



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월07일
(11) 등록번호 10-0820526
(24) 등록일자 2008년04월01일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2002-7002840
(22) 출원일자 2002년03월02일
심사청구일자 2005년08월30일
번역문제출일자 2002년03월02일
(65) 공개번호 10-2002-0059386
(43) 공개일자 2002년07월12일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2000/000517
국제출원일자 2000년08월31일
(87) 국제공개번호 WO 2001/16314
국제공개일자 2001년03월08일
(30) 우선권주장
131719 1999년09월02일 이스라엘(IL)
(56) 선행기술조사문헌
WO1997037016 A1
KR1020000005204 A
전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자
에다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 76100 피.오. 박스 95 웨이즈
만 인스티튜트 오브 사이언스
(72) 발명자
왈라치, 데이비드
이스라엘, 레호보트76406, 보로초브스트리트24
말리닌, 니콜라이
미국, 매사추세츠02446,
브룩클린, 코울릿스트리트88
(뒀면에 계속)
(74) 대리인
강명구, 강석용

심사관 : 김정희

(54) I R E N 단백질, 이의 제조 및 용도

(57) 요약

TRAF 결합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열, 이에 의해 인코딩되는 단백질 및 NF-κB 유도, 또는 TRAF에 의해 매개된 활성화와 관련된 병리학적 이상의 치료나 예방에서 이들의 용도를 제공한다.

대표도 - 도3b

ATG AGC GGA TCA CAG AAC AAT GAC AAA AGA GAA TTT CTG CTG GAG GGA CTG CTG GAT GCA
 811
 ATT AAA GAG TCC CAG ATE GGC TTT GAA GGA AGG GAG ATT GGC TCG GAT TCC GAC AGC
 812
 GCG CTC AAC TGT CTG TGT GCG GAG TTT GAA GCG GCG CTC CAG GAT GCG GCG TTA AAG AGG AGT
 813
 GGA GGA TTG GGA CTC ACA GCG GCA GCG ATC GCG CAG GCA GCG GCG TTT GCG AGC AAA ACC
 814
 GAA AAA GAG GCG GTC TTT TCG TAC TAC GTC GAG GTC CTC AAC AAG GAC GAG CTG GAG
 815
 GAA AAA GAG GCG GTC TTT TCG TAC TAC GTC GAG GTC CTC AAC AAG GAC GAG CTG GAG
 816
 TTT TAC TCC CTG GCG CAC ATC GCG TCA GAG CTG GCG GCG GGT GCG GCG TGG CTG GCG
 817
 TGT GCG CTC AAC GAA CAC TCC CTG GAG GCG TAC CTG GAC ATG CTC CTG GCG GCG GCG TCG
 818
 AGC CTG AGC ACT TTT TAT GAA GAG TGG TCT TTT CTG ATG GAT GAA GAA AGC TCG AGT ATG
 819
 GCG CTT ACC ACG GGA GGA GGT CTG AAC TCC GCG CTC TTT GCG ATP AAC ATG GAC AAC AAG
 820
 ATT AAC GCG CAG AGT AAG TTT GCT GCG GCG CTT TCA GAC CTC TTA AAG GAG TCA AGC
 821
 GAG AAC CTG ACC TCC TTG CTG AAG GAG TCC AGC GAA GGA CTG AGC AGC CTG TTC AGC GAG
 822
 AAC GCG TCC TCT GCG CTC TCC ATC CTC ATT AAA CCG GAA CAG AGC GAC GCG GCG TTG
 823
 TTT CTG TCC AGG AAT GTC AGT GCT GAT GCG AAA TCC AAA AAG GAG GCG AAG AAG AAA
 824
 AAG AAA CTG ACC AAG ATA ATE TCA TTT GAA GCG GAG GAA GAT GAG CAG AAG TCT GCG GAG
 825
 CTG TTT AAG AAG ACA CCG GCG GCA GCG GAG AAC TCA GAG GAC AAC TCC GAC GCG TCC TCT
 826
 GCG AAT ATC ATG TCC GCG TTT GAA AGC CTC GCG GCG GCG AAC TCC AAT GGA AGT CAG AGC
 827
 AGC AAC TCA TGG AAA ATT GAT TCC CTG TCT TCT GAA GCG GAG TTT GCG TAC CAG AAG CTT
 828
 GAT CTG AAA AGC ATC GAT GAT GAA GAT CTG GAT GAA AAC GAA GAT GAC CTG TAT GGA AAC
 829
 TCA TCA GGA AGG AAG CAG AGG GCG CAG TCG GAG TCG CCG GAG AAG CCA CTG GAA GCG AAC
 830
 ATG TCC CTC TCC CAG ATG CAG AAC TGG GGT GCG GCG AAG GTC CTC CAG AAT GAG TCC GAC
 831
 ATC CTC TCC CCG CTC AGT GCG CTG GCG TCC TCC AAC CCA GGA GAT GCG GCG CTC GGA AGC
 832
 CTG GAG AAC GCG ACA GGA CCA GAG GAC CAC GCG GCG GCG GAT CCG GAT CCG GAT CCG TAC AGT
 833
 TTT GAA GCG AGC TCT GGA GCG CAG GAA AAT CCG CTC AGC AGC CTG TTA CCG TCT GCG TCA
 834
 CTG CCA GAG TCC ATG AAG ATT AGT GAA CTG GCG GCG GCG ACT CTG GCG ATG AAG AGG
 835
 AAG GAT AAG CTG GAG GAG GAG AAG AAG TCA CCG GAA AAC CTC GAC GCG GCG GCG AAG GAG
 836
 GCG TCA GCG GCG CTC GCG GAG GAG GAG GAG GCG
 837
 GCG
 838
 GCG
 839
 GCG
 840
 GCG
 841
 GCG
 842
 GCG
 843
 GCG
 844
 GCG
 845
 GCG
 846
 GCG
 847
 GCG
 848
 GCG
 849
 GCG
 850
 GCG
 851
 GCG
 852
 GCG
 853
 GCG
 854
 GCG
 855
 GCG
 856
 GCG
 857
 GCG
 858
 GCG
 859
 GCG
 860
 GCG
 861
 GCG
 862
 GCG
 863
 GCG
 864
 GCG
 865
 GCG
 866
 GCG
 867
 GCG
 868
 GCG
 869
 GCG
 870
 GCG
 871
 GCG
 872
 GCG
 873
 GCG
 874
 GCG
 875
 GCG
 876
 GCG
 877
 GCG
 878
 GCG
 879
 GCG
 880
 GCG
 881
 GCG
 882
 GCG
 883
 GCG
 884
 GCG
 885
 GCG
 886
 GCG
 887
 GCG
 888
 GCG
 889
 GCG
 890
 GCG
 891
 GCG
 892
 GCG
 893
 GCG
 894
 GCG
 895
 GCG
 896
 GCG
 897
 GCG
 898
 GCG
 899
 GCG
 900
 GCG
 901
 GCG
 902
 GCG
 903
 GCG
 904
 GCG
 905
 GCG
 906
 GCG
 907
 GCG
 908
 GCG
 909
 GCG
 910
 GCG
 911
 GCG
 912
 GCG
 913
 GCG
 914
 GCG
 915
 GCG
 916
 GCG
 917
 GCG
 918
 GCG
 919
 GCG
 920
 GCG
 921
 GCG
 922
 GCG
 923
 GCG
 924
 GCG
 925
 GCG
 926
 GCG
 927
 GCG
 928
 GCG
 929
 GCG
 930
 GCG
 931
 GCG
 932
 GCG
 933
 GCG
 934
 GCG
 935
 GCG
 936
 GCG
 937
 GCG
 938
 GCG
 939
 GCG
 940
 GCG
 941
 GCG
 942
 GCG
 943
 GCG
 944
 GCG
 945
 GCG
 946
 GCG
 947
 GCG
 948
 GCG
 949
 GCG
 950
 GCG
 951
 GCG
 952
 GCG
 953
 GCG
 954
 GCG
 955
 GCG
 956
 GCG
 957
 GCG
 958
 GCG
 959
 GCG
 960
 GCG
 961
 GCG
 962
 GCG
 963
 GCG
 964
 GCG
 965
 GCG
 966
 GCG
 967
 GCG
 968
 GCG
 969
 GCG
 970
 GCG
 971
 GCG
 972
 GCG
 973
 GCG
 974
 GCG
 975
 GCG
 976
 GCG
 977
 GCG
 978
 GCG
 979
 GCG
 980
 GCG
 981
 GCG
 982
 GCG
 983
 GCG
 984
 GCG
 985
 GCG
 986
 GCG
 987
 GCG
 988
 GCG
 989
 GCG
 990
 GCG
 991
 GCG
 992
 GCG
 993
 GCG
 994
 GCG
 995
 GCG
 996
 GCG
 997
 GCG
 998
 GCG
 999
 GCG
 1000
 GCG GCG

(72) 발명자

신하, 인드라닐

이스라엘, 레호보트76100, 룸13, 베이트케네디, 웨이즈
만인스티튜트오브사이언스

데우, 스테판

이스라엘, 85112, 모샤브마슬롤7

(81) 지정국

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

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

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

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

TRAF에 결합할 수 있는 단백질을 인코딩하는 다음의 DNA 서열중에서 선택된 하나의 DNA 서열.

- (a) SEQ ID No. 4의 뉴클레오티드 서열로 구성된 cDNA; 이때, 이 서열을 IREN으로 명명함;
- (b) SEQ ID No. 5의 뉴클레오티드 서열로 구성된 cDNA; 이때, 이 서열을 IREN-10B으로 명명함; 또는
- (c) SEQ ID No. 6의 뉴클레오티드 서열로 구성된 cDNA; 이때, 이 서열을 IREN-E으로 명명함.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 따른 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 11

제 10항에 있어서, 진핵 숙주세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 12

제 10항에 있어서, 원핵 숙주세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 13

제 10 항에 따른 벡터를 보유하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 원핵 또는 진핵 숙주세포.

청구항 14

제 1항에 따른 DNA 서열에 의해 인코딩되며, TRAF2의 아미노산 225 내지 501사이에 결합하는 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 15

제 14항에 있어서, 다음의 아미노산 서열중 하나로 구성된 단백질.

- a) SEQ ID No. 7의 아미노산 서열로 구성된 단백질;
- b) SEQ ID No. 8의 아미노산 서열로 구성된 단백질;
- c) SEQ ID No. 9의 아미노산 서열로 구성된 단백질.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

단백질이 발현될 수 있는 통상의 조건하에 제 13 항에 따른 형질변환된 숙주 세포를 생장시키고, 전사후 변형 (post-translational modification) 후에, 발현된 단백질을 수득하는 단계로 구성된 제 15 항에 따른 단백질을 생산하는 방법.

청구항 21

제 15항의 단백질에 특이적인 항체.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

TRAF2와 바로 결합할 수 있는 제 15 항에 따른 단백질을 분리 및 확인하는 방법에 있어서,
효모 이중-하이브리드(yeast two hybrid) 과정을 이용하는데, 이때, TRAF2를 인코딩하는 서열은 제1 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리의 서열은 제2 하이브리드 벡터에 의해 운반되며,
효모 숙주세포를 상기 벡터들로 형질전환시키고,

양성(positive)으로 형질전환된 세포를 분리하고,

제2 하이브리드 벡터를 추출하여 TRAF2에 결합하는 단백질을 인코딩하는 서열을 수득하는 단계로 구성된 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

제 15항에 따른 단백질과 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하는 방법에 있어서,

제15항에 따른 단백질이 부착되는 친화성(affinity) 크로마토그래피 매트릭스를 세포 추출물과 접촉시키고, 이때, 리간드는 상기 매트릭스와 결합하고, 상기 리간드를 용출하고, 분리하고, 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 15항에 따른 단백질과 결합할 수 있는 리간드를 코딩하는 DNA 서열을 스크리닝하는 방법에 있어서,

효모 이중-하이브리드(yeast two hybrid) 과정을 이용하는데, 이때, 제15항에 따른 단백질을 인코딩하는 서열은

제 1 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리의 서열은 제2 하이브리드 벡터에 의해 운반되며,

효모 숙주세포를 상기 벡터로 형질전환시키고,

양성(positive)으로 형질전환된 세포를 분리하고, 제2 하이브리드 벡터를 추출하여 상기 리간드를 인코딩하는 서열을 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

TRAF2에 의해 조절 또는 매개되는 세포내 활성을 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법에 있어서,

- a) TRAF2의 아미노산 잔기 225-501을 보유하는 폴리펩티드와 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하고;
- b) 결합이 이루어진 리간드를 확인하고 이때 공지의 TRAF2 또는 TNF/NGF 수용체군에 대한 리간드는 배제되며;
- c) (b)의 리간드를 분리 정제된 형태로 생산하는 단계의 방법.

청구항 43

청구항 14항의 단백질에 의해 조절 또는 매개되는 세포내 활성을 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법에 있어서,

- a) SEQ ID No. 7의 서열에 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하고;
- b) 결합이 이루어진 리간드를 확인하고 이때 공지의 TRAF2 또는 TNF/NGF 수용체군에 대한 리간드는 배제되며;
- c) (b)의 리간드를 분리 정제된 형태로 생산하는 단계의 방법.

청구항 44

청구항 1항의 a)에서 정의된 단백질 IREN에 의해 조절 또는 매개되는 세포내 활성을 직간접적으로 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법에 있어서,

- a) SEQ ID No. 7의 서열에 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하고;
- b) 결합이 이루어진 리간드를 확인하고 이때 공지의 TRAF2 또는 TNF/NGF 수용체군에 대한 리간드는 배제되며;
- c) (b)의 리간드를 분리 정제된 형태로 생산하는 단계의 방법.

청구항 45

청구항 14항의 단백질에 의해 조절 또는 매개되는 세포내 활성을 직간접적으로 조절할 수 있는 분자를 확인 및 생산하는 방법에 있어서,

- a) 제14항에 따른 단백질에 의해 조절 또는 매개되는 활성을 조절할 수 있는 분자를 스크리닝하고;
- b) (a)에서 스크리닝된 분자를 확인 및 특성화하고;
- c) (b)의 리간드를 분리 정제된 형태로 생산하는 단계의 방법.

청구항 46

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 TNF 수용체 관련된 인자(TRAF) 결합단백질을 인코딩하는 DNA에 관한다. 좀더 구체적으로, 이는 TRAF2에 결합할 수 있고 본원에서 IREN으로 명시된 생물학적 활성단백질 및 이의 동소체를 인코딩하는 cDNA 서열에 관한다. 또한, 본 발명은 상기 DNA에 의해 인코딩되는 단백질 및 NF-κB 유도, 또는 TRAF2 혹은 이런 단백질이 결합하는 다른 분자에 의해 매개되는 임의 다른 활성과 관련된 병리질환의 치료나 예방에서 상기 단백질과 DNA 서열의 용도에 관한다.

배경 기술

- <2> 종양 피사 인자/신경 성장 인자(TNF/NGF) 수용체 대과는 포유동물에서 지금까지 확인된 20개이상의 원소를 가진다. TNF/NGF 수용체 대과가 세포의 도메인의 일차 서열에서 상이하긴 하지만, 이런 수용체 대과의 원소는 유사한 4차 구조를 보유하는 것으로 생각되는 시스테인-풍부한 부도메인을 공유한다(Bazan, 1993; Beutler and van Huffel, 1994; Smith et al., 1994). 2개의 수용체, 즉 p55 TNF 수용체와 Fas/APO1을 제외하고, 이런 수용체군의 원소는 다양한 구조적 차이를 보유할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 수용체간에 상당한 기능적 유사성이 존재하는데, 이는 이들이 공통의 신호 경로를 공유한다는 것을 시사한다. 이런 유사상의 한가지 예는 전사인자 NK- κ B를 활성화시키는 몇몇 TNF/NGF 수용체의 능력이다.
- <3> TRAF2는 확인된 몇몇 단백질, 예를 들면 TRAF1, TRAF2(Rothe, M., et al (1994); PCT 출원 W095/33051), TRAF3(Cheng, G. et a. 1995), TRAF4(CART1, RING 및 TRAF 도메인과 관련된 C-풍부한 모티프, Regnier et al. 1995), TRAF5(Ishida et al. 1996a, Nakano et al. 1996), TRAF6(Cao et al. 1996a, Ishida et al. 1996b)을 포함하고 최근에 TRAF(TNF 수용체 결합 인자)로 명시된 단백질군중 한 원소다. TRAF군에 속하는 모든 단백질은 C-말단 도메인에서 높은 아미노산 상동성을 공유하는 반면, N-말단 도메인은 무관할 수 있다. TRAF2의 개요도(도1)에서 도시한 바와 같이, 상기 분자는 N-말단에 하나의 고리 핑거 모티프와 2개의 TFIIIA-유사 아연 핑거 모티프를 보유한다. 상기 분자의 C-말단 절반은 아미노산 264-358에 이르는 잠재적 루이신 지퍼 영역을 보유하는 "TRAF 도메인"영역(N-TRAF)을 포함한다. 아미노산 359-501사이에서 상기 분자의 카르복시 말단방향으로 추가된 도메인(C-TRAF)은 동형- 또는 이형이량체를 형성하는 수용체 및 다른 TRAF 분자에 대한 TRAF 결합을 담당한다.
- <4> TRAF 어댑터 단백질은 수용체 분자를 세포질 도메인으로 동원하는데, 이는 상이한 TRAF 어댑터 분자 및 효소 활성을 지닌 다른 주효체 단백질로 구성되는 거대 시그널 복합체를 유발할 수 있다. 다수의 보고서에서, TRAF-의존한 신호 전달에 따른 세포내 키나아제의 활성화를 조사하였다. 특히, 유사분열물질-활성화된 단백질 키나아제(MAPK)군의 키나아제는 TRAF-보유 복합체로 의해 유발되는 신호 경로에 핵심 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이들 경로는 c-Jun 아미노-(N)-말단 키나아제(JNK) 활성화로 종결되는 것으로 생각된다(Reinhard et al. 1997; Song et al. 1997). 따라서, TRAF 단백질은 단백질 키나아제의 인산화와 활성화 및 이후 Rel과 AP-1군 전사인자의 활성을 유도하는 상이한 신호 경로를 자극하는 수용체의 능력을 조절할 수 있다.
- <5> c-Jun 전사인자는 MAPK 신호 경로의 가장 하류 원소인 JNK에 의해 아미노 말단에서 인산화된다(Hibi et al. 1993). JNK는 활성화되기 위하여, MAPK 키나아제(MAPKK, SEK, MEK)에 의해 인산화되어야 한다. 이런 키나아제 자체는 MAPKKK(MEKK1)에 의해 인산화되고, 이는 상기 공정에서 밝힌 가장 상류 키나아제인 GCKR(관련된 발아 중심 키나아제) 단백질에 의한 인산화를 통하여 활성화시킬 수 있다(Minden et al. 1994; Lin et al. 1995; Shi and Kehr1 1997). 키나아제 활성이 결핍된 이들 단백질중 임의 하나의 네거티브-우세한 돌연변이체는 TNF/NGFR 대과의 원소에 의해 유도되는 TRAF-매개된 JNK 활성화를 차단한다. 따라서, TRAF 단백질은 매우 근접 단계에서 JNK 활성화 경로를 조절하는 것으로 보인다(Liu et al. 1996; Lee et al. 1997; Reinhard et al. 1997). TRAF2-결핍된 생쥐의 세포는 TNF α 에 대한 반응으로 JNK를 활성화시키지 못한다(Yeh et al. 1997). JNK는 T 림프구의 활성화동안 CD28에 의한 보조-자극 신호의 통합을 매개하는 것으로 확인되었다(Su et al. 1994). 이들 결과는 TNFR-관련된 분자의 결합이후, CD28과 TRAF-매개된 동시-자극이 동일한 원거리 신호 성분을 활용한다는 것을 암시한다.
- <6> 또한, TRAF 단백질은 NK- κ B의 수용체-매개된 활성화에서 초기 단계를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다(Rothe et al. 1995b; Cao et al. 1996; Nakano et al. 1996). NF- κ B는 이량체 형태로 전사인자로 작용하는 Rel 종양유전자와 상동한 이량체-형성 단백질군의 원소다. 이들 인자는 편재하고, 다중 유전자의 발현의 발현조절에 참여한다. NF- κ B는 초기에 Igk 경쇄 발현 단계에서 B세포에 본질적으로 존재하는 인자로 확인되었는데, 이는 일차적으로 유도성 전사 활성물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 경우에, NF- κ B는 일차 인자로서 기능한다. 다시 말하면 활성의 유도는 NF- κ B 유전자를 작동시키는 유도성 전사인자에 의존하는 새로운 합성보다는 불활성 형태로 세포에 존재하는 기존 분자의 활성화에 의해 달성된다. NF- κ B의 효과는 매우 다면적이다. 대부분의 NF- κ B 활성화 약물은 바이러스와 박테리아 성분, 면역반응을 조절하는 사이토킨, UV광등을 비롯한 면역보호의 유도물질이다. 따라서, NF- κ B에 의해 조절되는 대부분의 유전자는 면역 보호에 기여한다(Blank et al., 1992; Grilli et al., 1993; Baeuerle and Henkel, 1994).
- <7> NF- κ B-조절의 한가지 주요 특징은 이런 인자가 세포질-비-DNA 결합형으로 발견될 수 있다는 것인데, 이것은 핵으로 이동하고 DNA에 결합하고 전사를 활성화시키도록 유도할 수 있다. 이런 이중 형태의 NF- κ B 단백질은 I- κ B - 적혈구 단백질 안키린에서 처음 확인된 도메인의 반복부위를 포함하는 단백질군으로 조절한다(Gilmore

and Morin, 1993). 비-자극 형태의 NF- κ B 이량체는 I- κ B 분자와 결합하여 발생하는데, 상기 분자는 NF- κ B-결합 DNA 서열과의 상호작용 및 전사 활성을 예방하는 세포질 국소화를 강제한다. NF- κ B 이량체로부터 I- κ B의 분리는 다수의 유도약물에 의한 중요 활성화 단계다(DiDonato et al., 1995). 다양한 NF- κ B-유도 약물에 대한 반응도와 관련하여 세포 특이성이 결정되는 방식은 지금까지 이해되지 않고 있다.

<8> TRAF 단백질이 수용체-매개된 NF- κ B 활성화에 영향을 줄 수 있다는 증거는 TRAF2의 네거티브 우세형이 TNFR II, CD40, CD30, 4-1BB, O \times 40(Rothe et al. 1994, 1995b; Duckett et al. 1997; Arch and Thompson 1998)을 비롯한 몇몇 TNFR-관련된 분자의 올리고머화에 반응하여 NF- κ B 활성화를 저해할 수 있다는 실험에 기초한다. 하지만, 생쥐의 유전자 제거 연구는 이들 수용체중 임의 하나에 의한 NF- κ B 활성화에서 특정 TRAF에 대하여 요구되는 역할을 연동시키는데 실패하였다(Lee et al. 1997; Yeh et al. 1997). 이는 수용체 연동이 한가지이상의 경로로 NF- κ B를 활성화시킨다는 것을 암시한다.

<9> NF- κ B의 가장 강력한 유도물질중의 하나는 사이토킨 종양 괴사 인자다(TNF). 2가지의 상이한 TNF 수용체: p55와 p75 수용체가 존재한다. 이들의 발현 수준은 세포간에 독립적으로 변화된다(Vandenabeele et al., 1995). p75 수용체는 TNF(TNF는 II형-막통 단백질과 가용성 단백질 모두로 발현된다)의 세포-결합형에 우선적으로 반응하고, p55 수용체는 가용성 TNF 분자에 효과적으로 반응한다(Grell et al., 1995). 2가지 수용체의 세포내 도메인은 구조적으로 무관하고, 상이한 세포질 단백질에 결합한다. 그럼에도 불구하고, TNF의 세포독성 효과 및 NF- κ B의 유도를 비롯한 TNF의 효과중 적어도 일부는 양 수용체에 의해 유도될 수 있다. 이의 특징은 세포 특이적이다. p55 수용체는 TNF에 반응하여 이런 효과를 보이는 모든 세포에서 세포독성 효과 또는 NF- κ B의 활성화를 유도할 수 있다. p75-R은 일부에서만 이런 효과를 가질 수 있다. 하지만, 높은 수준으로 p75-R을 발현하는 다른 수용체는 p55-R의 자극에만 반응하여 이런 효과를 유도한다(Vandenabeele et al., 1995). TNF 수용체와는 별개로, TNF/NGF 수용체 과(family)의 다양한 다른 수용체: CD30(McDonald et al., 1995), CD40(Berberich et al., 1994; Lalmanach-Girard et al., 1993), 림프톡신 베타 수용체 및 일부 세포에서 Fas/AP01(Rensing-Ehl et al., 1995) 역시 NF- κ B의 활성화를 유도할 수 있다. NF- κ B 활성화를 효과적으로 유인하는 IL-1 I형 수용체는 이들과 구조적 유사성이 없음에도 불구하고, TNF 수용체의 효과 대부분을 공유한다. IL-18 수용체 복합체의 신규한 수용체 하부단위가 최근에 클론되었는데, 이는 IL-18에 반응하여 NF- κ B 전치와 활성화를 유인하는 것으로 밝혀졌다(Born et al. 1998). IL-1Rrp 및 AcPL(Accessory Protein Like)로 명시된 IL-1 수용체군의 단백질 모두 IL-18 시그널링에 필요하다.

<10> 이들 다양한 수용체의 유인직후 NF- κ B의 활성화는 관련된 I- κ B 분자에 의해 유도된 인산화에 기인한다. 항염증 사이토킨 TNF- α 또는 IL-1 β 에 반응하여 활성화되는 특정 신호 전달 캐스케이드의 몇몇 성분이 최근에 확인되었다. NIK(NF- κ B 유도 키나아제)로 명시된 신규한 단백질 키나아제가 제일 먼저 확인되었다(Patent Application WO 97/37016, Malinin et al. 1996). NIK는 TRAF2와 결합하고 NF- κ B 활성화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. NIK는 MAP3K 키나아제와 서열 상동성을 공유하고, TNF/NGF군의 수용체 및 IL-1 I형 수용체에 공통된 NF- κ B 유도 시그널링 캐스케이드에 참여한다. TNF- α 와 IL-1 β 는 2가지 I κ B 키나아제, 즉 IKK-1[IKK- α]와 IKK-2[IKK- β]를 결과하는 시그널링 캐스케이드를 개시하는데, 이들 키나아제는 특정 N-말단 세린 잔기[I κ B α 에 대하여 S32와 S36, I α B β 에 대하여 S19와 S23]에서 I κ B를 인산화시킨다(Mercurio F and Manning AM, 1999). 이들 키나아제는 IKK 시그널솜(signalsome)으로 명시된 고분자량 단백질 복합체의 구성성분으로 확인되었다.

<11> 인산화된 I κ B는 유비퀴틴 공액효소 캐스케이드의 종결 원소인 E3 유비퀴틴 리가아제에 의해 선택적으로 유비퀴틴화된다. 이런 시그널링 캐스케이드의 최종 단계에서, 세포질에서 NF- κ B와 여전히 결합하고 있는 인산화되고 유비퀴틴화된 I κ B는 26S 프로테오솜에 의해 선택적으로 분해된다. 이런 과정은 NLS를 노출시키고, 따라서 핵 유입 기구와 상호작용하고 핵으로 전치하는 NF- κ B를 유리시키는데, 이것은 핵에서 표적 유전자와 결합하여 전사를 개시시킨다.

<12> IKK 시그널솜에서 몇몇 추가적인 성분의 확인은 수용체 활성화가 IKK 활성화와 연동되는 잠재적 기전에 대한 단서를 제공한다. 이들중의 한가지는 NEMO로 명시된 NF- κ B 필수 조절물질이다. 이런 무린 단백질은 모든 NF- κ B 자극에 반응하지 않는 HTLV-1 Tax 형질전환된 섬유아세포의 편평세포 변이체에서, NF- κ B 활성화에 필수적인 것으로 밝혀졌다(Yamaoka et al. 1998). NEMO는 동형이량체를 형성하고 IKK2와 직접 상호작용하는 것으로 보인다. 상기 단백질은 Kovalenko등(Israel Patent Application Nos. 123758, 126024)에 의해 RIP-결합 단백질로 독립적으로 클론되고 RAP-2로 명명되었다. NEMO는 이후, 다른 두 그룹에 의해 IKK 시그널솜의 비-키나아제 구성성분으로 독립적으로 클론되고 IKKAP-1로 명명되었다(Mercurio F et al 1999b, Rothwarf DM et al 1998). 또한, 상기 단백질은 E3 상호작용 단백질로 클론되었는데, 이는 초기 전사 영역에 인코딩되는 아데노바이러스

단백질로, TNF의 세포독성효과를 저해하고 RIP 키나아제와 상호작용하는 것으로 밝혀졌다(Li Y et al 1998). 이들 연구는 NEMO가 NF- κ B 신호 전달 경로의 필수 단계를 매개한다는 증거한다. 3개의 수용체-관련된 단백질은 인산화 캐스케이드의 개시에 참여하는 것으로 보인다(도2의 막대그래프). 높은 수준으로 발현되어 자체적으로 NF- κ B 활성화를 유인할 수 있는 TRAF2는 활성화된 p75 TNF-R(Rother et al., 1994), 림포독신 베타 수용체(Mosialos et al., 1995), CD40(Rother et al., 1995a), CD-30(비공개 데이터)과 결합하고, 이들에 의한 NF- κ B 유도를 매개한다. TRAF2는 p55 TNF 수용체 및 Fas/APO1과 결합하지 않지만 TRADD라고 하는 p55 수용체-결합된 단백질과 결합할 수 있고, TRADD는 MORT1(또는 FADD - Boldin et al., 1995b and 1996)이라고 하는 Fas/APO1-관련된 단백질과 결합할 수 있는 능력을 보유한다. RIP(Stranger et al., 1995)로 명시된 다른 세틴/트레오닌 키나아제 수용체-상호작용 단백질을 보유하는 다른 사멸 도메인 역시, Fas/APO1, TRADD, p55 TNF 수용체, MORT-1뿐만 아니라 TRAF2와 상호작용할 수 있다. 따라서, RIP는 초기에 세포독성유도(세포 사멸)와 연관하였는데, TRAF2와 상호작용하는 이의 능력은 NF- κ B 활성화에 이의 참여를 암시한다.

<13> TRAF 분자는 NF- κ B 활성화를 유발하는 경로에 연관하는 것으로 보인다. 이런 연관관계는 p55 TNF 수용체와 Fas/APO1이 NF- κ B 활성화를 유인할 수 있도록 한다(Hsu et al., 1995; Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Varfolomeev et al., 1996; Hsu et al., 1996). IL-1 수용체 의한 NF- κ B 활성화의 유인은 TRAF2와 무관하게 일어나는데, 여기에는 TRAF2 상동체 - TRAF6 및 IRAK(Croston et al., 1995)라고 하는 최근에 클론된 IL-1 수용체-관련된 단백질-키나아제가 관여할 수도 있다. TRAF6과 IRAK 역시 IL-18-유도된 시그널링과 기능에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다(Kanarakaraj et al. 1999).

<14> TRAF 분자 또는 어댑터 단백질을 보유하는 사멸 도메인의 수용체 동원에 의해 개시되는 시그널링 캐스케이드는 다중단백질 복합체의 구성을 변형하고 및/또는 단백질-단백질 상호작용과 하류 주효체 기능을 차단함으로써 특정 단계를 간섭할 수 있는 단백질에 의해 조절된다. TRAF와 결합하는 몇몇 세포질 분자가 확인되었다. 이들에는, A20, c-IPA(아포토시스의 세포 저해물질), TRIP(TRAF 상호작용 단백질), I-TRAF/TANK(TRAF 상호작용 단백질, TRAF군 원소-관련된 NF- κ B 활성물질)(Rothe et al., 1994; Rothe et al., 1995b; Cheng and Baltimore 1996; Lee et al. 1997; Roy et al. 1997) 및 본 발명에 따른 단백질과 일부 상동성을 보이는 2개의 다른 분자(이중 하나는 클론9라 하고, 다른 하나는 클론15라 한다)(Patent Application WO 97/37016)가 포함된다. 이들 단백질 각각은 TRAF군의 원소와 적어도 결합하고, 일부는 이와 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 하지만, 이들 상호작용의 기능적 역할은 매우 상이한 것으로 확인되었다. 이들 단백질은 세포 생존을 조절하는 TRAF-의존한 신호 전달의 능력에 중요한 연결물질일 수 있다. 하지만, TRAF가 I- κ B의 인산화를 어떻게 유인하는 지는 확실치 않다. 현재, 예로써 2개의 TNF 수용체에 의한 NF- κ B 유도에서 발견되는 것과 같은 상이한 수용체에 의한 TRAF 활성화의 세포-특이적 패턴을 설명하는 기전에 관한 정보는 없다. 사람 TRAF의 TNF 도메인의 결정 구조는 최근에 해결되었다(Park, Y.C. et al. 1999). 상기 구조는 TRAF 도메인의 삼량체 자가-결합을 보이는데, 이는 세포의 삼량체 리간드에 의한 수용체의 올리고화에서 TRAF 동원의 의존을 아주 명쾌하게 설명한다.

<15> 따라서, NF- κ B 활성화 및 세포생존을 유지하는데 있어 이의 중요성과 관련하여, 이런 활성화에 관여하는 다양한 세포내 경로, 예를 들면 다양한 TRAF 단백질이 어떻게 직간접적으로 관여하는 지는 명확하게 설명되지 않고 있다.

<16> 이에 더하여, TNF/NGF 수용체군의 다양한 원소 및 다양한 어댑터를 포함하는 관련된 세포내 시그널링 경로에 관하여 공지된 바와 같이, 매개물질/조절물질 단백질(Israel Patent Application Nos. 114615, 114986, 115319, 116588), 예를 들면 TNF와 FAS/APO1 리간드는 세포에 유익한 효과와 유해한 효과를 동시에 미칠 수 있다. 예로써, TNF는 종양 세포와 바이러스-감염된 세포의 죽임을 유도하고 과립백혈구의 항균활성을 증폭함으로써 종양과 감염성 물질에 대한 미생물의 보호에 기여하고 손상으로부터 회복에 기여하는데, 이런 경우에 TNF-유도된 세포 죽임이 바람직하다. 하지만, 과량의 TNF는 유해할 수 있는데, 그 이유는 이런 TNF가 다수의 질환, 예를 들면 폐혈 쇼크, 식욕부진, 류머티스 질환, 염증, 이식편-대-숙주 반응에서 중요한 병리학적 역할을 수행하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 이런 경우에, TNF-유도된 세포 죽임은 바람직하지 않다. 예로써, FAS/APO1 리간드 역시 유익한 효과와 유해한 효과를 미친다. 이런 FAS/APO1 리간드는 수용체를 통하여 T 세포의 성숙동안 자가반응성 T 세포의 죽임, 다시 말하면 발달동안 자가-항원을 인식하여 자가면역 질환을 예방하는 T 세포의 죽임을 유도한다. 이에 더하여, 다양한 악성 세포 및 HIV-감염된 세포는 표면에 FAS/APO1 수용체를 보유하고, 따라서 리간드 또는 이에 특이적인 항체에 의한 수용체의 활성화 및 이후 이런 수용체에 의해 매개되는 세포 사멸(아포토시스) 세포내 경로의 활성화에 의해 파괴될 수 있다. 하지만, FAS/APO1 수용체는 유해한 효과, 예를 들면 간세포의 파괴를 동반하는 급성 간염과 같은 특정 질환에서 관찰되는 통제되지 않은 조직 죽임을 매개할 수 있다.

- <17> 상기와 같은 관점, 즉 TNF/NGF군의 수용체가 한편으로 세포 사멸 경로를 유도하고 다른 한편으로 세포 생존 경로(NF-κB 유도를 통하여)를 유도할 수 있다는 점에서, 세포내에는 이들 2가지 반대 경로간의 미묘한 균형이 존재한다. 가령, 암세포 또는 다른 감염된 세포의 최대 파괴를 달성해야 하는 경우에 NF-κB 유도없이 세포 사멸 경로만을 유도하는 TNF 및/또는 FAS/APO1 리간드를 갖는 것이 바람직하다. 반대로, 염증, 이식편-대-숙주 반응, 급성 간염과 같은 질환에서 세포를 보호하는 것이 유익한 경우에 TNF 및/또는 FAS/APO1 리간드의 세포 죽임 유도를 차단하고 대신에 NF-κB 유도를 강화하는 것이 바람직하다. 유사하게, 특정 병리환경에서는 p75 TNF 수용체와 IL-1 수용체에 의해 매개되는 세포내 시그널링 경로를 차단하는 것이 바람직하고, 다른 환경에서는 이들 세포내 경로를 강화하는 것이 바람직하다.
- <18> **본 발명의 요약**
- <19> 본 발명의 목적은 종양 괴사 인자 수용체-결합된 인자(TRAF)와 결합할 수 있는 생물학적 활성단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이들의 유도체를 제공하는 것이다. TRAF 결합단백질이 전술한 바와 같이 일부 TNF/NGF 수용체에 의해 개시되는 전사인자 NF-κB 활성화의 조절 또는 매개에 관여하기 때문에, 본 발명에 따른 단백질은 TRAF 단백질과 결합함으로써 수용체에 대한 다양한 리간드 결합에 의해 개시되는 세포내 시그널링 과정을 조절 또는 매개할 수 있다. 이런 리간드는 예를 들면 TNF, CD40 리간드, FAS 리간드이고, 조절/매개는 TRAF 단백질과의 직간접적인 상호작용(TRAF2와 TRAF6에 의한 NF-κB 활성화 유도 및 TRAF3에 의한 NF-κB 활성화 저해)을 통한 NF-κB 활성화이다.
- <20> 본 발명의 생물학적 활성단백질, 이의 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체는 직간접적으로 TRAF 단백질과 상호작용할 수 있는 다양한 다른 단백질(가령, FAS/APO1 수용체, p55 TNF 수용체, p75 TNF 수용체, IL-1 수용체 및 이들과 관련된 단백질(예, MORT-1, TRADD, RIP))의 세포내 생물활성의 간접적인 조절물질/매개물질이다.
- <21> 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 TRAF-결합단백질, 동소체, 유사체, 단편, 이의 유도체에 대한 길항물질(예, 항체, 펩티드, 유기 화합물 또는 일부 동소체)을 제공하는 것인데, 이는 시그널링 과정, 또는 좀더 구체적으로 NF-κB 활성화 및 세포-생존 과정에서 TRAF의 참여를 저해하는데 사용할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 TRAF-결합단백질 또는 이들이 결합하는 TRAF 단백질(예, TRAF3) 자체가 NF-κB 활성화(직접적으로, 또는 이들이 결합하는 단백질의 소통(trafficking)이나 안정성 조절을 통하여)를 저해하는 경우, 시그널링 과정을 활성화시키는, 좀더 구체적으로 NF-κB 활성화의 저해를 차단하여 강화된 NF-κB 활성화를 유발하는 TRAF-결합단백질에 대한 길항물질을 제공한다.
- <22> 본 발명의 또 다른 목적은 TRAF 단백질 활성 및/또는 전술한 수용체 활성화에 관여하는 추가적인 단백질이나 인자, 예를 들면 TRAF 단백질에 결합하고 이들의 활성화에 영향을 줄 수 있는 단백질을 분리하고 특성화하는데, 및/또는 시그널링 과정의 상류 또는 하류에서 이들 신규한 단백질, 이의 유사체, 단편, 유도체가 결합하고 관여하는 다른 수용체나 다른 세포내 단백질을 분리하고 특성화하는데 신규한 TRAF-결합단백질, 동소체, 유사체, 단편, 이의 유도체를 이용하는 것이다.
- <23> 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 TRAF-결합단백질 및 이의 가능 동소체와 결합 또는 상호작용하도록 세포에 도입할 수 있는 저해물질을 제공하는 것인데, 상기 저해물질은 NF-κB 활성화에서 TRAF 단백질-관련된 활성을 저해하고, 따라서 NF-κB 활성화를 저해할 수 있다; 또는 NF-κB 활성화에서 저해성 TRAF-관련된 활성(예, TRAF3)을 저해하고, 따라서 NF-κB 활성화를 강화시킬 수 있다.
- <24> 본 발명의 또 다른 목적은 다클론 및/또는 이의 단클론항체의 제조를 위한 항원으로 전술한 TRAF-결합단백질, 동소체, 유사체, 단편, 유도체를 이용하는 것이다. 상기 항체는 상이한 출처, 예를 들면 세포 추출물 또는 형질전환된 세포주로부터 유래된 신규한 단백질의 정제에 사용할 수 있다.
- <25> 이에 더하여, 이들 항체는 진단 목적, 예를 들면 TRAF 단백질에 의해 직접 매개되는, 또는 TRAF 단백질과의 상호작용을 통하여 세포내 과정을 직간접적으로 매개/조절하는 p55 TNF 수용체, FAS/APO1 수용체나 다른 관련된 수용체 및 이들과 관련된 세포 단백질(예, MORT-1, TRADD, RIP)에 의해 매개되는 비정상적 작용과 관련된 질환을 확인하는데 사용할 수 있다.
- <26> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 함유하는 제약학적 조성물 및 전술한 항체 또는 다른 길항물질을 함유하는 제약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <27> 따라서, 본 발명은 적어도 TRAF2와 결합하고 TRAF2와의 결합에서 높은 특이성을 갖는 신규한 IREN 단백질을 제공하는 것이다. 따라서, 이는 TRAF2 세포내 활성의 조절물질 또는 매개물질이다. TRAF2는 적어도 한가지의 세

포내 시그널링 경로, 예를 들면 세포-생존 또는 생존-관련된 경로의 매개 또는 조절에 관여하는데, 여기서 TRAF2는 세포 생존에서 중요한 역할을 수행하는 NF- κ B의 활성화에 직접적으로 참여한다.

- <28> 실제로, IREN(I κ B 조절물질)이라고 하는 단백질은 TRAF2에 결합하고, NIK 하류 및 NEMO와 IKK1의 상류에서 NF- κ B 시그널링 경로에 작용하고, I κ B의 IKK1 인산화를 강화시킨다. 이에 더하여, 전술한 p55 TNF 수용체, p75 TNF 수용체, FAS/APO1 수용체 및 이들과 관련된 단백질(MORT-1, TRADD, RIP)과 직간접적으로 상호작용하는 TRAF2 역시 NF- κ B 유도 또는 이들 수용체에 기인하는 활성화 활성의 조절물질 또는 매개물질이다. 따라서, TRAF2는 이들 수용체 및 이들과 관련된 단백질에 의해 매개되는 세포 생존 경로(세포 사멸 경로의 반대)의 조절 물질/매개물질인데, 이런 경우 이들 수용체 및/또는 단백질과 TRAF2간의 상호작용 정도는 이들 수용체(리간드에 의해 활성화 된)의 활성 결과, 즉 세포의 생존과 죽음에서 중요한 인자가 된다. 따라서, 본 발명의 단백질은 TRAF2 및 TRAF2가 상호작용하는 다른 단백질/수용체간의 상호작용에 중요한 역할을 수행하는데, 그 이유는 TRAF2와 특이적으로 결합하는 IREN과 같은 단백질이 이들 활성을 조절하고 및/또는 TRAF2와의 상호작용에 의해 매개되는 활성을 보유하기 때문이다.
- <29> 본원에서, TRAF 단백질 활성, 예를 들면 TRAF2 활성에는 세포 생존 경로, 예를 들면 NF- κ B 유도/활성화의 조절/매개에서 활성이 포함된다. 유사하게, 본원에서 TRAF-결합단백질, 바람직하게는 TRAF2-결합단백질에서 활성은 TRAF, 바람직하게는 TRAF2 단백질과의 특이적인 결합을 통한 TRAF, 바람직하게는 TRAF2 활성의 조절/매개를 포함하는데, 이런 조절/매개에는 세포 생존 경로, 특히 TRAF 단백질, 바람직하게는 TRAF2가 직간접적으로 관여하는 NF- κ B 활성화/유도와 관련된 경로의 조절/매개가 포함된다. 따라서, IREN은 전술한 모든 단백질 및 세포 생존, 예를 들면 NF- κ B 활성화/유도에 관여하고 TRAF2(또는 TRAF 단백질)가 결합하거나 또는 TRAF2(또는 다른 TRAF 단백질)가 직간접적인 방식으로 상호작용하는 다른 다양한 단백질의 간접적인 조절물질/매개물질로 간주할 수 있다. 유사하게, TRAF2는 Jun 키나아제 캐스케이드의 활성화를 통하여 AP1 전사인자의 조절에 관여하고, 따라서 IREN은 Jun 키나아제 활성화 경로의 조절 또는 다른 유전자 활성화 경로, 예를 들면 p38 키나아제 경로의 조절에 작용할 수 있다. 이런 이유로, 이것은 아포토시스의 조절뿐만 아니라 염증 및 TNF의 다른 비-아포토시스 효과의 조절에서 중요한 역할을 수행할 수 있다.
- <30> 좀더 구체적으로, 본 발명은 TRAF와 결합할 수 있는 단백질을 인코딩하는 DNA를 제공하는데, 상기 DNA는 다음에서 선택된다:
- <31> (a) 도3에서 밝힌 뉴클레오티드 서열로 구성되고 본원에서 IREN로 명기된 cDNA 서열;
- <32> (b) 도4에서 밝힌 뉴클레오티드 서열로 구성되고 본원에서 IREN-10B로 명기된 cDNA;
- <33> (c) 도5에서 밝힌 뉴클레오티드 서열로 구성되고 본원에서 동소체 IREN-E로 명기된 cDNA;
- <34> (d) 적어도 TRAF2의 225-501 아미노산과 결합할 수 있는 생물학적 활성단백질을 인코딩하는 (a)-(c) 서열의 단편;
- <35> (e) 중등도로 엄밀한 조건하에 (a)-(d) 서열과 하이브리드를 형성하고, 적어도 TRAF2의 225-501 아미노산과 결합할 수 있는 생물학적 활성단백질을 인코딩하는 DNA 서열;
- <36> (f) (a)-(e)에서 정의되고 적어도 TRAF2의 225-501 아미노산과 결합할 수 있는 생물학적 활성단백질을 인코딩하는 DNA 서열에 대한 유전자 코드와 축증하는 DNA 서열.
- <37> IREN에 의해 인코딩되는 단백질을 인코딩하는 본 발명에 따른 상기 DNA 서열의 구체에는 다음과 같다:
- <38> (i) TRAF2와 결합할 수 있고 NF- κ B의 활성을 조절할 수 있는 IREN 단백질, 이의 생물학적 활성 동소체, 단편 또는 이의 유사체를 인코딩하는 DNA 서열;
- <39> (ii) 상기 (i)에서, 다음에서 선택되는 DNA 서열
- <40> a) 고유 IREN 단백질의 코딩영역으로부터 유래된 cDNA 서열;
- <41> b) 중등도로 엄밀한 조건하에 (a)의 서열과 하이브리드를 형성하고, 생물학적 활성 IREN을 인코딩하는 DNA 서열;
- <42> c) (a)와 (b)에서 정의되고 생물학적 활성 IREN 단백질을 인코딩하는 DNA 서열에 대한 유전자 코드와 축증하는 DNA 서열;
- <43> (iii) 상기 (i) 또는 (ii)에서, 도3에서 밝힌 서열의 적어도 일부를 포함하고 적어도 한가지의 활성 IREN

단백질, 이의 동소체, 유사체 또는 단편을 인코딩하는 DNA 서열;

- <44> (iv) 상기 (iii)에서, 도3에서 밝힌 아미노산 서열의 적어도 일부를 보유하는 IREN 단백질, 이의 동소체, 유사체 또는 단편을 인코딩하는 DNA 서열.
- <45> 다른 측면에서, 본 발명은 전술한 DNA에 의해 인코딩되는 단백질 또는 폴리펩티드를 제공하는데, 이들은 TRAF2, 바람직하게는 적어도 TRAF2의 아미노산 서열 225-501 및 상기 단백질과 폴리펩티드의 동소체, 유사체, 단편과 유도체와 결합할 수 있어야 한다. 본 발명에 따른 이들 단백질/폴리펩티드의 구체에는 다음과 같다:
- <46> (a) IREN으로 명기된 단백질;
- <47> (b) 이의 동소체, 단편, 유사체 및 유도체;
- <48> (c) 도6에서 밝힌 아미노산 서열이 적어도 일부를 보유하는 IREN 단백질, 이의 동소체, 유사체, 단편 및 유도체;
- <49> 또 다른 측면에서, 본 발명은 원핵과 진핵세포에서 선택되는 숙주세포에서 발현될 수 있는 본 발명에 따른 상기 DNA 서열중 임의 하나를 운반하는 벡터 및 이런 벡터를 보유하는 형질전환된 원핵과 진핵 숙주세포를 제공한다.
- <50> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 DNA 서열중 임의 하나로 인코딩되는 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 생산하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 발현하는데 적합한 조건하에 전술한 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 얻기 위하여 번역후 수식을 실시하고, 상기 발현된 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 분리하는 단계로 구성된다.
- <51> 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 TRAF-결합단백질, 동소체, 유사체, 단편 혹은 유도체에 특이적인 또는 전술한 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체에 특이적인 항체, 활성 단편 또는 이의 유도체를 제공한다.
- <52> 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음과 같은 스크리닝 방법을 제공한다:
- <53> (i) 전술한 본 발명에 따른 단백질, 이의 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체와 결합할 수 있는 리간드의 스크리닝 방법, 상기 방법은 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체가 부착되는 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세포 추출물과 접촉시키고, 여기서 리간드는 상기 매트릭스와 결합하고, 상기 리간드를 용출하고, 분리하고, 분석하는 단계로 구성된다.
- <54> (ii) 전술한 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체와 결합할 수 있는 리간드를 코딩하는 DNA 서열의 스크리닝 방법, 상기 방법은 효모 이중-하이브리드 과정을 적용하고, 여기서 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 인코딩하는 서열은 제1 하이브리드 벡터에 의해 운반되고 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리의 서열은 제2 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, 효모 숙주세포를 상기 벡터로 형질전환시키고, 양성으로 형질전환된 세포를 분리하고, 제2 하이브리드 벡터를 추출하여 상기 리간드를 인코딩하는 서열을 얻는 단계로 구성된다.
- <55> 유사하게, TRAF2와 직접 결합할 수 있는 전술한 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 분리하고 확인하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 효모 이중-하이브리드 과정을 적용하고, 여기서 상기 TRAF2를 인코딩하는 서열은 제1 하이브리드 벡터에 의해 운반되고 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리의 서열은 제2 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, 효모 숙주세포를 상기 벡터로 형질전환시키고, 양성으로 형질전환된 세포를 분리하고, 제2 하이브리드 벡터를 추출하여 상기 TRAF2와 결합하는 단백질을 인코딩하는 서열을 얻는 단계로 구성된다.
- <56> 본 발명의 또 다른 구체예에서, 세포에서 NF- κ B 활성, 또는 전술한 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체와 결합하는 TRAF2 혹은 다른 분자에 의해 조절/매개되는 임의 다른 세포내 시그널링 활성을 조절 또는 매개하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 세포내 도입에 적합한 형태로 한가지이상의 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 세포에 도입하거나, 또는 상기 서열을 운반하는데 적합한 벡터 형태로 한가지이상의 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 인코딩하는 DNA 서열을 세포에 도입하여 상기 세포를 처리하는 것으로 구성되고, 상기 벡터는 서열을 세포에 삽입시키고 상기 서열이 상기 세포에서 발현되도록 한다.
- <57> 세포에서 NF- κ B 활성, 또는 TRAF2 혹은 다른 분자에 의해 조절/매개되는 임의 다른 세포내 시그널링 활성을 조절/매개하는 전술한 방법의 예는 다음과 같다:

- <58> (i) 상기에서, IREN 단백질, 동소체, 단편, 유사체 또는 유도체를 인코딩하는 DNA 서열을 상기 서열을 운반하는 데 적절한 벡터 형태로 세포에 도입하여 상기 세포를 처리하는 방법, 상기 벡터는 서열을 세포에 삽입시키고 상기 서열이 상기 세포에서 발현되도록 한다.
- <59> (ii) 상기에서, 재조합 동물바이러스 벡터로 세포를 트랜스펙션시켜 상기 세포를 처리하는 방법, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 구성된다:
- <60> (a) 처리할 세포의 표면에서 특정 세포 표면 수용체와 결합할 수 있는 바이러스 표면 단백질(리간드)을 인코딩하는 서열 및 본 발명에 따른 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 단편, 유도체를 인코딩하는 제2 서열을 전달하는 재조합 동물 바이러스 벡터를 작제하고, 이는 상기 세포에서 발현되어 NF- κ B 활성화, 또는 TRAF2 혹은 다른 전술한 분자에 의해 조절/매개되는 임의의 다른 세포내 시그널링 활성을 조절/매개할 수 있다;
- <61> (b) (a) 벡터로 세포를 감염시킨다.
- <62> 유사하게, 본 발명은 또한 세포에서 TRAF2 조절/매개되는 효과를 조절하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 전술한 항체, 활성화단편 또는 이의 유도체로 상기 세포를 처리하는 단계로 구성되고, 이런 처리는 상기 항체, 활성화단편 또는 이의 유도체를 함유하는 적절한 조성물을 상기 세포에 사용하여 실시하고, 여기서 상기 세포의 IREN 단백질 또는 이들의 일부분이 세포의 표면에 노출되는 경우 상기 조성물은 세포의 용도로 제조되고, 상기 IREN 단백질이 세포내에 존재하는 경우 상기 조성물은 세포내 용도로 제조된다.
- <63> 세포에 대한 TRAF2 매개/조절되는 효과를 조절하는 본 발명에 따른 다른 방법은 다음과 같다:
- <64> IREN 단백질을 인코딩하는 DNA 서열의 적어도 일부에 대한 안티센스 서열을 인코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열로 세포를 처리하는 방법, 상기 DNA 서열은 본 발명에 따른 전술한 서열중 임의의 하나이고, 상기 올리고뉴클레오티드 서열은 IREN 단백질의 발현을 차단할 수 있다.
- <65> (ii) 상기 (i)에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 전술한 재조합 바이러스를 통하여 세포에 도입되는 방법, 여기서 바이러스의 제2 서열은 상기 올리고뉴클레오티드 서열을 인코딩한다.
- <66> (iii) 리보자임 과정을 적용하는 방법, 여기서 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 인코딩하는 세포내 mRNA 서열과 상호작용할 수 있는 리보자임 서열을 인코딩하는 벡터는 세포에서 상기 리보자임 서열의 발현을 가능하게 하는 형태로 상기 세포에 도입되고, 상기 리보자임 서열이 상기 세포에서 발현되는 경우 이는 상기 세포내 mRNA 서열과 상호작용하여 mRNA 서열을 절단하고, 상기 세포에서 IREN 단백질의 발현 저해를 결과한다.
- <67> 본 발명에 따른 전술한 방법 및 이의 구체예에는 NF- κ B 유도, 또는 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체가 결합하는 TRAF2 혹은 다른 분자에 의해 매개되는 임의의 다른 활성화와 관련된 병리질환의 예방 또는 치료 방법이 포함되는데, 상기 방법은 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체 혹은 이들을 코딩하는 DNA 분자, 또는 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체와 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체가 결합하는 TRAF2 혹은 임의의 다른 분자의 상호작용을 교란시킬 수 있는 분자의 효과량을 환자에 투여하는 것으로 구성된다. 본 발명의 이런 방법에서, 환자에 투여되는 본 발명에 따른 단백질은 IREN 또는 이를 코딩하는 DNA 분자에 의해 인코딩되는 단백질일 수 있다. IREN에 의해 인코딩되는 단백질은 현재 IKK-1과 NIK에 의한 NF- κ B 유도를 조절하는 것으로 생각된다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 활성화성분으로 IREN, 이의 생물학적 활성화단편, 유사체, 유도체 또는 이들의 혼합물을 함유하고 세포에서 TRAF2 조절/매개되는 효과를 조절하기 위한 제약학적 조성물을 제공한다.
- <68> 본 발명에 따른 다른 제약학적 조성물 또는 이들의 구체예는 다음과 같다:
- <69> (i) 세포표면 수용체와 결합할 수 있는 단백질 및 본 발명에 따른 IREN, 이의 생물학적 활성화단편 또는 유사체를 인코딩하는 재조합 동물바이러스 벡터를 활성화성분으로 함유하고 세포에서 TRAF2 조절/매개되는 효과를 조절하기 위한 제약학적 조성물.
- <70> (ii) 본 발명에 따른 IREN mRNA 서열의 안티센스 서열을 인코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열을 활성화성분으로 함유하고 세포에서 TRAF2 조절/매개되는 효과를 조절하기 위한 제약학적 조성물.
- <71> 상기 제약학적 조성물의 다른 구체예는 NF- κ B 유도, 또는 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 단편이나 유도체가 결합하는 TRAF2 혹은 다른 분자에 의해 매개되는 임의의 다른 활성화와 관련된 병리질환의 예방이나 치료를 위한 제약학적 조성물인데, 상기 조성물은 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체, 이들을 인코딩하

는 DNA 분자, 또는 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체와 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체가 결합하는 TRAF2 혹은 임의 다른 분자의 상호작용을 교란시킬 수 있는 분자의 효과량으로 구성된다. 또 다른 특정 구체예에서, 제약학적 조성물은 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 유도체나 단편, 또는 이들을 코딩하는 DNA 분자의 효과량을 함유한다.

<72> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 NF-κB 유도, 또는 IREN 단백질이 결합하는 TRAF2 혹은 다른 분자와 관련된 병리 질환의 예방이나 치료를 위한 제약학적 조성물을 제공하는데, 상기 조성물은 IREN 단백질의 활성을 간섭할 수 있는 분자를 함유한다. 상기 조성물에서, 간섭분자는 활성부위 잔기에서 돌연변이된 효과량의 IREN일 수 있는데, 이런 돌연변이된 IREN은 고유 IREN을 간섭하는 역할을 한다.

<73> NF-κB 유도(비정상)와 관련된 것으로 알려진 질환중의 하나는 AIDS이고, 다른 질환은 자가면역 질환과 종양이다.

<74> 본 발명의 또 다른 측면 및 구체예는 다음과 같다:

<75> (i) 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체에 의해 조절/매개되는 세포활성을 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 구성된다:

<76> a) 도6에서 밝힌 IREN 서열의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드와 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하고;

<77> b) TNF/NGF 수용체군의 수용체중에서 TRAF2 또는 이의 일부분을 제외하고, 상기 스크리닝 단계에서 결합할 수 있는 것으로 밝혀진 리간드를 확인 및 특성화하고;

<78> c) 상기 리간드를 실질적으로 분리되고 정제된 형태로 생산한다.

<79> (ii) IREN에 의해 조절/매개되는 세포활성을 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 구성된다:

<80> a) 도6에서 밝힌 IREN 서열의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드와 결합할 수 있는 리간드를 스크리닝하고;

<81> b) TNF/NGF 수용체군의 수용체중에서 TRAF2 또는 이의 일부분을 제외하고, 상기 스크리닝 단계에서 결합할 수 있는 것으로 밝혀진 리간드를 확인 및 특성화하고;

<82> c) 상기 리간드를 실질적으로 분리되고 정제된 형태로 생산한다.

<83> (iii) IREN 단백질에 의해 조절/매개되는 세포활성을 직간접적으로 조절할 수 있는 리간드를 확인 및 생산하는 방법, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 구성된다:

<84> a) IREN 단백질에 의해 조절/매개되는 활성을 조절할 수 있는 분자를 스크리닝하고;

<85> b) 상기 분자를 확인 및 특성화하고;

<86> c) 상기 분자를 실질적으로 분리되고 정제된 형태로 생산한다.

<87> (iv) 본 발명에 따른 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체에 의해 조절/매개되는 세포활성을 직간접적으로 조절할 수 있는 분자를 확인 및 생산하는 방법, 상기 방법은 다음과 같은 단계로 구성된다:

<88> a) 본 발명에 따른 IREN 단백질, 동소체, 유사체, 단편이나 유도체에 의해 조절/매개되는 활성을 조절할 수 있는 분자를 스크리닝하고;

<89> b) 상기 분자를 확인 및 특성화하고;

<90> c) 상기 분자를 실질적으로 분리되고 정제된 형태로 생산한다.

<91> 또한, 다음의 본 발명의 상세한 설명에 기인한 본 발명의 다른 측면 및 구체예를 제공한다.

<92> 인지하는 바와 같이, 본원에서 다음의 용어 "세포에서 TRAF(또는 TRAF2) 효과의 조절/매개" 및 명세서에 언급된 임의 다른 "조절/매개"에는 *in vitro*와 *in vivo*처리가 포함되고, 또한 저해 혹은 강화/증폭이 포함된다.

발명의 상세한 설명

<107> 본 발명은 TRAF2와 결합할 수 있는 단백질을 인코딩하고 본원에서 IREN이라고 명시한 cDNA 서열(도3) 및 이런 DNA 서열에 의해 인코딩되는 단백질에 관한다. 또한, 본 발명은 IREN 동소체인 IREN-10B와 IREN-E(각각 도4와

5)의 cDNA 서열에 관한다.

- <108> 전술한 DNA 및 아미노산 추정서열은 'GENEBANK' 또는 'PROTEIN BANK'의 DNA 또는 아미노산 서열에 존재하지 않고, 따라서 이들은 공지되지 않은 서열이다.
- <109> 또한, 본 발명의 범주에는 전술한 DNA 서열 및 중등도로 엄밀한 조건에서 이들 서열이나 이들의 일부와 하이브리드를 형성할 수 있는 DNA 서열의 단편이 포함되는데, 이들은 적어도 TRAF2의 아미노산 서열 225-501과 결합할 수 있는 생물학적 활성단편 또는 폴리펩티드를 인코드한다.
- <110> 또한, 본 발명은 적어도 TRAF2의 아미노산 서열 225-501과 결합할 수 있는 생물학적 활성단편 또는 폴리펩티드를 인코드하는 전술한 DNA 서열에 대한 유전자 코드와 축중하는 DNA 서열에 관한다.
- <111> TRAF2와 관련하여, TNF/NGF 수용체군의 몇몇 원소는 TRAF2와의 직간접적인 연관으로 전사인자 NF-κB를 활성화시키는데, 상기 TRAF2는 이들 수용체에 대한 어댑터 단백질로 기능하고, 따라서 이들 TNF/NGF 수용체의 NF-κB 활성화 활성유도의 조절물질/매개물질로 간주된다(도2에서 반응식). 다른 수용체인 IL-1 수용체는 TRAF2와 독립적으로 NF-κB를 활성화시킨다. 본 발명에 따라 만들어진 IREN 유사체 또는 뮤테인(실시에 참조)은 세포에서 발현되는 경우에 NF-κB 활성화를 조절한다.
- <112> 따라서, 본 발명은 IREN, 이의 생물학적 활성단편, 동소체, 유사체, 단편과 유도체 및 이에 의해 인코드되는 단백질의 동소체, 유사체, 단편과 유도체에 관한다. 이런 유사체, 단편과 유도체의 제조는 표준과정에 따르는데 (Sambrook et al., 1989), 여기서 DNA 인코딩 서열에서 하나이상의 코돈이 결실, 부가 또는 치환되어 고유 단백질과 비교하여 하나이상 변이된 아미노산 잔기를 보유하는 유사체가 만들어진다. 수용가능한 유사체는 임의의 다른 결합이나 효소 활성을 매개하고 또는 매개하지 않으면서 적어도 TRAF2에 결합하는 능력을 유지하는 유사체, 예를 들면 TRAF2와 결합하지만 신호하지 않는(즉, 하류 단백질이나 다른 인자와 추가적으로 결합하지 않거나 또는 신호-의존 반응을 촉매하지 않는) 유사체이다. 이런 방식으로, 소위 네거티브 우세한 효과를 보유하는 유사체, 다시 말하면 전술한 바와 같이 TRAF2와의 결합 또는 이런 결합이후의 시그널링이 결핍된 유사체를 만들 수 있다. 이런 유사체는 예로써, 고유 IREN 단백질과 결합하여, 전술한 다양한 수용체 관련된 단백질(어댑터)에 의해 매개되는 효과뿐만 아니라 CD40, p55 TNF, p75 TNF(FAS/APO1과 다른 관련된 수용체) 효과를 저해하는데 사용할 수 있다. 유사하게, TRAF2 효과를 강화하는 파지티브 우세한 유사체를 만들 수 있다. 이들은 고유 TRAF2-결합단백질과 동일한 또는 이보다 뛰어난 TRAF2-결합특성 및 시그널링 특성을 보유한다. 유사한 방식으로, 본 발명에 따른 클론의 생물학적 활성단편은 유사체 제조를 참고하여 전술한 바와 같이 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 DNA 서열의 적합한 단편은 TRAF2 결합능력을 유지하는 단백질이나 폴리펩티드를 인코드하는 단편, 또는 전술한 임의의 다른 결합이나 효소 활성을 매개할 수 있는 단편이다. 따라서, 네거티브 우세한 또는 파지티브 우세한 본 발명에 따른 인코드된 단백질의 단편은 유사체와 관련하여 전술한 바와 같이 만들 수 있다. 유사하게, 유도체는 단백질, 이의 유사체나 단편의 하나이상 아미노산 잔기의 표준 변형으로, 또는 단백질, 이의 유사체나 단편과 다른 분자, 예를 들면 당분야에 공지된 항체, 효소, 수용체등의 공액으로 만들 수 있다.
- <113> TRAF2-결합단백질 IREN, 생물학적 활성 동소체, 유사체, 단편이나 유도체를 인코드하는 본 발명에 따른 전술한 DNA 서열에는 본 발명에 따른 구체예로, 고유 TRAF-결합단백질의 코딩영역으로부터 유래된 cDNA 서열과 하이브리드를 형성할 수 있는 DNA 서열이 포함되는데, 여기서 이런 하이브리드형성은 중등도로 엄밀한 조건하에서 실시하고 하이브리드형성 가능한 DNA 서열은 생물학적 활성 TRAF-결합단백질을 인코드한다. 따라서, 이들 하이브리드형성 가능한 DNA 서열은 고유 IREN cDNA 서열과 상대적으로 높은 상동성을 갖는 DNA 서열을 포함하고 따라서 TRAF-결합단백질-유사 서열을 대표하는데, 여기에는 다양한 IREN 동소체를 인코드하는 자연적으로-유래된 서열, 또는 IREN을 인코드하는 TRAF-결합단백질-유사 서열군에 속하는 단백질을 인코드하는 자연적으로-발생하는 서열이 포함될 수 있다. 이에 더하여, 이들 서열에는 고유한 IREN cDNA 서열과 유사하지만 다수의 소요 변형을 포함하는 비-자연발생된 합성서열이 포함된다. 따라서, 이런 합성서열에는 IREN의 유사체, 단편과 유도체를 인코드하는 모든 가능 서열이 포함되는데, 이들 모두 TRAF-결합단백질의 활성을 보유한다.
- <114> 본원에서, 엄밀한 조건은 하이브리드형성 실험에 이용되는 온도, 일가양이온의 몰농도 및 하이브리드형성 용액에서 포름아마이드 비율의 함수다. 임의의 설정된 조건과 관련된 엄밀도를 측정하기 위하여, 먼저 DNA-DNA 하이브리드의 용점 T_m으로 표시된 100% 상동성의 하이브리드 안정도를 측정하기 위한 Meinkoth등(1984)의 방정식을 이용한다: T_m=81.5°C + 16.6(LogM) + 0.41 (%GC) - 0.61(% form) - 500/L, 여기서 M은 일가양이온의 몰농도이고, %GC는 DNA에서 G와 C 뉴클레오티드의 비율이고, %포름아마이드는 하이브리드형성 용액에서 포름아마이드의 비율이고, L은 염기쌍에서 하이브리드의 길이이다. T_m에서 100% 상동성 하이브리드에 대하여 계산된 용점으로 부터 감소되는 각 1°C에서, 허용되는 미스매치의 양은 대략 1%씩 증가한다. 따라서, 특정 염과 포름아마이드

농도에서 임의의 하이브리드형성 실험에 사용되는 Tm이 Meinkoth 방정식에 따라 100% 하이브리드에 대하여 계산된 Tm보다 10°C 낮은 경우에, 하이브리드형성은 최대 10% 미스매치의 존재하에 일어나게 된다. "고도로 엄밀한 조건"은 상기 공식으로 계산하거나 또는 실제로 측정하는 경우에, 표적 서열과 완전한 이중 나선으로 존재하는 Tm보다 10°C정도 낮은 Tm을 제공하는 조건이다. "중등도로 엄밀한 조건"은 상기 공식으로 계산하거나 또는 실제로 측정하는 경우에, 표적 서열과 완전한 이중 나선으로 존재하는 Tm보다 20°C정도 낮은 Tm을 제공하는 조건이다. 제한없이, 고도로 엄밀한(하이브리드의 계산된 또는 측정된 Tm보다 5-10°C 낮은) 조건은 하이브리드의 계산된 Tm보다 낮은 온도에서 2 X SSC(표준 시트르산 식염수)와 0.5% SDS(소듐 도데실 설페이트)의 세척 용액을 이용한다. 상기 조건의 최종 엄밀도는 특히, 이용되는 하이브리드형성 조건이 안정한 하이브리드와 함께 좀더 불안정한 하이브리드가 형성될 수 있도록 하는 조건인 경우에, 일차적으로 세척 조건에 기인한다. 이후, 좀더 높은 엄밀도에서 세척 조건은 좀더 불안정한 하이브리드를 제거한다. 전술한 고도로 엄밀한 세척 조건에서 중등도로 엄밀한 조건까지 이용할 수 있는 공통적인 하이브리드형성 조건은 Tm보다 대략 20 내지 25°C 낮은 온도에서, 6 X SSC(또는 6 X SSPE(표준 식염수-포스페이트-EDTA)), 5 X 데하르트 시약, 0.5% SDS, 100µg/ml 변성되고 단편화된 연어 정자 DNA의 용액에서 하이브리드형성이다. 혼성 프로브를 사용하는 경우, SSC 대신에 테트라메틸 암모늄 클로라이드(TMAC)를 사용하는 것이 바람직하다(Ausubel, 1987, 1999).

- <115> 전술한 다양한 자연발생 IREN-유사 서열을 얻기 위하여, 다양한 조직으로부터 자연적으로-유래된 DNA 또는 RNA 샘플의 스크리닝과 분리의 표준 과정은 고유 IREN cDNA 또는 이의 일부를 프로브로 이용하여 실시할 수 있다 (Sambrook et al., 1989).
- <116> 유사하게, IREN의 유사체, 단편 또는 유도체를 인코딩하는 전술한 다양한 합성 TRAF-결합단백질-유사 서열을 만들기 위하여 다양한 표준 과정을 활용할 수 있는데, 이들은 이런 유사체, 단편, 유도체의 제조와 관련하여 하기에 자세하게 설명한다.
- <117> IREN에 "실질적으로 상응하는" 폴리펩티드 또는 단백질에는 IREN 자체뿐만 아니라 IREN과 유사한 폴리펩티드 또는 단백질이 포함된다.
- <118> IREN에 실질적으로 상응하는 유사체는 IREN 아미노산 서열에서 하나이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 결실 또는 부가된 폴리펩티드인데, 생성된 단백질은 IREN과 실질적으로 동일한 또는 이보다 높은 생물활성을 보인다.
- <119> IREN과 실질적으로 상응하기 위해서, 동소체와 같은 단백질 서열에서 변이는 상대적으로 적어야 한다. 변이 개수가 10개이상일 수도 있지만, 변이는 바람직하게는 10개이하, 좀더 바람직하게는 5개이하, 가장 바람직하게는 3개이하이다. IREN과 실질적으로 상응하는 잠재적인 생물학적 활성단백질을 찾는데 임의의 기술을 활용할 수 있는데, 이런 기술중의 한가지는 상기 단백질을 인코딩하는 DNA에서 통상적인 돌연변이유발 기술을 활용하여 수개의 변형을 유발하는 것이다. 이후, 이런 클론에 의해 발현된 단백질은 TRAF 단백질(예, TRAF2)과 결합하고 전술한 세포내 경로의 조절/매개에서 TRAF 단백질(예, TRAF2) 활성을 조절하는 능력에 대하여 스크리닝할 수 있다.
- <120> "보존적" 변이는 단백질의 활성을 변화시키지 않는 변이로서, 일반적으로 가장 먼저 스크리닝되는데, 그 이유는 이들 변이가 단백질의 크기, 극성 또는 형태를 실질적으로 변화시키지 않고, 따라서 이들의 생물학적 특성을 변화시키지 않기 때문이다.
- <121> IREN의 보존적 치환에는 폴리펩티드에서 하나이상의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산으로 보존적으로 치환된 유사체가 포함된다. 치환은 가급적, 표IA에서 제시한 리스트에 따라 실시하는데, 이런 치환은 IREN에 특징적인 생물학적 활성을 유지하면서 합성된 폴리펩티드 분자의 변이된 구조적·기능적 특성을 제공하는 일상적 검사로 확정할 수 있다.

<122> **표 1A**

원래 아미노산	예시적인 치환체
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn

Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

<124> 대안으로, IREN의 다른 치환군은 폴리펩티드에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고, 이의 위치에 표IB에 따른 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 폴리펩티드에서 일어날 수 있는 치환의 유형은 Schulz et al., G.E., Principles of Protein Structure Springer-Verlag, New York, NY, 1978의 표1-2 및 Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA 1983의 도3-9에서 제시된 것과 같은 상이한 중의 상동성 단백질간의 아미노산 변이 빈도에 기초할 수 있다. 이런 분석에서 기초하여, 대안적인 보존적 치환은 다음의 5개 군중 한가지에서 치환으로 정의한다.

<125> 표 1B

- <126> 1. 작은 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기: Ala, Ser, Thr(Pro, Gly);
- <127> 2. 음으로 하전된 극성 잔기와 이들의 아마이드: Asp, Asn, Glu, Gln;
- <128> 3. 양으로 하전된 극성 잔기: His, Arg, Lys;
- <129> 4. 큰 지방족 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val(Cys);
- <130> 5. 큰 지방족 잔기: Phe, Tyr, Trp

<131> 상기 괄호안 3개의 아미노산 잔기는 단백질 구조에서 특별한 역할을 수행한다. Gly는 측쇄가 없는 유일한 잔기로서, 사슬에 유연성을 부여한다. 하지만, 이는 α-나선 이외의 다른 2차 구조의 형성을 촉진하는 경향이 있다. Pro는 특이적인 기하학적 배열로 인해, 사슬을 강하에 압박하고 β-턴-유사 구조를 촉진하는 경향이 있는 반면, Cys는 일부 경우에 이황화결합 형성에 참여할 수 있는데, 이는 단백질 접힘에 중요하다(Schulz et al., supra). 또한, Tyr은 수소결합 잠재력으로 인해, Ser, Thr등과 상당한 유사성을 보유한다.

<132> 전술한 바와 같이 본 발명에 따른 보존적 아미노산 치환은 당분야에 공지된 것으로, 아미노산 치환이후에 폴리펩티드의 생물학적, 구조적 특성을 유지시킬 것으로 예상된다. 본 발명에 따른 대부분의 결실과 치환은 단백질 또는 폴리펩티드 분자의 특성에 급격한 변화를 유발하지 않는 것이다. "특징"은 생물활성, 예를 들면 TRAF 단백질과의 결합 및/또는 세포 사멸에 대한 TRAF 단백질 효과의 매개에서 변화뿐만 아니라 이차 구조, 예를 들면 α-나선과 β-시트에서 변화 모두를 정의하기 위하여 비-포괄적으로 방식으로 정의한다.

<133> 본 발명에 사용되는 IREN의 유사체를 얻기 위하여 활용할 수 있는 단백질에서 아미노산 치환의 유발 방법의 예에는 임의의 공지된 방법(U.S. patent RE 33,653, 4,959,314, 4,588,585, 4,737,462(Mark et al.); 5,116,943(Koths et al.); 4,965,195(Namen et al.); 4,879,111(Chong et al.); 5,017,691(Lee et al.); 및 리신 치환된 단백질(U.S. patent No. 4,904,584(Shaw et al.))이 포함된다.

<134> IREN의 활성을 현저하게 변화시키지 않는 전술한 보존적 치환이외에, IREN 유사체의 생물학적 활성을 증가시키는 보존적 치환 또는 조금 덜 보존적이고 좀더 임의적인 변이는 본 발명의 범주에 속한다.

<135> 치환 또는 결실의 정확한 효과가 확인되면, 당업자는 치환, 결실등의 효과를 이해하고 일상적인 결합 분석과 세포 사멸 분석으로 평가하게 된다. 이런 표준 검사를 활용한 스크리닝은 과도한 실험을 필요로 하지 않는다.

- <136> 유전자 수준에서, 이들 유사체는 IREN을 인코딩하는 DNA에서 뉴클레오티드의 특정부위-돌연변이유발로 만들고, 유사체를 인코딩하는 DNA를 생산하고, 이후 DNA를 합성하고, 재조합 세포 배양액에서 폴리펩티드를 발현한다. 이들 유사체는 일반적으로, 고유발생 단백질과 동일한 또는 이보다 높은 생물학적 활성을 보인다(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- <137> 본 발명에 따른 IREN 뮤테인, 또는 동일한 폴리펩티드를 인코딩하지만 유전자 코드의 공지된 축중에 따른 변화로 인해 고유 서열과 상이한 대안적 뉴클레오티드 서열의 제조는 IREN의 전술한 유사체 또는 고유형을 인코딩하는 DNA의 특정부위-돌연변이유발로 달성할 수 있다. 특정부위-돌연변이유발은 충분한 수의 인접 뉴클레오티드 뿐만 아니라 소량의 돌연변이된 DNA 서열을 인코딩하는 특정 올리고뉴클레오티드의 활용을 통한 유사체의 생산을 가능하게 함으로써, 가로지르는 결실 접합부의 양 측면에서 안정한 이중나선을 형성할 수 있는 충분한 크기와 서열 복잡성의 프라이머 서열을 제공한다. 전형적으로, 20 내지 25개 길이의 프라이머가 바람직하고, 서열의 양 측면에서 5 내지 10 뉴클레오티드가 변한다. 일반적으로, 특정부위-돌연변이유발은 당분야에 공지된 기술이다(Adelman et al., DNA 2:183(1983)).
- <138> 인지하는 바와 같이, 특정부위-돌연변이유발 기술은 일반적으로, 단일-가닥과 이중-가닥 형태로 존재하는 파아지 벡터를 활용한다. 특정부위-돌연변이유발기술에 통상적으로 이용되는 벡터에는 M13 파아지와 같은 벡터가 포함된다(Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981)). 이들 파아지는 상업적으로 이용하고, 이들의 유용성은 당업자에게 공지되어 있다. 대안으로, 단일-가닥 파아지 복제기점을 보유하는 플라스미드 벡터(Veira et al., Meth. Enzymol. 153:3, 1987)를 활용하여, 단일-가닥 DNA를 얻을 수 있다.
- <139> 일반적으로, 본 발명에 따른 특정부위-돌연변이유발은 관련된 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 자신의 서열에 포함하는 단일-가닥 벡터를 먼저 수득함으로써 실시된다. 소량의 돌연변이된 서열을 보유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 자동화 DNA/올리고뉴클레오티드 합성방법으로 합성할 수 있다. 이후, 상기 프라이머는 단일-가닥 단백질-서열-보유 벡터와 어닐링시키고 대장균(*E. Coli*) I Klenow 단편과 같은 DNA-중합효소에 처리하여, 돌연변이-보유 가닥의 합성을 종결한다. 따라서, 돌연변이된 서열 및 제2 가닥은 소량의 돌연변이를 보유하게 된다. 그 다음, 이런 이형이중나선 벡터는 대장균(*E. coli*)JM101 세포와 같은 적합한 세포를 형질전환시키는데 사용하고, 돌연변이된 서열 배열을 보유하는 재조합 벡터를 포함하는 클론을 선별한다.
- <140> 이런 클론이 선별된 이후에, 돌연변이된 IREN 서열은 떼어내고, 적절한 벡터, 일반적으로 적합한 숙주의 트랜스펙션에 활용할 수 있는 유형의 전달 또는 발현 벡터에 위치시킬 수 있다.
- <141> 따라서, 공지된 DNA나 RNA 증폭 기술, 예를 들면 PCR과 화학적 올리고뉴클레오티드 합성법을 활용하여 IREN 단백질을 코딩하는 유전자 또는 핵산은 *in vitro*, *in situ* 및/또는 *in vivo*에서 검출, 수득 및/또는 변이시킬 수 있다. PCR은 반복된 DNA 중합효소 반응으로 특정 DNA 서열의 증폭(개수 증가)을 가능하게 한다. 이런 반응은 클로닝의 대안으로 활용할 수 있다; 여기에서 핵산 서열을 인식하기만 하면 된다. PCR을 실시하기 위하여, 관심있는 서열과 상보적인 프라이머를 디자인한다. 이후, 상기 프라이머는 자동화 DNA 분석으로 준비한다. 프라이머는 유전자의 임의 일부분과 혼성화되도록 디자인할 수 있기 때문에, 상보성 염기쌍에서 미스매치를 관용하는 조건을 만들 수 있다. 이들 미스매치된 영역의 증폭은 돌연변이된 산물의 합성을 유발하고, 이는 신규한 특성(예, 특정부위 돌연변이유발)을 갖는 펩티드의 생성을 결과한다(Ausubel, supra, Ch. 16). 또한, PCR 및 역전사효소를 이용하는 상보성 DNA(cDNA) 합성을 결합시켜, RNA는 클로닝없이 프로락틴 수용체의 세포의 도메인의 합성을 위한 출발물질로 이용할 수 있다.
- <142> 더 나아가, PCR 프라이머는 증폭할 유전자 분절의 말단에 종결 코돈과 같은 신규한 절단위치 또는 다른 특성을 통합하도록 디자인할 수 있다. 증폭된 유전자 서열의 5'와 3'말단에서 제한위치의 이런 배치는 IREN 단백질을 인코딩하는 유전자 분절 또는 이의 단편에서, 다른 서열 및/또는 벡터에서 클로닝 위치를 결정하도록 맞춤 디자인할 수 있게 한다.
- <143> PCR 및 RNA 및/또는 DNA의 다른 증폭 방법은 당분야에 공지된 것으로, 본원에서 밝힌 도움말에 따라 활용할 수 있다. DNA 또는 RNA 증폭의 공지된 방법에는 중합효소 연쇄반응(PCR) 및 관련된 증폭 과정(U.S. patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188(Mullis et al.); 4,795,699, 4,921,794(Tabor et al.); 5,142,033(Innis); 5,122,464(Wilson et al.); 5,091,310(Innis); 5,066,584(Gyllenstein et al.); 4,889,818(Gelfand et al.); 4,994,370(Silver et al.); 4,766,067(Biswas); 4,656,134(Ringold); Innis et

al., eds, PCR Protocols; a Guide to Method and Application) 및 이중 가닥 DNA 합성(U.S. patent No. 5,130,238(Malek et al.), 상품명 NASBA)과 항체 라벨링과 DNA 증폭을 병용하는 면역-PCR(Ruzicka et al., Science 260:487(1993); Sano et al., Science 258:120(1992); Sano et al., Biotechniques 9:1378 (1991))을 위한 주형으로 표적 서열에 대한 안티-센스 RNA를 이용하는 RNA 매개된 증폭이 포함되지만, 이들에 국한하지 않는다.

- <144> 유사한 방식으로, IREN의 생물학적 활성단편 또는 이의 동소체는 TRAF-결합단백질의 유사체에 관하여 전술한 바와 같이 만들 수 있다. TRAF-결합단백질의 적절한 단편은 TRAF-결합단백질 능력을 유지하고, TRAF 단백질 또는 TRAF 단백질과 직접적으로 관련된 다른 단백질의 생물활성을 매개할 수 있는 단편이다. 따라서, IREN 단편은 유사체에 관하여 전술한 바와 같이 네거티브 우세한 또는 파지티브 우세한 효과를 보이는 IREN 단편을 만들 수 있다. 이들 단편은 본 발명에 따른 유사체의 특정 부류를 나타낸다, 다시 말하면 이들은 IREN 전장 서열 또는 이의 동소체로부터 유래된 IREN의 일부분으로 정의되는데, 이런 일부분 또는 단편 각각은 전술한 소오의 활성을 보유한다. 이런 단편은 예로써 펩티드일 수도 있다.
- <145> 유사하게, 유도체는 IREN, 이의 유사체 또는 단편의 하나이상 아미노산 잔기 측쇄의 표준 변형, 또는 IREN, 이의 유사체 또는 단편과 다른 분자(예, 당분야에 공지된 항체, 효소, 수용체등)의 공액으로 만들 수 있다. 따라서, 본원의 "유도체"에는 당분야에 공지된 수단으로 잔기의 측쇄 또는 N-이나 C-말단기로 생성되는 작용기로부터 만들 수 있는 유도체가 포함되는데, 이는 본 발명에 속한다. 유도체는 탄수화물 또는 인산염 잔기와 같은 화학적 성분을 보유할 수 있지만, 단 이런 분취물은 IREN 단백질보다 동일한 또는 이보다 더 높은 생물학적 활성을 보유해야 한다.
- <146> 가령, 유도체에는 카르복실기의 지방족 에스테르, 암모니아 혹은 일·이차 아민과의 반응으로 카르복실기의 아마이드, 아실 성분으로 형성되는 아미노산 잔기의 N-아실 유도체 혹은 자유아미노기(예, 알칸올이나 카르복실 아로일기), 또는 아실 성분으로 형성되는 자유 하이드록실기(예, 세틸이나 테레오닐 잔기)의 O-아실 유도체가 포함된다.
- <147> "유도체"는 아미노산이 20개의 자연발생 공통 아미노산중 한가지로 변이된 유도체를 의미한다.
- <148> IREN 단백질은 단백질 또는 폴리펩티드, 즉 아미노산 서열이다. 본원의 정의에 따라, IREN 단백질의 전체 서열을 포함하는 큰 서열로 구성되는 폴리펩티드는 부가서열(addition)이 본 발명의 기본적인 신규한 특성에 영향을 주지 않는 조건하에서, 다시 말하면 이들이 IREN의 생물학적 활성을 유지 혹은 증가시키는 경우에 또는 이들이 절단되어 IREN의 생물학적 활성을 보유하는 단백질이나 폴리펩티드가 원상태로 유지되는 경우에 이런 폴리펩티드의 범주에 속한다. 따라서, 가령 본 발명에는 IREN과 다른 아미노산 또는 펩티드의 융합단백질이 포함된다.
- <149> 전술한 바와 같이, 본 발명의 상기 IREN, 동소체, 단편, 유도체, 뮤테인등은 세포내에서 임의 TRAF 단백질과 결합할 수 있는 및/또는 이의 활성을 매개/조절할 수 있는 임의의 단백질이다. 특히, 전술한 TRAF2-관련된 세포내 시그널링 활성, 바람직하게는 본원에서 밝힌 TRAF2 및 TNF/NGF 수용체군의 다양한 원소 또는 이들의 관련된 어댑터 단백질간의 상호작용이후 NF-κB 활성화에 TRAF2의 관여를 조절 또는 매개할 수 있는 단백질이다. TRAF2에 매우 특이적으로 결합하는 것으로 보이는 본 발명에 따른 IREN, 이의 다양한 동소체, 유사체, 단편등은 NF-κB 활성화의 조절에 작용하고, IREN 네거티브 우세한 유사체/뮤테인 역시 이런 활성을 조절한다.
- <150> 전술한 변이체가 적어도 TRAF2의 225-501 아미노산 서열과 결합하는 인코딩된 단백질, 폴리펩티드, 유사체, 이들의 유도체의 능력을 보존하는 조건하에서, 본 발명의 범주에 속한다.
- <151> TRAF2와 결합할 수 있는 능력의 측면에서 본 발명에 따른 모든 단백질과 폴리펩티드는 TRAF2 시그널링의 조절물질 또는 매개물질로 간주한다. 이와 같이, 본 발명에 따른 상기 분자는 전술한 다른 수용체와 어댑터 단백질을 비롯하여 CD30, CD40, 림포톡신 베타(LT-β) 수용체, p55나 p75 TNF 수용체에 대한 TRAF2 리간드의 결합이 전사인자 NF-κB의 활성화를 유발하는 시그널링 과정에 작용한다.
- <152> 신규한 클론, 이들의 단백질, 유사체, 단편, 유도체는 다음과 같은 다수의 유용성을 갖는다:
- <153> (i) 이들은 TRAF-2-유도된 효과가 바람직한 항-종양 또는 면역-촉진에서와 같은 상황에서, NF-κB 활성화, TRAF2 기능 및 이들이 결합하는 수용체의 기능을 조절하는데 사용할 수 있다. 이런 경우에, TRAF2 또는 수용체 효과를 조절하는 본 발명의 단백질, 이들의 유사체, 단편 또는 유도체는 공지된 표준 과정으로 세포에 도입할 수 있다. 예로써, 본 발명의 DNA 클론에 의해 인코딩되는 단백질이 세포내에 존재하고, TRAF2 효과가 필요한 세포에만 도입되어야 하기 때문에, 이들 단백질의 세포로의 특이적인 도입을 위한 시스템이 필요하다. 이를 달성하는

한가지 방법은 재조합 동물 바이러스, 예를 들면 우두로부터 유래된 재조합 동물 바이러스를 만드는 것으로, 상기 바이러스 DNA에 다음의 2가지 유전자: 세포에 의해 특이적으로 발현되는 표면단백질, 예를 들면 일부 세포 (CD4 림프구와 관련된 백혈병)에 특이적으로 결합하는 AIDS(HIV) 바이러스 gp120 단백질과 결합하는 리간드를 인코딩하는 유전자 또는 TRAF2와 결합하는 수용체를 보유하는 세포에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 리간드를 인코딩하는 유전자를 도입하여, 이런 재조합 바이러스 벡터가 이런 세포와 결합하고 상기 유전자가 본 발명에 따른 단백질을 인코딩할 수 있도록 한다. 따라서, 바이러스의 표면에서 세포-표면-결합단백질의 발현은 바이러스를 종양 세포 또는 다른 수용체-보유 세포에 대하여 특이적으로 표적시키고, 이후 단백질 인코딩 서열은 바이러스를 통하여 세포에 도입하는데, 상기 서열이 세포에서 발현되면 수용체 또는 TRAF2 효과가 강화되고, 이는 이들 세포에서 소요의 면역-촉진 효과를 결과한다. 이런 재조합 동물 바이러스의 작제는 표준 과정에 따른다(Sambrook et al., 1989). 다른 대안은 세포에 의해 흡수될 수 있는 올리고뉴클레오티드 형태로 인코딩된 단백질의 서열을 도입하고, 이를 발현시키는 것이다.

<154> (ii) 이들은 AIDS, 폐혈 쇼크 또는 이식편-대-숙주 거부반응에서와 같은 조직손상의 경우에, NF- κ B 활성화, TRAF2의 효과 또는 이들이 결합하는 수용체의 효과를 조절하는데 사용할 수 있는데, 여기서는 유도된 세포내 시그널링을 차단하는 것이 바람직하다. 이런 상황에서, 가령 표준 과정으로 본 발명의 단백질에 대한 안티-센스 코딩 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것이 가능한데, 이런 올리고뉴클레오티드는 상기 단백질을 인코딩하는 mRNA의 번역을 효과적으로 차단하여 이들의 발현을 차단하고 원치않는 효과를 저해한다. 대안으로, 다른 올리고뉴클레오티드: 상기 단백질과 다른 분자의 결합을 간섭하는 방식으로 TRAF2와 결합하는 능력을 보유하면서 동시에 이런 분자의 임의의 활성화 또는 조절을 매개하지 않는 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 이들 특성을 보유한 상기 분자는 고유 리간드와 TRAF2의 상호작용을 교란시킬 수 있고, 따라서 TRAF2에 의해 매개되는 효과, 예를 들면 NF- κ B 활성화를 소멸시키는 저해물질로서 작용할 수 있다. 이런 올리고뉴클레오티드는 상기 재조합 바이러스 방식으로 세포에 도입할 수 있는데, 바이러스에 의해 운반되는 제2 서열이 올리고뉴클레오티드 서열이다.

<155> 다른 유용성은 세포내 시그널링 활성을 저해하는데 본 발명의 단백질에 특이적인 항체를 사용하는 것이다.

<156> 원치않는 효과를 저해하는 또 다른 방법은 최근에 개발된 리보자임 방법이다. 리보자임은 RNA를 특이적으로 절단하는 촉매성 RNA 분자다. 리보자임은 선택한 RNA, 예를 들면 본 발명의 단백질을 인코딩하는 mRNA를 절단하도록 가공할 수 있다. 이런 리보자임은 상기 단백질의 mRNA에 대하여 특이적인 서열을 보유하고, 이들과 상호작용(상보성 결합)하여 mRNA를 절단한 이후 단백질의 발현을 감소시킬 수 있는데, 감소된 발현의 수준은 표적 세포에서 리보자임 발현 수준에 의존한다. 리보자임을 선택된 세포(예, IREN 단백질을 보유한 세포)에 도입하기 위하여, 임의의 적절한 벡터, 예를 들면 이런 목적에 통상적으로 사용되는 플라스미드, 동물 바이러스(레트로바이러스) 벡터를 사용할 수 있는데, 여기서 상기 바이러스 벡터는 선택된 리보자임 서열을 인코딩하는 cDNA를 제2 서열로 보유한다(Chen et al., 1992; Zhao and Pick, 1993).

<157> (iii) 이들은 이들과 결합할 수 있는 다른 단백질, 예를 들면 TRAF2 하류의 세포내 시그널링 과정에 관여하는 다른 단백질을 분리, 확인 및 클론하는데 사용할 수 있다. 가령, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 서열은 효모 이중-하이브리드 시스템에 사용할 수 있는데, 여기서 인코딩된 단백질은 클론된 단백질과 결합할 수 있는 단백질을 인코딩하는 다른 서열("먹이")을 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리로부터 분리, 클론 및 확인하기 위한 "미끼"로 사용할 수 있다. 동일한 방식으로, 본 발명의 단백질이 다른 세포 단백질, 예를 들면 TNF/NGF 대과 수용체중 다른 수용체와 결합하는 지를 측정할 수 있다.

<158> (iv) 인코딩된 단백질, 이들의 유사체, 단편 또는 유도체는 또한, 동일 부류의 다른 단백질, 예를 들면 TRAF2 또는 기능적으로 관련된 단백질과 결합하고 세포내 시그널링 과정에 관여하는 단백질을 분리, 확인 및 클론하는데 사용할 수 있다. 이런 용도에서, 전술한 효모 이중-하이브리드 시스템을 활용하거나, 또는 비-엄밀한 서던 하이브리드형성 및 이후 PCR 클로닝을 이용하는 최근에 개발된 시스템(Wilks et al., 1989)을 활용할 수 있다.

<159> (v) 본 발명의 인코딩된 단백질, 이들의 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체를 이용하는 다른 방법은 이들이 결합할 수 있는 다른 단백질 또는 인자, 예를 들면 TRAF2와 관련된 단백질 또는 세포내 시그널링 과정에 관여하는 다른 단백질이나 인자를 분리 및 확인하는 친화성 크로마토그래피 방법에 이들을 이용하는 것이다. 이런 용도에서, 본 발명의 단백질, 이의 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체는 개별적으로 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 부착시키고, 이후 세포 추출물 또는 세포내 시그널링 과정에 관여하는 것으로 보이는 분리된 단백질이나 인자와 접촉시킨다. 친화성 크로마토그래피 과정이후, 본 발명의 단백질, 이들의 유사체, 단편, 유도체와 결합하는 다른 단백질 또는 인자는 용출, 분리 및 특성화할 수 있다.

- <160> (vi) 전술한 바와 같이, 본 발명의 단백질, 이들의 유사체, 단편 또는 유도체는 또한, 항체를 생산하기 위한 면역원(항원)으로 사용할 수 있다. 이들 항체는 세포 추출물로부터 또는 이를 생산하는 형질전환된 세포주로부터 본 발명에 따른 단백질의 정제에 사용할 수 있다. 이에 더하여, 이들 항체는 이들이 작용하는 수용체 시스템의 비정상적 작용, 예를 들면 과도한 또는 소극적인 TRAF2-유도된 세포 효과와 관련된 질환을 확인하는 진단 목적으로 사용할 수 있다. 따라서, 이런 질환이 본 발명의 단백질이 관여하는 세포내 시그널링 시스템의 기능장애와 연관하는 경우에, 이런 항체는 중요한 진단 도구로서 기능한다. "항체"에는 다클론항체, 단클론항체(mAbs), 키메라항체, 가용성이나 결합된 형태로 표지할 수 있는 항체에 대한 anti-Id 항체 및 이들의 단편, 예를 들면 Fab와 F(ab')₂ - 항원과 결합할 수 있는 원래항체의 Fc 단편이 결합된 단편이 포함된다.
- <161> (vii) 항체 단편을 비롯하여 본 발명에 유용한 항체는 샘플에서 본 발명의 클론, 또는 본 발명의 클론을 발현하는 세포의 존재를 정량적 또는 정성적으로 검출하는데 사용할 수 있다. 이는 광현미경, 유세포분석 또는 형광 분석 검출과 함께 형광표지된 항체를 이용한 형광면역기술로 달성할 수 있다.
- <162> 본 발명에 유용한 항체(또는 이의 단편)는 면역형광 또는 면역전자현미경에서와 같이, 본 발명에 따른 클론의 *in situ* 검출을 위하여 조직학적으로 사용할 수 있다. *in situ* 검출은 환자로부터 조직 검체를 떼어내고, 본 발명에 따른 표지된 항체를 이런 검체에 제공하여 달성할 수 있다. 항체(또는 단편)는 가급적, 표지된 항체(또는 단편)를 생물학적 샘플에 바르거나 또는 얇게 덮여있어 제공한다. 이런 과정을 활용하여, 클론의 존재뿐만 아니라 검사조직에서 이의 분포를 확인할 수 있다. 본 발명으로, 당업자는 이런 *in situ* 검출을 달성하기 위하여 임의의 다양한 조직학적 방법(예, 염색 과정)을 변형할 수 있음을 용이하게 인식할 것이다.
- <163> 본 발명의 클론에 대한 이런 분석은 일반적으로, 인코딩된 단백질을 확인할 수 있는 표지된 항체의 존재하에서 생물유체, 조직 추출물, 새로 수득된 세포(예, 림프구 또는 백혈구), 또는 조직 배양액에서 배양된 세포와 같은 생물학적 샘플을 배양하고, 당분야에 공지된 다수의 기술로 항체를 검출하는 단계로 구성된다.
- <164> (viii) 본 발명의 인코딩되는 단백질은 또한, 다른 세포내 단백질과 결합할 수 있는 능력으로 인해 다른 단백질의 간접적인 조절물질로 사용할 수 있는데, 여기서 상기 다른 세포내 단백질은 직접적으로 또 다른 세포내 단백질 또는 막통 단백질의 세포내 도메인과 결합한다.
- <165> 이들 다른 세포내 단백질 또는 막통 단백질의 세포내 도메인을 조절하기 위하여, 본 발명의 단백질은 (ii)에서 전술한 다수의 방법으로 세포에 도입할 수 있다.
- <166> 본 발명에 따른 단백질의 분리, 확인 및 특성화는 공지된 표준 스크리닝 과정으로 실시할 수 있다. 가령, 이들 스크리닝 과정중 하나인 효모 이중-하이브리드 과정을 이용하여 본 발명의 단백질을 확인할 수 있다. 유사하게, 당분야에 공지된 다른 과정, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, DNA 하이브리드형성 과정등을 이용하여 본 발명의 단백질을 분리, 확인 및 특성화하거나, 또는 본 발명의 단백질과 결합할 수 있는 추가적인 단백질, 인자, 수용체등을 분리, 확인, 특성화할 수 있다.
- <167> 이에 더하여, 본 발명의 단백질과 결합하는 것으로 밝혀진 단백질은 본원에서 밝힌 바와 같이, 본 발명의 단백질과 결합하고 관련된 시그널링 과정의 하류에 관여하는 인자를 나타내거나, 또는 이들의 시그널링 활성을 보유하여 상이한 시그널링 과정에 관여하는 단백질을 나타내는 다른 단백질, 인자등을 분리, 확인 및 특성화하는데 있어 본 발명의 단백질을 이용하는 방법과 유사한 방식으로 이용할 수 있다.
- <168> 본 발명의 DNA 서열 및 인코딩되는 단백질은 임의의 표준 제조합 DNA 과정으로 만들 수 있는데(Sambrook, et al., 1989), 여기서 적절한 진핵 또는 원핵 숙주세포는 상기 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 적절한 진핵 또는 원핵 벡터로 형질전환시킨다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 단백질의 생산을 위한 이런 발현 벡터 및 형질전환된 숙주에 관한다. 전술한 바와 같이, 이들 단백질에는 이들의 생물학적 활성단편, 유사체, 유도체가 포함되고, 따라서 이들을 인코딩하는 벡터에는 이들 단백질의 유사체와 단편을 인코딩하는 벡터가 포함되고, 형질전환된 숙주에는 이런 유사체와 단편을 생산하는 숙주가 포함된다.
- <169> 본 발명은 또한, TRAF2에 의해 매개되는 효과를 조절하기 위한 제약학적 조성물에 관한다. 상기 제약학적 조성물은 활성성분으로 다음의 성분중 한가지이상을 포함한다: (i) 적절한 발현 벡터에서 서브클론되는 본 발명에 따른 한가지이상의 DNA 서열, 또는 이들의 일부분; (ii) 본 발명에 따른 단백질, 이의 생물학적 활성단편, 유사체, 유도체 또는 이들의 혼합물; (iii) 본 발명에 따른 단백질, 이의 생물학적 활성단편, 유사체 또는 유도체를 인코딩하는 제조합 동물 바이러스 벡터.
- <170> 상기 제약학적 조성물은 치료할 질병, 체중 및 다른 고려사항에 기초하여 환자에게 유익하고 임상의가 결정한

양으로 투여한다.

- <171> 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 TRAF-결합단백질의 특정 구체예중 하나는 TRAF-2-결합단백질인 IREN이다. IREN이 TRAF2와 특이적으로 결합하고, 따라서 TRAF2의 조절물질/조절물질로서 NK-κB 활성화에서 TRAF2의 활성화를 조절/매개할 수 있고, 이런 이유로 TRAF2가 독립적으로 또는 다른 단백질(예, p55 TNF와 p75 TNF 수용체, FAS/APO1 수용체, MORT-1, RIP, TRADD)과 공동으로 기능하는 방식으로 세포 생존 경로를 조절/매개한다는 발견에 기초하여, 원하는 경우에 TRAF2-IREN 상호작용을 강화/저해할 수 있는 약물을 디자인하는 것이 중요하다. 가령, TNF에 의해 매개되는 세포독성을 조절하는 것이 필요한 경우에, TRAF-2-IREN 상호작용을 조절하여 또는 TRAF2 및/또는 IREN을 특이적으로 조절하여 NK-κB 유도를 조절하는 것이 바람직하다. 유사하게, TNF에 의해 유도된 세포독성을 조절하는 것이 필요한 경우에, TRAF2-IREN 상호작용을 조절하여 또는 TRAF2-및/또는 IREN 특이적인 NK-κB 활성화를 조절하여 NK-κB 유도를 조절하는 것이 바람직하다. 이런 약물이 상당한 도움이 되는 다수의 질환이 존재한다. 이들 질병에는 급성 간염, 여기서 간에 대한 급성 손상은 FAS 리간드의 유도이후 간세포의 FAS/APO1 수용체-매개된 사멸을 반영한다; 췌장의 β랑게르한스 세포의 죽음과 같은 자가면역-유도된 세포 사멸, 이는 당뇨병을 야기한다; 이식편 거부(신장, 심장, 간)에서 세포 죽음; 다발성 경화증으로 뇌에서 회돌기교세포의 죽음; AIDS 바이러스의 증식을 유발하고, 따라서 AIDS 질병을 야기하는 AIDS-저해된 T 세포 자살이 포함된다.
- <172> IREN, 또는 이의 생물학적 활성단편, 유사체나 단편중 한가지이상은 IREN 자체 또는 IREN-TRAF2 상호작용의 "고유" 저해물질로 작용할 수 있고, 따라서 NK-κB 활성화의 조절물질로 작용할 수 있다. 이런 이유로, 이런 조절물질은 전술한 특정 조절물질, 예를 들면 TNF의 세포독성효과를 조절하는 것이 필요한 경우에 사용되는 조절물질로 사용할 수 있다. 실제로, 하기에 예시한 바와 같이, 다양한 IREN 유사체와 뮤테인이 본 발명에 따라 분리되었는데, 이들은 NIK, NEMO, IKK-1 또는 이들의 단편에 의해 매개되고, 또한 박테리아 엔도톡신(LPS), 포르볼미리스테이트 아세테이트, HTLV-1 단백질 TAX에 의해 매개되는 NK-κB 활성화의 유도를 조절할 수 있다. 유사하게, 펩티드, 유기화합물, 항생제등과 같은 다른 물질을 스크리닝하여, TRAF2-IREN 상호작용 또는 IREN의 활성을 저해할 수 있는 특정 약물을 수득할 수 있다.
- <173> 유사한 방식으로, 전술한 다양한 상황에서 NK-κB 활성화를 조절하는 것이 필요한 경우에 전술한 다양한 표준 방법으로(예, IREN 및/또는 TRAF2를 인코딩하는 DNA를 세포에 도입하여 발현을 조절하거나, 세포로의 직접 도입을 위해 IREN 및/또는 TRAF2를 보유하는데 적합한 제형을 제조하거나, 또는 당분야에 공지된 임의의 방법으로) 세포에서 IREN 및/또는 TRAF2의 함량을 조절할 수 있다. 유사하게, 펩티드, 유기 화합물등과 같은 다른 물질을 스크리닝하여, IREN의 활성 또는 TRAF2-IREN 상호작용을 강화할 수 있는 특정 약물을 수득할 수 있다.
- <174> IREN-TRAF2 상호작용의 펩티드 조절물질을 디자인하고 스크리닝하는 무제한적 예는 ICE 또는 ICE-유사 프로테아제의 펩티드 저해물질, ICE 기질 특이성 및 펩티드 합성을 이용한 에피토프 분석 전략에 대한 기존의 연구에 기초한다. ICE에 의한 펩티드의 효과적인 절단에 필요한 최소 요건은 P₁ 위치에서 아스파르트산을 강하게 선호하는 절단 위치의 좌측에 위치한 4개의 아미노산과 관계하고, P₁ 위치의 우측은 메틸아민으로 충분하다는 것이 밝혀졌다(Sleath et al., 1990; Howard et al., 1991; Thornberry et al., 1992). 또한, 형광발생성 기질 펩티드(테트라펩티드), 아세틸-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-메틸-코마릴-7-아미드)[약어 Ac-DEVD-AMC]는 FAS-R 자극 및 다른 아파토시스 과정 직후에 세포에서 절단되는 것으로 밝혀진 폴리(ADP-리보즈) 중합효소(PARP)상의 서열과 상응하고(Kaufmann, 1989; Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994), CPP32(CED/ICE 프로테아제군의 원소)와 MACH 프로테아제에 의해 효과적으로 절단된다.
- <175> 기질의 P1 위치에 Asp가 중요한 것으로 보이기 때문에, 4번째 아미노산 잔기로 Asp를 가지고 처음 3개 잔기위치에서 다양한 아미노산 조합을 보유하는 테트라펩티드는 Gelyson(Geysen, 1985; Geysen et al., 1987)이 개발한 방법으로, 프로테아제의 활성부위와의 결합을 스크리닝하는데, 여기서 항체와 특이적인 상호작용하는 고품 지지체상의 다수 펩티드가 스크리닝되었다. 특정 펩티드와 MACH 프로테아제의 결합은 방사능표지와 같은 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 검출할 수 있다. Geysen의 방법으로, 하루 일과시간동안 적어도 4000펩티드를 테스트할 수 있다.
- <176> 유사한 방식으로, TRAF2와 IREN(또는 임의의 다른 TRAF 단백질과 TRAF-결합단백질)사이의 상호작용을 결정하는 정확한 결합 영역 또는 상동성 영역을 밝히고, 이후 이런 상호작용을 차단할 수 있는 펩티드, 예를 들면 TRAF2(또는 TRAF)와의 결합에 대하여 고유 IREN(또는 TRAF-결합단백질)과 결합할 수 있는 결합 영역 또는 이의 상동성 영역의 서열과 유사한 서열을 보유한 합성 펩티드를 스크리닝할 수 있다.

- <177> 세포내 시그널링 경로의 다른 원소, 예를 들면 CED3/ICE 프로테아제군의 원소인 세포 사멸 경로의 MACH 프로테아제가 관여하는 생리적인 세포 사멸 과정을 간섭하지 않고 TRAF2-IREN(또는 TRAF-TRAF 결합단백질) 상호작용을 선택적으로 저해하는 펩티드 저해물질을 디자인하는 것이 유리하기 때문에, 전술한 것과 같은 분석에서 TRAF2(또는 TRAF)나 IREN(또는 TRAF-결합단백질)은 TRAF2/IREN(또는 TRAF/TRAF-결합단백질)에 특이적인 것만을 선별하기 위한 다른 단백질과의 선택적 결합을 검사할 수 있는 형광발생성 기질 펩티드로 추가 합성할 수 있다. 예로써 TRAF2/IREN에 특이적인 것으로 확인된 펩티드는 이후, 세포 투과성을 강화하고 가역적 또는 비가역적으로 TRAF2 및/또는 IREN의 활성을 저해하기 위하여 변형할 수 있다. Thornberry등(1994)은 테트라펩티드(아실옥시) 메틸 케톤Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CH₂OC(O)-[2,5-(CF₃)₂] Ph가 ICE의 강력한 불활성화물질이라고 보고하였다. 유사하게, Milligan등(1995)은 클로로메틸케톤(비가역적) 또는 알데하이드(가역적)기를 보유하는 테트라펩티드가 ICE를 저해한다고 보고하였다. 또한, 벤질옥시카르복실-Asp-CH₂OC(O)-2,6-디클로로벤젠(DCB)은 ICE를 저해하는 것으로 밝혀졌다(Mashima et al., 1995). 따라서, 유사한 방식으로 TRAF2 또는 IREN과 선택적으로 결합하는 테트라펩티드는 알데하이드기, 클로로메틸케톤, (아실옥시)메틸 케톤 또는 CH₂OC(O)-DCB기로 변형하여 TRAF2/IREN 활성의 펩티드 저해물질을 만들 수 있다. 이에 더하여, 투과성을 향상시키기 위하여 펩티드는 화학적으로 변형하거나 유도체화시키는데, 이는 이들의 세포막 투과성을 강화시키고 이런 펩티드가 막을 통과하여 세포질로 이동하는 것을 용이하게 한다. Muranishi등(1991)은 라울산으로 티로트로핀-방출 호르몬을 유도체화시키면 상당한 세포막 투과성을 갖는 지질친화성 라우로일 유도체가 만들어진다고 보고하였다. Zacharia등(1991) 역시 메티오닌을 설펍시드로 산화시키고 펩티드 결합을 케토메틸렌 이소에스테르(COCH₂)로 치환시키면 세포막을 통한 펩티드의 전달이 용이해진다고 보고하였다. 이들은 당업자에게 공지된 변형체와 유도체의 일부다.
- <178> 또한, IREN-TRAF2 상호작용 및 유사하게 TRAF 단백질과 TRAF-결합단백질의 상호작용을 저해하여 IREN의 활성을 저해할 수 있는 약물 또는 펩티드 저해물질은 세포로의 진입을 용이하게 하는 분자와 공액 또는 복합할 수 있다.
- <179> 미국 특허 5,149,782에서는 세포막을 통하여 전달되는 분자와 융합유발성(fusogenic) 폴리펩티드, 이온-채널 형성 폴리펩티드, 다른 막 폴리펩티드, 긴 사슬 지방산(예, 미리스트산, 팔미트산)과 같은 막 혼합제를 공액시키는 방법을 개시한다. 이와 같은 막 혼합제는 세포막의 지질 이중층으로 분자 공액체를 삽입하고, 이들의 세포질로의 진입을 용이하게 한다.
- <180> Low등(미국 특허 5,108,921)은 수용체 매개된 엔도사이토시스 활성의 기전에 의해 단백질 및 핵산을 포함하는 이온 교환수지 않는 분자를 막을 통하여 수송하는 방법을 검토한다. 이들 수용체 시스템에는 갈락토스, 만노스, 만노스 6-포스페이트, 트랜스페린, 아시알로글리코프로테인, 트란스코발민(비타민 B₁₂), α-2 마크로글로불린, 인슐린, 다른 펩티드 성장 인자(예, 상피 성장 인자(EGF))를 인식하는 시스템이 포함된다. Low등은 비오틴 및 엽산염(folate)에 대한 수용체와 같은 영양 수용체를 이용하여 세포막을 통한 수송을 강화시킬 수 있다고 지적하였는데, 이것은 대부분의 세포 표면에서 비오틴과 엽산염의 위치와 다중성 및 다른 관련된 수용체 매개의 막통 전달 과정에 기인한다. 따라서, 세포질로 전달되는 화합물 및 비오틴 또는 엽산염과 같은 리간드 사이에 형성된 복합체는 비오틴 또는 엽산염 수용체를 보유한 세포막과 접촉시켜, 수용체 매개된 막통 전달 기전을 개시시키고, 따라서 원하는 화합물이 세포안으로 들어가도록 한다.
- <181> ICE는 P₂위치에서 자유로운 치환을 관용하는 능력을 보유한 것으로 알려져 있는데, 이런 관용은 비오틴 태그를 갖는 강력하고 고도로 선택적인 친화성 라벨을 개발하는데 이용되었다(Thornberry et al., 1994). 결과적으로, P₂위치 및 테트라펩티드 저해물질의 N-말단은 비오틴 분자의 첨가와 같이 변형 또는 유도체화시킬 수 있는데, 이는 이들 펩티드 저해물질의 세포막 투과성을 증가시킨다.
- <182> 이에 더하여, 당분야에 공지된 바와 같이 원하는 펩티드 서열과 리더/시그널 펩티드 서열을 융합하여 "키메라 펩티드"를 만들 수 있는데, 이런 "키메라 펩티드"는 세포막을 통하여 세포질로 이동하게 된다.
- <183> 펩티드 분야에 통상의 지식을 가진 자가 인지하는 바와 같이, TRAF-TRAF-결합단백질 상호작용, 예를 들면 본 발명에 따른 TRAF2-IREN 상호작용의 펩티드 저해물질에는 펩티드 유사 약물 또는 저해물질이 포함되는데, 이들은 좀더 안정적인 저해물질을 디자인하기 위하여, TRAF2/IREN과의 결합에 대하여 신속하게 스크리닝할 수 있다.
- <184> 전술한 것과 같이, 세포막을 통한 펩티드 저해물질의 수송을 실행하거나 또는 강화하기 위한 동일한 수단은 TRAF-결합단백질, 예를 들면 IREN, 이의 유사체, 단편 또는 동소체 및 세포내에서 효과를 발휘하는 다른 펩티드와 단백질에 적용할 수 있다.

- <185> 명세서 전반에서 언급된 "항체"에는 다클론항체, 단클론항체(mAbs), 키메라 항체, 가용성 또는 결합된 형태로 표지할 수 있는 항체에 대한 항-이디오타입(항-Id) 항체 및 효소 절단, 펩티드 합성 또는 재조합 기술등과 같은 임의의 공지된 기술로 만들 수 있는 이들의 단편이 포함된다.
- <186> 다클론항체는 항원으로 면역한 동물의 혈장으로부터 유래된 항체 분자의 이형이질성 집단이다. 단클론항체는 항원에 특이적인 실질적으로 동질한 항체 집단을 의미하는데, 이들 집단은 실질적으로 유사한 에피토프 결합 부위를 갖는다. MAbs는 당분야에 공지된 임의의 공지된 방법으로 획득할 수 있다(Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975); 미국 특허 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory(1988); and Colligan et al., eds, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y.,(1992-199)). 이런 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, GILD, 이의 아종을 포함하는 임의의 면역글로불린이다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마는 *in vitro*, *in vivo*, *in situ*에서 배양할 수 있다. *in vivo* 또는 *in situ*에서 고역가의 mAb 생산이 적절한 방법이다.
- <187> 키메라 항체는 상이한 영역이 다른 동물종으로부터 유래된 분자, 예를 들면 뮤린(murin) mAb에서 유래된 가변영역과 사람 면역글로불린 불변영역을 보유한 분자다. 일차적으로, 키메라 항체는 면역원성을 감소시키고 생산성을 증가시키는데 이용하는데, 예를 들면 사람/뮤린 키메라 mAb를 이용하는 경우에 뮤린 mAb는 하이브리도마로부터 높은 산출량을 갖고 사람에서는 높은 면역원성을 가진다. 키메라 항체 및 이를 생산하는 방법은 당분야에 공지되어 있다(Cabily et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277(1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646(1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270(1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496(published Feb 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494(published Mar 13, 1996); Kudo et al., European Patent Application 184187(published June 11, 1986); Sahagan et al., J. Immunol 137:1066-1074(1986); Robinson et al., International Patent Application No. Wo 8702671(published May 7, 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443(1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84-214-218(1987); Better et al., Science 240:1041-1043(1988) and Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, supra).
- <188> 항-이디오타입(항-Id) 항체는 항체의 항원 결합 부위와 일반적으로 관련된 독특한 결정 부위를 인식하는 항체다. Id 항체는 항-Id이 만들어지는 mAb 공급원으로 동일 종과 동일한 유전자형의 동물(가령, 생쥐)을 면역하여 만들 수 있다. 면역된 동물은 이들 이디오타입 항원결정기에 대한 항체(항-Id 항체)를 만들어, 면역화 항체의 이디오타입 항원결정기를 인지하고 이와 반응하게 된다(미국 특허 4,699,880).
- <189> 항-Id 항체는 또한, 다른 동물에서 면역 반응을 유도하기 위한 "면역원"으로 사용하여, 이른바 항-항-Id 항체를 생산할 수 있다. 항-항-Id는 항-Id를 유도한 원래 mAb와 에피토프가 동일하다. 따라서, mAb의 이디오타입 항원결정기에 대한 항체를 이용하여, 동일한 특이성의 항체를 발현하는 다른 클론을 확인할 수 있다.
- <190> 따라서, 본 발명의 IREN, 유사체, 단편 또는 유도체에 대하여 발생된 mAb을 이용하여, BALB/c 생쥐와 같은 적절한 동물에서 항-Id 항체를 유도할 수 있다. 이런 면역된 쥐의 체장 세포를 이용하여, 항-Id mAb를 분비하는 항-Id 하이브리드를 생산한다. 또한, 항-Id mAb를 키홀 림페트 헤모시아닌(KLH)에 결합시켜, 추가적인 BALB/c 쥐를 면역할 수 있다. 이들 쥐의 혈청은 상기 IREN 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체의 에피토프에 특이적인 고유 mAb의 결합 성질을 보유하는 항-항-Id 항체를 함유한다.
- <191> 따라서, 항-Id mAb는 자체의 이디오타입 에피토프, 또는 GRB 단백질-a와 같은 평가할 에피토프와 구조적으로 유사한 "이디오프(idiotopes)"를 가진다.
- <192> "항체"에는 고유 분자뿐만 아니라 Fab, F(ab')₂와 같은 단편이 포함되는데, 이들은 항원과 결합할 수 있다. Fab와 F(ab')₂ 단편은 고유 항체의 Fc 단편이 결핍되어, 순환계로부터 더 빨리 제거되고 고유 항체보다 비-특이적인 조직 결합이 적다(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325(1983)).
- <193> 인지하는 바와 같이, Fab와 F(ab')₂ 및 본 발명에 유용한 다른 항체 단편은 고유 항체 분자에 대하여 본 발명에서 개시한 방법에 따른 IREN 단백질의 탐지 및 정량에 사용할 수 있다. 이런 단편은 일반적으로, 파파인(Fab 단편을 만들) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 만들)과 같은 효소를 이용한 단백질 분해로 만들 수 있다.
- <194> 항체가 분자에 특이적으로 반응하여 분자와 항체가 결합하는 경우, 항체는 분자와 "결합할 수 있다"라고 한다.

"에피토프"는 항체에 의해 인지되고, 항체와 결합할 수 있는 임의 분자의 영역을 말한다. 에피토프 또는 "항원 결정부위"는 일반적으로, 아미노산 또는 당의 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면기로 구성되고 특이적인 3차원 구조 특성 및 특이적인 전하 특성을 가진다.

- <195> "항원"은 항체와 결합할 수 있는 분자 또는 분자의 일부본인데, 이들은 동물이 상기 항원의 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 생산하도록 유도할 수 있다. 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 전술한 특이적인 반응은 매우 선택적인 방식으로, 항원이 상응하는 항체에 반응하고, 다른 항원에 의해 야기된 다른 항체와는 반응하지 않는다는 것을 의미한다.
- <196> 항체의 일부분을 비롯하여 본 발명에 유용한 항체는 샘플에서 IREN 단백질을 정량적 또는 정성적으로 탐지하거나, 또는 본 발명의 IREN 단백질을 발현시키는 세포의 존재를 확인하는데 사용할 수 있다. 이것은 광현미경, 유세포분석 또는 형광분석 검출과 함께, 형광표지된 항체(하기 참조)를 이용한 면역형광 기술로 달성할 수 있다.
- <197> 본 발명에 유용한 항체(또는 이의 단편)는 본 발명에 따른 IREN 단백질의 *in situ* 검출을 위하여, 면역형광 또는 면역전자 현미경에서와 같은 조직학적 방법에 이용한다. *In situ* 검출은 환자에서 조직검체를 떼어내고, 본 발명의 표지된 항체를 상기 검체에 제공하여 달성할 수 있다. 항체(또는 이의 단편)는 가급적, 생물학적 샘플에 표지된 항체(또는 이의 단편)를 바르거나 또는 얇게 덮어씌워 제공한다. 이와 같은 과정을 이용하여, IREN 단백질의 존재뿐만 아니라 검사조직에서 이의 분포를 확인할 수 있다. 본 발명을 이용하여, 당업자는 광범위한 다수의 조직학적 방법(가령 착색 과정)을 변형하여 이런 *in situ* 탐지를 성취할 수 있다.
- <198> 본 발명에 따른 IREN 단백질에 대한 분석은 일반적으로, 인코딩된 단백질을 확인할 수 있는 표지된 항체의 존재 하에서 생물유체, 조직 추출물, 새로 수득된 세포(예, 림프구 또는 백혈구), 또는 조직 배양액에서 배양된 세포와 같은 생물학적 샘플을 배양하고, 당분야에 공지된 다수의 기술로 항체를 검출하는 단계로 구성된다.
- <199> 생물학적 샘플은 니트로셀룰로오즈와 같은 고형상 지지체나 담체, 또는 세포, 세포 입자 혹은 가용성 단백질을 고정시킬 수 다른 지지체나 담체로 처리한다. 이후, 지지체 또는 담체는 전술한 바와 같이 적절한 완충액으로 세척하고, 본 발명에 따른 표지된 항체로 처리한다. 그 다음, 상기 고형상 지지체 또는 담체는 완충액으로 한 번 더 세척하여, 결합안된 항체를 제거한다. 이후, 고형상 지지체 또는 담체에 결합된 라벨의 양은 통상적인 수단으로 검출한다.
- <200> "고형상 지지체", "고형상 담체", "고형 지지체", "고형 담체", "지지체" 또는 "담체"는 항원 또는 항체가 결합할 수 있는 임의 지지체 또는 담체를 의미한다. 공지된 지지체 또는 담체에는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나이론 아밀라제, 천연 또는 변형된 셀룰로오즈, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철광이 포함된다. 담체의 특성은 본 발명의 목적에 맞게, 어느 정도 가용성 또는 불용성일 수 있다. 지지체 물질은 결합 분자가 항원 또는 항체와 결합할 수 있는 한도내에서, 실제로 거의 모든 구조적 형태가 가능하다. 따라서, 지지체 또는 담체 형태는 비드에서와 같은 원형, 시험관의 내부에서와 같은 실린더형 또는 막대의 외부표면이 될 수 있다. 대안으로, 표면은 쉬트, 테스트 스트립등과 같은 편평한 형태일 수 있다. 적절한 지지체 또는 담체에는 폴리스테렌 비드가 포함된다. 당업자는 항원 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 공지된 적절한 담체를 이용하거나 또는 일상적인 실험을 통하여 이를 결정할 수 있다.
- <201> 전술한 바와 같이, 본 발명의 임의 항체에 대한 결합 활성은 공지된 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 당업자는 통상적인 실험으로, 각 측정에 적합한 실험 조건을 결정할 수 있다.
- <202> 세척, 교반, 혼합, 여과등과 같은 다른 단계는 특정 상황에 맞게 분석과정에 추가할 수 있다.
- <203> 본 발명에 따른 항체를 표지할 수 있는 방법중 한가지 방법은 상기 항체와 효소를 결합시키고, 이를 효소면역분석(EIA)에 사용하는 것이다. 이후, 이런 효소가 적절한 기질에 노출되면 상기 기질과 반응하게 되는데, 여기서 분광광도법, 형광분석 또는 다른 가시적 수단등으로 검출할 수 있는 화학적 성분이 만들어진다. 항체를 검출가능하도록 표지하는데 사용할 수 있는 효소에는 말레이트 디하이드로게나제, 스타필로코커스 핵산분해효소, 델타-5-스테로이드 이소메라제, 이스트 알코올 디하이드로게나제, 알파-글리세로포스페이트 디하이드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소메라제, 양고추냉이 과산화효소, 알칼리 포스포타제, 아스파라기나제, 포도당 산화효소, 베타-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 유리아제, 카탈라제, 포도당-6-포스페이트 디하이드로게나제, 글루코아밀라제, 아세틸콜린-에스테라제가 포함되지만, 이들에 국한시키지 않는다. 검출은 효소에 대한 발색 기질을 이용한 비색 방법으로 달성할 수 있다. 검출은 또한, 유사하게 준비된 표준과 기질의 효소반응의 정도를 가시적으로 비교하여 달성할 수 있다.

- <204> 검출은 다양한 다른 면역분석을 이용하여 달성할 수 있다. 가령, 항체 또는 항체 단편에 방사성 표지하여, 방사능 면역분석(RIA)으로 R-PTPase를 검출할 수 있다. RIA에 대해서는 Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY(1978), 특히 "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques" by Chard. T.에서 상세하게 설명하고 있다. 방사성 에피토프는 카운터, 신틸레이션 카운터 또는 자가방사사진등으로 검출할 수 있다.
- <205> 또한, 본 발명에 따른 항체는 형광화합물로 표지할 수 있다. 형광표지된 항체가 적절한 파장의 빛에 노출되면, 형광으로 인해 이의 존재를 확인할 수 있다. 흔히 이용되는 형광표지 화합물에는 플루레신 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리틴, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데히드 및 플로레스카민등이 포함된다.
- <206> 또한, 항체는 ¹⁵²E 또는 다른 란타니드 시리즈와 같은 형광방출 금속으로 표지할 수 있다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(ETPA)과 같은 금속 킬레이트기를 이용하여 항체와 부착시킬 수 있다.
- <207> 또한, 항체는 화학적 발광화합물과 결합시켜, 검출가능하게 표지할 수 있다. 이후, 화학적 발광화합물-태그된 항체는 화학 반응동안에 발생하는 발광의 존재를 검출하여 확인할 수 있다. 특히 유용한 화학적 발광 표지화합물의 예로는 루미놀, 이소루미놀, 트레오마틱 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리딘염 및 옥살레이트 에스테르를 들 수 있다.
- <208> 유사하게, 생물발광 화합물을 이용하여, 본 발명의 항체를 표지할 수 있다. 생물발광은 생물계에서 볼 수 있는 일종의 화학적 발광으로, 여기서 촉매 단백질은 화학발광 반응의 효율을 증가시킨다. 생물발광 단백질의 존재는 발광을 검출하여 확인한다. 표지 목적으로 중요한 생물발광 화합물은 루시페린, 루시페라제, 에쿠오린이다.
- <209> 본 발명의 항체 분자는 "이중-위치" 또는 "샌드위치" 분석으로 알려진 면역측정 분석에 이용할 수 있다. 일반적인 면역측정 분석에서, 일정량의 표지안된 항체(또는 항체의 단편)를 고정 지지체 또는 담체에 결합시키고 일정량의 검출가능하게 표지된 가용성 항체를 첨가하면, 고정상 항체, 항원, 표지된 항체사이에 형성된 3자 복합체를 검출 및/또는 정량할 수 있다.
- <210> 일반적인 그리고 적절한 면역측정 분석에는 "선행" 분석이 포함되는데, 여기서 고정상에 결합된 항체는 먼저 검사샘플과 접촉시켜, 이중 고정상 항체-항원 복합체 형성으로 샘플로부터 항원을 추출한다. 적당한 배양기간 이후에, 고정 지지체 또는 담체는 세척하여 반응하지 않은 항원을 비롯한 유체 샘플의 잔류물을 제거하고, 이후 함량을 알지 못하는 표지된 항체(이는 "리포터 분자"로 작용함)를 함유하는 용액과 접촉시킨다. 표지된 항체가 고정 지지체 또는 담체와 결합된 항원과 복합체를 형성하는 제2 배양기간 이후에, 고정 지지체 또는 담체는 한 번 더 세척하여 반응하지 않은 표지된 항체를 제거한다.
- <211> 본 발명의 항원에 유용하게 활용할 수 있는 다른 형태의 "샌드위치" 분석은 소위 "동시" 또는 "역행" 분석을 이용한다. 동시 분석은 고정 지지체 또는 담체에 결합된 항체 및 표지된 항체를 검사샘플에 동시에 첨가하는 단일 배양 단계로 구성된다. 배양이 완료된 후에, 고정 지지체 또는 담체를 세척하여 유체 샘플 잔류물 및 결합하지 않은 표지된 항체를 제거한다. 고정 지지체 또는 담체와 결합된 표지된 항체는 "선행" 샌드위치 분석에서와 같이 확인한다.
- <212> "역행" 분석에서, 먼저 표지된 항체 용액을 조금씩 유체 샘플에 첨가하고, 이후 적당히 배양한 후 고정 지지체 또는 담체와 결합된 표지안된 항체를 첨가한다. 2차 배양 후, 고정상은 통상의 방식으로 세척하여 검사샘플의 잔류물 및 반응하지 않은 표지된 항체 용액을 제거한다. 이후, 고정 지지체 또는 담체와 결합된 라벨된 항체는 "동시" 또는 "선행" 분석에서와 같이 확인한다.
- <213> 진술한 바와 같이, 본 발명은 또한 IREN 단백질을 인코딩하는 재조합 동물 바이러스 벡터를 포함하는 제약학적 조성물에 관한데, 상기 벡터는 IREN 단백질 서열의 세포 삽입을 주도하는 특정 표적세포(예, 암세포) 표면 단백질과 결합할 수 있는 바이러스 표면 단백질을 인코딩한다. 이에 더하여, 본 발명의 제약학적 조성물은 활성 성분으로, (a) IREN 단백질 서열의 안티-센스 서열을 인코딩하는 올리고뉴클레오티드 또는 (b) IREN 단백질-TRAF2 상호작용을 차단하는 약물을 포함한다.
- <214> 본 발명에 따른 제약학적 조성물은 의도한 목적을 달성하는데 충분한 양의 활성성분을 함유한다. 또한, 제약학적 조성물은 당분야에 공지된 부형제와 보조제로 구성되는 제약학적으로 수용가능한 적당한 담체를 포함하는데, 상기 부형제와 보조제는 활성성분의 제약학적 조성물로의 가공을 용이하게 하고, 이를 필요로 하는 개체에 투여 시 이런 조성물을 안정화시킬 수 있다.

- <215> IREN 단백질 및 이의 동소체 또는 이소타입은 전술한 바와 같이 세포내 시그널링 경로에 관여하는 다양한 다른 단백질의 발현과 유사한 방식으로, 상이한 이소타입 패턴 및 현저하게 상이한 수준으로 상이한 조직에서 발현되는 것으로 보인다. 이런 차이는 Fas/AP01-리간드와 TNF에 대한 조직-특이적 반응 특성의 원인이 될 수 있다. 다른 CED3/ICE 유사체의 경우와 같이(Wanh et al.,; Alnemri et al., 1995), 불완전한 CED3/ICE 영역(가령, MACH α3)을 포함하는 MACH 동소체는 동시 발현된 MACH α1 또는 MACH α2 분자의 활성화에 저해효과를 갖는 것으로 밝혀졌다; 이들은 또한 Fas/AP01과 p55-R에 의한 사멸 유도를 차단하는 것으로 밝혀졌다. 세포에서 이런 저해성 동소체의 발현은 Fas/AP01-와 TNF-매개된 세포독성에 대한 세포의 자가-방어 기전을 구성할 수 있다. CED3/ICE군의 임의 다른 프로테아제에서 관찰되는 이형이질성을 훨씬 초과하는 MACH 동소체의 폭넓은 이형이질성(heterogeneity)으로 인하여, 활성 MACH 동소체 기능을 매우 정교하게 조절할 수 있다.
- <216> 본 발명에는 또한, TRAF2-결합단백질 IREN의 분리된 유사체/뮤테인이 포함된다. IREN 분자의 결실 뮤테인과 같은 일부 IREN 유사체/뮤테인(하기 실시예 참조)은 NF-κB 활성화를 조절한다. 전술한 바와 같이, IREN 단백질 또는 이의 가능 동소체는 TRAF 단백질과의 상호작용 및 이에 따른 TRAF 단백질 활성화에 대한 작용, 또는 TRAF 단백질에 의해 매개되는 세포내 시그널링의 측면에서, 상이한 조직에 다양한 효과를 미친다.
- <217> 또한, 가능한 IREN 동소체의 일부는 다른 기능을 할 수 있다. 가령, IREN, 일부 IREN 유사체 또는 동소체는 TRAF2와의 상호작용을 통하여 또는 TRAF2와 독립적으로 Fas/AP01과 TNF 수용체의 다른 비-세포독성 효과에 관여하는 분자의 결합 부위로 작용한다.
- <218> 세포 사멸의 원인이 되는 Fas/AP01과 TNF 수용체의 독특한 능력 및 다른 조직-손상 활성을 자극하는 TNF 수용체의 능력으로 인하여, 이들 수용체의 기능에서 변형은 유기체에 상당히 유해하다. 실제로, 이들 수용체의 과도한 또는 소극적 기능은 다양한 질병의 병인의 원인이 된다(Vassalli, 1992, Nagata and Golstein, 1995). 수용체의 시그널링 활성화에 참여하는 분자를 확인하고, 이들 분자의 활성을 조절하는 방법을 발견하는 것은 새로운 치료요법의 방향을 제시할 수 있다. NF-κB 활성화의 조절에서 TRAF 단백질(예, TRAF2)의 역할 및 이에 따른 TRAF2-IREN 상호작용의 측면에서, 세포를 죽이는 것이 바람직한 경우(NF-κB 활성화 저해) 및 반대로 세포를 보존하는 것이 바람직한 경우(NF-κB 활성화 강화)에 TRAF2-IREN 상호작용을 조절할 수 있는 약물을 디자인하는 것이 특히 중요하다.
- <219> 또한, 본 발명은 본 발명에 다른 IREN 단백질과 결합하고, 따라서 IREN 단백질의 활성을 조절/매개할 수 있는 단백질 또는 다른 리간드에 관한다. 이런 단백질 또는 리간드는 전술한 임의의 방법으로 스크리닝, 분리 및 생산할 수 있다. 가령, 단백질을 비롯하여 본 발명에 따른 IREN 단백질과 결합할 수 있는 다수의 신규한 리간드를 분리할 수 있다(이런 신규한 단백질/리간드에서 공지된 TRAF2와 TRAF1은 제외한다).
- <220> 전술한 바와 같이, 이런 신규한 IREN 단백질-결합단백질/리간드, 예를 들면 IREN-결합단백질은 IREN-매개된 활성 또는 TRAF2-IREN 상호작용에 의해 매개된 활성의 저해물질 또는 강화물질로 작용할 수 있고, 따라서 전술한 다양한 병리학적 상황에서 중요한 역할을 수행하게 된다. 이런 IREN 단백질-결합단백질/리간드는 또한, 친화성 크로마토그래피에 의한 IREN 단백질의 정제에서 특정 약물로 기능하는데, 여기서 이들 신규한 결합단백질/리간드는 적당한 크로마토그래피 매트릭스에 부착되어 고정 또는 친화성 지지체/매트릭스를 형성하고, 이런 매트릭스를 통하여 IREN을 함유하는 용액, 추출물등이 정제되게 된다.
- <221> 유사하게, 본 발명에 따른 전술한 IREN 단백질, 유사체, 단편, 동소체, 유도체는 자신들과 결합하는 다양한 TRAF 단백질을 친화성 크로마토그래피로 정제하는데 사용할 수 있다. 가령, IREN, 이의 유사체, 단편, 뮤테인은 TRAF2의 친화성 크로마토그래피 정제에 사용할 수 있다.
- <222> 본 발명은 다음의 무제한적 실시예 및 첨부된 도면에서 좀더 자세하게 설명한다.
- <223> i) 이중-하이브리드 스크리닝 및 이중-하이브리드 β-갈락토시다제 발현 검사; (ii) 단백질의 유도된 발현, 대사표지, 면역침전; (iii) *in vitro* 결합; (iv) 세포독성의 평가; (v) 노란 분석 및 서열 분석 및 다음의 실시예에 활용되는 다른 과정은 다른 세포내 시그널링 단백질과 경로와 관련하여 본원 발명자들에 의한 이전 간행물에 자세히 설명되어 있다(예, Boldin et al., 1995a, 1995b; Boldin et al., 1996). 이들 과정은 또한, 이스라엘 출원 114615, 114986, 115319, 116588, 117932, 120367 및 상응하는 PCT 출원 PCT/US96/10521에서 상세하게 설명되어 있다. 따라서, 이들 간행물 및 특허 출원은 적어도 상세한 실험과정과 관련하여, 본원에 완전히 포함된다.

실시예

- <224> **재료 및 방법**
- <225> i) cDNA 라이브러리
- <226> a) B-세포 cDNA 라이브러리
- <227> 사람 B 세포로부터 작제된 올리고 dT 라이브러리를 사용한다(Durfee et al., 1993). 상기 라이브러리의 cDNA는 GAL4 활성화 도메인과 융합시키고 pACT 기초한 벡터 pSE1107의 XhoI 위치에 삽입한다.
- <228> b) λ gt10 고회환 cDNA 라이브러리
- <229> 사람 고회환의 cDNA 라이브러리를 사용한다. 상기 라이브러리는 평균 200 내지 400 bp의 삽입 크기의 임의 핵사 뉴클레오티드 라이브러리이다.
- <230> ii) 효모 균주
- <231> 형질전환 및 스크리닝을 위한 숙주로 2개의 효모 균주를 사용한다: 이중-하이브리드 스크리닝에 사용되는 HF7c 균주 및 β -갈락토시다제 분석에 사용되는 SFY526. 양 균주는 영양요구성 마커 trp1와 leu2를 보유한다, 다시 말하면 이들 효모 균주는 이들 유전자의 야생형(TRP1, LEU2)을 보유한 플라스미드에 의해 형질전환되지 않는 경우에, 트립토판과 루이신이 결핍된 최소영양배지에서 성장할 수 없다. 이들 효모 균주는 GAL4와 GAL80 유전자에 결실 돌연변이(각각, gal4-542와 gal80-538 돌연변이)를 보유한다.
- <232> SFY526과 HF7c 균주는 유전형에 lacZ 리포터를 보유한다; SFY526 균주에서 GAL1 프로모터의 UAS와 TATA 영역 및 HF7c에서 CYC1 프로모터의 GAL4 17-mer 공통 서열의 사본 3개와 TATA 영역이 lacZ와 융합된다. GAL1 UAS와 GAL4 17-mer 모두 GAL4 전사활성물질에 반응한다. 이에 더하여, HF7c 균주는 GAL1 프로모터의 UAS와 TATA 영역에 융합된 HIS3 리포터를 보유한다.
- <233> iii) 사람 TRAF2의 클로닝
- <234> 사람 TRAF2는 HL60 cDNA 라이브러리로부터 PCR로 클론한다(Rothe et al., 1994; Rothe et al., 1995a, Cheng et al., 1996; Hsu et al., 1996; Wallach, 1996). 사용된 프라이머는 다음과 같다: a) 제1 메티오닌(밀줄)에 대한 코돈에서부터 시작하고 BamHI 위치를 갖는 링커를 포함하는 hTRAF2의 코딩 서열에 상응하는 30-mer 선형 프라이머 CAGGATCCTCATGGCTGCAGCTAGCGTGAC (SEQ ID NO:1); b) hTRAF2 유전자 종결코돈(밀줄) 및 링커에 SalI 제한위치를 포함하는 32-mer 역행 프라이머 GGTGCACTTAGAGCCCTGTGACGGTCCACAATG (SEQ ID NO:2). PCR 프로그램은 94°C에서 2분동안 초기 변성 및 30 사이클의 94°C에서 1분, 64°C에서 1분과 72°C에서 40초로 구성된다. 이후, 증폭된 사람 TRAF2는 GAL4 DNA 결합도메인과 공액된 pGBT9 벡터의 BamHI-SalI 위치에 삽입한다.
- <235> iv) B-세포 라이브러리의 이중 하이브리드 스크리닝
- <236> 이중-하이브리드 스크리닝은 "미끼"로 작용하는 특정 분자와 관련된 인자를 확인하는데 사용되는 기술이다(전술한 간행물과 특허 출원 참조). 본 발명에서, pGBT9로 클론된 TRAF2는 미끼로 이용한다. TRAF2는 효모 균주 HF7c에서 스크리닝된 B-세포 cDNA 라이브러리와 함께 동시-발현시킨다. PCR-클론된 TRAF2는 CAL4 DNA-결합도메인과의 제조할 융합체이고, 스크리닝된 cDNA 라이브러리는 pSE1107 벡터에서 GAL4 활성화 도메인과 융합시킨다. HF7c에서 리포터 유전자는 GAL4 전사활성화물질과 반응하는 GAL1 프로모터에서, 상류 활성화 서열(UAS)에 융합된 HIS3이다. pGBT9와 pSE1107 플라스미드를 모두 보유하는 형질전환체는 트립토판과 루이신이 없는 평판에서 성장시켜 스크리닝한다. 2단계에서, 서로 상호작용하는 이중 하이브리드 단백질을 발현하고, 따라서 GAL1-HIS3을 활성화시키는 양성 클론은 트립토판, 루이신과 히스티딘이 결핍되고 50mM 3-아미노트리아졸(3AT)을 함유하는 평판에서 선별한다.
- <237> v) β -갈락토시다제 분석
- <238> 이중-하이브리드 스크리닝에서 선택된 양성 클론은 Clontech Laboratories의 매뉴얼에 따라, SFY526 효모 세포에서 lacZ 발색 검사를 실시한다. 간단히 말하면, 형질전환체는 2mm 직경에 도달할 때까지 30°C에서 2-4일동안 배양하고, 이후 휘트만 필터로 옮긴다. 필터는 세포를 투과시키기 위하여 동결/해동 처리하고, 이후 0.33mg/ml X-gal과 0.35 mM β -말캅토에탄올을 함유하는 완충액(15.1mg/ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5.5 mg/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.75mg/ml KCl; 0.75mg/ml $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH=7)에 적신다. 콜로니는 푸른색의 발색을 모니터하는데, 이는 β -갈락토시다제의 유도를 시사한다.

- <239> vi) 클론된 cDNA의 발현
- <240> 2종류의 발현 벡터를 작제한다:
- <241> a) 헤마글루티닌(HA) 에피토프와 융합되고 IREN의 개방해독틀(ORF)을 보유하는 pUHD10-3 기초한 벡터.
- <242> b) 클론된 TRAF2의 바로 앞에 FLAG 옥타펩티드 서열이 도입된 pUHD10-3 기초한 벡터(FLAG/B6/TRAF2).
- <243> IREN의 ORF를 보유하는 구조체는 표준 칼슘-포스페이트 방법으로(Current Protocols in Molecular Biology, eds, Ausubel, F.M et al.), 단독 또는 FLAG/B6/TRAF2로 공동-트랜스펙션된 HeLa 세포의 HtTa1 클론(Gossen, M. and Bujard, M. (1992))에 트랜스펙션시킨다.

<244> vii) 루시페라제 분석

<245> 일반적으로, 5×10^5 개의 트랜스펙션된 세포는 냉각 PBS로 3회 세척하고 400 μ l 추출 완충액(0.1M K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH=7.8; 1mM DTT)에 재부유시켜 회수한다. 세포 용해는 액체 질소에서 3회 동결 및 해동하여 달성한다. 세포 잔류물은 원심분리(5분, 10,000xg)로 제거한다. 루시페라제 분석에서, 200 μ l의 루시페라제 완충액(25mM 글리실 글리신, 15 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH=7.8; 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 2mM ATP, 1 mM DTT)은 50 μ l 용해질에 첨가한다. 이후, 100 μ l의 0.2mM D-루시페린, 25mM 글리실글리신, 1mM DTT를 상기 반응물에 첨가한다. 루시페라제 활성은 10초 지속시간으로 설정된 Lumitron 발광측정기로 광 방출을 판독하여 확인한다.

<246> **실시예 1: IREN의 클로닝 및 이중 하이브리드 검사**

<247> B-세포로부터 만들어진 cDNA 라이브러리는 상기 재료 및 방법(iv)에서 밝힌 이중-하이브리드 기술을 이용하여, TRAF2와 결합하는 단백질에 대하여 스크리닝한다. TRAF2 및 이와 상호작용하는 단백질을 모두 발현하는 형질전환체에서만, GAL4 DNA-결합도메인 및 전사활성화도메인이 합쳐진다. 이의 결과는 리포터 유전자, 예를 들면 GAL1 프로모터의 UAS와 TATA 영역에 융합된 HIS3의 활성화와 발현이다.

<248> 스크리닝에서 대략 2000개의 클론이 산출되는데, 이들은 Trp-, Leu-, His- 3AT 평판에서 성장할 수 있다. 165개의 임의로 선택된 양성 클론으로부터 만들어진 DNA는 pGBT9 벡터에 클론된 TRAF2와 함께 SFY526 효모 균주의 일시적인 동시-트랜스펙션에 참여한다. β -갈락토시다제 활성화에 대한 분석은 재료 및 방법(v)에서 밝힌 바와 같이 형질전환된 SFY526 효모 콜로니에서 실시한다. 푸른색의 발색은 TRAF2에 결합하는 단백질 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 cDNA를 보유하는 효모 콜로니를 시사한다.

<249> 신규한 IREN 단백질을 인코딩하는 6개의 독립된 클론은 발색 검사에서, 3AT 평판에서 성장하고 LacZ를 유도하는 능력으로 동정한다. 검사한 모든 양성 클론중에서, 2개는 공지된 단백질: 자가-결합하고 동형이량체를 형성할 수 있는 TRAF2 자체 및 세포내 도메인이 TRAF2와 결합하는 리포톡신 베타 수용체를 코딩하는 cDNA이다.

<250> 또한, 양성 클론은 결합 특이성 검사, 즉 무관한 미끼와의 상호작용에 대하여 분석한다. 표II에 도시한 바와 같이, IREN은 단지 TRAF2 및 TRAF1과 반응하고 다수의 무관한 분석단백질, 예를 들면 라민과 사이클린 D와 결합하지 않는다. IREN은 p55와 p75 TNF 수용체의 세포내 도메인, MORT, NIK, NIK 돌연변이체₁₋₄₀₀ 및 A20과 결합하지 않는다.

<251> IREN과 상호작용하는 TRAF2 분자의 영역을 좁히기 위하여, 2개의 구조체를 추가로 만들었다. TRAF2 분자의 N-말단인 아미노산 1 내지 224로 구성되는 제1 구조체는 RING₁₋₂₂₄라고 하는데, 이는 링 핑거와 아연 핑거 모티프를 보유한다. 제2 구조체는 TRAF2의 C-말단인 아미노산 225 내지 501만으로 구성되는데, 이는 "TRAF-도메인"뿐만 아니라 추가로 42개의 아미노산을 보유한다. 이들 2개의 구조체는 이중-하이브리드 검사에서 미끼로 사용된다. 이의 결과는 IREN이 TRAF2 분자의 아미노산 1 내지 224로 구성되는 구조체와는 상호작용하지 않지만, "TRAF 도메인"을 보유하는 C-말단 구조체와는 전장 TRAF2에 결합하는 것과 동일한 효율로 결합한다는 것을 보여준다. 결실 분석은 IREN 및 이의 동소체에서 TRAF2 결합영역이 아미노산 198 내지 388 영역에 한정된다는 것을 입증한다(표II).

<252> **표II IREN 상호작용에 대한 효모 이중 하이브리드 검사**

<253>

	미끼	먹이	상호작용
	TRAF2	IREN	+++

TRAF2 ₂₂₅₋₅₀₁	IREN	+++
RING ₁₋₂₂₄	IREN	-
TRAF2	IREN ₁₋₁₉₇	-
Lamin	IREN ₁₋₁₉₇	-
TRAF2	IREN ₁₉₈₋₃₈₈	+++
Lamin	IREN ₁₉₈₋₃₈₈	-
TRAF2	IREN ₃₉₈₋₅₄₁	+/-
Lamin	IREN ₃₉₈₋₅₄₁	+/-
TRAF2	IREN ₁₉₈₋₅₄₁	+++
Lamin	IREN ₁₉₈₋₅₄₁	-
TRAF2	IREN 10B	++
IREN 10B	IREN 10B	++
IREN 10B	IREN	-
Lamin	IREN 10B	-
Lamin	IREN	-
CycD	IREN	-
p75 ^{IC}	IREN	-
p55 ^{IC}	IREN	-
MORT	IREN	-
TRAF3	IREN	-
NIK	IREN	-
NIK 1-400	IREN	-
TRAF1	IREN	+++
A20	IREN	-
TRAF6	IREN	-

- <254> IREN cDNA의 개방해독들은 541개 아미노산으로 구성되는 단백질을 인코딩한다. 상기 cDNA는 또한, 3'UTR 및 폴리(A)를 보유한다(도3A와 3B).
- <255> IREN 개방해독들(ORF)의 5'도메인은 다른 공지된 단백질(ID: Rap2 결합단백질에 대한 이중-하이브리드 스크리닝에서 클론된 U73941(Janoueix-Lerosey I et al 1998)) 및 상기 데이터베이스에서 발견된 공지되지 않은 추가 단백질: 2개의 사람 유전자(KIAA0871, KIAA0842)와 하나의 꼬마 선충 유전자(ID CAA21666)와 상동한 영역을 보유하는 것으로 밝혀졌다.
- <256> 또한, IREN 서열은 이중-하이브리드 분석에서 NIK에 대한 IKK-1 결합 및 NIK 과다발현에 의한 NF-κB 활성화에 필수적인 NIK의 아미노산 769에서 820까지 51개의 아미노산 도메인내에 존재하는 펩티드 서열[IDSLSL 326-331]을 보유하는 것으로 밝혀졌다.
- <257> **실시예 2: IREN의 추가적인 연구와 기능적 특성**
- <258> HA 에피토프에 융합된 IREN cDNA는 헤마글루티닌(HA) 에피토프와 융합된 IREN ORF를 보유하는 pcDNA3 기초한 벡터를 이용하여, 293 사람 신장 세포주에서 발현시킨다. 이후, IREN은 HA 항체로 면역침강시킨다. 세포는 표준 갈슘-포스페이트 방법(Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M et al)을 활용하여, IREN-HA 융합단백질로 트랜스펙션시킨다. 이후, 세포는 24시간동안 두베르코 변형 이이글 배지(DMEM) + 10% 우혈청에서 성장시킨다. 배양 종결시점에서, 세포는 방사성면역 침강 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 1% 테옥시콜레이트, 0.1% SDS, 1 mM EDTA; 1 ml/5x10⁵세포)에 용해시키고, 용해질은 무관한 토끼 항혈청 및 단백질 G-세파로즈 비드(Pharmacia, Sweden)와 함께 배양하여 안정성을 사전에 담보한다. 면역침강은 4°C에서 anti-HA(클론 12CA5(Field, J. et al., 1988)) 단클론항체와 함께, 상기 용해질의 분취물을 1시간동안 배양하여 실시한다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE 및 이후 HA 항체와의 웨스턴 블랏으로 분석한다. 따라

서, IREN에 의해 인코딩되는 단백질은 대략 60kDa의 밴드로 나타난다.

- <259> NF-κB 활성화에 대한 IREN 효과의 조사는 리포터 유전자 분석으로 실시한다. 293 EBNA 세포는 IREN cDNA만을 포함하는 pcDNA3 플라스미드, 또는 다음의 단백질: IKK-1, 전장 NEMO, NEMO의 C-말단 결실 돌연변이체, NIK, NIK의 키나아제 결핍 돌연변이체(NIKmut), IREN의 C 말단 결실 돌연변이체(IREN₁₋₁₉₇) 또는 IREN의 N-말단 결실 돌연변이체(IREN₁₉₈₋₅₄₁)를 인코딩하는 cDNA를 보유하는 pcDNA3 플라스미드와 함께, 루시페라제 리포터 유전자에 연결된 HIV LTR를 보유하는 pcDNA3 벡터로 공동-트랜스펙션시킨다.
- <260> 트랜스펙션은 전술한 재료 및 방법(vii)에서 밝힌 바와 같이, 표준 칼슘-포스페이트 방법(Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, F.m et al.)으로 실시한다.
- <261> NIK 효소활성에 대하여 공지된 기질인 뮤린 IKK-1(Regnier CH, et al 1997)과의 공동-트랜스펙션에서, 사람 IREN은 293 세포에서 NF-κB를 효과적으로 유도하는 것으로 루시페라제 분석에 의해 밝혀졌다(도10).
- <262> IKK의 효소활성을 차단할 수 있는 것으로 보고된 NEMO의 C-말단 결실 돌연변이체(CΔNEMO 아미노산 1-309)(Rothwarf DM, et al. 1998)의 공동-트랜스펙션은 IREN과 IKK1의 공동-트랜스펙션에 의해 유도된 NF-κB를 저해하는 것으로 밝혀졌다(도10).
- <263> IREN과 IKK1의 공동-트랜스펙션에 의해 유도된 NF-κB 활성화는 전장 NEMO와 IKK1의 공동-발현에 의해 유도된 활성화와 유사하다. NEMO는 IREN과 IKK1에 의해 유도된 NF-κB를 추가로 강화시킬 수 없다(도10).
- <264> CΔNEMO와는 달리, NIK의 키나아제-결핍된 돌연변이체(NIKmut 아미노산, Patent Application WO 97/37016, Malini et al. 1996)의 공동-트랜스펙션은 IREN과 IKK1의 공동-트랜스펙션에 의한 NF-κB 유도를 차단할 수 없다(도10).
- <265> NIK DNA와 2:1 비율로 공동-발현된 IREN은 NF-κB 유도를 효과적으로 강화시킨다. 전장 NEMO와 NIK의 공동-발현은 후자에 의해 유도된 NF-κB를 차단한다. 이런 저해는 IREN의 발현으로 반전시킬 수 있다(도10). 앞서 도시한 바와 같이(Patent Application WO 97/37016, Malinin et al. 1996), NIKmut는 CD120a 과다발현에 의해 유도된 NF-κB를 효과적으로 차단한다. 이런 효과는 IREN의 공동-발현으로 변화되지 않는다(도10).
- <266> 전술한 데이터를 종합하면, IREN이 NIK의 하류 및 NEMO와 IKK1의 상류에서 NF-κB 시그널링 경로에 작용하고, NIK와 IKK-1간 상호작용의 조절물질이라는 것을 알 수 있다.
- <267> 따라서, IREN의 일부 결실 돌연변이체가 NIK 키나아제에서 NEMO-IKK 복합체까지 신호 흐름을 간섭한다고 가정한다. C 말단 결실 돌연변이체 IREN₁₋₁₉₇은 NIK-유도된 NF-κB 활성화에 영향을 미치지 않았다. 하지만, IREN의 N-말단 결실 돌연변이체(IRENΔN; IREN₁₉₈₋₅₄₁)는 NEMO와 유사한 수준으로, NIK-유도된 NF-κB를 현저하게 저해하였다(도10).
- <268> **실시예 3: 키나아제 분석**
- <269> 293-T 세포(2x10⁶)는 pcFLAG CHUK(뮤린 IKK1을 인코딩) 단독으로, 또는 pcNIK, pc20.4(NEMO 단백질을 인코딩), pcHIS-IREN(His 태그된-IREN을 인코딩) 혹은 pcHIS-IRENΔN(네거티브 우세한 IREN의 His-태그된 N 말단 결실 돌연변이체를 인코딩하는 pcHIS-IREN₁₉₈₋₅₄₁)과 함께 트랜스펙션시킨다. 트랜스펙션 24시간후에, 세포는 회수하고, 1% NP-40, 50 mM Hepes pH-7.5, 100mM NaCl, 10% 글리세롤, 1mM EDTA, 20mM b-글리세로포스페이트, 20 mM PNPP, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM Na-메타바이실피트, 1 mM 벤즈아미딘, 1 mM DTT, "완전" 프로테아제 저해물질(Boehringer)을 함유한 용해 완충액에 용해시킨다.
- <270> 이후, 세포 잔류물은 원심분리로 제거한다. 최대 250 mM까지 NaCl을 첨가한 이후, 단백질은 단클론 안티-FLAG 항체로 면역침강시키고, 0.1% NP-40과 250 mM NaCl를 보유하는 용해 완충액을 함유한 세척 완충액에서 완전히 세척하고, 1 mg/ml FLAG 펩티드를 함유한 30μl 세척 완충액으로 용출한다. 용출액의 분취물은 50 mM β-글리세로포스페이트, 2 mM DTT, 20 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA/EGTA를 함유하는 키나아제 완충액에서 ³²P-감마 ATP의 존재하에 대장균(*E. coli.*) 생산된 GST-IκB(기질)와의 *In-vitro* 키나아제 반응에 사용한다. 반응물은 SDS-PAGE로 분리하고, 단백질의 인산화는 X-Ray 필름에 노출시킨 이후 검출한다. 대조군으로, 용해액에서 단백질의 함량은 안티-FLAG 항체와의 웨스턴 블랏으로 측정한다.
- <271> IREN의 N 말단 결실 돌연변이체는 네거티브 우세한 분자로 작용하고, IREN과 IKK-1이 NEMO와 공동발현되는 키나

아래 분석에서 IKK-1 활성을 차단하는 것으로 밝혀졌다.

<272> IKK1 단독이 아닌 IKK1과 NEMO의 과다발현은 IKK1의 강한 키나아제 활성(대장균(*E. coli.*) 생산된 GST-IkappaB 융합단백질의 자가인산화 및 인산화로 평가)을 유도한다. IKK1과 NEMO 및 IREN₁₉₈₋₅₄₁의 공동발현은 IKK1과 NEMO 발현수준에 영향을 주지 않으면서 활성을 현저하게 감소시킨다(도11). 전장 IREN은 이런 효과를 보이지 않는다(도11, 중간 레인)

<273> **실시예 4. IREN-10B와 IREN-E의 클로닝과 서열분석**

<274> IREN의 접합변이체를 확인하기 위하여, 전술한 MCF7 세포주로부터 유래된 파이지 cDNA 라이브러리는 프로브인 600bp의 IREN으로 먼저 스크리닝한다. 2개의 상이한 IREN 변이체로 보이는 2개의 독립된 클론이 확인되었다. 이들 2개의 클론은 5' 1595bp에서 IREN과 동일하고, 3-말단에 추가적인 코딩 서열을 보유한다. 이 영역은 PX-도메인 - PI3-키나아제를 비롯한 일부 시그널링 분자에서 발견되는 기능미상의 보존성 도메인(단백질-단백질 상호작용 도메인으로 추정됨)을 보유한다. 클론10B와 클론E에서, PX 도메인은 2개의 짧은 동일 영역과 측면에서 접한다. 이들 영역의 하류 영역은 2가지 클론에서 상이하다. IREN에 대한 2가지 접합변이체의 비교는 도9에 도시한다.

<275> 5-프라임 UTR(서열의 시작으로부터 Kozak의 첫 ATG 코돈까지)의 잠정적인 서열분석은 이들 서열이 IREN 및 IREN-10B와 IREN-E 동소체에서 동일하다는 것을 시사한다.

<276> TRAF2 결합 영역은 IREN₁₉₈₋₃₈₈로 표시되는데, 이는 전술한 3개의 모든 접합동소체에서 동일하다(도9). 따라서, IREN 10B 역시 이중-하이브리드 분석에서 TRAF2와 상호작용한다. IREN의 자가-결합은 관찰되지 않지만, IREN 10B는 이중-하이브리드 검사에서 자가-결합하고 IREN과는 상호작용하지 않는다(표II).

<277> PX 도메인은 결핍되지만, IREN에 존재하지 않는 꼬인 나선 모티프를 보유하는 IREN 10B의 결실 돌연변이체 역시 자가-결합할 수 있다. 이는 전술한 꼬인 나선 도메인이 IREN 10B의 자가 상호작용을 주관한다는 것을 시사한다.

<278> **실시예 5: IREN 10B 및 IREN과 상호작용하는 단백질**

<279> B 세포 라이브러리는 전술한 효모 이중-하이브리드 시스템을 이용하여 IREN 10B로 스크리닝하고 IREN 10B와 상호작용하는 추가적인 단백질을 확인한다. IREN 10B와 강하고 특이적으로 상호작용하는 3개의 단백질이 확인되었다.

<280> 1) 클라트린 조합 단백질 2의 mu 1 하부단위(AP50, CLAPM1; 유전자뱅크 기탁 번호 U36188), 이는 IREN 10B와는 강하게 상호작용하지만 IREN과는 약하게 상호작용한다.

<281> 2) FB1 또는 Amida 유전자, 이는 IREN 10B와 IREN 둘 모두와 강하고 특이적으로 상호작용한다. 이 유전자는 초기에, 유년기 선구-B 백혈병 세포에서 E2A 유전자에 융합된 서열로 동정되었다(Brambillasca et al, Leukemia 13 (3), 369-376, 1999). 최근에, 이는 과다발현시 아픏토시스를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 이는 핵에 국지적으로 위치하고 신경세포 특이적 초기 유전자(Arc)의 핵 전치에 관여한다(Irie et al, J. Biol. Chem 275, (2000) 2647-2653).

<282> 3) TRAX 유전자, 이는 IREN 10B와는 강하게 상호작용하지만 IREN과는 매우 약하게 상호작용한다. 이 유전자는 DNA 결합단백질 Translin과 매우 유사한데, Translin의 핵 국소화(localization)에 관여하는 것으로 보인다(Aoki et al, FEBS Lett 401, 109-112, 1997).

<283> IREN 10B가 상기 단백질과 강하고 특이적으로 결합하고, 따라서 IREN은 신호 단백질, 예를 들면 TRAF-2의 소통(trafficking)을 조절하는데 활성을 나타낼 수 있다.

<284> **실시예 6: IREN 10B는 IREN 10B를 인산화시키는 미확인 키나아제와 강하게 상호작용한다**

<285> N-말단 6-His 태그에 융합된 IREN 10B와 IREN은 일시적인 트랜스펙션에 의해 293T 세포에서 발현된다. 상기 단백질은 트랜스펙션 24시간후 면역침강으로 정제한다. 면역침강물질은 PAGE 처리하고 안티-His 항체로 면역염색하는데, 이는 양 단백질이 유사한 수준으로 발현된다는 것을 보여준다. 키나아제 반응은 양 면역침강물질에서 실시한다. IREN 10B 단백질은 강한 인산화를 나타내는데, 이는 상기 단백질이 IREN 10B를 기질로 하는 미확인 키나아제와 연관한다는 것을 보여준다. IREN 자체는 비특이적으로 결합된 키나아제에 의해 아주 약하게 인산화되는 것으로 보인다. 이는 상기 키나아제가 IREN 10B의 C-말단 서열, 특히 PX 도메인과 상호작용한다는 것을

시사한다(도12).

<286> 실시예 7: IREN은 한 유전자군의 원소로 보인다

<287> 거의 대부분의 사람 게놈 서열을 포함하는 새로운 유전자은행의 BLAST 검색에서, 뉴클레오티드 수준에서 97-98% 상동성을 갖는 매우 밀접하게 관련된 동소체뿐만 아니라, 보존된 엑손 구조를 보유하는 IREN 유전자의 적어도 부분적인 사본이 크로모솜 5의 몇몇 위치에서 발생한다는 것이 밝혀졌다. 아미노산 113-406(이는 각각 도3B, 4, 5의 서열[SEQ ID No:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6]에서 뉴클레오티드 559-759에 상응한다) 및 이에 따른 TRAF2 결합도메인을 인코딩하는 두 동소체중 어느 하나의 엑손 4-7은 4개의 상이한 크로모솜에 보존되어 있는 것으로 밝혀졌는데, 추가적인 엑손은 이들 크로모솜중 한두개에서만 검출된다. 이들 데이터는 IREN 변이체가 TRAF1 또는 TRAF2 의존한 시그널링 경로를 조절하는 분자로서, 상이한 N-과 C-말단 신장부를 갖고 다양한 크기로 발현된다는 것을 시사한다(도13A).

<288> BLAST에 의한 EST 데이터뱅크 검사에서, IREN의 적어도 일부는 생쥐와 양에서 고도로 보존된 형태로 발현된다는 것이 밝혀졌다. IREN 유전자의 양 동소체, 즉 본원에서 밝힌 것 및 전술한 다른 크로모솜 위치에서 발견되는 것에 상응하는 EST는 EST 데이터뱅크에서 발견되는데, 이는 밀접하게 관련된 양 동소체가 활성 유전자라는 것을 입증한다(도13B).

<289> 참고문헌

<290> 1. Adelman et. al., (1983) DNA 2, 183.

<291> 2. Alnemri, E.S. et. al.(1995) J. Biol. Chem. 270, 4312-4317.

<292> 3. Arch RH et al. (1998). Genes Dev. Sep. 15;12(18):2821-30.

<293> 4. Arch, R. H. and C. B. Thompson. (1998) B. *Mol. Cell. Biol.* 18, 558-565.

<294> 5. Ausubel, F.M. et.al.eds., Current Protocols in Molecular Biology.

<295> 6. Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) Annu Rev Immunol.

<296> 7. Bazan, J. F.(1993). Current Biology 3, 603-606.

<297> 8. Berberich, I., Shu, G. L., and Clark, E. A.(1994). J Immunol 153, 4357-66.

<298> 9. Beutler, B., and van Huffel, C. (1994). Science 264, 667-8.

<299> 10. Blank, V., Kourilsky, P., and Israel, A. (1992). Trends Biochem. Sci 17, 135-40.

<300> 11. Boldin, M.P. et. al. (1995a) J. Biol. Chem. 270, 337-341.

<301> 12. Boldin, M. P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995b). J. Biol. Chem. 270. 7795-7798.

<302> 13. Boldin, M. P., et. al.(1996) Cell 85, 803-815.

<303> 14. Born TL et. al. (1998) J Biol. Chem. 273. 29445-50.

<304> 15. Cao, Z. et. al. (1996a) Nature 383, 443-446.

<305> 16. Cao, Z. et. al. (1996b) Science 271, 1128-1131.

<306> 17. Caen, C. J. et. al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:271-273.

<307> 18. Cheng, G., Cleary, A.M., Ye, Z-s., Hong, D.I., Lederman, S. and Baltimore. C. (1995)

<308> Science 267:1494-1498.

<309> 19. Cheng, G. and Baltimore, D. (1996) Genes Dev. 10, 963-973.

<310> 20. Chinnalyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995) Cell 81, 505-512.

<311> 21. Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, Ca. 1983.

- <312> 22. Croston, G. E., Cao, Z., and Goeddel, D.V.(1995). *J Biol Chem* 270, 16514-7.
- <313> 23. DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M.(1995). *Mol Cell Biol* 15, 1302-11.
- <314> 24. Duckett, C.S., R.W. Gedrich, M.C. Gilfillan, and C.B. Thompson. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 1535-1542.
- <315> 25. Durfee, T. et. al.(1993) *Genes Dev.* 7:555-569.
- <316> 26. Field, J. et. al.(1998) *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165.
- <317> 27. Geysen, H.M.(1985) *Immunol. Today* 6,364-369.
- <318> 28. Geysen, H.M., et. al.(1987) *J. Immunol. Meth.* 102,259-274.
- <319> 29. Gilmore, T.D., and Morin, P.J.(1993). *Trends Genet* 9,427-33.
- <320> 30. Gossen, M. and Bujard, M.(1992) *PNAS* 89:5547-5551.
- <321> 31. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Baxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P.(1995). *Cell* 83, 793-802.
- <322> 32. Grilli, M., Chiu, J.J., and Lenardo, M.J.(1993). *Int RevCytol.*
- <323> 33. Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T.(1998). *Science* 241, 42-52.
- <324> 34. Hibi, M., Lin, A. Smeal, T. Minden, A. and Karin, M. (1993) *Genes & Dev.* 7, 2135-2148.
- <325> 35. Howard, A.D., et. al.(1991) *J.Immunol.* 147, 2964-2969.
- <326> 36. Hsu, H., Shu, H. B., Pan. M. -G. and Goeddel, D.V.(1996). *Cell.* 84, 299-308.
- <327> 37. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V.(1995). *Cell.* 81, 495-504.
- <328> 38. Ishida T. et. al. (1996a) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 9437-42.
- <329> 39. Ishida T. et. al. (1996b) *J. Biol. Chem.* 271, 28745-8.
- <330> 40. Janoueix-Lerosey I et. al. *Eur J Biochem*(1998) Mar 1;252(2):290-8.
- <331> 41. Kanakaraj P et. al.(1999) *J. Exp. Med.* 189, 1129-38.
- <332> 42. Kaufmann, S.H.(1989) *Cancer Res.* 49, 5870-5878.
- <333> 43. Kaufmann, S.H.(1993) *Cancer Res.* 53, 3976-3985.
- <334> 44. Lalmanach-Girard, A. C., Chiles, T. C., Parker, D. C., and Rothstein, T. L., (1993). *J. Exp. Med.* 177, 1215-1219.
- <336> 45. Lazebnik, Y. A., et. al. (1994) *Nature* 371, 346-347.
- <337> 46. Lee, S. Y., C. G. Park, and Y. Choi. 1996. *J. Exp. Med.* 183, 669-674.
- <338> 47. Lee, S.Y., A. Reichlin, A. Santana, K. A. Soko., M.C. Nussenzweig, and Y. Choi.(1997) *Immunity* 7, 703-713.
- <339> 48. Li Y et. al. (1998) *Mol. Cell Biol.* 18, 1601-10.
- <340> 49. Lin, A., A. Minden, H. Martinetto, F. X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G. L. Johnson, and M. Karin. (1995) *Science* 268, 286-290.
- <341> 50. Liu, Z. -G. Hsu, H. Goeddel D. V., and Karin M., 1996. *Cell* 87, 565-576.
- <342> 51. Mashima, T. et. al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209. 907-915.
- <343> 52. McDonald, P. P., Cassatella, M. A., Bald, A., Maggi, E., Romagnani, S., Gruss, H. J., and Pizzolo, G. (1995). *Eur. J. Immunol.* 25, 2870-6.

- <344> 53. Mercurio, F. and Manning A. M. (1999a) *Curr Opin Cell Biol.* 1999 11,. 226-32.
- <345> 54. Mercurio F., et. al.(1999b) *Mol Cell Biol.* 19, 1526-38.
- <346> 55. Messing, et. al., *Third Celveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, E. A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981).
- <347> 56. Minden, A., Lin A., McMahon M., Lange-Carter C., Derijard B., Davis R. J., Johnson, G. L. and Karin M. 1994. *Science* 266, 1719-1723.
- <348> 57. Milligan, C. E. et. al. (1995) *Neuron* 15, 385-393.
- <349> 58. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). *Cell* 80, 389-399.
- <350> 59. Muranishi, S. et. a. (1991) *Pharm, Reseach* 8, 649.
- <351> 60. Nagata, S. and Glsten, P.(1995) *Science* 267, 1449-1456.
- <352> 61. Nakano, H.(1996) *J. Biol. Chem.* 271, 14661-4.
- <353> 62. Park, Y. C. (1999) *Nature*, 398. 533-8.
- <354> 63. Reinhard C., Shamoon, B.Shyamala, V. and Williams.L.T.1997. *EMBO J.* 16, 1080-1092
- <355> 64. Regnier CH(1995) *J Biol Chem.* 270, 25715-21
- <356> 65. REgner CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M(1997) *Cell* 90, 373-383
- <357> 66. Rensing-Ehl, A., Hess, S., Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Reithmuller, G., and Engelmann, H.(1995).*J.Inlamm.*45, 161-174.
- <358> 67. Rothe, M., Pan, M-G, Henzel, W.J.,Ayres, T.M., and Goeddel, D.V.(1995b). *Cell* 83, 1243-1252.
- <359> 68. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M.,and Goeddel, D.V.(1995a). *Science* 269, 1424-1427.
- <360> 69. Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V.(1994). *Cell* 78, 681-692.
- <361> 70. Rothe, M. et al.(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8241-8246.
- <362> 71. Rothwarf DM et al(1998) *Nature.* 395,297-300.
- <363> 72. Roy, N., Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed.(1997). *EMBO J.* 16, 6914-6925.
- <364> 73. Ruzicka et al., (1993) *Science* 260, 487.
- <365> 74. Sambrook et al.(1998) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- <366> 75. Sano et al., (1992) *Science* 258, 120.
- <367> 76. Sano et al., (1991) *Biotechniques* 9, 1378.
- <368> 77. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M.and Schaffner, W.(1989), *Nuc. Acids Res.* 17:6419.
- <369> 78. Schulz et al., G.E., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, N.Y. 1798.
- <370> 79. Sleath, P.R. et al.(1990) *J.Biol.Chem.* 265,14526-14528.
- <371> 80. Shi, C.-S.and J.H.K도기.(1997) *J.Biol.Chem.*272, 32102-32107.
- <372> 81. Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G.(1994). *Cell* 76, 959-962.
- <373> 82. Song, H.Y., C.H. Regnier, C.J. Kirschning, D.V. Goeddel, and M.Rothe.(1997). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 9,9792-9796.
- <374> 83. Stanger, B.Z. et al.(1995) *Cell* 81, 513-523.

<375> 84. Su, B., E. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin, and Y. Ben-Neriah. (1994) Cell 77, 727-736.

<376> 85. Thornberry, N.A. et al. (1992) Nature 356, 768-774.

<377> 86. Thornberry, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33, 3934-3940.

<378> 87. Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fiers, W. (1995). Trends Cell Biol. 5, 392-400.

<379> 88. Varfolomeev, E.E., Boldin, M.P., Goncharov, T.M., and Wallach, D. (1996). J. Exp. Med. 183, 1271-5.

<380> 89. Vassalli, P. (1992) Ann. Rev. Immunol. 10, 411-452.

<381> 90. Veira et al., (1987) Meth. Enzymol. 153, 3.

<382> 91. Wallach, D. (1996) Eur. Cytokine Net. 7, 713-724.

<383> 92. Wang, L. et al. (1994) Cell 78, 739-750.

<384> 93. Wilks, A.F. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1603-1607.

<385> 94. Yamaoka S et al., (1998) Cell. 93, 1231-40.

<386> 95. Yeh, W.-C., A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Billia, A. Wakeham, J.L. de T.W. Mak. (1997) Immunity 7, 715-725.

<387> 96. Zaccaraia, S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 203, 353-357.

<388> 97. Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) Nature 365: 448-451.

도면의 간단한 설명

<93> 도1은 TRAF2 분자 구조의 개요도를 도시한다.

<94> 도2는 NF- κ B 활성화에 관여하는 일부 단백질을 보여주는 개요도를 도시한다.

<95> 도3A는 3개의 IREN 접합동소체에서 동일한 IREN의 5-프라임 UTR(서열 처음에서부터 Kozak 서열의 ATG까지)의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID:3)을 도시한다.

<96> 도3B는 IREN의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:4)을 도시한다.

<97> 도4는 IREN-10B의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:5)을 도시한다.

<98> 도5는 IREN-E의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:6)을 도시한다.

<99> 도6은 IREN의 아미노산 서열(SEQ ID NO:7)을 도시한다.

<100> 도7은 IREN-10B의 아미노산 서열(SEQ ID NO:8)을 도시한다.

<101> 도8은 IREN-E의 아미노산 서열(SEQ ID NO:9)을 도시한다.

<102> 도9는 IREN 서열 및 이의 동소체 IREN-10B와 IREN-E의 비교를 도시한다.

<103> 도10은 IKK-1, 야생형 IREN, NIK, NEMO 및 이들의 돌연변이체에 의한 NF- κ B 유도결과를 개략적으로 도시한다.

<104> 도11은 pCHIS-IREN Δ N(pCHIS-IREN₁₉₈₋₅₄₁, 왼쪽 레인), pCHIS-IREN(중간 레인) 또는 빈 pcDNA3 벡터(오른쪽 레인, 대조군)와 함께 pcFLAG-CHUK(뮤린 IKK1을 인코딩)과 pc20.4(NEMO 단백질을 인코딩)로 293 세포를 트랜스펙션시킨 이후 획득된 FLAG-IKK1, GST-IkappaB, NEMO의 자가방사선사진을 도시한다. 면역침강 및 키나아제 분석은 실시예 3에서 밝힌 바와 같이 실시한다. 가지적인 밴드의 크기는 FLAG-IKK1, GST-IkappaB, NEMO에 대하여 측정된 분자량에 상응한다.

<105> 도12는 트랜스펙션된 세포로부터 면역침강시키고 이후 시험관내 키나아제 검사를 실시한 IREN 10B와 IREN의 SDS-PAGE 분석의 자가방사선사진(왼쪽)과 면역염색(오른쪽)을 도시한다. 이 수치는 세포에서 IREN 10B가 IREN

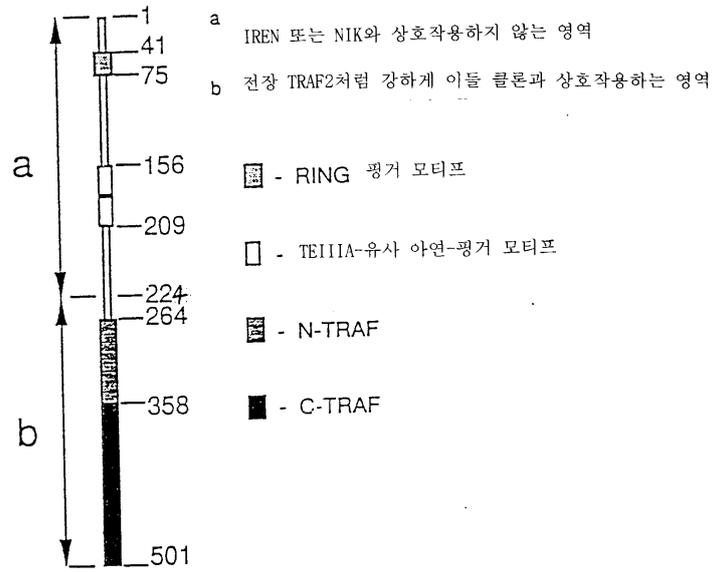
접합변이체를 인산화시킬 수 있는 단백질 키나아제와 연관한다는 것을 입증한다.

<106>

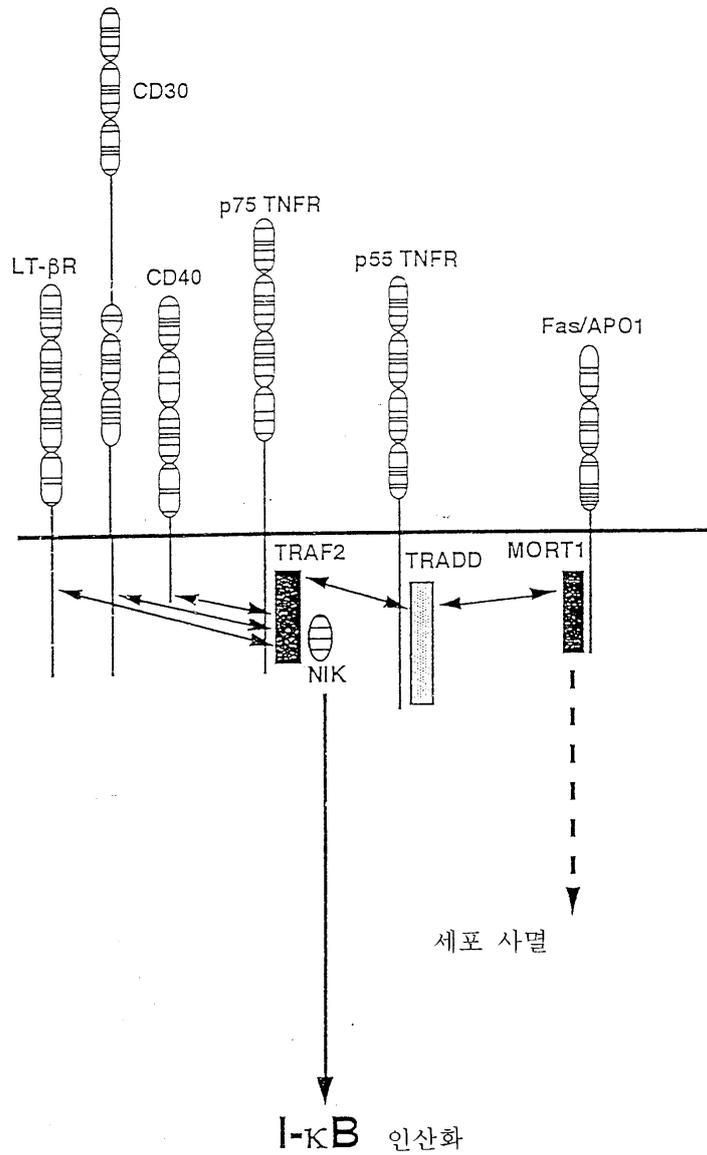
도13은 IREN과 밀접하게 연관된 유전자가 몇몇 사람 크로모솨에 존재한다는 것을 시사하는 유전자 데이터 뵤크 분석의 결과를 나타낸다.

도면

도면1



도면2



도면3a

```

GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTG
CGGATGTACCCATACGATGTTCCAGATACGCTGAATTTGAGGCCACGAAG
GCCGGCGGCGGGCGCAGGCACCGGCCCGGGGAGAGGCACC
    
```

도면3b

ATG AGC GGA TCA CAG AAC AAT GAC AAA AGA CAA TTT CTG CTG GAG CGA CTG CTG GAT GCA
 61 91
 GTG AAA CAG TGC CAG ATC CGC TTT GGA GGG AGA AAG GAG ATT GCC TCG GAT TCC GAC AGC
 121 151
 AGG GTC ACC TGT CTG TGT GCC CAG TTT GAA GCC GTC CTG CAG CAT GGC TTG AAG AGG AGT
 181 211
 CGA GGA TTG GCA CTC ACA GCG GCA GCG ATC AAG CAG GCA GCG GGC TTT GCC AGC AAA ACC
 241 271
 GAA ACA GAG CCC GTG TTC TGG TAC TAC GTG AAG GAG GTC CTC AAC AAG CAC GAG CTG CAG
 301 331
 CGC TTC TAC TCC CTG CGC CAC ATC GCC TCA GAC GTG GGC CGG GGT CGC GCC TGG CTG CGC
 361 391
 TGT GCC CTC AAC GAA CAC TCC CTG GAG CGC TAC CTG CAC ATG CTC CTG GCC GAC CGC TGC
 421 451
 AGG CTG AGC ACT TTT TAT GAA GAC TGG TCT TTT GTG ATG GAT GAA GAA AGG TCC AGT ATG
 481 511
 CTT CCT ACC ATG GCA GCA GGT CTG AAC TCC ATA CTC TTT GCG ATT AAC ATC GAC AAC AAG
 541 571
 GAT TTG AAC GGG CAG AGT AAG TTT GCT CCC ACC GTT TCA GAC CTC TTA AAG GAG TCA ACG
 601 631
 CAG AAC GTG ACC TCC TTG CTG AAG GAG TCC ACG CAA GGA GTG AGC AGC CTG TTC AGG GAG
 661 691
 ATC ACA GCC TCC TCT GCC GTC TCC ATC CTC ATC AAA CCT GAA CAG GAG ACC GAC CCC TTG
 721 751
 CCT GTC GTG TCC AGG AAT GTC AGT GCT GAT GCC AAA TGC AAA AAG GAG CGG AAG AAG AAA
 781 811
 AAG AAA GTG ACC AAC ATA ATC TCA TTT GAT GAT GAG GAA GAT GAG CAG AAC TCT GGG GAC
 841 871
 GTG TTT AAA AAG ACA CCT GGG GCA GGG GAG AGC TCA GAG GAC AAC TCC GAC CGC TCC TCT
 901 931
 GTC AAT ATC ATG TCC GCC TTT GAA AGC CCC TTC GGG CCT AAC TCC AAT GGA AGT CAG AGC
 961 991
 AGC AAC TCA TGG AAA ATT GAT TCC CTG TCT TTG AAC GGG GAG TTT GGG TAC CAG AAG CTT
 1021 1051
 GAT GTG AAA AGC ATC GAT GAT GAA GAT GTG GAT GAA AAC GAA GAT GAC GTG TAT GGA AAC
 1081 1111
 TCA TCA GGA AGG AAG CAC AGG GGC CAC TCG GAG TCG CCC GAG AAG CCA CTG GAA GGG AAC
 1141 1171
 ACC TGC CTC TCC CAG ATG CAC AGC TGG GCT CCG CTG AAG GTG CTG CAC AAT GAC TCC GAC
 1201 1231
 ATC CTC TTC CCT GTC AGT GGC GTG GGC TCC TAC AGC CCA GCA GAT GCC CCC CTC GGA AGC
 1261 1291
 CTG GAG AAC GGG ACA GGA CCA GAG GAC CAC GTT CTC CCG GAT CCT GGA CTT CGG TAC AGT
 1321 1351
 GTG GAA GCC AGC TCT CCA GGC CAC GGA AGT CCT CTG AGC AGC CTG TTA CCT TCT GCC TCA
 1381 1411
 GTG CCA GAG TCC ATG ACA ATT AGT GAA CTG CGC CAG GCC ACT GTG GCC ATG ATG AAC AGG
 1441 1471
 AAG GAT GAG CTG GAG GAG GAG AAC AGA TCA CTG CGA AAC CTG CTC GAC GGT GAG ATG GAG
 1501/501 1531
 CAC TCA GCC GCG CTC CGG CAA GAG GTG GAC ACC TTG AAA AGG AAG GTG GCT GAA CAG GAG
 1561 1591
 GAG CGG CAG GGC ATG AAG GTC CAG GCG CTG GCC AGC TAT CTT TGC TAT TTT GTG AGG AGA
 1621 1651
 TTC TAA CCC CAC GTG AGA ACC ATG TGG TGG AGA AAT GGA GGG AGA GAG AAA TCC AAC AGT
 1681 1711
 TCC TGA TAG TCT CAT TTG AGC TCC TGG ATC CAG TCT TTC CTG AAG CTG TGT TTC CTC TGG
 1741 1771
 ACT TTT CAT GTA TGT GAG CCA ATA AAT TGC TTT CAT TCC TTG

도면4

ATG AGC GGA TCA CAG AAC AAT GAC AAA AGA CAA TTT CTG CTG GAG CGA CTG CTG GAT GCA
 61 91
 GTG AAA CAG TGC CAG ATC CGC TTT GGA GGG AGA AAG GAG ATT GCC TCG GAT TCC GAC AGC
 121 151
 AGG GTC ACC TGT CTG TGT GCC CAG TTT GAA GCC GTC CTG CAG CAT GGC TTG AAG AGG AGT
 181 211
 CGA GGA TTG GCA CTC ACA GCG GCA GCG ATC AAG CAG GCA GCG GGC TTT GCC AGC AAA ACC
 241 271
 GAA ACA GAG CCC GTG TTC TGG TAC TAC GTG AAG GAG GTC CTC AAC AAG CAC GAG CTG CAG
 301 331
 CGC TTC TAC TCC CTG CGC CAC ATC GCC TCA GAC GTG GGC CGG GGT CGC GCC TGG CTG CGC
 361 391
 TGT GCC CTC AAC GAA CAC TCC CTG GAG CGC TAC CTG CAC ATG CTC CTG GCC GAC CGC TGC
 421 451
 AGG CTG AGC ACT TTT TAT GAA GAC TGG TCT TTT GTG ATG GAT GAA GAA AGG TCC AGT ATG
 481 511
 CTT CCT ACC ATG GCA GCA GGT CTG AAC TCC ATA CTC TTT GCG ATT AAC ATC GAC AAC AAG
 541 571
 GAT TTG AAC GGG CAG AGT AAG TTT GCT CCC ACC GTT TCA GAC CTC TTA AAG GAG TCA ACG
 601 631
 CAG AAC GTG ACC TCC TTG CTG AAG GAG TCC ACG CAA GGA GTG AGC AGC CTG TTC AGG GAG
 661 691
 ATC ACA GCC TCC TCT GCC GTC TCC ATC CTC ATC AAA CCT GAA CAG GAG ACC GAC CCC TTG
 721 751
 CCT GTC GTG TCC AGG AAT GTC AGT GCT GAT GCC AAA TGC AAA AAG GAG CGG AAG AAG AAA
 781 811
 AAG AAA GTG ACC AAC ATA ATC TCA TTT GAT GAT GAG GAA GAT GAG CAG AAC TCT GGG GAC
 841 871
 GTG TTT AAA AAG ACA CCT GGG GCA GGG GAG AGC TCA GAG GAC AAC TCC GAC CGC TCC TCT
 901 931
 GTC AAT ATC ATG TCC GCC TTT GAA AGC CCC TTC GGG CCT AAC TCC AAT GGA AGT CAG AGC
 961 991
 AGC AAC TCA TGG AAA ATT GAT TCC CTG TCT TTG AAC GGG GAG TTT GGG TAC CAG AAG CTT
 1021 1051
 GAT GTG AAA AGC ATC GAT GAT GAA GAT GTG GAT GAA AAC GAA GAT GAC GTG TAT GGA AAC
 1081 1111
 TCA TCA GGA AGG AAG CAC AGG GGC CAC TCG GAG TCG CCC GAG AAG CCA CTG GAA GGG AAC
 1141 1171
 ACC TGC CTC TCC CAG ATG CAC AGC TGG GCT CCG CTG AAG GTG CTG CAC AAT GAC TCC GAC
 1201 1231
 ATC CTC TTC CCT GTC AGT GGC GTG GGC TCC TAC AGC CCA GCA GAT GCC CCC CTC GGA AGC
 1261 1291
 CTG GAG AAC GGG ACA GGA CCA GAG GAC CAC GTT CTC CCG GAT CCT GGA CTT CGG TAC AGT
 1321 1351
 GTG GAA GCC AGC TCT CCA GGC CAC GGA AGT CCT CTG AGC AGC CTG TTA CCT TCT GCC TCA
 1381 1411
 GTG CCA GAG TCC ATG ACA ATT AGT GAA CTG CGC CAG GCC ACT GTG GCC ATG ATG AAC AGG
 1441 1471
 AAG GAT GAG CTG GAG GAG GAG AAC AGA TCA CTG CGA AAC CTG CTC GAC GGT GAG ATG GAG
 1501 1531
 CAC TCA GCC GCG CTC CGG CAA GAG GTG GAC ACC TTG AAA AGG AAG GTG GCT GAA CAG GAG
 1561 1591
 GAG CGG CAG GGC ATG AAG GTC CAG GCG CTG GCC AGA GAG AAC GAG GTG CTC AAA GTC CAA
 1621 1651
 CTG AAG AAA TAT GTA GGA GCT GTC CAG ATG CTG AAA AGA GAA GGT CAA ACA GCT GAA GTG
 1681 1711
 CCA AAT CTT TGG AGT GTT GAT GGA GAA GTT ACA GTA GCT GAA CAG AAG CCG GGA GAA ATT
 1741 1771
 GCT GAA GAA CTC GCA AGC TCC TAC GAA AGA AAG CTC ATC GAG GTG GCA GAG ATG CAT GGC
 1801 1831
 GAG CTG ATT GAG TTC AAC GAG CGC CTG CAC AGG GCC CTG GTA GCC AAG GAA GCC CTC GTG

도면4-1

1861	TCC CAG ATG AGG CAG GAG CTC ATC GAT CTC	1891	CGG GGA CCG GTG CCT GGA GAT TTG AGT CAA
1921	ACG TCC GAA GAC CAG AGT TTG TCG GAT TTT	1951	GAA ATA TCA AAC CGG GCG CTG ATC AAC GTC
1981	TGG ATC CCC TCA GTG TTT CTC CGG GGC AAA	2011	GCA GCA AAT GCA TTC CAC GTG TAT CAG GTC
2041	TAC ATC CGG ATA AAA GAC GAT GAA TGG AAT	2071	ATT TAT CGC CGG TAT ACA GAG TTC AGG AGT
2101	TTG CAC CAC AAG TTA CAA AAC AAG TAC CCT	2131	CAA GTG AGG GCC TAC AAC TTC CCA CCC AAA
2161	AAG GCC ATT GGA AAC AAG GAT GCC AAG TTT	2191	GTG GAG GAA CGG AGA AAG CAG CTC CAG AAT
2221	TAC CTG CGC AGC GTC ATG AAC AAA GTC ATC	2251	CAG ATG GTC CCC GAG TTC GCT GCC AGC CCC
2281	AAG AAG GAG ACC CTC ATC CAG CTG ATG CCC	2311	TTC TTC GTC GAC ATC ACC CCG CCC GGA GAG
2341	CCT GTG AAC AGC CGG CCC AAA GCA GCT TCC	2371	CGC TTT CCC AAA CTG TCC CGG GGT CAG CCC
2401	CGG GAG ACC CGC AAC GTG GAG CCC CAG AGC	2431	GGT GAC CTC TGA CCT CGA CAA AAC CGC AGC
2461	CAC GGG CCC TGT GCG TGG CAC CAG CTG CGT	2491	CCA CCC CAG CCA CTG CCG CTG GCC CCT CAC
2521	CTC AGC GTG ACA ACC ACG TCC CAC TGG TGA	2551	TCC TGA GAG CAC ACG ATT CCC AAC AGT TAC
2581	ACA ACA CCC CGA TTA AAC TAA TCA GTC TTC	2611	GAG CCG CAT GAT ACC GTG ACC CGA GAG ACC
2641	AAG GCA GCA CCT CGC TGG AGA GAC TGG GAC	2671	ACA CAG TCC TTC TGC TTC TGG GGT CTA CCC
2701	TGG GCT GCA AGG GCT GTT CCT CCA CCT TCC	2731	TAT AGT TCA GGG CTG GCA GGA GGG TGG GCA
2761	CCA GGT CAG GCT GGG TGC GCC ATG GTT GAG	2791	AGG CAA AGG TGA TCC CCT ATA TAG GAA GGT
2821	TCA TGC AGA GCC AGC CTC TCC ACT CTT TCC	2851	CAT GTG GGG ACT AGA ATG ACT ATT AGC CTC
2881	TTC CTT TGC TTT TTA AGG TTA TTA CCT GGC	2911	CTA ACC TAG GGA TGG CTG GCT GTG GGG GGG
2941	GGG GGT GGG CAT GGT TCC TTT CAC TGC ATT	2971	TTC CAC CAA CAG TCA TTA GAC ACC TGG CAC
3001	TGT CAC AGC TCA CTT TTC CAG AGG GAT ATT	3031	CCT GTG GCT TTG GCA AGG AGC CAT TAG TGA
3061	TGT GCA ACT TGA GTT CAG AGA ACT TCC CCT	3091	ACC TCC CCC ATG GCT GGC TTC AGG AAG GAC
3121	CAG TGC CCT CCA TAG CCT G		

도면5

ATG AGC GGA TCA CAG AAC AAT GAC AAA AGA CAA TTT CTG CTG GAG CGA CTG CTG GAT GCA
 61 91
 GTG AAA CAG TGC CAG ATC CGC TTT GGA GGG AGA AAG GAG ATT GCC TCG GAT TCC GAC AGC
 121 151
 AGG GTC ACC TGT CTG TGT GCC CAG TTT GAA GCC GTC CTG CAG CAT GGC TTG AAG AGG AGT
 181 211
 CGA GGA TTG GCA CTC ACA GCG GCA GCG ATC AAG CAG GCA GCG GGC TTT GCC AGC AAA ACC
 241 271
 GAA ACA GAG CCC GTG TTC TGG TAC TAC GTG AAG GAG GTC CTC AAC AAG CAC GAG CTG CAG
 301 331
 CGC TTC TAC TCC CTG CGC CAC ATC GCC TCA GAC GTG GGC CGG GGT CGC GCC TGG CTG CGC
 361 391
 TGT GCC CTC AAC GAA CAC TCC CTG GAG CGC TAC CTG CAC ATG CTC CTG GCC GAC CGC TGC
 421 451
 AGG CTG AGC ACT TTT TAT GAA GAC TGG TCT TTT GTG ATG GAT GAA GAA AGG TCC AGT ATG
 481 511
 CTT CCT ACC ATG GCA GCA GGT CTG AAC TCC ATA CTC TTT GCG ATT AAC ATC GAC AAC AAG
 541 571
 GAT TTG AAC GGG CAG AGT AAG TTT GCT CCC ACC GTT TCA GAC CTC TTA AAG GAG TCA ACG
 601 631
 CAG AAC GTG ACC TCC TTG CTG AAG GAG TCC ACC CAA GGA GTG AGC AGC CTG TTC AGG GAG
 661 691
 ATC ACA GCC TCC TCT GCC GTC TCC ATC CTC ATC AAA CCT GAA CAG GAG ACC GAC CCC TTG
 721 751
 CCT GTC GTG TCC AGG AAT GTC AGT GCT GAT GCC AAA TGC AAA AAG GAG CGG AAG AAG AAA
 781 811
 AAG AAA GTG ACC AAC ATA ATC TCA TTT GAT GAT GAG GAA GAT GAG CAG AAC TCT GGG GAC
 841 871
 GTG TTT AAA AAG ACA CCT GGG GCA GGG GAG AGC TCA GAG GAC AAC TCC GAC CGC TCC TCT
 901 931
 GTC AAT ATC ATG TCC GCC TTT GAA AGC CCC TTC GGG CCT AAC TCC AAT GGA AGT CAG AGC
 961 991
 AGC AAC TCA TGG AAA ATT GAT TCC CTG TCT TTG AAC GGG GAG TTT GGG TAC CAG AAG CTT
 1021 1051
 GAT GTG AAA AGC ATC GAT GAT GAA GAT GTG GAT GAA AAC GAA GAT GAC GTG TAT GGA AAC
 1081 1111
 TCA TCA GGA AGG AAG CAC AGG GGC CAC TCG GAG TCG CCC GAG AAG CCA CTG GAA GGG AAC
 1141 1171
 ACC TGC CTC TCC CAG ATG CAC AGC TGG GCT CCG CTG AAG GTG CTG CAC AAT GAC TCC GAC
 1201 1231
 ATC CTC TTC CCT GTC AGT GGC GTG GGC TCC TAC AGC CCA GCA GAT GCC CCC CTC GGA AGC
 1261 1291
 CTG GAG AAC GGG ACA GGA CCA GAG GAC CAC GTT CTC CCG GAT CCT GGA CTT CGG TAC AGT
 1321 1351
 GTG GAA GCC AGC TCT CCA GGC CAC GGA AGT CCT CTG AGC AGC CTG TTA CCT TCT GCC TCA
 1381 1411
 GTG CCA GAG TCC ATG ACA ATT AGT GAA CTG CGC CAG GCC ACT GTG GCC ATG ATG AAC AGG
 1441 1471
 AAG GAT GAG CTG GAG GAG GAG AAC AGA TCA CTG CGA AAC CTG CTC GAC GGT GAG ATG GAG
 1501 1531
 CAC TCA GCC GCG CTC CGG CAA GAG GTG GAC ACC TTG AAA AGG AAG GTG GCT GAA CAG GAG
 1561 1591
 GAG CGG CAG GGC ATG AAG GTC CAG GCG CTG GCC AGA GAG AAC GAG GTG CTC AAA GTC CAA

도면5-1

```

1621          1651
CTG AAG AAA TAT GTA GGA GCT GTC CAG ATG CTG AAA AGA GAA GGT CAA ACA GCT GAA GTG
1681          1711
CCA AAT CTT TGG AGT GTT GAT GGA GAA GTT ACA GTA GCT GAA CAG AAG CCG GGA GAA ATT
1741          1771
GCT GAA GAA CTC GCA AGC TCC TAC GAA AGA AAG CTC ATC GAG GTG GCA GAG ATG CAT GGC
1801          1831
GAG CTG ATT GAG TTC AAC GAG CGC CTG CAC AGG GCC CTG GTA GCC AAG GAA GCC CTC GTG
1861          1891
TCC CAG ATG AGG CAG GAG CTC ATC GAT CTC CGG GGA CCG GTG CCT GGA GAT TTG AGT CAA
1921          1951
ACG TCC GAA GAC CAG AGT TTG TCG GAT TTT GAA ATA TCA AAC CCG GCG CTG ATC AAC GTC
1981          2011
TGG ATC CCC TCA GTG TTT CTC CGG GGC AAA GCA GCA AAT GCA TTC CAC GTG TAT CAG GTC
2041          2071
TAC ATC CGG ATA AAA GAC GAT GAA TGG AAT ATT TAT CGC CGG TAT ACA GAG TTC AGG AGT
2101          2131
TTG CAC CAC AAG TTA CAA AAC AAG TAC CCT CAA GTG AGG GCC TAC AAC TTC CCA CCC AAA
2161          2191
AAG GCC ATT GGA AAC AAG GAT GCC AAG TTT GTG GAG GAA CCG AGA AAG CAG CTC CAG AAT
2221          2251
TAC CTG CGC AGC GTC ATG AAC AAA GTC ATC CAG ATG GTC CCC GAG TTC GCT GCC AGC CCC
2281          2311
AAG AAG GAG ACC CTC ATC CAG CTG ATG CCC TTC TTC GTC GAC TGG ATC TCA CTT GTT TGG
2341          2371
AAA TGG CCG CGA TAG TTC ACG TGA GGA GTT CTC ATC CTC TTA GCG GCA TCC CCA TGG CCC
2401          2431
AGG GTG CAC GGG GGA ATT AGC CTC TCG CGG AGT CAT CAC GCA TCG ACT GAA TTC CCT GGT
2461          2491
GAA AAC TGA GTT AGC CAG TTG TTC CTA AGA TAC TCC TGA TGC TGA GAG TGT GAG CAG GAG
2521          2551
GCG CTG CCC CAT CCG CAA GTC AGT GTC CCC CAC CCC CTG CCG GGT CCA CAG CCC AGG CAT
2581          2611
CTC CGG TCC AGT GTT TCC CAA ACA TTC GCG TGC CGA ATT GTA AAA AGT GCA CGT TAA TGC
2641          2671
GAG CCT GTC GGT GTG ACA TGA ATC TCA GCC ATG CTG GTT GCC ATC AGT CAG CAC GGA GAG
2701          2731
AGA AAC CTT TTG TGC CTA ATT AGC ACG CAG AAC AGA ACA CAG GGT TCG ATT TAT GGA CTT
2761          2791
TTC AAA ACG AGA ATT TCA GTG GGA GAC TGT GGC AAA TGA CAC AGT GTT GAC ACT GGA ATT
2821          2851
TTG ACT ACA TGT TGG TCT AGA GCG GCC GCC ACC GCG GTG GAG CTC CAA TTC GT

```

도면6

M R R C R F K R C L F A D L T A P E D P V N L D S P P S L G P T K D T K F
S L K A G A E H A A V G L K Q V V R E G N G N D S L L G E L L I D G L V *
G L E Q L S V I L D M L N E G S V K E A I S G E G E K V N R S S E E K Q
S D I F A K L A N R D N G S V I S K D G M Q E D R G V G G Y S E L M R A
Q A A E L T N S E C E S Q T S L R K E E S S F V K N L S T S L L E E K L
N V S A T E K D H R E I S Q S I N K Q S A S G D H T H Y G V L R E H V A
N K D V A T H V S L R L K N L K V K N S F N Y E R C N S P E P Q E S A S
D Q S L A E E G L S S F F V P S V S E E S Q N G L D P E A S A N A E Y
K C D Q A P L R E T S A A T R E A T G D S W K E H S S A D S A T R A Q L
R Q S H I V Q G R F M I P S E Q D N D N P K L D S Q D D H S S V S L E C
Q I R G K F R R Y Y L N T L I E A I V S F I D D E M I A V P V A L R E Y
F R V L Q W F A L E P I V L T T K I F D G D V V S H L P L G P M R Q R F
L F T K A Y Y W H D T D S K A D C S K R P S K Y P S F L P H E M N E Q V
L G C R A Y S L M W M N D E S P K F K S N L S G E W P G D G S N L V G R
E G L S G V L R L S A K L S S L K D T S S S I N K A V S P S M R L D M R

도면7

M R R C R F K R C L F A D L T A P E D P V N L D S P P S L G P T K D T K L Q T S
 S L K A G A E H A A V G L K Q V V R E G N G N D S L L G E L L I D G L V K T V S
 G L E Q L S V I L D M L N E G S V K E A I S G E G E K V N R S S E E K Q K A A Y
 S D I F A K L A N R D N G S V I S K D G M Q E D R G V G G Y S E L M R A Y E E E
 Q A A E L T N S E C E S Q T S L R K E E S S F V K N L S T S L L E E K L V V Q R
 N V S A T E K D H R E I S Q S I N K Q S A S G D H T H Y G V L R E H V A G P K K
 N K D V A T H V S L R L K N L K V K N S F N Y E R C N S P E P Q E S A R A N P L
 D Q S L A E E G L S S F V F P S V S E E S Q N G L D P E A S A N A E E V L G I
 K C D Q A P L R E T S A A T R E A T G D S W K E H S S A D S A T R A Q N Q W E E
 R Q S H I V Q G R F M I P S E Q D N D N P K L D S Q D D H S S V S L E E M S I V
 Q I R G K F R R Y Y L N T L I E A I V S F I D D E M I A V P V A L R E V L V A A
 F R V L Q W F A L E P I V L T T K I F D G D V V S H L P L G P M R Q R L K D E E
 L F T K A Y Y W H D T D S K A D C S K R P S K Y P S F L P H E M N E Q K R G E M
 L G C R A Y S L M W M N D E S P K F K S N L S G E W P G D G S N L V G V E E L H
 E G L S G V L R L S A K L S S L K D T S S S I N K A V S P S M R L D M Q G V A G

도면7-1

E K R S W H I Q K K Q I P S G
 L E G L I V Y N A Q M Q V R D
 I A P S P Y R K I L V L N G L
 E L V D S Q R Y G Q P M S Q *
 F V P F V V Y P N N E P R P
 N S G E F Y T Q K Y F F P R
 E Q D I L I E V D L A F K E
 R M L S R R F R A R A V A T
 L R S N G I R A K S S D A R
 H Q R R K K S Y F V P I S N
 R E T A A D L N V M K T R V
 A L S L A D H F E N K P F E
 L I E I N E H P E K E P P P
 V D D N A W K P R V T G K Q
 A L Q V F N L K R I L E L S

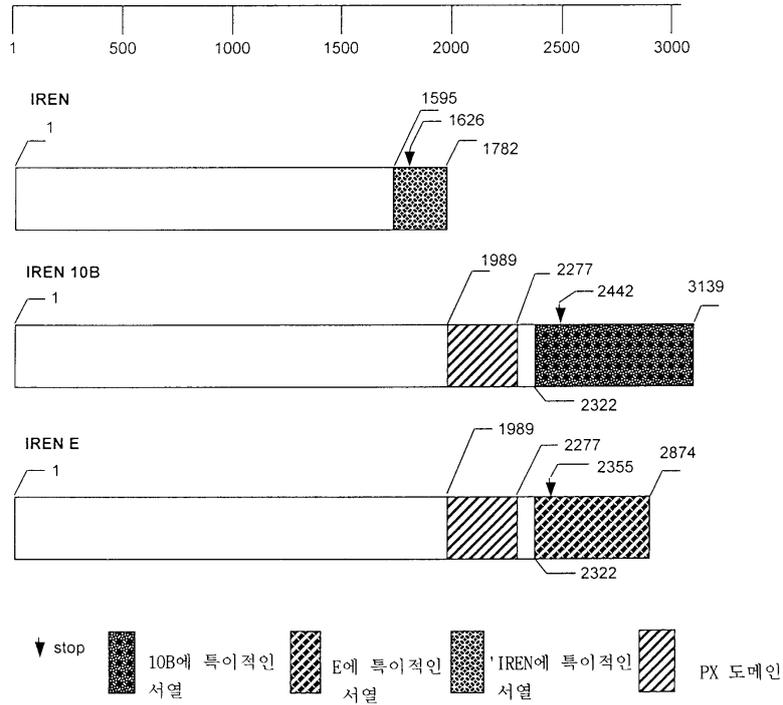
도면8

M R R C R F K R C L F A D L T A P E D P V N L D
 S L K A G A E H A A V G L K Q V V R E G N G N D
 G L E Q L S V I L D M L N E G S V K E A I S G E
 S D I F A K L A N R D N G S V I S K D G M Q E D
 Q A A E L T N S E C E S Q T S L R K E E S S F V
 N V S A T E K D H R E I S Q S I N K K Q S A S G D
 N K D V A T H V S L R L K N L K V K N S F N Y E
 D Q S L A E E G L S S F V F P S V S E E S S Q N
 K C D Q A P L R E T S A A T R E A T G D S W K K E
 R Q S H I V Q G R F M I P S E Q D N D N P K L D
 Q I R G K F R R Y L N T L I E A I V S F I D D
 F R V L Q W F A L E P I V L T T K I F D G D V V
 L F T K A Y Y W H D T D S K A D C S K R P S K Y
 L G C R A Y S L M W M N D E S P K F K S N L S G
 E G L S G V L R L S A K L S S L K D T S S S I N

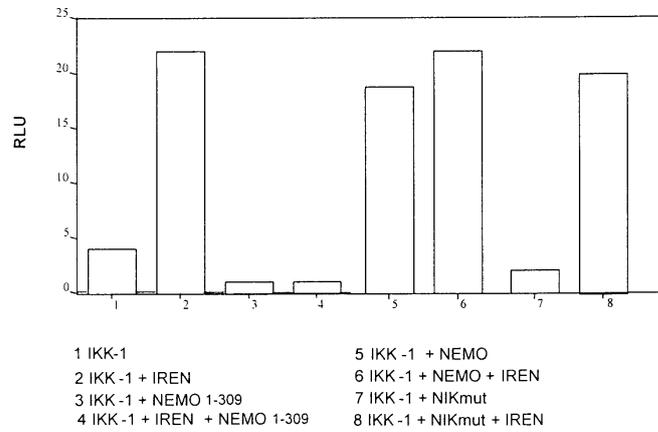
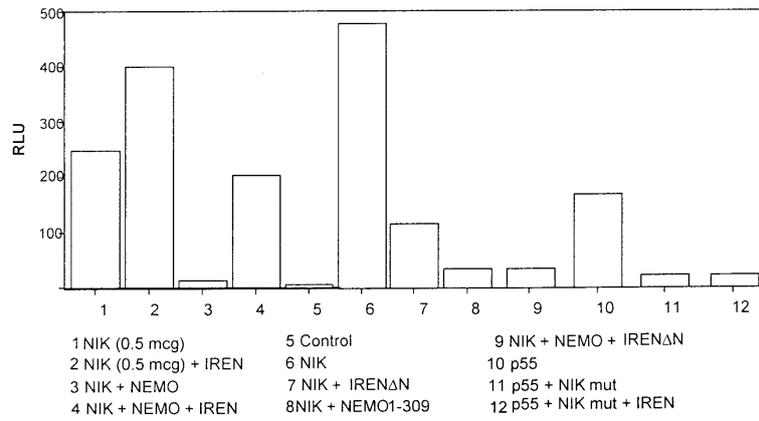
도면8-1

S P P S L G P T K D T K L Q T S E K R S W H I Q K K Q I K
 S L L G E L L I D G L V K K T V S L E G L I V Y N A Q M Q W
 G E K V N R S S E E K Q K A A Y I A P S P Y R K I L V L P
 R G V G G Y S E L M R A Y E E E L V D S Q R Y G Q P M R
 K N L S T S L L E E K L V V Q R F V P F V Y P N N E P *
 H T H Y G V L R E H V A G P K K N S G E F Y T Q K Y F F
 R C N S P E P Q E S A R A N P L E Q D I L I E V D L A F
 G L D P E A S A N A E E V L G I R M L S R R F R A R A V
 H S S A D S A T R A Q N Q W E E L R S N G I R A K S S D
 S Q D D H S S V S L E E M S I V H Q R K K S Y F V P W
 E M I A V P V A L R E V L V A A R E T A A D L N V M K I
 S H L P L G P M R R Q R L K D E E A L S L A D H F E N K S
 P S F L P H E M N E Q K R G E M L I E I N E H P E K E L
 E W P G D G S N L V G V E E L H V D D N A W K P R V T V
 K A V S P S M R L D M Q G V A G A L Q V F N L K R I L W

도면9



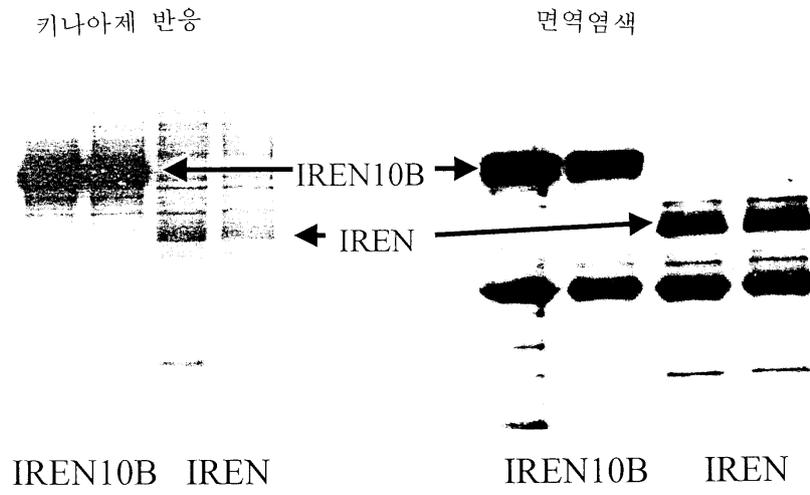
도면10



도면11



도면12



도면13a

BLAST results of bases 498 – 699 of 10B open reading frame (parts of putative exon 6 of the 10B gene) against htgs databank

>gb|AC007601.3|AC007601 Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-276H1, WORKING DRAFT SEQUENCE, 58
 unordered pieces
 Length = 238514

Score = 398 bits (201), Expect = e-109
 Identities = 201/201 (100%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 60
 |||
 Sbjct: 128380 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt
 128439

Query: 61 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 120
 |||
 Sbjct: 128440 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg
 128499

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcagggagatcacagcctcctctgcc 180
 |||
 Sbjct: 128500 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcagggagatcacagcctcctctgcc
 128559

Query: 181 gtctccatcctcatcaaact 201
 |||
 Sbjct: 128560 gtctccatcctcatcaaact 128580

>gb|AC034281.2|AC034281 Homo sapiens chromosome 4 clone RP11-65606 map 4, WORKING DRAFT SEQUENCE,
 32 unordered pieces
 Length = 205309

Score = 398 bits (201), Expect = e-109
 Identities = 201/201 (100%)
 Strand = Plus / Minus

Query: 1 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 60
 |||
 Sbjct: 119945 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt
 119886

Query: 61 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 120
 |||
 Sbjct: 119885 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg
 119826

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcagggagatcacagcctcctctgcc 180
 |||
 Sbjct: 119825 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcagggagatcacagcctcctctgcc
 119766

도면13a-1

```

Query: 181   gtctccatcctcatcaaacct 201
             |||
Sbjct: 119765 gtctccatcctcatcaaacct 119745

>gblAC008864.6|AC008864 Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2192M20, WORKING
DRAFT SEQUENCE, 9
             ordered pieces
             Length = 140011

Score = 331 bits (167), Expect = 1e-88
Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
             |||
Sbjct: 86177  ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt 86236

Query: 61     aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaacgtgacctccttg 120
             |||
Sbjct: 86237  aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaatgtga---ccttg 86293

Query: 121    ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
             |||
Sbjct: 86294  ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 86353

Query: 181    gtctccatcctcatcaaacct 201
             |||
Sbjct: 86354  atctccatcctcatcaaacct 86374

>gblAC008740.5|AC008740 Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2547E10, WORKING
DRAFT SEQUENCE, 4
             ordered pieces
             Length = 157848

Score = 331 bits (167), Expect = 1e-88
Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
             |||
Sbjct: 90259  ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt 90318

Query: 61     aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaacgtgacctccttg 120
             |||
Sbjct: 90319  aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaatgtga---ccttg 90375

Query: 121    ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
             |||
Sbjct: 90376  ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 90435

Query: 181    gtctccatcctcatcaaacct 201
             |||
Sbjct: 90436  atctccatcctcatcaaacct 90456
    
```

도면13a-2

```

>gb|AC025279.2|AC025279 Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-231C14, WORKING
DRAFT SEQUENCE, 25
      unordered pieces
      Length = 183752

Score = 331 bits (167), Expect = 1e-88
Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
      ||| |
Sbjct: 156098 ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt
156157

Query: 61      aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaacgtgacctccttg 120
      ||| |
Sbjct: 156158 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaatgtga---ccttg
156214

Query: 121     ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
      ||| |
Sbjct: 156215 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc
156274

Query: 181     gtctccatcctcatcaaacct 201
      ||| |
Sbjct: 156275 atctccatcctcatcaaacct 156295

>gb|AC023814.3|AC023814 Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2159J19, WORKING
DRAFT SEQUENCE,
      19 unordered pieces
      Length = 181463

Score = 331 bits (167), Expect = 1e-88
Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
      ||| |
Sbjct: 55839 ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt 55898

Query: 61      aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaacgtgacctccttg 120
      ||| |
Sbjct: 55899 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtcaacgcagaatgtga---ccttg 55955

Query: 121     ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
      ||| |
Sbjct: 55956 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 56015

Query: 181     gtctccatcctcatcaaacct 201
      ||| |
Sbjct: 56016 atctccatcctcatcaaacct 56036
    
```


도면13b

BLAST results of bases 498 – 699 of 10B open reading frame (parts of putative exon 6 of the 10B gene) against the est databank

```

>gb|AI369689.1|AI369689 qy71g08.x1 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:2017502 3'.
    Length = 439

    Score = 398 bits (201), Expect = e-109
    Identities = 201/201 (100%)
    Strand = Plus / Minus

Query: 1  ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 60
|||||
Sbjct: 276 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 217

Query: 61  aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 120
|||||
Sbjct: 216 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 157

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
|||||
Sbjct: 156 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 97

Query: 181 gtctccatcctcatcaaacct 201
|||||
Sbjct: 96  gtctccatcctcatcaaacct 76

>gb|AW503340.1|AW503340 UI-HF-BN0-akx-f-06-0-UI.r1 NIH_MGC_50 Homo sapiens cDNA
clone
    IMAGE:3078682 5'.
    Length = 520

    Score = 331 bits (167), Expect = 6e-89
    Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
    Strand = Plus / Plus

Query: 1  ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 60
|||||
Sbjct: 190 ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggattgaacgggcagagt 249

Query: 61  aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 120
|||||
Sbjct: 250 aagtttgctcccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaatgtga--ccttg 306

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
|||||
Sbjct: 307 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 366

Query: 181 gtctccatcctcatcaaacct 201
|||||
Sbjct: 367 atctccatcctcatcaaacct 387
    
```

도면13b-1

```

>gb|AW403206.1|AW403206 UI-HF-BK0-aay-f-08-0-UI.r1 NIH_MGC_36 Homo sapiens cDNA
clone
      IMAGE:3055622 5'.
      Length = 430

      Score = 331 bits (167), Expect = 6e-89
      Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
      Strand = Plus / Plus

Query: 1  ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 86  ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt 145

Query: 61  aagtttgctccccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctcttg 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 146 aagtttgctccccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaatgtga---ccttg 202

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 203 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 262

Query: 181 gtctccatcctcatcaaacct 201
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 263 atctccatcctcatcaaacct 283

>gb|AW206027.1|AW206027 UI-H-BI1-afy-h-03-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub3 Homo sapiens
cDNA clone
      IMAGE:2723572 3'.
      Length = 332

      Score = 331 bits (167), Expect = 6e-89
      Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
      Strand = Plus / Minus

Query: 1  ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggatttgaacgggcagagt 60
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 275 ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggatttgaacgggcagagt 216

Query: 61  aagtttgctccccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctcttg 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 215 aagtttgctccccaccgtttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaatgtgac---cttg 159

Query: 121 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 158 ctgaaggagtccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 99

Query: 181 gtctccatcctcatcaaacct 201
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 98  atctccatcctcatcaaacct 78

>gb|AA584128.1|AA584128 no10g11.s1 NCI_CGAP_Phe1 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:1100324 3'
      similar to contains element XTR repetitive element ;.
      Length = 414
    
```

도면13b-2

Score = 331 bits (167), Expect = 6e-89
 Identities = 193/201 (96%), Gaps = 3/201 (1%)
 Strand = Plus / Minus

Query: 1 ggtctgaactccatactctttgcgattaacatcgacaacaaggattgaacgggcagagt 60
 |||||
 Sbjct: 217 ggtccgaactccatactctttgcgattaacattgacaacaaggattgaacgggcagagt 158

Query: 61 aagtttgctcccaccgcttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaacgtgacctccttg 120
 |||||
 Sbjct: 157 aagtttgctcccaccgcttcagacctcttaaggagtgcaacgcagaatgtgac---cttg 101

Query: 121 ctgaaggagtgccacgcaaggagtgagcagcctgttcaggagatcacagcctcctctgcc 180
 |||||
 Sbjct: 100 ctgaaggagtgccacgcaaggagtgagcagcgtgttcaggagatcacagcctcctctgcc 41

Query: 181 gtctccatcctcatcaaacct 201
 |||||
 Sbjct: 40 atctccatcctcatcaaacct 20

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd
 Wallach, David Malinin, Nikolay

Sinha, Indranil
 Leu, Stefan

<120> IREN PROTEIN, ITS PREPARATION AND USE
 <130> 399
 <150> 131719
 <151> 1999-09-02
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

<223> Synthetic DNA Sequence
 <400> 1
 caggatcctc atggctgcag cttagcgtgac 30
 <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence -
 <400> 2
 ggtcgactta gagccctgtc aggtccacaa tg 32
 <210> 3
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 ggtaccgagc tcggatccac tagtaacggc cgccagtgtg ctggaattct gcggatgtac 60
 ccatacagatg ttccagatac gctgaatttc gaggccacga aggccggcgg cgcggcgcag 120
 gcaccggccc ggggagaggg
 acc 143

<210> 4
 <211> 1782
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 atgagcggat cacagaacaa tgacaaaaga caatttctgc tggagcgact gctggatgca 60
 gtgaaacagt gccagatccg ctttggaggg agaaaggaga ttgcctcgga ttccgacagc 120
 agggtcacct gtctgtgtgc ccagttttaa gccgtcctgc agcatggctt gaagaggagt 180
 cgaggattgg cactcacagc ggcagcgatc aagcaggcag cgggctttgc cagcaaaacc 240
 gaaacagagc ccgtgttctg gtactacgtg aaggaggtcc tcaacaagca cgagctgcag 300
 cgcttctact ccctgcgcca
 catcgectca gacgtgggcc ggggtcgcgc ctggctgcgc 360
 tgtgccctca acgaacactc cctggagcgc tacctgcaca tgctcctggc cgaccgctgc 420
 aggctgagca cttttatga agactggctct tttgtgatgg atgaagaaag gtccagtatg 480
 ctctctacca tggcagcagg tctgaactcc atactctttg cgattaacat cgacaacaag 540
 gatttgaacg ggcagagtaa gtttctccc accgtttcag acctcttaa ggagtcaacg 600
 cagaactgta cctccttctg gaaggagtcc acgcaaggag tgagcagcct gttcaggag 660
 atcacagcct cctctgcctg ctccatctc atcaaactg aacaggagac cgacccttg 720
 cctgtcgtgt
 ccaggaatgt cagtctgat gccaaatgca aaaaggagcg gaagaagaaa 780
 aagaaagtga ccaacataat ctcatttgat gatgaggaag atgagcagaa ctctggggac 840
 gtgtttaaaa agacacctgg ggcaggggag agctcagagg acaactccga ccgtcctct 900
 gtcaatatea tgtccgctt tgaagcccc ttcgggctca actccaatgg aagtcagagc 960
 agcaactcat ggaaaatga ttccctgtct ttgaacgggg agtttgggta ccagaagctt 1020
 gatgtgaaaa gcatcgatga tgaagatgtg gatgaaaacg aagatgacgt gtatggaac 1080
 tcatcaggaa ggaagcacag gggccactcg gagtgcgccg agaagccact ggaagggaac 1140
 acctgcctct ccagatgca cagctgggct ccgtgaagg tgctgcacaa tgactccgac 1200
 atcctcttcc ctgtcagtgg cgtgggctcc tacagcccag cagatgcccc cctcgggaagc 1260
 ctggagaacg ggacaggacc agaggaccac gttctcccgg atcctggact tcggtacagt 1320
 gtggaagcca gctctccagg ccacggaagt cctctgagca gcctgttacc tctgcctca 1380
 gtgccagagt ccatgacaat tagtgaactg cgccaggcca ctgtggccat gatgaacagg 1440
 aaggatgagc tggaggagga gaacagatca ctgcgaaacc tgctcgacgg tgagatggag 1500
 cactcagccg cgctccgcca agaggtggac acctgaaaa ggaaggtggc tgaacaggag
 1560
 gagcggcagg gcatgaaggt ccaggcctg gccagctatc tttgctatit tgtgaggaga 1620
 ttctaacccc acgtgagaac catgtggtgg agaaatggag ggagagagaa atccaacagt 1680
 tcctgatagt ctcatttgag ctctggatc cagtcttcc tgaagctgtg tttcctctgg 1740
 acttttcatg tatgtgagcc aataaattgc tttcattcct tg 1782
 <210> 5
 <211> 3139
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 atgagcggat cacagaacaa tgacaaaaga caatttctgc tggagcgact gctggatgca 60
 gtgaaacagt gccagatccg ctttggaggg agaaaggaga ttgcctcgga ttccgacagc
 120
 agggtcacct gtctgtgtgc ccagttttaa gccgtcctgc agcatggctt gaagaggagt 180
 cgaggattgg cactcacagc ggcagcgatc aagcaggcag cgggctttgc cagcaaaacc 240
 gaaacagagc ccgtgttctg gtactacgtg aaggaggtcc tcaacaagca cgagctgcag 300
 cgcttctact ccctgcgcca catcgectca gacgtgggcc ggggtcgcgc ctggctgcgc 360
 tgtgccctca acgaacactc cctggagcgc tacctgcaca tgctcctggc cgaccgctgc 420
 aggctgagca cttttatga agactggctct tttgtgatgg atgaagaaag gtccagtatg 480
 ctctctacca tggcagcagg tctgaactcc atactctttg cgattaacat
 cgacaacaag 540
 gatttgaacg ggcagagtaa gtttctccc accgtttcag acctcttaa ggagtcaacg 600
 cagaactgta cctccttctg gaaggagtcc acgcaaggag tgagcagcct gttcaggag 660

atcacagcct cctctgccgt ctccatcctc atcaaacctg aacaggagac cgacccttg 720
cctgtcgtgt ccaggaatgt cagtgtgat gccaaatgca aaaaggagcg gaagaagaaa 780
aagaaagtga ccaacataat ctcatttgat gatgaggaag atgagcagaa ctctggggac 840
gtgtttaaaa agacacctgg ggcaggggag agctcagagg acaactccga ccgctcctct 900
gtcaatatca tgtccgcctt tgaaagcccc ttcgggcta
actccaatgg aagtccagagc 960
agcaactcat ggaaaatgga ttccctgtct ttgaacgggg agtttgggta ccagaagctt 1020
gatgtgaaaa gcatcgatga tgaagatgtg gatgaaaacg aagatgacgt gtatggaaac 1080
tcatcaggaa ggaagcacag gggccactcg gagtgcgccg agaagccact ggaaggggac 1140
acctgectct cccagatgca cagctgggct ccgctgaagg tgctgcacaa tgactccgac 1200
atcctcttcc ctgtcagtgg cgtgggctcc tacagcccag cagatgcccc cctcggaagc 1260
ctggagaacg ggacaggacc agaggaccac gttctcccgg atcctggact tcggtacagt 1320
gtggaagcca gctctccagg ccacggaagt
cctctgagca gcctgttacc ttctgectca 1380
gtgccagagt ccatgacaat tagtgaactg cgccaggcca ctgtggccat gatgaacagg 1440
aaggatgagc tggaggagga gaacagatca ctgcgaaacc tgctcgacgg tgagatggag 1500
cactcagccc cgctccggca agaggtggac accttgaana ggaaggtggc tgaacaggag 1560
gagcggcagg gcatgaaggt ccagcgctg gccagagaga acgaggtgct caaagtcaa 1620
ctgaagaaat atgtaggagc tgtccagatg ctgaaaagag aaggtcaaac agctgaagtg 1680
ccaaatcttt ggagtgttga tggagaagtt acagtactg aacagaagcc gggagaaatt 1740
gctgaagaac tcgcaagctc
ctacgaaaga aagctcatcg aggtggcaga gatgcatggc 1800
gagctgattg agtcaacga gcgcctgcac agggccctgg tagccaagga agccctcgtg 1860
tcccagatga ggcaggagct catcgatctc cggggaccgg tgcttgagga tttagtcaa 1920
acgtccgaag accagagttt gtccgatttt gaaatacaa accgggcgct gatcaacgtc 1980
tggatcccc cagtgtttct ccggggcaaa gcagcaaatg cattccacgt gtatcaggtc 2040
tacatccgga taaaagacga tgaatggaat atttatcgcc ggtatacaga gttcaggagt 2100
ttgcaccaca agttacaaaa caagtacct caagtgggg cctacaactt cccaccacaa 2160
aaggccattg
gaaacaagga tgccaagtgt gtggagggaac ggagaaagca gctccagaat 2220
tacctgcgca gcgtcatgaa caaagtcatc cagatggtcc ccgagttcgc tgccagcccc 2280
aagaaggaga ccctcatcca gctgatgcc ttcttcgtcg acatcacccc gcccgagag 2340
cctgtgaaca gccggcccaa agcagcttcc cgctttcca aactgtccc gggtagcccc 2400
cgggagacc gcaacgtgga gcccagagc ggtgacctct gacctcgaca aaaccgcagc 2460
cacgggcccc gtgcgtggca ccagctgcgt ccaccccagc cactgccgct ggccccac 2520
ctcagcgtga caaccacgtc ccactggtga tctgagagc acacgattcc caacagttac 2580
acaacacccc gattaaacta atcagctctc gagccgcatg ataccgtgac ccgagagacc 2640
aaggcagcac ctgcctggag agactgggac acacagtcct tctgcttctg gggcttacc 2700
tgggctgcaa gggctgttcc tccaccttcc tatagttcag ggctggcagg aggggtgggca 2760
ccaggtcagg ctgggtgcgc catggtttag aggcaaaagt gatcccctat ataggaaagt 2820
tcatgcagag ccagcctctc cactcttcc catgtgggga ctagaatgac tattagctc 2880
ttcctttgct ttttaaggtt attactggc ctaacctagg gatggctggc tgtggggggg 2940
gggggtgggc atggttcctt tcactgcatt ttccaccaac agtcattaga cacctggcac
3000
tgtcacagct cacttttcca gagggatatt cctgtggctt tggcaaggag ccattagtga 3060
tgtgcaactt gagtccagag aacttcccc acctcccaca tggctggctt caggaaggac 3120
cagtgcctc catagcctg 3139
<210> 6
<211> 2873
<212> DNA
<213> homo sapiens
<400> 6
atgagcggat cacagaaca tgacaaaaga caatttctgc tggagcgact gctggatgca 60
tgaaacagt gccagatccg ctttggaggg agaaaggaga ttgcctcgga ttccgacagc 120
agggcacct gtctgtgtgc ccagttgaa gccgtcctgc agcatggctt gaagaggagt

cgaggattgg cactcacagc ggcagcgatc aagcaggcag cgggctttgc cagcaaaacc 240
 gaaacagagc ccgtgttctg gtactactgt aaggaggtcc tcaacaagca cgagctgcag 300
 cgcttctact cctcgcgcca catcgctca gacgtgggcc ggggtcgcgc ctggctgcgc 360
 tgtgccctca acgaacactc cctggagcgc tacctgcaca tgctcctggc cgaccctgc 420
 aggctgagca cttttatga agactggctt tttgtgatgg atgaagaaag gtccagtatg 480
 cttectacca tggcagcagg tctgaactcc atactctttg cgattaacat cgacaacaag 540
 gatttgaacg ggcagagtaa gtttctccc accgtttcag acctctaaa
 ggagtcaacg 600
 cagaacgtga cctccttgcct gaaggagtcc acgcaaggag tgagcagcct gttcagggag 660
 atcacagcct cctctgccgt ctccatctc atcaaactg aacaggagac cgacccttg 720
 cctgtcgtgt ccaggaatgt cagtctgat gccaaatgca aaaaggagcg gaagaagaaa 780
 aagaaagtga ccaacataat ctcatttgat gatgaggaag atgagcagaa ctctggggac 840
 gtgtttaaaa agacacctgg ggcaggggag agctcagagg acaactccga ccgctcctct 900
 gtcaatatca tgtccgctt tgaagcccc ttcgggctca actccaatgg aagtcagagc 960
 agcaactcat ggaaaattga ttccctgtct ttgaacgggg
 agtttgggta ccagaagctt 1020
 gatgtgaaaa gcatcgatga tgaagatgtg gatgaaaacg aagatgacgt gtatggaaac 1080
 tcatcaggaa ggaagcacag gggccactcg gactcggccg agaagccact ggaagggaac 1140
 acctgcctct cccagatgca cagctgggct ccgctgaagg tgctgcacaa tgactccgac 1200
 atcctcttcc ctgtcagtgg cgtgggctcc tacagcccag cagatgcccc cctcggaagc 1260
 ctggagaacg ggacaggacc agaggaccac gttctcccgg atcctggact tcggtacagt 1320
 gtggaagcca gctctccagg ccacggaagt cctctgagca gcctgttacc tctgcctca 1380
 gtgccagagt ccatgacaat tagtgaactg
 cgccaggcca ctgtggccat gatgaacagg 1440
 aaggatgagc tggaggagga gaacagatca ctgcgaacc tgctcgacgg tgagatggag 1500
 cactcagccg cgtcggcca agaggtggac acctgaaaa ggaaggtggc tgaacaggag 1560
 gagcggcagg gcatgaaggt ccagcgctg gccagagaga acgaggtgct caaagtcca 1620
 ctgaaagaaat atgtaggagc tgtccagatg ctgaaaagag aaggtcaaac agctgaagtg 1680
 ccaaatcttt ggagtgttga tggagaagt acagtactg aacagaagcc gggagaaatt 1740
 gctgaagaac tcgaagctc ctacgaaaga aagctcatcg aggtggcaga gatgcatggc 1800
 gagctgattg agttcaacga
 gcgctgcac agggccctgg tagccaagga agccctcgtg 1860
 tcccagatga ggcaggagct catcgatctc cggggaccgg tgcttgaga tttgagtcaa 1920
 acgtccgaag accagagttt gtcggattt gaaatatcaa accggcgct gatcaacgtc 1980
 tggatccct cagtgttct cggggcaca gcagcaaatg cattccact gtatcaggtc 2040
 tacatccgga taaaagacga tgaatggaat atttatgcc ggtatacaga gttcaggagt 2100
 ttgcaccaca agttacaaa caagtacct caagtgggg cctacaactt cccaccacaa 2160
 aaggccattg gaaacaagga tgccaagt tttggaggaac ggagaaagca gctccagaat 2220
 tactgcgca
 gcgtcatgaa caaagtcac cagatggctc ccgagttcgc tgccagcccc 2280
 aagaaggaga ccctcatcca gctgatgcc tttctcgtcg actggatctc acttgtttgg 2340
 aaatggccgc gatagttcac gtgaggagt ctcatctct tagcggcatc cccatggccc 2400
 aggggtgcac ggggaattag cctctcgcgg agtcatcac catcgactga attccctggt 2460
 gaaaactgag ttagccagtt gttcctaaga tactcctgat gctgagagt tgagcaggag 2520
 gcgctgcccc atccgaagt cagtgtccc caccctcgc ggggtccaca gccaggcat 2580
 ctccggtcca gtgtttccca aacatcgcg tgccgaattg taaaaagtgc acgttaatgc 2640
 gagcctgtcg gtgtgacatg aatctcagcc atgctggtg ccatcagtc gcacggagag 2700
 agaaaccttt tgtgcctaat tagcacgcag aacagaacac agggttcgat ttatggactt 2760
 ttcaaaacga gaatttcagt gggagactgt ggcaaatgac acagtgttga cactggaatt 2820
 ttgactacat gttggtctag agcgccgcc acccggtgg agtccaatt cgt 2873
 <210> 7
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

Ser Asn Ser Trp Lys Ile Asp Ser Leu Ser Leu Asn Gly Glu Phe Gly
 325 330 335
 Tyr Gln Lys Leu Asp Val Lys Ser Ile Asp Asp Glu Asp Val Asp Glu
 340 345 350
 Asn Glu Asp Asp Val Tyr Gly Asn Ser Ser Gly Arg Lys His Arg Gly
 355 360 365
 His Ser Glu Ser Pro Glu Lys Pro Leu Glu Gly Asn Thr Cys Leu Ser
 370 375 380
 Gln Met His Ser Trp Ala Pro Leu Lys Val Leu His Asn Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Leu Phe Pro Val Ser Gly Val Gly Ser Tyr Ser Pro Ala Asp Ala
 405 410 415
 Pro Leu Gly Ser Leu Glu Asn Gly Thr Gly Pro Glu Asp His Val Leu
 420 425 430
 Pro Asp Pro Gly Leu Arg Tyr Ser Val Glu Ala Ser Ser Pro Gly His
 435 440 445
 Gly Ser Pro Leu Ser Ser Leu Leu Pro Ser Ala Ser Val Pro Glu Ser
 450 455 460
 Met Thr Ile Ser Glu Leu Arg Gln Ala Thr Val Ala Met Met Asn Arg
 465 470 475 480
 Lys Asp Glu Leu Glu Glu Glu Asn Arg Ser Leu Arg Asn Leu Leu Asp
 485 490 495
 Gly Glu Met Glu His Ser Ala Ala Leu Arg Gln Glu Val Asp Thr Leu
 500 505 510
 Lys Arg Lys Val Ala Glu Gln Glu Glu Arg Gln Gly Met Lys Val Gln
 515 520 525
 Ala Leu Ala Ser Tyr Leu Cys Tyr Phe Val Arg Arg Phe
 530 535 540
 <210> 8
 <211> 813
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Ser Gly Ser Gln Asn Asn Asp Lys Arg Gln Phe Leu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Ala Val Lys Gln Cys Gln Ile Arg Phe Gly Gly Arg Lys
 20 25 30
 Glu Ile Ala Ser Asp Ser Asp Ser Arg Val Thr Cys Leu Cys Ala Gln
 35 40 45
 Phe Glu Ala Val Leu Gln His Gly Leu Lys Arg Ser Arg Gly Leu Ala
 50 55 60
 Leu Thr Ala Ala Ala Ile Lys Gln Ala Ala Gly Phe Ala Ser Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Pro Val Phe Trp Tyr Tyr Val Lys Glu Val Leu Asn Lys
 85 90 95
 His Glu Leu Gln Arg Phe Tyr Ser Leu Arg His Ile Ala Ser Asp Val
 100 105 110
 Gly Arg Gly Arg Ala Trp Leu Arg Cys Ala Leu Asn Glu His Ser Leu
 115 120 125
 Glu Arg Tyr Leu His Met Leu Leu Ala Asp Arg Cys Arg Leu Ser Thr
 130 135 140
 Phe Tyr Glu Asp Trp Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Arg Ser Ser Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Thr Met Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Leu Phe Ala Ile Asn
 165 170 175
 Ile Asp Asn Lys Asp Leu Asn Gly Gln Ser Lys Phe Ala Pro Thr Val
 180 185 190
 Ser Asp Leu Leu Lys Glu Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Lys
 195 200 205
 Glu Ser Thr Gln Gly Val Ser Ser Leu Phe Arg Glu Ile Thr Ala Ser
 210 215 220
 Ser Ala Val Ser Ile Leu Ile Lys Pro Glu Gln Glu Thr Asp Pro Leu
 225 230 235 240
 Pro Val Val Ser Arg Asn Val Ser Ala Asp Ala Lys Cys Lys Lys Glu
 245 250 255
 Arg Lys Lys Lys Lys Lys Val Thr Asn Ile Ile Ser Phe Asp Asp Glu
 260 265 270
 Glu Asp Glu Gln Asn Ser Gly Asp Val Phe Lys Lys Thr Pro Gly Ala
 275 280 285
 Gly Glu Ser Ser Glu Asp Asn Ser Asp Arg Ser Ser Val Asn Ile Met
 290 295 300
 Ser Ala Phe Glu Ser Pro Phe Gly Pro Asn Ser Asn Gly Ser Gln Ser
 305 310 315 320
 Ser Asn Ser Trp Lys Ile Asp Ser Leu Ser Leu Asn Gly Glu Phe Gly
 325 330 335
 Tyr Gln Lys Leu Asp Val Lys Ser Ile Asp Asp Glu Asp Val Asp Glu
 340 345 350
 Asn Glu Asp Asp Val Tyr Gly Asn Ser Ser Gly Arg Lys His Arg Gly
 355 360 365
 His Ser Glu Ser Pro Glu Lys Pro Leu Glu Gly Asn Thr Cys Leu Ser
 370 375 380
 Gln Met His Ser Trp Ala Pro Leu Lys Val Leu His Asn Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Leu Phe Pro Val Ser Gly Val Gly Ser Tyr Ser Pro Ala Asp Ala
 405 410 415

Pro Leu Gly Ser Leu Glu Asn Gly Thr Gly Pro Glu Asp His Val Leu
 420 425 430
 Pro Asp Pro Gly Leu Arg Tyr Ser Val Glu Ala Ser Ser Pro Gly His
 435 440 445
 Gly Ser Pro Leu Ser Ser Leu Leu Pro Ser Ala Ser Val Pro Glu Ser
 450 455 460
 Met Thr Ile Ser Glu Leu Arg Gln Ala Thr Val Ala Met Met Asn Arg
 465 470 475 480
 Lys Asp Glu Leu Glu Glu Asn Arg Ser Leu Arg Asn Leu Leu Asp
 485 490 495
 Gly Glu Met Glu His Ser Ala Ala Leu Arg Gln Glu Val Asp Thr Leu
 500 505 510
 Lys Arg Lys Val Ala Glu Gln Glu Glu Arg Gln Gly Met Lys Val Gln
 515 520 525
 Ala Leu Ala Arg Glu Asn Glu Val Leu Lys Val Gln Leu Lys Lys Tyr
 530 535 540
 Val Gly Ala Val Gln Met Leu Lys Arg Glu Gly Gln Thr Ala Glu Val
 545 550 555 560
 Pro Asn Leu Trp Ser Val Asp Gly Glu Val Thr Val Ala Glu Gln Lys
 565 570 575
 Pro Gly Glu Ile Ala Glu Glu Leu Ala Ser Ser Tyr Glu Arg Lys Leu
 580 585 590
 Ile Glu Val Ala Glu Met His Gly Glu Leu Ile Glu Phe Asn Glu Arg
 595 600 605
 Leu His Arg Ala Leu Val Ala Lys Glu Ala Leu Val Ser Gln Met Arg
 610 615 620
 Gln Glu Leu Ile Asp Leu Arg Gly Pro Val Pro Gly Asp Leu Ser Gln
 625 630 635 640
 Thr Ser Glu Asp Gln Ser Leu Ser Asp Phe Glu Ile Ser Asn Arg Ala
 645 650 655
 Leu Ile Asn Val Trp Ile Pro Ser Val Phe Leu Arg Gly Lys Ala Ala
 660 665 670
 Asn Ala Phe His Val Tyr Gln Val Tyr Ile Arg Ile Lys Asp Asp Glu
 675 680 685
 Trp Asn Ile Tyr Arg Arg Tyr Thr Glu Phe Arg Ser Leu His His Lys
 690 695 700
 Leu Gln Asn Lys Tyr Pro Gln Val Arg Ala Tyr Asn Phe Pro Pro Lys
 705 710 715 720
 Lys Ala Ile Gly Asn Lys Asp Ala Lys Phe Val Glu Glu Arg Arg Lys
 725 730 735
 Gln Leu Gln Asn Tyr Leu Arg Ser Val Met Asn Lys Val Ile Gln Met
 740 745 750

Val Pro Glu Phe Ala Ala Ser Pro Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Leu
 755 760 765
 Met Pro Phe Phe Val Asp Ile Thr Pro Pro Gly Glu Pro Val Asn Ser
 770 775 780
 Arg Pro Lys Ala Ala Ser Arg Phe Pro Lys Leu Ser Arg Gly Gln Pro
 785 790 795 800
 Arg Glu Thr Arg Asn Val Glu Pro Gln Ser Gly Asp Leu
 805 810
 <210> 9
 <211> 784
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Ser Gly Ser Gln Asn Asn Asp Lys Arg Gln Phe Leu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Ala Val Lys Gln Cys Gln Ile Arg Phe Gly Gly Arg Lys
 20 25 30
 Glu Ile Ala Ser Asp Ser Asp Ser Arg Val Thr Cys Leu Cys Ala Gln
 35 40 45
 Phe Glu Ala Val Leu Gln His Gly Leu Lys Arg Ser Arg Gly Leu Ala
 50 55 60
 Leu Thr Ala Ala Ala Ile Lys Gln Ala Ala Gly Phe Ala Ser Lys Thr
 65 70 75 80
 Glu Thr Glu Pro Val Phe Trp Tyr Tyr Val Lys Glu Val Leu Asn Lys
 85 90 95
 His Glu Leu Gln Arg Phe Tyr Ser Leu Arg His Ile Ala Ser Asp Val
 100 105 110
 Gly Arg Gly Arg Ala Trp Leu Arg Cys Ala Leu Asn Glu His Ser Leu
 115 120 125
 Glu Arg Tyr Leu His Met Leu Leu Ala Asp Arg Cys Arg Leu Ser Thr
 130 135 140
 Phe Tyr Glu Asp Trp Ser Phe Val Met Asp Glu Glu Arg Ser Ser Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Thr Met Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Leu Phe Ala Ile Asn
 165 170 175
 Ile Asp Asn Lys Asp Leu Asn Gly Gln Ser Lys Phe Ala Pro Thr Val
 180 185 190
 Ser Asp Leu Leu Lys Glu Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Lys
 195 200 205
 Glu Ser Thr Gln Gly Val Ser Ser Leu Phe Arg Glu Ile Thr Ala Ser
 210 215 220
 Ser Ala Val Ser Ile Leu Ile Lys Pro Glu Gln Glu Thr Asp Pro Leu

Pro Gly Glu Ile Ala Glu Glu Leu Ala Ser Ser Tyr Glu Arg Lys Leu
 580 585 590
 Ile Glu Val Ala Glu Met His Gly Glu Leu Ile Glu Phe Asn Glu Arg
 595 600 605
 Leu His Arg Ala Leu Val Ala Lys Glu Ala Leu Val Ser Gln Met Arg
 610 615 620
 Gln Glu Leu Ile Asp Leu Arg Gly Pro Val Pro Gly Asp Leu Ser Gln
 625 630 635 640
 Thr Ser Glu Asp Gln Ser Leu Ser Asp Phe Glu Ile Ser Asn Arg Ala
 645 650 655
 Leu Ile Asn Val Trp Ile Pro Ser Val Phe Leu Arg Gly Lys Ala Ala
 660 665 670
 Asn Ala Phe His Val Tyr Gln Val Tyr Ile Arg Ile Lys Asp Asp Glu
 675 680 685
 Trp Asn Ile Tyr Arg Arg Tyr Thr Glu Phe Arg Ser Leu His His Lys
 690 695 700
 Leu Gln Asn Lys Tyr Pro Gln Val Arg Ala Tyr Asn Phe Pro Pro Lys
 705 710 715 720
 Lys Ala Ile Gly Asn Lys Asp Ala Lys Phe Val Glu Glu Arg Arg Lys
 725 730 735
 Gln Leu Gln Asn Tyr Leu Arg Ser Val Met Asn Lys Val Ile Gln Met
 740 745 750
 Val Pro Glu Phe Ala Ala Ser Pro Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Leu
 755 760 765
 Met Pro Phe Phe Val Asp Trp Ile Ser Leu Val Trp Lys Trp Pro Arg
 770 775 780