(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.^{7}
C12N 15/52
C12N 9/64

(11) 공개번호 10-2004-0077928
(43) 공개일자 2004년09월07일

(21) 출원번호 10-2004-7011904
(22) 출원일자 2004년07월30일
번역문 제출일자 2004년07월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/003058
(86) 국제출원출원일자 2003년01월31일
(87) 국제공개번호 WO 2003/064622
(87) 국제공개일자 2003년08월07일

(30) 우선권주장 60/353,680 2002년01월31일 미국(US)

(71) 출원인
와이어쓰
미합중국 뉴저지 매디슨 파이브 지랄다-팜즈 (우편번호 07940-0874)

(72) 발명자
코르코란크리스토퍼
미국 마이애미주 02474 알링턴 브로드웨이 스트리트 170

아고스티노마이클제이
미국 마이애미주 01810 앤드오버 월코트 애비뉴 26

라발리에드워드
미국 마이애미주 01451 하버드 앤 리 로드 113

프리만베타니
미국 마이애미주 02474 알링턴 포스터 스트리트 52

젱웨일란
미국 마이애미주 02452 월덤 렉싱턴 스트리트 696

콜린스레이시
미국 마이애미주 01720 액턴 스쿨 스트리트 124

플래너리카를알
미국 마이애미주 01720 액턴 브루스우드 로드 13

(74) 대리인
이병호

심사청구 : 없음

(54) 아그레카나제 분자

요약

신규 아그레카나제 단백질 및 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 이를 제조하는 방법이 기술된다. 아그레칸의 분해를 특징으로 하는 상태를 치료하기 위한 아그레카나제 효소의 억제제 및 당해 효소에 대한 억제제를 확인 및 개발하는 방법이 또한 기술된다.

대표도

도 1A

색인어

아그레카나제, 아그레칸, 골관절염, 단백질분해 활성

명세서

관련 출원

본 출원은 전문이 본원에서 참조로 인용되는, 2002년 1월 31일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/353,680호의 우선권의 잇점을 주장한다.

기술분야

본 발명은 신규 아그레카나제 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 아그레카나제 단백질 및 이의 단편 및 이의 제조방법의 발견에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아그레카나제 효소의 억제제 및 아그레카나제 효소에 대한 항체의 확인 및 개발에 관한 것이다. 이들 억제제 및 항체는 골관절염을 포함하는 각종 아그레카나제 관련 상태의 치료용으로 유용할 수 있다.

배경기술

아그레칸은 관절연골의 주요 세포외 성분이다. 이는 연골에 이의 압축성 및 탄력성의 물리적 특성을 제공하는 프로테오글리칸이다. 아그레칸의 손실은 관절 질환에 있어 관절 연골의 분해와 관련되어 왔다. 골관절염은 3천만명 이상의 미국인들이 앓고 있는 쇠약성 질병이다[참조: MacLean et al., J Rheumatol 25:2213-8 (1998)]. 골관절염은 관절 연골의 분해 및 이로 인한 만성 통증으로 인해 생활의 질을 심각하게 감소시킬 수 있다. 골관절염 과정의 초기의 중요한 특징은 세포외 매트릭스로부터 아그레칸의 손실이다[참조: Brandt and Mankin, Pathogenesis of Osteoarthritis, in Textbook of Rheumatology, WB Saunders Company, Philadelphia, PA, at 1355-1373 (1993)]. 이로 인해서, 아그레칸의 당을 함유하는 상당 부분이 세포외 매트릭스로부터 손실됨으로써 연골의 생체역학적 특징이 결핍된다.

'아그레카나제'로서 명명되는 단백질분해 활성은 아그레칸의 분해를 초래함으로써 골관절염 및 염증성 관절 질환과 동반되는 연골 분해에서 역활을 하는 것으로 사료된다. 사람 골관절염성 연골에서 아그레칸의 분해를 초래하는 효소를 확인하고자 하는 연구가 수행되어 왔다. 2개 이상의 효소 분해 부위가 아그레칸의 구체사이(interglobular) 도메인 내에서 확인되었다. 아그레칸의 구체사이 도메인 내의 하나의 효소 분해 부위(Asn ^{341} - Phe ^{342})는 몇가지 공지된 메탈로프로테아제에 의해 분해되는 것으로 관찰되었다[참조: Flannery et al., J Biol Chem 267:1008-14 (1992); Fosang et al., Biochemical J. 304:347-351 (1994)]. IL-1 유도된 연골 아그레칸 분해로 인한 아그레칸내의 제2 아그레칸 분해 부위(Glu ^{373} - Ala ^{374})에서의 분해는 사람 윤활액에서 발견되는 아그레칸 단편을 생성시킨다[참조: Sandy et al., J Clin Invest 69:1512-1516 (1992); Lohmander et al., Arthritis Rheum 36: 1214-1222 (1993); Sandy et al., J Biol Chem 266:8683-8685 (1991)]. (Glu ^{373} - Ala ^{374})에서의 아그레칸 분해는 아그레카나제 활성에 기인하여 왔다[참조:Sandy et al., J Clin Invest 69: 1512-1516 (1992)]. 이러한 Glu ^{373} -Ala ^{374} 분해 부위는 아그레카나제 분해 부위로서 지칭될 것이다.

최근에는, IL-1 자극된 연골에 의해 합성되며 Glu ^{373} -Ala ^{374} 부위에서 아그레칸을 분해하는, '트롬보스폰딘 1형 모티프를 갖는 디스인테그린-유사 및 메탈로프로테아제'(ADAMTS) 계통내의 2가지 효소, 즉 아그레카나제-1(ADAMTS-4) 및 아그레카나제-2(ADAMTS-11)가 동정된 바 있다[참조: Tortorella et al., Science 284: 1664-6 (1999); Abbaszade et al, J Biol Chem 274: 23443-23450 (1999)]. 상기 효소들이 골관절염성 사람 관절 연골에 의해 합성될 수 있을 가능성이 있다. 또한, Glu ^{373} -Ala ^{374} 결합에서 아그레칸을 분해할 수 있고 골관절염에서 아그레칸 분해에 기여할 수 있는 ADAMTS 계통의 기타 관련 효소가 있는 것으로 고려된다. 따라서, 다양한 아그레카나제 효소를 확인하고 이의 효소 활성을 차단하는 방식을 결정해야할 필요가 있다.

발명의 요약

본 발명은 아그레칸을 분해할 수 있는 신규한 아그레카나제 단백질 분자의 확인, 상기 아그레카나제 효소를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 아그레카나제의 제조방법에 관한 것이다. 상기 효소는 단백질분해성 아그레카나제 활성을 지니는 것을 특징으로 하는 것으로 고려된다. 본 발명은 추가로 상기 효소를 포함하는 조성물을 포함한다.

본 발명은 또한 상기 효소에 대한 항체, 하나의 양태에서 예를 들어, 아그레카나제 활성을 차단하는 항체를 포함한다. 또한, 본 발명은 효소의 단백질분해 활성을 차단하는 아그레카나제의 억제제를 확인하고 개발하는 방법을 포함한다. 이러한 억제제 및 항체는 각종 검정 및 관절 연골의 분해를 특징으로 하는 상태 치료용 치료요법에서 사용할 수 있다. 본 발명은 신규한 아그레카나제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 서열 1의 뉴클레오타이드 1번 내지 뉴클레오타이드 3663번(도 1A 및 1B); 아그레카나제 활성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 서열 1의 단편; 아그레카나제 활성을 나타내는 단백질 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열 1의 변이체 및 이의 단편; 엄격한 조건하에 서열 1과 하이브리드화하는 서열; 천연 사람 대립유전자 서열; 및 등가 변성 코돈 서열로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자를 특징으로 한다.

다른 양상에서, 본 발명은 서열 2(도 2)의 아미노산 1번(메티오닌) 내지 아미노산 1221번(이소류신), 아그레카나제 활성을 나타내는 서열 2의 단편, 및 결실 및 치환 돌연변이체를 포함하여, 단백질분해 활성을 나타내는 아그레카나제 단백질의 변이체 및 단편으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분리된 아그레카나제 단백질을 포함한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 분리된 아그레카나제 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 하나의 방법은 서열 1에 제시한 DNA 서열과 같은 DNA 서열로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계(1), 상기 숙주 세포를 배양하는 단계(2) 및 당해 DNA 서열에 의해 암호화되는 서열 2에 제시된 아그레카나제 효소를 세포 배양 배지로부터 정제하는 단계(3)를 포함한다.

본 발명은 또한 본 발명의 분리된 아그레카나제 단백질에 결합하는 항체를 제공한다. 하나의 양태에서, 이러한 항체는 아그레카나제 활성을 감소, 억제 또는 길항시킨다. 본 발병은 추가로 서열 2, 또는 이의 단편 또는 변이체로부터 선택된 아그레카나제 단백질을 사용함을 포함하여, 아그레카나제 활성의 억제제를 개발 및 동정하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 아그레카나제 활성의 억제제는 아그레칸의 분해를 방지한다.

추가로, 본 발명은 하나 이상의 본 발명에 따른 항체와 하나 이상의 약제학적 담체를 포함하는, 아그레카나제의 단백질분해 활성을 억제하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 포유동물에게 아그레카나제 활성을 억제하기에 유효한 양의 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 당해 포유동물에서 아그레카나제 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

본원의 추가의 양상은 부분적으로 하기 설명 부분에서 제시될 것이며 부분적으로 이러한 설명 부분으로부터 명백하거나 본 발명의 실시로부터 습득할 수 있다. 본 발명은 청구의 범위에 제시, 특히 교시되어 있으며, 그 내용은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 다음의 상세한 설명은 본 발명의 다양한 양태의 예시적 설명을 포함하며, 이는 청구된 바와 같은 본 발명을 제한하지 않는다. 첨부한 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며, 설명과 함께 양태를 도시하기 위해 제공되며 본 발명을 제한하지 않는다.

도면의 간단한 설명

도 1A 및 1B는 ADAMTS-18(EST18)에 대한 전체길이 뉴클레오타이드 서열(서열 1)을 도시한 것이다.

도 2는 서열 1의 뉴클레오타이드 서열에 기초한 ADAMTS-18에 대한 전체길이 아미노산 서열(서열 2)을 도시한 것이다.

도 3A 및 3B는 ADAMTS-18(EST18)의 뉴클레오타이드 서열(서열 3)을 도시한 것이다.

도 4는 서열 3의 뉴클레오타이드 서열에 기초한 ADAMTS-18의 추정상의 아미노산 서열(서열 4)을 도시한 것이다.

도 5A 및 도 5B는 셀렐라 데이타베이스 마이닝(Celera database mining) 기술로 확인된 ADAMTS-18에 대한 실제 아미노산 서열(서열 5)을 도시한 것이다.

도 6A는 EST18 뉴클레오타이드 서열의 단편을 증폭시키기 위한 PCR 프라이머의 도식적 설명을 도시한 것이다. 도 6B는 제한 효소에 대한 부위를 포함하는 EST18의 중첩 뉴클레오타이드 서열의 도식적 설명을 도시한 것이다.

도 7은 스트렙타비딘-태그에 연결된 ADAMTS-18의 절단된 형태를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 도시한 것이다.

도 8은 서열 7에 기초한, 스트렙타비딘-태그를 포함하는 ADAMTS-18의 절단된 형태의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

도 9는 GCG 플롯구조(plotstructure) 프로그램을 이용하여 서열 2의 단백질 에 대해 생성시킨 소수성 플롯의 도식적 설명을 도시한 것이다.

도 10은 아그레카나제 활성을 검출하기 위한 검정의 도식적 설명을 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있기 위해서, 특정 용어들이 먼저 정의된다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다.

'아그레카나제'란 용어는 아그레칸 단백질을 분해할 수 있는 폴리펩타이드 계통을 의미한다. 일반적으로, 이들은 Glu ^{373} -Ala ^{374} 아그레카나제 분해 부위에서 아그레칸을 분해하는 단백질이다. 본 발명의 아그레카나제는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. '아그레카나제'란 용어는 서열 2에 제시된 아미노산 서열의 천연 변이체 뿐만 아니라, 제공되는 하나 이상의 검정에서 활성인 서열 2의 단편을 포함한다. 예를 들어, 본 정의에는 서열 2의 아미노산 또는 이의 단편과 실질적으로 유사하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 서열 2의 아미노산 서열 또는 이의 단편과 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상 동일한 아미노산 서열이 포함된다. '아그레카나제'란 용어에는 기술되는 서열 1의 핵산 서열, 또는 이의 단편 및 변이체가 포함된다. 하 나의 양태에서, 본 발명의 핵산은 천연 아그레카나제 암호화 유전자로부터 유래되거나 천연 아그레카나제 암호화 유전자의 변이체인 서열 또는 이의 단편인 서열을 지닐 것이다.

'아그레카나제 활성'이란 용어는 아그레칸에 결합하는 아그레카나제 효소에 의해 방해되거나 개시되는 하나 이상의 세포 과정을 의미한다. 일반적으로, 활성은 아그레카나제에 의한 아그레칸의 단백질분해성 분해를 의미한다. 아그레카나제 활성으로는 아그레카나제의 아그레칸에의 결합 및 아그레카나제에 의한 아그레칸의 분해가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 활성은 아그레칸의 본 발명의 아그레칸에의 결합 및 본 발명의 아그레카나제에 의한 아그레칸의 분해로부터 야기되는 생물학적 반응을 또한 포함할 수 있다.

'항체'란 용어는 면역글로불린 또는 이의 단편을 의미하며, 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 용어에는 폴리클로날, 모노클로날, 일특이적, 다특이적, 비특이적, 사람화, 사람, 일본쇄, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이된, 이식된 및 시험관내 생성된 항체가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 달리 언급하지 않는 한, 상기 용어에는 Fab, F(ab') $_2$, Fv, scFv, Fd, dAb, 및 항원 결합 작용을 유지하는 기타 항체 단편도 또한 포함된다.

'유효량'이란 용어는 환자를 치료하기에 충분한 본 발명의 하나 이상의 아그레카나제 억제제 또는 항체를 포함하는 조성물의 투여량 또는 양을 의미한다.

아그레카나제 또는 아그레카나제를 '억제하다' 또는 '억제'란 용어는 아그레 카나제 또는 아그레칸에 억제제가 결합됨으로 인한 아그레카나제의 하나 이상의 활성의 감소, 억제 또는 저하를 의미한다. 결합의 감소, 억제 또는 저하는 제공되는 다수의 검정 중 하나를 이용하여 측정할 수 있다. 아그레카나제 활성의 억제가 반드시 아그레카나제 활성의 완전한 결여를 나타내는 것은 아니다. 활성의 감소는 예를 들어, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상일 수 있다. 하나의 양태에서, 억제는 아그레칸의 분해 산물의 검출량의 감소에 의해 측정한다.

'분리된'이란 용어는 실질적으로 천연 환경으로부터 유리되어 있는 핵산 분자 또는 폴리펩타이드 분자를 기술한다. 예를 들어, 분리된 단백질은 실질적으로 세포성 물질 또는 이러한 분리된 단백질이 유래되는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 기타 오염 단백질을 함유하지 않는다. '분리된'이란 용어는 또한 다른 프로테아제와의 결합으로부터 유리되어 있으며 아그레카나제 단백질분해 활성을 유지하는 아그레카나제 단백질을 의미한다. 또한, '분리된'이란 용어는 본 발명의 아그레카나제를 암호화하며 기타 세포성 물질 및 오염원을 함유하지 않는 핵산 분자를 의미한다.

'신에피토프(neoepitope) 항체'란 용어는 단백질분해성 분해에 의해 생성되는 새로운 N- 또는 C-말단 아미노산 서열은 특이적으로 인식하지만 무손상(분해되지 않은) 기질 상의 이러한 에피토프에는 결합하지 않는 항체를 의미한다.

발현 조절 서열과의 '작동적 결합'이란 용어는 서열에 연결된 뉴클레오타이드 분자의 전사 속도 또는 효율을 조절하는 특정 뉴클레오타이드 서열 또는 서열들의 존재를 의미한다. 예를 들어, 아그레카나제 암호화 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단에 인접하여 위치하는 프로모터 서열은 아그레카나제 암호화 뉴클레오타이드 서열과 작동적으로 결합된 것일 수 있다. 발현 조절 서열로는 예를 들어, 프로모터, 인핸서(enhancer) 및 아그레카나제 암호화 뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하기 위해 아그레카나제 암호화 뉴클레오타이드 서열에 대해 5' 또는 3'에 있는 기타 발현 조절 서열 또는 이러한 요소들의 임의의 조합이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 당해 분야의 숙련가라면, 예를 들어, 목적하는 발현 수준에 따라서 본 발명의 아그레카나제에 대한 적절한 발현 조절 서열을 선택할 수 있다.

항체의 '특이적 결합'이란 용어는 항체가 하나 이상의 본 발명의 신규 아그레카나제 분자에 결합하고 항체가 하나 이상의 당해 신규 아그레카나제 분자 이외의 분자에 대한 어떠한 실질적 결합도 나타내지 않을 수 있는 것을 의미한다. 상기 용어는, 예를 들어, 항체의 항원 결합 도메인이 수많은 항원에서 제시되는 특정 에피토프에 대해 특이적이고 이러한 항원 결합 도메인을 보유하는 특이적 결합 구성원(항체)이 이러한 에피토프를 보유하는 각종 항원에 결합할 수 있는 경우에도 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 다수의 신규 아그레카나제 단백질상의 에피토프에 결합할 수 있는 것으로 고려된다. 통상적으로, 결합은 친화상수 Ka가 10^{8} M^{-1} 이상인 경우에 특이적인 것으로 고려된다. 항체는 적절하게 선택된 조건하에 결합이 실질적으로 억제되지 않으면서 동시에 비특이적 결합이 억제되는 경우에 항원에 '특이적으로 결합'된다고 말한다. 상기 조건은 일반적으로 항체의 농도, 용액의 이온 강도, 온도, 결합을 위해 허용되는 시간, 결합 반응과 관련되는 추가 분자(예: 혈청 알부민, 우유 카제인)의 농도 등의 측면에서 정의된다. 조건은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 당해 분야의 숙련가라면, 통상적 기술을 이용하여 적절한 조건을 선택할 수 있다.

'고도로 엄격한' 또는 '높은 엄격성'이란 용어는 핵산-핵산 상호작용을 측정하기 위해 사용되는 하이브리드화 및 세척의 조건을 기술한다. 핵산 하이브리드화는 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 인식될 수 있는 바와 같이, 염기 조성, 상보 쇄의 길이와 하이브리드화되는 핵산들 간의 뉴클레오타이드 염기 미스매치(mismatch)의 수 이외에도 염 농도, 온도 또는 유기 용매와 같은 이러한 조건에 의해 영향을 받을 수 있다. 엄격성 조건은 핵산의 길이 및 핵산의 염기 조성에 따라 좌우되며 당해 분야에 익히 공지된 기술로 측정할 수 있다. 일반적으로, 엄격성은 예를 들어, 하이브리드화 및 세척 동안에 온도 및 염 농도를 조작함으로써 변경하거나 조절할 수 있다. 예를 들어, 높은 온도와 낮은 염 농도의 조합은 엄격성을 증가시킨다. 이러한 조건은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[참조; 'Current Protocols in Molecular Biology, 'John Wiley amp; Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 찾아볼 수 있다. 당해 분야에 기재되어 있는 수성 조건 및 비수성 조건 둘다를 사용할 수 있다. 고도로 엄격한 하이브리드화 조건의 한가지 예는 약 45℃에서 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC)에서 하이브리드화한 다음, 50℃에서 0.2X SSC, 0.1 % SDS에서 1회 이상 세척하는 것이다. 고도로 엄격한 하이브리드화 조건의 두번째 예는 약 45℃에서 6X SSC에 하이브리드화한 다음, 55℃에서 0.2X SSC, 0.1 % SDS에서 1회 이상 세척하는 것이다. 고도로 엄격한 하 이브리드화 조건의 또 다른 예는 약 45℃에서 6X SSC에서 하이브리드화한 다음, 60℃에서 0.2X SSC에서의 1회 이상 세척하는 것이다. 고도로 엄격한 하이브리드화 조건의 추가 예는 약 45℃에서 6X SSC에서 하이브리드화한 다음, 65℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상 세척하는 것이다. 고도로 엄격한 조건으로는 65℃에서 0.5M 인산 나트륨, 7% SDS에서 하이브리드화한 다음, 65℃에서 0.2X SSC, 1% SDS에서 1회 이상 세척하는 것이다.

'중간 정도로 엄격한' 또는 '중간 정도의 엄격성' 하이브리드화란 어구는 핵산이 이 핵산과 약 60% 이상, 약 75% 이상 또는 약 85% 이상 동일한, 특히 바람직하게는 이 핵산과 약 90%를 초과하여 동일한 상보적 핵산에 결합하도록 하는 조건을 의미한다. 중간 정도로 엄격한 조건은 예를 들어, 42℃에서 50% 포름아미드, 5X 덴하르트 용액, 5X SSPE, 0.2% SDS에서의 하이브리드화 다음에 65℃에서 0.2X SSPE, 0.2% SDS에서의 세척을 포함하나 이에 제한되지는 않는다[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

'실질적으로 동일한' 또는 '실질적으로 유사한'이란 어구는 관련 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열이 기술되는 서열과 비교하여 (보존된 아미노산 서열을 통해) 동일하거나 근소한 차이를 가질 수 있음을 의미한다. 본 발명의 뉴클레오타이드 및 폴리펩타이에는 예를 들어, 기술하는 핵산 분자 및 폴리펩타이드와 서열이 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상 동일한 것들이 포함된다.

폴리펩타이드의 경우에는, 20개 이상, 30개, 50개 또는 100개 이상의 아미노산이 본래의 폴리펩타이드와 이러한 본래의 폴리펩타이드와 실질적으로 동일한 변이체 폴리펩타이드 간에 비교될 것이다. 핵산의 경우에는, 50개 이상, 100개, 150개 또는 300개 이상의 뉴클레오타이드가 본래의 핵산과 이러한 본래의 핵산과 실질적으로 동일한 변이체 핵산 간에 비교될 것이다. 따라서, 변이체는 영역 또는 영역들이 실질적으로 동일할 수 있으나 다른 것들은 상이할 수 있으며, 여전히 '실질적으로 동일한'의 정의에 부합된다. 두 서열 간의 동일율(%)은 예를 들어, 문헌[참조: Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)]에 기재되어 있는 Basic Local Alignment Tool(BLAST), 문헌[참조: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970)] 또는 문헌[참조: Meyers et al., Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)]의 알고리듬과 같은 표준 정렬 알고리듬에 의해 측정한다.

'치료하다' 또는 '치료'란 용어는 치료학적 처리 및 예방 또는 방지 수단 둘다를 의미한다. 치료가 필요한 개체로는 이미 특정 의학 장애를 앓고 있는 개체뿐만 아니라 결국에는 장애를 획득할 수 있는 개체(즉, 방지 수단이 필요한 개체)가 포함된다. 치료는 아그레카나제 활성 또는 아그레카나제의 수준을 조정하여 하나 이상의 질환의 임상적 증상을 예방하거나 개선시킬 수 있다. 억제제 및/또는 항체는 예를 들어, 아그레칸에 대한 아그레카나제의 상호작용 또는 결합을 방지하거나 아그레카나제 활성을 감소 또는 억제함으로써 작용할 수 있다.

'변이체'란 용어는 제공되는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열과 각각 실질적으로 동일하거나 유사한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 의미한다. 변이체는 아그레카나제 또는 아그레카나제-유사 단백질을 암호화하는 천연, 예를 들어, 천연 사람 및 비사람 뉴클레오타이드 서열일 수 있거나 인공적으로 제조할 수 있다. 변이체의 예는 본 발명의 아그레카나제의 3' 및 5' 스플라이싱된 변이체, 점 돌연변이 및 기타 돌연변이 또는 아그레카나제 단백질의 단백질분해성 분해를 포함하여, 아그레카나제 mRNA의 선택적 스플라이싱으로부터 야기되는 아그레카나제이다. 본 발명의 아그레카나제의 변이체로는 각각 다른 핵산(또는 적절한 삽입 또는 결실과 함께 최적으로 정렬되는 경우에 이의 상보 쇄) 또는 아미노산 서열과 실질적으로 동일하거나 상이한 핵산 분자 또는 이의 단편 및 아미노산과 이의 단편이 포함된다. 하나의 양태에서, 최적으로 정렬될 경우 각각 본 발명의 핵산 분자 또는 단백질과 또 다른 핵산 또는 단백질 간에는 약 50% 이상의 동일성, 약 55% 이상의 동일성, 약 60% 이상의 동일성, 약 65% 이상의 동일성, 약 70% 이상의 동일성, 약 75% 이상의 동일성, 약 80% 이상의 동일성, 약 85% 이상의 동일성, 약 90% 이상, 약 92% 이상의 동일성, 약 93% 이상의 동일성, 약 94% 이상의 동일성, 약 95% 이상의 동일성, 약 96% 이상의 동일성, 약 97% 이상의 동일성, 약 98% 이상의 동일성 또는 약 99% 이상의 동일성이 존재한다. 추가로, 변이체는 정의된 바와 같은 아그레카나제 활성을 나타내는 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함한다.

본 명세서 및 도면에 기재된 서열들의 확인을 돕기 위해, 서열 번호, 도면 위치 및 각 서열의 간단한 설명을 기재한 다음 표(표 1)을 제공한다.

[표 1]

서열	도면	설명
서열 1	도 1A 및 1B	ADAMTS-18(EST-18)의 전체길이 뉴클레오타이드 서열
서열 2	도 2	서열 1에 의해 암호화되는 ADAMTS-18의 전체길이 a.a. 서열
서열 3	도 3A 및 3B	ADAMTS-18(EST 18)의 뉴클레오타이드 서열
서열 4	도 4	서열 3에 기초한 ADAMTS-18의 추정되는 a.a. 서열
서열 5	도 5A 및 5B	ADAMTS-18에 대한 실제 뉴클레오타이드 서열
서열 6		아그레카나제-1의 아연 결합 기호 영역
서열 7	도 7	스트렙타비딘 태그를 포함하는 절단된 EST18 뉴클레오타이드 서열
서열 8	도 8	서열 7에 의해 암호화되는 스트렙타비딘 태그를 포함하는 EST18의 절단된 a.a. 서열
서열 9	도 6A	프라이머
서열 10	도 6A	프라이머
서열 11	도 6A	프라이머
서열 12	도 6A	프라이머
서열 13		펩타이드 서열
서열 14		펩타이드 서열
서열 15		CD-36 결합 모티프
서열 16		프라이머
서열 17		프라이머
서열 18		프라이머
서열 19		프라이머
서열 20		프라이머
서열 21		올리고뉴클레오타이드
서열 22		올리고뉴클레오타이드

서열 23		올리고뉴클레오타이드
서열 24		올리고뉴클레오타이드
서열 25		올리고뉴클레오타이드
서열 26		올리고뉴클레오타이드
서열 27		프라이머
서열 28		프라이머
서열 29		에피토프 태그
서열 30		뉴클레오타이드 삽입
서열 31		XhoI 부위를 함유하는 뉴클레오타이드 서열
서열 32		68개 염기쌍의 어댑터 뉴클레오타이드 서열
서열 33		뉴클레오타이드 서열
a.a.=아미노산		

II. 신규한 아그레카나제 분자

하나의 양태에서, 본 발명에 따른 아그레카나제 분자의 뉴클레오타이드 서열은 서열 1의 뉴클레오타이드 1번 내지 뉴클레오타이드 3663번(도 1A 및 1B)을 포함하여 서열 1에 제시한다. 본 발명은 추가로 서열 1에 제시된 서열의 등가 변성 코돈 서열뿐만 아니라 아그레카나제 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 이의 단편 및 변이체를 포함한다. 본 발명의 핵산 서열은 천연 서열과 이의 변이체 및 인공적으로 생성된 서열과 이의 변이체 둘다를 포함한다. 본 발명의 아그레카나제 분자를 암호화하는 전체길이 뉴클레오타이드 서열은 하나의 양태에서, 예를 들어, 표준 기술을 사용하여 전체길이 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열을 스크리닝하기 위한 프로브를 디자인하는데 서열 3에 제시된 뉴클레타이드 서열을 사용함으로써 수득할 수 있다.

분리된 아그레카나제-유사 분자의 아미노산 서열은 서열 2의 아미노산 1번(메티오닌) 내지 아미노산 1221번(이소류신)(도 2)을 포함하여 서열 2에 제시한다.

본 발명은 추가로 아그레카나제 활성을 나타내는 분자를 암호화하는 아미노산 서열의 단편을 포함한다.

본 발명은 전체길이 아그레카나제 분자를 수득하는 방법, 이러한 방법으로 수득된 아그레카나제 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 단백질을 포함한다. 전체길이 서열을 분리하기 위한 방법은, 예를 들어, 스크리닝용 프로브를 디자인하거나 당해 분야의 숙련가에게 공 지된 표준 과정을 사용하여 전체길이 뉴클레오타이드 서열을 스크리닝하기 위해 서열 3(도 3A 및 3B)에 제시된 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열을 사용함을 포함한다.

사람 아그레카나제 단백질 또는 이의 단편은 서열 1로부터 선택된 DNA 서열로 형질전환된 세포를 배양하고, 동시에 생성된 기타 단백질성 물질을 실질적으로 함유하지 않는, 서열 2에 제시된 아미노산 서열을 특징으로 하는 단백질을 배양 배지로부터 회수 및 정제함으로써 제조할 수 있다. 포유동물 세포에서의 제조의 경우, DNA 서열은 아그레카나제 효소를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 프레임내(in frame)에서 5' 연결된, 적합한 프로펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 추가로 포함한다.

본 발명의 방법으로 제조된 사람 아그레카나제 단백질은 아그레칸을 분해하는 능력을 갖고 서열 2로부터 선택된 아미노산 서열, 천연 돌연변이 단백질 스플라이싱된 생성물을 포함하는 서열 2의 아미노산 서열의 변이체 및 기타 변이체를 가짐을 특징으로 하는 것으로서, 아그레카나제 단백질의 특징적인 아그레칸을 분해하는 능력을 보유한다. 이들 단백질은 서열 2에 제시된 아미노산 서열과 약 30% 이상 동일한, 약 35% 동일한, 약 40% 동일한, 약 45% 동일한, 약 50% 동일한, 약 55% 동일한, 약 60% 동일한, 약 65% 동일한, 약 70% 동일한, 약 75% 동일한, 약 80% 동일한, 약 85% 동일한, 약 90% 동일한, 약 92% 동일한, 약 94% 동일한, 약 95% 동일한, 약 96% 동일한, 약 97% 동일한, 약 98% 동일한 또는 약 99% 동일한 단백질을 포함할 수 있다. 마지막으로, 돌연변이유발, 화학적 변경 또는 단백질을 제조하는데 사용되는 DNA 서열의 변경에 의해 유도된 아미노산 변화를 포함하는 서열 2에 제시된 서열의 변이체를 포함함으로써 펩타이드 서열이 여전히 아그레카나제 활성을 보유하는 단백질도 또한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 또한 아그레카나제 단백질의 활성을 보유하는 서열 2의 아미노산 서열의 단편 및 상기 단편의 변이체를 포함한다.

III. 아그레카나제 단백질 및 이를 암호화하는 DNA 분자, 및 이의 변이체의 확인

아그레카나제 또는 아그레카나제 활성을 갖는 관련 단백질을 암호화하는 추가의 사람 서열이 존재하고 다른 종도 사람 아그레카나제 효소의 변이체인 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 가질 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 아그레카나제 단백질 및 이의 변이체를 암호화하는 DNA 서열을 수득하는 방법, 상기 방법으로 수득된 DNA 서열 및 상기 DNA 서열에 의해 암호화되는 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 한가지 방법은 표준 기술을 사용하여 다른 종으로부터의 상응하는 뉴클레오타이드 서열 또는 암호화 서열 또는 이의 단편에 대해 라이브러리를 스크리닝하기 위한 프로브를 디자인하는데 본 발명의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부분을 사용함을 포함한다. 따라서, 본 발명은 아그레카나제 또는 아그레카나제-유사 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 다른 종 유래의 DNA 서열을 포함할 수 있으며, 이는 사람 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 수득할 수 있다. 본 발명은 또한 아그레카나제 단백질의 작용성 단편 및 이러한 작용성 단편을 암호화하는 DNA 서열뿐만 아니라 아그레카나제 또는 아그레카나제-유사 활성을 갖는 관련 단백질의 작용성 단편을 포함할 수 있다. 아그레카나제와 같이 작용하는 이러한 단편의 능력은 아그레카나제 단백질의 활성을 검출하기 위해 기술된 다수의 생물학적 검정 중 하나에서 폴리펩타이드 또는 단백질을 사용함으로써 측정할 수 있다.

예를 들어, 도 1A 및 1B에 제시된 서열 1을 GenBank 및 GenSeq에 대해서 조회(query) 서열로서 사용하여 사람 유래의 유사한 뉴클레오타이드 서열을 발견하였다. 몇가지 서열이 서열 1의 전체길이 또는 부분적 핵산 서열과 유사한 것으로 확인되었다. 공개된 서열은 다음 승인 번호로 확인되었다: AJ311903; Ax319854 (WO 01/183782로부터의 서열 18); AC025284; AC010548; AC009139; AQ407949; AQ309991; AQ543125; AQ052241; Abn89277(WO 02/250258에 기재되어 있음); G65591; G53009; BD040395; Abn89277; Aas97176; Aad16756; Aad16759; Abq79948; Aas65280; Aad16771; Aad16774; Aas75293; Aas65278; Aac16650; Aah36077; Aba11592; Aba15654; Aba15653; 및 Aba15655.

또한, 서열 1을 사용하여 Genbank 데이타베이스내의 유전자의 해독 및 GeneSeq 데이타베이스의 단백질 성분을 포함하는 데이타베이스 BLASTX를 조사하였다. 조사로 다음 승인 번호로 확인되는 서열을 포함하는 몇가지 사람 단백질 서열이 밝혀졌다: GENESEQP: ABB81460(WO 02/250,258에 기재되어 있음); Genbank:CAC83612; GENESEQP:AAU72893; GENESEQP:AAE09696; GENESEQP:AAE09699; GENESEQP: ABB82162; GENESEQP:AAE09711; GENESEQP:ABG11106; GENESEQP:AAB08954; 및 GENESEQP:AAB08913.

유사한 서열이 아그레카나제 또는 아그레카나제-유사 단백질을 암호화할 가능성이 있는 비사람 종에 존재할 것으로 예상된다. 아그레카나제 단백질의 다양한 비사람 변이체는 서열 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 BLASTX 데이타베이스를 조사함으로서 확인되었다. 이러한 비사람 변이체로는 예를 들어, BAC35556_1 (마우스); AAH34739_1(마우스); BAC29190_1(마우스); AAO17380_1(마우스); BAC33391_1(마우스); AAG29823_1(랫트); AAD34012_1(랫트); BAA110881(마우스); BAA24501_1(마우스); AAH40382_1(마우스); CAA65253_1(보스. 타우루스(Bos. tauruas)); CAA93287_1 (씨. 엘레간스(C. elegans)); AAF46065_2(디. 멜라노가스터(D. melanogaster)); AAN17331_1(에쿠스카발루스(Equuscaballus)); AAM50192_1(디. 멜라노가스터); AAF55199_2(디. 멜라노가스터); AAF25805_1(마우스); AAG37995_1(디. 멜라노가스터); AAG41980_1(마우스); AAD56356_1(마우스); AAF56794_3(디. 멜라노가스터); AAF56795_3; GENESEQP:ABB71150(디. 멜라노가스터); GENESEQP:AAB72280(마우스); GENESEQP:ABB62044(디. 멜라노가스터); GENESEQP:AAB72284(마우스); GENESEQP:AAB21265(마우스); GENESEQP:AAY53899(마우스); GENESEQP:AAY53900(소); GENESEQP:ABB60410(디. 멜라노가스터); GENESEQP:AAB50004(소); GENESEQP:AAY53898 (씨. 엘레간스); GENESEQP:AAW47030(소); GENESEQP:AAB72287(마우스); NR: 25053113(마우스); NR:20888361(마우스); NR:23634336(마우스); NR27721019(랫트); NR27688211(랫트); NR:27712734; NR:20898418(마우스); NR:27681743(마우스); NR:21288693(아노펠레스 감비아에 (Anopheles gambiae)); NR:27705982(랫트); NR:27693936(랫트); NR:27664306(랫트); NR:20861058(마우스); NR:27681747(랫트); NR:27719839(랫트); NR:25056874 (마우스); 및 NR:25052431(마우스)를 포함한다.

다음 승인 번호를 포함하는 서열 1의 뉴클레오타이드 서열과 유사한 몇가지 EST가 또한 Genbank에 공개되어 있다: AW295437; BF224279; BE674425; BF512077; AA057097; AA057097; AA057408; AV730422; BM696215; BM664487; BG396090; BE253544; AA442575; 및 AA436819.

기술한 BLAST 조사의 결과에 기초하여, EST18 mRNA는 적어도 유암종 조직, 망막모세포종, 망막, 고환, 시상하부, 신장 및 뇌에서 발현되는 것으로 고려된다. 추가로, EST18에 대한 유전자는 사람의 16번 염색체에 위치하는 것으로 추측된다.

서열 1에 제시된 전체길이 EST18 서열을 추가로 사용하여, 예를 들어, 5' 및 3' 스플라이싱 변이체 둘다를 포함하는 EST18 mRNA의 스플라이싱 변이체에 대해 셀렐라(Celera)에 의해 공급된 게놈 서열 데이타베이스를 조사하였다. 추정상의 스플라이싱 변이체의 일부가 다음 승인 번호로 확인된다: Geneseq:aac16650; Geneseq:aah36077; Geneseq:aas65278; Geneseq:aas65279; Geneseq:aas65280; Geneseq:aas97176; Genbank:AJ311903; 및 Genbank:AX319854. 이들 서열과 EST18 뉴클레오타이드 서열의 서열 정렬은 본원에서 기술되는 스플라이싱 변이체의 대다수가 3' 말단에 차이를 가짐을 제안한다.

셀렐라의 단일 뉴클레오타이드 다형태 데이타베이스를 서열 1에 제시된 서열로 조사하였다. 하기 표에는 이러한 조사의 결과가 요약되어 있으며, 예를 들어, 사람의 상이한 인종과 민족에 걸쳐 EST18 서열내에서 발견되는 유전적 변이가 기술되어 있다.

[표 2a]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV3284477	셀렐라	T/C		인트론
hCV3284476	셀렐라	G/A	Cys(TGC)1057Cys(TGT)	침묵 돌연변이
hCV11516846	셀렐라	A/-		인트론
hCV3284474	셀렐라	A/T		인트론
hCV3284473	셀렐라	A/G		인트론
hCV3284472	셀렐라	T/G		인트론
hCV9478412	dbSNP	A/C		인트론

[표 2b]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV3284471	셀렐라	C/G		인트론
hCV3284470	셀렐라	T/A		인트론
hCV3284469	셀렐라	T/C		인트론
hCV3284468	셀렐라	C/T		인트론
hCV3284467	셀렐라	A/G		인트론
hCV3284466	셀렐라	T/C	Val(GTA)986Val(GTG)	침묵 돌연변이
hCV3284465	셀렐라	C/A	Ala(GCC)955Ser(TCC)	미스-센스 돌연변이
hCV3284464	셀렐라	A/G		인트론
hCV3284463	셀렐라	G/C		인트론
hCV3284462	셀렐라	T/C		인트론
hCV11516852	셀렐라	-/T		인트론
hCV3284461	셀렐라	T/C		인트론
hCV3284460	셀렐라	C/T		인트론
hCV16210086	dbSNP	G/A		인트론
hCV11937057	dbSNP	C/T		인트론
hCV11937062	dbSNP	C/T		인트론
hCV9602010	dbSNP	A/G		인트론
hCV9602009	dbSNP	A/G		인트론
hCV9602008	dbSNP	T/C		인트론
hCV9602001	dbSNP	T/G T/G T/G		인트론
hCV11937070	dbSNP	T/C		인트론
hCV2852198	셀렐라	C/A		인트론
hCV2852197	셀렐라	A/G		인트론
hCV2828126	셀렐라	C/A		인트론
hCV2828125	셀렐라	T/C		인트론
hCV2828124	셀렐라	G/C		인트론
hCV2828123	셀렐라	T/C		인트론
hCV7606027	dbSNP	T/C		인트론
hCV7606023	dbSNP	G/A		인트론
hCV7606022	dbSNP	T/C		인트론
hCV2828122	셀렐라	T/-		인트론
hCV2828121	셀렐라	C/T		인트론
hCV11935339	dbSNP	G/A		인트론
hCV16018212	dbSNP	T/G		인트론
hCV2828119	dbSNP 셀렐라	G/A A/G G/A		인트론
hCV2828118	dbSNP 셀렐라	A/T T/A T/A T/A		인트론
hCV2381371	dbSNP	A/G G/A G/A G/A		인트론
hCV2828117	dbSNP	G/A G/A G/A		인트론

[표 2c]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV2381370	dbSNP	A/G A/G G/A		인트론
hCV11669939	셀렐라	T/-		인트론
hCV2381369	dbSNP	G/A A/G A/G		인트론
hCV2828115	셀렐라	T/G		인트론
hCV7606016	dbSNP	G/A		인트론
hCV7606010	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV11669940	dbSNP 셀렐라	G/A A/G		인트론
hCV9478393	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828114	셀렐라	C/G		인트론
hCV11439282	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828113	dbSNP 셀렐라	C/G G/C		인트론
hCV2828112	셀렐라	G/A		인트론
hCV11439283	dbSNP	C/G		인트론
hCV7606009	dbSNP	T/C		인트론
hCV16139205	dbSNP	C/T		인트론
hCV11669941	셀렐라	A/-		인트론
hCV11669944	셀렐라	A/-		인트론
hCV11439286	dbSNP	A/G		인트론
hCV16271258	dbSNP	A/G		인트론
hCV16271259	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828109	dbSNP 셀렐라	T/C C/T		인트론
hCV2828108	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV9478420	dbSNP	A/C A/C A/C A/C		인트론
hCV2828107	dbSNP 셀렐라	T/C T/C		인트론
hCV2828106	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV2828105	dbSNP 셀렐라	C/T T/C		인트론
hCV2828104	셀렐라	G/A		인트론
hCV16271260	dbSNP	A/G		인트론
hCV3284520	셀렐라	C/A		인트론
hCV3284521	dbSNP 셀렐라	G/A A/G G/A		인트론
hCV11669953	셀렐라	T/G		인트론
hCV11669954	셀렐라	T/A		인트론
hCV11669955	셀렐라	C/A		인트론
hCV16271264	dbSNP	C/T		인트론
hCV11439287	dbSNP	T/C		인트론
hCV2828103	dbSNP 셀렐라	A/G A/G		인트론
hCV2828102	dbSNP 셀렐라	T/A A/T		인트론
hCV2828101	셀렐라	T/A		인트론
hCV2828100	셀렐라	A/G		인트론
hCV2828099	셀렐라	C/T		인트론

[표 2d]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV11439288	dbSNP	A/G G/A A/G A/G		인트론
hCV11439289	dbSNP HGBASE	G/C C/G G/C C/G C/G		인트론
hCV2828097	셀렐라	C/A		인트론
hCV2828096	셀렐라	C/A		인트론
hCV2828095	셀렐라	C/T		인트론
hCV11669963	셀렐라	C/G		인트론
hCV2828094	셀렐라	C/T		인트론
hCV11669964	셀렐라	G/A		인트론
hCV11669965	셀렐라	A/G		인트론
hCV11669967	셀렐라	A/G		인트론
hCV11669968	셀렐라	A/G		인트론
hCV11439290	dbSNP	G/T		인트론
hCV11439291	dbSNP	A/G		인트론
hCV9478400	dbSNP	C/T		인트론
hCV7606003	dbSNP	G/C		인트론
hCV16210093	dbSNP	T/C		인트론
hCV2381366	dbSNP	C/T T/C C/T C/T		인트론
hCV2828091	dbSNP 셀렐라	C/T T/C C/T C/T C/T		인트론
hCV11439294	dbSNP	C/G		인트론
hCV2828090	셀렐라	G/C		인트론
hCV2828089	dbSNP 셀렐라	A/T A/T		인트론
hCV2828088	셀렐라	A/G		인트론
hCV2828087	셀렐라	T/C		인트론
hCV2828086	dbSNP 셀렐라	A/C C/A		인트론
hCV16271265	dbSNP	A/G		인트론
hCV2828084	셀렐라	T/C		인트론
hCV11669971	셀렐라	A/-		인트론
hCV2828082	셀렐라	T/G		인트론
hCV2828081	셀렐라	C/T		인트론
hCV16261553	dbSNP	C/T		인트론
hCV7605998	dbSNP	G/A A/G		인트론
hCV9478310	dbSNP	G/C C/G		인트론
hCV16261554	dbSNP	A/G		인트론
hCV15845773	dbSNP	C/G		인트론
hCV7605997	dbSNP	C/A A/C		인트론
hCV2381364	dbSNP	T/C C/T C/T C/T C/T C/T		인트론
hCV7605993	dbSNP	A/G G/A		인트론

[표 2e]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV7605992	dbSNP	A/G		인트론
hCV11669973	셀렐라	-/A		인트론
hCV7605991	dbSNP	T/C		인트론
hCV7605987	dbSNP	C/T		인트론
hCV15816829	dbSNP	T/C		인트론
hCV2381363	dbSNP	T/G G/T T/G		인트론
hCV7605980	dbSNP	C/A		인트론
hCV7605979	dbSNP	A/G		인트론
hCV2828079	dbSNP 셀렐라	T/C C/T		인트론
hCV11669974	셀렐라	-/A		인트론
hCV11439309	dbSNP	T/C C/T C/T C/T		인트론
hCV7605972	dbSNP 셀렐라	T/C C/T		인트론
hCV7605971	dbSNP	T/A		인트론
hCV2828078	셀렐라	G/C		인트론
hCV11669976	셀렐라	T/C		인트론
hCV2828077	셀렐라	C/T		인트론
hCV11669977	셀렐라	G/T		인트론
hCV2381361	dbSNP	C/T T/C T/C		인트론
hCV2381360	dbSNP	A/T T/A A/T		인트론
hCV11439314	dbSNP	T/C		인트론
hCV2828076	dbSNP 셀렐라	T/A T/A		인트론
hCV2828074	셀렐라	T/A		인트론
hCV7605963	dbSNP 셀렐라	C/G C/G		인트론
hCV7605957	dbSNP	A/C		인트론
hCV2828072	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828071	셀렐라	A/G		인트론
hCV16016767	dbSNP	G/A		인트론
hCV7605956	dbSNP	G/T G/T		인트론
hCV7605955	dbSNP	C/A A/C		인트론
hCV2828070	dbSNP 셀렐라	T/C C/T T/C		인트론
hCV2828069	dbSNP 셀렐라	T/C T/C		인트론
hCV2828068	dbSNP 셀렐라	G/A G/A G/A		인트론
hCV16261555	dbSNP	G/A		인트론
hCV16271253	dbSNP	A/G		인트론
hCV16261562	dbSNP	T/C		인트론
hCV7605948	dbSNP	T/C C/T		인트론
hCV7605947	dbSNP	C/G C/G		인트론
hCV16271271	dbSNP	C/G		인트론
hCV11669982	셀렐라	G/-		인트론
hCV11669983	셀렐라	A/C		인트론

[표 2f]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV11669985	셀렐라	-/A		인트론
hCV15784638	dbSNP	AAAA/-		인트론
hCV2828065	dbSNP 셀렐라	C/T C/T C/T		인트론
hCV2828064	dbSNP 셀렐라	A/G G/A		인트론
hCV2828063	dbSNP 셀렐라	C/G C/G		인트론
hCV9478268	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828062	dbSNP 셀렐라	G/A A/G		인트론
hCV16261563	dbSNP	A/G		인트론
hCV16261564	dbSNP	A/G		인트론
hCV16271266	dbSNP	C/T		인트론
hCV11669986	셀렐라	-/A		인트론
hCV2828060	dbSNP 셀렐라	C/A A/C A/C		인트론
hCV2828059	dbSNP 셀렐라	T/C T/C T/C		인트론
hCV2828058	dbSNP 셀렐라	G/C C/G G/C		인트론
hCV2828057	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV2828056	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV2828055	dbSNP 셀렐라	C/A A/C		인트론
hCV2828054	dbSNP 셀렐라	A/T A/T		인트론
hCV16271272	dbSNP	T/C		인트론
hCV16261571	dbSNP	G/A G/A		인트론
hCV16261572	dbSNP	G/A		인트론
hCV16261573	dbSNP	G/C		인트론
hCV15784665	dbSNP	-/CTA		인트론
hCV16016733	dbSNP	A/G		인트론
hCV11669989	dbSNP 셀렐라	T/C C/T T/C		인트론
hCV11669990	dbSNP 셀렐라	T/C T/C C/T		인트론
hCV16261580	dbSNP	A/T		인트론
hCV16271273	dbSNP	A/G		인트론
hCV16261582	dbSNP	G/C		인트론
hCV11669992	셀렐라	G/T		인트론
hCV15845774	dbSNP	T/C T/C		인트론
hCV16016736	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828045	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828044	셀렐라	A/G	His(CAC)244Tyr(TAC)	미스 센스 돌연변이
hCV2828043	dbSNP 셀렐라	T/G G/T		인트론
hCV2828042	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828041	셀렐라	G/A		인트론
hCV11439320	dbSNP	A/G A/G		인트론
hCV2828040	dbSNP 셀렐라	G/A A/G		인트론

[표 2g]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV11669993	셀렐라	T/A		인트론
hCV2828039	셀렐라	A/C		인트론
hCV16018201	dbSNP	G/A		인트론
hCV11669994	셀렐라	G/A		인트론
hCV2828038	셀렐라	G/A		인트론
hCV2828037	셀렐라	A/G		인트론
hCV2828036	dbSNP 셀렐라	G/A A/G		인트론
hCV2828035	dbSNP 셀렐라	T/C T/C T/C		인트론
hCV11669995	dbSNP 셀렐라	A/G G/A		인트론
hCV11439321	dbSNP	G/C G/C		인트론
hCV11439324	dbSNP	C/G C/G		인트론
hCV7605946	dbSNP	T/C T/C C/T C/T		인트론
hCV2828033	셀렐라	C/G		인트론
hCV2828032	셀렐라	A/G		인트론
hCV2381355	dbSNP	G/C C/G G/C C/G		인트론
hCV2381354	dbSNP	A/G G/A G/A A/G		인트론
hCV16016737	dbSNP	G/A		인트론
hCV16016738	dbSNP	A/G		인트론
hCV2381353	dbSNP	C/T C/T C/T T/C		인트론
hCV16018237	dbSNP	T/C		인트론
hCV2381352	dbSNP	C/T C/T T/C C/T		인트론
hCV2381351	dbSNP	T/C C/T C/T T/C		인트론
hCV15864249	dbSNP	A/C		인트론
hCV11439333	dbSNP	C/A		인트론
hCV11439334	dbSNP	A/C A/C		인트론
hCV2381349	dbSNP	T/C T/C T/C T/C		인트론
hCV2828031	dbSNP 셀렐라	C/T T/C T/C T/C T/C		인트론
hCV2828030	dbSNP 셀렐라	C/T C/T C/T C/T		인트론
hCV2828029	셀렐라	C/T		인트론
hCV2381348	dbSNP	C/T C/T C/T		인트론
hCV2381347	dbSNP	A/T A/T T/A		인트론
hCV2828028	셀렐라	C/G		인트론
hCV16018247	dbSNP	T/A		인트론
hCV16018248	dbSNP	G/C		인트론
hCV2828027	셀렐라	A/G		인트론
hCV16016748	dbSNP	A/T		인트론
hCV16016749	dbSNP	A/G		인트론
hCV16018249	dbSNP	C/T		인트론
hCV9606709	dbSNP	C/T C/T C/T C/T		인트론

[표 2h]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
		C/T		
hCV2828026	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV16016750	dbSNP	G/C		인트론
hCV9606713	dbSNP	G/A G/A		인트론
hCV16016754	dbSNP	G/C		인트론
hCV2828025	셀렐라	G/A		인트론
hCV9606714	dbSNP	T/C		인트론
hCV2828024	셀렐라	G/A		인트론
hCV2381346	dbSNP	C/T T/C T/C T/C		인트론
hCV2381345	dbSNP	G/A A/G A/G G/A		인트론
hCV2828023	셀렐라	T/A		인트론
hCV2828022	셀렐라	T/A		인트론
hCV2381344	dbSNP 셀렐라	A/T A/T A/T T/A A/T		인트론
hCV2381343	dbSNP	C/T C/T C/T C/T		인트론
hCV2381342	dbSNP	C/G C/G C/G G/C		인트론
hCV16018211	dbSNP	C/T		인트론
hCV2381341	dbSNP	C/G G/C C/G G/C G/C		인트론
hCV11669997	셀렐라	-/A		인트론
hCV2828020	셀렐라	G/A		인트론
hCV11439337	dbSNP	A/T		인트론
hCV2828019	셀렐라	A/G		인트론
hCV11669998	셀렐라	A/-		인트론
hCV2828017	셀렐라	C/A		인트론
hCV2828016	셀렐라	C/G		인트론
hCV2828015	셀렐라	C/G		인트론
hCV2828014	셀렐라	G/A		인트론
hCV2828013	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828012	셀렐라	T/C		인트론
hCV15944296	dbSNP	T/G		인트론
hCV9605371	dbSNP	C/T		인트론
hCV2381340	dbSNP	C/T C/T C/T T/C C/T		인트론
hCV2828011	셀렐라	G/T		인트론
hCV2828010	셀렐라	A/G		인트론
hCV2828009	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828008	셀렐라	A/G		인트론
hCV11670003	셀렐라	C/G		인트론
hCV7605903	dbSNP	C/A		인트론

[표 2i]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV7605890	dbSNP	C/T		인트론
hCV2828002	셀렐라	A/G		인트론
hCV7605889	dbSNP	C/G		인트론
hCV2828001	셀렐라	C/T		인트론
hCV2828000	셀렐라	G/A		인트론
hCV2827999	셀렐라	A/G		인트론
hCV2827998	셀렐라	T/C		인트론
hCV2827997	셀렐라	G/C		인트론
hCV2827996	셀렐라	C/G		인트론
hCV2827995	셀렐라	-/G		인트론
hCV11670006	셀렐라	-/G		인트론
hCV2827993	셀렐라	C/G		인트론
hCV2827992	셀렐라	A/C		인트론
hCV2827991	셀렐라	A/G		인트론
hCV2827990	셀렐라	G/A		인트론
hCV2827989	셀렐라	G/A		인트론
hCV16080952	dbSNP	A/G		인트론
hCV2827988	dbSNP 셀렐라	G/A A/G		인트론
hCV2827987	Celera	G/A		인트론
hCV11670008	dbSNP 셀렐라	T/G T/G		인트론
hCV11670009	셀렐라	T/-		인트론
hCV2827984	셀렐라	G/T		인트론
hCV2827983	셀렐라	G/A		인트론
hCV11670011	셀렐라	C/T		인트론
hCV11670012	셀렐라	T/A		인트론
hCV11670013	셀렐라	A/G		인트론
hCV2827979	셀렐라	A/G		인트론
hCV11670014	셀렐라	C/T		인트론
hCV2827977	셀렐라	A/T		인트론
hCV2827976	셀렐라	G/A		인트론
hCV2827975	셀렐라	T/A		인트론
hCV2827974	셀렐라	T/A		인트론
hCV2827973	셀렐라	C/G		인트론
hCV2827972	셀렐라	A/G		인트론
hCV2827971	셀렐라	C/A		인트론
hCV11439338	dbSNP	A/G		인트론
hCV2381339	dbSNP	C/T C/T T/C C/T		인트론
hCV2827970	셀렐라	T/C		인트론
hCV2827969	셀렐라	T/A		인트론
hCV7605880	dbSNP	T/C T/C		인트론

[표 2j]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV7605879	dbSNP	A/G G/A		인트론
hCV2827968	셀렐라	T/C		인트론
hCV2827967	셀렐라	G/C		인트론
hCV2827966	셀렐라	C/G		인트론
hCV2381338	dbSNP	A/G G/A A/G		인트론
hCV2827964	셀렐라	A/C		인트론
hCV2827963	dbSNP 셀렐라	C/T C/T		인트론
hCV11439341	dbSNP	C/T		인트론
hCV2827962	셀렐라	A/G		인트론
hCV2827961	dbSNP 셀렐라	C/T T/C		인트론
hCV11670022	셀렐라	-/A		인트론
hCV2827959	셀렐라	G/A		인트론
hCV2827958	셀렐라	T/C		인트론
hCV2827957	셀렐라	C/G		인트론
hCV2827956	셀렐라	T/G		인트론
hCV2827955	셀렐라	G/C		인트론
hCV2827954	셀렐라	T/C		인트론
hCV2827953	셀렐라	G/C		인트론
hCV15815639	dbSNP	C/A		인트론
hCV16142119	dbSNP	T/A		인트론
hCV2827952	셀렐라	C/T		인트론
hCV15816830	dbSNP	T/C		인트론
hCV1004253	dbSNP	T/G T/G		인트론
hCV9606740	dbSNP	C/T		인트론
hCV3189734	dbSNP 셀렐라	C/T T/C		인트론
hCV9606733	dbSNP	A/G		인트론
hCV3189733	셀렐라	C/G		인트론
hCV3189732	dbSNP 셀렐라	T/A T/A T/A T/A A/T		인트론
hCV1004252	dbSNP	C/A A/C A/C C/A C/A		인트론
hCV1004251	dbSNP	A/T A/T T/A T/A A/T T/A		인트론
hCV11670025	셀렐라	G/A		인트론
hCV3189731	셀렐라	T/C		인트론
hCV11670028	셀렐라	-/A		인트론
hCV3189730	셀렐라	G/T		인트론
hCV8560814	dbSNP 셀렐라	A/G G/A		인트론
hCV11670031	셀렐라	A/G		인트론
hCV11670032	셀렐라	G/A		인트론

[표 2k]

SNP 명칭	공급원	대립유전자	단백질 변이	위치
hCV11439346	dbSNP	C/T		인트론
hCV3189728	셀렐라	G/C		인트론
hCV9606725	dbSNP	C/G		인트론
hCV3189727	셀렐라	C/A		인트론
hCV9606724	dbSNP	C/A		인트론
hCV9606723	dbSNP	T/C		인트론
hCV9606719	dbSNP	T/G		인트론
hCV16142120	dbSNP	G/C		인트론
hCV16142127	dbSNP	T/A		인트론
hCV3189726	셀렐라	T/C		인트론
hCV3189725	셀렐라	C/T		인트론
hCV9606718	dbSNP	C/G		인트론
hCV3189724	dbSNP 셀렐라	C/T T/C		인트론
hCV2950480	셀렐라	G/T		인트론
hCV11670036	셀렐라	-/A		인트론
hCV3189723	셀렐라	T/A		인트론
hCV2950479	셀렐라	C/T		인트론
hCV7605776	dbSNP	C/T		인트론
hCV3189722	셀렐라	C/T		인트론
hCV2950478	셀렐라	C/G		인트론

제공되는 아그레카나제 분자는 또한, 서열 1의 서열과 유사하지만 단백질내의 아미노산 변화를 초래할 수 있는 뉴클레오타이드 서열내의 천연, 예를 들어, 대립유전자 변이인 변형 또는 결실을 포함하는 서열에 의해 암호화되는 인자 또는 인공적으로 조작된 단백질을 포함한다. 예를 들어, 합성 단백질은 전체적으로 또는 부분적으로 서열 2의 아미노산 잔기의 연속적 서열을 복제할 수 있다. 이들 서열은 아그레카나제 단백질과 1차, 2차 또는 3차 구조적 및 입체형태적 특징을 공유하기 때문에 서로 공통되는 생물학적 특성을 지닐 수 있다. 예를 들어, 단백질의 구조 및 입체형태를 현저하게 변형시키지 않으면서 수많은 보존적 아미노산 치환이 가능하므로 단백질의 생물학적 특성을 유지할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 예 를 들어, 보존적 아미노산 치환은 라이신(Lys 또는 K), 아르기닌(Arg 또는 R) 및 히스티딘(His 또는 H)과 같은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산; 아스파르트산(Asp 또는 D) 및 글루탐산(Glu 또는 E)과 같은 산성 측쇄를 갖는 아미노산; 아스파라긴(Asn 또는 N), 글루타민(Gln 또는 Q), 세린(Ser 또는 S), 트레오닌(Thr 또는 T) 및 티로신(Tyr 또는 Y)과 같은 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산; 및 알라닌(Ala 또는 A), 글리신(Gly 또는 G), 발린(Val 또는 V), 류신(Leu 또는 L), 이소류신(lie or I), 프롤린(Pro 또는 P), 페닐알라닌(Phe 또는 F), 메티오닌(Met 또는 M), 트립토판(Trp 또는 W) 및 시스테인(Cys 또는 C)과 같은 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 간에 이루어질 수 있는 것으로 인정되고 있다. 따라서, 이러한 천연 아그레카나제의 변형 및 결실을 천연 아그레카나제에 대한 생물학적 활성 대용물로서 억제제 및 치료 목적을 위한 기타 단백질의 개발에서 사용할 수 있다. 아그레카나제 및 소정의 아그레카나제 변이체뿐만 아니라 이의 억제제를 하기 실시예에서 기술하는 검정에 도입시킴으로써 상기 아그레카나제 변이체가 아그레카나제의 생물학적 활성을 유지하는지를 용이하게 측정할 수 있다.

목적하는 아미노산 치환(보존적인지 또는 비보존적인지에 관계없이)은 이러한 치환이 요망되는 때에 당해 분야의 숙련가에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환을 본 발명의 단백질 또는 폴리펩타이드의 중요한 아미노산 잔기를 확인하거나 기술되는 본 발명의 아그레카나제의 활성을 증가 또는 감소시키기는데 사용할 수 있다. 예시적 아미노산 치환은 하기 표 3에 제시한다.

[표 3]

본래의 잔기	예시적 치환	보다 보존적인 치환
Ala(A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg(R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn(N)	Gln	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser, Ala	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Gly(G)	Pro, Ala	Ala
His(H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile(I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신	Leu
Leu(L)	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys(K)	Arg, 1,4 디아미노-부티르산, Gln, Asn	Arg
Met(M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe(F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro(P)	Ala	Gly
Ser(S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val(V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르류신	Leu

특정 양태에서, 보존적 아미노산 치환은 통상적으로 생물학적 시스템에서의 합성 보다는 화학적 펩타이드 합성에 의해 혼입된 비천연 아미노산 잔기를 또한 포함한다.

기술되는 아그레카나제 단백질의 서열의 기타 특이적 돌연변이는 글리코실화 부위의 변형을 포함한다. 이러한 변형은 O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위와 관련될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화의 부재 또는 단지 부분적인 글리코실화의 존재는 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위에서의 아미노산 치환 또는 결실로부터 초래될 수 있다. 아스파리긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 적절한 세포의 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩타이드 서열을 포함한 다. 이러한 트리펩타이드 서열은 일반적으로 아스파리긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린(여기서, X는 임의의 아미노산일 수 있다)이다. 글리코실화 인식 부위의 제1 또는 제3 아미노산 중 하나 또는 둘다에서의 다양한 아미노산 치환 또는 결실은 변형된 트리펩타이드 서열에서 비글리코실화를 야기한다. 추가로, 글리코실화 부위가 변형되지 않은 상태로 남겨진다 해도 아그레카나제-관련 단백질의 세균성 발현도 비글리코실화된 단백질의 생산을 초래할 수 있다.

IV. 신규한 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열

본 발명의 범주내에서 핵산 서열은 중간정도 내지 고도의 엄격성 조건하에 기술되는 천연 아그레카나제 DNA 서열에 하이브리드화하는 분리된 DNA 및 RNA 서열을 포함한다. 염격한 조건 또는 높은 엄격성 조건이란, 보다 높은 온도와 보다 낮은 염 농도를 사용하는 하이브리드화 및 세척 조건을 의미한다. 추가로, 포름아미드의 포함도 엄격성을 증가시킨다. 예를 들어, 포름아미드의 부재하에 60 내지 65℃에서의 하이브리드화 조건 또는 50% 포름아미드하에 42℃에서의 하이브리드화 조건은 둘다 높은 엄격성 조건이다.

본 발명의 추가의 양상은 아그레카나제 단백질분해 활성 또는 아그레카나제의 기타 기술된 활성 또는 아직 발견되지 않은 활성을 갖는 아그레카나제 단백질을 암호화하는 DNA 서열이다. 이러한 서열은 서열 1에 제시한 뉴클레오타이드 서열, 및 유전자 코드의 축퇴성이 없다면 서열 1의 DNA 서열과 동일하고, 예를 들어, 서열 2의 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함하는 아그레카나제 단백질을 암호화 하는 DNA 서열을 포함한다.

추가로, 본 발명에는 중간정도로 엄격한 조건하에 서열 1의 DNA 서열과 하이브리드화하고 아그레칸을 분해하는 능력을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 포함된다. 하나의 양태에서, DNA 서열은 높은 엄격성 조건하에 하이브리드화하는 DNA 서열을 포함한다[참조: Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, at 387-389 (1982)]. 이러한 엄격한 조건은 예를 들어, 65℃에서의 0.1X SSC, 0.1% SDS를 포함한다. 하이브리드화로 확인되는 DNA 서열은 예를 들어, 서열 2에 제시된 서열과 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상 동일한 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함한다. 서열 1의 DNA와 동등한 DNA도 또한 중간정도의 엄격한 조건하에 서열 2의 펩타이드 서열을 암호화하는 DNA 서열에 하이브리드화할 것이다.

중간정도의 엄격성 조건은 당해 분야에 공지되어 있으며 문헌[참조: Sambrook et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1, Cold Spring Harbor Press. (1989)]에 기재되어 있다. 하나의 양태에서, 예를 들어, 중간정도의 엄격성 조건은 5X SSC/0.5% SDS, 1.0mM EDTA(pH 8.0)의 예비세척 용액의 사용 및 약 55℃ 내지 60℃ 온도의 하이브리드화 조건 및 약 55℃에서 5X SSC에서 밤새 세척함을 포함한다. 당해 숙련가라면 상기 조건이 핵산 서열의 길이와 조건과 같은 요인에 따라 조정될 수 있음을 인지할 것이다.

최종적으로, 서열 2의 아미노산 서열 또는 아그레카나제 활성을 갖는 서열 2의 펩타이드 서열 변이체를 암호화하는 서열 1의 서열의 대립유전자 변이 또는 기 타 변이가 또한 본 발명에 포함된다. 추가로, 본 발명은 아그레카나제 활성을 갖는 단백질을 암호화하는, 서열 1에 제시한 DNA 서열의 단편 및 서열 1의 변이체를 포함한다.

마찬가지로, 서열 2에 제시한 서열을 포함하는 아그레카나제 단백질을 암호화하지만, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 또는 대립유전자 변이(아미노산 변화를 초래하거나 초래할 수 있거나 초래하지 않을 수 있는 종 집단에서의 천연 염기 변화)로 인해 코돈 용법이 서열 1과는 상이한 DNA 서열도 기술하는 신규 인자를 암호화한다. 점 돌연변이 또는 유도된 변형(삽입, 결실 및 치환을 포함)에 의해 유발되어 서열 1의 DNA 서열에 의해 암호화되는 단백질의 활성, 반감기 또는 생산을 증가시키는 서열 1의 DNA 서열에서의 변이도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 DNA 서열은 예를 들어, 소정의 세포 집단에서 아그레카나제를 암호화하는 mRNA를 검출하기 위한 프로브로서 유용하다. 따라서, 본 발명은 아그레카나제 단백질과 관련된 질병 및 유전적 장애 또는 아그레카나제가 불규칙적으로 전사되거나 발현되는 세포, 기관 또는 조직 장애와 관련된 장애를 검출 또는 진단하는 방법을 포함한다. 안티센스 DNA 서열을 유전자 치료요법용 벡터를 제조하기 위해 사용할 수도 있다. 안티센스 DNA는 또한 안티센스 DNA와 내인성 아그레카나제 서열과의 상호작용을 연구하고 추가로 세포내에서 안티센스 DNA가 생산되는 양의 척도로서 벡터내에서 안티센스 DNA에 작동적으로 연결된 프로모터의 성능을 시험하기 위해, 예를 들어, 아그레카나제에 대한 안티센스 DNA 서열을 세포내로 도입시키는, 세포 또는 유기체와 관련된 생체내 방법에서 유용하다.

본 발명의 추가의 양상은 발현 조절 서열과 작동적으로 결합된 상기한 DNA 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 발현 조절 서열과 작동적으로 결합된, 아그레카나제 단백질을 암호화하는 DNA 서열로 형질전환된 세포주를 적합한 배양 배지에서 배양하고 상기 배양 배지로부터 아그레카나제 단백질을 회수 및 분리하는, 본 발명의 아그레카나제 단백질의 신규한 제조방법에서 사용할 수 있다. 상기 방법은 단백질 발현용 숙주 세포로서 다수의 공지된 원핵

및 진핵 세포를 사용할 수 있다. 벡터는 유전자 치료요법 용도로 사용할 수 있다. 이러한 용도에서는, 벡터를 환자의 세포내로 생체외 형질감염시킬 수 있으며 이 세포를 환자에게 재도입시킬 수 있다. 대안으로, 벡터를 표적화된 형질감염을 통해 생체내에서 환자에게 도입시킬 수 있다.

V. 아그레카나제 단백질의 제조

본 발명의 또 다른 양상은 신규 아그레카나제 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 DNA 서열, 예를 들어, 서열 1에 제시된 서열로 형질전환된 적합한 세포주를 배양하고 상기 DNA를 공지된 조절 서열의 조절하에 서열 2에 제시된 본 발명의 아그레카나제 단백질로 전사시킴을 포함한다. 형질전환된 숙주 세포를 배양하고 아그레카나제 단백질을 배양 배지로부터 회수 및 분리한다. 분리된, 발현된 단백질은 동시에 생산되는 기타 단백질뿐만 아니라 기타 오염원을 실질적으로 함유하지 않는다. 회수된, 분리된 단백질은 아그레칸 분해를 포함하는 단백질분해성 아그레카나제 활성을 나타내는 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명의 단백질은 아그레칸-분해 분자의 존재를 측정하는 검정에서 아그레카나제 단백질분해 활성을 입증하는 능력에 의해 추가로 특성화될 수 있다. 이러한 검정 또는 이의 개발은 당해 분야의 숙련간의 지식내에 있다. 상기 검정은 아그레칸 기질을 아그레카나제 분자와 접촉시키고 아그레칸 단편의 생산을 모니터링함을 포함할 수 있다[참조: Hughes et al., Biochem J 305: 799-804 (1995); Mercuri et al., J Biol. Chem 274: 32387-32395 (1999)]. 적합한 세포 또는 세포주는 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포일 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포의 선택과 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝, 산물 생산 및 정제의 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Gething and Sambrook, Nature, 293:620-625 (1981); Kaufman etal., Mol Cell Biol, 5(7):1750-1759 (1985); Howley et al., 미국 특허 제 4,419,446호]. 첨부되는 실시예에서 기술되는 또 다른 적합한 포유동물 세포는 원숭이 신장 COS-1 세포주이다. 포유동물 CV-1 세포를 사용할 수도 있다.

세균 세포를 또한 본 발명의 단백질 또는 폴리펩타이드의 발현에 적합한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 이. 콜라이(E. coli)의 다양한 균주(예: HB101, MC1061)가 생물공학 분야에서 숙주 세포로서 익히 공지되어 있다. 비. 서브틸리스(*B. subtilis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 기타 간상균 등의 다양한 균주를 또한 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다. 세포 세포에서의 단백질 발현의 경우, 아그레카나제의 프로펩타이드를 암호화하는 DNA가 일반적으로 필수적인 것은 아니다.

당해 분야의 숙련가에게 공지된 효모 세포의 다수의 균주가 본 발명의 단백 질 또는 폴리펩타이드의 발현용 숙주 세포로서 또한 유용할 수 있다. 추가로, 경우에 따라, 곤충 세포를 본 발명의 방법에서 숙주 세포로서 사용할 수 있다[참조: Miller et al., Genetic Engineering, 8: 277-298 (Plenum Press 1986)].

본 발명의 또 다른 양상은 이러한 신규 아그레카나제 단백질의 발현 방법에서 사용하기 위한 벡터를 제공한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 벡터는 본 발명의 신규 인자를 암호화하는 기술되는 전체길이 DNA 서열을 함유한다. 추가로, 당해 벡터는 아그레카나제 단백질 서열이 발현되도록 하는 적절한 발현 조절 서열을 함유한다. 대안으로, 상기한 바와 같이 변형된 서열을 포함하는 벡터도 또한 본 발명의 양태이다. 추가로, 서열 1의 서열 또는 아그레카나제 단백질을 암호화하는 기타 서열을 조작하여 복합 아그레카나제 단백질을 발현시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 상이한 아그레카나제 단백질에 연결된 서열 2의 단편을 포함하는 아그레카나제 단백질을 포함하는 재조합 단백질을 암호화하는 키메릭 DNA 분자를 포함한다. 이러한 재조합 또는 융합 단백질은 서열 2에 제시된 아그레카나제 분자의 단편을 암호화하는 DNA를 상이한 아그레카나제 단백질을 암호화하는 DNA와 프레임내에서 연결시킴으로써 제조할 수 있다. 서열 2에 제시된 아그레카나제 단백질을 암호화하는 DNA 또는 이의 단편 또는 변이체는 상이한 아그레카나제를 암호화하는 DNA에 3' 또는 5' 연결시킬 수 있다. 본 발명의 아그레카나제 분자의 발현용으로 사용되는 벡터는 세포주를 형질전화시키는 방법에서 사용할 수 있으며, 일반적으로 본 발명의 DNA 서열과 작동적으로 결합된 아그레카나제 분자의 복제 및 발현을 지시할 수 있는 선택된 조절 서열을 함유한다. 이러한 벡터에 대한 조절 서열은 당해 분 야의 숙련가에게 공지되어 있으며 숙주 세포에 따라 선택할 수 있다. 이러한 선택은 통상적이며 본 발명의 일부를 구성하지 않는다.

당해 분야의 숙련가라면, 예를 들어, 서열 1 또는 아그레카나제 관련 단백질을 암호화하는 다른 DNA 서열 또는 다른 변형된 서열을 포함하는 서열 및 공지된 벡터, 예를 들어, pCD[참조: Okayama et al., Mol Cell Biol, 2:161-170 (1982)], pJL3, pJL4[참조: Gough et al., EMBO J, 4: 645-653 (1985)] 및 pMT2 CXM를 사용하여 포유동물 발현 벡터를 작제할 수 있다. 또한, 당해 분야의 숙련가는 선택된 발현 시스템에서 아그레카나제 단백질의 재조합 형태, 예를 들어, rA18FS를 발현시키기에 적합한 발현 벡터를 사용할 수 있다.

벡터의 작제는 아그레카나제-관련 DNA 서열의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아그레카나제 cDNA는 암호화 영역의 5' 및 3' 말단에 있는 비암호화 뉴클레오타이드를 제거함으로써 변형시킬 수 있다. 제거된 비암호화 뉴클레오타이드는 발현에 유리한 것으로 공지된 다른 서열로 대체될 수 있거나 대체되지 않을 수 있다. 이러한 벡터는 아그레카나제 또는 아그레카나제 관련 단백질을 발현시키기 위한 적절한 숙주 세포내로 형질전환시킨다. 추가로, 서열 1의 서열 또는 아그레카나제 또는 아그레카나제 관련 단백질을 암호화하는 다른 서열을 조작하여, 아그레카나제 암호화 프로펩타이드 서열을 제거하고 이를 다른 아그레카나제 단백질의 완전한 프로펩타이드를 암호화하는 서열로 대체시킴으로써 성숙한 아그레카나제 또는 아그레카나제 관련 단백질을 발현시킬 수 있다.

당해 분야의 숙련가는, 서열 1의 서열을, 암호화 서열을 플랭킹하는 포유동 물 조절 서열을 제거하거나 이를 세균 서열로 대체시켜 조작함으로써 세균 세포에 의한 세포내 또는 세포외 발현을 위한 세균 벡터를 제조할 수 있다. 예를 들어, 암호화 서열을 추가로 조작할 수 있다(예를 들어, 다른 공지된 링커에 연결시키거나, 비암호화 서열을 암호화 서열로부터 제거하거나 다른 공지된 기술로 암호화 서열내의 뉴클레오타이드를 변경시킴으로써 조작할 수 있다). 이어서, 변형된 아그레카나제 관련 암호화 서열을 문헌[참조: Taniguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5230-5233 (1980)]에 기술된 바와 같은 방법을 이용하여 공지된 세균 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 이어서, 이러한 예시적 세균 벡터를 세균 숙주 세포내로 형질전환시키고 이로써 아그레카나제 관련 단백질을 발현시킬 수 있다. 세균 세포내의 아그레카나제 관련 단백질을 세포외 발현시키기 위한 전략에 대해서는 예를 들어, 유럽 특허원 제EPA 177,343호 참조.

유사한 조작을 곤충 세포에서의 발현을 위한 곤충 벡터(예를 들어, 공개된 유럽 특허원 제EPA 155,476호에 기재된 방법 참조)의 작제를 위해 수행할 수 있다. 본 발명의 인자의 세포내 또는 세포내 발현을 위해 효모 조절 서열을 사용하여 효모 벡터를 작제할 수도 있다(예를 들어, PCT 공개공보 제WO 86/00639호 및 유럽 특허원 제EPA 123,289호에 기재된 방법 참조).

고 수준의 본 발명의 아그레카나제 관련 단백질을 포유동물, 세균, 효모 또는 곤충 숙주 세포 시스템에서 제조하는 방법은 이종 아그레카나제 관련 유전자의 다수의 복사체를 함유하는 세포를 작제함을 포함할 수 있다. 이종 유전자는 증폭가능한 마커, 예를 들어, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자에 연결시키는 데, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR)에 대해 증가된 유전자 복사체를 함유할 수 있는 세포를 문헌[참조: Kaufman and Sharp, J Mol Biol, 159:601-629 (1982)]의 방법에 따라 증가되는 메토트렉세이트(MTX) 농도하에 증식에 대해 선택할 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 아그레카나제 관련 단백질이 발현될 수 있게 하는 다른 플라스미드 서열과 작동적으로 결합된 본 발명의 아그레카나제 관련 단백질에 대한 DNA 서열을 함유하는 플라스미드와 DHFR 발현 플라스미드 pAdA26SV(A)3[참조: Kaufman and Sharp, Mol Cell Biol 2:1304 (1982)]를 인산칼슘 공침전 및 형질감염, 전기천공 또는 원형질체 융합을 포함하는 방법에 의해 DHFR-결핍 CHO 세포, DUKX-BII내로 동시도입시킬 수 있다. DNFR 발현 형질전환체는 투석된 태아 송아지 혈청을 함유하는 알파 배지에서의 성장에 대해 선별한 다음, 문헌[참조: Kaufman et al., Mol Cell Biol., 5:1750 (1983)]에 기재되어 있는 바와 같이 증가되는 MTX 농도(예: 0.02, 0.2, 1.0 및 5μM MTX의 연속적 단계)하에서 성장에 의한 증폭에 대해 선별한다. 형질전환체를 클로닝하고, 생물학적 활성 아그레카나제 발현을 상기한 검정으로 모니터링한다. 아그레카나제 단백질 발현은 MTX 내성의 수준이 증가됨에 따라 함께 증가할 것이다. 아그레카나제 단백질은 ^{35}S 메티오닌 또는 시스테인으로의 펄스 표지화 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 특성화한다. 유사한 방법을 수행하여 다른 관련된 아그레카나제 관련 단백질을 제조할 수 있다.

본 발명의 아그레카나제 단백질은 또한 단백질 서열, 예를 들어, 서열 2에 제시된 서열 또는 이의 단편 또는 변이체와, 예를 들어, 태그, 즉 제2 단백질 또는 아그레카나제 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체의 아미노산 서열의 아미노산 말단, 카복시 말단 또는 임의의 위치에 추가되는 하나 이상의 아미노산, 약 2개 내지 50개의 아미노산 또는 약 50개 내지 약 100개의 아미노산을 포함하는 융합 단백질로서 발현시킬 수 있다. 통상적으로, 이러한 아미노산 태그는 생성되는 융합 단백질을 안정화시키도록 또는 예를 들어, 본 발명의 아그레카나제 단백질의 절단된 형태를 포함하여 상응하는 아그레카나제 단백질 또는 상기 단백질의 단편 또는 변이체의 발현된 재조합 형태의 정제를 단순화시키도록 제조한다. 상기 태그는 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 태그의 대표적 예로는 일련의 히스티딘 잔기, 에피토프 태그 FLAG, 단순포진 당단백질 D, 베타-갈락토시다제, 말토즈 결합 단백질, 스트렙타비딘 태그 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라제를 암호화하는 서열이 포함된다.

VI. 항체의 제조

본 발명의 분리된 단백질은, 당해 분야에 일반적으로 공지되어 있는 항체 제조방법을 이용하여 아그레카나제 및/또는 기타 아그레카나제 관련 단백질에 대한 모노클로로날 또는 폴리클로로날 항체를 제조하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 아그레카나제 또는 기타 관련 단백질에 대한 항체를 또한 포함한다. 항체는 아그레카나제 활성을 차단하는 항체 및 차단하지 않는 항체 둘다를 포함한다. 항체는 아그레카나제 또는 관련 단백질의 검출 및/또는 정제를 위해 또는 아그레카나제의 효과를 억제 또는 방지하기 위해 유용할 수 있다. 본 발명의 아그레카나제 또는 이의 일부분을 이용하여 아그레카나제에 특이적으로 결합하는 항체를 제조할 수 있다.

항체는 예를 들어, 종래의 하이브리도마 기술[참조: Kohler and Milstein, Nature 256:495-499 (1975)], 재조합 DNA 방법[참조: 예를 들어 미국 특허 제4,816,567] 또는 항체 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이(phage display) 기술[참조: Clackson et al., Nature 352: 624-628(1991); Marksetal., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]을 통해 제조할 수 있다. 다양한 항체 제조 기술에 대해 문헌[Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]을 참조.

단백질은 소수성인 절편과 친수성인 절편을 포함하는 특정한 생물학적 특성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 소수성 단편은 폴딩된 단백질의 구조의 내부에 위치할 가능성이 크며 친수성 단편은 폴딩된 단백질의 구조의 외부에 위치할 가능성이 크다. 단백질의 소수성 영역이 단백질상의 항원성 에피토프에 상응하는 것으로 사료된다. 서열 2에 제시된 단백질의 소수성은 플롯구조로 지칭되는 GCG 프로그램을 사용하여 측정하였다. 도 9에 도시한 바와 같이, 결과는 서열 2의 단백질이, 소수성이어서 폴딩된 단백질의 표면에 위치할 것으로 예상되는 몇가지 영역을 지님을 나타내었다. 예를 들어, 아미노산 50번 내지 100번 사이에는 소수성이며 항원성인 것으로 예상되는 영역이 존재한다. 상기 항원성 영역을 항체의 제조를 위해 사용할 수 있다.

본 발명의 항체는 하기하는 질병의 치료시에 사용할 수 있다. 항체는 또한 기술하는 검정 및 검출 방법에서 사용할 수 있다.

VII. 억제제의 개발

골관절염과 같은 다양한 상태는 아그레칸의 분해로 특성화되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 아그레칸을 분해하는 본 발명의 아그레카나제 단백질은 아그레카나제의 개발에 유용할 수 있다. 그러므로, 본 발명은 아그레카나제 억제제를 포함하는 조성물을 제공한다. 억제제는 아그레칸 기질의 혼합물을 아그레카나제 활성의 억제제와 관련시킨 다음, 아그레칸에 노출시키는 스크리닝 검정에서 아그레카나제 분자를 사용하여 개발할 수 있다. 억제제는, 예를 들어, 억제제의 라이브리리를 스크리닝함으로써 고처리량 방법을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 억제제는 또한 3차원 구조 분석 및/또는 컴퓨터 보조된 약물 디자인을 사용하여 제조할 수 있다. 상기 방법은 아그레카나제 및 아그레칸의 3차원 구조에 기초하여 억제제에 대한 결합 부위를 측정하고 아그레카나제 또는 아그레칸상의 결합 부위와 반응성인 분자를 개발함을 포함할 수 있다. 후보 분자는 억제 활성에 대해 검정한다. 아그레카나제 분자의 억제제를 개발하기 위한 추가의 표준 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 억제제에 대한 검정은 아그레칸과 억제제의 혼합물을 아그레카나제 분자와 접촉시킨 다음, 예를 들어, 아그레카나제 감수성 부위에서의 분해에 의해 생성되는 아그레카나제 단편을 검출 및 측정함으로써 아그레카나제 억제 정도를 측정함을 포함한다. 억제제는 단백질 항체이거나 소형 분자일 수 있다.

VIII. 질병 치료 및 진단

아그레카나제 활성의 억제제는 하기하는 질병의 치료시에 사용할 수 있다. 억제제는 또한 기술하는 검정 및 검출 방법에서 사용할 수 있다. 본 발명의 아그레카나제의 억제제를 사용함으로써 치료가능할 것으로 고려되는 다양한 질병으로는, 골관절염, 암, 염증성 관절 질환, 류마티스 관절염, 화농성 관절염, 치주 질환, 각막 궤양, 단백뇨, 죽상경맥동화증 플라크 파열로 인한 관상 혈전증, 동맥류 대동맥성 질환, 염증성 장 질환, 크론병, 폐기종, 급성 호흡 곤란 증후군, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 알쯔하이머병, 뇌 및 조혈 악성종양, 골다공증, 파킨슨병, 편두통, 우울증, 말초 신경병증, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 안구 혈관신생, 황반변성, 대동맥류, 심근경색, 자가면역 질환, 외상성 관절 손상 후의 퇴행성 연골 손실, 두부 외상, 이영양성 수포성 표피 박리증, 척수 손상, 급성 및 만성 신경퇴행성 질환, 골감소증, 악관절 질환, 신경계의 탈수초성 질환, 기관 이식 독성 및 거부, 악액질, 알레르기, 조직 궤양, 재협착증 및 변경된 아그레카나제 활성 또는 변경된 아그레카나제 수준을 특징으로 하는 기타 질환이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

아그레카나제의 활성을 억제하는 본 발명의 억제제 및 항체 및/또는 아그레카나제의 발현을 저하시킬 수 있는 화합물은 아그레카나제 및 아그레카나제 관련 단백질에 의한 아그레칸과 같은 세포외 매트릭스 단백질의 분해와 관련된 포유동물의 임의의 질환의 치료시에 사용할 수 있는 것으로 고려된다.

IX. 투여

본 발명의 또 다른 양상은 약제학적으로 허용되는 비히클 중에 하나 이상의 아그레카나제 항체 및 억제제의 치료학적 유효량을 함유하는 약제학적 조성물을 제 공한다. 연골내 아그레칸의 아그레카나제-매개된 분해는 골관절염 및 기타 염증 질환과 연루되어 왔다. 따라서, 이러한 본 발명의 조성물을 아그레칸의 분해 및/또는 아그레카나제 활성 또는 아그레카나제 수준의 상향 조절을 특징으로 하는 질병의 치료시에 사용할 수 있다.

본 발명은 아그레칸의 분해를 특징으로 하는 상태를 앓는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 이러한 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 아그레카나제 효소의 단백질분해 활성을 억제하는 아그레카나제 항체 또는 억제제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여함을 포함한다.

본 발명의 항체 및 억제제는 사람 또는 동물에서 다양한 의학 장애를 진단하거나 치료하는데 유용하다. 하나의 양태에서, 본 발명의 항체는 동일한 항체에 의해 결합되지 않은 아그레카나제 단백질에 비해서 아그레카나제 단백질과 관련된 하나 이상의 활성을 억제 또는 감소시키는데 사용할 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 항체 및 억제제는 항체에 의해 결합되지 않은 아그레카나제에 비해서 아그레카나제 분자의 하나 이상의 활성을 억제 또는 감소시킬 수 있다. 특정 양태에서, 아그레카나제의 활성은 본원에서 기술하는 항체 중 하나 이상에 의해 결합된 경우에 50% 이상 억제

되며, 본원에서 기술하는 항체 중 하나 이상에 의해 결합되지 않은 아그레카나제 단백질에 비해서 60, 62, 64, 66, 68 , 70, 72, 72, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 또는 88% 이상 억제될 수 있거나, 90, 91, 92, 93 또는 94% 이상 억제될 수 있거나 95% 이상 내지 100% 억제될 수 있다.

일반적으로, 본 발명의 조성물은 항체 또는 이의 결합 단편이 약 1μg/kg 내 지 약 20mg/kg, 약 1μg/kg 내지 약 10mg /kg, 약 1μg/kg 내지 약 1mg/kg, 약 10μg/kg 내지 약 1mg/kg, 약 10μg/kg 내지 약 100μg/kg, 약 100μg 내지 약 1mg /kg 또는 약 500μg/kg 내지 약 1mg/kg의 범위인 투여량으로 투여되도록 환자에게 투여한다. 항체는 거환 투여로서 투여하여, 항체가 환자에게 투여된 후에 환자의 체내에서 순환될 수 있는 시간 간격이 최대가 되도록 한다. 또한, 초기 거환 투여 후에 연속 주입을 사용할 수도 있다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 단백질 및 소형 분자와 같은 아그레카나제의 억제제의 투여에 관한 것이다. 억제제의 유효량은 아그레카나제의 활성을 감소시켜 목적하는 생물학적 결과를 달성하는데 유용한 투여량이다. 일반적으로, 억제제를 투여하기에 적절한 치료학적 투여량은 예를 들어, 약 5mg 내지 약 100mg, 약 15mg 내지 약 85mg, 약 30mg 내지 약 70mg 또는 약 40mg 내지 약 60mg의 범위일 수 있다. 억제제는 단일 투여로서 또는 1일 1회, 주 1회 또는 월 1회의 간격으로 투여할 수 있다. 아그레카나제 억제제의 투여에 대한 투여량 스케쥴은 예를 들어, 이의 아그레카나제 표적에 대한 억제제의 친화성, 억제제의 반감기 및 환자의 상태의 중증도에 기초하여 조정할 수 있다. 일반적으로, 억제제는 거환 투여로서 투여하여 이의 순환 수준이 최대화되도록 한다. 거환 투여 후에 연속 주입을 사용할 수도 있다.

이러한 화합물의 독성 및 치료학적 효능은 예를 들어, LD_{50} (집단의 50%를 치사시키는 투여량) 및 ED_{50} (집단의 50%에서 치료학적으로 유효한 양)을 측정하기 위 한 세포 배양물 또는 실험 동물 모델에서 표준 약제학적 과정으로 측정할 수 있다. 독성 및 치료학적 효과 간의 투여량 비가 치료 지수이며 이는 LD_{50}/ED_{50} 비로서 표현할 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 항체 및 억제제가 일반적으로 바람직하다.

세포 배양물 검정 및 동물 연구로부터 수득한 데이터는 사람에서 사용하기 위한 투여량 범위의 제형화시에 사용할 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 독성을 거의 갖지 않거나 전혀 갖지 않는 ED_{50} 을 나타내는 순환 농도의 범위내에 해당될 수 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이의 범위가 달라질 수 있다. 본 발명에 따라서 사용되는 임의의 항체 또는 억제제의 경우, 치료학적 유효량은 세포 배양물 검정으로부터 초기에 산정할 수 있다. 투여량은 동물 모델에서 제형화하여, 세포 배양물 검정으로 측정된 바와 같은 IC_{50} (즉, 증상의 최대 억제의 1/2을 달성하는 시험 항체의 농도)를 나타내는 순환 혈장 농도를 달성할 수 있다. 혈장중 수준은 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다. 임의의 특정 투여량의 효과는 적합한 생물검정으로 모니터링할 수 있다. 적합한 생물검정의 예로는 DNA 복제 검정, 전사 기반 검정, GDF 단백질/수용체 결합 검정, 크레아틴 키나제 검정, 전구지방 세포의 분화에 기초한 검정, 지방세포내의 글루코즈 흡수량에 기초한 검정 및 면역학적 검정이 포함된다.

본 발명의 치료학적 방법은 아그레카나제 억제제 조성물을 국소, 전신 또는 이식물 또는 장치로서 국부 투여함을 포함한다. 투여량 섭생은 아그레카나제 단백질의 작용, 병리 부위, 질병의 중증도, 환자의 연령, 성별 및 식이, 임의의 염증의 중증도, 투여 시간을 변형시키는 각종 요소 및 기타 임상 요소에 기초하여 담당 주치의가 결정할 수 있다. 일반적으로 전신 또는 주사에 의한 투여는 최소로 효과적인 투여량에서 시작하여 투여량을 긍정적 효과가 관찰될 때까지 미리 선택된 시간 경과에 따라 증가시킬 수 있다. 이어서, 투여량의 점진적 증가는 나타날 수 있는 모든 부작용을 고려하여, 상응하는 효과의 증가를 생성하는 수준으로 제한될 수 있다. 최종 조성물에 기타 공지된 요소의 추가가 또한 투여량에 영향을 미칠 수 있다.

진행은 질병 진행을 정기적으로 평가하여 모니터링할 수 있다. 진행은 예를 들어, X-선, MRI 또는 기타 영상 기법, 윤활액 분석, 환자 반응 및/또는 임상 검사로 모니터링할 수 있다.

X. 검정 및 검출 방법

본 발명의 억제제 및 항체는 샘플 중의 아그레카나제의 존재나 부재 또는 양을 측정하기 위한 검정 및 검출 방법에서 사용할 수 있다. 본 발명의 억제제 및 항체를 사용하여 생체내 또는 시험관내에서 아그레카나제 단백질을 검출할 수 있다. 이들 단백질의 존재 또는 수준과 질병을 상호관련시킴으로써, 당해 분야의 숙련가는 동반 질병을 진단하거나 이의 중증도를 측정할 수 있다. 본원에서 기술하는 억제제 및 항체로 진단할 수 있는 질병은 상기에 제시되어 있다.

항체를 이용하기 위한 검출 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며 ELISA, 방사선면역검정, 면역블롯, 웨스턴 블롯, 면역형광법, 면역침전법 및 기타 유사한 기술이 포함된다. 항체는 추가로 단백질(예: 아그레카나제 단백질)을 검출하는 상기 기술들 중 하나 이상을 포함하는 진단 키트내에 제공될 수 있다. 이러한 키트는 기타 성분, 포장재, 지침서 또는 아그레카나제 단백질의 검출을 보조하는 기타 물질 및 당해 키트 사용에 관한 지침서를 함유할 수 있다. 단백질 억제제를 이러한 진단 검정에서 사용하는 경우, 단백질-단백질 상호작용 검정을 사용할 수 있다.

항체 및 억제제를 진단 목적으로 의도하는 경우, 이들을, 예를 들어, 리간드 그룹(예: 바이오틴) 또는 검출가능한 마커

그룹(예: 형광 그룹, 방사선동위원소 또는 효소)로 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 경우에 따라, 항체(폴리클로날 또는 모노클로날인지에 관계없이)는 통상의 기술을 사용하여 표지화할 수 있다. 적합한 표지로는 형광발색단, 발색단, 방사성 원자, 전자 고밀도 시약, 효소 및 특이적 결합 파트너를 갖는 리간드가 포함된다. 효소는 통상적으로 이의 활성으로 검출한다. 예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제는 테트라메틸벤지딘(TMB)을 분광광도계로 정량화할 수 있는 청색 색소로 전환시키는 능력으로 측정할 수 있다. 기타 적합한 결합 파트너로는 바이오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, IgG 및 단백질 A, 및 당해 분야에 공지된 다수의 수용체-리간드 커플이 포함된다.

실시예

실시예 1: DNA의 분리

잠재적인 신규 아그레카나제 계통 구성원을 데이타베이스 스크리닝 접근법을 사용하여 확인하였다. 아그레카나제-1[참조: Science 284:1664- 1666(1999)]는 적 어도 다음의 6개의 도메인을 갖는다: 시그날, 프로펩타이드, 촉매 도메인, 디스인테그린, tsp(트롬보스폰딘) 및 c-말단. 촉매 도메인은 아연 결합 기호 영역인 TAAHELGHVKF(서열 6) 및 프로테아제 활성을 초래하는 'MET 턴(turn)'을 함유한다. 다수의 위치에서 아연 결합 영역내의 치환은 여전히 프로테아제 활성을 가능하게 하지만, 히스티딘(H) 및 글루탐산(E) 잔기가 존재해야 한다. 아그레카나제-1의 트롬보스폰딘 도메인이 또한 기질 인식 및 분해에 중요한 도메인이다. 이들 두 도메인이 본 발명자들의 신규 아그레카나제 계통 구성원의 분류를 결정한다. 아그레카나제-1 DNA 서열의 암호화 영역을 사람 EST에 중점을 두어 TBLASTN을 사용하여 GeneBank EST에 대해 조회하는데 사용하였다. 수득된 서열은 잠재적 계통 구성원을 확인하고자 하는 노력에 있어 출발점이었다. ADAMTS-18 또는 EST18로서 지칭되는 본 발명의 아그레카나제의 특정한 뉴클레오타이드 서열은 도 1A 및 1B(서열 1)에 도시되어 있다.

실제 EST18 서열은 도 5A 및 5B(서열 5)에 제시한다. 초기의 실제 서열에 기초하여, 한 세트의 PCR 프라이머를 EST18의 프로도메인 및 촉매 도메인에 걸쳐있는 약 1200개의 염기쌍을 증폭시키도록 디자인하였다. 상기 프라이머 세트를 사용하여 상이한 유형의 조직으로부터의 cDNA 분자를 스크리닝함으로써 아그레카나제 분자에 대한 조직 공급원을 확인하였다. 일단 조직 공급원이 확인되면, EST18의 2개의 중첩 단편을 cDNA 분자를 사용한 PCR로 증폭시켰고, 증폭된 단편을 서열분석용 벡터내로 클로닝시켰다. 클로닝된 서열은 추정상의 서열과 상이하였으며, 따라서 각 반응의 다중 복제물을 클로닝하고 3개의 독립적인 조직 공급원으로부터 서열 분석하였다. 모든 클론의 서열 분석에 기초하여, 3219개 염기쌍의 컨센수스(consensus) 개방 판독 프레임(open reading frame; ORF)를 측정하였다(서열 3). 상기 3219bp ORF 프레임은 하기에서 추가로 기술하는 전체길이 유전자를 대표하지 않는 것으로 고려된다. 수득된 서열을 사용하여 전체길이 서열을 스크리닝하고 분리할 수 있다. EST18 서열을 증폭시키는데 사용되는 PCR 조건이 오류 도입을 촉진시켰기 때문에, 다중 중첩 단편을 증폭시키고 이를 특이적 제한 효소로 분해시킨 다음, pED로 지칭되는 포유동물 발현 벡터내로 최종 연결시킴으로써 3219bp ORF를 작제해야 했다.

구체적으로, 마라톤-레디(marathon-ready) ™ cDNA, 뇌, 위 및 흉선(제조원: Clontech, Palo Alto, CA)을 모든 PCR 클로닝 반응에서 주형으로서 사용하였다. 모든 PCR 반응은 다음의 순환 미계변수를 사용하여 Perkin-Elmer 9600 열순환장치(제조원: Wellesley, MA)에서 수행하였다: 94°C에서 30초 동안, 94°C에서 5초 동안의 5회의 사이클, 72°C에서 4분 동안, 94°C에서 5초 동안의 5회의 사이클, 70°C에서 4분 동안, 94°C에서 5초 동안의 30회의 사이클, 68°C에서 4분 동안. 클론텍(Clontech)의 어드벤티지(Advantage) ™ GC2 폴리머라제를 제조업자의 권장사항(클론텍, Palo Alto, CA)에 따라서 0.5M GC-용융물의 최종 농도와 함께 사용하였다. EST18에 대한 추정상의 전체길이 뉴클레오타이드의 각 단편을 증폭시키기 위해 사용된 다양한 프라이머머 세트는 서열 9, 10, 11 및 12에 제시된 서열로서 도 6A에 도시되어 있다.

PCR 산물을 도 6B에 도시한 바와 같이 상이한 효소를 사용하여 분해시킨 다음, 1 또는 1.5% 아가로스 겔 상에서 분리하였다. 명시된 분해된 크기에 상응하는 DNA 밴드를 겔로부터 회수하였다. 연결 반응은 동일한 몰비의 분해된 DNA 단편과 EcoRI 및 SalI로 미리 분해된 벡터 pED를 포함한다. 다양한 증폭 단편을 사용한 특정 cDNA 작제는 DNA를 서열분석하여 확인하였고, 이는 도 3(서열 3)에 제시되어 있다

본 발명의 아그레카나제의 예상되는 아미노산 서열(서열 4)은 도 4에 제시되어 있다. 클로닝된 서열은 3개의 TSP 서브-모티프를 갖는 것으로 보인다. TSP 서브-모티프는 약 50개의 아미노산으로 기술되며, 이는 기호 WXXXXW로 시작하며 6개의 시스테인 잔기를 함유한다. 도 4에 제시한 서열내의 제3 서브-모티프는 41개의 아미노산으로 이루어지고 WXXXXW로 시작하며 4개의 시스테인을 함유한다. 따라서, 추가의 TSP 서브모티프가 없는 것으로 예상하면 10개의 추가아미노산이 있는 것으로 고려된다. 본 발명의 아그레카나제의 대다수는 3개의 조직 공급원인 뇌, 위 및 흉선에서 발견된다.

도 4에 제시된 바와 같은 본 발명의 아그레카나제 분자는 다음과 같이 특징지워질 수 있다: 프리-프로 영역 시그날-

서열, LLQALQLCCLCCA- (서열 13) SVAAALASDSSSGASGLNDDYVFVTPVEVDSAGSYISHDILHNGRKKRSA (서열 14) |(시그날) |(성숙한 펩타이드) 5 18 은 보존된 시스테인 잔기 및 푸린(furin) 부위를 함유한다. 촉매 도메인은 전형적 아연 결합 모티프로 특성화된다. 이는 아연 결합 서열의 상부에 5개의 보존된 시스테인 잔기를 함유하며 아연 결합 서열의 하부에 3개의 잔기를 함유한다. 이는 또한 아연 결합 서열의 하부에 보존된 메티오닌 'Met-턴'을 함유한다. 디스인테그린-유사 도메인은 8개의 보존된 시스테인 잔기를 함유한다. TSP 모듈은 헤파린 결합 도메인(WXXWXXW); CD36-결합 모티프(CSRTCGG)(서열 15); 및 6개의 보존된 시스테인 잔기를 함유한다. 시스테인이 풍부한 도메인은 10개의 보존된 시스테인을 함유하는 것으로 특징으로 한다. 스페이서 도메인은 2½개가 클로닝된 TSP-반복부를 특징으로 한다. 아그레카나제의 N 말단 부분은 기술되는 서열을 사용하여 클로닝할 수 있다. TSP 서브모티프는 기호 WXXXXW로 시작하고 6개의 시스테인을 함유한다. 도 4의 제3 모티프는 4개의 시스테인을 갖는다.

ADAMTS-18 뉴클레오타이드 서열은 5' 및 3' RACE를 이용하여 본래 서열 이상으로 신장시켰다. 흉선 마라톤-레디 ™ cDNA를 PCR 클로닝 반응에서 주형으로서 사용하기 위해 클론텍(Palo Alto, CA)으로부터 구입하였다. 안티센스 프라이머 5' TGGTATGATTCACGACGGAGAAGGG(서열 16)는 제1 라운드의 5' RACE 반응에서 사용하였고 센스 프라이머 5'CGGGTCACCATCCTCACGTACTGTA(서열 17)은 제1 라운드의 3'RACE 반응에서 사용하였으며, 둘다 마라톤 cDNA에 특이적인 AP-1 말단 프라이머와 함께 사용하였다. 클론텍 어드벤티지 ™ GC2 폴리머라제 시약(제조원: 클론텍, Palo Alto, CA)를 제조업자의 권장사항에 따라 사용하였다. 모든 증폭은 Perkin-Elmer 9600 열순환 장치(제조원: Perkin Elmer, Wellesley, MA)에서 수행하였다. 순환 매계변수는 94℃에서 30초 동안, 94℃에서 5초 동안의 5회의 사이클, 72℃에서 4분 동안, 94℃에서 5초 동안의 5회의 사이클, 70℃에서 4분 동안, 94℃에서 5초 동안의 30회의 사이클, 68℃에서 4분 동안이었다. 제1 라운드의 반응물을 TE 속에 10배 희석시키고, 반응 혼합물 5㎕를 제2 라운드의 PCR용 주형으로서 사용하였다. 안티센스 프라이머 5'AACCCTCGTGGTGGCAGACAAG(서열 18)을 제2 라운드 5'RACE용으로 사용하였고, 센스 프라이머 5'TCATTCCAGCTGGCGCCCGAAGCAT(서열 19)를, 마라톤 cDNA에 특이적인 AP-2 말단 프라이머를 제외하고는 제1 라운드에 대해 기술한 바와 동일한 매계변수를 사용하는 제2 라운드의 3'RACE 반응에서 사용하였다. 각 반응물의 분취액을 1% 아가로스 겔 상에서 분리시킨 다음, 써던 분석을 위해 니트로셀룰로즈로 옮겼다. 니트로셀루로즈 막을 제조업자의 권장사항에 따라서 37℃에서 30분 동안 클론텍 ExpressHyb ™ (제조원: Clontech, Palo Alto, CA)에서 예비하이브리드화시켰다. 이어서, 막을 1×10 ^{6} CPM의 α-ATP 말단-표지된 올리고 5' CTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGC(서열 11)(5'RACE) 또는 5' GATAACTTTCCCAGAGCGAAGATGC(서열 20)(3'RACE)과 함께 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 결합되지 않은 프로브를 실온에서 2X SSC/0.05% SDS로 2회 세척한 다음, 실온에서 0.1X SSC/0.1% SDS로 2회 추가 세척하여 제거하였다. 2중 아가로즈 겔을 전개시켰고, 자가방사선상에서 양성 시그날에 상응하는 PCR 산물을 상기 아가로즈 겔로부터 절개하고 DNA를 바이오래드(BioRad)의 Prep-A-Gene DNA 정제 시스템(제조원; 바이오래드, Hercules, CA)을 통해 겔 매트릭스로부터 회수하였다. 회수된 DNA를 제조업자의 지시에 따라서 스트라타젠(Stratagene)의 PCR-Script ^{R} Amp Cloning(제조원: 스트라 타젠, La Jolla, CA)에 연결시켰다.

연결 혼합물을 분취액을 제조업자의 지시(Carlsbad, CA)에 따라서 Gibco Technologies Electromax DH10B 세포로 형질전환시켰다. 이어서, 플라스미드 DNA를 수득된 재조합 세균으로부터 분리시키고, DNA를 서열분석하였다. 한 실험에서는, 5'RACE 반응으로 156개 염기의 5'UTR에 뒤이어, 제2 라운드 안티센스 프라이머(서열 18)로서 기술되는 서열로 끝나는 개방 판독 프레임의 909개 염기쌍이 시작되는 메티오닌이 있는 1065개의 염기가 수득되었다. 3' RACE 반응으로 1007개 염기쌍의 3' UTR에 뒤이어, 제2 라운드 센스 프라이머(서열 19)로서 기술되는 서열로 시작하여 종결 코돈으로 끝나는 1358개 염기의 암호화 서열이 있는 총 2368개의 염기가 수득되었다.

실시예 2: EST18 조직 발현

클론텍 사람 다중 조직 발현 어레이 MTE ™ (클론텍 카탈로그 번호: 7776-1)를 제조업자의 지침에 따라서 533개 염기쌍 α- ^{32}P dCTP-표지된 cDNA 프로브로 프로빙하였다. 프로브 표지화 및 하이브리드화를 다음과 같이 수행하였다: A18FS 플라스미드(하기에서 기술함) 5㎍을 판매업자의 권장사항에 따라서 이의 최적 완충액 속에서 EcoRI 효소로 분해시켰다. 제한 분해물을 1% 아가로즈 겔에서 분리시키고, 서열 2의 아미노산 1번(메티오닌) 내지 아미노산 174번(아스파라긴)을 포함하는 EST18 단백질 서열을 암호화하는 533개 염기쌍 단편을 상기 요약한 바와 같이 아가로즈 겔로부터 회수하였다. α- ^{32}P dCTP-표지된 프로브를 애머샴 파마시아(Amersham Pharmacia)의 Ready-To-Go 키트(카탈로그 번호: 27-9240-01, Pharmacia,)를 사용하여 제조하였다. 간략하게 언급하면, 열-변성된 DNA 30ng를 50μCi의 α- ^{32}P dCTP 및 1개의 표지화 비드와 함께 37℃에서 15분 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 반응 혼합물을 미리 평형화된 파마시아 NICK 컬럼(카탈로그 번호: 17-0855-02)에 적용시켜 혼입되지 않은 α- ^{32}P dCTP를 표지된 프로브로부터 제거하였다. 탈염된 프로브를 분석하고, 15×10 ^{6} cpm을 미리 가온된 ExpressHyb 5㎖에 첨가하였다. 이어서, 하이브리드화 혼합물을 미리 하이브리드화된 MTE로 옮겼다. 하이브리드화를 65℃에서 교반하면서 밤새 진행시켰다.

프로브 검출: 하이브리드화 후, MTE를 제조업자의 지침에 따라서 일련의 완충액으로 세척하였다. 이어서, MTE를 Kodak BioMax MS 필름(제조원: Kodak)과 1개의 증감지를 갖는 X-선 카셋트에 위치시켰다. 이어서, 상기 카셋트를 -70℃에서 저장하였다. 20시간 또는 76시간 후에 각 필름을 현상하였다. 노출 후의 결과는 동일하였다. 발현은 좌측 및 우측 소뇌, 뇌량 및 태반으로 제한되었었다.

실시예 3: 아그레카나제 단백질의 절단된 형태의 발현

EST18 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 절단된 형태의 단백질을 융합 단백질로서 발현시켰다. 이러한 한가지 절단된 단백질인 A18FS는 EST18 뉴클레오 타이드에 의해 암호화되는 아미노산 1번(메티오닌) 내지 아미노산 650번(페닐알라닌)의 처음 650개 아미노산을 의미한다. 발현 작제물은 두 단계로 제조하였다. 먼저, EST18 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단을 5' RACE에 의해 확인되는 추가의 암호화 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 변형시켰다. 두번째, 작제물은 페닐알라닌에 대한 코돈에서 종결되도록 개방 판독 프레임을 갖도록 하였다. 재조합 단백질의 정제를 돕기 위해 스트렙타비딘-태그 서열을 추가하였다.

5' 말단의 변형: 하기에 기재한 6개의 합성 올리고뉴클레오타이드를, 함께 어닐링되어 5' 말단이 EcoRI 부위로 플랭킹되고 3' 말단이 SacII 부위로 플랭킹된 DNA 서열을 형성하도록 디자인하였다. 클로닝된 EST18 서열을 EcoRI 및 SacII 효소로 분해하였다. 분해된 벡터를 1% 아가로즈 겔에서 분리시키고, 회수된 DNA를 합성 올리고뉴클레오타이드와 연결시켰다. 상기 올리고뉴클레토타이드는 다음에 기재한다:

5'AATTCCCACCATGGAGTGCGCCCTCCTGCTCGCGTGTGCCT 3' (서열 21);

5' CCCACCATGGAGTGCGCCCTCCTGCTCGCGTGTGCCTTCCCGGCTGCG 3' (서열 22);

5' TCCCGGCTGCGGGTTCGGGCCCGCCGAGGGGCCTGGCGGGACTGGGGCGCGTGGCCAAG 3' (서열 23);

5' GGTTCGGGCCCGCCGAGGGGCCTGGCGGGACTGGGGCGCGTGGCCAAGGCGCTCCAGCT 3' (서열 24);

5'GCGCTCCAGCTGTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCCGC 3' (서열 25); 및

5'GTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCC 3' (서열 26).

연결 혼합물의 분취액을 Gibco Life Technologies ElectroMax DH10B 세포로 형질전환시키고, 재조합 플라스미드의 서열을 서열분석하여 확인하였다.

A18FS 절단 및 스트렙타비딘-태그첨가: A18FS를 프라이머 쌍인, 전방향 프라이머 5' CTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCG 3'(서열 27)과 역방향 프라이머 5' CCCTTGCAATGAAAATAGCTTGGATTTTGGAAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAAGGCGGCCGCCGCAAA 3'(서열 28) 및 주형으로서의 EST18 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 전방향 프라이머는 고유의 제한 부위 BglII을 함유하고 역방향 프라이머는 고유의 제한 부위 NotI을 함유하여, 미리 분해된 발현 벡터내로의 방향성 클로닝이 가능하였다. 역방향 프라이머는 또한 에피토프 태그로서 작용하는 생성된 단백질 서열 GSAWSHPQFEK(서열 29)을 포함하였다.

PCR 증폭을 5μℓ 10X PCR 반응 완충액; 최종 농도 0.2mM 이하의 1μℓ dNTP; 전방향 프라이머(서열 27) 10pmole; 역방향 프라이머(서열 28) 10pmole; 서열 1에 제시된 EST18 전체길이 뉴클레오타이드 주형 1ng; 스트라타젠 Pfu Turbo Hotstar 폴리머라제(카탈로그 번호 600320) 2.5단위; 및 50μℓ 이하의 정제수를 함유하는 50μℓ 용적 반응물 속에서 수행하였다. 증폭 반응 조건은 94℃에서 2분 동안; 94℃에서 15초 동안; 총 22회의 사이클 동안 70℃에서 3분 동안 증폭; 및 72℃에서 5분 동안 신장시킨 다음, 4℃에서 냉각이었다. 스트렙타비딘 태그를 포함하여 절단된 형태의 아그레카나제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 7에 제시한다.

실시예 4: CHO 세포에서 아그레카나제의 발현

쥐, 사람 또는 기타 포유동물 아그레카나제 관련 단백질을 제조하기 위해, 아그레카나제 단백질을 암호화하는 DNA를 적절한 발현 벡터내로 클로닝하고, 통상의 유전공학 기술을 사용하여 포유동물 세포 또는 곤충 숙주 세포 배양 시스템을 포함하는 기타 바람직한 원핵 또는 진핵 숙주내로 도입시켰다. 생물학적 활성 재조합 사람 아그레카나제에 대한 발현 시스템은 안정하게 형질전환된 포유동물, 곤충, 효모 또는 세균 세포를 포함하는 것으로 고려된다.

포유동물발현 벡터 pMT2 CXM은 p91023(b)[참조문헌: Wong et al., Science 228:810-815 (1985)]의 유도체이며, 테트라사이클린 내성 유전자 대신에 암피실린 내성 유전자를 함유하고 cDNA 분자를 벡터내로 삽입하기 위한 XhoI 부위를 추가로 함유한다는 점에서 p91023(b)와 상이하다. pMT2 CXM의 작용적 요소는 기술된 바 있으며[참조: Ka ufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689-693 (1985)] 아데노바이러스 VA 유전자, 72bp 인핸서를 포함하는 SV40 복제 오리진, 5' 스플라이싱 부위 및 아데노바이러스 후기 mRNA상에 존재하는 대다수의 아데노바이러스 3부분 리더 서열(adenovirus tripartite leader sequence)을 포함하는 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, DHFR 삽입체, SV40 초기 폴리아데닐화 부위(SV4) 및 이. 콜라내에서의 증식에 필요한 pBR322 서열을 포함한다.

플라스미드 pMT2 CXM은 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC, Rockville, MD, USA)에 수탁번호 제ATCC 67122호로서 기탁된 pMT2-VWF를 EcoRI로 분해시켜 수득하였다. EcoRI 분해는 pMT2-VWF내에 존재하는 cDNA 삽입체를 절단하여, 연결될 수 있으며 이. 콜라이 HB 101 또는 DH-5를 형질전환시키는데 사용할 수 있는 직쇄 형태의 pMT2를 산출하였는데, 이는 암피실린에 대해 내성이다. 플라스미드 pMT2 DNA는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 이어서, pMT2 CXM을 루프아웃(loopout)/루프인(loopin) 돌연변이유발 기술[참조: Morinaga, et al., Biotechnology 84:636 (1984)]을 이용하여 작제한다. 이로써 SV40 복제 오리진 및 pMT2의 인핸서 서열 부근의 Hind III 부위에 대해 염기 1075번 내지 1145번이 제거된다. 또한, 이는 뉴클레오타이드 1145번에 다음 서열을 삽입시킨다: 5'CATGGGCAGCTCGAG 3'(서열 30). 상기 서열은 제한 엔도뉴클레아제 Xho I에 대한 인식 부위를 함유한다. pMT23로 명명되는, pMT2 CXM의 유도체는 제한 엔도뉴클레아제 PstI, EcoRI, SalI 및 XhoI에 대한 인식 부위를 함유한다. 플라스미드 pMT2 CXM 및 pMT23 DNA는 통상의 방법으로 제조할 수 있다.

또한, pMT21로부터 유도된 pEMC2β1이 본 발명의 실행에 있어 적합할 수 있다. pMT21은 pMT2-VWF로부터 유도된 pMT2로부터 유도하였다. 상기한 바와 같이, EcoRI 분해는 pMT-VWF 내에 존재하는 cDNA 삽입체를 절단하여, 후속적으로 연결될 수 있고 이. 콜라이 HB 101 또는 DH-5를 형질전환하는데 사용하여 암피실린 내성을 초래할 수 있는 직쇄 형태의 pMT2를 생성시킨다. 플라스미드 pMT2 DNA는 통상의 방법으로 제조할 수 있다.

pMT21은 다음의 2가지 변형을 통해 pMT2로부터 유도하였다. 먼저, cDNA 클로닝을 위해 G/C 말단으로부터의 19개 G 잔기의 신장부를 포함하는, DHFR cDNA의 76bp의 5' 비전사된 영역을 결실시킨다. 이 과정에서는, XhoI 부위를 삽입시켜 DHFR로부터 바로 상부에 위치하는 다음의 서열을 수득하였다:

5' CTGCAGGCGAGCCTGAATTCCTCGAGCCATCATG 3' (서열 31)
PstI Eco RI XhoI

두번째, EcoRV 및 XbaI로 분해시키고 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편으로 처리하고 ClaI 링커(CATCGATG)에 연결시켜 고유의 ClaI 부위를 도입시켰다. 이로써 아데노바이러스 관련 RNA(VAI) 영역으로부터 250bp 절편이 결실되지만, VAI RNA 유전자 발현 또는 기능은 손상되지 않는다. pMT21을 EcoRI 및 XhoI로 분해시키고 벡터 pEMC2B1를 유도하는데 사용하였다.

EMCV 리더의 일부분은 pMT2-ECAT1[참조: S. K. Jung, et al., J. Virol 63 : 1651-1660 (1989)]을 EcoRI 및 PstI로 분해시켜 2752bp 단편을 수득함으로써 수득하였다. 상기 단편을 TaqI로 분해하여 508bp의 Eco RI-TaqI 단편을 수득하고, 이를 저융점 아가로즈 겔에서 전기영동하여 분리시켰다. 68bp의 어댑터 및 이의 상보 쇄를 다음 서열을 갖는 5'TaqI 돌출 말단 및 3'XhoI 돌출 말단으로 합성하였다:

5
CGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTT
T
TaqI
GAAAAACACGATTGC 3'(서열 32)
XhoI

상기 서열은 뉴클레오타이드 763번 내지 827번의 EMC 바이러스 리더 서열에 매치된다. 이는 또한 EMC 바이러스 리더내의 위치 10에 있는 ATG를 ATT로 변화시키며 이 다음에 XhoI 부위가 위치한다. pMT21 EcoRI-XhoI 단편, EMC 바이러스 EcoRI-TaqI 단편 및 68bp 올리고뉴클레오타이드 TaqI-XhoI 어댑터의 3방향 연결 (three way ligation)로 벡터 pEMC2β1를 수득하였다.

상기 벡터는 포유동물 세포에서 목적하는 cDNA의 고수준 발현을 지시하기에 적절한 관련성이 있게 SV40 복제 오리진과 인핸서, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 아데노바이러스 3부분 리더 서열 중 대다수의 cDNA 복사체, 소형 하이브리드 개재 서열, SV40 폴리아데닐화 시그날 및 아데노바이러스 VAI 유전자, DHFR 및 β-락타마제 마커 및 EMC 서열을 함유한다.

하나의 예로서, 서열 1에 제시된 본 발명의 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터 pED6[참조: Kaufman et al., Nucleic Acid Res 19:44885-4490 (1991)]내로 클로닝시킬 수 있다. COS 및 CHO DUKX B11 세포를 리포펙션(lipofection)(LF2000, 제조원: Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 본 발명의 아그레카나제 서열로 일시적으로

형질감염시켰다(+/- 개별적 pED6 플라스미드상의 PACE의 공형질감염). 2중 형질감염을 각 관심대상의 유전자에 대해 수행하였다: (a) 활성 검정용으로 조건화된 배지를 수거하기 위한 형질감염 및 (b) ^{35}S 메티오닌/시스테인 대사성 표지화를 위한 형질감염.

1일째에, 배지를 활성 검정을 위해 수거될 한 세트의 형질감염(a)을 위해 DME(COS) 또는 알파(CHO) 배지 + 1% 열-불활성화된 태아 송아지 혈청 +/-100㎍/ml 헤파린으로 교체하였다. 48시간(4일째) 후, 조건화된 배지를 활성 검정을 위해 수거하였다.

3일째에, 2중 세트의 형질감염(b)의 세포용 배지를 MEM(메티오닌 비함유/시 스테인 비함유) 배지 + 1% 열-불활성화된 태아 송아지 혈청 +100㎍/ml 헤파린 + 100pCi/ml ^{35}S-메티오닌/시스테인(Redivue ™ Pro mix, 제조원: Amersham, Piscataway, NJ)로 교체하였다. 37℃에서 6시간 동안 항온처리한 후, 조건화된 배지를 수거하고 환원 조건하에 SDS-PAGE 겔상에서 전개시켰다. 단백질을 자가방사선술로 가시화하였다.

다른 예로서, 서열 1에 제시된 본 발명의 아그레카나제 뉴클레오타이드 서열은 pED[참조: Kaufman et al., 1991 NAR 19: 4485-4490]의 유도체로서, 대다수의 아데노 주요 후기 프로모터가 tet 오퍼레이터의 6개의 반복부[참조: Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551]로 대체된 발현 벡터 pHTop내로 클로닝시킬 수 있다. 상기 벡터는 디하이드로폴레이트 리덕타제 유전자를 함유하며, 세포주 CHO/A2(하기 설명 참조)에 도입된 경우에 매우 효율적으로 작용하며, 고 발현체를 높은 메토트렉세이트 농도에서 생존하는 세포를 분리시킴으로써 선택할 수 있다.

마찬가지로, 서열 8에 제시되어 있으며 기술한 방법을 사용하여 발현시킨 재조합 아그레카나제 단백질을 pHTop 벡터내로 클로닝시킬 수 있다.

<u>안정한 CHO 세포주의 확립:</u> CHO/A2 세포주를, 전사 활성화인자(tTA), 융합 단백질을 Tet 억제인자와 포진 바이러스 VP16 전사 도메인[참조: Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551] 사이에 안정하게 통합시켜 CHO DUKX B11[참조: Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216- 4220]로부터 유도하였다. 세포외 ADAMTS-18을 발현하는 CHO 세포주는 pHTopADMTS8-스트렙타비딘 태그된 DNA를 CHO/A2 세포내로 형질감염(리포펙션)시키고 0.02, 0.05 및 0.01㎛ 메토트렉세이트 중에서 클론을 선택하여 확립시켰다.

<u>안정한 CHO 세포의 스크리닝</u> : 다수의 클론을, 스트렙타비딘 HRP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 스크리닝하였다. 최상의 클론은 이의 고 발현으로 결정하였고, 이는 0.02 ㎛ 메토트렉세이트 선별로부터 수득되고 회전병(roller bottle) 조건화된 배지 제조(4ℓ)용으로 규모 확대되도록 선택된 클론이었다. 세포주는 대규모 제조를 위해 보내졌다.

실시예 5: 발현된 아그레카나제의 생물학적 활성

발현된 아그레카나제-관련 단백질, 예를 들어, 상기 실시예 4에서 수득된 단백질의 생물학적 활성을 측정하기 위해, 단백질을 세포 배양물로부터 회수하고, 동시 생산되는 기타 단백질성 물질뿐만 아니라 기타 오염원으로부터 아그레카나제 단백질을 분리함으로써 제정한다. 정제는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 표준 기술을 이용하여 수행한다. 분리된 단백질은 다음 검정에 따라서 검정할 수 있다:

단백질이 아그레카나제 분해 부위에서 아그레칸을 분해할 수 있는 효소인지를 명확하게 측정하기 위한 검정:

1. <u>형광 펩타이드 검정</u> : 발현된 단백질을 아그레칸의 아그레카나제 분해 부위에 있는 아미노산을 포함하는 합성 펩타이드와 함께 항온처리한다. 합성 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단을 형광발색단으로 표지화시키고, 나머지 말단에는 소광제 (quencher)를 포함시킨다. 펩타이드의 분해는 형광발색단과 소광제를 분리시켜 형광을 유도한다. 상기 검정으로부터, 발현된 아그레카나제 단백질이 아그레카나제 부위에서 아그레칸을 분해시킬 수 있는지가 측정되며, 상대적 형광이 발현된 단백질의 상대적 활성의 측정인자이다.

2. <u>신에피토프 웨스턴:</u> 발현된 아그레카나제 단백질을 무손상 아그레칸과 함께 항온처리한다. 수득되는 샘플을 수차례 생화학적으로 조작(투석, 콘드로이티나제 처리, 동결건조 및 재구성)한 후, 샘플을 SDS PAGE 겔 상에 전개시킨다. 상기 겔을 아그레카나제 분해 후에만 노출되는 아그레칸상의 부위에 대해 특이적인 항체와 함께 항온처리한다. 겔을 니트로셀룰로즈지로 옮기고, 아그레카나제에 의해 생성된 아그레칸의 분해 산물과 일치하는 분자량을 갖는 산물의 표시하는 밴드 패턴을 후속적으로 생성시키는 2차 항체를 이용하여 현상하였다(웨스턴 검정으로 지칭됨), 상기 검정으로, 발현된 아그레카나제 단백질이 아그레카나제 분해 부위에서 천연 아그레칸을 분해시켰는지를 알아낼 수 있으며 또한 분해 산물의 분자량을 알 수 있다. 밴드의 상대 밀도는 상대적 아그레카나제 활성의 지표를 제공할 수 있다.

발현된 단백질이 아그레칸 내의 어떠한 위치에서라도 아그레칸을 분해시킬 수 있는지(아그레카나제 부위에 대해 특

이적이지 않은지)를 측정하기 위한 검정:

3. 아그레칸 ELISA: 발현된 단백질을 미리 플라스틱 웰에 부착시킨 무손상 아그레칸과 함께 항온처리한다. 상기 웰을 세척한 다음, 아그레칸을 검출하는 항체와 함께 항온처리한다. 웰을 2차 항체를 이용하여 현상하였다. 본래 양의 아그 레칸이 웰내에 잔류한다면, 항체 염색은 농후할 것이다. 반면에, 아그레칸이 발현된 아그레카나제 단백질의 아그레카나제 활성에 의해 분해되었다면, 아그레칸이 플레이트로부터 방출되어 항체에 의한 아그레칸 피복된 웰의 후속적 염색이 감소될 것이다. 상기 검정은 발현된 단백질이 (아그레카나제 부위뿐만 아니라 아그레칸 단백질 내의 어떠한 위치에서도) 아그레칸을 분해할 수 있는지를 말해주며 상대적 아그레칸 분해를 추가로 측정할 수 있다.

분리된 단백질의 단백질 분석은 은[참조: Oakley, et al., Anal Biochem. 105: 361 (1980)]으로 염색된 SDS-PAGE 아크릴아미드[참조: Laemmli, Nature 227: 680 (1970)] 및 면역블롯[참조: Towbin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 (1979)]과 같은 표준 기술을 이용하여 수행한다. 상기한 검정을 이용함으로써, 발현된 아그레카나제-관련 단백질이 이의 활성에 대해 평가되고 유용한 아그레카나제 관련 분자가 확인된다.

실시예 6: ADAMTS-18의 아그레카나제 활성

소의 관절연골을 분리된 ADAMTS-18와 함께, 37℃에서 100mM NaCl 및 5mM $CaCl_2$ 를 함유하는 pH 7.3의 50mM Tris 속에서 항온처리하였다. 분해 산물을 콘드로이티나제 ABC(제조원: Seikagaku America, Falmouth, MA; 1mU/㎍ 아그레칸), 케라티나제(제조원: Seikagaku, 1mU/㎍ 아그레칸) 및 케라티나제 II(제조원: Seikagaku; 0.02mU/㎍ 아그레칸)의 존재하에 37℃에서 2시간 동안 항온처리하여 탈 글리코실화시켰다. SDS-PAGE로 분리시킨 후, 분해 산물을 니트로셀룰로즈로 시키고, 아그레칸의 G1 및 G2 도메인 사이에 위치하는 아그레카나제-감수성 E^{373}-A^{374} 펩타이드 결합(도 10)의 분해로 생성되는 C-말단 신에피토프 서열-$NITEGE^{373}$ (서열 33)을 인식하는 신에피토프(모노클로날) 항체 AGG-C1을 이용하여 웨스턴 면역블롯팅으로 검출하였다.

실시예 7: 항체의 제조

신규 아그레카나제 분자에 대한 항체를 제조한다. 아그레카나제 활성을 억제할 수 있는 항체를 개발하기 위해, 마우스의 그룹을 처음 2회의 면역화 동안에는 프로인트(Freund) 완전 보조제와 혼합된 신규 아그레카나제 단백질을 이용하고, 이후에는 불완전 보조제와 혼합된 시규 아그레카나제 단백질을 이용하여 매 2주마다 면역화시킨다. 면역화 기간 전반에 걸쳐서, 혈액 샘플을 추출하고 순환 항체의 존재에 대해 시험한다. 9주째에, 순환 항체를 갖는 동물을 선별하여 3일 동안 연속적으로 면역화시키고 희생시킨다. 비장을 채취하여 세포로 균질화시킨다. 비장 세포를 50% PEG 1500을 이용하여 확립된 방법[참조: Oi amp; Herzenberg, Selected Methods in Cellular Immunology, W. J. Freeman Co., San Francisco, CA, at 351 (1980)]에 의해 골수종 융합 파트너(세포주 P3-x63-Ag8.653-])에 융합시킨다. 융합된 세포를 96-웰 미세역가 플레이트에 2×10^5 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅한다. 24시간 후, 세포를 임의의 융합되지 않은 골수종 세포와 비생산적으로 융합된 골수 종 세포를 효율적으로 치사시키는 HAT 선별[참조: Littlefield, Science, 145: 709 (1964)]에 도입시킨다.

항-아그레카나제 항체를 분비하는, 성공적으로 융합된 하이브리도마 세포를 고체 상 및 용액 상 ELISA로 확인한다. 신규 아그레카나제 단백질을 상기한 바와 같이 CHO 세포로부터 제조하고 폴리스티렌(고체 상 검정용) 또는 바이오티닐화된 플레이트(용액계 검정용)에 피복시킨다. 아그레칸을 폴리스티렌 플레이트에 피복시키고 바이오틴 아그레카나제 활성이 하이브리도마 상청액을 첨가함으로써 억제되는 경우에는 중화 검정을 또한 사용한다. 결과는 아그레카나제 항체를 발현하는 하이브리도마를 확인시킨다. 이러한 양성 클론을 배양하고 추가의 연구를 위해 확장(expanding)시킨다. 이러한 배양물은 확장된 경우에 안정한 상태를 유지하며, 세포주를 제한 희석(limiting dilution) 기술로 클로닝한 다음, 냉동보존한다.

상기 세포 배양물로부터, 아그레카나제 단백질을 특이적으로 인식하는 항체의 패널을 개발한다. 마우스 면역글로불린 이소형측정 키트(Zymed ™ Laboratories, Inc.,San Francisco, CA)를 이용하여 항체의 이소형(isotype)을 결정한다.

실시예 8: 아그레카나제의 수준을 측정하는 방법

기술한 바와 같은 본 발명에 따라 제조된 항-아그레카나제 항체를 사용하여 샘플 중의 아그레카나제의 수준을 검출할 수 있다. 항체는, 예를 들어, 항체가 결합하는, 샘플 중의 아그레카나제의 존재 또는 부재를 동정하거나 이의 양을 정량화 하기 위해 ELISA에서 사용할 수 있다. 항체는 형광 태그로 표지화할 수 있다. 일반적으로, 샘플 중의 아그레카나제의 수준은 기술한 임의의 검정을 사용하여 측정할 수 있다.

실시예 9: 환자를 치료하는 방법

기재한 방법에 따라서 개발한 항체는 아그레칸의 손실 또는 아그레카나제 활성의 증가와 관련된 질병 또는 장애를 앓는 환자에게 투여할 수 있다. 환자는 본 발명의 조성물을 1회 투여로서 또는 1일 1회와 같은 간격으로 질병 또는 장애의 증상 및 징후가 개선될 때까지 섭취하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 환자에게 투여한 후, 아그레칸 손실은 감소 또는 중단되고 관절 연골의 분해는 감소 또는 중단된다. 골관절염의 증상은 감소하거나 제거될 것으로 예상된다. 이는 본 발명의 조성물이 아그레칸의 손실 또는 아그레카나제의 수준 및/또는 활성의 증가와 관련된 질병 또는 장애의 치료에 유용할 수 있음을 보여준다. 항체는 또한 골관절염에 대해 감수성일 수 있는 환자, 예를 들어, 당해 질병의 가족력 또는 마커를 갖고 있으나 증상이 없는 환자에게 사용할 수 있다. 다음 결과가 환자에 치료에 대해 예상될 수 있다.

환자의 상태	투여 경로	투여량	횟수	예상되는 결과
골관절염	피하	500μg/kg	매일	증상의 감소
골관절염	피하	1mg/kg	매주	증상의 감소
골관절염	근육내	500μg/kg	매일	증상의 감소
골관절염	근육내	1mg/kg	매주	증상의 감소
골관절염	정맥내	500μg/kg	매일	증상의 감소
골관절염	정맥내	1mg/kg	매주	증상의 감소
골관절염의 가족력	피하	500μg/kg	매일	상태의 예방
골관절염의 가족력	근육내	500μg/kg	매일	
골관절염의 가족력	정맥내	500μg/kg	매일	

상기 설명은 본원에서 본 발명의 바람한 양태를 상술한다. 이의 실시에 있어 다수의 변형 및 변화가 상기 설명의 고려시에 상기 설명의 당해 분야의 숙련가에게 발생할 것으로 예상된다. 이러한 변형 및 변화는 본원에 첨부되는 청구의 범위내에 포함되는 것으로 사료된다. 본 출원에서 언급되는 모든 문헌은 이의 전문이 본원에서 참조로 인용된다. 추가로, 데이타베이스에서 인용된 모든 서열 및 기술되는 모든 참조문헌은 이의 전문이 본원에서 참조로 인용된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 뉴클레오타이드 1번 내지 3663번의 서열 1의 서열;

(b) 서열 1의 단편;

(c) 서열 1의 변이체;

(d) 엄격한 조건(stringent condition)하에 서열 1과 하이브리드화하는 서열 및

(e) (a) 내지 (d)의 천연 사람 대립유전자 서열 및 등가 변성 코돈 서열로부터 선택되는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자.

청구항 2.

발현 조절 서열과 작동적으로 결합된 제1항에 따른 DNA 분자를 포함하는 벡터.

청구항 3.

제1항에 따른 DNA 서열로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 4.

제2항에 따른 DNA 서열로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 5.

(a) 제1항에 따른 DNA 분자로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및

(b) 당해 DNA 분자에 의해 암호화되는 사람 아그레카나제 단백질을 배양 배지로부터 회수 및 정제하는 단계를 포함하는, 분리된 사람 아그레카나제 단백질의 제조방법.

청구항 6.
제5항에 있어서, 숙주 세포가 곤충 세포인 방법.

청구항 7.
(a) 아미노산 1번 내지 1221번의 서열 2의 아미노산 서열;

(b) 서열 2의 단편; 및

(c) (a) 및 (b)의 서열의 첨가, 치환 및 결실 돌연변이체로 이루어진 아그레카나제 단백질의 변이체로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 아그레카나제 단백질.

청구항 8.
(a) 제1항에 따른 DNA 분자로 형질전환된 세포를 배양하는 단계 및

(b) 서열 2로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 배양 배지로부터 회수 및 정제하는 단계에 의해 제조되는 분리된 아그레카나제 단백질.

청구항 9.
제7항에 따른 분리된 아그레카나제 단백질에 결합하는 항체.

청구항 10.
제9항에 있어서, 아그레카나제 활성을 억제하는 항체.

청구항 11.
(a) 서열 2 또는 이의 단편으로부터 선택된 아그레카나제 단백질을 제공하는 단계,

(b) 당해 아그레카나제 단백질을 잠재적 억제제와 배합하는 단계 및

(c) 잠재적 억제제가 아그레카나제 활성을 억제하는지를 평가하는 단계를 포함하는, 아그레카나제의 억제제를 확인하는 방법.

청구항 12.
제11항에 있어서, 아그레카나제 단백질을 잠재적 억제제와 배합하기 전에 3차원 구조 분석으로 평가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13.
제11항에 있어서, 아그레카나제 단백질을 잠재적 억제제와 배합하기 전에 컴퓨터 보조된 약물 디자인으로 평가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14.
제9항에 따른 항체와 약제학적 담체를 포함하는, 아그레카나제의 단백질분해 활성을 억제하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 15.
포유동물에게 아그레카나제 활성을 억제하기에 유효한 양의 제14항에 따른 조성물을 투여함을 포함하여, 포유동물에서 아그레카나제 활성을 억제하는 방법.

청구항 16.
제15항에 있어서, 조성물이 정맥내, 피하 또는 근육내 투여되는 방법.

청구항 17.
제15항에 있어서, 조성물이 약 500㎍/kg 내지 약 1mg/kg의 투여량으로 투여되는 방법.

도면

도면1A

전체길이 EST18 뉴클레오타이드 서열: 서열 1

```
ATGGAGTGCGCCCTCCTGCTCGCGTGTGCCTTCCCGGCTGCGGGTTCGGGCCCGCCGAGGGGCCTGGCGGGACTGGGGCG
CGTGGCCAAGGCGCTCCAGCTGTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCCGCGGCCTTAGCCAGTGACAGCAGCAGCGGCG
CCAGCGGATTAAATGATGATTACGTCTTTGTCACGCCAGTAGAAGTAGACTCAGCCGGGTCATATATTTCACACGACATT
TTGCACAACGGCAGGAAAAAGCGATCGGCGCAGAATGCCAGAAGCTCCCTGCACTACCGATTTTCAGCATTTGGACAGGA
ACTGCACTTAGAACTTAAGCCCTCGGCGATTTTGAGCAGTCACTTTATTGTCCAGGTACTTGGAAAAGATGGTGCTTCAG
AGACTCAGAAACCCGAGGTGCAGCAATGCTTCTATCAGGGATTTATCAGAAATGACAGCTCCTCCTCTGTCGCTGTGTCT
ACGTGTGCTGGCTTGTCAGGTTTAATAAGGACACGAAAAAATGAATTCCTCATCTCGCCATTACCTCAGCTTCTGGCCCA
GGAACACAACCACAGCTCCCCTGCGGGTCACCATCCTCACGTACTGTACAAAAGGACAGCAGAGGAGAAGATCCAGCGGT
ACCGTGGCTACCCCGGCTCTGGCCGGAATTATCCTGGTTACTCCCCAAGTCACATTCCCCATGCATCTCAGAGTCGAGAG
ACAGAGTATCACCATCGAAGGTTGCAAAAGCAGCATTTTTGTGGACGACGCAAGAAATATGCTCCCAAGCCTCCCACAGA
GGACACCTATCTAAGGTTTGATGAATATGGGAGCTCTGGGCGACCCAGAAGATCAGCTGGAAAATCACAAAAGGCCTCA
ATGTGGAAACCCTCGTGGTGGCAGACAAGAAAATGGTGGAAAAGCATGGCAAGGGAAATGTCACCACATACATTCTCACA
GTAATGAACATGGTTTCTGGCCTATTTAAAGATGGGACTATTGGAAGTGACATAAACGTGGTTGTGGTGAGCCTAATTCT
TCTGGAACAAGAACCTGGAGGATTATTGATCAACCATCATGCAGACCAGTCTCTGAATAGTTTTTGTCAATGGCAGTCTG
CCCTCATTGGAAAGAATGGCAAGAGACATGATCATGCCATCTTACTAACAGGATTTGATATTTGTTCTTGGAAGAATGAA
CCATGTGACACTCTAGGGTTTGCCCCCATCAGTGGAATGTGCTCTAAGTACCGAAGTTGTACCATCAATGAGGACACAGG
ACTTGGCCTTGCCTTCACCATCGCTCATGAGTCAGGGCACAACTTTGGTATGATTCACGACGGAGAAGGGAATCCCTGCA
GAAAGGCTGAAGGCAATATCATGTCTCCCACACTGACCGGAAACAATGGAGTGTTTTCATGGTCTTCTTGCAGCCGCCAG
TATCTCAAGAAATTCCTCAGCACACCTCAGGCGGGGTGTCTAGTGGATGAGCCCAAGCAAGCAGGACAGTATAAATATCC
GGACAAACTACCAGGACAGATTTATGATGCTGACACACAGTGTAAATGGCAATTTGGAGCAAAAGCCAAGTTATGCAGCC
TTGGTTTTGTGAAGGATATTTGCAAATCACTTTGGTGCCACCGAGTAGGCCACAGGTGTGAGACCAAGTTTATGCCCGCA
GCAGAAGGGACCGTTTGTGGCTTGAGTATGTGGTGTCGGCAAGGCCAGTGCGTAAAGTTTGGGGAGCTCGGGCCCCGGCC
CATCCACGGCCAGTGGTCCGCCTGGTCGAAGTGGTCAGAATGTTCCCGGACATGTGGTGGAGGAGTCAAGTTCCAGGAGA
GACACTGCAATAACCCCAAGCCTCAGTATGGTGGCATATTCTGTCCAGGTTCTAGCCGTATTTATCAGCTGTGCAATATT
```

도면1B

AACCCTTGCAATGAAAATAGCTTGGATTTTCGGGCCCAACAGTGTGCAGAATATAACAGCAAACCTTTCCGTGGATGGTT
CTACCAGTGGAAACCCTATACAAAAGTGGAAGAGGAAGATCGATGCAAACTGTACTGCAAGGCTGAGAACTTTGAATTTT
TTTTTGCAATGTCCGGCAAAGTGAAAGATGGAACTCCCTGCTCCCCAAACAGAAATGATGTTTGTATTGACGGGGTTTGT
GAACTAGTGGGATGTGATCATGAACTAGGCTCTAAAGCAGTTTCAGATGCTTGTGGCGTTTGCAAAGGTGATAATTCAAC
TTGCAAGTTTTATAAAGGCCTGTACCTCAACCAGCATAAAGCAAATGAATATTATCCGGTGGTCATCATTCCAGCTGGCG
CCCGAAGCATCGAAATCCAGGAGCTGCAGGTTTCCTCCAGTTACCTCGCAGTTCGAAGCCTCAGTCAAAAGTATTACCTC
ACCGGGGGCTGGAGCATCGACTGGCCTGGGGAGTTCCCCTTCGCTGGGACCACGTTTGAATACCAGCGCTCTTTCAACCG
CCCGGAACGTCTGTACGCGCCAGGGCCCACAAATGAGACGCTGGTCTTTGAAATTCTGATGCAAGGCAAAAATCCAGGGA
TAGCTTGGAAGTATGCACTTCCCAAGGTCATGAATGGAACTCCACCAGCCACAAAAAGACCTGCCTATACCTGGAGTATC
GTGCAGTCAGAGTGCTCCGTCTCCTGTGGTGGAGGTTACATAAATGTAAAGGCCATTTGCTTGCGAGATCAAAATACTCA
AGTCAATTCCTCATTCTGCAGTGCAAAAACCAAGCCAGTAACTGAGCCCAAAATCTGCAACGCTTTCTCCTGCCCGGCTT
ACTGGATGCCAGGTGAATGGAGTACATGTAGCAAGGCCTGTGCTGGAGGCCAGCAGAGCCGAAAGATCCAGTGTGTGCAA
AAGAAGCCCTTCCAAAAGGAGGAAGCAGTGTTGCATTCTCTCTGTCCAGTGAGCACACCCACTCAGGTCCAAGCCTGCAA
CAGCCATGCCTGTCCTCCACAATGGAGCCTTGGACCCTGGTCTCAGTGTTCCAAGACCTGTGGACGAGGGGTGAGGAAGC
GTGAACTCCTCTGCAAGGGCTCTGCCGCAGAAACCCTCCCCGAGAGCCAGTGTACCAGTCTCCCCAGACCTGAGCTGCAG
GAGGGCTGTGTGCTTGGACGATGCCCCAAGAACAGCCGGCTACAGTGGGTCGCTTCTTCGTGGAGCGAGTGTTCTGCAAC
CTGTGGTTTGGGTGTGAGGAAGAGGGAGATGAAGTGCAGCGAGAAGGGCTTCCAGGGAAAGCTGATAACTTTCCCAGAGC
GAAGATGCCGTAATATTAAGAAACCAAATCTGGACTTGGAAGAGACCTGCAACCGACGGGCTTGCCCAGCCCATCCAGTG
TACAACATGGTAGCTGGATGGTATTCATTGCCGTGGCAGCAGTGCACAGTCACCTGTGGGGGAGGGGTCCAGACCCGGTC
AGTCCACTGTGTTCAGCAAGGCCGGCCTTCCTCAAGTTGTCTGCTCCATCAGAAACCTCCGGTGCTACGAGCCTGTAATA
CAAACTTCTGTCCAGCTCCTGAAAAGAGAGAGGATCCATCCTGCGTAGATTTCTTCAACTGGTGTCACCTAGTTCCTCAG
CATGGTGTCTGCAACCACAAGTTTTACGGAAAACAATGCTGCAAGTCATGCACAAGGAAGATC

도면2

전체길이 EST18 뉴클레오타이드 서열: 서열 2

```
MECALLLACAFPAAGSGPPRGLAGLGRVAKALQLCCLCCASVAAALASDSSSGASGLNDDYVFVTPVEVDSAGSYISHDI
LHNGRKKRSAQNARSSLHYRFSAFGQELHLELKPSAILSSHFIVQVLGKDGASETQKPEVQQCFYQGFIRNDSSSSVAVS
TCAGLSGLIRTRKNEFLISPLPQLLAQEHNHSSPAGHHPHVLYKRTAEEKIQRYRGYPGSGRNYPGYSPSHIPHASQSRE
TEYHHRRLQKQHFCGRRKKYAPKPPTEDTYLRFDEYGSSGRPRRSAGKSQKGLNVETLVVADKKMVEKHGKGNVTTYILT
VMNMVSGLFKDGTIGSDINVVVVSLILLEQEPGGLLINHHADQSLNSFCQWQSALIGKNGKRHDHAILLTGFDICSWKNE
PCDTLGFAPISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFGMIHDGEGNPCRKAEGNIMSPTLTGNNGVFSWSSCSRQ
YLKKFLSTPQAGCLVDEPKQAGQYKYPDKLPGQIYDADTQCKWQFGAKAKLCSLGFVKDICKSLWCHRVGHRCETKFMPA
AEGTVCGLSMWCRQGQCVKFGELGPRPIHGQWSAWSKWSECSRTCGGGVKFQERHCNNPKPQYGGIFCPGSSRIYQLCNI
NPCNENSLDFRAQQCAEYNSKPFRGWFYQWKPYTKVEEEDRCKLYCKAENFEFFFAMSGKVKDGTPCSPNRNDVCIDGVC
ELVGCDHELGSKAVSDACGVCKGDNSTCKFYKGLYLNQHKANEYYPVVIIPAGARSIEIQELQVSSSYLAVRSLSQKYYL
TGGWSIDWPGEFPFAGTTFEYQRSFNRPERLYAPGPTNETLVFEILMQGKNPGIAWKYALPKVMNGTPPATKRPAYTWSI
VQSECSVSCGGGYINVKAICLRDQNTQVNSSFCSAKTKPVTEPKICNAFSCPAYWMPGEWSTCSKACAGGQQSRKIQCVQ
KKPFQKEEAVLHSLCPVSTPTQVQACNSHACPPQWSLGPWSQCSKTCGRGVRKRELLCKGSAAETLPESQCTSLPRPELQ
EGCVLGRCPKNSRLQWVASSWSECSATCGLGVRKREMKCSEKGFQGKLITFPERRCRNIKKPNLDLEETCNRRACPAHPV
YNMVAGWYSLPWQQCTVTCGGGVQTRSVHCVQQGRPSSSCLLHQKPPVLRACNTNFCPAPEKREDPSCVDFFNWCHLVPQ
HGVCNHKFYGKQCCKSCTRKI
```

도면3A

```
ATGTCACCTTTTCTCTTGCAGGCGCTCCAGCTGTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCCGCGGCCTTAGCCAGTGACAG
CAGCAGCGGCGCCAGCGGATTAAATGATGATTACGTCTTTGTCACGCCAGTAGAAGTAGACTCAGCCGGGTCATATATTT
CACACGACATTTTGCACAACGGCAGGAAAAAGCGATCGGCGCAGAATGCCAGAAGCTCCCTGCACTACCGATTTTCAGCA
TTTGGACAGGAACTGCACTTAGAACTTAAGCCCTCGGCGATTTTGAGCAGTCACTTTATTGTCCAGGTACTTGGAAAAGA
TGGTGCTTCAGAGACTCAGAAACCCGAGGTGCAGCAATGCTTCTATCAGGGATTTATCAGAAATGACAGCTCCTCCTCTG
TCGCTGTGTCTACGTGTGCTGGCTTGTCAGGTTTAATAAGGACACGAAAAAATGAATTCCTCATCTCGCCATTACCTCAG
CTTCTGGCCCAGGAACACAACCACAGCTCCCCTGCGGGTCACCATCCTCACGTACTGTACAAAAGGACAGCAGAGGAGAA
GATCCAGCGGTACCGTGGCTACCCCGGCTCTGGCCGGAATTATCCTGGTTACTCCCCAAGTCACATTCCCCATGCATCTC
AGAGTCGAGAGACAGAGTATCACCATCGAAGGTTGCAAAAGCAGCATTTTTGTGGACGACGCAAGAAATATGCTCCCAAG
CCTCCCACAGAGGACACCTATCTAAGGTTTGATGAATATGGGAGCTCTGGGCGACCCAGAAGATCAGCTGGAAAATCACA
AAAGGGCCTCAATGTGGAAACCCTCGTGGTGGCAGACAAGAAAATGGTGGAAAAGCATGGCAAGGGAAATGTCACCACAT
ACATTCTCACAGTAATGAACATGGTTTCTGGCCTATTTAAAGATGGGACTATTGGAAGTGACATAAACGTGGTTGTGGTG
AGCCTAATTCTTCTGGAACAAGAACCTGGAGGATTATTGATCAACCATCATGCAGACCAGTCTCTGAATAGTTTTTGTCA
ATGGCAGTCTGCCCTCATTGGAAAGAATGGCAAGAGACATGATCATGCCATCTTACTAACAGGATTTGATATTTGTTCTT
GGAAGAATGAACCATGTGACACTCTAGGGTTTGCCCCCATCAGTGGAATGTGCTCTAAGTACCGAAGTTGTACCATCAAT
GAGGACACAGGACTTGGCCTTGCCTTCACCATCGCTCATGAGTCAGGGCACAACTTTGGTATGATTCACGACGGAGAAGG
GAATCCCTGCAGAAAGGCTGAAGGCAATATCATGTCTCCCACACTGACCGGAAACAATGGAGTGTTTTCATGGTCTTCTT
GCAGCCGCCAGTATCTCAAGAAATTCCTCAGCACACCTCAGGCGGGGTGTCTAGTGGATGAGCCCAAGCAAGCAGGACAG
TATAAATATCCGGACAAACTACCAGGACAGATTTATGATGCTGACACACAGTGTAAATGGCAATTTGGAGCAAAAGCCAA
GTTATGCAGCCTTGGTTTTGTGAAGGATATTTGCAAATCACTTTGGTGCCACCGAGTAGGCCACAGGTGTGAGACCAAGT
TTATGCCCGCAGCAGAAGGGACCGTTTGTGGCTTGAGTATGTGGTGTCGGCAAGGCCAGTGCGTAAAGTTTGGGGAGCTC
GGGCCCCGGCCCATCCACGGCCAGTGGTCCGCCTGGTCGAAGTGGTCAGAATGTTCCCGGACATGTGGTGGAGGAGTCAA
GTTCCAGGAGAGACACTGCAATAACCCCAAGCCTCAGTATGGTGGCATATTCTGTCCAGGTTCTAGCCGTATTTATCAGC
TGTGCAATATTAACCCTTGCAATGAAAATAGCTTGGATTTTCGGGCCCAACAGTGTGCAGAATATAACAGCAAACCTTTC
CGTGGATGGTTCTACCAGTGGAAACCCTATACAAAAGTGGAAGAGGAAGATCGATGCAAACTGTACTGCAAGGCTGAGAA
CTTTGAATTTTTTTTTGCAATGTCCGGCAAAGTGAAAGATGGAACTCCCTGCTCCCCAAACAGAAATGATGTTTGTATTG
```

도면3B

ACGGGGTTTGTGAACTAGTGGGATGTGATCATGAACTAGGCTCTAAAGCAGTTTCAGATGCTTGTGGCGTTTGCAAAGGT
GATAATTCAACTTGCAAGTTTTATAAAGGCCTGTACCTCAACCAGCATAAAGCAAATGAATATTATCCGGTGGTCATCAT
TCCAGCTGGCGCCCGAAGCATCGAAATCCAGGAGCTGCAGGTTTCCTCCAGTTACCTCGCAGTTCGAAGCCTCAGTCAAA
AGTATTACCTCACCGGGGGCTGGAGCATCGACTGGCCTGGGGAGTTCCCCTTCGCTGGGACCACGTTTGAATACCAGCGC
TCTTTCAACCGCCCGGAACGTCTGTACGCGCCAGGGCCCACAAATGAGACGCTGGTCTTTGAAATTCTGATGCAAGGCAA
AAATCCAGGGATAGCTTGGAAGTATGCACTTCCCAAGGTCATGAATGGAACTCCACCAGCCACAAAAAGACCTGCCTATA
CCTGGAGTATCGTGCAGTCAGAGTGCTCCGTCTCCTGTGGTGGAGGTTACATAAATGTAAAGGCCATTTGCTTGCGAGAT
CAAAATACTCAAGTCAATTCCTCATTCTGCAGTGCAAAAACCAAGCCAGTAACTGAGCCCAAAATCTGCAACGCTTTCTC
CTGCCCGGCTTACTGGATGCCAGGTGAATGGAGTACATGTAGCAAGGCCTGTGCTGGAGGCCAGCAGAGCCGAAAGATCC
AGTGTGTGCAAAAGAAGCCCTTCCAAAAGGAGGAAGCAGTGTTGCATTCTCTCTGTCCAGTGAGCACACCCACTCAGGTC
CAAGCCTGCAACAGCCATGCCTGTCCTCCACAATGGAGCCTTGGACCCTGGTCTCAGTGTTCCAAGACCTGTGGACGAGG
GGTGAGGAAGCGTGAACTCCTCTGCAAGGGCTCTGCCGCAGAAACCCTCCCCGAGAGCCAGTGTACCAGTCTCCCCAGAC
CTGAGCTGCAGGAGGGCTGTGTGCTTGGACGATGCCCCAAGAACAGCCGGCTACAGTGGGTCGCTTCTTCGTGGAGCGAG
TGTTCTGCAACCTGTGGTTTGGGTGTGAGGAAGAGGGAGATGAAGTGCAGCGAGAAGGGCTTCCAGGGAAAGCTGATAAC
TTTCCCAGAGCGAAGATGC

도면4

```
MSPFLLQALQLCCLCCASVAAALASDSSSGASGLNDDYVFVTPVEVDSAGSYISHDILHNGRKKRSAQNARSSLHYRFSA
FGQELHLELKPSAILSSHFIVQVLGKDGASETQKPEVQQCFYQGFIRNDSSSSVAVSTCAGLSGLIRTRKNEFLISPLPQ
LLAQEHNHSSPAGHHPHVLYKRTAEEKIQRYRGYPGSGRNYPGYSPSHIPHASQSRETEYHHRRLQKQHFCGRRKKYAPK
PPTEDTYLRFDEYGSSGRPRRSAGKSQKGLNVETLVVADKKMVEKHGKGNVTTYILTVMNMVSGLFKDGTIGSDINVVVV
SLILLEQEPGGLLINHHADQSLNSFCQWQSALIGKNGKRHDHAILLTGFDICSWKNEPCDTLGFAPISGMCSKYRSCTIN
EDTGLGLAFTIAHESGHNFGMIHDGEGNPCRKAEGNIMSPTLTGNNGVFSWSSCSRQYLKKFLSTPQAGCLVDEPKQAGQ
YKYPDKLPGQIYDADTQCKWQFGAKAKLCSLGFVKDICKSLWCHRVGHRCETKFMPAAEGTVCGLSMWCRQGQCVKFGL
GPRPIHGQWSAWSKWSECSRTCGGGVKFQERHCNNPKPQYGGIFCPGSSRIYQLCNINPCNENSLDFRAQQCAEYNSKPF
RGWFYQWKPYTKVEEEDRCKLYCKAENFEFFFAMSGKVKDGTPCSPNRNDVCIDGVCELVGCDHELGSKAVSDACGVCG
DNSTCKFYKGLYLNQHKANEYYPVVIIPAGARSIEIQELQVSSSYLAVRSLSQKYYLTGGWSIDWPGEFPFAGTTFEYQR
SFNRPERLYAPGPTNETLVFEILMQGKNPGIAWKYALPKVMNGTPPATKRPAYTWSIVQSECSVSCGGGYINVKAICLRD
QNTQVNSSFCSAKTKPVTEPKICNAFSCPAYWMPGEWSTCSKACAGGQQSRKIQCVQKKPFQKEEAVLHSLCPVSTPTQV
QACNSHACPPQWSLGPWSQCSKTCGRGVRKRELLCKGSAAETLPESQCTSLPRPELQEGCVLGRCPKNSRLQWVASSWSE
CSATCGLGVRKREMKCSEKGFQGKLITFPERRC
```

도면5A

```
ATGTCACCTTTTCTCTTGCAGGCGCTCCAGCTGTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCCGCGGCCTTAGCCAGTGACAG
CAGCAGCGGCGCCAGCGGATTAAATGATGGTTCGTATTTGCCCCCCATCCCCAAGAAGGGCCTTTCGCAGCACTTTGACC
CTTCCTTCCCCCAAAGAGAGAAAAGATGGAAAAGCGCACCCCCTAACCTGGCAGATTACGTCTTTGTCACGCCAGTAGAA
GTAGACTCAGCCGGGTCATATATTTCACACGACATTTTGCACAACGGCAGGAAAAAGCGATCGGCGCAGAATGCCAGAAG
CTCCCTGCACTACCGATTTTCAGCATTTGGACAGGAACTGCACTTAGAACTTAAGCCCTCGGCGATTTTGAGCAGTCACT
TTATTGTCCAGGTACTTGGAAAAGATGGTGCTTCAGAGACTCAGAAACCCGAGGTGCAGCAATGCTTCTATCAGGGATTT
ATCAGAAATGACAGCTCCTCCTCTGTCGCTGTGTCTACGTGTGCTGGCTTGATGATCCCCAAGGAAATTAACTTGATGGA
TGCCATTCGCTTTGTAATGTCCCGGGAGACCAGGCATTCTATAAATCTAACAAGCTTCATGCGTCTACATGGCTTTGAAA
TGGGAAAACTGTATTTCAATGCGAAATTGCATTCAGCAGCACTGTTTAATAAAGGAAAGAAAAGCTTCACCTATGGGGGA
CTCAGAGTCATTGTCCTCAAGGTGTCTGAACAGGACCTTCAGTGGAAACGAGACTGCCTGAACCTCTCTGGGAGAGTTGT
TTTTGCTTTGTGGAATGCATCACACCATCTCATGGCTTTACATATGAATTCCTCATCTCGCCATTACCTCAGCTTCTGGC
CCAGGAACACAACTACAGCTCCCCTGCGGGTCACCATCCTCACGTACTGTACAAAAGGACAGCAGAGGAGAAGATCCAGC
GGTACCGTGGCTACCCCGGCTCTGGCCGGAATTATCCTGGTTACTCCCCAAGTCACATTCCCCATGCATCTCAGAGTCGA
GAGACAGAGTATCACCATCGAAGGTTGCAAAAGCAGCATTTTTGTGGACGACGCAAGAAATGTATTTTCTCTCTCAACTG
TCTTATCCAGATATTCTCTAATATCCCTTCCAAATGCTCTTCTGTTCATCGTAGATGCTCCCAAGCCTCCCACAGAGGAC
ACCTATCTAAGGTTTGATGAATATGGGAGCTCTGGGCGACCCAGAAGATCAGCTGGAAAATCACAAAAGGGCCTCAATGT
GGAAACCCTCGTGGTGGCAGACAAGAAAATGGTGGAAAAGCATGGCAAGGGAAATGTCACCACATACATTCTCACAGTAA
TGAACATGGTTTCTGGCCTATTTAAAGATGGGACTATTGGAAGTGACATAAACGTGGTTGTGGTGAGCCTAATTCTTCTG
GAACAAGAACCTGGAGGATTATTGATCAACCATCATGCAGACCAGTCTCTGAATAGTTTTTGTCAATGGCAGTCTGCCCT
CATTGGAAAGAATGGCAAGAGACATGATCATGCCATCTTACTAACAGGATTTGATATTTGTTCTTGGAAGAATGAACCAT
GTGACACTCTAGGGTTTGCCCCCATCAGTGGAATGTGCTCTAAGTACCGAAGTTGTACCATCAATGAGGACACAGGACTT
GGCCTTGCCTTCACCATCGCTCATGAGTCAGGGCACAACTTTGGTATGATTCACGACGGAGAAGGGAATCCCTGCAGAAA
GGCTGAAGGCAATATCATGTCTCCCACACTGACCGGAAACAATGGAGTGTTTTCATGGTCTTCCTGCAGCCGCCAGTATC
TCAAGAAATTCCTCAGCACACCTCAGGCGGGGTGTCTAGTGGATGAGCCCAAGCAAGCAGGACAGTATAAATATCCGGAC
AAACTACCAGGACAGATTTATGATGCTGACACACAGTGTAAATGGCAATTTGGAGCAAAAGCCAAGTTATGCAGCCTTGG
TTTTGTGAAGTGGTGTCGGCAAGGCCAGTGCGTAAAGTTTGGGGAGCTCGGGCCCCGGCCCATCCACGGCCAGTGGTCCG
```

도면5B

CCTGGTCGAAGTGGTCAGAATGTTCCCGGACATGTGGTGGAGGAGTCAAGTTCCAGGAGAGACACTGCAATAACCCCAAT
AACAATCAACCAGAGTTTTACTGTTTGCATATAAAGTCCATGTGCACCGAGGGAAGGTATGGTGGGCAGAAACCAAAACA
CAGCAGAGGAGTCATTCTCTACGGGACTGTGATGATCCAGCCTCAGTATGGTGGCTTATTCTGTCCAGGTTCTAGCCGTA
TTTATCAGCTGTGCAATATTAACCCTTGCAATGAAAATAGCTTGGATTTTCGGGCTCAACAGTGTGCAGAATATAACAGC
AAACCTTTCCGTGGATGGTTCTACCAGTGGAAACCCTATACAAAAGTGGAAGAGGAAGATCGATGCAAACTGTACTGCAA
GGCTGAGAACTTTGAATTTTTTTTTGCAATGTCCGGCAAAGTGAAAGATGGAACTCCCTGCTCCCCAAACAAAAATGATG
TTTGTATTGACGGGGTTTGTGAACTAGTGGGATGTGATCATGAACTAGGCTCTAAAGCAGTTTCAGATGCTTGTGGCGTT
TGCAAAGGTGATAATTCAACTTGCAAGTTTTATAAAGGCCTGTACCTCAACCAGCATAAAGCAAATGAATATTATCCGGT
GGTCCTCATTCCAGCTGGCGCCCGAAGCATCGAAATCCAGGAGCTGCAGGTTTCCTCCAGTTACCTCGCAGTTCGAAGCC
TCAGTCAAAAGTATTACCTCACCGGGGGCTGGAGCATCGACTGGCCTGGGGAGTTCCCCTTCGCTGGGACCACGTTTGAA
TACCAGCGCTCTTTCAACCGCCCGGAACGTCTGTACGCGCCAGGGCCCACAAATGAGACGCTGGTCTTTGAAGTAAGCCC
CTTCTGTGTATTCAGTTCTCAGTGCTTCTTGCTACATTTATATCGTATGGATATCCCCTCAGGGGTAAGGTCAGCAAAGG
TTCTCTCACTAGAGGAATGGATTAAATCTGAGACAACCCTTGCAAGGAAGGAACAACAGCAACCATCTACTGGCTGGATG
CCAGGTGAATGGAGTACATGCAGCAAGTCCTGTGCTGGAGGCCAGCAGAGCCGAAAGATCCAGTGTGTGCAAAAGAAGCC
CTTCCAAAAGGAGGAAGCAGTGTTGCATTCTCTCTGTCCAGTAAGCACACCCACTCAGGTCCAAGCCTGCAACAGCCATG
CCTGCCCTCCACAATGGAGCCTTGGACCCTGGTCTCAGTGTTCCAAGACCTGTGGACGAGGGGTGAGGAAGCGTGAACTC
CTCTGCAAGGGCTCTGCCGCAGAAACCCTCCCCGAGAGCCAGTGTACCAGTCTCCCCAGACCTGAGCTGCAGGAGGGCTG
TGTGCTTGGACGATGCCCCAAGAACAGCCGGCTACAGTGGGTCGCTTCTTCGTGGAGCGAGTGTTCTGCAACCTGTGGTT
TGGGTGTGAGGAAGAGGGAGATGAAGTGCAGCGAGAAGGGCTTCCAGGGAAAGCTGATAACTTTCCCAGAGCGAAGATGC
CGTAATATTAAGAAACCAAATCTGGACTTGGAAGAGACCTGCAACCGACGGGCTTGCCCAGCCCATCCAGTGTACAACAT
GGTAGCTGGATGGTATTCATTGCCGTGGCAGCAGTGCACAGTCACCTGTGGGGGAGGGGTCCAGACCCGGTCAGTCCACT
GTGTTCAGCAAGGCCGGCCTTCCTCAAGTTGTCTGCTCCATCAGAAACCTCCGGTGCTACGAGCCTGTAATACAAACTTC
TGTCCAGCTCCTGAAAAGAGAGATCTTAATTCCTTGAATACCTCTATGGTCTCCACTGGTGCTGAGGGTCAACACCTAAG
ACGGTTTTCGTCAGTCACCCCTGGATCTGGGTGA

도면6A

PCR 산물 (염기쌍) .

분해되지 않은 분해된

단편 1 1762 bp 353 bp
5'프라이머 TAAATCGAATTCCCACCATGTCACCTTTTCTCTTGCAGGCG (서열 9)
3'프라이머 CCGGGAACATTCTGACCACTTCGAC (서열 10)

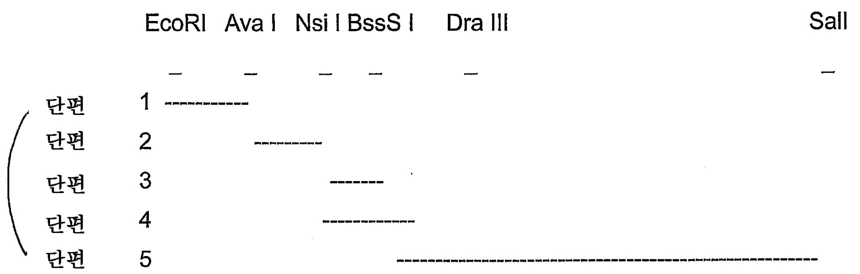
단편 2 1762 bp 293 bp
5'프라이머 TAAATCGAATTCCCACCATGTCACCTTTTCTCTTGCAGGCG (서열 9)
3'프라이머 CCGGGAACATTCTGACCACTTCGAC (서열 10)

단편 3 3189 bp 187 bp
5'프라이머 CTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGC (서열 11)
3'프라이머 GCATCTTCGCTCTGGGAAAGTTATC (서열 12)

단편 4 1762 bp 667 bp
5'프라이머 TAAATCGAATTCCCACCATGTCACCTTTTCTCTTGCAGGCG (서열 9)
3'프라이머 CCGGGAACATTCTGACCACTTCGAC (서열 10)

단편 5 3189 bp 1796 bp
5'프라이머 CTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGC (서열 11)
3'프라이머 GCATCTTCGCTCTGGGAAAGTTATC (서열 12)

도면6B



도면7

절단된 EST18 뉴클레오타이드 서열과 스트렙타비딘-태그: 서열 7

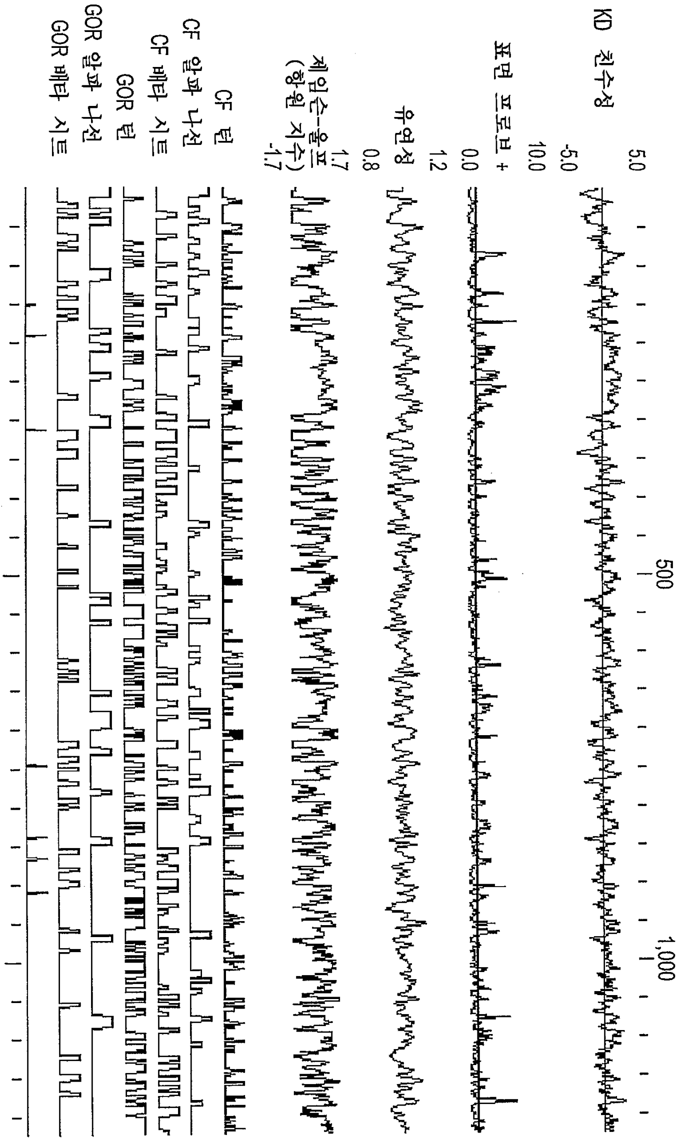
```
ATGGAGTGCGCCCTCCTGCTCGCGTGTGCCTTCCCGGCTGCGGGTTCGGGCCCGCCGAGGGGCCTGGCGGGACTGGGGCG
CGTGGCCAAGGCGCTCCAGCTGTGCTGCCTCTGCTGTGCGTCGGTCGCCGCGGCCTTAGCCAGTGACAGCAGCAGCGGCG
CCAGCGGATTAAATGATGATTACGTCTTTGTCACGCCAGTAGAAGTAGACTCAGCCGGGTCATATATTTCACACGACATT
TTGCACAACGGCAGGAAAAAGCGATCGGCGCAGAATGCCAGAAGCTCCCTGCACTACCGATTTTCAGCATTTGGACAGGA
ACTGCACTTAGAACTTAAGCCCTCGGCGATTTTGAGCAGTCACTTTATTGTCCAGGTACTTGGAAAAGATGGTGCTTCAG
AGACTCAGAAACCCGAGGTGCAGCAATGCTTCTATCAGGGATTTATCAGAAATGACAGCTCCTCCTCTGTCGCTGTGTCT
ACGTGTGCTGGCTTGTCAGGTTTAATAAGGACACGAAAAAATGAATTCCTCATCTCGCCATTACCTCAGCTTCTGGCCCA
GGAACACAACCACAGCTCCCCTGCGGGTCACCATCCTCACGTACTGTACAAAAGGACAGCAGAGGAGAAGATCCAGCGGT
ACCGTGGCTACCCCGGCTCTGGCCGGAATTATCCTGGTTACTCCCCAAGTCACATTCCCCATGCATCTCAGAGTCGAGAG
ACAGAGTATCACCATCGAAGGTTGCAAAAGCAGCATTTTTGTGGACGACGCAAGAAATATGCTCCCAAGCCTCCCACAGA
GGACACCTATCTAAGGTTTGATGAATATGGGAGCTCTGGGCGACCCAGAAGATCAGCTGGAAAATCACAAAAGGGCCTCA
ATGTGGAAACCCTCGTGGTGGCAGACAAGAAAATGGTGGAAAAGCATGGCAAGGGAAATGTCACCACATACATTCTCACA
GTAATGAACATGGTTTCTGGCCTATTTAAAGATGGGACTATTGGAAGTGACATAAACGTGGTTGTGGTGAGCCTAATTCT
TCTGGAACAAGAACCTGGAGGATTATTGATCAACCATCATGCAGACCAGTCTCTGAATAGTTTTTGTCAATGGCAGTCTG
CCCTCATTGGAAAGAATGGCAAGAGACATGATCATGCCATCTTACTAACAGGATTTGATATTTGTTCTTGGAAGAATGAA
CCATGTGACACTCTAGGGTTTGCCCCCATCAGTGGAATGTGCTCTAAGTACCGAAGTTGTACCATCAATGAGGACACAGG
ACTTGGCCTTGCCTTCACCATCGCTCATGAGTCAGGGCACAACTTTGGTATGATTCACGACGGAGAAGGGAATCCCTGCA
GAAAGGCTGAAGGCAATATCATGTCTCCCACACTGACCGGAAACAATGGAGTGTTTTCATGGTCTTCTTGCAGCCGCCAG
TATCTCAAGAAATTCCTCAGCACACCTCAGGCGGGGTGTCTAGTGGATGAGCCCAAGCAAGCAGGACAGTATAAATATCC
GGACAAACTACCAGGACAGATTTATGATGCTGACACACAGTGTAAATGGCAATTTGGAGCAAAAGCCAAGTTATGCAGCC
TTGGTTTTGTGAAGGATATTTGCAAATCACTTTGGTGCCACCGAGTAGGCCACAGGTGTGAGACCAAGTTTATGCCCGCA
GCAGAAGGGACCGTTTGTGGCTTGAGTATGTGGTGTCGGCAAGGCCAGTGCGTAAAGTTTGGGGAGCTCGGGCCCCGGCC
CATCCACGGCCAGTGGTCCGCCTGGTCGAAGTGGTCAGAATGTTCCCGGACATGTGGTGGAGGAGTCAAGTTCCAGGAGA
GACACTGCAATAACCCCAAGCCTCAGTATGGTGGCATATTCTGTCCAGGTTCTAGCCGTATTTATCAGCTGTGCAATATT
AACCCTTGCAATGAAAATAGCTTGGATTTTGGAAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAA
```

도면8

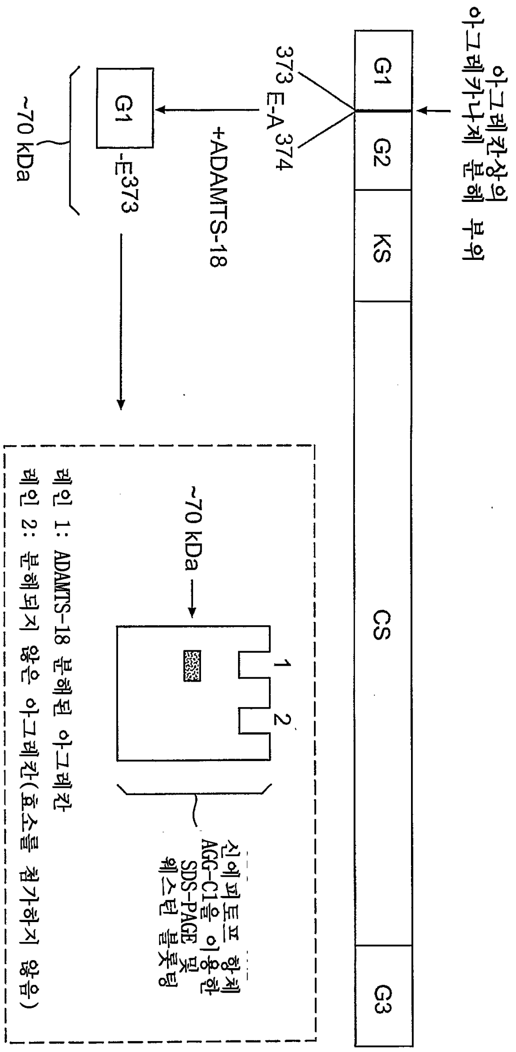
절단된 EST18 단백질 서열과 스트렙타비딘-태그: 서열 8

```
MECALLLACAFPAAGSGPPRGLAGLGRVAKALQLCCLCCASVAAALASDSSSGASGLNDDYVFVTPVEVDSAGSYISHDI
LHNGRKKRSAQNARSSLHYRFSAFGQELHLELKPSAILSSHFIVQVLGKDGASETQKPEVQQCFYQGFIRNDSSSSVAVS
TCAGLSGLIRTRKNEFLISPLPQLLAQEHNHSSPAGHHPHVLYKRTAEEKIQRYRGYPGSGRNYPGYSPSHIPHASQSRE
TEYHHRRLQKQHFCGRRKKYAPKPPTEDTYLRFDEYGSSGRPRRSAGKSQKGLNVETLVVADKKMVEKHGKGNVTTYILT
VMNMVSGLFKDGTIGSDINVVVVSLILLEQEPGGLLINHHADQSLNSFCQWQSALIGKNGKRHDHAILLTGFDICSWKNE
PCDTLGFAPISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFGMIHDGEGNPCRKAEGNIMSPTLTGNNGVFSWSSCSRQ
YLKKFLSTPQAGCLVDEPKQAGQYKYPDKLPGQIYDADTQCKWQFGAKAKLCSLGFVKDICKSLWCHRVGHRCETKFMPA
AEGTVCGLSMWCRQGQCVKFGELGPRPIHGQWSAWSKWSECSRTCGGGVKFQERHCNNPKPQYGGIFCPGSSRIYQLCNI
NPCNENSLDFGSAWSHPQFEK
```

도면9


KD 친수성
5.0
-5.0
표면 프로브 +
10.0
0.0
유연성
1.2
0.8
제임슨-울프
(항원 지수)
1.7
-1.7
CF 턴
CF 알파 나선
CF 베타 시트
GOR 턴
GOR 알파 나선
GOR 베타 시트
500
1,000

도면10



<110> WYETH

<120> Aggrecanase molecules

<130> 5-1998-071710-7

<150> 60/353,680

<151> 2002-01-31

<160> 32

<170> KopatentIn 1.7

<210> 1

<211> 3663

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggagtgcg ccctcctgct cgcgtgtgcc ttcccggctg cgggttcggg cccgccgagg 60

ggcctggcgg gactggggcg cgtggccaag gcgctccagc tgtgctgcct ctgctgtgcg 120

tcggtcgccg cggccttagc cagtgacagc agcagcggcg ccagcggatt aaatgatgat 180

tacgtctttg tcacgccagt agaagtagac tcagccgggt catatatttc acacgacatt 240

ttgcacaacg gcaggaaaaa gcgatcggcg cagaatgcca gaagctccct gcactaccga 300

ttttcagcat ttggacagga actgcactta gaacttaagc cctcggcgat tttgagcagt 360

cactttattg tccaggtact tggaaaagat ggtgcttcag agactcagaa acccgaggtg 420

cagcaatgct tctatcaggg atttatcaga aatgacagct cctcctctgt cgctgtgtct 480

acgtgtgctg gcttgtcagg tttaataagg acacgaaaaa atgaattcct catctcgcca 540

ttacctcagc ttctggccca ggaacacaac cacagctccc ctgcgggtca ccatcctcac 600

gtactgtaca aaaggacagc agaggagaag atccagcggt accgtggcta ccccggctct 660

ggccggaatt atcctggtta ctccccaagt cacattcccc atgcatctca gagtcgagag 720

acagagtatc accatcgaag gttgcaaaag cagcattttt gtggacgacg caagaaatat 780

gctcccaagc ctcccacaga ggacacctat ctaaggtttg atgaatatgg gagctctggg 840

cgacccagaa gatcagctgg aaaatcacaa aagggcctca atgtggaaac cctcgtggtg 900

gcagacaaga aaatggtgga aaagcatggc aagggaaatg tcaccacata cattctcaca 960

gtaatgaaca tggtttctgg cctatttaaa gatgggacta ttggaagtga cataaacgtg 1020

gttgtggtga gcctaattct tctggaacaa gaacctggag gattattgat caaccatcat 1080

gcagaccagt ctctgaatag tttttgtcaa tggcagtctg ccctcattgg aaagaatggc 1140

aagagacatg atcatgccat cttactaaca ggatttgata tttgttcttg gaagaatgaa 1200

ccatgtgaca ctctagggtt tgcccccatc agtggaatgt gctctaagta ccgaagttgt 1260

accatcaatg aggacacagg acttggcctt gccttcacca tcgctcatga gtcagggcac 1320

aactttggta tgattcacga cggagaaggg aatccctgca gaaaggctga aggcaatatc 1380

atgtctccca cactgaccgg aaacaatgga gtgttttcat ggtcttcttg cagccgccag 1440

tatctcaaga aattcctcag cacacctcag gcggggtgtc tagtggatga gcccaagcaa 1500

gcaggacagt ataaatatcc ggacaaacta ccaggacaga tttatgatgc tgacacacag 1560

tgtaaatggc aatttggagc aaaagccaag ttatgcagcc ttggttttgt gaaggatatt 1620

tgcaaatcac tttggtgcca ccgagtaggc cacaggtgtg agaccaagtt tatgcccgca 1680 gcagaaggga ccgtttgtgg cttgagtatg tggtgtcggc aaggccagtg cgtaaagttt 1740

ggggagctcg ggccccggcc catccacggc cagtggtccg cctggtcgaa gtggtcagaa 1800

tgttcccgga catgtggtgg aggagtcaag ttccaggaga gacactgcaa taaccccaag 1860

cctcagtatg gtggcatatt ctgtccaggt tctagccgta tttatcagct gtgcaatatt 1920

aacccttgca atgaaaatag cttggatttt cgggcccaac agtgtgcaga atataacagc 1980

aaacctttcc gtggatggtt ctaccagtgg aaaccctata caaaagtgga agaggaagat 2040

cgatgcaaac tgtactgcaa ggctgagaac tttgaatttt tttttgcaat gtccggcaaa 2100

gtgaaagatg gaactccctg ctccccaaac agaaatgatg tttgtattga cggggtttgt 2160

gaactagtgg gatgtgatca tgaactaggc tctaaagcag tttcagatgc ttgtggcgtt 2220

tgcaaaggtg ataattcaac ttgcaagttt tataaaggcc tgtacctcaa ccagcataaa 2280

gcaaatgaat attatccggt ggtcatcatt ccagctggcg cccgaagcat cgaaatccag 2340

gagctgcagg tttcctccag ttacctcgca gttcgaagcc tcagtcaaaa gtattacctc 2400

accgggggct ggagcatcga ctggcctggg gagttcccct tcgctgggac cacgtttgaa 2460

taccagcgct ctttcaaccg cccggaacgt ctgtacgcgc cagggcccac aaatgagacg 2520

ctggtctttg aaattctgat gcaaggcaaa aatccaggga tagcttggaa gtatgcactt 2580

cccaaggtca tgaatggaac tccaccagcc acaaaaagac ctgcctatac ctggagtatc 2640

gtgcagtcag agtgctccgt ctcctgtggt ggaggttaca taaatgtaaa ggccatttgc 2700

ttgcgagatc aaaatactca agtcaattcc tcattctgca gtgcaaaaac caagccagta 2760

actgagccca aaatctgcaa cgctttctcc tgcccggctt actggatgcc aggtgaatgg 2820

agtacatgta gcaaggcctg tgctggaggc cagcagagcc gaaagatcca gtgtgtgcaa 2880

aagaagccct tccaaaagga ggaagcagtg ttgcattctc tctgtccagt gagcacaccc 2940

actcaggtcc aagcctgcaa cagccatgcc tgtcctccac aatggagcct tggaccctgg 3000

tctcagtgtt ccaagacctg tggacgaggg gtgaggaagc gtgaactcct ctgcaagggc 3060

tctgccgcag aaaccctccc cgagagccag tgtaccagtc tccccagacc tgagctgcag 3120

gagggctgtg tgcttggacg atgccccaag aacagccggc tacagtgggt cgcttcttcg 3180

tggagcgagt gttctgcaac ctgtggtttg ggtgtgagga agagggagat gaagtgcagc 3240

gagaagggct tccagggaaa gctgataact ttcccagagc gaagatgccg taatattaag 3300

aaaccaaatc tggacttgga agagacctgc aaccgacggg cttgcccagc ccatccagtg 3360

tacaacatgg tagctggatg gtattcattg ccgtggcagc agtgcacagt cacctgtggg 3420

ggaggggtcc agacccggtc agtccactgt gttcagcaag gccggccttc ctcaagttgt 3480

ctgctccatc agaaacctcc ggtgctacga gcctgtaata caaacttctg tccagctcct 3540

gaaaagagag aggatccatc ctgcgtagat ttcttcaact ggtgtcacct agttcctcag 3600

catggtgtct gcaaccacaa gttttacgga aaacaatgct gcaagtcatg cacaaggaag 3660

atc 3663

<210> 2

<211> 1221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Cys Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ala Phe Pro Ala Ala Gly Ser

1 5 10 15

Gly Pro Pro Arg Gly Leu Ala Gly Leu Gly Arg Val Ala Lys Ala Leu

20 25 30

Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys Ala Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser

35 40 45

Asp Ser Ser Ser Gly Ala Ser Gly Leu Asn Asp Asp Tyr Val Phe Val

50 55 60

Thr Pro Val Glu Val Asp Ser Ala Gly Ser Tyr Ile Ser His Asp Ile

65 70 75 80

Leu His Asn Gly Arg Lys Lys Arg Ser Ala Gln Asn Ala Arg Ser Ser

85 90 95

Leu His Tyr Arg Phe Ser Ala Phe Gly Gln Glu Leu His Leu Glu Leu

100 105 110

Lys Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ser His Phe Ile Val Gln Val Leu Gly

115 120 125

Lys Asp Gly Ala Ser Glu Thr Gln Lys Pro Glu Val Gln Gln Cys Phe
130 135 140

Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Val Ala Val Ser
145 150 155 160

Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Arg Thr Arg Lys Asn Glu Phe
165 170 175

Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln Leu Leu Ala Gln Glu His Asn His Ser
180 185 190

Ser Pro Ala Gly His His Pro His Val Leu Tyr Lys Arg Thr Ala Glu
195 200 205

Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Asn Tyr
210 215 220

Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His Ile Pro His Ala Ser Gln Ser Arg Glu
225 230 235 240

Thr Glu Tyr His His Arg Arg Leu Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg
245 250 255

Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys Pro Pro Thr Glu Asp Thr Tyr Leu Arg
260 265 270

Phe Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Arg Pro Arg Arg Ser Ala Gly Lys
275 280 285

Ser Gln Lys Gly Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Ala Asp Lys Lys
290 295 300

Met Val Glu Lys His Gly Lys Gly Asn Val Thr Thr Tyr Ile Leu Thr

305 310 315 320

Val Met Asn Met Val Ser Gly Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Ser

325 330 335

Asp Ile Asn Val Val Val Val Ser Leu Ile Leu Leu Glu Gln Glu Pro

340 345 350

Gly Gly Leu Leu Ile Asn His His Ala Asp Gln Ser Leu Asn Ser Phe

355 360 365

Cys Gln Trp Gln Ser Ala Leu Ile Gly Lys Asn Gly Lys Arg His Asp

370 375 380

His Ala Ile Leu Leu Thr Gly Phe Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu

385 390 395 400

Pro Cys Asp Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys

405 410 415

Tyr Arg Ser Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe

420 425 430

Thr Ile Ala His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly

435 440 445

Glu Gly Asn Pro Cys Arg Lys Ala Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr

450 455 460

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln

465 470 475 480

Tyr Leu Lys Lys Phe Leu Ser Thr Pro Gln Ala Gly Cys Leu Val Asp

485 490 495

Glu Pro Lys Gln Ala Gly Gln Tyr Lys Tyr Pro Asp Lys Leu Pro Gly

500 505 510

Gln Ile Tyr Asp Ala Asp Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Ala Lys

515 520 525

Ala Lys Leu Cys Ser Leu Gly Phe Val Lys Asp Ile Cys Lys Ser Leu

530 535 540

Trp Cys His Arg Val Gly His Arg Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala

545 550 555 560

Ala Glu Gly Thr Val Cys Gly Leu Ser Met Trp Cys Arg Gln Gly Gln

565 570 575

Cys Val Lys Phe Gly Glu Leu Gly Pro Arg Pro Ile His Gly Gln Trp

580 585 590

Ser Ala Trp Ser Lys Trp Ser Glu Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly

595 600 605

Val Lys Phe Gln Glu Arg His Cys Asn Asn Pro Lys Pro Gln Tyr Gly

610 615 620

Gly Ile Phe Cys Pro Gly Ser Ser Arg Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Ile

625 630 635 640

Asn Pro Cys Asn Glu Asn Ser Leu Asp Phe Arg Ala Gln Gln Cys Ala

645 650 655

Glu Tyr Asn Ser Lys Pro Phe Arg Gly Trp Phe Tyr Gln Trp Lys Pro

660 665 670

Tyr Thr Lys Val Glu Glu Glu Asp Arg Cys Lys Leu Tyr Cys Lys Ala

675 680 685

Glu Asn Phe Glu Phe Phe Phe Ala Met Ser Gly Lys Val Lys Asp Gly

690 695 700

Thr Pro Cys Ser Pro Asn Arg Asn Asp Val Cys Ile Asp Gly Val Cys

705 710 715 720

Glu Leu Val Gly Cys Asp His Glu Leu Gly Ser Lys Ala Val Ser Asp

725 730 735

Ala Cys Gly Val Cys Lys Gly Asp Asn Ser Thr Cys Lys Phe Tyr Lys

740 745 750

Gly Leu Tyr Leu Asn Gln His Lys Ala Asn Glu Tyr Tyr Pro Val Val

755 760 765

Ile Ile Pro Ala Gly Ala Arg Ser Ile Glu Ile Gln Glu Leu Gln Val

770 775 780

Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Val Arg Ser Leu Ser Gln Lys Tyr Tyr Leu

785 790 795 800

Thr Gly Gly Trp Ser Ile Asp Trp Pro Gly Glu Phe Pro Phe Ala Gly

805 810 815

Thr Thr Phe Glu Tyr Gln Arg Ser Phe Asn Arg Pro Glu Arg Leu Tyr

820 825 830

Ala Pro Gly Pro Thr Asn Glu Thr Leu Val Phe Glu Ile Leu Met Gln

835 840 845

Gly Lys Asn Pro Gly Ile Ala Trp Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Val Met

850 855 860

Asn Gly Thr Pro Pro Ala Thr Lys Arg Pro Ala Tyr Thr Trp Ser Ile

865 870 875 880

Val Gln Ser Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Tyr Ile Asn Val

885 890 895

Lys Ala Ile Cys Leu Arg Asp Gln Asn Thr Gln Val Asn Ser Ser Phe

900 905 910

Cys Ser Ala Lys Thr Lys Pro Val Thr Glu Pro Lys Ile Cys Asn Ala

915 920 925

Phe Ser Cys Pro Ala Tyr Trp Met Pro Gly Glu Trp Ser Thr Cys Ser

930 935 940

Lys Ala Cys Ala Gly Gly Gln Gln Ser Arg Lys Ile Gln Cys Val Gln

945 950 955 960

Lys Lys Pro Phe Gln Lys Glu Glu Ala Val Leu His Ser Leu Cys Pro

965 970 975

Val Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Pro

980 985 990

Pro Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser Gln Cys Ser Lys Thr Cys Gly

995 1000 1005

Arg Gly Val Arg Lys Arg Glu Leu Leu Cys Lys Gly Ser Ala Ala Glu

1010 1015 1020

Thr Leu Pro Glu Ser Gln Cys Thr Ser Leu Pro Arg Pro Glu Leu Gln

1025 1030 1035 1040

Glu Gly Cys Val Leu Gly Arg Cys Pro Lys Asn Ser Arg Leu Gln Trp

1045 1050 1055

Val Ala Ser Ser Trp Ser Glu Cys Ser Ala Thr Cys Gly Leu Gly Val

1060 1065 1070

Arg Lys Arg Glu Met Lys Cys Ser Glu Lys Gly Phe Gln Gly Lys Leu

1075 1080 1085

Ile Thr Phe Pro Glu Arg Arg Cys Arg Asn Ile Lys Lys Pro Asn Leu

1090 1095 1100

Asp Leu Glu Glu Thr Cys Asn Arg Arg Ala Cys Pro Ala His Pro Val

1105 1110 1115 1120

Tyr Asn Met Val Ala Gly Trp Tyr Ser Leu Pro Trp Gln Gln Cys Thr

1125 1130 1135

Val Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val His Cys Val Gln

1140 1145 1150

Gln Gly Arg Pro Ser Ser Ser Cys Leu Leu His Gln Lys Pro Pro Val

1155 1160 1165

Leu Arg Ala Cys Asn Thr Asn Phe Cys Pro Ala Pro Glu Lys Arg Glu

1170 1175 1180

Asp Pro Ser Cys Val Asp Phe Phe Asn Trp Cys His Leu Val Pro Gln

1185 1190 1195 1200

His Gly Val Cys Asn His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys Lys Ser

1205 1210 1215

Cys Thr Arg Lys Ile

1220

<210> 3

<211> 3219

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgtcacctt ttctcttgca ggcgctccag ctgtgctgcc tctgctgtgc gtcggtcgcc 60

gcggccttag ccagtgacag cagcagcggc gccagcggat taaatgatga ttacgtcttt 120

gtcacgccag tagaagtaga ctcagccggg tcatatattt cacacgacat tttgcacaac 180

ggcaggaaaa agcgatcggc gcagaatgcc agaagctccc tgcactaccg attttcagca 240

tttggacagg aactgcactt agaacttaag ccctcggcga ttttgagcag tcactttatt 300

gtccaggtac ttggaaaaga tggtgcttca gagactcaga aacccgaggt gcagcaatgc 360

ttctatcagg gatttatcag aaatgacagc tcctcctctg tcgctgtgtc tacgtgtgct 420

ggcttgtcag gtttaataag gacacgaaaa aatgaattcc tcatctcgcc attacctcag 480

cttctggccc aggaacacaa ccacagctcc cctgcgggtc accatcctca cgtactgtac 540

aaaaggacag cagaggagaa gatccagcgg taccgtggct accccggctc tggccggaat 600

tatcctggtt actccccaag tcacattccc catgcatctc agagtcgaga gacagagtat 660

caccatcgaa ggttgcaaaa gcagcatttt tgtggacgac gcaagaaata tgctcccaag 720

cctcccacag aggacaccta tctaaggttt gatgaatatg ggagctctgg gcgacccaga 780

agatcagctg gaaaatcaca aaagggcctc aatgtggaaa ccctcgtggt ggcagacaag 840

aaaatggtgg aaaagcatgg caagggaaat gtcaccacat acattctcac agtaatgaac 900

atggtttctg gcctatttaa agatgggact attggaagtg acataaacgt ggttgtggtg 960

agcctaattc ttctggaaca agaacctgga ggattattga tcaaccatca tgcagaccag 1020

tctctgaata gtttttgtca atggcagtct gccctcattg gaaagaatgg caagagacat 1080

gatcatgcca tcttactaac aggatttgat atttgttctt ggaagaatga accatgtgac 1140

actctagggt ttgcccccat cagtggaatg tgctctaagt accgaagttg taccatcaat 1200

gaggacacag gacttggcct tgccttcacc atcgctcatg agtcagggca caactttggt 1260

atgattcacg acggagaagg gaatccctgc agaaaggctg aaggcaatat catgtctccc 1320

acactgaccg gaaacaatgg agtgttttca tggtcttctt gcagccgcca gtatctcaag 1380

aaattcctca gcacacctca ggcggggtgt ctagtggatg agcccaagca agcaggacag 1440 tataaatatc cggacaaact accaggacag atttatgatg ctgacacaca gtgtaaatgg 1500

caatttggag caaaagccaa gttatgcagc cttggttttg tgaaggatat ttgcaaatca 1560

ctttggtgcc accgagtagg ccacaggtgt gagaccaagt ttatgcccgc agcagaaggg 1620

accgtttgtg gcttgagtat gtggtgtcgg caaggccagt gcgtaaagtt tggggagctc 1680

gggccccggc ccatccacgg ccagtggtcc gcctggtcga agtggtcaga atgttcccgg 1740

acatgtggtg gaggagtcaa gttccaggag agacactgca ataaccccaa gcctcagtat 1800

ggtggcatat tctgtccagg ttctagccgt atttatcagc tgtgcaatat taacccttgc 1860

aatgaaaata gcttggattt tcgggcccaa cagtgtgcag aatataacag caaacctttc 1920

cgtggatggt tctaccagtg gaaaccctat acaaaagtgg aagaggaaga tcgatgcaaa 1980

ctgtactgca aggctgagaa ctttgaattt ttttttgcaa tgtccggcaa agtgaaagat 2040

ggaactccct gctccccaaa cagaaatgat gtttgtattg acggggtttg tgaactagtg 2100

ggatgtgatc atgaactagg ctctaaagca gtttcagatg cttgtggcgt ttgcaaaggt 2160

gataattcaa cttgcaagtt ttataaaggc ctgtacctca accagcataa agcaaatgaa 2220

tattatccgg tggtcatcat tccagctggc gcccgaagca tcgaaatcca ggagctgcag 2280

gtttcctcca gttacctcgc agttcgaagc ctcagtcaaa agtattacct caccgggggc 2340

tggagcatcg actggcctgg ggagttcccc ttcgctggga ccacgtttga ataccagcgc 2400

tctttcaacc gcccggaacg tctgtacgcg ccagggccca caaatgagac gctggtcttt 2460

gaaattctga tgcaaggcaa aaatccaggg atagcttgga agtatgcact tcccaaggtc 2520

atgaatggaa ctccaccagc cacaaaaaga cctgcctata cctggagtat cgtgcagtca 2580

gagtgctccg tctcctgtgg tggaggttac ataaatgtaa aggccatttg cttgcgagat 2640

caaaatactc aagtcaattc ctcattctgc agtgcaaaaa ccaagccagt aactgagccc 2700

aaaatctgca acgctttctc ctgcccggct tactggatgc caggtgaatg gagtacatgt 2760

agcaaggcct gtgctggagg ccagcagagc cgaaagatcc agtgtgtgca aaagaagccc 2820

ttccaaaagg aggaagcagt gttgcattct ctctgtccag tgagcacacc cactcaggtc 2880

caagcctgca acagccatgc ctgtcctcca caatggagcc ttggaccctg gtctcagtgt 2940

tccaagacct gtggacgagg ggtgaggaag cgtgaactcc tctgcaaggg ctctgccgca 3000

gaaaccctcc ccgagagcca gtgtaccagt ctccccagac ctgagctgca ggagggctgt 3060

gtgcttggac gatgccccaa gaacagccgg ctacagtggg tcgcttcttc gtggagcgag 3120

tgttctgcaa cctgtggttt gggtgtgagg aagagggaga tgaagtgcag cgagaagggc 3180

ttccagggaa agctgataac tttcccagag cgaagatgc 3219

<210> 4

<211> 1071

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Ser Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys
  1               5                  10                  15

Ala Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser Asp Ser Ser Ser Gly Ala Ser
             20                  25                  30

Gly Leu Asn Asp Asp Tyr Val Phe Val Thr Pro Val Glu Val Asp Ser
         35                  40                  45

Ala Gly Ser Tyr Ile Ser His Asp Ile Leu His Asn Gly Arg Lys Lys
     50                  55                  60

Arg Ser Ala Gln Asn Ala Arg Ser Ser Leu His Tyr Arg Phe Ser Ala
 65                  70                  75                  80

Phe Gly Gln Glu Leu His Leu Glu Leu Lys Pro Ser Ala Ile Leu Ser
                 85                  90                  95

Ser His Phe Ile Val Gln Val Leu Gly Lys Asp Gly Ala Ser Glu Thr
            100                 105                 110

Gln Lys Pro Glu Val Gln Gln Cys Phe Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn
        115                 120                 125

Asp Ser Ser Ser Ser Val Ala Val Ser Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly
    130                 135                 140

Leu Ile Arg Thr Arg Lys Asn Glu Phe Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln
```

145 150 155 160

Leu Leu Ala Gln Glu His Asn His Ser Ser Pro Ala Gly His His Pro

165 170 175

His Val Leu Tyr Lys Arg Thr Ala Glu Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg

180 185 190

Gly Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Asn Tyr Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His

195 200 205

Ile Pro His Ala Ser Gln Ser Arg Glu Thr Glu Tyr His His Arg Arg

210 215 220

Leu Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys

225 230 235 240

Pro Pro Thr Glu Asp Thr Tyr Leu Arg Phe Asp Glu Tyr Gly Ser Ser

245 250 255

Gly Arg Pro Arg Arg Ser Ala Gly Lys Ser Gln Lys Gly Leu Asn Val

260 265 270

Glu Thr Leu Val Val Ala Asp Lys Lys Met Val Glu Lys His Gly Lys

275 280 285

Gly Asn Val Thr Thr Tyr Ile Leu Thr Val Met Asn Met Val Ser Gly

290 295 300

Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Ser Asp Ile Asn Val Val Val Val

305 310 315 320

Ser Leu Ile Leu Leu Glu Gln Glu Pro Gly Gly Leu Leu Ile Asn His

325 330 335

```
His Ala Asp Gln Ser Leu Asn Ser Phe Cys Gln Trp Gln Ser Ala Leu
            340                 345                 350

Ile Gly Lys Asn Gly Lys Arg His Asp His Ala Ile Leu Leu Thr Gly
        355                 360                 365

Phe Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp Thr Leu Gly Phe
    370                 375                 380

Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser Cys Thr Ile Asn
385                 390                 395                 400

Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala His Glu Ser Gly
                405                 410                 415

His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn Pro Cys Arg Lys
            420                 425                 430

Ala Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Thr Gly Asn Asn Gly Val
        435                 440                 445

Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln Tyr Leu Lys Lys Phe Leu Ser
    450                 455                 460

Thr Pro Gln Ala Gly Cys Leu Val Asp Glu Pro Lys Gln Ala Gly Gln
465                 470                 475                 480

Tyr Lys Tyr Pro Asp Lys Leu Pro Gly Gln Ile Tyr Asp Ala Asp Thr
                485                 490                 495

Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Ala Lys Ala Lys Leu Cys Ser Leu Gly
            500                 505                 510
```

Phe Val Lys Asp Ile Cys Lys Ser Leu Trp Cys His Arg Val Gly His
515 520 525

Arg Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr Val Cys Gly
530 535 540

Leu Ser Met Trp Cys Arg Gln Gly Gln Cys Val Lys Phe Gly Leu Gly
545 550 555 560

Pro Arg Pro Ile His Gly Gln Trp Ser Ala Trp Ser Lys Trp Ser Glu
565 570 575

Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Lys Phe Gln Glu Arg His Cys
580 585 590

Asn Asn Pro Lys Pro Gln Tyr Gly Gly Ile Phe Cys Pro Gly Ser Ser
595 600 605

Arg Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Ile Asn Pro Cys Asn Glu Asn Ser Leu
610 615 620

Asp Phe Arg Ala Gln Gln Cys Ala Glu Tyr Asn Ser Lys Pro Phe Arg
625 630 635 640

Gly Trp Phe Tyr Gln Trp Lys Pro Tyr Thr Lys Val Glu Glu Glu Asp
645 650 655

Arg Cys Lys Leu Tyr Cys Lys Ala Glu Asn Phe Glu Phe Phe Phe Ala
660 665 670

Met Ser Gly Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys Ser Pro Asn Arg Asn
675 680 685

Asp Val Cys Ile Asp Gly Val Cys Glu Leu Val Gly Cys Asp His Glu

690 695 700

Leu Gly Ser Lys Ala Val Ser Asp Ala Cys Gly Val Cys Gly Asp Asn

705 710 715 720

Ser Thr Cys Lys Phe Tyr Lys Gly Leu Tyr Leu Asn Gln His Lys Ala

725 730 735

Asn Glu Tyr Tyr Pro Val Val Ile Ile Pro Ala Gly Ala Arg Ser Ile

740 745 750

Glu Ile Gln Glu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Val Arg Ser

755 760 765

Leu Ser Gln Lys Tyr Tyr Leu Thr Gly Gly Trp Ser Ile Asp Trp Pro

770 775 780

Gly Glu Phe Pro Phe Ala Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Gln Arg Ser Phe

785 790 795 800

Asn Arg Pro Glu Arg Leu Tyr Ala Pro Gly Pro Thr Asn Glu Thr Leu

805 810 815

Val Phe Glu Ile Leu Met Gln Gly Lys Asn Pro Gly Ile Ala Trp Lys

820 825 830

Tyr Ala Leu Pro Lys Val Met Asn Gly Thr Pro Pro Ala Thr Lys Arg

835 840 845

Pro Ala Tyr Thr Trp Ser Ile Val Gln Ser Glu Cys Ser Val Ser Cys

850 855 860

Gly Gly Gly Tyr Ile Asn Val Lys Ala Ile Cys Leu Arg Asp Gln Asn

865 870 875 880

Thr Gln Val Asn Ser Ser Phe Cys Ser Ala Lys Thr Lys Pro Val Thr

885 890 895

Glu Pro Lys Ile Cys Asn Ala Phe Ser Cys Pro Ala Tyr Trp Met Pro

900 905 910

Gly Glu Trp Ser Thr Cys Ser Lys Ala Cys Ala Gly Gly Gln Gln Ser

915 920 925

Arg Lys Ile Gln Cys Val Gln Lys Lys Pro Phe Gln Lys Glu Glu Ala

930 935 940

Val Leu His Ser Leu Cys Pro Val Ser Thr Pro Thr Gln Val Gln Ala

945 950 955 960

Cys Asn Ser His Ala Cys Pro Pro Gln Trp Ser Leu Gly Pro Trp Ser

965 970 975

Gln Cys Ser Lys Thr Cys Gly Arg Gly Val Arg Lys Arg Glu Leu Leu

980 985 990

Cys Lys Gly Ser Ala Ala Glu Thr Leu Pro Glu Ser Gln Cys Thr Ser

995 1000 1005

Leu Pro Arg Pro Glu Leu Gln Glu Gly Cys Val Leu Gly Arg Cys Pro

1010 1015 1020

Lys Asn Ser Arg Leu Gln Trp Val Ala Ser Ser Trp Ser Glu Cys Ser

1025 1030 1035 1040

Ala Thr Cys Gly Leu Gly Val Arg Lys Arg Glu Met Lys Cys Ser Glu

1045 1050 1055

Lys Gly Phe Gln Gly Lys Leu Ile Thr Phe Pro Glu Arg Arg Cys

1060 1065 1070

<210> 5

<211> 3954

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgtcacctt ttctcttgca ggcgctccag ctgtgctgcc tctgctgtgc gtcggtcgcc 60

gcggccttag ccagtgacag cagcagcggc gccagcggat taaatgatgg ttcgtatttg 120

ccccccatcc ccaagaaggg cctttcgcag cactttgacc cttccttccc ccaaagagag 180

aaaagatgga aaagcgcacc ccctaacctg gcagattacg tctttgtcac gccagtagaa 240

gtagactcag ccgggtcata tatttcacac gacattttgc acaacggcag gaaaaagcga 300

tcggcgcaga atgccagaag ctccctgcac taccgatttt cagcatttgg acaggaactg 360

cacttagaac ttaagccctc ggcgattttg agcagtcact ttattgtcca ggtacttgga 420

aaagatggtg cttcagagac tcagaaaccc gaggtgcagc aatgcttcta tcagggattt 480

atcagaaatg acagctcctc ctctgtcgct gtgtctacgt gtgctggctt gatgatcccc 540

aaggaaatta acttgatgga tgccattcgc tttgtaatgt cccgggagac caggcattct 600

ataaatctaa caagcttcat gcgtctacat ggctttgaaa tgggaaaact gtatttcaat 660

gcgaaattgc attcagcagc actgtttaat aaaggaaaga aaagcttcac ctatggggga 720

ctcagagtca ttgtcctcaa ggtgtctgaa caggaccttc agtggaaacg agactgcctg 780

aacctctctg ggagagttgt ttttgctttg tggaatgcat cacaccatct catggcttta 840

catatgaatt cctcatctcg ccattacctc agcttctggc ccaggaacac aactacagct 900

cccctgcggg tcaccatcct cacgtactgt acaaaaggac agcagaggag aagatccagc 960

ggtaccgtgg ctaccccggc tctggccgga attatcctgg ttactcccca agtcacattc 1020

cccatgcatc tcagagtcga gagacagagt atcaccatcg aaggttgcaa aagcagcatt 1080

tttgtggacg acgcaagaaa tgtattttct ctctcaactg tcttatccag atattctcta 1140

atatcccttc caaatgctct tctgttcatc gtagatgctc ccaagcctcc cacagaggac 1200

acctatctaa ggtttgatga atatgggagc tctgggcgac ccagaagatc agctggaaaa 1260

tcacaaaagg gcctcaatgt ggaaaccctc gtggtggcag acaagaaaat ggtggaaaag 1320

catggcaagg gaaatgtcac cacatacatt ctcacagtaa tgaacatggt ttctggccta 1380

tttaaagatg ggactattgg aagtgacata aacgtggttg tggtgagcct aattcttctg 1440 gaacaagaac ctggaggatt attgatcaac catcatgcag accagtctct gaatagtttt 1500

tgtcaatggc agtctgccct cattggaaag aatggcaaga gacatgatca tgccatctta 1560

ctaacaggat ttgatatttg ttcttggaag aatgaaccat gtgacactct agggtttgcc 1620

cccatcagtg gaatgtgctc taagtaccga agttgtacca tcaatgagga cacaggactt 1680

ggccttgcct tcaccatcgc tcatgagtca gggcacaact ttggtatgat tcacgacgga 1740

gaagggaatc cctgcagaaa ggctgaaggc aatatcatgt ctcccacact gaccggaaac 1800

aatggagtgt tttcatggtc ttcctgcagc cgccagtatc tcaagaaatt cctcagcaca 1860

cctcaggcgg ggtgtctagt ggatgagccc aagcaagcag gacagtataa atatccggac 1920

aaactaccag gacagattta tgatgctgac acacagtgta aatggcaatt tggagcaaaa 1980

gccaagttat gcagccttgg ttttgtgaag tggtgtcggc aaggccagtg cgtaaagttt 2040

ggggagctcg ggccccggcc catccacggc cagtggtccg cctggtcgaa gtggtcagaa 2100

tgttcccgga catgtggtgg aggagtcaag ttccaggaga gacactgcaa taaccccaat 2160

aacaatcaac cagagtttta ctgtttgcat ataaagtcca tgtgcaccga gggaaggtat 2220

ggtgggcaga aaccaaaaca cagcagagga gtcattctct acgggactgt gatgatccag 2280

cctcagtatg gtggcttatt ctgtccaggt tctagccgta tttatcagct gtgcaatatt 2340

aacccttgca atgaaaatag cttggatttt cgggctcaac agtgtgcaga atataacagc 2400

aaacctttcc gtggatggtt ctaccagtgg aaaccctata caaaagtgga agaggaagat 2460

cgatgcaaac tgtactgcaa ggctgagaac tttgaatttt tttttgcaat gtccggcaaa 2520

gtgaaagatg gaactccctg ctccccaaac aaaaatgatg tttgtattga cggggtttgt 2580

gaactagtgg gatgtgatca tgaactaggc tctaaagcag tttcagatgc ttgtggcgtt 2640

tgcaaaggtg ataattcaac ttgcaagttt tataaaggcc tgtacctcaa ccagcataaa 2700

gcaaatgaat attatccggt ggtcctcatt ccagctggcg cccgaagcat cgaaatccag 2760

gagctgcagg tttcctccag ttacctcgca gttcgaagcc tcagtcaaaa gtattacctc 2820

accgggggct ggagcatcga ctggcctggg gagttcccct tcgctgggac cacgtttgaa 2880

taccagcgct ctttcaaccg cccggaacgt ctgtacgcgc cagggcccac aaatgagacg 2940

ctggtctttg aagtaagccc cttctgtgta ttcagttctc agtgcttctt gctacattta 3000

tatcgtatgg atatcccctc aggggtaagg tcagcaaagg ttctctcact agaggaatgg 3060

attaaatctg agacaaccct tgcaaggaag gaacaacagc aaccatctac tggctggatg 3120

ccaggtgaat ggagtacatg cagcaagtcc tgtgctggag gccagcagag ccgaaagatc 3180

cagtgtgtgc aaaagaagcc cttccaaaag gaggaagcag tgttgcattc tctctgtcca 3240

gtaagcacac ccactcaggt ccaagcctgc aacagccatg cctgccctcc acaatggagc 3300

cttggaccct ggtctcagtg ttccaagacc tgtggacgag ggtgaggaa gcgtgaactc 3360

ctctgcaagg gctctgccgc agaaaccctc cccgagagcc agtgtaccag tctccccaga 3420

cctgagctgc aggagggctg tgtgcttgga cgatgcccca agaacagccg gctacagtgg 3480 gtcgcttctt cgtggagcga gtgttctgca acctgtggtt tgggtgtgag gaagagggag 3540

atgaagtgca gcgagaaggg cttccaggga aagctgataa ctttcccaga gcgaagatgc 3600

cgtaatatta agaaaccaaa tctggacttg gaagagacct gcaaccgacg ggcttgccca 3660

gcccatccag tgtacaacat ggtagctgga tggtattcat tgccgtggca gcagtgcaca 3720

gtcacctgtg ggggaggggt ccagacccgg tcagtccact gtgttcagca aggccggcct 3780

tcctcaagtt gtctgctcca tcagaaacct ccggtgctac gagcctgtaa tacaaacttc 3840

tgtccagctc ctgaaaagag agatcttaat tccttgaata cctctatggt ctccactggt 3900

gctgagggtc aacacctaag acggttttcg tcagtcaccc ctggatctgg gtga 3954

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic zinc
binding signature peptide sequence

<400> 6

Thr Ala Ala His Glu Leu Gly His Val Lys Phe
1 5 10

<210> 7

<211> 1986

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggagtgcg ccctcctgct cgcgtgtgcc ttcccggctg cgggttcggg cccgccgagg 60

ggcctggcgg gactggggcg cgtggccaag gcgctccagc tgtgctgcct ctgctgtgcg 120

tcggtcgccg cggccttagc cagtgacagc agcagcggcg ccagcggatt aaatgatgat 180

tacgtctttg tcacgccagt agaagtagac tcagccgggt catatatttc acacgacatt 240 ttgcacaacg gcaggaaaaa gcgatcggcg cagaatgcca gaagctccct gcactaccga 300

ttttcagcat ttggacagga actgcactta gaacttaagc cctcggcgat tttgagcagt 360

cactttattg tccaggtact tggaaaagat ggtgcttcag agactcagaa acccgaggtg 420

cagcaatgct tctatcaggg atttatcaga aatgacagct cctcctctgt cgctgtgtct 480

acgtgtgctg gcttgtcagg tttaataagg acacgaaaaa atgaattcct catctcgcca 540

ttacctcagc ttctggccca ggaacacaac cacagctccc ctgcgggtca ccatcctcac 600

gtactgtaca aaaggacagc agaggagaag atccagcggt accgtggcta ccccggctct 660

ggccggaatt atcctggtta ctccccaagt cacattcccc atgcatctca gagtcgagag 720

acagagtatc accatcgaag gttgcaaaag cagcattttt gtggacgacg caagaaatat 780

gctcccaagc ctcccacaga ggacacctat ctaaggtttg atgaatatgg gagctctggg 840

cgacccagaa gatcagctgg aaaatcacaa aagggcctca atgtggaaac cctcgtggtg 900

gcagacaaga aaatggtgga aaagcatggc aagggaaatg tcaccacata cattctcaca 960

gtaatgaaca tggtttctgg cctatttaaa gatgggacta ttggaagtga cataaacgtg 1020

gttgtggtga gcctaattct tctggaacaa gaacctggag gattattgat caaccatcat 1080

gcagaccagt ctctgaatag tttttgtcaa tggcagtctg ccctcattgg aaagaatggc 1140

aagagacatg atcatgccat cttactaaca ggatttgata tttgttcttg gaagaatgaa 1200

ccatgtgaca ctctagggtt tgcccccatc agtggaatgt gctctaagta ccgaagttgt 1260

accatcaatg aggacacagg acttggcctt gccttcacca tcgctcatga gtcagggcac 1320

aactttggta tgattcacga cggagaaggg aatccctgca gaaaggctga aggcaatatc 1380

atgtctccca cactgaccgg aaacaatgga gtgttttcat ggtcttcttg cagccgccag 1440

tatctcaaga aattcctcag cacacctcag gcggggtgtc tagtggatga gcccaagcaa 1500

gcaggacagt ataaatatcc ggacaaacta ccaggacaga tttatgatgc tgacacacag 1560

tgtaaatggc aatttggagc aaaagccaag ttatgcagcc ttggttttgt gaaggatatt 1620

tgcaaatcac tttggtgcca ccgagtaggc cacaggtgtg agaccaagtt tatgcccgca 1680

gcagaaggga ccgtttgtgg cttgagtatg tggtgtcggc aaggccagtg cgtaaagttt 1740

ggggagctcg ggccccggcc catccacggc cagtggtccg cctggtcgaa gtggtcagaa 1800

tgttcccgga catgtggtgg aggagtcaag ttccaggaga gacactgcaa taaccccaag 1860

cctcagtatg gtggcatatt ctgtccaggt tctagccgta tttatcagct gtgcaatatt 1920

aacccttgca atgaaaatag cttggatttt ggaagcgctt ggagccaccc gcagttcgaa 1980

aaataa 1986

<210> 8

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Cys Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ala Phe Pro Ala Ala Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Pro Arg Gly Leu Ala Gly Leu Gly Arg Val Ala Lys Ala Leu
20 25 30

Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys Ala Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser
35 40 45

Asp Ser Ser Ser Gly Ala Ser Gly Leu Asn Asp Asp Tyr Val Phe Val
50 55 60

Thr Pro Val Glu Val Asp Ser Ala Gly Ser Tyr Ile Ser His Asp Ile
65 70 75 80

Leu His Asn Gly Arg Lys Lys Arg Ser Ala Gln Asn Ala Arg Ser Ser
85 90 95

Leu His Tyr Arg Phe Ser Ala Phe Gly Gln Glu Leu His Leu Glu Leu
100 105 110

Lys Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ser His Phe Ile Val Gln Val Leu Gly
115 120 125

Lys Asp Gly Ala Ser Glu Thr Gln Lys Pro Glu Val Gln Gln Cys Phe
130 135 140

Tyr Gln Gly Phe Ile Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Val Ala Val Ser

145 150 155 160

Thr Cys Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Arg Thr Arg Lys Asn Glu Phe

165 170 175

Leu Ile Ser Pro Leu Pro Gln Leu Leu Ala Gln Glu His Asn His Ser

180 185 190

Ser Pro Ala Gly His His Pro His Val Leu Tyr Lys Arg Thr Ala Glu

195 200 205

Glu Lys Ile Gln Arg Tyr Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Asn Tyr

210 215 220

Pro Gly Tyr Ser Pro Ser His Ile Pro His Ala Ser Gln Ser Arg Glu

225 230 235 240

Thr Glu Tyr His His Arg Arg Leu Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg

245 250 255

Arg Lys Lys Tyr Ala Pro Lys Pro Pro Thr Glu Asp Thr Tyr Leu Arg

260 265 270

Phe Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Arg Pro Arg Arg Ser Ala Gly Lys

275 280 285

Ser Gln Lys Gly Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Ala Asp Lys Lys

290 295 300

Met Val Glu Lys His Gly Lys Gly Asn Val Thr Thr Tyr Ile Leu Thr

305 310 315 320

Val Met Asn Met Val Ser Gly Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Ser

325 330 335

```
Asp Ile Asn Val Val Val Val Ser Leu Ile Leu Leu Glu Gln Glu Pro
            340                 345                 350

Gly Gly Leu Leu Ile Asn His His Ala Asp Gln Ser Leu Asn Ser Phe
        355                 360                 365

Cys Gln Trp Gln Ser Ala Leu Ile Gly Lys Asn Gly Lys Arg His Asp
    370                 375                 380

His Ala Ile Leu Leu Thr Gly Phe Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu
385                 390                 395                 400

Pro Cys Asp Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys
                405                 410                 415

Tyr Arg Ser Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe
            420                 425                 430

Thr Ile Ala His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly
        435                 440                 445

Glu Gly Asn Pro Cys Arg Lys Ala Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr
    450                 455                 460

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln
465                 470                 475                 480

Tyr Leu Lys Lys Phe Leu Ser Thr Pro Gln Ala Gly Cys Leu Val Asp
                485                 490                 495

Glu Pro Lys Gln Ala Gly Gln Tyr Lys Tyr Pro Asp Lys Leu Pro Gly
            500                 505                 510
```

Gln Ile Tyr Asp Ala Asp Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Ala Lys

515 520 525

Ala Lys Leu Cys Ser Leu Gly Phe Val Lys Asp Ile Cys Lys Ser Leu

530 535 540

Trp Cys His Arg Val Gly His Arg Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala

545 550 555 560

Ala Glu Gly Thr Val Cys Gly Leu Ser Met Trp Cys Arg Gln Gly Gln

565 570 575

Cys Val Lys Phe Gly Glu Leu Gly Pro Arg Pro Ile His Gly Gln Trp

580 585 590

Ser Ala Trp Ser Lys Trp Ser Glu Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly

595 600 605

Val Lys Phe Gln Glu Arg His Cys Asn Asn Pro Lys Pro Gln Tyr Gly

610 615 620

Gly Ile Phe Cys Pro Gly Ser Ser Arg Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Ile

625 630 635 640

Asn Pro Cys Asn Glu Asn Ser Leu Asp Phe Gly Ser Ala Trp Ser His

645 650 655

Pro Gln Phe Glu Lys

660

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9

taaatcgaat tcccaccatg tcaccttttc tcttgcaggc g 41

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10

cagcttcacc agtcttacaa gggcc 25

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11

ctgcctctgc tgtgcgtcgg tcgc 24

```
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12
ctattgaaag ggtctcgctt ctacg                                       25



 <210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      pre-pro signal peptide sequence

<400> 13
Leu Leu Gln Ala Leu Gln Leu Cys Cys Leu Cys Cys Ala
  1               5                  10



<210> 14
<211> 50
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
```

pre-pro signal peptide sequence

<400> 14

Ser Val Ala Ala Ala Leu Ala Ser Asp Ser Ser Ser Gly Ala Ser Gly
1   5   10   15

Leu Asn Asp Asp Tyr Val Phe Val Thr Pro Val Glu Val Asp Ser Ala
            20   25   30

Gly Ser Tyr Ile Ser His Asp Ile Leu His Asn Gly Arg Lys Lys Arg
        35   40   45

Ser Ala
    50

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
CD36-binding motif

<400> 15

Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly
1   5

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

tggtatgatt cacgacggag aaggg 25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17

cgggtcacca tcctcacgta ctgta 25

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18

aaccctcgtg gtggcagaca ag 22

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19

tcattccagc tggcgcccga agcat 25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20

gataactttc ccagagcgaa gatgc 25

<210> 21

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 21

aattcccacc atggagtgcg ccctcctgct cgcgtgtgcc t 41

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 22

cccaccatgg agtgcgccct cctgctcgcg tgtgccttcc cggctgcg 48

<210> 23

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 23

tcccggctgc gggttcgggc ccgccgaggg gcctggcggg actggggcgc gtggccaag 59

<210> 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 24

```
ggttcgggcc cgccgagggg cctggcggga ctggggcgcg tggccaaggc gctccagct  59
```

<210> 25

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 25

```
gcgctccagc tgtgctgcct ctgctgtgcg tcggtcgccg c                     41
```

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 26

gtgctgcctc tgctgtgcgt cggtcgcc 28

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27

ctcgcggttg aggacaaact cttcg 25

<210> 28

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28

cccttgcaat gaaaatagct tggattttgg aagcgcttgg agccacccgc agttcgaaaa 60

ataaggcggc cgccgcaaa 79

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide sequence

<400> 29

Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 30

catgggcagc tcgag 15

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31

ctgcaggcga gcctgaattc ctcgagccat catg 34

<210> 32

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32

```
cgaggttaaa aaacgtctag gcccccccgaa ccacggggac gtggttttcc tttgaaaaac 60
acgattgc                                                          68
```