 도 2에 나타낸 전장 PRO1800 단백질의 추정 분자량은 약 29,537 달톤이고 추정 pI는 약 8.97이다. 도 2(서열 2)에 나타낸 전장 PR

O1800 서열의 분석 결과는 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 15의 신호 펩티드, 약 아미노산 183 내지 약 아미노산 186의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 약 아미노산 43 내지 약 아미노산 48, 약 아미노산 80 내지 약 아미노산 85, 약 아미노산 191 내지 약 아미노산 196, 약 아미노산 213 내지 약 아미노산 218, 및 약 아미노산 272 내지 약 아미노산 277의 잠재적인 N-미리스토일화 부위 및 약 아미노산 276 내지 약 아미노산 278의 미소체 C-말단 표적화 신호의 존재를 입증한다. 클론 DNA35672-2508을 1998년 12월 15일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203538호를 배정받았다.

도 2(서열 2)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데 이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO1800 아미노산 서열과 데이호프 서열 HE27_HUMAN, CELF36H9_1, CEF54F3_3, A69621, AP000007_227, UCPA_ECOLI, F69868, Y4LA_RHISN, DHK2_STRVN 및 DHG1_BACME 사이의 상당한 상동성을 입증하였다.

실시예 5: 인간 PRO539를 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 프랩을 이용하여 다른 EST 서열에 대해 컨센서스 DNA 서열을 조립하였다. 본원에서는 이 컨센서스 서열을 DNA41882로 명명하였다. 나타낸 DNA41882 컨센서스 서열을 기초로, 올리고뉴클레오티드를 합성하여 1) PCR에 의해 목적 서열을 포함하는 cDNA 라이브러리를 확인하였고, 2) 프로브로 사용하여 PRO539에 대한 전장 코딩 서열의 클론을 단리하였다.

cDNA 라이브러리를 만들기 위한 RNA는 인간 태아의 신장 조직으로부터 단리하였다. 상기 기재된 바와 같이 단리된 클론의 DNA 서열분석 결과, PRO539에 대한 전장 DNA 서열(본원에서 DNA47465-1561(도 3, 서열 6)로 명명) 및 PRO539에 대한 추정 단백질 서열이 밝혀졌다.

DNA47465-1561의 전체 뉴클레오티드 서열은 도 3(서열 6)에 나타나 있다. 클론 DNA47465-1561은 뉴클레오티드 위치 186 내지 188의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 2676 내지 2678의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임(도 3)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 아미노산 830개 길이를 갖는다(도 4). 도 4에 나타낸 전장 PRO539 단백질의 추정 분자량은 약 95,029 달톤이고 추정 pI는 약 8.26이다. 도 4(서열 7)에 나타낸 전장 PRO539 서열의 분석 결 과는 약 아미노산 557 내지 약 아미노산 578, 및 약 아미노산 794 내지 약 아미노산 815의 루신 지퍼 패턴 서열, 약 아미노산 133 내지 약 아미노산 136, 및 약 아미노산 383 내지 약 아미노산 386의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 및 약 아미노산 231 내지 약 아미노산 672의 키네신계 단백질 Kif-4의 코일-코일 도메인의 존재를 입증한다. 클론 DNA47465-1561을 1999년 2월 9일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203661호를 배정받았다.

도 4(서열 7)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO539 아미노산 서열과 데이호프 서열 AF019250_1, KIF4_MOUSE, TRHY_HUMAN, A56514, G02520, MYSP_HUMAN, AF041382_1, A45592, HS125H2_1 및 HS68O2_2 사이의 상동성을 입증하였다.

실시예 6: 인간 PRO982를 코딩하는 cDNA 클론의 단리

실시예 3에 기술된 신호 서열 알고리즘을 사용하여 본원에서 Incyte EST 클러스터 서열번호 43715로 명명된 단일 Incyte EST 서열을 확인할 수 있었다. 상기 EST 서열을, 공용 EST 데이타베이스 (예를 들어, 젠뱅크) 및 독점 EST DNA 데이타베이스 (LIFESEQ(등록상표), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)를 포함하는 다양한 EST 데이타베이스와 비교하여 존재하는 상동성을 확인하였다. 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2 (Altshul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))를 사용하여 상동성 조사를 수행하였다. 공지의 단백질을 코딩하지 않는, BLAST 스코어가 70(일부 경우에 90) 이상인 비교물을 수집하여 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)으로 정리하여 컨센서스 DNA 서열을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 컨센서스 서열을 DNA56095로 명명하였다.

DNA56095와 Merck EST AA024389 사이의 관찰된 서열 상동성을 고려하여, Merck EST 클론 AA024389를 수득하고 서열 분석하였다. DNA57700-1408(서열 8)로 명명된 이 서열은 도 5에 나타나 있다. 이 서열은 PRO982에 대한 전장 DNA 서열이다.

도 5에 나타낸 전장 클론은 뉴클레오티드 위치 26 내지 28의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 401 내지 403의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (서열 8)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 125개의 아미노산으로 이루어진 길이를 가지며, 이론치 분자량은 약 14,198 달톤이고 추정 pI는 약 9.01이다. 도 6 (서열 9)에 나타낸 전장 PRO982 서열의 분석은 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 21의 신호 펩티드, 및 약 아미노산 50 내지 약 아미노산 59의 잠재적인 아나필라톡신 도메인의 존재를 입증한다. 데이호프 데이타베이스 (버전 35.45 SwissProt 35)의 분석은 PRO982 아미노산 서열과 데이호프 서열 RNTMDCV_1, A48151, WAP_RAT, S24596, A53640, MT4_HUMAN, U93486_1, SYNBILGFG_1, P_R49917 및 P_R41880 사이의 상동성을 입증하였다. 클론 DNA57700-1408을 1999년 1월 12일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203583호를 배정받았다.

실시예 7: 인간 PRO1434를 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 프랩을 이용하여 다른 EST 서열에 대해 컨센서스 DNA 서열을 조립하였다. 본원에서는 이 컨센서스 서열을 DNA54187로 명명하였다. DNA54187 컨센서스 서열을 기초로, 올리고뉴클레오티드를 합성하여 1) PCR에 의해 목적 서열을 포함하는 cDNA 라이브러리를 확인하였고, 2) 프로브로 사용하여 PRO1434에 대한 전장 코딩 서열의 클론을 단리하였다.

PCR 프라이머(전방향 및 역방향)를 합성하였다.

전방향 PCR 프라이머 5'-gaggtgtcgctgtgaagccaacgg-3' (서열 12)

역방향 PCR 프라이머 5'-cgctcgattctccatgtgccttcc-3' (서열 13)

또한, 하기 뉴클레오티드 서열을 갖는 컨센서스 DNA54187 서열로부터 합성 올리고뉴클레오티드 혼성화 프로브를 만들었다.

혼성화 프로브

5'-gacggagtgtgtggaccctgtgtacgagcctgatcagtgctgtcc-3' (서열 14)

cDNA 라이브러리를 만들기 위한 RNA는 인간의 망막 조직(LIB94)으로부터 단리하였다. 상기 기재된 바와 같이 단리된 클론의 DNA 서열분석 결과, PRO1434에 대한 전장 DNA 서열(본원에서 DNA68818-2536(도 7, 서열 10)으로 명명) 및 PRO1434에 대한 추정 단백질 서열이 밝혀졌다.

DNA68818-2536의 전체 뉴클레오티드 서열은 도 7(서열 10)에 나타나 있다. 클론 DNA68818-2536은 뉴클레오티드 위치 581 내지 583의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 1556 내지 1558의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 7)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 아미노산 325개 길이를 갖는다(도 8). 도 8에 나타낸 전장 PRO1434 단백질의 추정 분자량은 약 35,296 달톤이 고 추정 pI는 약 5.37이다. 도 8(서열 11)에 나타낸 전장 PRO1434 서열의 분석 결과는 도 8에 나타낸 여러가지 중요한 단백질 도메인의 존재를 입증한다. 클론 DNA68818-2536을 1999년 2월 9일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203657호를 배정받았다.

도 8(서열 11)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO1434 아미노산 서열과 데이호프 서열 NEL_MOUSE, APMU_PIG, P_W37501, NEL_RAT, TSP1_CHICK, P_W37500, NEL2_HUMAN, MMU010792_1, D86983_1 및 10MUCS_BOVIN 사이의 상당한 상동성을 입증하였다.

실시예 8: 인간 PRO1863을 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 3에 기술된 신호 서열 알고리즘을 사용하여 Incyte EST 클러스터 서열번호 82468로 명명된, Incyte 데이타베이스로부터의 EST 클러스터 서열을 확인할 수 있었다. 그 후에, 상기 EST 클러스터 서열을, 공용 EST 데이타베이스 (예를 들어, 젠뱅크) 및 독점 EST DNA 데이타베이스 (LIFESEQ(등록상표), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)를 포함하는 다양한 발현된 서열 태그(EST) 데이타베이스와 비교하여 존재하는 상동성을 확인하였다. 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2 (Altshul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))를 사용하여 상동성 조사를 수행하였다. 공지의 단백질을 코딩하지 않는, BLAST 스코어가 70(일부 경우에 90) 이상인 비교물을 수집하여 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)으로 정리하여 컨센서스 DNA 서열 을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 컨센서스 서열을 본원에서는 DNA56029로 명명하였다.

DNA56029 서열 및 Incyte EST 클론번호 2186536내에 포함된 EST 서열 사이의 서열 상동성을 고려하여, Incyte EST 클론번호 2186536을 구입하여 cDNA 삽입체를 수득하고 서열 분석하였다. 이 cDNA 삽입체의 서열은 도 9에 나타나 있고 본원에서는 DNA59847-2510으로 명명하였다.

클론 DNA59847-2510은 뉴클레오티드 위치 17 내지 19의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 1328 내지 1330의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 9)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 437개의 아미노산으로 이루어진 길이를 갖는다(도 10). 도 10에 나타낸 전장 PRO1863 단백질의 추정 분자량은 약 46,363 달톤이고 추정 pI는 약 6.22이다. 도 10 (서열 16)에 나타낸 전장 PRO1863 서열의 분석은 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 15의 신호 펩티드, 약 아미노산 243 내지 약 아미노산 260의 막횡단 도메인, 약 아미노산 46 내지 약 아미노산 49, 약 아미노산 189 내지 약 아미노산 192, 및 약 아미노산 382 내지 약 아미노산 385의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 약 아미노산 51 내지 약 아미노산 54, 및 약 아미노산 359 내지 약 아미노산 362의 글리코사미노글리칸 부착 부위, 및 약 아미노산 54 내지 약 아미노산 59, 약 아미노산 75 내지 약 아미노산 80, 약 아미노산 141 내지 약 아미노산 146, 약 아미노산 154 내지 약 아미노산 159, 약 아미노산 168 내지 약 아미노산 173, 약 아미노산 169 내지 약 아미노산 174, 약 아미노산 198 내지 약 아미노산 203, 약 아미노산 254 내지 약 아미노산 259, 약 아미노산 261 내지 약 아미노산 266, 약 아미노산 269 내지 약 아미노산 274, 약 아미노산 284 내지 약 아미노산 289, 약 아미노산 333 내지 약 아미노산 338, 약 아미노산 347 내지 약 아미노산 352, 약 아미노산 360 내지 약 아미노산 365, 약 아미노산 361 내지 약 아미노산 366, 약 아미노산 388 내지 약 아미노산 393, 약 아미노산 408 내지 약 아미노산 413, 및 약 아미노산 419 내지 약 아미노산 424의 잠재적인 N-미리스토일화 부위의 존재를 입증한다. 클론 DNA59847-2510을 1999년 1월 12일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203576호를 배정받았다.

도 10(서열 16)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO1863 아미노산 서열과 데이호프 서열 AF041083_1, P_W26579, HSA223603_1, MMU97068, RNMAGPIAN_1, CAHX_FLABR, S61882, AB007899_1, CAH1_FLALI 및 P_W13386 사이의 상동성을 입증하였다.

실시예 9: 인간 PRO1917을 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 3에 기술된 신호 서열 알고리즘을 사용하여 LIFESEQ(등록상표) 데이타베이스로부터 EST 클러스터 서열(EST 클러스터 번호 85496으로 명명)을 확인할 수 있었다. 그 후에, 상기 EST 클러스터 서열을, 상기 기재된 EST 데이타베이스와 비교하여 존재하는 상동성을 확인하였다. 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2 (Altshul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))를 사용하여 상동성 조사를 수행하였다. 공지의 단백질을 코딩하지 않는, BLAST 스코어가 70(일부 경우에 90) 이상인 비교물을 수집하여 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)으로 정리하여 컨센서스 DNA 서열을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 컨센서스 서열을 본원에서는 DNA56415로 명명하였다.

DNA56415 서열과 EST 번호 3255033내에 포함된 EST 서열 사이의 서열 상동성을 고려하여, 난소암 라이브러리 유래의 EST 클론을 구입하여 cDNA 삽입체를 수득하고 서열 분석하였다. 이 cDNA 삽입체의 서열은 도 11에 나타나 있고 본원에서는 DNA76400-2528로 명명하였다.

도 11에 나타낸 전장 클론은 뉴클레오티드 위치 6 내지 9의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 1467 내지 1469의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 11, 서열 17)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체(도 12, 서열 18)는 487개의 아미노산으로 이루어진 길이를 갖는다. PRO1917의 이론치 분자량은 약 55,051 달톤이고 추정 pI는 약 8.14이다. 추가의 특징에는 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 30의 신호 펩티드, 약 아미노산 242 내지 약 아미노산 245, 및 약 아미노산 481 내지 약 아미노산 484의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 약 아미노산 95 내지 약 아미노산 97, 약 아미노산 182 내지 약 아미노산 184, 및 약 아미노산 427 내지 약 아미노산 429의 단백질 키나제 C 인산화 부위, 약 아미노산 107 내지 약 아미노산 112, 약 아미노산 113 내지 약 아미노산 118, 약 아미노산 117 내지 약 아미노산 122, 약 아미노산 118 내지 약 아미노산 123, 및 약 아미노산 128 내지 약 아미노산 133의 N-미리스토일화 부위, 및 약 아미노산 484 내지 약 아미노산 487의 소포체 표적화 서열이 포함된다.

도 12(서열 18)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO1917 아미노산 서열과 데이호프 서열 AF012714_1 사이의 상당한 상동성을 입증하였다. 또한, PRO1917 아미노산 서열과, 연골세포를 증식 상태에서 비대 상태로 전환시키는데 관여하는 것으로 보고된 연골세포 단백질 서열(데이호프 데이타베이스에서 'P_W52286'으로 명명) 사이의 상동성이 밝혀졌다(국제 특허 출원 공개 제WO9801468-A1호). 또한, PRO1917 아미노산 서열과 다른 데이호프 서열 P_W52286, GGU59420_1, P_R25597, PPA3_YEAST, PPA1_SCHPO, PPA2_SCHPO, A46783_1, DMC165H7_1 및 AST8_DROME 사이의 상동성이 밝혀졌다.

클론 DNA76400-2528을 1999년 1월 12일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203573호를 배정받았다.

실시예 10: 인간 PRO1868을 코딩하는 cDNA 클론의 단리

상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 프랩을 이용하여 다른 EST 서열에 대해 컨센서스 DNA 서열을 조립하였다. 본원에서는 이 컨센서스 서열을 DNA49803으로 명명하였다. DNA49803 컨센서스 서열과 Incyte EST 클론번호 2994689내에 포함된 EST 서열 사이의 관찰된 상동성을 기초로, Incyte EST 클론번호 2994689를 구입하여 그의 삽입체를 수득하고 서열 분석하였다. 이 삽입체의 서열은 도 13에 나타나 있으며 본원에서는 DNA77624-2515로 명명하였다.

DNA77624-2515의 전체 뉴클레오티드 서열은 도 13(서열 19)에 나타나 있다. 클론 DNA77624-2515는 뉴클레오티드 위치 51 내지 53의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 981 내지 983의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임(도 13)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 아미노산 310개 길이를 갖는다(도 14). 도 14에 나타낸 전장 PRO1868 단백질의 추정 분자량은 약 35,020 달톤이고 추정 pI는 약 7.90이다. 도 14(서열 20)에 나타낸 전장 PRO1868 서열의 분석 결과는 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 30의 신호 서열, 약 아미노산 243 내지 약 아미노산 263의 막횡단 도메인, 약 아미노산 104 내지 약 아미노산 107, 및 약 아미노산 192 내지 약 아미노산 195의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 약 아미노산 107 내지 약 아미노산 110의 cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 부위, 약 아미노산 106 내지 약 아미노산 109, 및 약 아미노산 296 내지 약 아미노산 299의 카세인 키나제 II 인산화 부위, 약 아미노산 69 내지 약 아미노산 77의 티로신 키나제 인산화 부위, 및 약 아미노산 26 내지 약 아미노산 31, 약 아미노산 215 내지 약 아미노산 220, 약 아미노산 226 내지 약 아미노산 231, 약 아미노산 243 내지 약 아미노산 248, 약 아미노산 244 내지 약 아미노산 249, 및 약 아미노산 262 내지 약 아미노산 267의 잠재적인 N-미리스토일화 부위의 존재를 입증한다. 클론 DNA77624-2515를 1998년 12월 22일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203553호를 배정받았다.

도 14(서열 20)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO1868 아미노산 서열과 데이호프 서열 HGS_RC75, P_W61379, A33_HUMAN, P_W14146, P_W14158, AMAL_DROME, P_R77437, I38346, NCM2_HUMAN 및 PTPD_HUMAN 사이의 상당한 상동성을 입증하였다.

실시예 11: 인간 PRO3434를 코딩하는 cDNA 클론의 단리

실시예 3에 기술된 신호 서열 알고리즘을 사용하여 Incyte 데이타베이스로부터 EST 클러스터 서열을 확인할 수 있었다. 그 후에, 상기 EST 클러스터 서열을, 공용 EST 데이타베이스 (예를 들어, 젠뱅크) 및 독점 EST DNA 데이타베이스 (LIFESEQ(등록상표), Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)를 포함하는 다양한 발현된 서열 태그(EST) 데이타베이스와 비교하여 존재하는 상동성을 확인하였다. 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2 (Altshul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))를 사용하여 상동성 조사를 수행하였다. 공지의 단백질을 코딩하지 않는, BLAST 스코어가 70(일부 경우에 90) 이상인 비교물을 수집하여 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)으로 정리하여 컨센서스 DNA 서열을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 컨센서스 서열을 본원에서는 DNA56009로 명명하였다.

DNA56009 서열과 Incyte EST 클론번호 3327089내에 포함된 EST 서열 사이의 서열 상동성을 고려하여, Incyte EST 클론번호 3327089를 구입하여 cDNA 삽입체를 수득하고 서열 분석하였다. 이 cDNA 삽입체의 서열은 도 15에 나타나 있고 본원에서 DNA77631-2537로 명명된다.

클론 DNA77631-2537은 뉴클레오티드 위치 46 내지 48의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 3133 내지 3135의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 15)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체는 1029개의 아미노산 으로 이루어진 길이를 갖는다(도 16). 도 16에 나타낸 전장 PRO3434 단백질의 추정 분자량은 약 114,213 달톤이고 추정 pI는 약 6.42이다. 도 16(서열 22)에 나타낸 전장 PRO3434 서열의 분석은 도 16에 나타낸 바와 같은 매우 중요한 폴리펩티드 도메인의 존재를 입증한다. 클론 DNA77631-2537을 1999년 2월 9일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203651호를 배정받았다.

도 16(서열 22)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석 결과는 PRO3434 아미노산 서열과 데이호프 서열 VATX_YEAST, P_R51171, POLS_IBDVP, IBDVORF_2, JC5043, IBDVPIV_1, VE7_HPV11, GEN14220, MUTS_THETH 및 COAC_CHICK 사이의 상동성을 입증하였다.

실시예 12: 인간 PRO1927을 코딩하는 cDNA 클론의 단리

실시예 3에 기술된 신호 서열 알고리즘을 사용하여 LIFESEQ(등록상표) 데이타베이스로부터 EST 클러스터 서열(EST 클러스터 번호 제1913호로 명명)을 확인할 수 있었다. 그 후에, 상기 EST 클러스터 서열을, 다른 독점 EST DNA 데이타베이스(Genentech, South San Francisco, CA)를 비롯한 상기 기재된 데이타베이스를 포함하는 다양한 발현된 서열 태그(EST) 데이타베이스와 비교하여 존재하는 상동성을 확인하였다. 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST 2 (Altshul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))를 사용하여 상동성 조사를 수행하였다. 공지의 단백질을 코딩하지 않는, BLAST 스코어가 70(일부 경우에 90) 이상인 비교물을 수집하여 프로그램 'phrap' (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)으로 정리하여 컨센서스 DNA 서열을 수득하였다. 이와 같이 얻어진 컨센서스 서열을 본원에서는 DNA73896으로 명명하였다.

DNA73896 서열과 EST 번호 3326981H1내에 포함된 EST 서열 사이의 서열 상동성을 고려하여, 대동맥 조직으로부터 단리된 RNA로부터 만든 라이브러리로부터 수득된 EST 클론번호 3326981H1을 구입하여 cDNA 삽입체를 수득하고 서열 분석하였다. 이 cDNA 삽입체의 서열은 도 17에 나타나 있고 본원에서는 DNA82307-2531로 명명하였다.

도 17에 나타낸 전장 클론은 뉴클레오티드 위치 51 내지 53의 분명한 번역 개시 부위를 가지며 뉴클레오티드 위치 1695 내지 1697의 종결 코돈으로 끝나는 단일 오픈 리딩 프레임 (도 17, 서열 23)을 포함한다. 예상된 폴리펩티드 전구체(도 18, 서열 24)는 548개의 아미노산으로 이루어진 길이를 갖는다. PRO1927의 이론치 분자량은 약 63,198 달톤이고 추정 pI는 약 8.10이다. 다른 특징에는 약 아미노산 1 내지 약 아미노산 23의 신호 펩티드, 약 아미노산 6 내지 약 아미노산 25의 추정의 막횡단 도메인, 약 아미노산 5 내지 약 아미노산 8, 약 아미노산 87 내지 약 아미노산 90, 약 아미노산 103 내지 약 아미노산 106, 및 약 아미노산 465 내지 약 아미노산 469의 잠재적인 N-글리코실화 부위, 약 아미노산 6 내지 약 아미노산 11, 약 아미노산 136 내지 약 아미노산 141, 약 아미노산 370 내지 약 아미노산 375, 및 약 아미노산 509 내지 약 아미노산 514의 잠재적인 N-미리스토일화 부위가 포함된다.

도 18(서열 24)에 나타낸 전장 서열의 WU-BLAST2 서열 정렬 분석을 이용한 데이호프 데이타베이스(버전 35.45 SwissProt 35)의 분석은 PRO1927 아미노산 서열과 데이호프 서열 AB000628_1 사이의 상당한 상동성을 밝혀냈다. 또한, PRO1927 아미노산 서열과 다른 데이호프 서열 HGS_A251, HGS_A197, CELC50H11_2, CPXM_BACSU, VF03_VACCC, VF03_VACCV, DYHA_CHLRE, C69084 및 A64315 사이의 상동성도 밝혀졌다.

클론 DNA82307-2531를 1998년 12월 15일자로 ATCC에 기탁하여 ATCC 기탁번호 제203537호를 배정받았다.

실시예 13: 혼합 림프구 반응 (MLR) 분석에서의 억제 활성 분석 (분석 67)

이 실시예는 본 발명의 폴리펩티드의 하나 이상이, 자극된 T-림프구의 증식 억제제로서 활성이 있음을 보여준다. 면역반응을 억제하는 것이 유리한 경우에는 림프구의 증식을 억제하는 화합물이 치료에 있어서 유용하다.

이 분석의 기본적인 프로토콜은 문헌 (Current Protocols in Immunology, unit 3.12; edited by J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Insitutes of Health, Published by John Wiley amp; Sons, Inc.)에 기재되어 있다.

더 구체적으로는, 한 변형 분석법에서는 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 포유동물 개체, 예를 들어 인간 지원자로부터 백혈구분리반출법(leukopheresis)를 통해 단리한다(한 공여자는 자극성 PBMC를 공급할 것이고, 다른 공여자는 반응성 PBMC를 공급할 것임). 필요하다면, 이들 세포를 단리한 후에 소 태아 혈청 및 DMSO 중에 냉동시킨다. 냉동 세포를 분석 배지 (37 ℃, 5 % CO_2) 중에서 밤새 해동시킨 다음 세척하고 분석 배지 (RPMI; 10 % 소 태아 혈청, 1 % 페니실린/스트렙토마이신, 1 % 글루타민, 1 % HEPES, 1 % 비필수 아미노산, 1 % 피루브산염)에 3 x 10^6 세포/ml로 재현탁시킬 수 있다. 자극성 PBMC는 세포를 약 3000 Rad로 조사하여 준비하였다.

이 분석은 1 % 또는 0.1 %로 희석된 시험 시료 100 : 1, 조사된 자극성 세포 50 : 1 및 반응성 PBMC의 혼합물을 3벌 웰에 플레이팅하여 준비한다.

대조구로서 세포 배양 배지 100 ㎕ 또는 CD4-IgG 100 ㎕를 사용한다. 그 후, 웰을 37 ℃, 5 % CO_2 에서 4 일 동안 인큐베이션시킨다. 5 일째, 각 웰에 삼중수소 티미딘 (1.0 mC/웰, Amersham)을 가한다. 6 시간 후에 세포를 3 회 세척한 후 이 표지의 흡수량을 측정한다.

이 분석의 다른 변형법에서는 PBMC를 Balb/c 마우스 및 C57B6 마우스의 비장으로부터 단리한다. 이들 세포는 분석 배지 (RPMI; 10 % 소 태아 혈청, 1 % 페니실린/스트렙토마이신, 1 % 글루타민, 1 % HEPES, 1 % 불필수 아미노산, 1 % 피루브산염 중의 새로 수거된 비장으로부터 떼어내고, PBMC는 Lympholyte M (Organon Teknika 제품) 상에 올려놓고 2000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하여 수집하고 단핵 세포층을 분석 배지 중에서 세척하고 이들 세포를 분석 배지에 1 x 10^7 세포/ml로 재현탁시킴으로써 단리한다. 그 다음, 이 분석을 상기한 바와 같이 수행한다.

대조구 미만으로 감소한 것은 억제성 화합물에 대한 포지티브 결과로 간주되 며, 감소는 80 % 이하인 것이 바람직하다. 그러나, 대조구 미만의 값은 어떤 값이든 시험 단백질의 억제 효과를 나타낸다.

이 분석에서는 시험된 PRO1917 및 PRO1868이 포지티브이었다.

실시예 14: 피부 혈관의 투과성 분석(분석 64)

이 분석은 본 발명의 특정 폴리펩티드가 면역 반응을 자극하고, 대상 동물의 주사 부위에서 단핵 세포, 호산구 및 PMN 침윤을 유도함으로써 염증을 유도한다는 것을 나타낸다. 면역 반응을 자극하는 것이 이로울 경우, 면역 반응을 자극하는 화합물이 치료에 있어서 유용하다. 피부 혈관의 투과성 분석을 다음과 같이 수행하였다. 케타민(75 내지 80 m

g/kg) 및 크실라진 5 mg/kg을 근육내 주사(IM)하여 체중이 350 g 이상인 무모의 기니 피그를 마취시켰다. 본 발명의 정제된 폴리펩티드 시료 또는 조정 배지 시험 시료를 주사 부위 당 100 ㎕의 양으로 시험 동물의 등에 피내 주사하였다. 대상 동물 당 약 10 내지 30개, 바람직하게는 약 16 내지 24개 부위에 주사할 수 있다. 에반스 블루(Evans blue) 염료(생리 완충 염수 중 1 %) 1 ㎕를 심장내에 주사하였다. 이어서, 주사 후 1시간 내지 6시간 후에 주사로 인한 손상 부위의 직경(mm)을 측정하였다. 주사 6시간 후 동물을 도살하였다. 피부의 주사 부위 각각을 생체검사하고 포르말린으로 고정하였다. 그 후에, 조직병리학적 평가를 위해 피부를 준비하였다. 각 부위에서 염증성 세포의 피부로의 침윤을 평가하였다. 염증성 세포에서 눈에 보이는 염증 부위를 포지티브로 기록하였다. 염증성 세포는 호중구, 호산구, 단핵구 또는 림프구일 수 있다. 주사 부위의 혈관주위에 침윤물이 조금이라도 있는 것은 포지티브로 기록하였고, 주사 부위에 침윤물이 전혀 없는 것은 네가티브로 기록하였다.

이 분석에서는 시험된 PRO1434 폴리펩티드가 포지티브였다.

실시예 15: 랫트의 소낭 지지 세포의 증식(분석 54)

이 분석은 본 발명의 특정 폴리펩티드가 청각 모 세포의 기원인 내이 지지 세포에 대한 강력한 미토겐으로 작용함으로써 포유동물에서 청각 모 세포의 재생을 유도하고 청각 상실을 치료하는데 유용하다는 것을 나타낸다. 이 분석은 다음과 같이 수행된다. 랫트의 UEC-4 소낭 상피 세포를 96 웰 플레이트에 웰 당 세포 3000개의 밀도로 33 ℃의 혈청 함유 배지 200 ㎕로 분주하였다. 세포를 밤새 배양한 다음, 37 ℃의 혈청-무함유 배지로 옮겼다. 이어서, 여러 농도로 희석시킨 PRO 폴리펩티드(또는 대조군은 이 폴리펩티드를 함유하지 않음)를 배양물에 가하고 세포를 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간의 인큐베이션 후에, ^{3}H-티미딘(1 ㎕Ci/웰)을 첨가하고 세포를 24시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 그 후에, 배양물을 세척하여 혼입되지 않은 방사표지를 제거하고, 세포를 수획하여 웰 당 Cpm을 결정하였다. 이 분석에서는 PRO 폴리펩티드로 처리한 배양물의 Cpm이 대조 배양물에 비해 30 % 또는 그 이상 높은 것을 포지티브로 간주하였다.

이 분석에서는 시험된 PRO982 폴리펩티드가 포지티브였다.

실시예 16: 유전자 증폭

본 실시예는 PRO1800, PRO539, PRO3434 및 PRO1927을 코딩하는 유전자가 특정 인간 폐암, 결장암 및(또는) 유방암 및(또는) 세포주의 게놈에서 증폭된다는 것 을 보여준다. 증폭은 유전자 산물의 과다 발현과 관련이 있으며, 이는 상기 폴리펩티드들이 특정 암, 예를 들어 결장암, 폐암, 유방암 및 기타 암을 치료하고 이러한 암의 존재를 결정하는데 유용한 표적이라는 것을 의미한다. 치료 물질은 PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927 폴리펩티드의 길항제 형태, 예를 들어 PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927 폴리펩티드에 대한 쥐-인간 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체의 형태를 취할 수 있다.

스크리닝을 위한 출발 물질은 여러 암으로부터 단리된 게놈 DNA였다. 이 DNA는 예를 들어 형광측정법으로 정확하게 정량된다. 음성 대조구로, 선발된 건강한 정상인 10 명의 세포로부터 DNA를 단리하여 건강한 사람들의 유전자 카피에 대한 분석 대조구로 사용하였다 (결과는 제시하지 않음). 5' 뉴클레아제 분석법(예를 들어 TaqMan ™) 및 실시간 정량적 PCR (예를 들면 ABI Prizm 7700 Sequence Detection System ™ (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, 미국 캘리포니아주 포스터시티 소재))을 이용하여 특정 암에서 증폭될 가능성이 있는 유전자를 찾아냈다. 그 결과를 사용하여, PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927을 코딩하는 DNA가 스크리닝된 원발성 폐 또는 결장암, 또는 암 세포주 또는 유방암 세포주 중 어느 것에서 과다하게 나타나는지를 결정하였다. 원발성 폐암은 표 7에 나타낸 유형 및 단계의 종양이 있는 대상으로부터 얻었다. 표 7에 열거한 원발성 종양을 지칭하기 위해 사용한 약어에 대한 설명 및 이 실시예 전체에서 거명된 원발성 종양 및 세포주를 하기에 제시하였다.

TaqMan ™의 결과는 델타 (Δ) Ct 단위로 나타낸다. 1 단위는 PCR 1 사이클에 상응하거나 또는 정상에 비해 약 2 배의 증폭에 상응하며, 2 단위는 4 배, 3 단위는 8 배의 증폭에 상응한다. 정량에는 PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927을 코딩하는 유전자로부터 유도된 프라이머 및 TaqMan ™ 형광성 프로브를 이용하였다. PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927 영역 중 고유의 핵산 서열을 포함할 가능성이 가장 크고 인트론이 스플라이싱되었을 가능성이 가장 작은 영역(예를 들어 3' 비번역 영역)이 프라이머 및 프로브의 유도에 바람직하다. PRO1800, PRO539, PRO3434 또는 PRO1927 유전자 증폭 분석에 사용된 프라이머 및 프로브 (전방향, 역방향 프라이머 및 프로브)의 서열은 다음과 같다.

PRO1800 (DNA35672-2508)
전방향 5'-actcgggattcctgctgtt-3' (서열 27)
프로브 5'-aggcctttacccaaggccacaac-3' (서열 28)
역방향 5'-ggcctgtcctgtgttctca-3' (서열 29)
PRO539 (DNA47465-1561)
전방향 5'-tcccaccacttacttccatgaa-3' (서열 30)
프로브 5'-ctgtggtacccaattgccgccttgt-3' (서열 31)
역방향 5'-attgtcctgagattcgagcaaga-3' (서열 32)
PRO3434 (DNA77631-2537)
전방향 5'-gtccagcaagccctcatt-3' (서열 33)
프로브 5'-cttctgggccacagccctgc-3' (서열 34)
역방향 5'-cagttcaggtcgtttcattca-3' (서열 35)
PRO1927 (DNA82307-2531)
전방향 5'-ccagtcaggccgttttaga-3' (서열 36)
프로브 5'-cgggcgcccaagtaaaagctc-3' (서열 37)

역방향 5'-cataaagtagtatatgcattccagtgtt-3' (서열 38)

5' 뉴클레아제 분석 반응은 Taq DNA 중합효소의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하여 증폭을 실시간으로 모니터링하는 형광성 PCR계 기술이다. 2 개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 PCR 반응에 통상적인 앰플리콘을 생성한다. 제3의 올리고뉴클레오티드 또는 프로브는 2 개의 PCR 프라이머 사이에 위치한 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 고안된다. 프로브는 Taq DNA 중합효소에 의해 연장될 수 없으며, 리포터 형광성 염료 및 켄쳐 (quencher) 형광성 염료로 표지된다. 레이저로 유도된 리포터 염료로부터의 방출은 2 개의 염료가 프로브 상에 함께 가까이에 위치할 때 켄칭 염료에 의해 켄칭된다. 증폭 반응 동안, Taq DNA 중합효소는 주형-의존적 방식으로 프로브를 절단한다. 이렇게 생성된 프로브 단편은 용액 중에서 분리되며, 방출된 리포터 염료로부터의 신호는 두번째 형광단의 켄칭 영향을 받지 않는다. 합성된 새로운 분자 각각에 대해 리포터 염료 분자가 하나씩 방출되며, 켄칭되지 않은 리포터 염료의 검출은 데이타의 정량적 해석을 위한 기초를 제공한다.

5' 뉴클레아제 방법은 실시간 정량적 PCR 장치, 예를 들어 ABI Prism 7700TM 서열 검출기(Sequence Detection)로 수행한다. 이 시스템은 주기적 가열기, 레이저, 전하-연결 장치(CCD) 카메라 및 컴퓨터로 구성된다. 본 시스템은 주기적 가열기에서 96 웰 포맷으로 시료를 증폭시킨다. 증폭시키는 동안, 레이저로 유도된 형광 신호가 모든 96 웰에 대해 광섬유 케이블을 통해 실시간으로 모아져 CCD에서 검출된다. 본 시스템은 장치를 작동하고 데이타를 분석하기 위한 소프트웨어를 포함한다.

5' 뉴클레아제 분석 데이타는 초기에는 Ct 또는 임계 사이클 (threshold cycle)로 표현된다. 이것은 리포터 신호가 형광의 배경값 수준 이상으로 축적되는 사이클로 정의된다. ΔCt 값은 암 DNA 결과를 정상 인간의 DNA 결과와 비교하는 경우, 핵산 시료 내 특정 표적 서열의 상대적인 출발 카피수의 양적인 측정치로 이용된다.

표 7은 본 발명의 PRO1800, PRO539, PRO3434 및 PRO1927 화합물을 스크리닝하는데 사용된 각종 원발성 종양의 단계, T 단계 및 N 단계를 설명한다. <표 7> 원발성 폐암 및 결장암 프로파일

원발성 폐암 및 결장암 프로파일

원발성 종양 단계	단계	다른 단계	듀크스 단계	T 단계	N 단계
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC724)[LT1]	IIA			T1	N1
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC725) [LT1a]	IIB			T3	N0
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC726) [LT2]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC727) [LT3]	IIIA			T1	N2
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC728) [LT4]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC729) [LT6]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 Aden/SqCCa (SRCC730) [LT7]	IA			T1	N0
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC731) [LT9]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC732) [LT10]	IIB			T2	N1
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC733) [LT11]	IIA			T1	N1
인간 폐 종양 AdenoCa (SRCC734)[LT12]	IV			T2	N0
인간 폐 종양 AdenoSqCCa (SRCC735)[LT13]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC736) [LT15]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC737) [LT16]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC738) [LT17]	IIB			T2	N1
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC739) [LT18]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 SqCCa (SRCC740) [LT19]	IB			T2	N0
인간 폐 종양 LCCa (SRCC741) [LT21]	IIB			T3	N1
인간 폐 AdenoCa (SRCC811) [LT22]	1A			T1	N0
인간 결장 AdenoCa (SRCC742) [CT2]	M1	D	pT4	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC743) [CT3]		B	pT3	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC744) [CT8]		B	T3	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC745) [CT10]		A	pT2	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC746) [CT12]	MO, R1	B	T3	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC747) [CT14]	pMO, RO	B	pT3	pN0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC748) [CT15]	M1, R2	D	T4	N2	
인간 결장 AdenoCa (SRCC749) [CT16]	pMO	B	pT3	pN0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC750) [CT17]		C1	pT3	pN1	
인간 결장 AdenoCa (SRCC751) [CT1]	MO, RI	B	pT3	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC752) [CT4]		B	pT3	M0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC753) [CT5]	G2	C1	pT3	pN0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC754) [CT6]	pMO, RO	B	pT3	pN0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC755) [CT7]	G1	A	pT2	pN0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC756) [CT9]	G3	D	pT4	pN2	
인간 결장 AdenoCa (SRCC757) [CT11]		B	T3	N0	
인간 결장 AdenoCa (SRCC758) [CT18]	MO, RO	B	pT3	pN0	

DNA 정제

DNA를 배양 세포주, 원발성 종양, 정상 인간의 혈액으로부터 정제하였다. 이러한 DNA 단리는 퀴아젠 (Quiagen)사의 정제 키트, 완충액 세트 및 프로테아제를 사용하여 제조업자의 지시 및 하기 설명에 따라 수행하였다.

세포 배양물 용해:

세포를 세척하여 팁 하나 당 7.5 x 10^{8} 의 농도로 트립신을 처리하고, 5 분 동안 4 ℃에서 1000 rpm으로 원심분리하여 펠렛화한 후, 1/2 부피의 PBS로 다시 세척하여 재원심분리하였다. 펠렛을 3번째 세척하고, 현탁된 세포를 수집

하고 PBS로 2 회 세척하였다. 그 다음에, 세포를 PBS 10 ml에 현탁시켰다. 완충액 C1을 4 ℃에서 평형화시켰다. 퀴아젠 프로테아제 #19155를 차가운 ddH $_2$O 6.25 ml에 최종 농도 20 mg/ml로 희석시키고 4 ℃에서 평형화시켰다. 퀴아젠 RNAse A 모용액(100 mg/ml)을 최종 농도 200 μg/ml로 희석하여 G2 완충액 10 ml를 준비하였다.
그 다음에 완충액 C1 (10 ml, 4 ℃) 및 ddH $_2$O (40 ml, 4 ℃)를 10 ml의 세포 현탁액에 첨가하고, 뒤집어서 혼합하고 10 분 동안 빙상에서 인큐베이션하였다. 베크만 (Beckman) 스윙 버켓 로터로 4 ℃에서 15분 동안 2500 rpm으로 원심분리하여 세포 핵을 펠렛화하였다. 상청액을 따라내고 볼텍싱하여 2 ml 완충액 C1 (4 ℃) 및 6 ml ddH $_2$O에 핵을 현탁시킨 후, 4 ℃에서 15분 동안 2500 rpm으로 두번째 원심분리하였다. 그 다음, 핵을 잔류 완충액에 팁 하나 당 200 ㎕으로 재현탁시켰다. 현탁된 핵에 G2 완충액 (10 ml)을 첨가하면서 천천히 볼텍싱하였다. 완충액 첨가를 완료한 후, 30 초 동안 격렬하게 볼텍싱하였다. 퀴아젠 프로테아제 (200 ㎕, 상기한 바와 같이 제조됨)를 첨가하고 60 분 동안 50 ℃에서 인큐베이션하였다. 용해물 (lysate)이 투명해질 때까지 인큐베이션 및 원심분리를 반복하였다 (예를 들어 30 내지 60 분을 더 인큐베이션하고 4 ℃에서 10 분 동안 3000 x g으로 펠렛화함).
인간 충실성종양 시료 제조 및 용해:
종양 시료의 무게를 달고 50 ml 들이 원뿔형 튜브에 넣고 빙상에 두었다. 1 회 제조(1 팁/1 회 제조)시 조직이 250 mg을 넘지 않도록 제한하여 처리하였다. 프로테아제 용액을 차가운 ddH $_2$O 6.25 ml 중에 최종 농도 20 mg/ml로 희석시켜 새로 제조하여 4 ℃에 보관하였다. DNAse A를 최종 농도 200 mg/ml로 희석(모용액 100 mg/ml로부터 희석됨)시켜 G2 완충액 (20 ml)을 제조하였다. 에어로졸의 흡입을 방지하기 위해서 라미나-플로우 TC 후드에서 큰 폴리트론 팁을 사용하여, 종양 조직을 G2 완충액 19 ml 중에서 60 초 동안 균질화하고 실온에 두었다. 시료와 시료 사이마다 폴리트론을 ddH $_2$O 2 ℓ 중에서 30 초씩 2 번 스피닝하여 세정한 후 G2 완충액 (50 ml)으로 세정하여 제거하였다. 제네레이터 팁 상에 남아있는 조직의 경우, 기기를 분해하여 제거하였다.
퀴아젠 프로테아제 (상기한 바와 같이 제조됨, 1.0 ml)를 첨가한 후 볼텍싱하고 50 ℃에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 용해물이 투명해질 때까지 인큐베이션 및 원심분리를 반복하였다 (예를 들어 30 내지 60 분을 더 인큐베이션하고 4 ℃에서 10 분 동안 3000 x g으로 펠렛화함).
인간 혈액의 제조 및 용해:
표준 감염 물질 프로토콜을 사용하여 건강한 지원자의 혈액을 채혈하여 팁 하나 당 시료 10 ml를 시트르산처리하였다. 퀴아젠 프로테아제를 차가운 ddH2O 6.25 ml 중에 최종 농도 20 mg/ml로 희석하여 새로 제조하고 4 ℃에서 보관하였다. RNAse A 모용액 100 mg/ml를 최종 농도 200 μg/ml로 희석시켜 G2 완충액을 제조하였다. 혈액 (10 ml)을 50 ml 들이 원뿔형 튜브에 넣고 C1 완충액 10 ml 및 ddH $_2$O 30 ml(둘다 미리 4 ℃로 평형화시킴)를 첨가하고, 뒤집어서 성분들을 혼합하고 빙상에 10 분 동안 두었다. 베크만 스윙 버켓 로터로 4 ℃에서 15 분 동안 2500 rpm으로 원심분리시켜 핵을 펠렛화하고 상청액을 따라냈다. 볼텍싱하여 핵을 C1 완충액(4 ℃) 2 ml 및 ddH $_2$O(4 ℃) 6 ml 중에 현탁시켰다. 펠렛이 백색으로 될때가지 볼텍싱을 반복하였다. 그 다음, 200 ㎕ 짜리 팁을 사용하여 핵을 잔류 완충액 중에 재현탁시켰다. G2 완충액 (10 ml)을 현탁된 핵에 첨가하면서 천천히 볼텍싱한 후, 30 초 동안 격렬하게 볼텍싱하였다. 퀴아젠 프로테아제(200 ㎕)를 첨가하고, 50 ℃에서 60 분 동안 인큐베이션하였다. 용해물이 투명해질 때까지 인큐베이션 및 원심분리를 반복하였다 (예를 들어 30 내지 60 분을 더 인큐베이션하고 4 ℃에서 10 분 동안 3000 x g으로 펠렛화함).
투명한 용해물의 정제:
(1) <u>게놈 DNA의 단리</u>
게놈 DNA를 10 ml QBT 완충액으로 평형화시켰다 (최대형 팁 당 1 시료 제조). QF 용출 완충액을 50 ℃에서 평형화시켰다. 시료를 30 초 동안 볼텍싱한 후, 평형화된 팁에 로딩하고 중력을 이용해 배수하였다. 팁을 QC 완충액 15 ml로 2 번 세척하였다. QF 완충액(50 ℃) 15 ml를 사용하여 DNA를 용출시켜, 30 ml 실란화 고압증기멸균된 30 ml 들이 Corex 튜브 내에 얻었다. 이소프로판올 (10.5 ml)을 각 시료에 첨가하고 튜브를 파라핀으로 씌우고, DNA가 침전될 때까지 뒤집기를 반복하여 혼합하였다. SS-34 로터로 4 ℃에서 10분 동안 15,000 rpm으로 시료를 원심분리하여 펠렛화시켰다. 펠렛 위치를 표시하고 상청액을 따라내고 70 % 에탄올 (4 ℃) 10 ml를 첨가하였다. SS-34 로터로 4 ℃에서 10분 동안 10,000 rpm으로 시료를 원심분리하여 재펠렛화시켰다. 펠렛 위치를 표시하고 상청액을 따라냈다. 이들 튜브를 다시 건조 랙(rack)에 놓고 시료가 과도하게 건조되지 않도록 주의하면서 37 ℃에서 10 분 동안 건조시켰다.
건조 후, 펠렛을 1.0 ml TE (pH 8.5)중에 용해시키고 50 ℃에서 1 내지 2 시간 동안 두었다. 계속 용해시키면서 시료를 4 ℃에서 밤새 두었다. 그 다음, 26 게이지 바늘이 달린 투베르쿨린 주사기를 사용하여 DNA 용액을 1.5 ml 들이 튜브에 옮겼다. DNA를 떼어내기 위해 이와 같은 DNA 용액 이전을 5 회 반복하였다. 그 다음, 시료를 50 ℃에서 1 내지 2 시간 동안 두었다.
(2) <u>게놈 DNA의 정량 및 유전자 증폭 분석을 위한 준비</u>
벡크만 DU640 분광광도기에서 0.1 ml 석영 큐벳을 사용하여 표준 A $_{260}$, A $_{280}$ 분광광도법을 통해 1 : 20 희석물 (5 ㎕ DNA + 95 ㎕ ddH $_2$O)에 대해 각 튜브의 DNA 수준을 정량하였다. A $_{260}$/A $_{280}$ 비율은 1.8 내지 1.9 범위였다. 그 후, 각 DNA 시료를 TE (pH 8.5) 중에서 약 200 ng/ml의 농도로 더 희석하였다. 본래 물질이 고농 축된 것이었다면 (약 700 ng/㎕), 이 물질은 재현탁시킬 때까지 수 시간 동안 50 ℃에 두었다.
그 다음, 아래와 같이 변형된 제조업자의 지침을 사용하여 희석된 물질 (20 - 600 ng/ml)에 대해 형광측정에 의한 DNA 정량을 수행하였다. 이는 Hoeffer DyNA Quant 200 형광측정기를 약 15 분 동안 워밍업시켜서 수행하였다. Hoechst 염료 처리 용액(#H33258, 10 ㎕, 사용 전 12 시간 이내에 제조)을 1×TNE 완충액 100 ml 중에 희석시켰다. 2 ml 큐벳에 형광측정기용 용액을 채워서 형광측정기 안에 넣고 이 기계를 0점에 맞추었다. pGEM 3Zf(+) (2 ㎕, 로트 번호 #360851026)를 형광측정기용 용액 2 ml에 첨가하고 200 유닛에서 측정하였다. 그 후에, 다른 pGEM 3Zf(+) D

NA 2 μℓ를 시험하고 측정 결과를 400 +/-10 유닛에서 확인하였다. 그 다음에, 각 시료를 적어도 3회 측정하였다. 시료를 3회 측정한 결과가 서로 10 % 이내인 경우, 이들의 평균을 구하여 이 값을 정량값으로 사용하였다.
형광측정에 의해 결정된 농도를 사용하여 각 시료를 ddH $_2$ O 중에 10 ng/μℓ로 희석하였다. 단일 TaqMan 플레이트 분석의 경우, 모든 템플레이트 시료에 대해 상기 희석을 동시에 수행하였으며, 물질은 분석을 500 내지 1000회 수행할 정도로 충분했다. Taqman ™ 프라이머, 및 정상 인간의 DNA 비주형 대조구를 갖는 단일 플레이트 상에서 B-액틴 및 GAPDH 둘다에 대한 프로브를 사용하여 3회 시험하였다. 정상 인간 DNA의 CT 값을 시험 DNA로부터 뺀 값이 +/-1 Ct이라면 희석된 시료를 사용하였다. 분류하여 표시한 희석된 게놈 DNA를 1.0 ml씩 나누어 -80 ℃에 보관하였 다. 나중에 유전자 증폭 분석에 사용할 분취액은 4 ℃에서 보관하였다. 분취액 각 1 ml는 8 내지 9개의 플레이트에 사용하거나 또는 시험 64회 수행하기에 충분했다.
유전자 증폭 분석:
본 발명의 PRO1800, PRO539, PRO3434 및 PRO1927 화합물을 다음의 원발성 종양에서 스크리닝하였고, 이로 얻은 1.0 이상의 ΔCt 값을 하기 표 8에 나타냈다. <표 8 폐 및 결장의 원발성 종양 모델에서의 ΔC1 값

Table 7 (폐 및 결장의 원발성 종양 모델에서의 ΔCt 값)

원발성 종양	PRO1800	PRO539	PRO3434	PRO1927
LT11	1.65, 1.59, 1.03			
LT12	1.34, 2.28, 2.03	1.25		
LT13	1.27, 2.18	1.64, 1.08	5.24, 4.47	4.38, 4.80
LT15	1.70, 2.23, 1.93	1.78, 1.10	1.24	1.00
LT16	1.00, 1.05, 1.09		3.65, 3.19	2.73, 2.74
LT17	1.94, 1.63	1.94, 1.01		
LT18	1.12			
LT19	2.51, 2.18	1.16		
LT21	1.30	1.32		
CT2	1.50			
CT3		1.17		
CT10		1.16		
CT12		1.19		
CT14	1.62			
CT15	1.48, 1.08	1.03	1.19, 1.40	1.10, 1.30
CT5	1.10			
CT11	1.20	1.12		
Colo-320 (결장 종양 세포주)	1.16		1.78, 1.76, 1.74	1.51
HF-00084 (폐 종양 세포주)			2.20	2.41
HCT-116 (결장 종양 세포주)			2.15, 2.22	1.41, 1.47
HF-00129 (폐 종양 세포주)			1.00, 1.17, 4.64 1.11	2.31, 5.14 2.40
SW-620 (결장 종양 세포주)			1.30	
HT-29 (결장 종양 세포주)			1.64	
SW-403 (결장 종양 세포주)			1.75	
LS174T (결장 종양 세포주)			1.42	
HCC-2998 (결장 종양 세포주)			1.15	
A549 (폐 종양 세포주)			1.51, 1.09	
Calu-6 (폐 종양 세포주)			1.60, 1.22	
H157 (폐 종양 세포주)			1.61	
H441 (폐 종양 세포주)			1.07, 1.15	
H460 (폐 종양 세포주)			1.01	
SKMES1 (폐 종양 세포주)			1.02	
H810 (폐 종양 세포주)			1.20, 1.54	

실시예 17: 이자 β-전구 세포의 증식 유도(분석 117)
이 분석은, 본 발명의 특정 폴리펩티드가 이자 β-세포의 전구 세포수의 증가를 유도하기 때문에 포유동물에서 당뇨병을 비롯한 다양한 인슐린 결핍 증상의 치료에 유용함을 나타낸다. 분석은 다음과 같이 수행된다. 분석에서는 마우스 태아의 이자 세포의 일차 배양물을 이용하며, 일차 판독 결과로 β-전구 세포 또는 성숙 β-세포를 나타내는 마커의 발현이 변경되는 것으로 나타났다. 마커의 발현은 실시간 정량적 PCR(RTQ-PCR)에 의해 측정되는데, 여기서 측정되는 마커는 Pdx1이라 불리는 전사인자이다.
E14 배아(CD1 마우스)로부터 이자를 절개하였다. 이어서, 37 ℃에서 40 내지 60분 동안 이자를 F12/DMEM 중 콜라게나제/디스파제로 처리하여 분해하였다(콜라게나제/디스파제, 1.37 mg/ml, 베링거 만하임(Boehringer Mannheim), #1097113). 그 후에, 같은 부피의 5 % BSA를 사용하여 분해물을 중화시키고 세포를 RPMI1640으로 1회 세척하였다. 1일째, 세포를 12-웰 조직 배양 플레이트(PBS 중 라미닌 20 μg/ml으로 예비-코팅함, 베링거 만하임, #124317)에 파종하였다. 1 내지 2개의 배아의 이자로부터의 세포를 웰마다 분배하였다. 이 일차 배양을 위한 배양 배지는

14F/1640이었다. 2일째, 배지를 제거하고 RPMI/1640을 사용하여 부착된 세포를 씻어냈다. 시험 대상 단백질 이외에, 최소 배지 2 ml를 첨가하였다. 4일째, 배지를 제거하고 세포로부터 RNA를 준비하여 실시간 정량적 RT-PCR에 의해 마커의 발현을 분석하였다. 이 분석에서, 단백질이 무처리 대조군에 비해 관련된 β-세포 마커의 발현을 증가시키는 경우, 단백질은 활성인 것으로 고려하였다.
14F/1640은 RPMI1640(Gibco)에 하기 성분을 부가한 것이다.
그룹 A 1:1000
그룹 B 1:1000
재조합 인간 인슐린 10 μg/ml
아프로티닌(50 μg/ml) 1:2000 (베링거 만하임 #981532)
소의 뇌하수체 추출물(BPE) 60 μg/ml
겐타마이신 100 ng/ml
그룹 A: (PBS 10 ml 중)
트랜스페린, 100 mg(시그마 T2252)
표피 성장 인자, 100 μg(BRL 100004)
5×10^{-6} M 트리요오도티로닌 10 μℓ (시그마 T5516)
10^{-1} M 에탄올아민 100 μℓ (시그마 E0135)
10^{-1} M 포스포에탄올아민 100 μℓ (시그마 P0503)
10^{-1} M 셀레늄 4 μℓ (Aesar #12574)
그룹 C: (100 % 에탄올 10 ml 중)
5×10^{-3} M 하이드로코티손 2 μℓ (시그마 #H0135)
1×10^{-3} M 프로게스테론 100 μℓ (시그마 #P6149)
20 mM 포르스콜린 500 μℓ (칼바이오켐 #344270)
최소 배지:
RPMI 1640, 및 트랜스페린(10 μg/ml), 인슐린(1 μg/ml), 겐타마이신(100 ng/ml), 아프로티닌(50 μg/ml) 및 BPE(15 μg/ml).
제한 배지:
RPMI 1640, 및 트랜스페린(10 μg/ml), 인슐린(1 μg/ml), 겐타마이신(100 ng/ml) 및 아프로티닌(50 μg/ml).
이 분석에서는 PRO1868 폴리펩티드가 포지티브이었다.

<u>실시예 18: 이자 β-전구 세포의 분화 유도(분석 89)</u>

이 분석은, 본 발명의 특정 폴리펩티드가 이자 β-세포의 전구 세포의 성숙한 이자 β-세포로의 분화를 유도하는 작용을 하기 때문에 포유동물에서 당뇨병을 비롯한 다양한 인슐린 결핍 증상의 치료에 유용함을 나타낸다. 분석은 다음과 같이 수행된다. 분석에서는 마우스 태아의 이자 세포의 일차 배양물을 이용하며, 일차 판독 결과로 β-전구 세포 또는 성숙 β-세포를 나타내는 마커의 발현이 변경되는 것으로 나타났다. 마커의 발현은 실시간 정량적 PCR(RTQ-PCR)에 의해 측정되는데, 여기서 측정되는 마커는 인슐린이다.
E14 배아(CD1 마우스)로부터 이자를 절개하였다. 이어서, 37 ℃에서 40 내지 60분 동안 이자를 F12/DMEM 중 콜라게나제/디스파제로 처리하여 분해하였다(콜라게나제/디스파제, 1.37 mg/ml, 베링거 만하임(Boehringer Mannheim), #1097113). 그 후에, 같은 부피의 5 % BSA를 사용하여 분해물을 중화시키고 세포를 RPMI1640으로 1회 세척하였다. 1일째, 세포를 12-웰 조직 배양 플레이트(PBS 중 라미닌 20 μg/ml으로 예비-코팅함, 베링거 만하임, #124317)에 파종하였다. 1 내지 2개의 배아의 이자로부터의 세포를 웰마다 분배하였다. 이 일차 배양을 위한 배양 배지는 14F/1640이었다. 2일째, 배지를 제거하고 RPMI/1640을 사용하여 부착된 세포를 씻어냈다. 시험 대상 단백질 이외에, 최소 배지 2 ml을 첨가하였다. 4일째, 배지를 제거하고 세포로부터 RNA를 준비하여 실시간 정량적 RT-PCR에 의해 마커의 발현을 분석하였다. 이 분석에서, 단백질이 무처리 대조군에 비해 관련된 β-세포 마커의 발현을 증가시키는 경우, 단백질은 활성인 것으로 고려하였다.
14F/1640은 RPMI1640(Gibco)에 하기 성분을 부가한 것이다.
그룹 A 1:1000
그룹 B 1:1000
재조합 인간 인슐린 10 μg/ml
아프로티닌(50 μg/ml) 1:2000 (베링거 만하임 #981532)
소의 뇌하수체 추출물(BPE) 60 μg/ml
겐타마이신 100 ng/ml
그룹 A: (PBS 10 ml 중)
트랜스페린, 100 mg(시그마 T2252)
표피 성장 인자, 100 μg(BRL 100004)
5×10^{-6} M 트리요오도티로닌 10 μℓ (시그마 T5516)
10^{-1} M 에탄올아민 100 μℓ (시그마 E0135)
10^{-1} M 포스포에탄올아민 100 μℓ (시그마 P0503)
10^{-1} M 셀레늄 4 μℓ (Aesar #12574)
그룹 C: (100 % 에탄올 10 ml 중)
5×10^{-3} M 하이드로코티손 2 μℓ (시그마 #H0135)

1 ×10 $^{-3}$ M 프로게스테론 100 ㎕ (시그마 #P6149)
20 mM 포르스콜린 500 ㎕ (칼바이오켐 #344270)
최소 배지:
RPMI 1640, 및 트랜스페린(10 ㎍/ml), 인슐린(1 ㎍/ml), 겐타마이신(100 ng/ml), 아프로티닌(50 ㎍/ml) 및 BPE(15 ㎍/ml).
제한 배지:
RPMI 1640, 및 트랜스페린(10 ㎍/ml), 인슐린(1 ㎍/ml), 겐타마이신(100 ng/ml) 및 아프로티닌(50 ㎍/ml).
이 분석에서는 PRO1863 폴리펩티드가 포지티브이었다.

실시예 19: 마우스 신장의 혈관간세포의 증식 분석(분석 92)

이 분석은, 본 발명의 특정 폴리펩티드가 포유동물 신장의 혈관간세포의 증식을 유도하는 작용을 하기 때문에 베르게(Berger)병, 또는 쇤라인-헤노흐(Schoenlein-Henoch) 자반병, 만성소화장애증, 포진성 피부염 또는 크론(Crohn)병과 관련된 기타 신경병증과 같은 혈관간세포의 기능 저하와 관계가 있는 신장 질환을 치료하는데 유용하다는 것을 나타낸다. 분석은 다음과 같이 수행된다. 1일째, 마우스 신장의 혈관간세포를 96 웰 플레이트에 성장 배지[둘베코스 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)와 햄(Ham's) F12 배지의 3:1 혼합물, 95 % 우 태아 혈청, 5 %는 14 mM HEPES로 보충] 중에 플레이팅하고 밤새 배양하였다. 2일째, PRO 폴리펩티드를 혈청-무함유 배지 중에 2가지 농도(1 % 및 0.1 %)로 희석하여 세포에 가하였다. 대조 시료는 혈청-무함유 배지 단독이다. 4일째, 셀 타이터 96 아쿠어스(Cell Titer 96 Aqueous) 일성분 용액 시약(Promega)을 각 웰에 첨가하고 비색 반응을 2시간 동안 진행시켰다. 이어서, 490 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 이 분석에서 포지티브란 대조군 판독치 보다 15 % 이상 높은 흡광도 수치를 나타내는 것들이다.
이 분석에서는 시험된 PRO1917 폴리펩티드가 포지티브이었다.

실시예 20: 섬유아세포(BHK-21) 증식(분석 98)

이 분석은, 본 발명의 특정 폴리펩티드가 배양에서 포유동물 섬유아세포의 증식을 유도하는 작용을 하기 때문에 포유동물계에서 유용한 성장 인자로 작용한다는 것을 나타낸다. 분석은 다음과 같이 수행된다. BHK-21 섬유아세포를 표준 성장 배지에 웰 당 2500개의 세포로 총 부피 100 ㎕로 플레이팅하였다. 이어서, 헤파린 1 ㎕/ml의 존재하에 웰에 PRO 폴리펩티드 또는 β-FGF(포지티브 대조군)를 첨가하거나 또는 아무 것도 첨가하지 않음으로써(네가티브 대조군) 총 부피를 200 ㎕로 만들었다. 이어서, 세포를 37 ℃에서 6일 내지 7일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 다음, 산 포스파타제 기질 반응 혼합물(웰 당 100 ㎕)을 첨가하였다. 이이서, 세포를 37 ℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 1 N NaOH를 웰 당 10 ㎕ 첨가하여 산 포스파타제 반응을 중지시켰다. 이어서, OD 405 nm에서 플레이트를 판독하였다. 이 분석에서 포지티브란 산 포스파타제 활성이 네가티브 대조군 보다 50 % 이상 높은 것들이다.
이 분석에서는 시험된 PRO982 폴리펩티드가 포지티브이었다.

실시예 21: 연골세포 재분화 분석(분석 110)

이 분석은, 본 발명의 특정 폴리펩티드가 연골세포의 분화를 유도하는 작용을 하기 때문에 예를 들어 운동으로 인한 손상 및 관절염과 같은 각종 뼈 및(또는) 연골 질환의 치료에 유용한 것으로 생각된다는 것을 나타낸다. 분석은 다음과 같이 수행된다. 생후 4 내지 6개월 된 암퇘지의 중수수지관절의 관절 연골을 밤새 콜라게나제로 처리하여 분해함으로써 돼지 연골세포를 단리하였다. 이어서, 단리된 세포를 10 % FBS 및 겐타마이신 4 ㎍/ml를 함유하는 햄(Ham) F-12 중 25,000 세포/cm ^{2} 로 파종하였다. 배양 배지는 3일마다 교환해주었으며 세포를 96 웰 플레이트에서 혈청을 함유하지 않는 동일한 배지 100 ㎕ 중에 웰 당 5,000개의 세포로 파종하고, 시험 PRO 폴리펩티드, 스타우로스포린(포지티브 대조군) 또는 배지 단독(네가티브 대조군)을 100 ㎕ 가하여 총 부피를 웰 당 200 ㎕로 만들었다. 37 ℃에서 5일 동안 인큐베이션한 다음, 각 웰의 사진을 찍고 연골세포의 분화 상태를 결정하였다. 이 분석에서 포지티브란 연골세포의 재분화가 네가티브 대조군보다는 포지티브 대조군에서 보다 유사한 것으로 결정된 것이다.
이 분석에서는 시험된 PRO1863 폴리펩티드가 포지티브이었다.

실시예 22 : PRO의 혼성화 프로브로서의 용도

하기 방법은 PRO를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 혼성화 프로브로서의 용도를 기술한다.
본원에 기술한 바와 같이 전장 또는 성숙 PRO의 코딩 서열을 포함하는 DNA를 프로브로 사용하여 인간 조직 cDNA 라이브러리 또는 인간 조직 게놈 라이브러리에서 상동성 DNA (예를 들면, PRO의 천연 변이체를 코딩하는 것)를 스크리닝하였다.
각각의 라이브러리 DNA를 포함하는 필터의 혼성화 및 세척을 하기의 고엄격 조건 하에 수행하였다. 방사성 표지된 PRO-유도 프로브와 필터의 혼성화를 50 % 포름아미드, 5 ×SSC, 0.1 % SDS, 0.1 % 피로인산나트륨, 50 mM 인산나트륨, pH 6.8, 2 ×덴하르트(Denhardt's) 용액 및 10 % 덱스트란 술페이트의 용액 중에서 42 ℃에서 20 시간 동안 수행하였다. 42 ℃의 0.1 ×SSC 및 0.1 % SDS의 수용액 중에서 필터를 세척하였다.
이어서, 전장 천연 서열 PRO를 코딩하는 DNA와 목적하는 서열 동일성을 갖는 DNA를 당업계에 공지된 표준 방법으로 확인하였다.

실시예 23 : 이. 콜라이에서 PRO의 발현

본 실시예는 이. 콜라이에서 재조합 발현에 의해 글리코실화되지 않은 형태의 PRO를 제조하는 방법을 설명한다.
먼저, 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 PRO를 코딩하는 DNA 서열을 증폭하였다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한 효소 부위에 상응하는 제한 효소 부 위를 포함해야 한다. 다양한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예로는 암피실린 및 테트라사이클린 내성 유전자를 포함하는 pBR322[이. 콜라이에서 유래, 볼리바(Bolivar) 등의 문헌[Gene , 2 :95(1977)]]가 있다. 이 벡터를 제한 효소로 절단하고 탈인산화하였다. 이어서, PCR 증폭된 서열을

벡터에 라이게이션하였다. 벡터는 바람직하게는 항생제 내성 유전자, trp 프로모터, 폴리-his 리더(처음 6개의 STII 코돈, 폴리-his 서열 및 엔테로키나제 절단 부위를 포함), PRO 코딩 영역, 람다 전사 종결자 및 argU 유전자를 코딩하는 서열을 포함할 것이다.
이어서, 라이게이션 혼합물을 사용하여 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에 기재한 방법에 의해 선택된 이. 콜라이 균주를 형질전환시켰다. 형질전환체가 LB 플레이트에서 성장할 수 있는지를 확인한 다음, 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선택하였다. 플라스미드 DNA를 단리하여 제한 분석법 및 DNA 서열 분석에 의해 확인할 수 있었다.
선택된 클론을, 항생제가 보충된 LB 브로쓰와 같은 액체 배양 배지에서 밤새 배양하였다. 이 배양액을 사용하여 더 큰 규모의 배양물을 접종시켰다. 이어서, 세포를 원하는 광학 밀도까지 배양시켰으며, 그 동안에 발현 프로모터가 작동하였다.
수시간 이상 동안 세포를 배양한 후에 원심분리로 세포를 회수할 수 있었다. 원심분리로 얻은 세포 펠렛을 당업계에 공지된 여러가지 시약을 사용하여 용해시키고, 금속 킬레이팅 칼럼을 이용하여 단백질을 단단히 결합시키는 조건 하에 상기 가용화된 PRO 단백질을 정제할 수 있었다.
하기 방법을 사용하여 PRO를 이. 콜라이에서 폴리-His 태그된 형태로 발현시켰다. 먼저, 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 PRO를 코딩하는 DNA를 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한효소 부위에 상응하는 제한효소 부위와, 효율적이고 신뢰할 만한 번역 개시, 금속 킬레이트 칼럼에서의 빠른 정제, 및 엔테로키나아제를 사용한 단백질 분해 제거를 제공하는 다른 유용한 서열을 포함하였다. 이어서, PCR-증폭된 폴리-His 태그된 서열을 발현 벡터에 라이게이션시키고, 이 벡터를 사용하여 균주 52를 토대로 한 이. 콜라이 숙주(W3110fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)를 형질전환시켰다. 먼저, 형질전환체를, 50 ㎎/㎖의 카르베니실린 함유 LB에서 O.D.600이 3 내지 5에 도달할 때까지 30 ℃에서 진탕 배양하였다. 이어서, 배양액을 CRAP 배지(물 500 ㎖ 중 $(NH_4)_2SO_4$ 3.57 g, 시트르산나트륨 · 2H $_2$O 0.71 g, KCl 1.07 g, Difco 효모 추출물 5.36 g, 쉐필드 히카제(Sheffield hycase) SF 5.36 g, 및 110 mM MPOS(pH 7.3), 0.55 % (w/v) 글루코스 및 7 mM $MgSO_4$를 혼합하여 제조함)로 50 내지 100배 희석하고 30 ℃에서 약 20 내지 30시간 동안 진탕 배양시켰다. 시료를 취해 SDS-PAGE 분석법으로 발현을 확인하고, 벌크 배양액을 원심분리하여 세포를 펠렛으로 만들었다. 정제 및 리폴딩될때까지 세포 펠렛을 동결시켰다.
0.5 내지 1 ℓ의 발효액으로부터 얻은 이. 콜라이 페이스트 (펠렛 6 내지 10 g)를 10배 부피(w/v)의 7 M 구아니딘, 20 mM Tris 완충액(pH 8) 중에 재현탁시켰다. 고체 아황산나트륨 및 사티온산나트륨을 가하여 최종 농도를 각각 0.1 M 및 0.02 M로 만들고 이 용액을 4 ℃에서 밤새 교반하였다. 이 단계에서 아황산염화에 의해 모든 시스테인 잔기가 차단된 변성 단백질이 생산되었다. 이 용액을 베크만(Beckman) 초원심분리기로 40,000 rpm에서 30 분간 원심분리하였다. 상청액을 3배 내지 5배 부피의 금속 킬레이트 칼럼 완충액(6 M 구아니딘, 20 mM Tris, pH 7.4)으로 희석하고 0.22 마이크론 필터로 여과시켜 정화하였다. 정화된 추출물을 금속 킬레이트 칼럼 완충액 중에 평형화된 5 ㎖ 퀴아젠(Qiagen) Ni-NTA 금속 킬레이트 칼럼에 로딩하였다. 50 mM 이미다졸을 함유하는 다른 완충액(Calbiochem, Utrol grade)(pH 7.4)으로 칼럼을 세척하였다. 250 mM 이미다졸을 포함하는 완충액으로 단백질을 용출시켰다. 목적 단백질을 함유하는 분획을 모아 4 ℃에서 보관하였다. 아미노산 서열을 기초로 하여 계산된 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서의 흡광도로 단백질 농도를 측정하였다.
20 mM Tris(pH 8.6), 0.3 M NaCl, 2.5 M 우레아, 5 mM 시스테인, 20 mM 글리신 및 1 mM EDTA로 구성된 새로 제조한 리폴딩 완충액 중에 시료를 천천히 희석하여 단백질을 리폴딩시켰다. 리폴딩 부피는 최종 단백질 농도가 50 내지 100 ㎍/㎖ 사이의 값이 되게끔 선택하였다. 리폴딩 용액을 4 ℃에서 12 내지 36시간 동안 천천히 교반하였다. 0.4 %의 최종 농도(약 pH 3)로 TFA를 첨가하여 리폴딩 반응을 정지시켰다. 단백질을 추가로 정제하기에 앞서, 0.22 마이크론 필터를 통해 용액을 여과하고 아세토니트릴을 첨가하여 최종 농도를 2 내지 10 %로 만들었다. 리폴딩된 단백질을, 0.1 % TFA의 이동 완충액을 사용하여 Poros R1/H 역상 칼럼에서 10 %로부터 80 %까지의 아세토니트릴 농도 구배로 용출시켜 크로마토그래피처리하였 다. A $_{280}$ 흡광도를 나타낸 분획의 분액을 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분석하고 균일한 리폴딩된 단백질을 함유하는 분획을 모았다. 일반적으로, 적절하게 리폴딩된 대부분의 단백질 종류는 역상 수지와의 상호작용으로부터 보호되는 소수성 내부를 포함하고 있어서 가장 조밀하기 때문에 가장 낮은 아세토니트릴 농도에서 용출된다. 응집된 단백질은 대개 더 높은 아세토니트릴 농도에서 용출된다. 역상 단계에서는 목적하는 형태의 단백질이 잘못 폴딩된 형태의 단백질로부터 분리될 뿐 아니라, 시료로부터 내독소가 제거되기도 한다.
목적하는 폴딩된 PRO 폴리펩티드를 함유하는 분획을 모은 다음, 용액에 질소 스트림을 천천히 가하여 아세토니트릴을 제거하였다. 투석법, 또는 배합 완충액으로 평형화시킨 G25 수퍼파인(Superfine, Pharmacia) 수지를 사용한 겔 여과법에 의해, 0.14 M 염화나트륨 및 4 % 만니톨을 함유하는 20 mM Hepes(pH 6.8) 중에 단백질을 배합하고 멸균 여과하였다.

실시예 24 : 포유동물 세포에서 PRO의 발현

본 실시예는 포유동물 세포에서 재조합 발현에 의해 잠재적으로 글리코실화된 형태의 PRO를 제조하는 방법을 설명한다.
벡터 pRK5(1989년 3월 15일에 공개된 유럽 특허 제307,247호 참조)를 발현 벡터로 사용하였다. 임의로, 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[상기 문헌]에 기재된 라이게이션 방법을 이용하여, PRO DNA를 선택된 제한 효소를 사용하여 pRK5에 라이게이션시켜, PRO DNA를 삽입하였다. 생성된 벡터는 pRK5-PRO 폴리펩티드라고 부른 다.
한 실시태양에서, 숙주 세포로 293 세포를 선택할 수 있다. 인간 293 세포(ATCC CCL 1573)를 태아 송아지 혈청 및 임의로 영양분 및(또는) 항생제가 보충된 DMEM와 같은 배지에서 조직 배양판에서 전면 배양하였다. pRK5-PRO DNA 약 10 ㎍를 VA RNA 유전자를 코딩하는 DNA[팀마파야(Thimmappaya) 등의 문헌[Cell , 31 : 543(1982)]] 약 1 ㎍과 혼합하여, 500 ㎕의 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA 및 0.227 M $CaCl_2$ 중에 용해시켰다. 이 혼합물에 5

00 μℓ의 50 mM HEPES(pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM $NaPO_4$ 를 적가하여 25 ℃에서 10분간 침전물을 형성시켰다. 침전물을 현탁시키고 293 세포에 첨가하여 37 ℃에서 약 4 시간 동안 정치시켰다. 배양 배지를 흡인 제거하고 PBS 중 20 % 글리세롤 2 ㎖를 30초 동안 첨가하였다. 이어서, 293 세포를 혈청 무함유 배지로 세척하고, 배지를 새로 첨가하고 약 5 일간 세포를 인큐베이션하였다.
트랜스펙션 약 24시간 후에 배양 배지를 제거하고 배양 배지(단독) 또는 200 μCi/㎖ ^{35}S-시스테인 및 200 μCi/㎖ ^{35}S-메티오닌을 함유하는 배양 배지로 대체하였다. 12시간 인큐베이션한 다음, 조정 배지(conditioned medium)를 회수하고 회전 필터에서 농축시켜 15 % SDS 겔에 로딩하였다. 처리된 겔을 건조시키고 일정 기간 필름에 노출시켜 PRO 폴리펩티드의 존재를 확인하였다. 트랜스펙션된 세포를 포함하는 배양액을 (혈청 무함유 배지에서) 추가로 인큐베이션하고, 선택한 생물분석법으로 배지를 시험하였다.
다른 기술로는, 솜파리락(Somparyrac) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. , 12 :7575 (1981)]에 기재된 덱스트란 술페이트 방법을 이용하여, PRO를 293 세포에 일시적으로 도입시킬 수 있다. 293 세포를 스핀너(spinner) 플라스크에서 최대 밀도까지 배양하고 pRK5-PRO DNA를 700 μg 첨가하였다. 세포를 우선 원심분리에 의해 스핀너 플라스크로부터 농축하고 PBS로 세척하였다. DNA-덱스트란 침전물을 4 시간 동안 세포 펠렛 상태로 인큐베이션하였다. 세포를 20 % 글리세롤로 90 초간 처리하고 조직 배양 배지로 세척한 다음, 조직 배양 배지, 5 μg/㎖ 소의 인슐린 및 0.1 μg/㎖ 소의 트랜스페린이 담긴 스핀너 플라스크에 다시 넣었다. 약 4일 후에 조정 배지를 원심분리하고 여과시켜 세포와 파쇄물을 제거하였다. 발현된 PRO를 포함하는 시료를 농축시키고 임의 선택된 방법, 예를 들어 투석 및(또는) 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다.
다른 실시태양으로, CHO 세포에서 PRO를 발현시킬 수 있다. pRK5-PRO를 공지된 시약, 예를 들어 $CaPO_4$ 또는 DEAE-덱스트란을 사용하여 CHO 세포에 트랜스펙션시킬 수 있다. 상기에서 언급한 것과 같이, 세포 배양물을 인큐베이션하고, 배지를 배양 배지(단독) 또는 ^{35}S-메티오닌과 같은 방사성 표지를 포함하는 배지로 대체하였다. PRO 폴리펩티드의 존재를 확인하고 나서, 배양 배지를 혈청 무함유 배지로 대체할 수 있다. 바람직하게는, 약 6일 가량 배양물을 인큐베이션한 다음, 조정 배지를 회수하였다. 이어서, 발현된 PRO를 포함하는 배지를 농축하여 임의 선택된 방법으로 정제할 수 있었다.
또한, 에피토프-태그된 PRO를 숙주 CHO 세포에서 발현시킬 수도 있었다. PRO 폴리펩티드를 pRK5 벡터로부터 서브클로닝한다. 서브클론 삽입체를 PCR에 의해 폴리-his 태그와 같은 선택된 에피토프 태그와 함께 바큘로바이러스 발현 벡터에 프레임내 융합한다. 폴리-his 태그된 PRO 삽입체를 안정한 클론을 선택하기 위해 DHFR과 같은 선택 마커를 포함하는 SV40 유도 벡터에 서브클로닝한다. 마지막으로, (상기와 같이) SV40 유도 벡터로 CHO 세포를 트랜스펙션시킬 수 있다. 발현을 확인하기 위해서 상기와 같은 방법으로 표지할 수도 있다. 이어서, 발현된 폴리-His 태그된 PRO를 포함하는 배양 배지를 농축하여 Ni^{2+} -킬레이트 친화성 크로마토그래피와 같은 임의 선택된 방법으로 정제한다.
PRO는 일시적인 발현 방법에 의해 CHO 및(또는) COS 세포에서 또는 다른 안정한 발현 방법에 의해 CHO 세포에서 발현시킬 수도 있다.
하기 방법을 이용하여 CHO 세포에서 안정하게 발현시켰다. 단백질은 각 단백질의 가용성 형태(예, 세포외 도메인)의 코딩 서열이, 힌지(hinge), CH2 및 CH2 도메인을 포함하는 IgG1 불변 영역의 서열에 융합되어 있는 IgG 구조물 (이뮤노어드헤신)로서 및(또는) 폴리-His 태그된 형태로서 발현되었다.
PCR 증폭에 이어, 아우수벨(Ausubel) 등의 문헌[*Current Protocols of Molecular Biology* , Unit 3.16, John Wiley and Sons(1997)]에 기재된 표준 방법을 이용하여 각 DNA를 CHO 발현 벡터에 서브클로닝하였다. CHO 발현 벡터는 당해 DNA의 5' 및 3'에 적합한 제한 부위를 갖게끔 작제하여 cDNA가 편리하게 셔틀링될 수 있게 한다. CHO 세포에서 발현에 사용되는 벡터는 루카스(Lucas) 등의 문헌[*Nucl. Acids Res.* 24 :9, 1774-1779(1996)]에 기재된 바와 같으며, SV40 초기 프로모터/인핸서를 사용하여 당해 cDNA와 디히드로폴레이트 리덕타제(DHFR)를 발현시켰다. DHFR 발현으로 트랜스펙션 후 안정하게 유지되는 플라스미드를 선별할 수 있었다.
목적 플라스미드 DNA 12 μg을, 시판되는 트랜스펙션 시약 수퍼펙트(Superfect, 등록상표)(Qiagen), 도스퍼(Dosper, 등록상표) 또는 퓨젠(Fugene, 등록상표)(Boehringer Mannheim)을 사용하여 약 1000만개의 CHO 세포에 도입하였다. 루카스(Lucas) 등의 문헌[상기 문헌]에 기재된 방법에 따라 세포를 배양하였다. 추후에 세포를 배양 및 생산하기 위해 약 3×10^{-7} 세포를 하기의 방법에 따라 앰플에 동결시켰다.
플라스미드 DNA를 포함하는 앰플을 수조에 넣어 녹인 후 볼텍싱하여 혼합하였다. 내용물을 배지 10 ㎖이 담긴 원심분리 튜브에 피펫으로 넣고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 흡입해 내고 세포를 선택 배지(0.2 μm 투석 여과처리한 5 % 소 태아 혈청을 포함하는 0.2 μm 여과처리한 PS20) 10 ㎖ 중에 재현탁시켰다. 선택 배지 90 ㎖이 담긴 100 ㎖ 들이 스핀너에 세포를 분주하였다. 1 내지 2일 후, 세포를 선택 배양 배지 150 ㎖이 담긴 250 ㎖ 들이 스핀너로 옮겨 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 2 내지 3일 후에 250 ㎖, 500 ㎖ 및 2000 ㎖ 스핀너에 3×10^{5} 세포/㎖를 파종하였다. 세포 배지를 원심 분리하여 신선한 배지로 교환하고 생산 배지에 재현탁하였다. 임의의 적당한 CHO 배지를 이용할 수 있으며, 실제 로는 미국 특허 제5,122,469호 (1992년 6월 16일에 허여됨)에 기재된 생산 배지를 사용하였다. 3 ℓ 들이 생산 스핀너에 1.2×10^{6} 세포/㎖로 파종하였다. 제0일에 세포 수와 pH를 측정하였다. 제1일에 스핀너에서 시료를 취해 여과된 공기를 살포하기 시작하였다. 제2일에 스핀너에서 시료를 취해 온도를 33 ℃로 바꾸고 500 g/ℓ 글루코스 30 ㎖ 및 10 % 안티폼 0.6 ㎖(예, 35 % 폴리디메틸 실록산 에멀젼, 다우 코닝(Dow Corning) 365 의약 등급 에멀젼)을 첨가하였다. 생산과정 전체에서, pH를 약 7.2로 조정 유지하여야 한다. 10 일 후 또는 생존률이 70 % 미만으로 떨어질 때, 세포 배양액을 원심분리로 회수하고 0.22 μm 필터를 통해 여과시켰다. 여액을 4 ℃에서 보관하거나 또는 정제를 위해 칼럼에 즉시 로딩하였다.

폴리-his 태그된 구조물의 경우, Ni-NTA 칼럼(Qiagen)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제하기 전에 이미다졸을 조정 배지에 5 mM의 농도로 첨가하였다. 조정 배지를, 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 포함하는 20 mM Hepes 완충액(pH 7.4) 중에 평형화된 6 ㎖ Ni-NTA 칼럼에 4 ℃에서 4 내지 5 ㎖/분의 유량으로 펌핑하였다. 로딩 후에, 칼럼을 평형 완충액으로 더 세척하고 0.25 M 이미다졸을 포함하는 평형 완충액으로 단백질을 용출시켰다. 이어서, 이 고도로 정제된 단백질을 25 ㎖의 G25 수퍼파인(Pharmacia) 칼럼을 사용하여 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 및 4 % 만니톨을 함유하는 저장 완충액(pH 6.8)에서 염을 제거하고 -80 ℃에서 보관하였다.

이뮤노어드헤신(Fc-포함) 구조물은 조정 배지로부터 다음과 같이 정제되었 다. 조정 배지를 20 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8)으로 평형화된 5 ㎖ 단백질 A 칼럼(Pharmacia)에 펌핑하였다. 로딩후, 칼럼을 평형 완충액으로 충분히 세척하고 100 mM 시트르산(pH 3.5)으로 용출시켰다. 용출된 단백질을 1 ㎖ 분획으로 수집하여 1 M Tris 완충액(pH 9) 275 ㎕이 담긴 튜브에서 즉시 중화시켰다. 이어서 고도로 정제된 단백질을, 폴리-His 태그된 단백질의 경우에 대해 상기에 기재된 방법으로 저장 완충액에서 염을 제거하였다. 균일성을 SDS-폴리아크릴 아미드 겔 및 에드만 분해법에 의한 N-말단 아미노산 서열 분석으로 평가하였다.

본원에 개시된 많은 PRO 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같이 성공적으로 발현되었다.

실시예 25 : 효모에서 PRO의 발현

하기 방법은 효모에서 PRO의 재조합 발현에 관한 설명이다.

먼저, ADH2/GAPDH 프로모터로부터 PRO의 세포내 생산 또는 분비를 위해 효모 발현 벡터를 작제하였다. PRO를 코딩하는 DNA 및 프로모터를 PRO의 세포내 발현을 위해 선택된 플라스미드의 적합한 제한 효소 부위에 삽입하였다. 분비의 경우, PRO를 코딩하는 DNA를, ADH2/GAPDH 프로모터, 천연 PRO 신호 펩티드 또는 다른 포유동물 신호 서열, 또는 예를 들어 효모 알파-인자 또는 인버타제 분비 신호/리더 서열, 및 PRO의 발현을 위한 링커 서열(필요한 경우)을 코딩하는 DNA와 함께 선택된 플라스미드에 클로닝할 수 있다.

이어서, 효모 세포, 예를 들어 효모 균주 AB110을 상기의 발현 플라스미드로 형질전환시키고 선택된 발효 배지에서 배양할 수 있다. 형질전환된 효모 상청액을 10 % 트리클로로아세트산으로 침전시키고 SDS-PAGE로 분리한 후 겔을 쿠마시 블루로 염색하여 분석할 수 있다.

그 후에, 원심분리에 의해 발효 배지로부터 효모 세포를 제거한 다음, 선택한 카트리지 필터를 사용하여 배지를 농축시켜 재조합 PRO를 단리 및 정제할 수 있다. PRO를 함유하는 농축액을 선택한 칼럼 크로마토그래피 수지를 사용하여 추가로 정제할 수 있다.

본원에 개시된 많은 PRO 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같이 성공적으로 발현되었다.

실시예 26 : 바큘로바이러스-감염 곤충 세포에서 PRO의 발현

하기 방법은 바큘로바이러스-감염 곤충 세포에서 PRO의 재조합 발현에 대한 설명이다.

PRO를 코딩하는 서열을 바큘로바이러스 발현 벡터에 포함된 에피토프 태그의 상류에 융합시켰다. 상기의 에피토프 태그는 폴리-his 태그 및 이뮤노글로불린 태그(IgG의 Fc 영역과 유사)를 포함하고 있다. 시판되는 플라스미드, 예를 들어 pVL1393(Novagen)에서 유도된 플라스미드를 포함하여 여러 플라스미드를 사용할 수 있다. 요컨대, PRO를 코딩하는 서열 또는 PRO를 코딩하는 서열의 원하는 부분 (예를 들어, 막횡단 단백질의 세포외 도메인을 코딩하는 서열, 또는 단백질이 세포외 단백질인 경우 성숙 단백질을 코딩하는 서열)을 5' 및 3' 영역에 상보적인 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 5' 프라이머는 양측에 인접한 (선택된) 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 이어서, 선택한 제한 효소로 산물을 절단하여 발현 벡 터에 서브클로닝하였다.

재조합 바큘로바이러스는 리포펙틴(GIBCO-BRL로부터 구입)을 이용하여 상기 플라스미드 및 바큘로골드(BaculoGold, 등록상표) 바이러스 DNA(Pharmingen)를 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda* , 'Sf9') 세포 (ATCC CRL 1711)에 공동-트랜스펙션시켜 생성하였다. 28 ℃에서 4 내지 5일 인큐베이션한 다음, 방출된 바이러스를 회수하여 이후의 증폭에 사용하였다. 바이러스 감염 및 단백질 발현은 오레일리(O'Reilley) 등의 문헌[Baculovirus Expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

이어서, 발현된 폴리-his 태그된 PRO는 예를 들어 Ni^{2+} -킬레이트 친화성 크로마토그래피로 다음과 같이 정제할 수 있다. 추출액은 루퍼트(Rupert) 등의 문헌[Nature, 362: 175-179(1993)]에 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염된 Sf9 세포로부터 제조한다. 요컨대, Sf9 세포를 세척하여 초음파처리 완충액(25 ㎖ Hepes, pH 7.9; 12.5 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 10 % 글리세롤; 0.1 % NP-40; 0.4 M KCl)에 재현탁시키고 얼음 상에서 20초간 두차례 초음파처리하였다. 초음파처리물을 원심분리로 제거하고 상청액을 로딩 완충액(50 mM 인산, 300 mM NaCl, 10 % 글리세롤, pH 7.8) 중에 50배로 희석하여 0.45 ㎛ 필터를 통해 여과시켰다. Ni^{2+} -NTA 아가로스 칼럼(Quiagen사에서 시판함)을 5 ㎖의 충진 부피로 준비하여 물 25 ㎖로 세척하고 로딩 완충액 25 ㎖로 평형화시켰다. 여과된 세포 추출물을 분당 0.5 ㎖로 칼럼에 로딩하였다. 칼럼을 로딩 완충액으로 A_{280} 기준선까지 세척하고, 그 때 분획 회수를 시작하였다. 다음으로, 2차 세정 완충액(50 mM 포스페이트; 300 mM NaCl, 10 % 글리세롤, pH 6.0)으로 칼럼을 세척하여 비특이적으로 결합된 단백질을 용출시켰다. 다시, A_{280} 기준선에 도달하게 한 다음, 칼럼을 2차 세정 완충액 중 0에서 500 mM까지의 이미다졸 구배를 이용하여 전개시켰다. 1 ㎖ 분획을 회수하여 SDS-PAGE 및 은 염색, 또는 알카리 포스파타제와 결합된 Ni^{2+} -NTA(Qiagen)에 의한 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 용출된 His_{10} -태그된 PRO를 포함하는 분획을 모아 로딩 완충액으로 투석하였다.

또는, IgG 태그된(또는 Fc 태그된) PRO의 정제는 공지된 크로마토그래피 기술, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있었다.

본원에 개시된 많은 PRO 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같이 성공적으로 발현되었다.

실시예 27 : PRO와 결합하는 항체의 제조

본 실시예는 PRO 폴리펩티드와 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체를 제조하는 방법을 설명한다.
모노클로날 항체를 생산하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 고딩(Goding)의 문헌[상기 문헌]에 기재되어 있다. 이용될 수 있는 면역원에는 정제된 PRO, PRO를 포함하는 융합 단백질 및 세포 표면에 재조합 PRO를 발현하는 세 포가 포함된다. 당업자라면 과도한 실험없이도 면역원을 선택할 수 있다.
마우스, 예를 들어 Balb/c를 프로인드(Freund) 완전 보조액 중에 에멀젼화된 PRO 면역원을 1 내지 100 μg의 양으로 피하 또는 복강내 주사하여 면역시켰다. 별법으로, 면역원을 MPL-TDM 보조액(Ribi Immunochemical Research, 미국 몬타나주 해밀턴 소재) 중에 에멀젼화하여 동물의 뒷발바닥에 주사하였다. 이어서 면역된 마우스를 10 내지 12일 후에 선택된 보조액 중에 에멀젼화된 추가의 면역원으로 추가항원촉진하였다. 그 이후, 수주 동안 마우스를 추가의 면역 주사로 추가항원촉진할 수 있다. 안와 후방에서 채혈하여 마우스로부터 혈청 시료를 주기적으로 채취하여, ELISA 분석법으로 항-PRO 항체를 검출하였다.
적합한 항체 역가가 검출되면, 항체에 대해 '포지티브'인 동물에게 PRO를 최종 정맥주사하였다. 3 내지 4일 후에 마우스를 희생시켜 비장 세포를 회수하였다. 이어서, 비장 세포를 선택된 쥐의 골수종 세포주, 예를 들어 ATCC 번호 CRL 1597로부터 이용가능한 P3X63AgU.1과 융합시켰다 (35 % 폴리에틸렌 글리콜을 사용). 이 융합으로, 비융합 세포, 골수종 하이브리드 및 비장세포 하이브리드의 증식을 억제하는 HAT(하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘) 배지를 포함하는 96 웰 조직 배양판에 플레이팅될 수 있는 하이브리도마 세포가 생성되었다.
이 하이브리도마 세포의 PRO에 대한 반응성을 ELISA로 스크리닝할 수 있다. PRO에 대한 목적하는 모노클로날 항체를 분비하는 '포지티브' 하이브리도마 세포를 결정하는 방법은 당업계의 숙련자에게 잘 알려져 있다.
포지티브 하이브리도마 세포를 동계의 Balb/c 마우스가 항-PRO 모노클로날 항체를 포함하는 복수를 생산하도록 복강 내에 주사할 수 있다. 또는, 하이브리도마 세포는 조직 배양 플라스크 또는 롤러병 안에서 배양할 수 있다. 복수 내에서 생산된 모노클로날 항체는 황산암모늄 침전, 이어서 겔 배제 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있다. 또는, 항체와 단백질 A 또는 단백질 G의 결합을 기초로 하는 친화성 크로마토그래피를 이용할 수도 있다.
실시예 28 : 특이 항체를 사용한 PRO 폴리펩티드의 정제
천연 또는 재조합 PRO 폴리펩티드를 단백질 정제 분야의 다양한 표준 기법으로 정제할 수 있다. 예를 들면, 프로(pro)-PRO 폴리펩티드, 성숙 PRO 폴리펩티드 또는 프리(pre)-PRO 폴리펩티드를, 목적 PRO 폴리펩티드에 특이적인 항체를 이용하는 면역친화성 크로마토그래피로 정제한다. 일반적으로, 면역친화성 칼럼은 항-PRO 폴리펩티드 항체를, 활성화된 크로마토그래피 수지에 공유 결합에 의해 커플링시킴으로써 제작된다.
폴리클로날 이뮤노글로불린은 면역 혈청으로부터 황산암모늄으로 침전시키거나, 고정화 단백질 A(Pharmacia LKB Biotechnology (미국 뉴저지주 피츠카타웨이 소재)) 상에서 정제하여 제조하였다. 유사하게, 모노클로날 항체는 마우스 복수액으로부터 황산암모늄 침전법 또는 고정화 단백질 A 상의 크로마토그래피에 의해 제조하였다. 부분적으로 정제된 이뮤노글로불린을 CnBr-활성화 SEPHAROSE(등록상표) (Pharmacia LKB Biotechnology)와 같은 크로마토그래피 수지에 공유 결합에 의해 부착시켰다. 항체를 수지에 커플링시키고, 수지를 차단하여, 유도된 수지를 제조업자의 지시에 따라 세척하였다.
이러한 면역친화성 칼럼은 세포로부터 가용성 형태의 PRO 폴리펩티드 함유 분획을 조제함으로써 PRO 폴리펩티드의 정제에 이용된다. 디터전트 첨가에 의해 또는 당업계에 잘 알려져 있는 다른 방법에 의한 전세포의 가용화 또는 차등 원심분리를 통해 수득한 세포 분획의 가용화에 의해 조제한다. 또는, 신호 서열을 포함하는 가용성 PRO 폴리펩티드가 세포가 배양되는 배지 내로 유용한 양으로 분비될 수도 있다.
가용성 PRO 폴리펩티드-함유 조제물을 면역친화성 칼럼에 통과시키고, 칼럼을 PRO 폴리펩티드의 우선적인 흡광을 허용하는 조건(예를 들면, 디터전트의 존재 하에 고 이온 농도 완충액) 하에 세척하였다. 이어서, 칼럼을 항체/PRO 폴리펩티드 결합을 파괴시키는 조건(예를 들면, 약 pH 2 내지 3과 같은 낮은 pH의 완충액 또는 고농도의 요소 또는 티오시아네이트 이온과 같은 카오트로프(chaotrope)) 하에 용출시키고, PRO 폴리펩티드를 회수하였다.
실시예 29 : 약물 스크리닝
본 발명은 PRO 폴리펩티드 또는 그의 결합 단편을 사용하여 임의의 다양한 약물 스크리닝 기법으로 화합물을 스크리닝하는데 특히 유용하다. 이러한 시험에 사용된 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편은 용액 중에 유리되어 있거나, 고상 지지체에 고착되거나, 세포 표면에 보유되거나, 세포 내에 위치할 수 있다. 약물 스크리닝의 한 방법에서는 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편을 발현하는 재조합 핵산으로 안정하게 형질전환된 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 이용한다. 경쟁적 결합 분석으로 상기 형질전환된 세포에 대해 약물을 스크리닝하였다. 생존형(viable)이든 고 정형이든 상기 세포를 표준 결합 분석에 사용할 수 있다. 예를 들면, PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편과 시험 물질 사이에 복합체의 형성을 측정할 수 있다. 또는, 시험 물질에 의해 유발된, PRO 폴리펩티드와 그의 표적 세포 또는 표적 수용체 사이의 복합체 형성의 감소를 검사할 수도 있다.
이렇듯, 본 발명은 PRO 폴리펩티드-관련 질환 또는 장애에 영향을 끼칠 수 있는 약물 또는 임의 다른 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이들 방법은 이러한 물질을 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편과 접촉시키는 것과, 당업계에 잘 알려진 방법으로 (i) 그 물질과 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편 사이의 복합체의 존재 여부 또는 (ii) PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편과 세포 사이의 복합체의 존재 여부에 대해 분석하는 것을 포함한다. 이러한 경쟁 결합 분석에서, PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편은 통상적으로 표지를 한다. 적합한 인큐베이션 후, 유리 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편을 결합형으로 존재하는 것과 분리시키며, 유리 또는 복합체화되지 않은 표지의 양은 PRO 폴리펩티드와 결합하거나 또는 PRO 폴리펩티드/세포 복합체를 저해하는 특정 물질의 능력의 척도가 된다.
또다른 약물 스크리닝 기법은 폴리펩티드와의 적합한 결합 친화성을 갖는 화합물에 대한 대용량 스크리닝법으로, WO84/03564(1984년 9월 13일자로 공개됨)에 상세히 기재되어 있다. 요컨대, 다수의 상이한 작은 펩티드 시험 화합물을 플라스틱 핀 또는 몇몇 다른 표면과 같은 고상 기재에서 합성한다. PRO 폴리펩티드와 마찬가지로, 펩티드 시험 화

합물을 PRO 폴리펩티드와 반응시키고 세척한다. 결합된 PRO 폴리펩티드는 당업계에 잘 공지된 방법으로 검출한다. 정제된 PRO 폴리펩티드 는 또한 상기 언급한 약물 스크리닝 기법에 사용되는 플레이트 상에 직접 코팅할 수도 있다. 또한, 비-중화 항체를 사용하여 펩티드를 포획하여 이를 고체 지지체 상에 고정시킬 수도 있다.

또한, 본 발명에는 PRO 폴리펩티드와 결합할 수 있는 중화 항체가 PRO 폴리펩티드 또는 그의 단편과 결합하는데 있어 시험 화합물과 특이적으로 경쟁하는 경쟁 약물의 스크리닝 분석을 이용하는 것이 포함된다. 이러한 방식으로, 항체를 사용하여 PRO 폴리펩티드와 하나 이상의 항원 결정자를 공유하는 임의 펩티드의 존재를 검출할 수 있다.

실시예 30 : 합리적인 약물 디자인

합리적 약물 디자인의 목표는 생물 활성의 목적 폴리펩티드 (즉, PRO 폴리펩티드) 또는 이들과 상호작용하는 작은 분자, 예를 들면, 아고니스트, 길항제 또는 억제제의 구조적 동족체를 생산하는 것이다. 이들 예 중 임의의 것들을 사용하여 보다 활성적이거나 또는 보다 안정한 형태의 PRO 폴리펩티드인 약물, 또는 생체내 PRO 폴리펩티드의 기능을 강화하거나 또는 저해하는 약물을 만드는데 사용할 수 있다[허드슨(Hodgson)의 문헌[Bio/Technology , 9 : 19-21 (1991)]을 참조].

한 방법으로, PRO 폴리펩티드 또는 PRO 폴리펩티드-억제제 복합체의 3차원 구조를 x-선 결정법, 컴퓨터 모델링 또는 가장 통상적으로는 상기 두 방법의 조합에 의해 결정한다. 분자의 구조를 밝히고 활성 부위를 결정하기 위해서는, PRO 폴리펩티드의 형태와 전하 모두를 확인해야 한다. 빈도는 더 적지만, 상동 단백질의 구조에 기초하여 모델링함으로써 PRO 폴리펩티드의 구조에 관한 유용한 정보를 얻 을 수도 있다. 두 경우 모두, 관련 구조 정보를 이용하여 동족 PRO 폴리펩티드-유사 분자를 디자인하거나 또는 효과적인 저해제를 확인한다. 합리적 약물 디자인의 유용한 예에는 브락스턴(Braxton) 및 웰스(Wells)의 문헌[Biochemistry, 31 :7796-7801 (1992)]에 나타낸 바와 같이 활성 또는 안정성을 향상시킨 분자, 또는 아타우다(Athauda) 등의 문헌[J. Biochem. , 113 :742-746 (1993)]에 나타낸 바와 같이 천연 펩티드의 억제제, 아고니스트 또는 길항제로서 작용하는 분자가 포함될 수 있다.

또한, 기능 분석에 의해 선택된 표적-특이적 항체를 상기한 바와 같이 단리한 후 그의 결정 구조를 해석할 수도 있다. 원칙적으로, 이 방법은 이후의 약물 디자인의 토대가 될 수 있는 파마코어(pharmacore)를 제공한다. 기능성의 약리학적으로 활성인 항체에 대한 항-유전형 항체(항-id)를 생산함으로써 단백질 결정법을 생략할 수도 있다. 거울상의 거울상으로, 항-id의 결합 부위는 원래 수용체의 동족체인 것으로 생각된다. 이어서, 항-id를 사용하여 화학적 또는 생물학적으로 생산된 펩티드 뱅크로부터 펩티드를 확인하고 단리할 수 있다. 이어서, 단리된 펩티드는 파마코어로서 쓰인다.

본 발명으로, 충분한 양의 PRO 폴리펩티드가 이용가능하게 되어 x-선 결정법과 같은 분석 연구를 수행할 수 있게 되었다. 또한, 본원에 제공된 PRO 폴리펩티드의 아미노산 서열 정보는 x-선 결정법 대신에 또는 그에 추가하여 컴퓨터 모델링 기법을 이용하는데 지침을 제공할 것이다.

물질의 기탁

다음 물질들은 미국 매릴랜드주 로크빌 파크로운 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)에 기탁되어 있다.

물질	ATCC 기탁번호	기탁일
DNA35672-2508	203538	1998년 12월 15일
DNA47465-1561	203661	1999년 2월 9일
DNA57700-1408	203583	1999년 1월 12일
DNA68818-2536	203657	1999년 2월 9일
DNA59847-2510	203576	1999년 1월 12일
DNA76400-2528	203573	1999년 1월 12일
DNA77624-2515	203553	1998년 12월 22일
DNA77631-2537	203651	1999년 2월 9일
DNA82307-2531	203537	1998년 12월 15일

이들 기탁은 특허 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약 및 그의 규칙 (부다페스트 조약 (Budapest Treaty))의 규정 하에 이루어졌다. 이는 기탁일로부터 30년 동안 기탁물의 생존 배양물의 유지를 보장한다. 기탁물은 부다페스트 조약의 협약 하에 ATCC로부터 제넨테크 인크와 ATCC 사이 협정에 따라 분양될 것이며, 이는 관련 미국 특허의 허여시 또는 미국 또는 외국 특허 출원의 공개시(이 중 먼저인 때) 공공에 대한 기탁물의 배양 프로제니의 영구적이고 비제한적인 분양을 보장하고, 미국 특허 및 상표청장에 의해 35 USC §122 및 그에 따른 미국 특허 및 상표청장의 규칙(37 CFR §1.14 포함, 특히 886 OG 638 참조)에 따라 권리가 있는 것으로 결정한 이에게 프로제니의 분양을 보장한다.

본 출원의 양수인은 적합한 조건 하에 배양할 때 기탁 물질의 배양물이 사멸하거나 손실되거나 파손된 경우, 그 통지시 물질을 다른 동일한 물질로 즉시 교체할 것임을 동의하였다. 기탁 물질의 분양은 각국 정부의 권한으로 그 특허법에 따라 승인된 권리에 위배하여 본 발명을 실시하도록 허가하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

앞서 기술한 명세서는 당업계의 숙련인이 본 발명을 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 생각된다. 본 발명은, 기탁된 실시태양이 본 발명의 특정 측면의 한 예시로서 의도되는 것이므로 기탁된 구조물의 범위에 제한되지 않고, 기능적으로 동등한 임의의 구조물은 본 발명의 범위 내에 있다. 본원에서 물질의 기탁은 본원에 포함된 기재 내용이 본 발명의 최선의 양식을 포함한 임의의 측면을 실시하기에 부적절하다는 것을 의미하지는 않으며, 특허 청구 범위의 범위를 명세서에서 나타내는 구체적인 설명에 제한하려는 것으로 해석되어서는 안된다. 실제로, 앞서의 상세한 설명으로부터 본원에 나타내고 기술된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 당업계의 숙련인에게는 명백하고, 이는 첨부된 특허 청구의 범위 내에 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
서열 2 (SEQ ID NO:2)의 아미노산 서열을 코딩하는 단리된 핵산.
청구항 2.
서열 1 (SEQ ID NO:1)의 단리된 핵산.
청구항 3.
서열 1 (SEQ ID NO:1)의 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 서열을 갖는 단리된 핵산.
청구항 4.
ATCC 기탁번호 제203538호로 기탁된 DNA의 전장 코딩 서열을 갖는 단리된 핵산.
청구항 5.
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 벡터.
청구항 6.
제5항에 있어서, 상기 벡터를 사용하여 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 조절서열과 작동가능하게 연결된 벡터.
청구항 7.
제5항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
청구항 8.
제7항에 있어서, 상기 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.
청구항 9.
제7항에 있어서, 상기 세포가 *E. coli* 인 숙주 세포.
청구항 10.
제7항에 있어서, 상기 세포가 효모 세포인 숙주 세포.
청구항 11.
제7항의 숙주 세포를 PRO1800 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하여 세포 배양물로부터 PRO1800 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하는 PRO1800 폴리펩티드의 제조방법.
청구항 12.
서열 2 (SEQ ID NO:2)의 단리된 폴리펩티드.
청구항 13.
삭제
청구항 14.
ATCC 기탁번호 제203538호로 기탁된 DNA의 전장 코딩서열에 의해 코딩되는 단리된 폴리펩티드.
청구항 15.
이종 아미노산 서열과 융합된 제12항 또는 14항의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자.
청구항 16.
제15항에 있어서, 상기 이종 아미노산 서열이 에피토프 태그 서열인 키메라 분자.
청구항 17.
제15항에 있어서, 상기 이종 아미노산 서열이 이뮤노글로불린의 Fc 영역인 키메라 분자.
청구항 18.
제12항 또는 제14항 중 어느 한 항의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체.
청구항 19.
제18항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체, 인간화 항체 또는 단쇄 항체인 항체.
청구항 20.
신호 펩티드가 결합되어 있지 않은 서열 2 (SEQ ID NO:2)의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.
청구항 21.
신호 펩티드가 결합되어 있지 않은 서열2 (SEQ ID NO:2)의 단리된 폴리펩티드.

도면

도면1

CGGACGCGTGGGACCCATACTTGCTGGTCTGATCC**ATG**CACAAGGCGGGGCTGCTAGGCCTC

TGTGCCCGGGCTTGGAATTCGGTGCGGATGGCCAGCTCCGGGATGACCCGCCGGGACCCGCT

CGCAAATAAGGTGGCCCTGGTAACGGCCTCCACCGACGGGATCGGCTTCGCCATCGCCCGGC

GTTTGGCCCAGGACGGGGCCCATGTGGTCGTCAGCAGCCGGAAGCAGCAGAATGTGGACCAG

GCGGTGGCCACGCTGCAGGGGGAGGGGCTGAGCGTGACGGGCACCGTGTGCCATGTGGGGAA

GGCGGAGGACCGGGAGCGGCTGGTGGCCACGGCTGTGAAGCTTCATGGAGGTATCGATATCC

TAGTCTCCAATGCTGCTGTCAACCCTTTCTTTGGAAGCATAATGGATGTCACTGAGGAGGTG

TGGGACAAGACTCTGGACATTAATGTGAAGGCCCCAGCCCTGATGACAAAGGCAGTGGTGCC

AGAAATGGAGAAACGAGGAGGCGGCTCAGTGGTGATCGTGTCTTCCATAGCAGCCTTCAGTC

CATCTCCTGGCTTCAGTCCTTACAATGTCAGTAAAACAGCCTTGCTGGGCCTGACCAAGACC

CTGGCCATAGAGCTGGCCCCAAGGAACATTAGGGTGAACTGCCTAGCACCTGGACTTATCAA

GACTAGCTTCAGCAGGATGCTCTGGATGGACAAGGAAAAAGAGGAAAGCATGAAAGAAACCC

TGCGGATAAGAAGGTTAGGCGAGCCAGAGGATTGTGCTGGCATCGTGTCTTTCCTGTGCTCT

GAAGATGCCAGCTACATCACTGGGGAAACAGTGGTGGTGGGTGGAGGAACCCCGTCCCGCCT

C**TGA**GGACCGGGAGACAGCCCACAGGCCAGAGTTGGGCTCTAGCTCCTGGTGCTGTTCCTGC

ATTCACCCACTGGCCTTTCCCACCTCTGCTCACCTTACTGTTCACCTCATCAAATCAGTTCT

GCCCTGTGAAAAGATCCAGCCTTCCCTGCCGTCAAGGTGGCGTCTTACTCGGGATTCCTGCT

GTTGTTGTGGCCTTGGGTAAAGGCCTCCCCTGAGAACACAGGACAGGCCTGCTGACAAGGCT

GAGTCTACCTTGGCAAAGACCAAGATATTTTTTCCTGGGCCACTGGTGAATCTGAGGGGTGA

TGGGAGAGAAGGAACCTGGAGTGGAAGGAGCAGAGTTGCAAATTAACAGCTTGCAAATGAGG

TGCAAATAAAATGCAGATGATTGCGCGGCTTTGAAAAAAAAAA

도면2

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA35672

><subunit 1 of 1, 278 aa, 1 stop

><MW: 29537, pI: 8.97, NX(S/T): 1

MHKAGLLGLCARAWNSVRMASSGMTRRDPLANKVALVTASTDGIGFAIARRLAQDGAHVVVS

SRKQQNVDQAVATLQGEGLSVTGTVCHVGKAEDRERLVATAVKLHGGIDILVSNAAVNPFFG

SIMDVTEEVWDKTLDINVKAPALMTKAVVPEMEKRGGGSVVIVSSIAAFSPSPGFSPYNVSK

TALLGLTKTLAIELAPRNIRVNCLAPGLIKTSFSRMLWMDKEKEESMKETLRIRRLGEPEDC

AGIVSFLCSEDASYITGETVVVGGGTPSRL

상기 단백질의 중요한 특징:
신호 펩티드:
아미노산 1-15

N- 글리코실화 부위:
아미노산 183-186

N- 미리스토일화 부위:
아미노산 43-48, 80-85, 191-196, 213-218, 272-277

미소체 **C-** 말단의 표적화 신호
아미노산 276-278

도면3

GCGCCCTGAGCTCCGCCTCCGGGCCCGATAGCGGCATCGAGAGCGCCTCCGTCGAGGACCAGGCGGCG
CAGGGGGCCGGCGGGCGAAAGGAGGATGAGGGGGCGCAGCAGCTGCTGACCCTGCAGAACCAGGTGGC
GCGGCTGGAGGAGGAGAACCGAGACTTTCTGGCTGCGCTGGAGGACGCC**ATG**GAGCAGTACAAACTGC
AGAGCGACCGGCTGCGTGAGCAGCAGGAGGAGATGGTGGAACTGCGGCTGCGGTTAGAGCTGGTGCGG
CCAGGCTGGGGGGGCCTGCGGCTCCTGAATGGCCTGCCTCCCGGGTCCTTTGTGCCTCGACCTCATAC
AGCCCCCCTGGGGGGTGCCCACGCCCATGTGCTGGGCATGGTGCCGCCTGCCTGCCTCCCTGGAGATG
AAGTTGGCTCTGAGCAGAGGGGAGAGCAGGTGACAAATGGCAGGGAGGCTGGAGCTGAGTTGCTGACT
GAGGTGAACAGGCTGGGAAGTGGCTCTTCAGCTGCTTCAGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGCCGCC
CAGGCGGACCTTACACCTGCGCAGAAATAGGATCAGCAACTGCAGTCAGAGGGCGGGGGCACGCCCAG
GGAGTCTGCCAGAGAGGAAGGGCCCAGAGCTTTGCCTTGAGGAGTTGGATGCAGCCATTCCAGGGTCC
AGAGCAGTTGGTGGGAGCAAGGCCCGAGTTCAGGCCCGCCAGGTCCCCCCTGCCACAGCCTCAGAGTG
GCGGCTGGCCCAGGCCCAGCAGAAGATCCGGGAGCTGGCTATCAACATCCGCATGAAGGAGGAGCTTA
TTGGCGAGCTGGTCCGCACAGGAAAGGCAGCTCAGGCCCTGAACCGCCAGCACAGCCAGCGTATCCGG
CAGCTGGAGCAGGAGGCAGAGCAGGTGCCGGCCCGAGCTGAGTGAAGGCCAGAGGCAGCTGCGGGAGCT
CGAGGGCAAGGAGCTCCAGGATGCTGGCGAGCGGTCTCGGCTCCAGGAGTTCCGCAGGAGGGTCGCTG
CGGCCCAGAGCCAGGTGCAGGTGCTGAAGGAGAAGAAGCAGGCTACGGAGCGGCTGGTGTCACTGTCG
GCCCAGAGTGAGAAGCGACTGCAGGAGCTCGAGCGGAACGTGCAGCTCATGCGGCAGCAGCAGGGACA
GCTGCAGAGGCGGCTTCGCGAGGAGACGGAGCAGAAGCGGCGCCTGGAGGCAGAAATGAGCAAGCGGC
AGCACCGCGTCAAGGAGCTGGAGCTGAAGCATGAGCAACAGCAGAAGATCCTGAAGATTAAGACGGAA
GAGATCGCGGCCTTCCAGAGGAAGAGGCGCAGTGGCAGCAACGGCTCTGTGGTCAGCCTGGAACAGCA
GCAGAAGATTGAGGAGCAGAAGAAGTGGCTGGACCAGGAGATGGAGAAGGTGCTACAGCAGCGGCGGG
CGCTGGAGGAGCTGGGGGAGGAGCTCCACAAGCGGGAGGCCATCCTGGCCAAGAAGGAGGCCCTGATG
CAGGAGAAGACGGGGCTGGAGAGCAAGCGCCTGAGATCCAGCCAGGCCCTCAACGAGGACATCGTGCG
AGTGTCCAGCCGGCTGGAGCACCTGGAGAAGGAGCTGTCCGAGAAGAGCGGGCAGCTGCGGCAGGGCA
GCGCCCAGAGCCAGCAGCAGATCCGCGGGGAGATCGACAGCCTGCGCCAGGAGAAGGACTCGCTGCTC
AAGCAGCGCCTGGAGATCGACGGCAAGCTGAGGCAGGGGAGTCTGCTGTCCCCCGAGGAGGAGCGGAC
GCTGTTCCAGTTGGATGAGGCCATCGAGGCCCTGGATGCTGCCATTGAGTATAAGAATGAGGCCATCA
CATGCCGCCAGCGGGTGCTTCGGGCCTCAGCCTCGTTGCTGTCCCAGTGCGAGATGAACCTCATGGCC
AAGCTCAGCTACCTCTCATCCTCAGAGACCAGAGCCCTCCTCTGCAAGTATTTTGACAAGGTGGTGAC
GCTCCGAGAGGAGCAGCACCAGCAGCAGATTGCCTTCTCGGAACTGGAGATGCAGCTGGAGGAGCAGC
AGAGGCTGGTGTACTGGCTGGAGGTGGCCCTGGAGCGGCAGCGCCTGGAGATGGACCGCCAGCTGACC
CTGCAGCAGAAGGAGCACGAGCAGAACATGCAGCTGCTCCTGCAGCAGAGTCGAGACCACCTCGGTGA
AGGGTTAGCAGACAGCAGGAGGCAGTATGAGGCCCGGATTCAAGCTCTGGAGAAGGAACTGGGCCGTT
ACATGTGGATAAACCAGGAACTGAAACAGAAGCTCGGCGGTGTGAACGCTGTAGGCCACAGCAGGGGT
GGGGAGAAGAGGAGCCTGTGCTCGGAGGGCAGACAGGCTCCTGGAAATGAAGATGAGCTCCACCTGGC
ACCCGAGCTTCTCTGGCTGTCCCCCCTCACTGAGGGGGCCCCCCGCACCCGGGAGGAGACGCGGGACT
TGGTCCACGCTCCGTTACCCTTGACCTGGAAACGCTCGAGCCTGTGTGGTGAGGAGCAGGGGTCCCCC
GAGGAACTGAGGCAGCGGGAGGCGGCTGAGCCCCTGGTGGGGCGGGTGCTTCCTGTGGGTGAGGCAGG
CCTGCCCTGGAACTTTGGGCCTTTGTCCAAGCCCCGGCGGGAACTGCGACGAGCCAGCCCGGGGATGA
TTGATGTCCGGAAAAACCCCCTG**TAA**GCCCTCGGGGCAGACCCTGCCTTGGAGGGAGACTCCGAGCCT
GCTGAAAGGGGCAGCTGCCTGTTTTGCTTCTGTGAAGGGCAGTCCTTACCGCACACCCTAAATCCAGG
CCCTCATCTGTACCCTCACTGGGATCAACAAATTTGGGCCATGGCCCAAAAGAACTGGACCCTCATTT
AACAAAATAATATGCAAATTCCCACCACTTACTTCCATGAAGCTGTGGTACCCAATTGCCGCCTTGTG
TCTTGCTCGAATCTCAGGACAATTCTGGTTTCAGGCGTAAATGGATGTGCTTGTAGTTCAGGGGTTTG
GCCAAGAATCATCACGAAAGGGTCGGTGGCAACCAGGTTGTGGTTTAAATGGTCTTATGTATATAGGG
GAAACTGGGAGACTTTAGGATCTTAAAAAACCATTTAATAAAAAAAAATCTTTGAAGGGAC

도면4

</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA47465

<subunit 1 of 1, 830 aa, 1 stop

<MW: 95029, pI: 8.26, NX(S/T): 2

MEQYKLQSDRLREQQEEMVELRLRLELVRPGWGGLRLLNGLPPGSFVPRPHTAPLGGAHAHV
LGMVPPACLPGDEVGSEQRGEQVTNGREAGAELLTEVNRLGSGSSAASEEEEEEEEPPRRTL
HLRRNRISNCSQRAGARPGSLPERKGPELCLEELDAAIPGSRAVGGSKARVQARQVPPATAS
EWRLAQAQQKIRELAINIRMKEELIGELVRTGKAAQALNRQHSQRIRELEQEAEQVRAELSE
GQRQLRELEGKELQDAGERSRLQEFRRRVAAAQSQVQVLKEKKQATERLVSLSAQSEKRLQE
LERNVQLMRQQQGQLQRRLREETEQKRRLEAEMSKRQHRVKELELKHEQQQKILKIKTEEIA
AFQRKRRSGSNGSVVSLEQQQKIEEQKKWLDQEMEKVLQQRRALEELGEELHKREAILAKKE
ALMQEKTGLESKRLRSSQALNEDIVRVSSRLEHLEKELSEKSGQLRQGSAQSQQQIRGEIDS
LRQEKDSLLKQRLEIDGKLRQGSLLSPEEERTLFQLDEAIEALDAAIEYKNEAITCRQRVLR
ASASLLSQCEMNLMAKLSYLSSSETRALLCKYFDKVVTLREEQHQQQIAFSELEMQLEEQQR
LVYWLEVALERQRLEMDRQLTLQQKEHEQNMQLLLQQSRDHLGEGLADSRRQYEARIQALEK
ELGRYMWINQELKQKLGGVNAVGHSRGGEKRSLCSEGRQAPGNEDELHLAPELLWLSPLTEG
APRTREETRDLVHAPLPLTWKRSSLCGEEQGSPEELRQREAAEPLVGRVLPVGEAGLPWNFG
PLSKPRRELRRASPGMIDVRKNPL

중요한 특징:
루아신 지퍼 패턴.
아미노산 557-579, 794-815

N-글리코실화 부위
아미노산 133-136, 383-386

키네신계 단백질 **Kif-4** 코일-코일 도메인
아미노산 231-672

도면5

ATTCTCCTAGAGCATCTTTGGAAGC**ATG**AGGCCACGATGCTGCATCTTGGCTCTTGTCTGCT
GGATAACAGTCTTCCTCCTCCAGTGTTCAAAAGGAACTACAGACGCTCCTGTTGGCTCAGGA
CTGTGGCTGTGCCAGCCGACACCCAGGTGTGGGAACAAGATCTACAACCCTTCAGAGCAGTG
CTGTTATGATGATGCCATCTTATCCTTAAAGGAGACCCGCCGCTGTGGCTCCACCTGCACCT
TCTGGCCCTGCTTTGAGCTCTGCTGTCCCGAGTCTTTTGGCCCCCAGCAGAAGTTTCTTGTG
AAGTTGAGGGTTCTGGGTATGAAGTCTCAGTGTCACTTATCTCCCATCTCCCGGAGCTGTAC
CAGGAACAGGAGGCACGTCCTGTACCCA**TAA**AAACCCCAGGCTCCACTGGCAGACGGCAGAC
AAGGGGAGAAGAGACGAAGCAGCTGGACATCGGAGACTACAGTTGAACTTCGGAGAGAAGCA
ACTTGACTTCAGAGGGATGGCTCAATGACATAGCTTTGGAGAGGAGCCCAGCTGGGGATGGC
CAGACTTCAGGGGAAGAATGCCTTCCTGCTTCATCCCCTTTCCAGCTCCCCTTCCCGCTGAG
AGCCACTTTCATCGGCAATAAAATCCCCCACATTTACCATCT

도면6

><usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA57700

><subunit 1 of 1, 125 aa, 1 stop

><MW: 14198, pI: 9.01, NX(S/T): 1

MRPRCCILALVCWITVFLLQCSKGTTDAPVGSGLWLCQPTPRCGNKIYNPSEQCCYDDAILS

LKETRRCGSTCTFWPCFELCCPESFGPQQKFLVKLRVLGMKSQCHLSPISRSCTRNRRHVLYP

중요한 특징:
신호 서열
아미노산 1-21

N-미리스토일화 부위
아미노산 33-39, 70-76

도면7

CCCACGCGTCCGCCCACGCGTCCGGGTGCCACTCGCGCGCCGGCCGCGCTCCGGGCTTCTCT

TTTCCCTCCGACGCGCCACGGCTGCCCAGACATTCCGGCTGCCGGGTCTGGAGAGCTCCCCG

AACCCCTCCGCGGAGAGGAGCGAGGCGGCGCCAGGGTGGCCCCCGGGGCGCGCTTGGTCTCG

GAGAAGCGGGGACGAGGCCGGAGGATGAGCGACTGAGGGCGACGCGGGCACTGACGCGAGTT

GGGGCCGCGACTACCGGCAGCTGACAGCGCGATGAGCGACTCCCCAGAGACGCCCTAGCCCG

GTGTGCGCGCCAGGCGGAGCGCGCAGGTGGGGCTGGGCTGTTAGTGGTCCCGCCCCACGCGGG

TCGCCGGCCGGCCCAGGATGGGCGCTGGCAACCCGGGCCCGCGCCCGCCGCTGCTACCCCTG

CGCCCGCTGCGAGCCCGGCGTCCGGCCCGCGCCCTGCGCTCATGGACGGCGGCTCCCGGCTG

GCGGCGGCGCGCCCCCGGGCTGTGAATGCGACTCGCCCCTCGGCCGCGCTCCCCGCCCGCCC

GCCCGCCGGGACGTGGTAGGGG**ATG**CCCAGCTCCACTGCGATGGCAGTTGGCGCGCTCTCCA

GTTCCCTCCTGGTCACCTGCTGCCTGATGGTGGCTCTGTGCAGTCCGAGCATCCCGCTGGAG

AAGCTGGCCCAGGCACCAGAGCAGCCGGGCCAGGAGAAGCGTGAGCACGCCACTCGGGACGG

CCCGGGGCGGGTGAACGAGCTCGGGCGCCCGGCGAGGGACGAGGGCGGCAGCGGCCGGGACT

GGAAGAGCAAGAGCGGCCGTGGGCTCGCCGGCCGTGAGCCGTGGAGCAAGCTGAAGCAGGCC

TGGGTCTCCCAGGGCGGGGGCGCCAAGGCCGGGGATCTGCAGGTCCGGCCCCGCGGGGACAC

CCCGCAGGCGGAAGCCCTGGCCGCAGCCGCCCAGGACGCGATTGGCCCGGAACTCGCGCCCA

CGCCCGAGCCACCCGAGGAGTACGTGTACCCGGACTACCGTGGCAAGGGCTGCGTGGACGAG

AGCGGCTTCGTGTACGCGATCGGGGAGAAGTTCGCGCCGGGCCCCTCGGCCTGCCCGTGCCT

GTGCACCGAGGAGGGGCCGCTGTGCGCGCAGCCCGAGTGCCCGAGGCTGCACCCGCGCTGCA

TCCACGTCGACACGAGCCAGTGCTGCCCGCAGTGCAAGGAGAGGAAGAACTACTGCGAGTTC

CGGGGCAAGACCTATCAGACTTTGGAGGAGTTCGTGGTGTCTCCATGCGAGAGGTGTCGCTG

TGAAGCCAACGGTGAGGTGCTATGCACAGTGTCAGCGTGTCCCCAGACGGAGTGTGTGGACC

CTGTGTACGAGCCTGATCAGTGCTGTCCCATCTGCAAAAATGGTCCAAACTGCTTTGCAGAA

ACCGCGGTGATCCCTGCTGGCAGAGAAGTGAAGACTGACGAGTGCACCATATGCCACTGTAC

TTATGAGGAAGGCACATGGAGAATCGAGCGGCAGGCCATGTGCACGAGACATGAATGCAGGC

AAATG**TAG**ACGCTTCCCAGAACACAAACTCTGACTTTTTCTAGAACATTTTACTGATGTGAA

CATTCTAGATGACTCTGGGAACTATCAGTCAAAGAAGACTTTTGATGAGGAATAATGGAAAA

TTGTTGGTACTTTTCCTTTTCTTGATAACAGTTACTACAACAGAAGGAAATGGATATATTTC

AAAACATCAACAAGAACTTTGGGCATAAAATCCTTCTCTAAATAAATGTGCTATTTTCACAG

TAAGTACACAAAAGTACACTATTATATATCAAATGTATTTCTATAATCCCTCCATTAGAGAG

CTTATATAAGTGTTTTCTATAGATGCAGATTAAAAATGCTGTGTTGTCAACCGTCAAAAAAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

도면8

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA68818

><subunit 1 of 1, 325 aa, 1 stop

><MW: 35296, pI: 5.37, NX(S/T): 0

MPSSTAMAVGALSSSLLVTCCLMVALCSPSIPLEKLAQAPEQPGQEKREHATRDGPGRVNEL
GRPARDEGGSGRDWKSKSGRGLAGREPWSKLKQAWVSQGGGAKAGDLQVRPRGDTPQAEALA
AAAQDAIGPELAPTPEPPEEYVYPDYRGKGCVDESGFVYAIGEKFAPGPSACPCLCTEEGPL
CAQPECPRLHPRCIHVDTSQCCPQCKERKNYCEFRGKTYQTLEEFVVSPCERCRCEANGEVL
CTVSACPQTECVDPVYEPDQCCPICKNGPNCFAETAVIPAGREVKTDECTICHCTYEEGTWR
IERQAMCTRHECRQM

상기 단백질의 중요한 특징
신호 펩티드:
아미노산 1-27

막횡단 도메인:
아미노산 11-30

글리코사미노글리칸 부착 부위
아미노산 80-83

N- 미리스토일화 부위
아미노산 10-15, 102-107, 103-108

세포 부착 서열
아미노산 114-117

EGF- 유사 도메인의 시스테인 패턴 특징
아미노산 176-187

도면9

CAGCCACAGACGGGTC**ATG**AGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCCTGGGGTTCATCCTCCCAC

TGCCAGGAGTGCAGGCGCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTCAGCATGTGTGGAAGGTGTCC

GACCTACCCCGGCAATGGACCCCTAAGAACACCAGCTGCGACAGCGGCTTGGGGTGCCAGGA

CACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCTCCAAGGGCTGCACGG

AGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCGGATGGGCCCCGGCCTCTCCCTGATC

TCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTAACTCCCTCCCGCT

TTGGGCCCCACAGCCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCCAGTCTGCTTGTCTATGG

AAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCCAAGGGGACCACACACTGTTATGAT

GGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGGGATGCATGCC

CCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCGTGGGTATGACTGAGA

ACTGCAATAGGAAAGATTTTCTGACCTGTCATCGGGGGACCACCATTATGACACACGGAAAC

TTGGCTCAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGGGGCAGGT

GTGTCAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCCTGGTGGGGACAAAAG

GCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCCTCCTGGG

GTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCAGCAG

CAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCCTCCTCAAGCTGCCCCTGTCCCAGGAGACCGGCAGTGTC

CTACCTGTGTGCAGCCCCTTGGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCCGAATGACCTGCCCCAGG

GGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAAT

GAGCATTCAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTTGAACCACACCAGACAAATCG

GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCTCTCAGCATGAGGGAGGT

GGGGCTGAGGGCCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTG

GTGGGGAGTGGTTTGCCCTTCCTGC**TAA**CTCTATTACCCCCACGATTCTTCACCGCTGCTGA

CCACCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTCATAACCTAATGGCCTTGGACACCAGATTCTTTC

CCATTCTGTCCATGAATCATCTTCCCCACACACAATCATTCATATCTACTCACCTAACAGCA

ACACTGGGGAGAGCCTGGAGCATCCGGACTTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTG

GCTGCATGTATCTGATAATACAGACCCTGTCCTTTCA

도면10

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA59847

><subunit 1 of 1, 437 aa, 1 stop

><MW: 46363, pI: 6.22, NX(S/T): 3

MSAVLLLALLGFILPLPGVQALLCQFGTVQHVWKVSDLPRQWTPKNTSCDSGLGCQDTLMLI
ESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISYTFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQP
PADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEICPKGTTHCYDGLLRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCN
LLNGTQEIGPVGMTENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSNTEMCEVGQVCQETL
LLIDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLCNSASSSSVLLN
SLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATHCYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGC
VAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQPPASQHEGGGAEGLESLTWGVGLALAPALWWGVVCPSC

상기 단백질의 중요한 특징
신호 펩티드
아미노산 1-15

막횡단 도메인:
아미노산 243-260

N- 글리코실화 부위
아미노산 46-49, 189-192, 382-385

글리코사미노글리칸 부착 부위
아미노산 51-54, 359-362

N- 미리스토일화 부위
아미노산 54-59, 75-80, 141-146, 154-159, 168-173, 169-174,
198-203, 254-259, 261-266, 269-274, 284-289, 333-338, 347-352,
360-365, 361-366, 388-393, 408-413, 419-424

도면11

CGACG**ATG**CTACGCGCGCCCGGCTGCCTCCTCCGGACCTCCGTAGCGCCTGCCGCGGCCCTG
GCTGCGGCGCTGCTCTCGTCGCTTGCGCGCTGCTCTCTTCTAGAGCCGAGGGACCCGGTGGC
CTCGTCGCTCAGCCCCTATTTCGGCACCAAGACTCGCTACGAGGATGTCAACCCCGTGCTAT
TGTCGGGCCCCGAGGCTCCGTGGCGGGACCCTGAGCTGCTGGAGGGGACCTGCACCCCGGTG
CAGCTGGTCGCCCTCATTCGCCACGGCACCCGCTACCCCACGGTCAAACAGATCCGCAAGCT
GAGGCAGCTGCACGGGTTGCTGCAGGCCCGCGGGTCCAGGGATGGCGGGGCTAGTAGTACCG
GCAGCCGCGACCTGGGTGCAGCGCTGGCCGACTGGCCTTTGTGGTACGCGGACTGGATGGAC
GGGCAGCTAGTAGAGAAGGGACGGCAGGATATGCGACAGCTGGCGCTGCGTCTGGCCTCGCT
CTTCCCGGCCCTTTTCAGCCGTGAGAACTACGGCCGCCTGCGGCTCATCACCAGTTCCAAGC
ACCGCTGCATGGATAGCAGCGCCGCCTTCCTGCAGGGGCTGTGGCAGCACTACCACCCTGGC
TTGCCGCCGCCGGACGTCGCAGATATGGAGTTTGGACCTCCAACAGTTAATGATAAACTAAT
GAGATTTTTTGATCACTGTGAGAAGTTTTTAACTGAAGTAGAAAAAAATGCTACAGCTCTTT
ATCACGTGGAAGCCTTCAAAACTGGACCAGAAATGCAGAACATTTTAAAAAAAGTTGCAGCT
ACTTTGCAAGTGCCAGTAAATGATTTAAATGCAGATTTAATTCAAGTAGCCTTTTTCACCTG
TTCATTTGACCTGGCAATTAAAGGTGTTAAATCTCCTTGGTGTGATGTTTTTGACATAGATG
ATGCAAAGGTATTAGAATATTTAAATGATCTGAAACAATATTGGAAAAGAGGATATGGGTAT
ACTATTAACAGTCGATCCAGCTGCACCTTGTTTCAGGATATCTTTCAGCACTTGGACAAAGC
AGTTGAACAGAAACAAAGGTCTCAGCCAATTTCTTCTCCAGTCATCCTCCAGTTTGGTCATG
CAGAGACTCTTCTTCCACTGCTTTCTCTCATGGGCTACTTCAAAGACAAGGAACCCCTAACA
GCGTACAATTACAAAAAACAAATGCATCGGAAGTTCCGAAGTGGTCTCATTGTACCTTATGC
CTCGAACCTGATATTTGTGCTTTACCACTGTGAAAATGCTAAGACTCCTAAAGAACAATTCC
GAGTGCAGATGTTATTAAATGAAAAGGTGTTACCTTTGGCTTACTCACAAGAAACTGTTTCA
TTTTATGAAGATCTGAAGAACCACTACAAGGACATCCTTCAGAGTTGTCAAACCAGTGAAGA
ATGTGAATTAGCAAGGGCTAACAGTACATCTGATGAACTA**TGA**GTAACTGAAGAACATTTTT
AATTCTTTAGGAATCTGCAATGAGTGATTACATGCTTGTAATAGGTAGGCAATTCCTTGATT
ACAGGAAGCTTTTATATTACTTGAGTATTTCTGTCTTTTCACAGAAAAACATTGGGTTTCTC
TCTGGGTTTGGACATGAAATGTAAGAAAAGATTTTTCACTGGAGCAGCTCTCTTAAGGAGAA
ACAAATCTATTTAGAGAAACAGCTGGCCCTGCAAATGTTTACAGAAATGAAATTCTTCCTAC
TTATATAAGAAATCTCACACTGAGATAGAATTGTGATTTCATAATAACACTTGAAAAGTGCT
GGAGTAACAAAATATCTCAGTTGGACCATCCTTAACTTGATTGAACTGTCTAGGAACTTTAC
AGATTGTTCTGCAGTTCTCTCTTCTTTTCCTCAGGTAGGACAGCTCTAGCATTTTCTTAATC
AGGAATATTGTGGTAAGCTGGGAGTATCACTCTGGAAGAAAGTAACATCTCCAGATGAGAAT
TTGAAACAAGAAACAGAGTGTTGTAAAAGGACACCTTCACTGAAGCAAGTCGGAAAGTACAA
TGAAAATAAATATTTTTGGTATTTATTTATGAAATATTTGAACATTTTTTCAATAATTCCTT
TTTACTTCTAGGAAGTCTCAAAAGACCATCTTAAATTATTATATGTTTGGACAATTAGCAAC
AAGTCAGATAGTTAGAATCGAAGTTTTTCAAATCCATTGCTTAGCTAACTTTTTCATTCTGT
CACTTGGCTTCGATTTTTATATTTTCCTATTATATGAAATGTATCTTTTGGTTGTTTGATTT
TTCTTTCTTTCTTTGTAAATAGTTCTGAGTTCTGTCAAATGCCGTGAAAGTATTTGCTATAA
TAAAGAAAATTCTTGTGACTTTAAAAAAAAA

도면12

><usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA76400

><subunit 1 of 1, 487 aa, 1 stop

><MW: 55051, pI: 8.14, NX(S/T): 2

MLRAPGCLLRTSVAPAAALAAALLSSLARCSLLEPRDPVASSLSPYFGTKTRYEDVNPVLLS

GPEAPWRDPELLEGTCTPVQLVALIRHGTRYPTVKQIRKLRQLHGLLQARGSRDGGASSTGS

RDLGAALADWPLWYADWMDGQLVEKGRQDMRQLALRLASLFPALFSRENYGRLRLITSSKHR

CMDSSAAFLQGLWQHYHPGLPPPDVADMEFGPPTVNDKLMRFFDHCEKFLTEVEKNATALYH

VEAFKTGPEMQNILKKVAATLQVPVNDLNADLIQVAFFTCSFDLAIKGVKSPWCDVFDIDDA

KVLEYLNDLKQYWKRGYGYTINSRSSCTLFQDIFQHLDKAVEQKQRSQPISSPVILQFGHAE

TLLPLLSLMGYFKDKEPLTAYNYKKQMHRKFRSGLIVPYASNLIFVLYHCENAKTPKEQFRV

QMLLNEKVLPLAYSQETVSFYEDLKNHYKDILQSCQTSEECELARANSTSDEL

중요한 특징:
신호 서열
아미노산 1-30

N- 글리코실화 부위
아미노산 242-246, 481-485

N- 미리스토일화 부위
아미노산 107-113, 113-119, 117-123, 118-124, 128-134

소포체 표적화 서열
아미노산 484-489

도면13

GGGACTACAAGCCGCGCCGCGCTGCCGCTGGCCCCTCAGCAACCCTCGAC**ATG**GCGCTGAGGCGGCCACCGCGAC
TCCGGCTCTGCGCTCGGCTGCCTGACTTCTTCCTGCTGCTGCTTTTCAGGGGCTGCCTGATAGGGGCTGTAAATC
TCAAATCCAGCAATCGAACCCCAGTGGTACAGGAATTTGAAAGTGTGGAACTGTCTTGCATCATTACGGATTCGC
AGACAAGTGACCCCAGGATCGAGTGGAAGAAAATTCAAGATGAACAAACCACATATGTGTTTTTTGACAACAAAA
TTCAGGGAGACTTGGCGGGTCGTGCAGAAATACTGGGGAAGACATCCCTGAAGATCTGGAATGTGACACGGAGAG
ACTCAGCCCTTTATCGCTGTGAGGTCGTTGCTCGAAATGACCGCAAGGAAATTGATGAGATTGTGATCGAGTTAA
CTGTGCAAGTGAAGCCAGTGACCCCTGTCTGTAGAGTGCCGAAGGCTGTACCAGTAGGCAAGATGGCAACACTGC
ACTGCCAGGAGAGTGAGGGCCACCCCCGGCCTCACTACAGCTGGTATCGCAATGATGTACCACTGCCCACGGATT
CCAGAGCCAATCCCAGATTTCGCAATTCTTCTTTCCACTTAAACTCTGAAACAGGCACTTTGGTGTTCACTGCTG
TTCACAAGGACGACTCTGGGCAGTACTACTGCATTGCTTCCAATGACGCAGGCTCAGCCAGGTGTGAGGAGCAGG
AGATGGAAGTCTATGACCTGAACATTGGCGGAATTATTGGGGGGGTTCTGGTTGTCCTTGCTGTACTGGCCCTGA
TCACGTTGGGCATCTGCTGTGCATACAGACGTGGCTACTTCATCAACAATAAACAGGATGGAGAAAGTTACAAGA
ACCCAGGGAAACCAGATGGAGTTAACTACATCCGCACTGACGAGGAGGGCGACTTCAGACACAAGTCATCGTTTG
TGATC**TGA**GACCCGCGGTGTGGCTGAGAGCGCACAGAGCGCACGTGCACATACCTCTGCTAGAAACTCCTGTCAA
GGCAGCGAGAGCTGATGCACTCGGACAGAGCTAGACACTCATTCAGAAGCTTTTCGTTTTGGCCAAAGTTGACCA
CTACTCTTCTTACTCTAACAAGCCACATGAATAGAAGAATTTTCCTCAAGATGGACCCGGTAAATATAACCACAA
GGAAGCGAAACTGGGTGCGTTCACTGAGTTGGGTTCCTAATCTGTTTCTGGCCTGATTCCCGCATGAGTATTAGG
GTGATCTTAAAGAGTTTGCTCACGTAAACGCCCGTGCTGGGCCCTGTGAAGCCAGCATGTTCACCACTGGTCGTT
CAGCAGCCACGACAGCACCATGTGAGATGGCGAGGTGGCTGGACAGCACCAGCAGCGCATCCCGGCGGGAACCCA
GAAAAGGCTTCTTACACAGCAGCCTTACTTCATCGGCCCACAGACACCACCGCAGTTTCTTCTTAAAGGCTCTGC
TGATCGGTGTTGCAGTGTCCATTGTGGAGAAGCTTTTTGGATCAGCATTTTGTAAAAACAACCAAAATCAGGAAG
GTAAATTGGTTGCTGGAAGAGGGATCTTGCCTGAGGAACCCTGCTTGTCCAACAGGGTGTCAGGATTTAAGGAAA
ACCTTCGTCTTAGGCTAAGTCTGAAATGGTACTGAAATATGCTTTTCTATGGGTCTTGTTTATTTTATAAAATTT
TACATCTAAATTTTTGCTAAGGATGTATTTTGATTATTGAAAAGAAAATTTCTATTTAAACTGTAAATATATTGT
CATACAATGTTAAATAACCTATTTTTTTAAAAAAGTTCAACTTAAGGTAGAAGTTCCAAGCTACTAGTGTTAAAT
TGGAAAATATCAATAATTAAGAGTATTTTACCCAAGGAATCCTCTCATGGAAGTTTACTGTGATGTTCCTTTTCT
CACACAAGTTTTAGCCTTTTTCACAAGGGAACTCATACTGTCTACACATCAGACCATAGTTGCTTAGGAAACCTT
TAAAAATTCCAGTTAAGCAATGTTGAAATCAGTTTGCATCTCTTCAAAAGAAACCTCTCAGGTTAGCTTTGAACT
GCCTCTTCCTGAGATGACTAGGACAGTCTGTACCCAGAGGCCACCCAGAAGCCCTCAGATGTACATACACAGATG
CCAGTCAGCTCCTGGGGTTGCGCCAGGCGCCCCCGCTCTAGCTCACTGTTGCCTCGCTGTCTGCCAGGAGGCCCT
GCCATCCTTGGGCCCTGGCAGTGGCTGTGTCCCAGTGAGCTTTACTCACGTGGCCCTTGCTTCATCCAGCACAGC
TCTCAGGTGGGCACTGCAGGGACACTGGTGTCTTCCATGTAGCGTCCCAGCTTTGGGCTCCTGTAACAGACCTCT
TTTTGGTTATGGATGGCTCACAAAATAGGGCCCCCAATGCTATTTTTTTTTTTTTAAGTTTGTTTAATTATTTGTT
AAGATTGTCTAAGGCCAAAGGCAATTGCGAAATCAAGTCTGTCAAGTACAATAACATTTTTAAAAGAAAATGGAT
CCCACTGTTCCTCTTTGCCACAGAGAAAGCACCCAGACGCCACAGGCTCTGTCGCATTTCAAAACAAACCATGAT
GGAGTGGCGGCCAGTCCAGCCTTTTAAAGAACGTCAGGTGGAGCAGCCAGGTGAAAGGCCTGGCGGGGAGGAAAG
TGAAACGCCTGAATCAAAAGCAGTTTTCTAATTTTGACTTTAAATTTTTCATCCGCCGGAGACACTGCTCCCATT
TGTGGGGGGACATTAGCAACATCACTCAGAAGCCTGTGTTCTTCAAGAGCAGGTGTTCTCAGCCTCACATGCCCT
GCCGTGCTGGACTCAGGACTGAAGTGCTGTAAAGCAAGGAGCTGCTGAGAAGGAGCACTCCACTGTGTGCCTGGA
GAATGGCTCTCACTACTCACCTTGTCTTTCAGCTTCCAGTGTCTTGGGTTTTTTATACTTTGACAGCTTTTTTTT
AATTGCATACATGAGACTGTGTTGACTTTTTTTAGTTATGTGAAACACTTTGCCGCAGGCCGCCTGGCAGAGGCA
GGAAATGCTCCAGCAGTGGCTCAGTGCTCCCTGGTGTCTGCTGCATGGCATCCTGGATGCTTAGCATGCAAGTTC
CCTCCATCATTGCCACCTTGGTAGAGAGGGATGGCTCCCCACCCTCAGCGTTGGGGATTCACGCTCCAGCCTCCT
TCTTGGTTGTCATAGTGATAGGGTAGCCTTATTGCCCCCTCTTCTTATACCCTAAAACCTTCTACACTAGTGCCA
TGGGAACCAGGTCTGAAAAAGTAGAGAGAAGTGAAAGTAGAGTCTGGGAAGTAGCTGCCTATAACTGAGACTAGA
CGGAAAAGGAATACTCGTGTATTTTAAGATATGAATGTGACTCAAGACTCGAGGCCGATACGAGGCTGTGATTCT
GCCTTTGGATGGATGTTGCTGTACACAGATGCTACAGACTTGTACTAACACACCGTAATTTGGCATTTGTTTAAC
CTCATTTATAAAAGCTTCAAAAAAACCCA

도면14

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA77624

><subunit 1 of 1, 310 aa, 1 stop

><MW: 35020, pI: 7.90, NX(S/T): 3

MALRRPPRLRLCARLPDFFLLLLFRGCLIGAVNLKSSNRTPVVQEFESVELSCIITDSQTSD

PRIEWKKIQDEQTTYVFFDNKIQGDLAGRAEILGKTSLKIWNVTRRDSALYRCEVVARNDRK

EIDEIVIELTVQVKPVTPVCRVPKAVPVGKMATLHCQESEGHPRPHYSWYRNDVPLPTDSRA

NPRFRNSSFHLNSETGTLVFTAVHKDDSGQYYCIASNDAGSARCEEQEMEVYDLNIGGIIGG

VLVVLAVLALITLGICCAYRRGYFINNKQDGESYKNPGKPDGVNYIRTDEEGDFRHKSSFVI

상기 단백질의 중요한 특징:
신호 펩티드:
아미노산 1-30

막횡단 도메인:
아미노산 243-263

N- 글리코실화 부위
아미노산 104-107, 192-195

cAMP- 및 **cGMP-**의존성 단백질 키나제 인산화 부위
아미노산 107-110

카세인 키나제 **II** 인산화 부위
아미노산 106-109, 296-299

티로신 키나제 인산화 부위
아미노산 69-77

N- 미리스토일화 부위
아미노산 26-31, 215-220, 226-231, 243-248, 244-249, 262-267

도면15

CAGGACCAGGTCTTCCTACGCTGGAGCAGCGGGGAGACAGCCACC**ATG**CACATCCTCGTGGTCCATGCCATGGTG
ATCCTGCTGACGCTGGGCCCGCCTCGAGCCGACGACAGCGAGTTCCAGGCGCTGCTGGACATCTGGTTTCCGGAG
GAGAAGCCACTGCCCACCGCCTTCCTGGTGGACACATCGGAGGAGGCGCTGCTGCTTCCTGACTGGCTGAAGCTG
CGCATGATCCGTTCTGAGGTGCTCCGCCTGGTGGACGCCGCCCTGCAGGACCTGGAGCCGCAGCAGCTGCTGCTG
TTCGTGCAGTCGTTTGGCATCCCCGTGTCCAGCATGAGCAAACTCCTCCAGTTCCTGGACCAGGCAGTGGCCCAC
GACCCCCAGACTCTGGAGCAGAACATCATGGACAAGAATTACATGGCCCACCTGGTGGAGGTCCAGCATGAGCGC
GGCGCCTCCGGAGGCCAGACTTTCCACTCCTTGCTCACAGCCTCCCTGCCGCCCCGCCGAGACAGCACAGAGGCA
CCCAAACCAAAGAGCAGCCCAGAGCAGCCCATAGGCCAGGGCCGGATTCGGGTGGGGACCCAGCTCCGGGTGCTG
GGCCCTGAGGACGACCTGGCTGGCATGTTCCTCCAGATTTTCCCGCTCAGCCCGGACCCTCGGTGGCAGAGCTCC
AGTCCCCGCCCCGTGGCCCTCGCCCTGCAGCAGGCCCTGGGCCAGGAGCTGGCCCGCGTCGTCCAGGGCAGCCCC
GAGGTGCCGGGCATCACGGTGCGTGTCCTGCAGGCCCTCGCCACCCTGCTCAGCTCCCCACACGGCGGTGCCCTG
GTGATGTCCATGCACCGTAGCCACTTCCTGGCCTGCCCGCTGCTGCGCCAGCTCTGCCAGTACCAGCGCTGTGTG
CCACAGGACACCGGCTTCTCCTCGCTCTTCCTGAAGGTGCTCCTGCAGATGCTGCAGTGGCTGGACAGCCCTGGC
GTGGAGGGCGGGCCCCTGCGGGCACAGCTCAGGATGCTTGCCAGCCAGGCCTCAGCCGGGCGCAGGCTCAGTGAT
GTGCGAGGGGGGCTCCTGCGCCTGGCCGAGGCCCTGGCCTTCCGTCAGGACCTGGAGGTGGTCAGCTCCACCGTC
CGTGCCGTCATCGCCACCCTGAGGTCTGGGGAGCAGTGCAGCGTGGAGCCGGACCTGATCAGCAAAGTCCTCCAG
GGGCTGATCGAGGTGAGGTCCCCCCACCTGGAGGAGCTGCTGACTGCATTCTTCTCTGCCACTGCGGATGCTGCC
TCCCCGTTTCCAGCCTGTAAGCCCGTTGTGGTGGTGAGCTCCCTGCTGCTGCAGGAGGAGGAGCCCCTGGCTGGG
GGGAAGCCGGGTGCGGACGGTGGCAGCCTGGAGGCCGTGCGGCTGGGGCCCTCGTCAGGCCTCCTAGTGGACTGG
CTGGAAATGCTGGACCCCGAGGTGGTCAGCAGCTGCCCCGACCTGCAGCTCAGGCTGCTCTTCTCCCGGAGGAAG
GGCAAAGGTCAGGCCCAGGTGCCCTCGTTCCGTCCCTACCTCCTGACCCTCTTCACGCATCAGTCCAGCTGGCCC
ACACTGCACCAGTGCATCCGAGTCCTGCTGGGCAAGAGCCGGGAACAGAGGTTCGACCCCTCTGCCTCTCTGGAC
TTCCTCTGGGCCTGCATCCATGTTCCTCGCATCTGGCAGGGGCGGGACCAGCGCACCCCGCAGAAGCGGCGGGAG
GAGCTGGTGCTGCGGGTCCAGGGCCCGGAGCTCATCAGCCTGGTGGAGCTGATCCTGGCCGAGGCGGAGACGCGG
AGCCAGGACGGGGACACAGCCGCCTGCAGCCTCATCCAGGCCCGGCTGCCCCTGCTGCTCAGCTGCTGCTGTGGG
GACGATGAGAGTGTCAGGAAGGTGACGGAGCACCTGTCAGGCTGCATCCAGCAGTGGGGAGACAGCGTGCTGGGA
AGGCGCTGCCGAGACCTTCTCCTGCAGCTCTACCTACAGCGGCCGGAGCTGCGGGTGCCCGTGCCTGAGGTCCTA
CTGCACAGCGAAGGGGCTGCCAGCAGCAGCGTCTGCAAGCTGGACGGACTCATCCACCGCTTCATCACGCTCCTT
GCGGACACCAGCGACTCCCGGGCGTTGGAGAACCGAGGGGCGGATGCCAGCATGGCCTGCCGGAAGCTGGCGGTG
GCGCACCCGCTGCTGCTGCTCAGGCACCTGCCCATGATCGCGGCGCTCCTGCACGGCCGCACCCACCTCAACTTC
CAGGAGTTCCGGCAGCAGAACCACCTGAGCTGCTTCCTGCACGTGCTGGGCCTGCTGGAGCTGCTGCAGCCGCAC
GTGTTCCGCAGCGAGCACCAGGGGGCGCTGTGGGACTGCCTTCTGTCCTTCATCCGCCTGCTGCTGAATTACAGG
AAGTCCTCCCGCCATCTGGCTGCCTTCATCAACAAGTTTGTGCAGTTCATCCATAAGTACATTACCTACAATGCC
CCAGCAGCCATCTCCTTCCTGCAGAAGCACGCCGACCCGCTCCACGACCTGTCCTTCGACAACAGTGACCTGGTG
ATGCTGAAATCCCTCCTTGCAGGGCTCAGCCTGCCCAGCAGGGACGACAGGACCGACCGAGGCCTGGACGAAGAG
GGCGAGGAGGAGAGCTCAGCCGGCTCCTTGCCCCTGGTCAGCGTCTCCCTGTTCACCCCTCTGACCGCGGCCGAG
ATGGCCCCCTACATGAAACGGCTTTCCCGGGGCCAAACGGTGGAGGATCTGCTGGAGGTTCTGAGTGACATAGAC
GAGATGTCCCGGCGGAGACCCGAGATCCTGAGCTTCTTCTCGACCAACCTGCAGCGGCTGATGAGCTCGGCCGAG
GAGTGTTGCCGCAACCTCGCCTTCAGCCTGGCCCTGCGCTCCATGCAGAACAGCCCCAGCATTGCAGCCGCTTTC
CTGCCCACGTTCATGTACTGCCTGGGCAGCCAGGACTTTGAGGTGGTGCAGACGGCCCTCCGGAACCTGCCTGAG
TACGCTCTCCTGTGCCAAGAGCACGCGGCTGTGCTGCTCCACCGGGCCTTCCTGGTGGGCATGTACGGCCAGATG
GACCCCAGCGCGCAGATCTCCGAGGCCCTGAGGATCCTGCATATGGAGGCCGTGATG**TGA**GCCTGTGGCAGCCGA
CCCCCCTCCAAGCCCCGGCCCGTCCCGTCCCCGGGGATCCTCGAGGCAAAGCCCAGGAAGCGTGGGCGTTGCTGG
TCTGTCCGAGGAGGTGAGGGCGCCGAGCCCTGAGGCCAGGCAGGCCCAGGAGCAATACTCCGAGCCCTGGGGTGG
CTCCGGGCCGGCCGCTGGCATCAGGGGCCGTCCAGCAAGCCCTCATTCACCTTCTGGGCCACAGCCCTGCCGCGG
AGCGGCGGATCCCCCCGGGCATGGCCTGGGCTGGTTTTGAATGAAACGACCTGAACTGTCAA

도면16

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA77631

><subunit 1 of 1, 1029 aa, 1 stop

><MW: 114213, pI: 6.42, NX(S/T): 0

MHILVVHAMVILLTLGPPRADDSEFQALLDIWFPEEKPLPTAFLVDTSEEALLLPDWLKLRM
IRSEVLRLVDAALQDLEPQQLLLFVQSFGIPVSSMSKLLQFLDQAVAHDPQTLEQNIMDKNY
MAHLVEVQHERGASGGQTFHSLLTASLPPRRDSTEAPKPKSSPEQPIGQGRIRVGTQLRVLG
PEDDLAGMFLQIFPLSPDPRWQSSSPRPVALALQQALGQELARVVQGSPEVPGITVRVLQAL
ATLLSSPHGGALVMSMHRSHFLACPLLRQLCQYQRCVPQDTGFSSLFLKVLLQMLQWLDSPG
VEGGPLRAQLRMLASQASAGRRLSDVRGGLLRLAEALAFRQDLEVVSSTVRAVIATLRSGEQ
CSVEPDLISKVLQGLIEVRSPHLEELLTAFFSATADAASPFPACKPVVVVSSLLLQEEEPLA
GGKPGADGGSLEAVRLGPSSGLLVDWLEMLDPEVVSSCPDLQLRLLFSRRKGKGQAQVPSFR
PYLLTLFTHQSSWPTLHQCIRVLLGKSREQRFDPSASLDFLWACIHVPRIWQGRDQRTPQKR
REELVLRVQGPELISLVELILAEAETRSQDGDTAACSLIQARLPLLLSCCCGDDESVRKVTE
HLSGCIQQWGDSVLGRRCRDLLLQLYLQRPELRVPVPEVLLHSEGAASSSVCKLDGLIHRFI
TLLADTSDSRALENRGADASMACRKLAVAHPLLLLRHLPMIAALLHGRTHLNFQEFRQQNHL
SCFLHVLGLLELLQPHVFRSEHQGALWDCLLSFIRLLLNYRKSSRHLAAFINKFVQFIHKYI
TYNAPAAISFLQKHADPLHDLSFDNSDLVMLKSLLAGLSLPSRDDRTDRGLDEEGEEESSAG
SLPLVSVSLFTPLTAAEMAPYMKRLSRGQTVEDLLEVLSDIDEMSRRRPEILSFFSTNLQRL
MSSAEECCRNLAFSLALRSMQNSPSIAAAFLPTFMYCLGSQDFEVVQTALRNLPEYALLCQE
HAAVLLHRAFLVGMYGQMDPSAQISEALRILHMEAVM

중요한 특징:
신호 펩티드:
아미노산 1-16

cAMP- 및 **cGMP-**의존성 단백질 키나제 인산화 부위
아미노산 154-158, 331-335, 616-620, 785-789, 891-895

N-미리스토일화 부위
아미노산 91-97, 136-142, 224-230, 435-441, 439-445, 443-449,
665-671, 698-704

아미드화 부위
아미노산 329-333, 634-638

도면17

CCGGGCCATGCAGCCTCGGCCCCGCGGGCGCCCGCCGCGCACCCGAGGAG**ATG**AGGCTCCGC
AATGGCACCTTCCTGACGCTGCTGCTCTTCTGCCTGTGCGCCTTCCTCTCGCTGTCCTGGTA
CGCGGCACTCAGCGGCCAGAAAGGCGACGTTGTGGACGTTTACCAGCGGGAGTTCCTGGCGC
TGCGCGATCGGTTGCACGCAGCTGAGCAGGAGAGCCTCAAGCGCTCCAAGGAGCTCAACCTG
GTGCTGGACGAGATCAAGAGGGCCGTGTCAGAAAGGCAGGCGCTGCGAGACGGAGACGGCAA
TCGCACCTGGGGCCGCCTAACAGAGGACCCCCGATTGAAGCCGTGGAACGGCTCACACCGGC
ACGTGCTGCACCTGCCCACCGTCTTCCATCACCTGCCACACCTGCTGGCCAAGGAGAGCAGT
CTGCAGCCCGCGGTGCGCGTGGGCCAGGGCCGCACCGGAGTGTCGGTGGTGATGGGCATCCC
GAGCGTGCGGCGCGAGGTGCACTCGTACCTGACTGACACTCTGCACTCGCTCATCTCCGAGC
TGAGCCCGCAGGAGAAGGAGGACTCGGTCATCGTGGTGCTGATCGCCGAGACTGACTCACAG
TACACTTCGGCAGTGACAGAGAACATCAAGGCCTTGTTCCCCACGGAGATCCATTCTGGGCT
CCTGGAGGTCATCTCACCCTCCCCCCACTTCTACCCTGACTTCTCCCGCCTCCGAGAGTCCT
TTGGGGACCCCAAGGAGAGAGTCAGGTGGAGGACCAAACAGAACCTCGATTACTGCTTCCTC
ATGATGTACGCGCAGTCCAAAGGCATCTACTACGTGCAGCTGGAGGATGACATCGTGGCCAA
GCCCAACTACCTGAGCACCATGAAGAACTTTGCACTGCAGCAGCCTTCAGAGGACTGGATGA
TCCTGGAGTTCTCCCAGCTGGGCTTCATTGGTAAGATGTTCAAGTCGCTGGACCTGAGCCTG
ATTGTAGAGTTCATTCTCATGTTCTACCGGGACAAGCCCATCGACTGGCTCCTGGACCATAT
TCTGTGGGTGAAAGTCTGCAACCCCGAGAAGGATGCGAAGCACTGTGACCGGCAGAAAGCCA
ACCTGCGGATCCGCTTCAAACCGTCCCTCTTCCAGCACGTGGGCACTCACTCCTCGCTGGCT
GGCAAGATCCAGAAACTGAAGGACAAAGACTTTGGAAAGCAGGCGCTGCGGAAGGAGCATGT
GAACCCGCCAGCAGAGGTGAGCACGAGCCTGAAGACATACCAGCACTTCACCCTGGAGAAAG
CCTACCTGCGCGAGGACTTCTTCTGGGCCTTCACCCCTGCCGCGGGGGACTTCATCCGCTTC
CGCTTCTTCCAACCTCTAAGACTGGAGCGGTTCTTCTTCCGCAGTGGGAACATCGAGCACCC
GGAGGACAAGCTCTTCAACACGTCTGTGGAGGTGCTGCCCTTCGACAACCCTCAGTCAGACA
AGGAGGCCCTGCAGGAGGGCCGCACCGCCACCCTCCGGTACCCTCGGAGCCCCGACGGCTAC
CTCCAGATCGGCTCCTTCTACAAGGGAGTGGCAGAGGGAGAGGTGGACCCAGCCTTCGGCCC
TCTGGAAGCACTGCGCCTCTCGATCCAGACGGACTCCCCTGTGTGGGTGATTCTGAGCGAGA
TCTTCCTGAAAAAGGCCGAC**TAA**GCTGCGGGCTTCTGAGGGTACCCTGTGGCCAGCCCTGAA
GCCCACATTTCTGGGGGTGTCGTCACTGCCGTCCCCGGAGGGCCAGATACGGCCCCGCCCAA
AGGGTTCTGCCTGGCGTCGGGCTTGGGCCGGCCTGGGGTCCGCCGCTGGCCCGGAGGCCCTA
GGAGCTGGTGCTGCCCCCGCCCGCCGGGCCGCGGAGGAGGCAGGCGGCCCCCACACTGTGCC
TGAGGCCCGGAACCGTTCGCACCCGGCCTGCCCCAGTCAGGCCGTTTTAGAAGAGCTTTTAC
TTGGGCGCCCGCCGTCTCTGGCGCGAACACTGGAATGCATATACTACTTTATGTGCTGTGTT
TTTTATTCTTGGATACATTTGATTTTTTCACGTAAGTCCACATATACTTCTATAAGAGCGTG
ACTTGTAATAAAGGGTTAATGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

도면18

><usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA82307

><subunit 1 of 1, 548 aa, 1 stop

><MW: 63198, pI: 8.10, NX(S/T): 4

MRLRNGTFLTLLLFCLCAFLSLSWYAALSGQKGDVVDVYQREFLALRDRLHAAEQESLKRSK
ELNLVLDEIKRAVSERQALRDGDGNRTWGRLTEDPRLKPWNGSHRHVLHLPTVFHHLPHLLA
KESSLQPAVRVGQGRTGVSVVMGIPSVRREVHSYLTDTLHSLISELSPQEKEDSVIVVLIAE
TDSQYTSAVTENIKALFPTEIHSGLLEVISPSPHFYPDFSRLRESFGDPKERVRWRTKQNLD
YCFLMMYAQSKGIYYVQLEDDIVAKPNYLSTMKNFALQQPSEDWMILEFSQLGFIGKMFKSL
DLSLIVEFILMFYRDKPIDWLLDHILWVKVCNPEKDAKHCDRQKANLRIRFKPSLFQHVGTH
SSLAGKIQKLKDKDFGKQALRKEHVNPPAEVSTSLKTYQHFTLEKAYLREDFFWAFTPAAGD
FIRFRFFQPLRLERFFFRSGNIEHPEDKLFNTSVEVLPFDNPQSDKEALQEGRTATLRYPRS
PDGYLQIGSFYKGVAEGEVDPAFGPLEALRLSIQTDSPVWVILSEIFLKKAD

중요한 특징:
신호 서열
아미노산 1-23

N- 글리코실화 부위
아미노산 5-9, 87-91, 103-107, 465-469

N- 미리스토일화 부위
아미노산 6-12, 136-142, 370-376, 509-515

<110> Genentech, Inc. <120> Secreted and Transmembrane Polypeptides and Nucleic Acids Encoding the Same <130> P2930R1 <140> PCT/US99/28634 <141> 1999-12-01 <150> US 60/112,851 <151> 1998-12-16 <150> US 60/113,145 <151> 1998-12-16 <150> US 60/113,511 <151> 1998-12-22 <150> US 60/115,565 <151> 1999-01-12 <150> US 60/115,558 <151> 1999-01-12 <150> US 60/115,733 <151> 1999-01-12 <150> US 60/119,341 <151> 1999-02-09 <150> US 60/119,537 <151> 1999-02-10 <150> US 60/119,965 <151> 1999-02-12 <150> PCT/US99/12252 <151> 1999-06-02 <160> 38 <210> 1 <211> 1283 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 1 cggacgcgtg ggacccatac ttg ctggtct gatccatgca caaggcgggg 50 ctgctaggcc tctgtgcccg ggcttggaat tcggtgcgga tggccagctc 100 cgggatgacc cgccgggacc cgctcgcaaa taaggtggcc ctggtaacgg 150 cctccaccga cgggatcggc ttcgccatcg cccggcgttt ggcccaggac 200 ggggcccatg tggtcgtcag cagccggaag cagcagaatg tggaccaggc 250 ggtggccacg ctgcaggggg aggggctgag cgtga cgggc accgtgtgcc 300 atgtggggaa ggcggaggac cgggagcggc tggtggccac ggctgtgaag 350 cttcatggag gtatcgatat cctagtctcc aatgctgctg tcaacccttt 400 ctttggaagc ataatggatg tcactgagga ggtgtgggac aagactctgg 450 acatta atgt gaaggcccca gccctgatga caaaggcagt ggtgccagaa 500 atggagaaac gaggaggcgg ctcagtggtg atcgtgtctt ccatag cagc 550 cttcagtcca tctcctggct tcagtcctta caatgtcagt aaaacagcct 600 tgctgggcct gaccaagacc ctggccatag a gctggcccc aaggaacatt 650 agggtgaact gcctagcacc tggacttatc aagactagct tcagcaggat 700 gctctggatg gacaagg aaa aagaggaaag catgaaagaa accctgcgga 750 taagaaggtt aggcgagcca gaggattgtg ctggcatcgt gtctttcctg 800 tg ctctgaag atgccagcta catcactggg gaaacagtgg tggtgggtgg 850 aggaaccccg tcccgcctct gaggaccggg agacagccca ca ggccagag 900 ttgggctcta gctcctggtg ctgttcctgc attcacccac tggcctttcc 950 cacctctgct caccttactg ttcacctc at caaatcagtt ctgccctgtg 1000 aaaagatcca gccttccctg ccgtcaaggt ggcgtcttac tcgggattcc 1050 tgctgttgtt g tggccttgg gtaaaggcct cccctgagaa cacaggacag 1100 gcctgctgac aaggctgagt ctaccttggc aaagaccaag atatttttttc 1150 ctgggccact ggtgaatctg aggggtgatg ggagagaagg aacctggagt 1200 ggaaggagca gagttgcaaa ttaacagctt gcaa atgagg tgcaaataaa 1250 atgcagatga ttgcgcggct ttgaaaaaaa aaa 1283 <210> 2 <211> 278 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 2 Met His Lys Ala Gly Leu Leu Gly Leu Cys Ala Arg Ala Trp Asn 1 5 10 15 Ser Val Arg Met Ala Ser Ser Gly Met Thr Arg Arg Asp Pro Leu 20 25 30 Ala Asn Lys Val Ala Leu Val Thr Ala Ser Thr Asp Gly Ile Gly 35 40 45 Phe Ala Ile Ala Arg Arg Leu Ala Gln Asp Gly Ala His Val Val 50 55 60 Val Ser Ser Arg Lys Gln Gln Asn Val Asp Gln Ala Val Ala Thr 65 70 75 Leu Gln Gly Glu Gly Leu Ser Val Thr Gly Thr Val Cys His Val 80 85 90 Gly Lys Ala Glu Asp Arg Glu Arg Leu Val Ala Thr Ala Val Lys 95

100 105 Leu His Gly Gly Ile Asp Ile Leu Val Ser Asn Ala Ala Val Asn
110 115 120 Pro Phe Phe Gly Ser Ile Met Asp Val Thr Glu Gl
u Val Trp Asp 125 130 135 Lys Thr Leu Asp Ile Asn Val
Lys Ala Pro Ala Leu Met Thr Lys 140 145 150 Ala Val Va
l Pro Glu Met Glu Lys Arg Gly Gly Gly Ser Val Val 155 160
165 Ile Val Ser Ser Ile Ala Ala Phe Ser Pro Ser Pro Gly Phe Ser 170
175 180 Pro Tyr Asn Val Ser Lys Thr Ala Leu Leu Gly Leu Thr Lys Thr 1
85 190 195 Leu Ala Ile Glu Leu Ala Pro Arg Asn Ile Arg Val Asn Cys Leu
200 205 210 Ala Pro Gly Leu Ile Lys Thr Ser Phe Ser Ar
g Met Leu Trp Met 215 220 225 Asp Lys Glu Lys Glu Glu
Ser Met Lys Glu Thr Leu Arg Ile Arg 230 235 240 Arg Le
u Gly Glu Pro Glu Asp Cys Ala Gly Ile Val Ser Phe Leu 245 250
255 Cys Ser Glu Asp Ala Ser Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Val Val Val 260
265 270 Gly Gly Gly Thr Pro Ser Arg Leu 275 278 <210> 3 <
211> 21 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-21 <223> Synthetic Oligonucle
otide Probe <400> 3 gcataatgga tgtcactgag g 21 <210> 4 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial <220> <221>
Artificial Sequence <222> 1-23 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 4 agaacaatcc tgctgaaagc tag
23 <210> 5 <211> 46 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-46 <223> Syntheti
c Oligonucleotide Probe <400> 5 gaaacgagga ggcggctcag tggtgatcgt gtcttccata gcagcc 46 <210> 6 <211> 312
1 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 6 gcgccctgag ctccgcctcc gggcccgata gcggcatcga gagcgcctcc 50 gtcga
ggacc aggcggcgca gggggccggc gggcgaaagg aggatgaggg 100 ggcgcagcag ctgctgaccc tgcagaacca ggtggcgcgg ctgga
ggagg 150 agaaccgaga ctttctggct gcgctggagg acgccatgga gcagtacaaa 200 ctgcagagcg accggctgcg tgagcagcag
gaggagatgg tggaactgcg 250 gctgcggtta gagctggtgc ggccaggctg ggggggcctg cggctcctga 300 atggcctgcc tcccgg
gtcc tttgtgcctc gacctcatac agccccccctg 350 gggggtgccc acgcccatgt gctgggcatg gtgccgcctg cctgcctccc 400 t
ggagatgaa gttggctctg agcagagggg agagcaggtg acaaatggca 450 gggaggctgg agctgagttg ctgactgagg tgaacaggct g
ggaagtggc 500 tcttcagctg cttcagagga ggaagaggag gaggaggagc cgcccaggcg 550 gaccttacac ctgcgcagaa ataggat
cag caactgcagt cagagggcgg 600 gggcacgccc agggagtctg ccagagagga agggcccaga gctttgcctt 650 gaggagttgg at
gcagccat tccagggtcc agagcagttg gtgggagcaa 700 ggcccgagtt caggcccgcc aggtcccccc tgccacagcc tcagagtggc 75
0 ggctggccca ggcccagcag aagatccggg agctggctat caacatccgc 800 atgaaggagg agcttattgg cgagctggtc cgcacagg
aa aggcagctca 850 ggccctgaac cgccagcaca gccagcgtat ccgggagctg gagcaggagg 900 cagagcaggt gcgggccgag ctg
agtgaag gccagaggca gctgcgggag 950 ctcgagggca aggagctcca ggatgctggc gagcggtctc ggctccagga 1000 gttccgca
gg agggtcgctg cggcccagag ccaggtgcag gtgctgaagg 1050 agaagaagca ggctacggag cggctggtgt cactgtcggc ccagagt
gag 1100 aagcgactgc aggagctcga gcggaacgtg cagctcatgc ggcagcagca 1150 gggacagctg cagaggcggc ttcgcgagga
gacggagcag aagcggcgcc 1200 tggaggcaga aatgagcaag cggcagcacc gcgtcaagga gctggagctg 1250 aagcatgagc aaca
gcagaa gatcctgaag attaagacgg aagagatcgc 1300 ggccttccag aggaagaggc gcagtggcag caacggctct gtggtcagcc 135
0 tggaacagca gcagaagatt gaggagcaga agaagtggct ggaccaggag 1400 atggagaagg tgctacagca gcggcgggcg ctggagg
agc tgggggagga 1450 gctccacaag cgggaggcca tcctggccaa gaaggaggcc ctgatgcagg 1500 agaagacggg gctggagagc
aagcgcctga gatccagcca ggccctcaac 1550 gaggacatcg tgcgagtgtc cagccggctg gagcacctgg agaaggagct 1600 gtcc
gagaag agcgggcagc tgcggcaggg cagcgcccag agccagcagc 1650 agatccgcgg ggagatcgac agcctgcgcc aggagaagga ctc
gctgctc 1700 aagcagcgcc tggagatcga cggcaagctg aggcagggga gtctgctgtc 1750 ccccgaggag gagcggacgc tgttcca
gtt ggatgaggcc atcgaggccc 1800 tggatgctgc cattgagtat aagaatgagg ccatcacatg ccgccagcgg 1850 gtgcttcggg
cctcagcctc gttgctgtcc cagtgcgaga tgaacctcat 1900 ggccaagctc agctacctct catcctcaga gaccagagcc ctcctctgca
1950 agtattttga caaggtggtg acgctccgag aggagcagca ccagcagcag 2000 attgccttct cggaactgga gatgcagctg gag
gagcagc agaggctggt 2050 gtactggctg gaggtggccc tggagcggca gcgcctggag atggaccgcc 2100 agctgaccct gcagcag
aag gagcacgagc agaacatgca gctgctcctg 2150 cagcagagtc gagaccacct cggtgaaggg ttagcagaca gcaggaggca 2200
gtatgaggcc cggattcaag ctctggagaa ggaactgggc cgttacatgt 2250 ggataaacca ggaactgaaa cagaagctcg gcggtgtgaa
cgctgtaggc 2300 cacagcaggg gtggggagaa gaggagcctg tgctcggagg gcagacaggc 2350 tcctggaaat gaagatgagc tcc
acctggc acccgagctt ctctggctgt 2400 ccccccctcac tgagggggcc ccccgcaccc gggaggagac gcgggacttg 2450 gtccacg
ctc cgttaccctt gacctggaaa cgctcgagcc tgtgtggtga 2500 ggagcagggg tcccccgagg aactgaggca gcgggaggcg gctgag
cccc 2550 tggtggggcg ggtgcttcct gtgggtgagg caggcctgcc ctggaacttt 2600 gggcctttgt ccaagccccg gcgggaactg
cgacgagcca gcccgggggat 2650 gattgatgtc cggaaaaacc ccctgtaagc cctcggggca gaccctgcct 2700 tggagggaga ctc
cgagcct gctgaaaggg gcagctgcct gttttgcttc 2750 tgtgaagggc agtccttacc gcacacccta aatccaggcc ctcatctgta 28
00 ccctcactgg gatcaacaaa tttgggccat ggcccaaaag aactggaccc 2850 tcatttaaca aaataatatg caaattccca ccactt
actt ccatgaagct 2900 gtggtaccca attgccgcct tgtgtcttgc tcgaatctca ggacaattct 2950 ggtttcaggc gtaaatggat
gtgcttgtag ttcaggggtt tggccaagaa 3000 tcatcacgaa agggtcggtg gcaaccaggt tgtggtttaa atggtcttat 3050 gta
tataggg gaaactggga gactttagga tcttaaaaaa ccatttaata 3100 aaaaaaaatc tttgaaggga c 3121 <210> 7 <211> 830
<212> PRT <213> Homo sapiens <400> 7 Met Glu Gln Tyr Lys Leu Gln Ser Asp Arg Leu Arg Glu Gln Gln 1
5 10 15 Glu Glu Met Val Glu Leu Arg Leu Arg Leu Glu Leu
Val Arg Pro 20 25 30 Gly Trp Gly Gly Leu Arg Leu L

eu Asn Gly Leu Pro Pro Gly Ser 35 40 45 Phe Val Pro
Arg Pro His Thr Ala Pro Leu Gly Gly Ala His Ala 50 55
60 His Val Leu Gly Met Val Pro Pro Ala Cys Leu Pro Gly Asp Glu 65
70 75 Val Gly Ser Glu Gln Arg Gly Glu Gln Val Thr Asn Gly Arg Glu 8
0 85 90 Ala Gly Ala Glu Leu Leu Thr Glu Val Asn Arg Leu Gly Ser Gly
95 100 105 Ser Ser Ala Ala Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
Glu Glu Pro Pro 110 115 120 Arg Arg Thr Leu His Leu A
rg Arg Asn Arg Ile Ser Asn Cys Ser 125 130 135 Gln Arg
Ala Gly Ala Arg Pro Gly Ser Leu Pro Glu Arg Lys Gly 140 145
150 Pro Glu Leu Cys Leu Glu Glu Leu Asp Ala Ala Ile Pro Gly Ser 155
160 165 Arg Ala Val Gly Gl Ser Lys Ala Arg Val Gln Ala Arg Gln Val 170
ro Pro Ala Thr Ala Ser Glu Trp Arg Leu Ala Gln Ala Gln Gln 185 190
195 Lys Ile Arg Glu Leu Ala Ile Asn Ile Arg Met Lys Glu Glu Leu 200
205 210 Ile Gly Glu Leu Val Arg Thr Gly Lys Ala Ala Gln Ala Leu Asn
215 220 225 Arg Gln His Ser Gln Arg Ile Arg Glu Leu Glu Gln Glu
Ala Glu 230 235 240 Gln Val Arg Ala Glu Leu Ser Glu G
ly Gln Arg Gln Leu Arg Glu 245 250 255 Leu Glu Gly Lys
Glu Leu Gln Asp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Leu 260 265 27
0 Gln Glu Phe Arg Arg Arg Val Ala Ala Ala Gln Ser Gln Val Gln 275 280
285 Val Leu Lys Glu Lys Lys Gln Ala Thr Glu Arg Leu Val Ser Leu 290
295 300 Ser Ala Gln Ser Glu Lys Arg Leu Gln Glu Leu Glu Arg Asn Val
305 310 315 Gln Leu Met Arg Gln Gln Gln Gly Gln Leu Gln Arg
Arg Leu Arg 320 325 330 Glu Glu Thr Glu Gln Lys Arg A
rg Leu Glu Ala Glu Met Ser Lys 335 340 345 Arg Gln His
Arg Val Lys Glu Leu Glu Leu Lys His Glu Gln Gln 350 355
360 Gln Lys Ile Leu Lys Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ala Ala Phe Gln 365
370 375 Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Asn Gly Ser Val Val Ser Leu Glu 38
0 385 390 Gln Gln Gln Lys Ile Glu Glu Gln Lys Lys Trp Leu Asp Gln Glu
395 400 405 Met Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg Arg Ala Leu
Glu Glu Leu Gly 410 415 420 Glu Glu Leu His Lys Arg G
lu Ala Ile Leu Ala Lys Lys Glu Ala 425 430 435 Leu Met
Gln Glu Lys Thr Gly Leu Glu Ser Lys Arg Leu Arg Ser 440 445
450 Ser Gln Ala Leu Asn Glu Asp Ile Val Arg Val Ser Ser Arg Leu 455
460 465 Glu His Leu Glu Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ser Gly Gln Leu Arg
470 475 480 Gln Gly Ser Ala Gln Ser Gln Gln Gln Ile Arg Gly Glu Ile A
sp 485 490 495 Ser Leu Arg Gln Glu Lys Asp Ser Leu Leu
Lys Gln Arg Leu Glu 500 505 510 Ile Asp Gly Lys Leu A
rg Gln Gly Ser Leu Leu Ser Pro Glu Glu 515 520 525 Glu
Arg Thr Leu Phe Gln Leu Asp Glu Ala Ile Glu Ala Leu Asp 530 535
540 Ala Ala Ile Glu Tyr Lys Asn Glu Ala Ile Thr Cys Arg Gln Arg 545
550 555 Val Leu Arg Ala Ser Ala Ser Leu Leu Ser Gln Cys Glu Met Asn
560 565 570 Leu Met Ala Lys Leu Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Glu Thr A
rg Ala 575 580 585 Leu Leu Cys Lys Tyr Phe Asp Lys Val
Val Thr Leu Arg Glu Glu 590 595 600 Gln His Gln Gln G
ln Ile Ala Phe Ser Glu Leu Glu Met Gln Leu 605 610 615
Glu Glu Gln Gln Arg Leu Val Tyr Trp Leu Glu Val Ala Leu Glu 620 625
630 Arg Gln Arg Leu Glu Met Asp Arg Gln Leu Thr Leu Gln Gln Lys 635
640 645 Glu His Glu Gln Asn Met Gln Leu Leu Leu Gln Gln Ser Arg Asp
650 655 660 His Leu Gly Glu Gly Leu Ala Asp Ser Arg Arg Gln T
yr Glu Ala 665 670 675 Arg Ile Gln Ala Leu Glu Lys Glu
Leu Gly Arg Tyr Met Trp Ile 680 685 690 Asn Gln Glu L
eu Lys Gln Lys Leu Gly Gly Val Asn Ala Val Gly 695 700
705 His Ser Arg Gly Gly Glu Lys Arg Ser Leu Cys Ser Glu Gly Arg 710 71
5 720 Gln Ala Pro Gly Asn Glu Asp Glu Leu His Leu Ala Pro Glu Leu 725
730 735 Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Glu Gly Ala Pro Arg Thr Arg Glu
740 745 750 Glu Thr Arg Asp Leu Val His Ala Pro Leu Pro L
eu Thr Trp Lys 755 760 765 Arg Ser Ser Leu Cys Gly Glu
Glu Gln Gly Ser Pro Glu Glu Leu 770 775 780 Arg Gln A
rg Glu Ala Ala Glu Pro Leu Val Gly Arg Val Leu Pro 785 790

795 Val Gly Glu Ala Gly Leu Pro Trp Asn Phe Gly Pro Leu Ser Lys 800
805 810 Pro Arg Arg Glu Leu Arg Arg Ala Ser Pro Gly Met Ile Asp Val
815 820 825 Arg Lys Asn Pro Leu 830 <210> 8 <211> 662
<212> DNA <213> Homo sapiens <400> 8 attctcctag agcatctttg gaagcatgag gccacgatgc tgcatcttgg 50 ctcttgt
ctg ctggataaca gtcttcctcc tccagtgttc aaaaggaact 100 acagacgctc ctgttggctc aggactgtgg ctgtgccagc cgacacc
cag 150 gtgtgggaac aagatctaca acccttcaga gcagtgctgt tatgatgatg 200 ccatcttatc cttaaaggag acccgccgct gt
ggctccac ctgcaccttc 250 tggccctgct ttgagctctg ctgtcccgag tcttttggcc cccagcagaa 300 gtttcttgtg aagttgag
gg ttctgggtat gaagtctcag tgtcacttat 350 ctcccatctc ccggagctgt accaggaaca ggaggcacgt cctgtaccca 400 taa
aaacccc aggctccact ggcagacggc agacaagggg agaagagacg 450 aagcagctgg acatcggaga ctacagttga acttcggaga gaa
gcaactt 500 gacttcagag ggatggctca atgacatagc tttggagagg agcccagctg 550 gggatggcca gacttcaggg gaagaatgc
c ttcctgcttc atccccttc 600 cagctcccct tcccgctgag agccactttc atcggcaata aaatccccca 650 catttaccat ct 6
62 <210> 9 <211> 125 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 9 Met Arg Pro Arg Cys Cys Ile Leu Ala Leu Val C
ys Trp Ile Thr 1 5 10 15 Val Phe Leu Leu Gln Cys Ser
Lys Gly Thr Thr Asp Ala Pro Val 20 25 30 Gly Ser G
ly Leu Trp Leu Cys Gln Pro Thr Pro Arg Cys Gly Asn 35 40
45 Lys Ile Tyr Asn Pro Ser Glu Gln Cys Cys Tyr Asp Asp Ala Ile 50
55 60 Leu Ser Leu Lys Glu Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr Cys Thr Phe
65 70 75 Trp Pro Cys Phe Glu Leu Cys Cys Pro Glu Ser Phe Gly Pro Gln
80 85 90 Gln Lys Phe Leu Val Lys Leu Arg Val Leu G
ly Met Lys Ser Gln 95 100 105 Cys His Leu Ser Pro Ile
Ser Arg Ser Cys Thr Arg Asn Arg Arg 110 115 120 His V
al Leu Tyr Pro 125 <210> 10 <211> 1942 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 10 cccacgcgt
c cgcccacgcg tccgggtgcc actcgcgcgc cggccgcgct 50 ccgggcttct cttttccctc cgacgcgcca cggctgccca gacattccgg
100 ctgccgggtc tggagagctc cccgaacccc tccgcggaga ggagcgaggc 150 ggcgccaggg tggcccccgg ggcgcgcttg gtctc
ggaga agcggggacg 200 aggccggagg atgagcgact gagggcgacg cgggcactga cgcgagttgg 250 ggccgcgact accggcagct
gacagcgcga tgagcgactc cccagagacg 300 ccctagcccg gtgtgcgcgc caggcggagc gcgcaggtgg ggctgggctg 350 ttagtg
gtcc gccccacgcg ggtcgccggc cggcccagga tgggcgctgg 400 caacccgggc ccgcgcccgc cgctgctacc cctgcgcccg ctgcga
gccc 450 ggcgtccggc ccgcgccctg cgctcatgga cggcggctcc cggctggcgg 500 cggcgcgccc ccgggctgtg aatgcgactc g
cccctcggc cgcgctcccc 550 gcccgcccgc ccgccgggac gtggtagggg atgcccagct ccactgcgat 600 ggcagttggc gcgctct
cca gttccctcct ggtcacctgc tgcctgatgg 650 tggctctgtg cagtccgagc atcccgctgg agaagctggc ccaggcacca 700 ga
gcagccgg gccaggagaa gcgtgagcac gccactcggg acggcccggg 750 gcgggtgaac gagctcgggc gcccggcgag ggacgagggc gg
cagcggcc 800 gggactggaa gagcaagagc ggccgtgggc tcgccggccg tgagccgtgg 850 agcaagctga agcaggcctg ggtctccc
ag ggcgggggcg ccaaggccgg 900 ggatctgcag gtccggcccc gcggggacac cccgcaggcg gaagccctgg 950 ccgcagccgc cca
ggacgcg attggcccgg aactcgcgcc cacgcccgag 1000 ccacccgagg agtacgtgta cccggactac cgtggcaagg gctgcgtgga 10
50 cgagagcggc ttcgtgtacg cgatcgggga gaagttcgcg ccgggcccct 1100 cggcctgccc gtgcctgtgc accgaggagg ggccgc
tgtg cgcgcagccc 1150 gagtgcccga ggctgcaccc gcgctgcatc cacgtcgaca cgagccagtg 1200 ctgcccgcag tgcaaggaga
ggaagaacta ctgcgagttc cggggcaaga 1250 cctatcagac tttggaggag ttcgtggtgt ctccatgcga gaggtgtcgc 1300 tgt
gaagcca acggtgaggt gctatgcaca gtgtcagcgt gtccccagac 1350 ggagtgtgtg gaccctgtgt acgagcctga tcagtgctgt cc
catctgca 1400 aaaatggtcc aaactgcttt gcagaaaccg cggtgatccc tgctggcaga 1450 gaagtgaaga ctgacgagtg caccat
atgc cactgtactt atgaggaagg 1500 cacatggaga atcgagcggc aggccatgtg cacgagacat gaatgcaggc 1550 aaatgtagac
gcttcccaga acacaaactc tgacttttc tagaacattt 1600 tactgatgtg aacattctag atgactctgg gaactatcag tcaaagaag
a 1650 cttttgatga ggaataatgg aaaattgttg gtacttttcc ttttcttgat 1700 aacagttact acaacagaag gaaatggata ta
tttcaaaa catcaacaag 1750 aactttgggc ataaaatcct tctctaaata aatgtgctat tttcacagta 1800 agtacacaaa agtaca
ctat tatatatcaa atgtatttct ataatccctc 1850 cattagagag cttatataag tgttttctat agatgcagat taaaaatgct 1900
gtgttgtcaa ccgtcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1942 <210> 11 <211> 325 <212> PRT <213> Homo sapiens <40
0> 11 Met Pro Ser Ser Thr Ala Met Ala Val Gly Ala Leu Ser Ser Ser 1 5
10 15 Leu Leu Val Thr Cys Cys Leu Met Val Ala Leu Cys Ser Pro Ser 2
0 25 30 Ile Pro Leu Glu Lys Leu Ala Gln Ala Pro Glu Gln Pro Gly Gln
35 40 45 Glu Lys Arg Glu His Ala Thr Arg Asp Gly Pro
Gly Arg Val Asn 50 55 60 Glu Leu Gly Arg Pro Ala Arg Asp Gl
65 70 75 Trp Lys Ser Lys Ser Gly Arg Gly Leu Ala Gly Arg Glu Pro
Trp 80 85 90 Ser Lys Leu Lys Gln Ala Trp Val Ser G
ln Gly Gly Gly Ala Lys 95 100 105 Ala Gly Asp Leu Gln
Val Arg Pro Arg Gly Asp Thr Pro Gln Ala 110 115 120 G
lu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gln Asp Ala Ile Gly Pro Glu Leu 125 130
135 Ala Pro Thr Pro Glu Pro Pro Glu Glu Tyr Val Tyr Pro Asp Tyr 140
145 150 Arg Gly Lys Gly Cys Val Asp Glu Ser Gly Phe Val Tyr Ala Ile
155 160 165 Gly Glu Lys Phe Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Cys
Leu Cys 170 175 180 Thr Glu Glu Gly Pro Leu Cys Ala G

ln Pro Glu Cys Pro Arg Leu 185 190 195 His Pro Arg Cys
Ile His Val Asp Thr Ser Gln Cys Cys Pro Gln 200 205 21
0 Cys Lys Glu Arg Lys Asn Tyr Cys Glu Phe Arg Gly Lys Thr Tyr 215 220
225 Gln Thr Leu Glu Glu Phe Val Val Ser Pro Cys Glu Arg Cys Arg 230
235 240 Cys Glu Ala Asn Gly Glu Val Leu Cys Thr Val Ser Ala Cys Pro
245 250 255 Gln Thr Glu Cys Val Asp Pro Val Tyr Glu Pro Asp
Gln Cys Cys 260 265 270 Pro Ile Cys Lys Asn Gly Pro A
sn Cys Phe Ala Glu Thr Ala Val 275 280 285 Ile Pro Ala
Gly Arg Glu Val Lys Thr Asp Glu Cys Thr Ile Cys 290 295
300 His Cys Thr Tyr Glu Glu Gly Thr Trp Arg Ile Glu Arg Gln Ala 305
310 315 Met Cys Thr Arg His Glu Cys Arg Gln Met 320 32
5 <210> 12 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-24 <223> Syntheti
c Oligonucleotide Probe <400> 12 gaggtgtcgc tgtgaagcca acgg 24 <210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> Artifi
cial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-24 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 13 cgctcgat
tc tccatgtgcc ttcc 24 <210> 14 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222>
1-45 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 14 gacggagtgt gtggaccctg tgtacgagcc tgatcagtgc tgtcc
45 <210> 15 <211> 1587 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 15 cagccacaga cgggtcatga gcgcggtatt actgctggc
c ctcctggggt 50 tcatcctccc actgccagga gtgcaggcgc tgctctgcca gtttgggaca 100 gttcagcatg tgtggaaggt gtccg
accta ccccggcaat ggacccctaa 150 gaacaccagc tgcgacagcg gcttggggtg ccaggacacg ttgatgctca 200 ttgagagcgg
accccaagtg agcctggtgc tctccaaggg ctgcacggag 250 gccaaggacc aggagccccg cgtcactgag caccggatgg gccccggcct
300 ctccctgatc tcctacacct tcgtgtgccg ccaggaggac ttctgcaaca 350 acctcgttaa ctcccctccg ctttgggccc cacagc
cccc agcagaccca 400 ggatccttga ggtgcccagt ctgcttgtct atggaaggct gtctggaggg 450 gacaacagaa gagatctgcc c
caaggggac cacacactgt tatgatggcc 500 tcctcaggct caggggagga ggcatcttct ccaatctgag agtccaggga 550 tgcatgc
ccc agccaggttg caacctgctc aatgggacac aggaaattgg 600 gcccgtgggt atgactgaga actgcaatag gaaagatttt ctgacct
gtc 650 atcgggggac caccattatg acacacggaa acttggctca agaacccact 700 gattggacca catcgaatac cgagatgtgc ga
ggtggggc aggtgtgtca 750 ggagacgctg ctgctcatag atgtaggact cacatcaacc ctggtgggga 800 caaaaggctg cagcactg
tt ggggctcaaa attcccagaa gaccaccatc 850 cactcagccc ctcctggggt gcttgtggcc tcctataccc acttctgctc 900 ctc
ggacctg tgcaatagtg ccagcagcag cagcgttctg ctgaactccc 950 tccctcctca agctgcccct gtcccaggag accggcagtg tcc
tacctgt 1000 gtgcagcccc ttggaacctg ttcaagtggc tccccccgaa tgacctgccc 1050 caggggcgcc actcattgtt atgatgg
gta cattcatctc tcaggaggtg 1100 ggctgtccac caaaatgagc attcagggct gcgtggccca accttccagc 1150 ttcttgttga
accacaccag acaaatcggg atcttctctg cgcgtgagaa 1200 gcgtgatgtg cagcctcctg cctctcagca tgagggaggt ggggctgagg
1250 gcctggagtc tctcacttgg ggggtggggc tggcactggc cccagcgctg 1300 tggtggggag tggtttgccc ttcctgctaa ctc
tattacc cccacgattc 1350 ttcaccgctg ctgaccaccc acactcaacc tccctctgac ctcataacct 1400 aatggccttg gacacca
gat tctttcccat tctgtccatg aatcatcttc 1450 cccacacaca atcattcata tctactcacc taacagcaac actggggaga 1500
gcctggagca tccggacttg ccctatggga gaggggacgc tggaggagtg 1550 gctgcatgta tctgataata cagaccctgt cctttca 15
87 <210> 16 <211> 437 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 16 Met Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly
Phe Ile Leu Pro 1 5 10 15 Leu Pro Gly Val Gln Ala L
eu Leu Cys Gln Phe Gly Thr Val Gln 20 25 30 His Val
Trp Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys 35 40
45 Asn Thr Ser Cys Asp Ser Gly Leu Gly Cys Gln Asp Thr Leu Met 50
55 60 Leu Ile Glu Ser Gly Pro Gln Val Ser Leu Val Leu Ser Lys Gly
65 70 75 Cys Thr Glu Ala Lys Asp Gln Glu Pro Arg Val Thr Glu His A
rg 80 85 90 Met Gly Pro Gly Leu Ser Leu Ile Ser Tyr
Thr Phe Val Cys Arg 95 100 105 Gln Glu Asp Phe Cys A
sn Asn Leu Val Asn Ser Leu Pro Leu Trp 110 115 120 Ala
Pro Gln Pro Pro Ala Asp Pro Gly Ser Leu Arg Cys Pro Val 125 130
135 Cys Leu Ser Met Glu Gly Cys Leu Glu Gly Thr Thr Glu Glu Ile 140
145 150 Cys Pro Lys Gly Thr Thr His Cys Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Leu
155 160 165 Arg Gly Gly Gly Ile Phe Ser Asn Leu Arg Val Gln Gly C
ys Met 170 175 180 Pro Gln Pro Gly Cys Asn Leu Leu Asn
Gly Thr Gln Glu Ile Gly 185 190 195 Pro Val Gly Met T
hr Glu Asn Cys Asn Arg Lys Asp Phe Leu Thr 200 205 210
Cys His Arg Gly Thr Thr Ile Met Thr His Gly Asn Leu Ala Gln 215 220
225 Glu Pro Thr Asp Trp Thr Thr Ser Asn Thr Glu Met Cys Glu Val 230
235 240 Gly Gln Val Cys Gln Glu Thr Leu Leu Leu Ile Asp Val Gly Leu
245 250 255 Thr Ser Thr Leu Val Gly Thr Lys Gly Cys Ser Thr V
al Gly Ala 260 265 270 Gln Asn Ser Gln Lys Thr Thr Ile
His Ser Ala Pro Pro Gly Val 275 280 285 Leu Val Ala S
er Tyr Thr His Phe Cys Ser Ser Asp Leu Cys Asn 290 295

300 Ser Ala Ser Ser Ser Ser Val Leu Leu Asn Ser Leu Pro Pro Gln 305 31
0 315 Ala Ala Pro Val Pro Gly Asp Arg Gln Cys Pro Thr Cys Val Gln 320
325 330 Pro Leu Gly Thr Cys Ser Ser Gly Ser Pro Arg Met Thr Cys Pro
335 340 345 Arg Gly Ala Thr His Cys Tyr Asp Gly Tyr Ile H
is Leu Ser Gly 350 355 360 Gly Gly Leu Ser Thr Lys Met
Ser Ile Gln Gly Cys Val Ala Gln 365 370 375 Pro Ser S
er Phe Leu Leu Asn His Thr Arg Gln Ile Gly Ile Phe 380 385
390 Ser Ala Arg Glu Lys Arg Asp Val Gln Pro Pro Ala Ser Gln His 395
400 405 Glu Gly Gly Gly Ala Glu Gly Leu Glu Ser Leu Thr Trp Gly Val
410 415 420 Gly Leu Ala Leu Ala Pro Ala Leu Trp Trp Gly Val Val Cys Pro
425 430 435 Ser Cys 437 <210> 17 <211> 2387 <212
> DNA <213> Homo sapiens <400> 17 cgacgatgct acgcgcgccc ggctgcctcc tccggacctc cgtagcgcct 50 gccgcggccc
tggctgcggc gctgctctcg tcgcttgcgc gctgctctct 100 tctagagccg agggacccgg tggcctcgtc gctcagcccc tatttcggca
150 ccaagactcg ctacgaggat gtcaaccccg tgctattgtc gggccccgag 200 gctccgtggc gggaccctga gctgctggag gggac
ctgca ccccggtgca 250 gctggtcgcc ctcattcgcc acggcacccg ctaccccacg gtcaaacaga 300 tccgcaagct gaggcagctg
cacgggttgc tgcaggcccg cgggtccagg 350 gatggcgggg ctagtagtac cggcagccgc gacctgggtg cagcgctggc 400 cgactg
gcct ttgtggtacg cggactggat ggacgggcag ctagtagaga 450 agggacggca ggatatgcga cagctggcgc tgcgtctggc ctcgct
cttc 500 ccggcccttt tcagccgtga gaactacggc cgcctgcggc tcatcaccag 550 ttccaagcac cgctgcatgg atagcagcgc c
gccttcctg caggggctgt 600 ggcagcacta ccaccctggc ttgccgccgc cggacgtcgc agatatggag 650 tttggacctc caacagt
taa tgataaacta atgagatttt ttgatcactg 700 tgagaagttt ttaactgaag tagaaaaaaa tgctacagct ctttatcacg 750 tg
gaagcctt caaaactgga ccagaaatgc agaacatttt aaaaaaagtt 800 gcagctactt tgcaagtgcc agtaaatgat ttaaatgcag at
ttaattca 850 agtagccttt ttcacctgtt catttgacct ggcaattaaa ggtgttaaat 900 ctccttggtg tgatgttttt gacataga
tg atgcaaaggt attagaatat 950 ttaaatgatc tgaaacaata ttggaaaaga ggatatgggt atactattaa 1000 cagtcgatcc ag
ctgcacct tgtttcagga tatctttcag cacttggaca 1050 aagcagttga acagaaacaa aggtctcagc caatttcttc tccagtcatc 1
100 ctccagtttg gtcatgcaga gactcttctt ccactgcttt ctctcatggg 1150 ctacttcaaa gacaaggaac ccctaacagc gtaca
attac aaaaaacaaa 1200 tgcatcggaa gttccgaagt ggtctcattg taccttatgc ctcgaacctg 1250 atatttgtgc tttaccact
g tgaaaatgct aagactccta aagaacaatt 1300 ccgagtgcag atgttattaa atgaaaaggt gttacctttg gcttactcac 1350 aa
gaaactgt ttcattttat gaagatctga agaaccacta caaggacatc 1400 cttcagagtt gtcaaaccag tgaagaatgt gaattagcaa g
ggctaacag 1450 tacatctgat gaactatgag taactgaaga acatttttaa ttctttagga 1500 atctgcaatg agtgattaca tgctt
gtaat aggtaggcaa ttccttgatt 1550 acaggaagct ttatattac ttgagtattt ctgtcttttc acagaaaaac 1600 attgggtttc tctctgg
50 ctggagcagc tctcttaagg agaaacaaat ctatttagag aaacagctgg 1700 ccctgcaaat gtttacagaa atgaaattct tcctac
ttat ataagaaatc 1750 tcacactgag atagaattgt gatttcataa taacacttga aaagtgctgg 1800 agtaacaaaa tatctcagtt
ggaccatcct taacttgatt gaactgtcta 1850 ggaactttac agattgttct gcagttctct cttcttttcc tcaggtagga 1900 cag
ctctagc attttcttaa tcaggaatat tgtggtaagc tgggagtatc 1950 actctggaag aaagtaacat ctccagatga gaatttgaaa ca
agaaacag 2000 agtgttgtaa aaggacacct tcactgaagc aagtcggaaa gtacaatgaa 2050 aataaatatt tttggtattt atttat
gaaa tatttgaaca ttttttcaat 2100 aattcctttt tacttctagg aagtctcaaa agaccatctt aaattattat 2150 atgtttggac
aattagcaac aagtcagata gttagaatcg aagtttttca 2200 aatccattgc ttagctaact ttttcattct gtcacttggc ttcgatttt
t 2250 atattttcct attatatgaa atgtatcttt tggttgtttg atttttcttt 2300 ctttctttgt aaatagttct gagttctgtc aa
atgccgtg aaagtatttg 2350 ctataataaa gaaaattctt gtgactttaa aaaaaaa 2387 <210> 18 <211> 487 <212> PRT <21
3> Homo sapiens <400> 18 Met Leu Arg Ala Pro Gly Cys Leu Leu Arg Thr Ser Val Ala Pro 1
5 10 15 Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Ala Arg Cys
20 25 30 Ser Leu Leu Glu Pro Arg Asp Pro Val Ala Se
r Ser Leu Ser Pro 35 40 45 Tyr Phe Gly Thr Lys Thr
Arg Tyr Glu Asp Val Asn Pro Val Leu 50 55 60 Leu Se
r Gly Pro Glu Ala Pro Trp Arg Asp Pro Glu Leu Leu Glu 65 70
75 Gly Thr Cys Thr Pro Val Gln Leu Val Ala Leu Ile Arg His Gly 80
85 90 Thr Arg Tyr Pro Thr Val Lys Gln Ile Arg Lys Leu Arg Gln Leu
95 100 105 His Gly Leu Leu Gln Ala Arg Gly Ser Arg Asp Gly Gly Ala
Ser 110 115 120 Ser Thr Gly Ser Arg Asp Leu Gly Ala Al
a Leu Ala Asp Trp Pro 125 130 135 Leu Trp Tyr Ala Asp
Trp Met Asp Gly Gln Leu Val Glu Lys Gly 140 145 150 Ar
g Gln Asp Met Arg Gln Leu Ala Leu Arg Leu Ala Ser Leu Phe 155 160
165 Pro Ala Leu Phe Ser Arg Glu Asn Tyr Gly Arg Leu Arg Leu Ile 170
175 180 Thr Ser Ser Lys His Arg Cys Met Asp Ser Ser Ala Ala Phe Leu
185 190 195 Gln Gly Leu Trp Gln His Tyr His Pro Gly Leu Pro Pro
Pro Asp 200 205 210 Val Ala Asp Met Glu Phe Gly Pro Pr
o Thr Val Asn Asp Lys Leu 215 220 225 Met Arg Phe Phe
Asp His Cys Glu Lys Phe Leu Thr Glu Val Glu 230 235 240
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Tyr His Val Glu Ala Phe Lys Thr Gly 245 250

255 Pro Glu Met Gln Asn Ile Leu Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu Gln 260
265 270 Val Pro Val Asn Asp Leu Asn Ala Asp Leu Ile Gln Val Ala Phe
275 280 285 Phe Thr Cys Ser Phe Asp Leu Ala Ile Lys Gly Val
Lys Ser Pro 290 295 300 Trp Cys Asp Val Phe Asp Ile As
p Asp Ala Lys Val Leu Glu Tyr 305 310 315 Leu Asn Asp
Leu Lys Gln Tyr Trp Lys Arg Gly Tyr Gly Tyr Thr 320 325
330 Ile Asn Ser Arg Ser Ser Cys Thr Leu Phe Gln Asp Ile Phe Gln 335 3
40 345 His Leu Asp Lys Ala Val Glu Gln Lys Gln Arg Ser Gln Pro Ile 350
355 360 Ser Ser Pro Val Ile Leu Gln Phe Gly His Ala Glu Thr Leu Leu
365 370 375 Pro Leu Leu Ser Leu Met Gly Tyr Phe Lys Asp
Lys Glu Pro Leu 380 385 390 Thr Ala Tyr Asn Tyr Lys Ly
s Gln Met His Arg Lys Phe Arg Ser 395 400 405 Gly Leu
Ile Val Pro Tyr Ala Ser Asn Leu Ile Phe Val Leu Tyr 410 415
420 His Cys Glu Asn Ala Lys Thr Pro Lys Glu Gln Phe Arg Val Gln 425
430 435 Met Leu Leu Asn Glu Lys Val Leu Pro Leu Ala Tyr Ser Gln Glu
440 445 450 Thr Val Ser Phe Tyr Glu Asp Leu Lys Asn His Tyr Lys Asp Il
e 455 460 465 Leu Gln Ser Cys Gln Thr Ser Glu Glu Cys
Glu Leu Ala Arg Ala 470 475 480 Asn Ser Thr Ser Asp Gl
u Leu 485 487 <210> 19 <211> 3554 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 19 gggactacaa
gccgcgccgc gctgccgctg gcccctcagc aaccctcgac 50 atggcgctga ggcggccacc gcgactccgg ctctgcgctc ggctgcctga
100 cttcttcctg ctgctgcttt tcaggggctg cctgataggg gctgtaaatc 150 tcaaatccag caatcgaacc ccagtggtac aggaat
ttga aagtgtggaa 200 ctgtcttgca tcattacgga ttcgcagaca agtgacccca ggatcgagtg 250 gaagaaaatt caagatgaac a
aaccacata tgtgtttttt gacaacaaaa 300 ttcagggaga cttggcgggt cgtgcagaaa tactggggaa gacatccctg 350 aagatct
gga atgtgacacg gagagactca gccctttatc gctgtgaggt 400 cgttgctcga aatgaccgca aggaaattga tgagattgtg atcgagt
taa 450 ctgtgcaagt gaagccagtg acccctgtct gtagagtgcc gaaggctgta 500 ccagtaggca agatggcaac actgcactgc ca
ggagagtg agggccaccc 550 ccggcctcac tacagctggt atcgcaatga tgtaccactg cccacggatt 600 ccagagccaa tcccagat
tt cgcaattctt ctttccactt aaactctgaa 650 acaggcactt tggtgttcac tgctgttcac aaggacgact ctgggcagta 700 cta
ctgcatt gcttccaatg acgcaggctc agccaggtgt gaggagcagg 750 agatggaagt ctatgacctg aacattggcg gaattattgg ggg
ggttctg 800 gttgtccttg ctgtactggc cctgatcacg ttgggcatct gctgtgcata 850 cagacgtggc tacttcatca acaataaac
a ggatggagaa agttacaaga 900 acccagggaa accagatgga gttaactaca tccgcactga cgaggagggc 950 gacttcagac acaa
gtcatc gtttgtgatc tgagacccgc ggtgtggctg 1000 agagcgcaca gagcgcacgt gcacatacct ctgctagaaa ctcctgtcaa 105
0 ggcagcgaga gctgatgcac tcggacagag ctagacactc attcagaagc 1100 ttttcgtttt ggccaaagtt gaccactact cttctta
ctc taacaagcca 1150 catgaataga agaattttcc tcaagatgga cccggtaaat ataaccacaa 1200 ggaagcgaaa ctgggtgcgt
tcactgagtt gggttcctaa tctgtttctg 1250 gcctgattcc cgcatgagta ttagggtgat cttaaagagt ttgctcacgt 1300 aaac
gcccgt gctgggccct gtgaagccag catgttcacc actggtcgtt 1350 cagcagccac gacagcacca tgtgagatgg cgaggtggct gga
cagcacc 1400 agcagcgcat cccggcggga acccagaaaa ggcttcttac acagcagcct 1450 tacttcatcg gcccacagac accaccg
cag tttcttctta aaggctctgc 1500 tgatcggtgt tgcagtgtcc attgtggaga agctttttgg atcagcattt 1550 tgtaaaaaca
accaaaatca ggaaggtaaa ttggttgctg gaagagggat 1600 cttgcctgag gaaccctgct tgtccaacag ggtgtcagga tttaaggaaa
1650 accttcgtct taggctaagt ctgaaatggt actgaaatat gcttttctat 1700 gggtcttgtt tattttataa aattttacat cta
aattttt gctaaggatg 1750 tattttgatt attgaaaaga aaatttctat ttaaactgta aatatattgt 1800 catacaatgt taaataa
cct attttttaa aaaagttcaa cttaaggtag 1850 aagttccaag ctactagtgt taaattggaa aatatcaata attaagagta 1900
ttttacccaa ggaatcctct catggaagtt tactgtgatg ttccttttct 1950 cacacaagtt ttagcctttt tcacaaggga actcatactg
tctacacatc 2000 agaccatagt tgcttaggaa acctttaaaa attccagtta agcaatgttg 2050 aaatcagttt gcatctcttc aaa
agaaacc tctcaggtta gctttgaact 2100 gcctcttcct gagatgacta ggacagtctg tacccagagg ccacccagaa 2150 gccctca
gat gtacatacac agatgccagt cagctcctgg ggttgcgcca 2200 ggcgcccccg ctctagctca ctgttgcctc gctgtctgcc aggagg
ccct 2250 gccatccttg ggccctggca gtggctgtgt cccagtgagc tttactcacg 2300 tggcccttgc ttcatccagc acagctctca
ggtgggcact gcagggacac 2350 tggtgtcttc catgtagcgt cccagctttg ggctcctgta acagacctct 2400 ttttggttat gga
tggctca caaaataggg cccccaatgc tatttttttt 2450 ttttaagttt gtttaattat ttgttaagat tgtctaaggc caaaggcaat 25
00 tgcgaaatca agtctgtcaa gtacaataac atttttaaaa gaaaatggat 2550 cccactgttc ctctttgcca cagagaaagc acccag
acgc cacaggctct 2600 gtcgcatttc aaaacaaacc atgatggagt ggcggccagt ccagcctttt 2650 aaagaacgtc aggtggagca
gccaggtgaa aggcctggcg gggaggaaag 2700 tgaaacgcct gaatcaaaag cagttttcta attttgactt taaatttttc 2750 atc
cgccgga gacactgctc ccatttgtgg ggggacatta gcaacatcac 2800 tcagaagcct gtgttcttca agagcaggtg ttctcagcct ca
catgccct 2850 gccgtgctgg actcaggact gaagtgctgt aaagcaagga gctgctgaga 2900 aggagcactc cactgtgtgc ctggag
aatg gctctcacta ctcaccttgt 2950 ctttcagctt ccagtgtctt gggtttttta tactttgaca gctttttttt 3000 aattgcatac
atgagactgt gttgactttt tttagttatg tgaaacactt 3050 tgccgcaggc cgcctggcag aggcaggaaa tgctccagca gtggctcag
t 3100 gctccctggt gtctgctgca tggcatcctg gatgcttagc atgcaagttc 3150 cctccatcat tgccaccttg gtagagaggg at
ggctcccc accctcagcg 3200 ttggggattc acgctccagc ctccttcttg gttgtcatag tgatagggta 3250 gccttattgc cccctc
ttct tataccctaa aaccttctac actagtgcca 3300 tgggaaccag gtctgaaaaa gtagagagaa gtgaaagtag agtctgggaa 3350
gtagctgcct ataactgaga ctagacggaa aaggaatact cgtgtatttt 3400 aagatatgaa tgtgactcaa gactcgaggc cgatacgag

g ctgtgattct 3450 gcctttggat ggatgttgct gtacacagat gctacagact tgtactaaca 3500 caccgtaatt tggcatttgt tt aacctcat ttataaaagc ttcaaaaaaa 3550 ccca 3554 <210> 20 <211> 310 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 20 Met Ala Leu Arg Arg Pro Pro Arg Leu Arg Leu Cys Ala Arg Leu 1 5 10 15 Pro Asp Phe Phe Leu Leu Leu Leu Phe Arg Gly Cys Leu Ile Gly 20 25 30 Ala Val Asn Leu Lys Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Val Gln Glu 35 40 45 Phe Glu Ser Val Glu Leu Ser Cys Ile Ile Thr Asp S er Gln Thr 50 55 60 Ser Asp Pro Arg Ile Glu Trp Lys Lys Ile Gln Asp Glu Gln Thr 65 70 75 Thr Tyr Val P he Phe Asp Asn Lys Ile Gln Gly Asp Leu Ala Gly 80 85 90 Arg Ala Glu Ile Leu Gly Lys Thr Ser Leu Ly Ile Trp Asn Val 95 100 eu Tyr Arg Cys Glu Val Val Ala Arg 110 115 120 Asn Asp Arg Lys Glu Ile Asp Glu Ile Val Ile Glu Leu Thr Val 125 130 135 Gln Val Lys Pro Val Thr Pro Val Cys Arg Val Pro Lys Ala Val 140 145 150 Pro Val Gly Lys Met Ala Thr Leu His Cys Gln Glu Ser Glu Gly 155 160 165 His Pro Arg Pro His Tyr Ser Trp Tyr Arg Asn Asp Val Pro L eu 170 175 180 Pro Thr Asp Ser Arg Ala Asn Pro Arg Phe Arg Asn Ser Ser Phe 185 190 195 His Leu Asn Ser Glu T hr Gly Thr Leu Val Phe Thr Ala Val His 200 205 210 Lys Asp Asp Ser Gly Gln Tyr Tyr Cys Ile Ala Ser Asn Asp Ala 215 220 225 Gly Ser Ala Arg Cys Glu Glu Gln Glu Met Glu Val Tyr Asp Leu 230 235 240 Asn Ile Gly Gly Ile Ile Gly Gly Val Leu Val Val Leu Ala Val 245 250 255 Leu Ala Leu Ile Thr Leu Gly Ile Cys Cys Ala Tyr Arg A rg Gly 260 265 270 Tyr Phe Ile Asn Asn Lys Gln Asp Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Pro 275 280 285 Gly Lys Pro Asp G ly Val Asn Tyr Ile Arg Thr Asp Glu Glu Gly 290 295 300 Asp Phe Arg His Lys Ser Ser Phe Val Ile 305 310 <210> 21 <211> 3437 <2 12> DNA <213> Homo sapiens <400> 21 caggaccagg tcttcctacg ctggagcagc ggggagacag ccaccatgca 50 catcctcg tg gtccatgcca tggtgatcct gctgacgctg ggcccgcctc 100 gagccgacga cagcgagttc caggcgctgc tggacatctg gtttccgg ag 150 gagaagccac tgcccaccgc cttcctggtg gacacatcgg aggaggcgct 200 gctgcttcct gactggctga agctgcgcat gat ccgttct gaggtgctcc 250 gcctggtgga cgccgccctg caggacctgg agccgcagca gctgctgctg 300 ttcgtgcagt cgtttggca t ccccgtgtcc agcatgagca aactcctcca 350 gttcctggac caggcagtgg cccacgaccc ccagactctg gagcagaaca 400 tcat ggacaa gaattacatg gcccacctgg tggaggtcca gcatgagcgc 450 ggcgcctccg gaggccagac tttccactcc ttgctcacag cctc cctgcc 500 gccccgccga gacagcacag aggcacccaa accaaagagc agcccagagc 550 agcccatagg ccagggccgg attcgggtgg ggacccagct ccgggtgctg 600 ggccctgagg acgacctggc tggcatgttc ctccagattt tcccgctcag 650 cccggaccct cggtg gcaga gctccagtcc ccgccccgtg gccctcgccc 700 tgcagcaggc cctgggccag gagctggccc gcgtcgtcca gggcagcccc 750 gaggtgccgg gcatcacggt gcgtgtcctg caggccctcg ccaccctgct 800 cagctcccca cacggcggtg ccctggtgat gtccatgcac cgtagccact 850 tcctggcctg cccgctgctg cgccagctct gccagtacca gcgctgtgtg 900 ccacaggaca ccggcttctc ctcgct cttc ctgaaggtgc tcctgcagat 950 gctgcagtgg ctggacagcc ctggcgtgga gggcgggccc ctgcgggcac 1000 agctcaggat gcttgccagc caggcctcag ccgggcgcag gctcagtgat 1050 gtgcgagggg ggctcctgcg cctggccgag gccctggcct tccgtcagga 1100 cctggaggtg gtcagctcca ccgtccgtgc cgtcatcgcc accctgaggt 1150 ctggggagca gtgcagcgtg gagccggacc tga tcagcaa agtcctccag 1200 gggctgatcg aggtgaggtc cccccacctg gaggagctgc tgactgcatt 1250 cttctctgcc actgcgg atg ctgcctcccc gtttccagcc tgtaagcccg 1300 ttgtggtggt gagctccctg ctgctgcagg aggaggagcc cctggctggg 1350 gggaagccgg gtgcggacgg tggcagcctg gaggccgtgc ggctggggcc 1400 ctcgtcaggc ctcctagtgg actggctgga aatgctggac cccgaggtgg 1450 tcagcagctg ccccgacctg cagctcaggc tgctcttctc ccggaggaag 1500 ggcaaaggtc aggcccaggt gcc ctcgttc cgtccctacc tcctgaccct 1550 cttcacgcat cagtccagct ggcccacact gcaccagtgc atccgagtcc 1600 tgctggg caa gagccgggaa cagaggttcg acccctctgc ctctctggac 1650 ttcctctggg cctgcatcca tgttcctcgc atctggcagg ggcggg acca 1700 gcgcaccccg cagaagcggc gggaggagct ggtgctgcgg gtccagggcc 1750 cggagctcat cagcctggtg gagctgatcc tggccgaggc ggagacgcgg 1800 agccaggacg gggacacagc cgcctgcagc ctcatccagg cccggctgcc 1850 cctgctgctc agc tgctgct gtggggacga tgagagtgtc aggaaggtga 1900 cggagcacct gtcaggctgc atccagcagt ggggagacag cgtgctggga 19 50 aggcgctgcc gagaccttct cctgcagctc tacctacagc ggccggagct 2000 gcgggtgccc gtgcctgagg tcctactgca cagcga aggg gctgccagca 2050 gcagcgtctg caagctggac ggactcatcc accgcttcat cacgctcctt 2100 gcggacacca gcgactcccg ggcgttggag aaccgagggg cggatgccag 2150 catggcctgc cggaagctgg cggtggcgca cccgctgctg ctgctcaggc 2200 acc tgcccat gatcgcggcg ctcctgcacg gccgcaccca cctcaacttc 2250 caggagttcc ggcagcagaa ccacctgagc tgcttcctgc ac gtgctggg 2300 cctgctggag ctgctgcagc cgcacgtgtt ccgcagcgag caccaggggg 2350 cgctgtggga ctgccttctg tccttc atcc gcctgctgct gaattacagg 2400 aagtcctccc gccatctggc tgccttcatc aacaagtttg tgcagttcat 2450 ccataagtac attacctaca atgccccagc agccatctcc ttcctgcaga 2500 agcacgccga cccgctccac gacctgtcct tcgacaacag tgacctggt g 2550 atgctgaaat ccctccttgc agggctcagc ctgcccagca gggacgacag 2600 gaccgaccga ggcctggacg aagagggcga gg aggagagc tcagccggct 2650 ccttgcccct ggtcagcgtc tccctgttca cccctctgac cgcggccgag 2700 atggcccccc acatga aacg gctttcccgg ggccaaacgg tggaggatct 2750 gctggaggtt ctgagtgaca tagacgagat gtcccggcgg agacccgaga 2800

tcctgagctt cttctcgacc aacctgcagc ggctgatgag ctcggccgag 2850 gagtgttgcc gcaacctcgc cttcagcctg gccctgcgc t ccatgcagaa 2900 cagccccagc attgcagccg ctttcctgcc cacgttcatg tactgcctgg 2950 gcagccagga ctttgaggtg gt gcagacgg ccctccggaa cctgcctgag 3000 tacgctctcc tgtgccaaga gcacgcggct gtgctgctcc accgggcctt 3050 cctggt gggc atgtacggcc agatggaccc cagcgcgcag atctccgagg 3100 ccctgaggat cctgcatatg gaggccgtga tgtgagcctg tggca gccga 3150 ccccccctcca agccccggcc cgtcccgtcc ccggggatcc tcgaggcaaa 3200 gcccaggaag cgtgggcgtt gctggtctg t ccgaggaggt gagggcgccg 3250 agccctgagg ccaggcaggc ccaggagcaa tactccgagc cctggggtgg 3300 ctccgggccg gc cgctggca tcaggggccg tccagcaagc cctcattcac 3350 cttctgggcc acagccctgc cgcggagcgg cggatccccc cgggcatggc 3 400 ctgggctggt tttgaatgaa acgacctgaa ctgtcaa 3437 <210> 22 <211> 1029 <212> PRT <213> Homo sapiens <400 > 22 Met His Ile Leu Val Val His Ala Met Val Ile Leu Leu Thr Leu 1 5
10 15 Gly Pro Pro Arg Ala Asp Asp Ser Glu Phe Gln Ala Leu Leu Asp 20
25 30 Ile Trp Phe Pro Glu Glu Lys Pro Leu Pro Thr Ala Phe Leu Val
35 40 45 Asp Thr Ser Glu Glu Ala Leu Leu Leu Pro Asp
Trp Leu Lys Leu 50 55 60 Arg Met Ile Arg Ser Glu Va
l Leu Arg Leu Val Asp Ala Ala Leu 65 70 75 Gln Asp
Leu Glu Pro Gln Gln Leu Leu Leu Phe Val Gln Ser Phe 80 85
90 Gly Ile Pro Val Ser Ser Met Ser Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asp 95
100 105 Gln Ala Val Ala His Asp Pro Gln Thr Leu Glu Gln Asn Ile Met
110 115 120 Asp Lys Asn Tyr Met Ala His Leu Val Glu Val Gln His Glu Ar
g 125 130 135 Gly Ala Ser Gly Gly Gln Thr Phe His Ser
Leu Leu Thr Ala Ser 140 145 150 Leu Pro Pro Arg Arg As
p Ser Thr Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ser 155 160 165 Ser
Pro Glu Gln Pro Ile Gly Gln Gly Arg Ile Arg Val Gly Thr 170 175
180 Gln Leu Arg Val Leu Gly Pro Glu Asp Asp Leu Ala Gly Met Phe 185
190 195 Leu Gln Ile Phe Pro Leu Ser Pro Asp Pro Arg Trp Gln Ser Ser
200 205 210 Ser Pro Arg Pro Val Ala Leu Ala Leu Gln Gln Ala Leu Gl
y Gln 215 220 225 Glu Leu Ala Arg Val Val Gln Gly Ser
Pro Glu Val Pro Gly Ile 230 235 240 Thr Val Arg Val Le
u Gln Ala Leu Ala Thr Leu Leu Ser Ser Pro 245 250 255
His Gly Gly Ala Leu Val Met Ser Met His Arg Ser His Phe Leu 260 265
270 Ala Cys Pro Leu Leu Arg Gln Leu Cys Gln Tyr Gln Arg Cys Val 275
280 285 Pro Gln Asp Thr Gly Phe Ser Ser Leu Phe Leu Lys Val Leu Leu
290 295 300 Gln Met Leu Gln Trp Leu Asp Ser Pro Gly Val Glu Gl
y Gly Pro 305 310 315 Leu Arg Ala Gln Leu Arg Met Leu
Ala Ser Gln Ala Ser Ala Gly 320 325 330 Arg Arg Leu Se
r Asp Val Arg Gly Gly Leu Leu Arg Leu Ala Glu 335 340 3
45 Ala Leu Ala Phe Arg Gln Asp Leu Glu Val Val Ser Ser Thr Val 350 355
360 Arg Ala Val Ile Ala Thr Leu Arg Ser Gly Glu Gln Cys Ser Val 365
370 375 Glu Pro Asp Leu Ile Ser Lys Val Leu Gln Gly Leu Ile Glu Val
380 385 390 Arg Ser Pro His Leu Glu Glu Leu Leu Thr Ala Ph
e Phe Ser Ala 395 400 405 Thr Ala Asp Ala Ala Ser Pro
Phe Pro Ala Cys Lys Pro Val Val 410 415 420 Val Val Se
r Ser Leu Leu Leu Gln Glu Glu Glu Pro Leu Ala Gly 425 430
435 Gly Lys Pro Gly Ala Asp Gly Gly Ser Leu Glu Ala Val Arg Leu 440
445 450 Gly Pro Ser Ser Gly Leu Leu Val Asp Trp Leu Glu Met Leu Asp 4
55 460 465 Pro Glu Val Val Ser Ser Cys Pro Asp Leu Gln Leu Arg Leu Leu
470 475 480 Phe Ser Arg Arg Lys Gly Lys Gly Gln Ala Gl
n Val Pro Ser Phe 485 490 495 Arg Pro Tyr Leu Leu Thr
Leu Phe Thr His Gln Ser Ser Trp Pro 500 505 510 Thr Le
u His Gln Cys Ile Arg Val Leu Leu Gly Lys Ser Ag Glu 515 520 52
Asp Phe Leu Trp Ala Cys 530 535 540 Ile His Val Pro Ar
g Ile Trp Gln Gly Arg Asp Gln Arg Thr Pro 545 550 555
Gln Lys Arg Arg Glu Glu Leu Val Leu Arg Val Gln Gly Pro Glu 560 565
570 Leu Ile Ser Leu Val Glu Leu Ile Leu Ala Glu Ala Glu Thr Arg 575
580 585 Ser Gln Asp Gly Asp Thr Ala Ala Cys Ser Leu Ile Gln Ala Arg
590 595 600 Leu Pro Leu Leu Leu Ser Cys Cys Cys Gly Asp Asp Gl
u Ser Val 605 610 615 Arg Lys Val Thr Glu His Leu Ser
Gly Cys Ile Gln Gln Trp Gly 620 625 630 Asp Ser Val Le
u Gly Arg Arg Cys Arg Asp Leu Leu Leu Gln Leu 635 640 6
45 Tyr Leu Gln Arg Pro Glu Leu Arg Val Pro Val Pro Glu Val Leu 650 655

660 Leu His Ser Glu Gly Ala Ala Ser Ser Ser Val Cys Lys Leu Asp 665
670 675 Gly Leu Ile His Arg Phe Ile Thr Leu Leu Ala Asp Thr Ser Asp
680 685 690 Ser Arg Ala Leu Glu Asn Arg Gly Ala Asp Ala Se
r Met Ala Cys 695 700 705 Arg Lys Leu Ala Val Ala His
Pro Leu Leu Leu Leu Arg His Leu 710 715 720 Pro Met Il
e Ala Ala Leu Leu His Gly Arg Thr His Leu Asn Phe 725 730
735 Gln Glu Phe Arg Gln Gln Asn His Leu Ser Cys Phe Leu His Val 740
745 750 Leu Gly Leu Leu Glu Leu Leu Gln Pro His Val Phe Arg Ser Glu 7
55 760 765 His Gln Gly Ala Leu Trp Asp Cys Leu Leu Ser Phe Ile Arg Leu
770 775 780 Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Ser Ser Arg His Le
u Ala Ala Phe Ile 785 790 795 Asn Lys Phe Val Gln Phe
Ile His Lys Tyr Ile Thr Tyr Asn Ala 800 805 810 Pro Al
a Ala Ile Ser Phe Leu Gln Lys His Ala Asp Pro Leu His 815 820
825 Asp Leu Ser Phe Asp Asn Ser Asp Leu Val Met Leu Lys Ser Leu 830
835 840 Leu Ala Gly Leu Ser Leu Pro Ser Arg Asp Asp Arg Thr Asp Arg
845 850 855 Gly Leu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Ser Ser Ala Gly Ser
Leu 860 865 870 Pro Leu Val Ser Val Ser Leu Phe Thr Pr
o Leu Thr Ala Ala Glu 875 880 885 Met Ala Pro Tyr Met
Lys Arg Leu Ser Arg Gly Gln Thr Val Glu 890 895 900 As
p Leu Leu Glu Val Leu Ser Asp Ile Asp Glu Met Ser Arg Arg 905 910
915 Arg Pro Glu Ile Leu Ser Phe Phe Ser Thr Asn Leu Gln Arg Leu 920
925 930 Met Ser Ser Ala Glu Glu Cys Cys Arg Asn Leu Ala Phe Ser Leu
935 940 945 Ala Leu Arg Ser Met Gln Asn Ser Pro Ser Ile Ala Ala
Ala Phe 950 955 960 Leu Pro Thr Phe Met Tyr Cys Leu Gl
y Ser Gln Asp Phe Glu Val 965 970 975 Val Gln Thr Ala
Leu Arg Asn Leu Pro Glu Tyr Ala Leu Leu Cys 980 985 990
Gln Glu His Ala Ala Val Leu Leu His Arg Ala Phe Leu Val Gly 995 1000
1005 Met Tyr Gly Gln Met Asp Pro Ser Ala Gln Ile Ser Glu Ala Leu 1010
1015 1020 Arg Ile Leu His Met Glu Ala Val Met 1025

1029 <210> 23 <211> 2186 <212> DNA <213> Homo sapiens <400> 23 ccgggccatg cagcctcggc cccgcgggcg cccgc
cgcgc acccgaggag 50 atgaggctcc gcaatggcac cttcctgacg ctgctgctct tctgcctgtg 100 cgccttcctc tcgctgtcct g
gtacgcggc actcagcggc cagaaaggcg 150 acgttgtgga cgtttaccag cgggagttcc tggcgctgcg cgatcggttg 200 cacgcag
ctg agcaggagag cctcaagcgc tccaaggagc tcaacctggt 250 gctggacgag atcaagaggg ccgtgtcaga aaggcaggcg ctgcgag
acg 300 gagacggcaa tcgcacctgg ggccgcctaa cagaggaccc ccgattgaag 350 ccgtggaacg gctcacaccg gcacgtgctg ca
cctgccca ccgtcttcca 400 tcacctgcca cacctgctgg ccaaggagag cagtctgcag cccgcggtgc 450 gcgtgggcca gggccgca
cc ggagtgtcgg tggtgatggg catcccgagc 500 gtgcggcgcg aggtgcactc gtacctgact gacactctgc actcgctcat 550 ctc
cgagctg agcccgcagg agaaggagga ctcggtcatc gtggtgctga 600 tcgccgagac tgactcacag tacacttcgg cagtgacaga gaa
catcaag 650 gccttgttcc ccacggagat ccattctggg ctcctggagg tcatctcacc 700 ctccccccac ttctaccctg acttctccc
g cctccgagag tcctttgggg 750 accccaagga gagagtcagg tggaggacca aacagaacct cgattactgc 800 ttcctcatga tgta
cgcgca gtccaaaggc atctactacg tgcagctgga 850 ggatgacatc gtggccaagc ccaactacct gagcaccatg aagaactttg 900
cactgcagca gccttcagag gactggatga tcctggagtt ctcccagctg 950 ggcttcattg gtaagatgtt caagtcgctg gacctgagcc
tgattgtaga 1000 gttcattctc atgttctacc gggacaagcc catcgactgg ctcctggacc 1050 atattctgtg ggtgaaagtc tgc
aaccccg agaaggatgc gaagcactgt 1100 gaccggcaga aagccaacct gcggatccgc ttcaaaccgt ccctcttcca 1150 gcacgtg
ggc actcactcct cgctggctgg caagatccag aaactgaagg 1200 acaaagactt tggaaagcag gcgctgcgga aggagcatgt gaaccc
gcca 1250 gcagaggtga gcacgagcct gaagacatac cagcacttca ccctggagaa 1300 agcctacctg cgcgaggact tcttctgggc
cttcacccct gccgcggggg 1350 acttcatccg cttccgcttc ttccaacctc taagactgga gcggttcttc 1400 ttccgcagtg gga
acatcga gcacccggag gacaagctct tcaacacgtc 1450 tgtggaggtg ctgcccttcg acaaccctca gtcagacaag gaggccctgc 15
00 aggagggccg caccgccacc ctccggtacc ctcggagccc cgacggctac 1550 ctccagatcg gctccttcta caagggagtg gcagag
ggag aggtggaccc 1600 agccttcggc cctctggaag cactgcgcct ctcgatccag acggactccc 1650 ctgtgtgggt gattctgagc
gagatcttcc tgaaaaaggc cgactaagct 1700 gcgggcttct gagggtaccc tgtggccagc cctgaagccc acatttctgg 1750 ggg
tgtcgtc actgccgtcc ccggagggcc agatacggcc ccgcccaaag 1800 ggttctgcct ggcgtcgggc ttgggccggc ctggggtccg cc
gctggccc 1850 ggaggcccta ggagctggtg ctgcccccgc ccgccgggcc gcggaggagg 1900 caggcggccc ccacactgtg cctgag
gccc ggaaccgttc gcacccggcc 1950 tgccccagtc aggccgtttt agaagagctt ttacttgggc gcccgccgtc 2000 tctggcgcga
acactggaat gcatatacta ctttatgtgc tgtgtttttt 2050 attcttggat acatttgatt ttttcacgta agtccacata tacttctat
a 2100 agagcgtgac ttgtaataaa gggttaatga agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2150 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa
aaaa 2186 <210> 24 <211> 548 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 24 Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Phe Leu
Thr Leu Leu Leu Phe Cys 1 5 10 15 Leu Cys Ala Phe Le
u Ser Leu Ser Trp Tyr Ala Ala Leu Ser Gly 20 25 30
Gln Lys Gly Asp Val Val Asp Val Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala 35 40

45 Leu Arg Asp Arg Leu His Ala Ala Glu Gln Glu Ser Leu Lys Arg 50
55 60 Ser Lys Glu Leu Asn Leu Val Leu Asp Glu Ile Lys Arg Ala Val
65 70 75 Ser Glu Arg Gln Ala Leu Arg Asp Gly Asp Gly Asn Ar
g Thr Trp 80 85 90 Gly Arg Leu Thr Glu Asp Pro Arg
Leu Lys Pro Trp Asn Gly Ser 95 100 105 His Arg His Va
l Leu His Leu Pro Thr Val Phe His His Leu Pro 110 115 1
20 His Leu Leu Ala Lys Glu Ser Ser Leu Gln Pro Ala Val Arg Val 125 130
135 Gly Gln Gly Arg Thr Gly Val Ser Val Val Met Gly Ile Pro Ser 140
145 150 Val Arg Arg Glu Val His Ser Tyr Leu Thr Asp Thr Leu His Ser
155 160 165 Leu Ile Ser Glu Leu Ser Pro Gln Glu Lys Glu As
p Ser Val Ile 170 175 180 Val Val Leu Ile Ala Glu Thr
Asp Ser Gln Tyr Thr Ser Ala Val 185 190 195 Thr Glu As
n Ile Lys Ala Leu Phe Pro Thr Glu Ile His Ser Gly 200 205
210 Leu Leu Glu Val Ile Ser Pro Ser Pro His Phe Tyr Pro Asp Phe 215
220 225 Ser Arg Leu Arg Glu Ser Phe Gly Asp Pro Lys Glu Arg Val Arg 2
30 235 240 Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr
245 250 255 Ala Gln Ser Lys Gly Ile Tyr Tyr Val Gln Le
u Glu Asp Asp Ile 260 265 270 Val Ala Lys Pro Asn Tyr
Leu Ser Thr Met Lys Asn Phe Ala Leu 275 280 285 Gln Gl
n Pro Ser Glu Asp Trp Met Ile Leu Glu Phe Ser Gln Leu 290 295
300 Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Lys Ser Leu Asp Leu Ser Leu Ile 305
310 315 Val Glu Phe Ile Leu Met Phe Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Asp Trp
320 325 330 Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro Glu
Lys 335 340 345 Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Al
a Asn Leu Arg Ile Arg 350 355 360 Phe Lys Pro Ser Leu
Phe Gln His Val Gly Thr His Ser Ser Leu 365 370 375 Al
a Gly Lys Ile Gln Lys Leu Lys Asp Lys Asp Phe Gly Lys Gln 380 385
390 Ala Leu Arg Lys Glu His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr 395
400 405 Ser Leu Lys Tr Tyr Gln His Phe Thr Leu Glu Lys Ala Tyr Leu 41
20 Arg Glu Asp Phe Phe Trp Ala Phe Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe 425 430
435 Ile Arg Phe Arg Phe Phe Gln Pro Leu Arg Leu Glu Arg Phe Phe 440
445 450 Phe Arg Ser Gly Asn Ile Glu His Pro Glu Asp Lys Leu Phe Asn
455 460 465 Thr Ser Val Glu Val Leu Pro Phe Asp Asn Pro Gl
n Ser Asp Lys 470 475 480 Glu Ala Leu Gln Glu Gly Arg
Thr Ala Thr Leu Arg Tyr Pro Arg 485 490 495 Ser Pro As
p Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Ser Phe Tyr Lys Gly Val 500 505
510 Ala Glu Gly Glu Val Asp Pro Ala Phe Gly Pro Leu Glu Ala Leu 515
520 525 Arg Leu Ser Ile Gln Thr Asp Ser Pro Val Trp Val Ile Leu Ser 5
30 535 540 Glu Ile Phe Leu Lys Lys Ala Asp 545
548 <210> 25 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-43 <223> Synth
etic Oligonucleotide Probe <400> 25 tgtaaaacga cggccagtta aatagacctg caattattaa tct 43 <210> 26 <211> 4
1 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-41 <223> Synthetic Oligonucleotide
Probe <400> 26 caggaaacag ctatgaccac ctgcacacct gcaaatccat t 41 <210> 27 <211> 19 <212> DNA <213> Artif
icial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-19 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 27 actcggg
att cctgctgtt 19 <210> 28 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-23
<223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 28 aggcctttac ccaaggccac aac 23 <210> 29 <211> 19 <212> DN
A <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-19 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400
> 29 ggcctgtcct gtgttctca 19 <210> 30 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequen
ce <222> 1-22 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 30 tcccaccact tacttccatg aa 22 <210> 31 <211>
25 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-25 <223> Synthetic Oligonucleotid
e Probe <400> 31 ctgtggtacc caattgccgc cttgt 25 <210> 32 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial <220> <221
> Artificial Sequence <222> 1-23 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 32 attgtcctga gattcgagca a
ga 23 <210> 33 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-18 <223> Synt
hetic Oligonucleotide Probe <400> 33 gtccagcaag ccctcatt 18 <210> 34 <211> 20 <212> DNA <213> Artificia
l <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-20 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 34 cttctgggcc
acagccctgc 20 <210> 35 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-21 <2
23> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 35 cagttcaggt cgtttcattc a 21 <210> 36 <211> 19 <212> DNA <21
3> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-19 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 36
ccagtcaggc cgttttaga 19 <210> 37 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <2

22> 1-21 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 37 cgggcgccca agtaaaagct c 21 <210> 38 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial <220> <221> Artificial Sequence <222> 1-28 <223> Synthetic Oligonucleotide Probe <400> 38 cataaagtag tatatgcatt ccagtgtt 28