

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. (45) 공고일자 2006년03월10일  
A01K 67/027 (2006.01) (11) 등록번호 10-0558288  
(24) 등록일자 2006년02월28일

(21) 출원번호	10-2000-7006731	(65) 공개번호	10-2001-0033289
(22) 출원일자	2000년06월17일	(43) 공개일자	2001년04월25일
번역문 제출일자	2000년06월17일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/027056	(87) 국제공개번호	WO 1999/31969
국제출원일자	1998년12월18일	국제공개일자	1999년07월01일

(81) 지정국      국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 엔 몬테네그로, 짐바브웨,

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

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

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

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

(30) 우선권주장	60/068,312	1997년12월19일	미국(US)
	08/994,689	1997년12월19일	미국(US)

(73) 특허권자      와이어쓰  
미합중국 뉴저지 매디슨 파이프 지랄다-팜즈 (우편번호 07940-0874)

(72) 발명자      뉴홀드리사엔  
미국뉴저지08540프린스톤캐슬튼로드23  
  
킬러로랜마리  
미국펜실베이니아18940뉴타운팜뷰드라이브206

(74) 대리인      차윤근

심사관 : 김정태

## (54) 연골의 퇴행성 질환용 트랜스제닉 동물 모델

### 요약

본 발명은 재조합 매트릭스-분해효소(MDE), 특히 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 일시적이고 공간적으로 조절된 방식으로 발현할 수 있는 트랜스제닉 동물을 포함하는, 연골-퇴행성 질환용 동물 모델 시스템을 제공한다. 본 발명은 또한, 포유동물에서 연골-퇴행성 질환의 표현형 지시자를 생성하는 방법 및 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜 측정방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 구성성 효소 활성을 보이는 proMMP를 암호화하는 분리된 핵산 및 분리된 proMMP 폴리펩타이드를 제공한다.

### 대표도

도 2a

### 색인어

proMMP, 연골-퇴행성 질환, 트랜스제닉 동물

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 재조합 매트릭스-분해효소를 일시적이고 공간적으로 조절된 방식으로 발현하는 트랜스제닉 포유동물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 치료제 및 치료법 확인 시스템을 포함하여, 퇴행성 관절 질환 연구를 위한 그러한 트랜스제닉 포유동물을 포함하는 모델 시스템에 관한 것이다.

#### 배경기술

골관절염, 류머티스성 관절염, 및 골연골이형성증 같은 관절 및 디스크 질환을 포함한 연골의 퇴행성 질환은 특히 노년층에 만연되어 있다. 이러한 질환에 공통적으로 나타나는 초기 증후로는 관절내 프로테오글리칸의 진행성 감소(변색성의 상실로 입증); 콜라겐 분해; 연골 표면의 피브릴화; 및 궁극적으로, 연골의 감소(관절 공간 협소화로서 방사선학적으로 입증)가 포함된다.

이러한 질환에 영향받는 1차 표적 중 하나는 관절 연골에서 발견되는 주요 구조 콜라겐인 II형 콜라겐이다. II형 콜라겐과 연골 및 골의 정상적인 리모델링 동안 II형 콜라겐을 분해하는 이화효소의 생성 간에는 균형이 존재한다. 예를 들면, 퇴행성 관절 질환 같은 병리학적 증상은 이러한 균형이 붕괴될 때 일어날 수 있다.

세포외 매트릭스 성분을 분해하는 효소로는 아연-의존형 효소 계열인 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP), 및 어그리카나제가 있다(표 1).

표 1

매트릭스-분해효소							
	기질						
	콜라겐	젤라틴	프로테오 글리칸	피브로넥틴	라미닌	엘라스틴	기타
I. 메탈로프로테이나제							
콜라게나제							
MMP-1 (강 콜라게나제)	I, II, III, VII, X	✓					
MMP-8 (호중구 콜라게나제)	I, II, III						
MMP-13 (콜라게나제 3)	I, II, III	✓					
젤라티나제							
MMP-2 (젤라티나제 A)	IV, V, VII, XI	✓		✓	✓	✓	
MMP-9 (젤라티나제 B)	IV, V	✓	✓				
스트로멜라이신							
MMP-3 (스트로멜라이신 1)		✓	✓	✓	✓		MMP 지모겐 활성화
MMP-7 (메틸라이신)	IV	✓	✓	✓	✓	✓	
MMP-10 (스트로멜라이신 2)	IV, V, IX		✓	✓	✓		MMP 지모겐 활성화
MMP-11 (스트로멜라이신 3)	IV			✓	✓		서편 활성화
기타							
MMP-12 (메탈로엘라스타제)						✓	
MMP-14		✓					proMMP- 2, proMMP- 13
MMP-15							
MMP-16							proMMP- 2
MMP-17							
II. 이그리카나제			✓				

MMP는 성숙한 관절 연골에서 연골-특이성 매트릭스 표현형을 유지하는 말단 분화세포인 연골세포에 의해 연결 관절에서 합성된다. 내생성 MMP 억제자에 대한 MMP의 과발현이 퇴행성 관절 질환에서 발생함에 따라, 연골 분해를 초래할 수도 있다. 예를 들면, II형 콜라겐은 MMP-13 및 MMP-1에 대한 기질이며[참조문헌:Knauper et al. J. Biol. Chem. 271:1544, 1996] MMP-1 및 MMP-13 단백질 모두 인간 골관절염 조직에서 면역조직화학적으로 검출될 수 있다. 일부 경우에는 MMP-13 및 이의 절단 산물이 MMP-1보다 높은 수준으로 발견되고 있다[참조문헌:Billingham et al., J. Clin. Inves. 99:1534, 1997]. 따라서, MMP-13는 골관절염 및 기타 퇴행성 관절 질환을 수반한 연골 분해에서 중요한 역할을 할 수 있다[참조문헌:Mitchell et al., J. Clin. Inves. 97:761, 1996].

골관절염-관련증에 대한 동물 모델이 기니 피그에서[참조문헌:Watson et al., Arth. Rheum. 39:1327, 1996] 및 마우스의 근친교배 STR/ORT 중[참조문헌:Das-Gupta et al., Int. J. Exp. Path. 74:627, 1993]에서 설명되어 있다. 기니 피그에서, 자발성 골관절염은 발생 코스가 길며(6개월 이상), STR/ORT 마우스의 특정 아계통만이 일관되게 퇴행성 관절 질환이 발병한다. 따라서, 이들 모델의 지속기간 및/또는 가변성이 이들로 하여금 약제 발견 연구에 덜 적용가능하게 한다.

기타 골관절염-관련 모델로는 연골 분해를 촉진하는, 수술-유도된 관절 탈안정화, 예를 들면 토기와 개에서의 전방 십자인대 가로절개 및/또는 부분 반월연골절제술을 포함한다[참조문헌:Hulth et al., Acta Orthop. Scand. 41:522, 1970]. 다른 모델은 생화학적 인대 가로절개를 유도하기 위하여 동물의 관절에의 박테리아 콜라게나제 주사를 이용한다[참조문헌:Van der Kraan et al., J. Exp. Pathol. 71:19, 1990]. (i)개개 동물의 수술 또는 기타 조작이 요구되고; (ii)동물이 대형이고 고가이며; 및/또는 (iii)질환의 진행이 일관적이지 않기 때문에, 이러한 모델은 약제 스크리닝을 포함한 대규모 연구에 손쉽게 사용될 수 없다.

트랜스제닉 동물 모델은 원칙적으로, 퇴행성 관절 질환용의 재현가능한 동물 모델 시스템에 대한 기회를 제공할 수 있다. 그러나, MMP-1 및 스트로멜라이신과 같은 MMP를 발현하는 트랜스제닉 동물을 공학처리하려는 이전의 시도는 트랜스제닉 동물에서 관찰가능한 관절 퇴행 표현형을 끌어내지 못하였다. 이러한 결과는 이들 효소의 구성적 발현으로 초래된 뼈 치사성에 기인할 수 있다. 포유동물 조직에서 MMP-1 및 스트로멜라이신을 구성적으로 발현하는 트랜스제닉 동물이 창작 되었지만[참조문헌;Witty et al., Mol. Biol. Cell 6: 1287, 1995] 이들 동물은 골관절염 증후를 보이지 않는다. 문헌 [참조:D'Armiento et al, Cell 71:955, 1992]에는 폐에서 인간 간질성 콜라게나제를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 개시하고 있다. 문헌[참조:Liu et al., J. Cell Biol. 130:227, 1995]에는 돌연변이된 II형 콜라겐을 과발현하여, 결합조직 결합을 초래하지만 골관절염은 일으키지 않는 트랜스제닉 동물을 개시하고 있다. 이들 트랜스제닉 동물 시스템 중 어느 것도 골관절염에 대한 유용한 동물 모델을 제공하지 못하고 있다[참조문헌:Khokha et al., Cancer and Metastasis Rev. 14:97, 1995; Shapiro, Matrix Biol. 15:527, 1997].

따라서, 예를 들면, 골관절염, 류머티스성 관절염, 및 연골발육부전 같은 인간 퇴행성 관절 질환을 모방하는 동물 모델 시스템이 당업계에서 필요하다. 발현이 연골 퇴행을 일으키는 조절가능한 이종 유전자를 함유하는 트랜스제닉 동물이 트랜스진의 발현 타이밍 및 발현 수준에 대한, 및 이에 따라 병리학적 증후 자체에 대한 재현가능한 실험 대조군의 제공에 특히 유리하다. 이러한 동물을 사용하여 어느 정도의 트랜스진 발현 수준이 질병을 일으키는 데 요구되는지를 측정할 수 있고, 중요하게는 약제의 발견 및 치료법의 최적화에 사용될 수 있다. 특히, 이러한 트랜스제닉 동물을 사용하여 연골 분해에서 매트릭스-분해효소의 역할을 좀더 자세히 규정하는 데 및 퇴행성 관절 질환의 진행을 억제하는 이러한 효소 또는 화합물을 조정하는 화합물의 동정을 위한 생체내 스트린으로서 사용될 수 있다.

**발명의 요약**

본 발명은 체세포 및 생식세포가 효소적 활성 매트릭스-분해효소(MDE), 바람직하게는 MMP를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 이종 또는 재조합 유전자를 안정하게 통합된 형태로 함유하고 있는 트랜스제닉 비-인간 동물 또는 이의 후대를 제공한다. 본 발명에 사용하기 위한 MMP는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, 및 MMP-17 중 하나 이상, 바람직하게는 MMP-1, MMP-3, MMP-8 및 MMP-13 중 하나 이상, 가장 바람직하게는 MMP-1 및 MMP-13 중 하나 이상을 포함하고; 이들 폴리펩타이드의 효소적 활성 변이체, 단편, 및 배합물을 포함한다. 예를 들면, 어그리카나제를 포함한 기타 매트릭스-분해효소도 사용될 수 있다. MDE는 임의의 종, 바람직하게는 인간으로부터 유래할 수 있다. 바람직한 양태에서, 재조합 MDE-암호화 유전자는 트랜스제닉 동물의 관절 연골세포에서 선택적으로 발현되며 이러한 발현은 퇴행성 관절 질환의 특징적인 병리학적 증후를 초래한다.

일면으로서, 본 발명은 MDE 또는 이의 효소적 활성 유도체 또는 변이체, 바람직하게는 서열번호 4에 나타난 서열을 포함하는 구성적 활성 proMMP-13 변이체(MMP-13\*로 명명)를 암호화하는 안정하게 통합된 제 1 재조합 유전자를 함유한다. 바람직하게는, 제 1 재조합 유전자는 제 1 조절가능한 프로모터의 통제하에 있으며, 가장 바람직하게는 제 1 조절가능한 프로모터는 예를 들면, 서열번호 5에 나타난 프로모터와 같은 tet07 서열을 포함한다. 트랜스제닉 동물은 제 1 조절가능한 프로모터를 조절하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제 2 재조합 유전자를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 tTA 폴리펩타이드이다. 이러한 양태에서, 제 2 재조합 유전자는 제 2 조절가능한 프로모터, 바람직하게는 관절-특이성 프로모터로부터 유도된 서열을 포함하는 것, 가장 바람직하게는 예를 들면 서열번호 6에 나타난 프로모터와 같은 II형 콜라겐 프로모터의 통제하에 있다. 따라서, 관절 조직내 제 2 재조합 유전자의 선택성 발현은 재조합 MDE의 조절된 관절-특이성 발현을 초래한다.

다른 일면으로서, 본 발명은 효소적 활성 MMP 변이체, 바람직하게는 인간 proMMP-13 변이체, 가장 바람직하게는 MMP-13\*을 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 이들 핵산을 포함하는 재조합 클로닝 벡터; 벡터를 포함하는 세포; MMP-13 발현에 적당한 조건하에 세포를 배양하는 단계를 포함하는 MMP-13-유도 폴리펩타이드의 생산방법; 및 분리된 MMP-13-유도 폴리펩타이드도 포함한다.

다른 일면으로서, 본 발명은 본 발명의 트랜스제닉 동물을 트랜스진에 의해 암호화된 MDE의 발현을 이끄는 조건에 노출시키는 단계를 포함하는, 포유동물에서 연골-퇴행성 질환의 특징적인 표현형 변화를 일으키는 방법을 제공한다. 바람직한 양태에서, tet07 프로모터에 작동적으로 연결된 MMP-13\*를 암호화하는 제 1 재조합 유전자 및 II형 콜라겐 프로모터에 작동적으로 연결된 tTA 단백질을 암호화하는 제 2 재조합 유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물을 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 존재하에 유지시킨다. MMP-13\*의 발현 유도를 원할 경우, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체를 제거한다. MMP-13\*를 관절 조직에서 선택적으로 발현시키면, 연골-퇴행성 질환의 특징적인 표현형 변화가 일어난다.

다른 일면으로서, 본 발명은 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화(counteract) 포텐셜 측정방법을 제공한다. 방법은 기지 용량의 조성물을 본 발명의 트랜스제닉 동물에, 연골-퇴행성 질환의 표현형 지시자가 발생하기 전이나 후에 투여하고; 조성물 투여 뒤에 소정의 시간 동안 지시자를 모니터한 다음; 조성물이 투여된 동물내 지시자의 범위를 조성물에 노출시키지 않은 대조군 트랜스제닉 동물과 비교함으로써 수행된다. (i)연골-퇴행성 질환의 표현형 지시자의 성질이나 범위, (ii)지시자의 발생에 요하는 시간, 또는 (iii)다른 개선적 치료책의 필요성에 있어 차이는 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜을 표시한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b: (a)인간 MMP-13(콜라게나제-3)의 구조 개략도. 제 1 박스(극단의 아미노 말단에 해당)는 분비를 위한 초기 proMMP-13을 표적화하는 프리(pre) 도메인(시그널 펩타이드)을 나타낸다. 제 2 박스는 효소의 잠재성 유지에 관련되는 프로(pro) 도메인을 나타낸다. 효소의 잠재성 유지에 중요한 프로 도메인 안의 보존 서열(서열번호 1)이 나타나 있다. 제 3 박스는 촉매활성에 중요한 보존 영역(예시:서열번호 2)을 함유하는 170-아미노산 촉매 도메인을 나타낸다. 제 4 박스는 200-아미노산 카복시 말단 도메인을 나타낸다. (b)MMP-13\*으로 명명된 인간 pro MMP-13의 구성적 활성 변이체를 암호화하는 핵산서열(서열번호 3), 및 MMP-13\*의 아미노산 서열(서열번호 4)도. 더 큰 활자체로 묘사되고 있는, 야생형 MMP-13에 대해 돌연변이되는 잔기는 뉴클레오타이드 위치 299-301에서의 GTC이다.

도 2a 및 2b: 연골세포 특이적이고, 독시사이클린(DOX) 조절된 MMP13\* 발현 달성에 사용된 2성분 전략. (a)제 1 작제물은 뒤에 SV40 스플라이스 및 폴리아데닐화 시그널이 따르는, 테트라사이클린 억제자 - VP16 활성화자 융합 단백질(TA)의 발현을 추진하는 래트 II형 콜라겐 프로모터를 도시한다(이 작제물은 CPE-TA로 언급한다). (b)제 2 작제물은 뒤에 SV40 스플라이스 및 폴리아데닐화 시그널이 따르는, 구성적 활성 인간 MMP13 단백질의 발현을 추진하는 Tet07 프로모터[참조문헌:Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547, 1992]를 도시한다(이 작제물은 Tet07-MMP13\*로 언급한다). 이들 두 독립된 트랜스진 작제물을 수태한 마우스 배아에 함께 미세주사하여 두 유전자 모두를 보유하는 이중 트랜스제닉체를 생성시킨다. DOX의 존재하에서, 트랜스진 발현은 중단되고; DOX가 제거될 때, 트랜스진 발현은 작동된다. 화살표는 전사 개시부위를 나타내며, 별표는 MMP13 트랜스진내 구성적 활성 돌연변이를 표시한다.

도 3a 및 3b: II형 콜라겐 유전자 프로모터는 래트 II형 콜라겐 프로모터의 통제하에  $\beta$ -갈락토시다제를 발현하는 테스터 트랜스제닉 마우스 관절에 발현을 지시한다. (a)CPE-lacZ 작제물의 다이어그램. 래트 II형 콜라겐 프로모터(제 1 박스)는 뒤에  $\beta$ -글로빈 스플라이스 및 폴리아데닐화 시그널(스플라이스 심볼에 의해 연결된 최종 박스)이 따르는,  $\beta$ -갈락토시다제(lacZ) 유전자(제 2 박스)의 발현을 추진한다. (b)E16 배아에서의  $\beta$ -갈락토시다제 활성화에 대한 전체 고정 염색. 좌측의 배아는 야생형 배아와 비교한 트랜스제닉체의 염색(화살표)을 보인다. (c)트랜스제닉 팔꿈치 및 앞발의 확대도;  $\beta$ -gal 염색은 가시적이다(화살표). 도 3b 및 3c는 컬러로 묘사될 때 본 발명을 좀더 인상적으로 설명하지만, 흑백묘사라도 본 발명의 이해에는 충분하다.

도 4a 및 4b. RT-PCR에 의한 TA 및 MMP13 RNA의 발현 프로파일. (a)전체 RNA로부터 TA cDNA의 증폭. (b)전체 RNA로부터 MMP13\* cDNA의 증폭. 레인 1:  $\phi$ x164 Hae III MW 마커; 레인 2: 트랜스제닉(라인 6) 게놈 DNA의 PCR 증폭; 레인 3:비-트랜스제닉 게놈 DNA의 PCR 증폭; 레인 4:DOX 상에 유지된 야생형 마우스; 레인 5:DOX 부재하의 야생형 마우스; 레인 6-7:DOX 상에 유지된 트랜스제닉 마우스(약 4개월령); 레인 8-9:출생시 DOX로부터 제거된 트랜스제닉 마우스(약 4개월령). 화살표 1a 및 1b는 648 bp MMP13\* 특이성 단편 및 859 bp 특이성 단편을 각각 표시한다. 각각의 반응을 내부 대조군으로서 c-fos 프라이머를 사용하여 실행하였으며, 스플라이싱 mRNA는 187 bp(화살표 3)를 생성하고 비스플라이싱 mRNA는 303 bp(화살표 2)를 생성하였다. RT 처리하지 않은 PCR용 RNA를 함유하는 상응하는 레인에서는 어떠한 밴드도 검출되지 않았다(데이터 비예시).

도 5a 및 5b: 도 2에 나타낸 트랜스진을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 성장판 및 관절 연골에서 II형 콜라겐 절단 산물의 면역조직화학적 국재의 사진도. 조직을 II형 콜라겐의 절단 산물을 인식하는 항체로 염색한다. (a)MMP-13\* 발현을 억제하기 위하여 독시사이클린 상에서 유지시킨 마우스로부터 유도된 조직. (b)생후 3개월째에 30일간, MMP-13\*의 발현을 허용하는, 독시사이클린으로부터 제거된 마우스로부터 유도된 조직. 도 5a 및 5b는 컬러로 묘사될 때 본 발명을 좀더 인상적으로 설명하지만, 흑색묘사라도 본 발명의 이해에 충분하다.

도 6a, 6b, 및 6c: 이중 트랜스제닉 마우스 슬개골의 관절 연골과 성장판의 사프란인 O 염색의 컬러 사진도. (a)독시사이클린 상에서 유지된 마우스로부터 유도된 조직. (b)독시사이클린으로부터 제거 7일 후 마우스로부터 유도된 조직. (c)독시사이클린으로부터 제거 14일 후 마우스로부터 유도된 조직. 도 6a-c는 컬러로 묘사할 때 본 발명을 좀더 인상적으로 설명하지만, 흑색묘사라도 본 발명의 이해에 충분하다.

도 7a, 7b, 7c, 및 7d: 뒷 무릎 관절(a 및 b)과 활액막(c 및 d)을 통한 종단면. (a 및 c) 연령 매치 한배 새끼 대조군 및 (b 및 d) DOX로부터 제거된 라인 6. 약어:L, 병변; AC, 관절 연골; AG, 맥관형성, IH, 침윤 과형성; BM, 골수; 및 PL, 슬개골 인대. 대퇴골 및 슬개골의 위치를 도면에 표시하였다. 도 7a-d는 컬러로 묘사될 때 본 발명을 좀더 인상적으로 설명하지만, 흑백묘사로도 본 발명의 이해에는 충분하다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 트랜스제닉 마우스의 연골내 매트릭스-분해효소의 조절된 발현이 관절과 추간판의 매트릭스 퇴행성 질환과 연관된 특징적인 표현형 변화를 일으킨다는 발견에 기초한다. 본 발명의 동물 모델은 인간의 관절과 추간판 병리의 상세한 특징규명 및 약제 발견과 치료법의 최적화에 사용될 수 있는 매트릭스 퇴행성 질환증을 위한 신모델 시스템을 제공한다.

본 발명에 따른 트랜스제닉 동물은 출생전(배아) 단계에서 동물 또는 동물의 선대에 도입된 트랜스진을 함유하는 세포를 지닌 동물이다. 트랜스제닉 동물은 예를 들면, 해당 유전자를 수정된 난모세포의 응성 전핵(前核)에, 예를 들면 미세주사에 의해 도입한 다음, 가임된 암컷 사육 동물에서 난모세포가 발생하도록 함으로써 만들어 낼 수 있다. 해당 유전자는 적당한 프로모터 서열, 및 인트론 서열과 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함할 수 있다. 트랜스제닉 동물의 생산방법은 예를 들면, US 특허 4,736,866와 4,870,009 및 문헌[참조:Hogan et al., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986]에 기재되어 있다. 트랜스제닉 화운더(founder) 동물은 트랜스진을 운반하는 추가의 동물을 사육하는 데 사용될 수 있다. 하나의 트랜스진을 운반하는 트랜스제닉 동물은 또한 두 트랜스진을 운반하는 "이중 트랜스제닉" 동물의 생산을 위해 제 2 트랜스진을 운반하는 다른 트랜스제닉 동물로 사육될 수 있다. 이와 달리, 두 트랜스진을 함께 미세주사하여 이중 트랜스진 동물을 생산할 수 있다. 둘 이상의 트랜스진을 운반하는 동물도 가능하다. 더욱이, 이형접합성 트랜스제닉 동물, 즉 트랜스진의 1 카피를 운반하는 동물을 트랜스진의 2 카피를 운반하는 동형접합성 동물의 생산을 위해 동일 트랜스진에 대해 이형접합성인 제 2 동물로 사육할 수 있다.

본 발명은 재조합 유전자로부터 MDE, 특히 MMP, 특히 콜라게나제 활성을 지닌 MMP를 발현하는, 트랜스제닉 동물, 바람직하게는 포유동물을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 MDE는 제한 없이 MMP 및 어그리키나제를 포함한다. 유용한 MMP는 제한 없이 MMP-1, MMP-8 및 MMP-13로 명명된 콜라게나제; MMP-3, MMP-10 및 MMP-11로 명명된 스트로멜라이신; MMP-2 및 MMP-9로 명명된 젤라티나제; MMP-12로 명명된 메탈로엘라스타제; 및 MMP-14, MMP-15, MMP-16, 및 MMP-17[참조문헌:Matrisian, BioEssays, 14:455, 1992]로 명명된 막형 MMP를 포함한다. 본원에서 사용되는 매트릭스-분해 활성은 예를 들면, 콜라겐, 특히 II형 콜라겐 및 가장 구체적으로는 II형 콜라겐의 삼중나선 형태를 포함한 매트릭스 성분의 단백질분해성 분해를 의미한다. 전술한 효소의 효소적 활성 단편을 포함하여, 매트릭스-분해 활성을 보이는 임의 폴리펩타이드가 본 발명의 실행에 사용될 수 있다. 바람직하게는, MMP-13 효소 활성이 발현된다. 본원에서 사용되는 MMP-13 효소 활성은 II형 콜라겐의 단백질분해성 분해를 의미한다. MMP-13 효소 활성을 보이는 임의의 MMP-13 폴리펩타이드 또는 이의 단편이나 유도체가 사용될 수도 있다. 효소는 제한 없이 인간, 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소, 또는 비-인간 영장류, 또는 이들의 조합을 포함하여 임의 동물 종으로부터 유도될 수 있다. 바람직하게는, MMP-13 또는 이의 유도체는 인간 기원이다.

통상적으로, MMP는 효소 활성이 잠재하는 전구체(즉, 지모겐 또는 전효소)로서 합성되며; 분비 후 프로(pro) 영역의 단백질분해성 제거는 효소적 활성 단백질을 생성한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 단백질분해성 프로세싱에 대한 필요는 비절단 상태에서도 효소적으로 활성을 띠는 효소 또는 전효소 변이체를 사용하여 우회된다. 이러한 변이체는 콜라게나제 효소 활성의 분석과 커플링된 부위-지향성 또는 랜덤 돌연변이유발을 위한 통상의 기술을 사용하여 생성될 수 있다(하기 참조). 이러한 방식으로, 변형(예를 들면, 삽입, 결실, 및 치환 포함)을 전효소 서열 중으로, 특히 프로 영역에 또는 프로 영역 절단 부위 부근에 도입시켜 활성화에 단백질분해성 프로세싱을 요하지 않는 구성적 활성 폴리펩타이드를 생성할 수 있다. 이와 달리, 프로 영역을 완전히 결실시킬 수도 있다. 또한, 천연 시그널 펩타이드를 암호화하는 서열이 시그널 펩타이드로서 작용하는, 즉 분비를 촉진하는 이중 서열로 대체되는 재조합 유전자가 사용될 수도 있다. 이러한 변형된 MMP 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 용도도 본 발명에 포함된다.

바람직하게는, 구성적 활성 MMP-13 변이체가 본 발명의 실행에 사용된다. 가장 바람직하게는, MMP-13 변이체는 PRCGVDPV 영역을 암호화하는 서열, 즉 서열번호 7에 돌연변이를 함유하는, 구체적으로는 Pro<sup>99</sup>가 Val로 치환되는 서열을 포함하며; 이러한 폴리펩타이드의 서열은 서열번호 4에 묘사되어 있으며 이러한 폴리펩타이드는 MMP-13\*으로 명명된다. 다른 양태로서, 구성적 활성 MMP-13 변이체는 Val<sup>98</sup>의 Gly로의 치환을 포함한다.

본 발명의 트랜스제닉 동물은 바람직하게는 조절된 방식으로 MMP 활성을 발현한다. 본원에서 사용되는 조절된 발현이란 일시적 및/또는 공간적 조절을 의미한다. 일시적 조절이란 트랜스제닉 동물의 발생에서 예정된 시기까지 MMP 활성의 발현 억제능을 의미하며, 그 후에는 MMP 발현이 활성화되고 원하는 만큼 장기간 유지될 수 있다. 바람직하게는, MMP 발현은 배아 발생 전반에 걸쳐 억제되고 성체 동물에서 활성화된다. 공간적 조절이란 특정 조직에서의 MMP 활성의 선택적 발현능을 의미한다. 바람직하게는, MMP 활성은 관절 조직에서, 가장 바람직하게는 관절 연골세포에서 선택적으로 발현된다.

MMP 발현의 일시적 조절은 전사 억제자, 전사 활성화자 또는 증강자, 또는 이들의 조합을, MMP-암호화 서열이 작동적으로 연결되는 사용된 전사 억제자/활성자에 반응성인 프로모터와 함께 포함하는 하나 이상의 폴리펩타이드의 사용에 의해 성취된다. 양태의 일 세트로서, MMP 발현의 일시적 조절은 (i)진핵세포에서 전사를 직접 또는 간접적으로 활성화하여 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드를 생성하는 폴리펩타이드에 작동적으로 연결된 억제자 폴리펩타이드의 트랜스제닉 동물에서의 발현; 및 (ii)전사 활성이 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드에 반응성인 MMP-암호화 서열에 작동적으로 연결된 표적 프로모터의 커플링 사용에 의해 성취된다. 전형적으로, 억제자 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 전사 활성화자 폴리펩타이드를 암호화하는 서열에 프레임으로 연결되어 융합 단백질을 암호화하는 키메릭 유전자를 생성한다.

유용한 억제자 폴리펩타이드는 제한 없이 테트라사이클린 억제자, LacR 억제자, KRAB 도메인, 및 람다 억제자(cro 및 cI)를 포함한 박테리아 억제자, 및 제한 없이 아미노산 또는 당 합성에 수반된 것들을 포함한 진핵세포 억제자로부터 유도된 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제한 없이 포함한다. 유용한 직접 전사 활성화자 폴리펩타이드로는 제한 없이 허피스 심플렉스 바이러스 단백질 16(VP16); 효모 GAL14; 효모 STAT; 예를 들면, 프로세스테론 수용체 및 에스트로젠 수용체와 같은 스테로이드 수용체; 및 예를 들면, c-fos, c-jun, 및 SP-1 같은 구성적 활성화자가 포함된다. 이와 달리, 억제자 폴리펩타이드는 억제자-활성자 융합 단백질과 상호작용하기 위하여 전사 활성화자를 보충하여 전사를 간접적으로 활성화하는 폴리펩타이드에 연결될 수 있으며; 이러한 간접 활성화자 폴리펩타이드로는 제한 없이 TATA Box 결합 단백질(TBP) 및 예를 들면, 염기 전사 인자 D를 포함하여 염기 전사 인자를 포함한다.

본 발명에 따라, 각각의 억제자-활성자 융합 단백질은 특정 융합 단백질에 반응성이고 MDE-암호화 서열의 전사를 조절하는 표적 프로모터와 함께 사용된다. 전형적으로, 프로모터는 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드의 억제자 성분에 반응성인 적어도 하나의 작동자 서열을 포함하며, 이는 진핵 세포에서 전사를 지원하는 적어도 최소 프로모터에 작동적으로 연결된다. 적당한 억제자-반응성 작동자 서열의 예로는 제한 없이, 이.콜라이내 Tn10에서 암호화된 테트라사이클린 내성 오페론, 람다 억제자 오페론, 및 효모 GAL 억제자 오페론으로부터 유도된 서열이 포함된다. 최소 프로모터가 유도될 수 있는 적당한 진핵세포 프로모터의 예로는 제한 없이, 사이토메갈로바이러스(CMV) IE 프로모터, PtK-1(티미딘 키나제) 프로모터, HSP(열 쇼크 단백질) 프로모터, 및 TATA 박스를 함유하는 진핵세포 프로모터가 포함된다. 최소 프로모터 서열은 (i) 통상의 방법을 사용하여 결실 돌연변이체를 생성하고 (ii)생성되는 서열의 세포주내 전사 활성화능을 시험함으로써 이들 프로모터로부터 유도될 수 있다. US 특허 5,650,298은 VP16 서열과 융합된 테트라사이클린 억제자로부터 유도된 서열(tTA로 명명), 및 CMV IE 프로모터의 일부에 연결된 Tn 10-유도된 서열을 포함하는 tTA-반응성 프로모터(tet07로 명명)로 이루어진 억제자-활성자 융합 단백질을 기재하고 있다.

이와 달리, 일시적 조절은 (i)이중 또는 재조합 전사 활성화자 폴리펩타이드(들)의 트랜스제닉 동물에서의 발현 및 (ii)전사 활성이 이중 또는 재조합 전사 활성화자에 반응성인 MMP-암호화 서열에 작동적으로 연결된 표적 프로모터의 커플링 사용에 의해 달성된다. 유용한 전사 활성화자로는 제한 없이, 글루코코르티코이드 수용체의 아미노말단 전사활성화 도메인에 연결된 VP16 전사활성화 도메인이 엑디손 수용체의 리간드-결합 도메인 및 카복시말단 서열과 융합되는 변형된 엑디손 수용체 [참조문헌:No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3346, 1996]; VP 16 활성화자 서열, GAL4 활성화자 서열, 및 돌연변이된 프로세스테론 수용체 리간드-결합 도메인을 포함하는 키메릭 단백질(pGL-VP로 명명)[참조문헌:Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8180, 1994; Wang et al., Gene Therapy 4:432, 1997]; 및 에스트로젠(또는 기타 스테로이드) 결합 도메인과 융합된 전사 활성화자를 포함하는 키메릭 단백질[참조문헌:Mattioni et al., Meth. Cell Biol. 43:335, 1994]이 포함된다. 엑디손 수용체 시스템은 레티노이드 X 수용체(RXR)를 사용하여 키메릭 수용체와의 헤테로 이량체를 형성하고, 엑디손, 뮤리스테론(엑디손 동족체) 또는 텍사메타손에 반응한다. pGL-VP 시스템은 미페프리스톤(RU486)에 반응성이다. 에스트로젠 결합 도메인을 함유하는 키메릭 수용체는 하이드록시타목시펜(에스트로젠 동족체)에 반응한다.

MDE 발현의 공간적 조절은 관절 조직에서 선택적으로 전사를 지시하는 전사 프로모터의 사용에 의해 달성된다. 본원에서 사용되는 관절-특이성 발현이란 타 세포에서 보다는 관절에서 더 큰 발현을 의미하며; 전형적으로, 비-관절 조직에서의 발현 수준은 관절에서의 발현 수준의 10% 이하이다. 바람직하게는, 비-관절 조직에서의 발현은 검출불가이다. 프로모터 서열이 작동적으로 연결되는 서열에 관절-특이성 발현을 부여하는 유용한 프로모터 서열은 제한 없이, 콜라겐 II형 프로모

터로부터 유도된 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 관절-특이성 프로모터가 특정 서열 또는 아서열의 하나 이상의 카피를 포함할 수 있고, 이러한 서열은 상호 간에 및 발현이 프로모터에 의해 조절되는 서열에 대해 똑바른 배향 또는 역 배향으로 존재할 수 있음이 이해될 것이다.

MDE 발현의 통합된 공간적 및 일시적 조절은 바람직하게는 (i)억제자-활성자 융합 폴리펩타이드 또는 전사 활성자 폴리펩타이드의 발현을 관절-특이성 프로모터의 통제하에 두고; (ii)MDE 또는 이의 유도체의 발현을 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드 또는 전사 활성자 폴리펩타이드에 반응성인 프로모터의 통제하에 둔 다음; (iii)트랜스제닉 동물을 태아 발생 및 생존 초기 동안 MDE 발현이 억제되는 조건하에 유지시킴으로써 달성된다.

MDE 발현이 억제되도록 트랜스제닉 동물을 태아 및 초기 출생후 발생 동안 유지시키는 방법은 발현되는 특정 트랜스진에 좌우될 것이다. 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드가 사용될 경우, 억제는 억제자-활성자 융합 단백질에 결합하여 표적 MDE 유전자의 전사 억제를 일으키는 제제를 동물에 제공함으로써 달성된다. tet 억제자 서열을 함유하는 억제자-활성자 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 트랜스진을 포함하는 동물에서, 억제는 어미, 및 출생 뒤 새끼의 먹이나 식수에 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체를 제공함으로써 달성된다. 테트라사이클린 또는 동족체는 또한, 외과적으로 이식된 피하 시간-방출 펠릿(Innovative Research of America, Inc., Sarasota FL)을 사용하여 제공될 수도 있다. 이 경우에, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 억제자-활성자 융합 단백질과의 결합은 융합 단백질의 동족(cognate) 프로모터에의 결합, 및 동족 프로모터의 전사 활성화를 방지한다. 테트라사이클린 동족체는 적어도 약  $10^6 M^{-1}$ 의  $K_a$ , 바람직하게는 약  $10^9 M^{-1}$  이상의 친화성으로 tet 억제자에 결합하는 테트라사이클린과 밀접히 관련된 화합물이다. 유용한 테트라사이클린 동족체에는 제한 없이, 독시사이클린, 언하이드로테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 에피옥시테트라사이클린 등이 포함된다. 사용된 용량은 MMP 발현의 실질적인 억제를 일으키는 양이다. 전형적으로, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체는 동물의 식수에 약 1 mg/ml의 용량으로 투여된다. MMP가 발현되기를 요망할 때, 테트라사이클린 또는 이의 동족체는 억제된다.

다른 양태에서, 억제는 전사 활성자 폴리펩타이드의 활성화에 요구되는 제제를 동물로부터 억제함으로써 달성된다. 예를 들면, 전사 활성자가 변형된 엑디손 수용체이면, 동물은 태아 및 초기 출생후 발생 전반에 걸쳐 엑디손 또는 엑디손 동족체의 부재하에 유지된다. 엑디손 동족체는 적어도 약  $10^6 M^{-1}$ 의  $K_a$ 로 변형된 엑디손 수용체와 결합하는 엑디손과 밀접하게 관련된 화합물이다. 유용한 엑디손 동족체로는 제한 없이 뮤리스테론 A가 포함된다. MDE를 발현시키고자 하는 경우, 동물에 예를 들면, 엑디손 또는 뮤리스테론 A를 복강내 주사를 통해 동물 당 약 10 내지 약 20 mg의 용량으로 투여한다. 이와 유사하게, pGL-VP가 사용될 경우, 활성화는 미페프리스톤을 제공함으로써 달성된다.

본 발명의 바람직한 양태에서, 체세포 및 생식세포가 두 재조합 유전자: (i)MMP-13\*를 암호화하는 서열을 포함하는 제 1 재조합 유전자(여기에서, 서열은 tetO7 프로모터에 작동적으로 연결된다); 및 (ii)콜라겐 II형 프로모터에 작동적으로 연결된 tTA 단백질을 암호화하는 제 2 재조합 유전자를 적당히 통합된 형태로 함유하는 트랜스제닉 동물이 작제된다. 이러한 양태에서, 동물은 유전자를 억제하기 위하여 태아 및 초기 출생 후 발생 전반에 걸쳐 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체 존재하에서 유지된다. 그 후에, 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체를 제거하고, MMP-13 효소 활성을 관절 조직에서 선택적으로 발현시킨다.

#### 연골-퇴행성 질환용 동물 모델

본 발명은 예를 들면, 관절 또는 디스크 질환과 같은 연골-퇴행성 질환의 특징적인 표현형 변화가 재현가능하게 보여지는 동물 모델 시스템을 제공한다. 이러한 질환으로는 제한 없이, 골관절염, 류머티스성 관절염, 연골발육부전, 및 퇴행성 추간판 질환이 포함된다. 본 발명의 모델 시스템은 이러한 질환에 공통인 하나 이상의 표현형 지시자를 보이며, 이러한 것들에는 제한 없이, 프로테오글리칸의 감소(예를 들면, 사프라닌 O 염색의 감소에 의해 표시) 및 환부 조직에서 II형 콜라겐의 절단이 포함된다. 시스템은 재조합 또는 이종 MDE, 특히 MMP가 트랜스제닉 동물의 일생에서 예정된 시기에 연골에서 발현되는 전술한 트랜스제닉 동물을 포함한다. 연골-퇴행성 지시자의 출현 타이밍은 MDE 발현을 활성화하고 연골에 대한 영향을 모니터링함으로써 측정된다(하기 참조). 바람직하게는, 하나 이상의 MDE가 출생 후에 발현되며, 가장 바람직하게는 동물이 성체가 된 후에 발현된다.

트랜스진의 발현은 전형적으로, 상이한 조직으로부터 mRNA를 추출한 다음 추출된 mRNA를: (i)트랜스진에 상동한 프라이머를 사용하는 역전사효소-폴리머라제 연쇄반응(RT-PCR); (ii)RNAase 보호; 및 (iii)노던 블롯 분석 중 하나 이상에 투입함으로써 모니터링된다. 이와 달리, 현장 하이브리드화가 사용될 수도 있다.



관절 연골에 미치는 MDE 발현의 생리학적 효과는 동물을 참수한 다음 파라핀에 묻은 탈석회 연골을 (i)헤마톡실린 및 에 오신(통상적인 기술 이용) 염색, 이어서 (ii)사프라닌 O 및 웨스트 그린으로 이중 염색함으로써 시험 동물에서 모니터된다 [참조문헌:Peter et al., J. Exp. Pathol. 71:19, 1990]. 대안으로, 동결 절편을 수득하여 II형 콜라겐으로부터 유도된 절단 단편에 특이적인 항체로 염색시킬 수도 있다[참조문헌:Billingham et al., J. Clin. Invest. 99:1534, 1997]. 전형적으로, 적어도 약 7일간 MMP 트랜스진의 발현은 프로테오글리칸의 검출가능한 감소 및 성장판 형태의 변화를 초래한다(예를 들면, 하기 실시예 5 참조). MDE, 특히 MMP, 가장 구체적으로는 MMP-13의 효소적 활성형태의 발현이 프로테오글리칸 감소 및/또는 II형 콜라겐의 절단을 초래하는 동물 모델이 본 발명의 범위내에 들어온다.

본 발명에 따라 생산된 트랜스제닉 동물에서 모니터될 수 있는 연골-퇴행성 질환의 다른 표현형 지시자로는 제한 없이, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰 및 (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거가 포함된다.

본 발명의 트랜스제닉 동물이 유용한 모델을 제공하는 증후는 제한 없이, 골관절염; 류머티스성 관절염; 퇴행성 추간관 질환; 예를 들면, Kniest 형성장해, 연골무형성증, 및 저인산효소증을 포함한 연골발육부전; 및 예를 들면, 단형(短型, brachymorphic) 동물에서 발생하는 바와 같은 프로테오글리칸-매개 질환을 포함한, 연골의 조성, 형태, 및/또는 기능의 교란을 표명하는 병리학적 증상을 포함한다[참조문헌:Hall et al., Cartilage: Molecular Aspects, CRC Press, 1991, pp 201-203].

본 발명의 추가 양태에서, 트랜스제닉 동물을 추가처리하여 연골-퇴행성 지시자를 조정하고/하거나 동물의 질환 표현형을 예를 들면, 특정 질환과 관련된 것들과 같은 부수적인 생리학적 효과로 보충시킬 수 있다. 예를 들면, 트랜스제닉 동물은 염증 매개자로 추가 처리하여 콜라겐 분해를 증대시키고/시키거나 프로테오글리칸의 감소를 유도할 수 있다(예를 들면, 하기 실시예 6 참조). 더욱이, 부수적인 처리를 하거나 하지 않고 MDE 유도의 타이밍과 범위를 적용하여 특정 질환이나 증상의 증후군을 그대로 복제할 수 있다.

#### 연골의 퇴행성 질환을 조절하는 약제의 평가 방법

본 발명은 연골의 퇴행성 질환, 특히 퇴행성 관절 질환에 대한 효능에 대한 약제와 치료법의 발견 및 평가 방법을 포함한다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물은 하나 이상의 MDE의 발현이 연골-퇴행성 질환의 하나 이상의 표현형 지시자를 유도하는 조건하에서 유지시킨다. 일단, 증후가 발생하면, 증후가 발생한 동물에 기지 용량의 조성물을 투여하고; 조성물 투여 뒤에 소정 시간 동안 표현형 지시자를 모니터한 다음; 조성물을 투여한 동물에서의 표현형 지시자의 범위를 대조군 동물에 대해 비교함으로써, 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜을 평가할 수 있다. 대조군 동물은 동일한 섭생하에 유지되지만(즉, 트랜스진 발현) 조성물을 투여하지 않는 연령- 및 성별-매치된 트랜스제닉 동물을 포함한다. 표현형 지시자의 범위 또는 성질에 있어 통계학적 유의차는 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜을 표시한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 연골-퇴행성 질환의 표현형 지시자란 프로테오글리칸 감소, 관절 공간의 협소화, 콜라겐 분해, 및 연골의 파괴를 의미한다.

본 발명의 다른 양태에서, 조성물의 연골의 퇴행성 질환, 특히 퇴행성 관절 질환 중화 포텐셜은 트랜스제닉 동물에서 MDE 발현의 유도 전 및/또는 유도와 동시에 기지 용량의 조성물을 트랜스제닉 동물에 투여하고; 조성물 투여와 MDE 유도 뒤에 소정 시간 동안 연골-퇴행성 질환의 표현형 지시자를 모니터한 다음; 조성물이 투여된 동물에서의 표현형 지시자 및/또는 질환의 범위를 조성물에 노출시키지 않은 대조군 동물과 비교함으로써 평가된다. 이러한 양태에서, 표현형 지시자 및/또는 질환의 범위나 성질의 통계학적 유의차, 또는 표현형 지시자 또는 질환의 출현에 있어 통계학적으로 유의한 지연은 조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜을 표시한다.

조성물의 연골-퇴행성 질환 중화 포텐셜의 추가 표시는 예를 들면, 질환의 증후 완화에 사용된 기타 치료제의 투여 용량과 타이밍을 포함한 다른 치료법의 범위나 지속기간의 감소를 초래하는 조성물의 능력이다.

항-연골-퇴행성 질환 포텐셜에 대해 시험될 수 있는 화합물은 예를 들면, 천연 산물 라이브러리, 발효 라이브러리(식물 및 미생물 포함), 조합 라이브러리, 화합물 파일, 합성 화합물 라이브러리, 및 지정된 이론적 약제 디자인 및 합성으로부터 생기는 화합물에서 발견될 수 있다. 예를 들면, 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex(Princeton, NJ), Brandon Associates(Merrimack, NH), 및 Microsource(New Milford, CT)로부터 시판되고 있다. 회귀 화학약품 라이브러리는 Aldrich Chemical Company, Inc.(Milwaukee, WI)로부터 입수가 가능하다. 이와 달리, 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 예를 들면, Pan Laboratories(Bothell,

WA) 또는 MycoSearch(NC)로부터 입수가가능하거나, 용이하게 생산가능하다. 아울러, 천연 및 합성 생산된 라이브러리 및 화합물은 통상의 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 손쉽게 변형된다[참조문헌:Blondelle et al., TibTech 14:60, 1996].

### 트랜스제닉 동물

본원에서 사용되는 트랜스제닉 동물은 하나 이상의 이중 및/또는 재조합 유전자가 도입된 동물을 의미한다. 트랜스진은 상이한 종으로부터, 또는 트랜스제닉 동물과 동일한 종으로부터 기원할 수 있지만 트랜스진에 의해 부여된 배열 및/또는 염색체좌에서 동물에서는 자연적으로 발견되지는 않는다. 트랜스진은 외래 DNA 서열, 즉 숙주 동물의 게놈에서 정상적으로 발견되지 않는 서열을 포함할 수 있다. 대안으로 또는 추가로, 트랜스진은 유전자 발현의 정상적인 생체내 패턴을 변경하거나, 또는 유전자에 의해 암호화된 내생 유전자 산물의 생물학적 활성을 변경하거나 제거하기 위하여 시험관내에서 재배치되거나 돌연변이된 내생 DNA 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에는 예를 들면, 발현 패턴을 변화시키거나 유전자의 발현을 조절하는 추가 수단을 제공하기 위하여 앞서 존재하는 유전자 중으로 도입되는 DNA 단편도 포함된다[참조문헌:Watson et al., "The Introduction of Foreign Genes Into Mice", in Recombinant DNA, 2d Ed., W.H Freeman & Co., New York, 1992, pp. 255-272; Gordon, J.W., Intl. Rev. Cytol. 115:171, 1989; Jaenisch, Science 240:1468, 1989; Rossant, Neuron 2:323, 1990].

본 발명의 트랜스제닉 비-인간 동물은 비-인간 동물의 생식세포 중으로 트랜스진을 도입함으로써 생산된다. 다양한 발생 단계에서의 배아 표적세포를 사용하여 본 발명의 트랜스진을 도입한다. 배아 표적세포의 발생단계에 따라 상이한 방법이 사용된다. 이러한 방법은 후술되는 바와 같이 접합자의 미세주사, 바이러스 통합, 및 배아 스템 세포의 형질전환을 포함하며 이에 한정되지는 않는다.

1. 접합체의 미세주사는 트랜스진을 동물 게놈 중으로 혼입하는 바람직한 방법이다. 전핵 융합 또는 후속 세포분열을 겪지 않은 수정 난세포인 접합체는 트랜스제닉 DNA 서열의 미세주사를 위한 바람직한 표적이다. 쥐의 융성 전핵은 직경 약 20 마이크로미터 크기에 달하며, 이는 트랜스제닉 DNA 서열을 함유하는 용액의 1 내지 2 피코리터의 재현가능한 주사를 허용하는 특징이다. 트랜스진의 도입을 위한 접합체의 사용은 대부분의 경우에, 주사된 트랜스제닉 DNA 서열이 제 1 세포 분열 전에 숙주 동물의 게놈 중으로 혼입되게 된다는 장점이 있다[참조문헌:Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438, 1985]. 결과적으로, 생성되는 트랜스제닉 동물(화운더 동물)의 모든 세포는 트랜스제닉 대립유전자로 언급되는 특정 유전자좌에 혼입된 트랜스진을 안정하게 운반한다. 트랜스제닉 대립유전자는 멘델의 유전을 입증하며, 즉 트랜스제닉 동물과 비-트랜스제닉 동물의 교잡으로 생기는 자손의 절반이 무작위 분류의 멘델 법칙에 따라 트랜스제닉 대립유전자를 유전할 것이다.

2. 바이러스 통합도 본 발명의 트랜스진을 동물 중으로 도입하는 데 사용될 수 있다. 발생중에 있는 배아를 미분화배아세포 발생단계로 시험관내 배양한다. 할구를 적당한 레트로바이러스로 감염시킬 수 있다[참조문헌:Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260]. 할구의 감염은 투명대의 효소적 제거에 의해 증진된다. 트랜스진은 전형적으로 복제-결손이지만 바이러스 서열과 결합된 트랜스제닉 DNA 서열을 포함한, 바이러스-연관 DNA 서열의 통합 역량이 남아있는 바이러스 벡터를 통해 숙주 동물의 게놈 중으로 도입된다. 형질감염은 트랜스진-함유 바이러스 벡터를 생성하는 세포의 단일층 상에 할구를 배양함으로써 용이하고 효율적으로 달성된다. 이와 달리, 감염은 할강과 같은 후기 발생단계에 있는 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 어떠한 경우에도, 바이러스 통합에 의해 생성된 대부분의 트랜스제닉 화운더 동물은 트랜스제닉 대립유전자에 대해 모자이크체가 될 것이며; 즉, 트랜스진은 트랜스제닉 화운더 동물을 형성하는 모든 세포의 서브세트에 만 혼입된다. 더욱이, 단일 화운더 동물에서 다중 바이러스 통합 사건이 발생할 수 있어, 자손의 미래 세대에서 분리될 다중 트랜스제닉 대립유전자가 생성된다. 이러한 방법에 의한 트랜스진의 생식세포 중으로의 도입이 가능하지만 집중할 수 낮은 빈도로 일어날 것이다. 그러나, 일단 트랜스진이 이 방법에 의해 생식세포 중으로 도입되면, 트랜스제닉 대립유전자가 동물 세포의 모두에서, 즉 체세포 및 생식세포 모두에서 존재하는 자손이 생산될 수 있다.

3. 배아 스템(ES) 세포는 또한, 본 발명 트랜스진의 동물 중으로의 도입을 위한 표적세포로 작용할 수 있다. ES 세포는 시험관내에서 배양되는 이식전 배아로부터 수득된다[참조문헌:Evans et al., Nature 292:154, 1981]. 트랜스진으로 형질전환시킨 ES 세포는 동물 미분화배아세포와 결합될 수 있으며, 그 후에 ES 세포는 배아에 이식하여 생성 동물의 생식세포(키메라임, 즉 둘 이상의 동물로부터 유도된 세포로 구성)에 기여한다. 또한, 일단 트랜스진이 이 방법에 의해 생식세포 중으로 도입되면, 트랜스제닉 대립유전자가 모든 동물세포, 즉 체세포 및 생식세포 모두에 존재하는 자손이 생산될 수 있다.

비록 트랜스진의 초기 도입이 라마르크식(비-멘델식) 사건이지만, 본 발명의 트랜스진이 멘델좌로서 생식세포 중으로 안정하게 통합되어 트랜스제닉 동물의 자손에 전달될 수 있다. 다른 트랜스제닉 기술은 일부 세포는 트랜스진을 운반하고 다

른 세포는 운반하지 않는 모자이크성 트랜스제닉 동물을 생성한다. 생식세포가 트랜스진을 운반하지 않는 모자이크성 트랜스제닉 동물에서, 자손으로의 트랜스진 전달은 일어나지 않는다. 그럼에도 불구하고, 모자이크성 트랜스제닉 동물은 트랜스진과 연관된 표현형을 입증할 수 있다.

본 발명의 실행시, 트랜스제닉 유지 계통의 동물을 트랜스진의 발현이 연골-퇴행성 질환의 증후를 일으키는 유전 백그라운드를 지닌 동물과 교잡시킨다. 본 발명의 트랜스진이 유전된 자손은 본 발명의 트랜스진으로부터 유도된 핵산서열의 존재에 대해 자손으로부터의 유전물질의 분석에 의해 트랜스진이 유전되지 않은 한배 새끼들과 구별된다. 예를 들면, 본 발명의 트랜스진에 의해 고유하게 암호화된 폴리펩타이드를 함유하는 생물학적 유체는 폴리펩타이드의 존재에 대해 면역분석할 수 있다. 트랜스제닉 자손을 확인하는 간단하고 신뢰할 만한 수단은 예를 들면, 꼬리와 같은 동물의 극단부로부터 조직 샘플을 수득한 다음, 본 발명의 트랜스진의 고유부분의 DNA 서열에 상응하는 핵산 서열의 존재에 대해 샘플을 분석하는 단계를 포함한다. 이러한 핵산 서열의 존재는 예를 들면, 트랜스진의 고유부분에 상응하는 DNA 서열을 사용한 하이브리드화("서던") 분석, 기질, 즉 트랜스진의 DNA 서열로부터 유도된 올리고뉴클레오타이드로서 샘플 중의 DNA 서열을 사용하는 PCR 반응의 산물 분석 등에 의해 측정될 수 있다.

#### 핵산, 벡터, 발현 시스템, 및 폴리펩타이드

본 발명은 MDE, 특히 MMP, 및 이로부터 유도된 효소적 활성 단편, 및 구성적 활성 MMP 변이체 및 이로부터 유도된 효소적 활성 단편을 암호화하는 분리된 핵산을 포함한다. 본 발명은 또한, 상기 핵산의 상보물, 핵산을 포함하는 벡터; 벡터를 포함하는 세포; 및 핵산에 의해 암호화된 분리된 폴리펩타이드도 포함한다.

예를 들면, 문헌[참조:Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, 1985 (D.N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984, (M.L. Gait ed.); Transcription and Translation, 1984 (Hames and Higgins eds.); A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); and Protein Purification; Principles and Practice, Second Edition(Springer-Verlag, N.Y.)]에 설명된 것들과 같이, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 단백질 생화학에서의 많은 기술이 본 발명의 실행에 사용된다.

본원에서 사용되는 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"란 임의의 길이의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 또는 혼합된 폴리리보-폴리데옥시리보 뉴클레오타이드의 퓨린- 및 피리미딘-함유 중합체를 의미한다. 이러한 것에는 예를 들면, DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 하이브리드와 같은 일본쇄 및 이본쇄 분자, 및 염기를 아미노산 백본과 접합시켜 형성된 "단백질 핵산"(PNA)가 포함된다. 여기에는 또한, 변형된 염기를 함유하는 핵산도 포함된다.

"암호화 서열" 또는 "단백질-암호화 서열"은 mRNA로 전사될 수 있고/있거나 폴리펩타이드로 해독될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5'-말단의 해독 개시코돈 및 3'-말단의 해독 종결코돈에 의해 전형적으로 결정된다.

본원에서 사용되는 핵산서열의 "상보체"란 본래의 서열과 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 참여하는 "안티센스" 서열을 의미한다.

본원에서 사용되는 "분리된" 핵산 또는 폴리펩타이드란 최초의 환경(예를 들면, 천연인 경우 천연 환경)으로부터 제거되는 성분을 의미한다. 분리된 핵산 또는 폴리펩타이드는 전형적으로, 초기에 결합되어 있던 세포 성분의 약 50% 이하, 바람직하게는 약 75% 이하, 가장 바람직하게는 약 90% 이하를 함유한다.

지정 서열"로부터 유도되는" 핵산 또는 폴리펩타이드 서열이란 지정 서열의 영역에 상응하는 서열을 의미한다. 핵산 서열의 경우, 이러한 것에는 서열과 상동성이거나 상보적인 서열, 및 "서열-보존성 변이체" 및 "기능-보존성 변이체"가 포함된다. 폴리펩타이드 서열의 경우, 이러한 것에는 "기능-보존성 변이체"가 포함된다. 서열-보존성 변이체는 주어진 코돈 위치에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 변화가 그 위치에서 암호화된 아미노산의 변화를 일으키지 않는 것들이다. 기능-보존성 변이체는 유사한 물리화학적 특성(예를 들면, 산성, 염기성, 소수성 등)을 지닌 것으로의 아미노산 치환을 포함하여(이에 한정되지는 않음) 천연 폴리펩타이드의 전체적인 형태와 기능을 변경하지 않으면서 폴리펩타이드내 주어진 아미노산 잔기가 변화된 것들이다. "기능-보존성" 변이체는 또한 지정 폴리펩타이드에 특이성을 보이는 항체의 도출능을 지닌 폴리펩타이드도 포함한다.

본원에서 기재된 서열 또는 이의 아서열을 포함하는 핵산은 통상의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, DNA는 예를 들면, 문헌[참조:Matteucci et al., 1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185]의 포스포아미다이트 고체 지지체법, 문헌[참

조:Yoo et al., 1989, J. Biol. Chem. 764:17078]의 방법, 또는 익히 공지된 타 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이는 합성 올리고뉴클레오타이드의 쌍을 포함하는 일련의 올리고뉴클레오타이드 카세트를 순차적으로 연결함으로써 수행될 수 있다.

유전 코드의 축퇴성으로 인하여, 다수의 상이한 뉴클레오타이드 서열이 본원에서 정의된 아미노산 서열 또는 이의 아서열을 지닌 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 코돈은 원핵세포 또는 진핵세포 시스템에서의 최적 발현을 위해 선택될 수 있다. 이러한 축퇴 변이체도 본 발명에 포함된다.

핵산은 또한 당업계에 공지된 다수의 수단에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적 예로는 메틸화, "캡", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상을 동족체로 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예를 들면, 비하전 결합(예를 들면, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등)을 갖는 것들 및 하전 결합(예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것들이 포함될 수 있다. 핵산은 예를 들면, 단백질(예를 들면, 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-라이신 등), 내위첨가물(예를 들면, 아크리딘, 프소칼렌 등), 킬레이트화제(예를 들면, 금속, 방사능 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제와 같이 하나 이상의 부가적인 공유결합된 잔기를 함유할 수 있다. PNA 또한 "핵산"이라는 용어에 포함된다. 핵산은 메틸 또는 에틸 포스포트리에스테르 또는 알킬 포스포아미데이트 결합의 형성에 의해 유도체화 될 수 있다. 또한, 본 발명의 핵산 서열은 직접적으로든 또는 간접적으로든 검출가능한 시그널을 제공할 수 있는 표지물로 변형시킬 수 있다. 표지물의 예로는 방사능 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 포함된다.

본 발명의 폴리펩타이드는 pUC 플라스미드, pET 플라스미드(Novagen, Inc., Madison, WI), 또는 pRSET 또는 pREP 플라스미드(Invitrogen, San Diego, CA)와 같은 다수의 공지 벡터와 다수의 적당한 숙주세포를 사용하고, 본원에서 기재되거나 인용되거나 아니면 관련업계 당업자에 공지된 방법을 이용하여 발현시킬 수 있다. 벡터/숙주의 특별한 선택은 본 발명의 실행에 중요하지 않다. 재조합 클로닝 벡터는 종종 클로닝 또는 발현을 위한 하나 이상의 복제 시스템; 숙주에서의 선별을 위한 하나 이상의 마커, 예를 들면 항생물질 내성; 및 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 것이다. 삽입된 암호화 서열은 표준방법에 의해 합성되거나, 천연원으로부터 분리되거나, 하이브리드로서 제조될 수 있다. 암호화 서열과 전사 조절 요소 및/또는 다른 아미노산 암호화 서열의 연결은 공지방법에 의해 성취될 수 있다. 적당한 숙주세포는 필요에 따라 전기 투공, CaCl<sub>2</sub> 매개 DNA 흡수, 진균 감염, 미세주사, 미세투사, 또는 기타 설정법을 포함한 적당한 방법에 의해 형질전환/형질감염/감염시킬 수 있다.

적당한 숙주세포로는 박테리아, 아키텍테리아, 진균, 효모, 식물, 및 동물세포, 및 특히 포유동물 세포가 포함된다. 특히 관심의 대상이 되는 것은 이.콜라이, S. 아우레우스, B. 서비틸리스, 사카로마이시스 세레비지에, 사카로마이시스 칼스버진시스(S. carlsbergensis), 스킴조사카로마이시스 폼비(Schizosaccharomyces pombe), SF9 세포, C129 세포, 293 세포, 뉴로스포라, CHO 세포, COS 세포, 헬라 세포, 및 불멸화된 포유동물 골수성 및 림프성 세포계이다. 바람직한 복제 시스템은 M13, ColE1, SV40, 배칼로바이러스, 람다, 아데노바이러스, 사이토메갈로바이러스 등을 포함한다. 다수의 전사 개시 및 종결 조절 영역이 분리되고 다양한 숙주에서 이종 단백질의 전사 및 해독에 유효하다. 이러한 영역의 예, 분리방법, 조작방법 등은 당업계에 공지되어 있다[참조문헌: Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1997]. 적당한 발현 조건하에서, 숙주세포는 재조합 생산된 펩타이드와 폴리펩타이드의 공급원으로서 사용될 수 있다.

기능-보존성 변이체를 포함하여 본 발명의 MDF는 단백질-암호화 서열이 도입되어 발현되는 천연 또는 이종 유기체 또는 세포(박테리아, 진균, 곤충, 식물, 및 포유동물 세포 포함, 이에 한정되지 않음)로부터 분리될 수 있다. 이와 달리, 이러한 폴리펩타이드는 무세포 단백질 합성 시스템에서 생산될 수 있으며, 합성 시스템은 프리프로콜라게나제의 글리코실화 및 시그널 펩타이드 프로세싱을 달성하기 위해 마이크로솜 막으로 추가 보충될 수 있다. 더욱이, 폴리펩타이드는 배타적 고체상 합성, 부분 고체상법, 단편 응축, 또는 고전적인 용액 합성을 포함한(이에 한정되지 않음) 상업적으로 이용가능한 자동화 절차에 의해 화학적으로 합성될 수 있다.

제한 없이, 예비 디스크-겔 전기영동, 등전 포커싱, HPLC, 역상 HPLC, 겔 여과, 이온 교환 및 분배 크로마토그래피, 향류(向流) 분배를 포함한(이에 한정되지 않음) 폴리펩타이드 정제방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. 일부 목적의 경우, 단백질이 폴리히스티딘 서열(이에 한정되지 않음)과 같이 정제를 촉진하는 부수적인 서열을 함유하는 재조합 시스템에서 폴리펩타이드를 생산하는 것이 바람직하다. 이어서, 폴리펩타이드는 적당한 고체상 매트릭스상에서 크로마토그래피에 의해 숙주세포의 조 용해물로부터 정제될 수 있다. 이와 달리, 단백질에 대해 또는 이로부터 유도된 펩타이드에 대해 생성된 항체가 정제 시약으로 사용될 수 있다. 다른 정제법도 가능하다.

효소 활성, 및 바람직하게는 구성적 효소 활성을 보이는 MMP 변이체 및 유도체의 작제 및 분석은 통상적인 방법의 일상적인 적용에 의해 달성될 수 있다. 먼저, MMP를 암호화하는 핵산을 부위-지향성 또는 무작위 돌연변이유발에 의해 변형시

키거나, 융합 유전자의 일 분절로서 작제에 사용한다. 바람직하게는, 이러한 절차에 의해 프로 영역을 암호화하는 서열에 또는 프로 영역 절단 부위 부근에 변형이 일어난다. 이와는 달리, 효소적 활성 MMP 도메인과 타 폴리펩타이드 간의, 또는 상이한 MMP 간의 융합 단백질을 암호화하는 서열이 작제될 수 있다. 이어서, 변형된 핵산은 무세포 시스템에서, 온전한 세포에서(투과화된 세포 포함), 또는 트랜스제닉 동물에서 변이체 MMP의 합성을 프로그래밍하는 데 사용된다. 바람직하게는, 무세포 시스템 또는 세포 배양 시스템을 MMP 변이체 또는 유도체의 발현에 사용한다. 프로 영역 절단의 정도는 대사성 표지 및 SDS-PAGE에 의한 MMP 산물의 분할에 의해 평가된다. 최종적으로, MMP 효소 활성은 예를 들면, 문헌[참조: Weingarten et al., Biochem. 24:6730, 1985; Woessner et al., J. Biol. Chem., 263:16918, 1988, and Knight et al., FEBS Letts., 296:263, 1992]에 기재된 바와 같이, 천연 기질 또는 모델 펩타이드의 절단 정량과 같이 통상적인 분석법을 이용하여 측정된다. 이러한 방식으로, 예를 들면, MMP-13\*의 기능-보존성 변이체를 포함하여 다수의 MMP 변이체 및 유도체가 일상적으로 생산될 수 있고 MMP 효소 활성에 대해 평가될 수 있다.

## 실시에

### 바람직한 양태의 설명

하기 실시예는 제한 없이 본 발명을 설명한다.

### 실시예 1: 변형된 구성적 활성 ProMMP-13을 암호화하는 유전자의 작제

하기 실험을 수행하여 프로 영역 절단의 부재하에서 효소적으로 활성을

띠는 MMP-13으로부터 유도된 프로콜라게나제를 암호화하는 유전자를 생성한다. MMP13\*로 명명된 이러한 proMMP-13 변이체의 서열을 서열번호 4에 나타내었다.

### MMP-13 cDNA를 변형시키기 위한 부위-지향성 돌연변이유발

proMMP를 암호화하는 cDNA 단편은 플라스미드 pNot3A [참조문헌: Freije et al., J. Biol. Chem. 269:16766, 1994; GENBANK 수탁번호 X75308]를 XbaI 및 HindIII로 분해하고 생성되는 약 1515 bp 단편을 정제함으로써 취득된다. 이 단편을 XbaI과 HindIII로 분해한 Tet-내성/Amp-감수성 pAlter 플라스미드(Promega, Madison, WI) 중으로 아클로닝한다.

부위-지향성 돌연변이유발은 시험관내 돌연변이유발 시스템에서 Altered Sites II(Promega, Madison, WI)를 사용하여 수행한다. 간단히 말해, 파지미드 일본쇄 DNA를 헬퍼 파지 R408(Promega)를 함유하는 배양액으로부터 정제한다. Amp 복구-Tet 녹아웃 전환 올리고(Promega) 외에, 서열 5'-

AAGCCAAGATGCGGGGTTGTCGATGTGGGTGAATACAAT-3', 서열번호 8를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 인산화시키고 일본쇄 DNA로 어닐링한 다음, 돌연변이체 본쇄 합성을 한다. 이어서, 반응 혼합물을 사용하여 복구-마이너스 이. 콜라이 균주 ES1301 *mutS*를 형질전환시킨 다음, 배양균을 앰피실린 선별 배지에서 증식시킨다. 분리된 클론으로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 JM109 세포 중으로 형질전환시키며, 이어서 이를 120  $\mu\text{g/ml}$  앰피실린을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅한다.

상기 절차에 의해 아미노산 99에 프롤린에서 발린으로의 치환이 일어난다. 변형된 proMMP를 MMP13\*(서열번호 4)로 명명한다.

유사 기술을 사용하여, 부위-지향성 돌연변이유발은 아미노산 98에 발린에서 글라이신으로의 돌연변이 도입에도 사용된다. 서열 5'-GAAAAAGCCAAGATGCGGGGTCCTGATGTGGGTGAATAC-5', 서열번호 9를 갖는 돌연변이원 올리고뉴클레오타이드를 전술한 바와 같이 사용한다. 이러한 절차에 의해 아미노산 98에 발린에서 글라이신으로의 치환이 일어난다.

직접 서열분석에 의해 상기 돌연변이를 확인한 후, MMP13\* cDNA를 암호화하는 cDNA를 EcoRI 및 HindIII 분해에 의해 pAlter-MMP13\* 벡터로부터 절단한다.

### 실시예 2: MMP-13\*의 효소 활성 측정

### 재료 및 방법

돌연변이형 MMP13 및 야생형 MMP-13 모두를 암호화하는 cDNA를 CMV 프로모터(XhoI - EcoRI) 및 SV40 스플라이스 폴리(A)n(XbaI - NcoI)을 함유하는 BS(SK-) 벡터(Stratagene) 중으로 아클로닝한다. 헬라 세포의 복제 배양균(10 cm 디쉬)을 CaPO<sub>4</sub> 침전법(Promega)을 사용하여 이들 플라스미드 50 µg으로 형질감염시킨다. 5 시간 후에, 세포를 동량의 2X HBS + 30% 글리세롤을 함유하는 용액을 사용하여 1분 글리세롤 쇼크를 받게 한다. 이러한 절차는 Profection Mammalian Transfection Systems technical manual(Promega)에 설명되어 있다.

형질감염 24 시간 뒤에, 배양 배지(10% 태 소 혈청을 함유하는 D-MEM)를 혈청을 함유하지 않고 MMP 억제제인 10 µM CGS-27023A(Ciba-Geigy)를 함유하는 D-MEM으로 교체한다. 첨가된 MMP 억제제의 부재하에서, 배양균의 자가분해에 의해 MMP가 생성된 것으로 추측되며; 따라서, 배양 배지에 MMP 억제제의 첨가는 검출가능한 MMP13 밴드를 유도하였다.

MMP 억제제를 함유하는 무혈청 배지 첨가 48 시간 후에, 상등액 10 ml를 수집하고 Centriprep-30 및 Centricon-10 농축기(Amicon)를 사용하여 약 200배 농축한 후, 동량의 2X 트리스-글라이신 SDS 러닝 완충액을 각각의 샘플에 가한다. 이어서, 샘플을 4-16% 사전 염색된 베타-카제인 지모그램 SDS 폴리아크릴아미드 겔(Novex)에 적용한다. 전기영동 후에 겔을 재생 완충액(Novex)중 실온에서 30분간 재생시키고, 이어서 지모그램 전개 완충액(Novex) 중 37°C에서 밤새 배양한다.

## 결과

정상적으로, MMP는 효소 활성이 잠재한 전구체(즉, 프로콜라게나제 또는 지모젠)으로서 합성되며; 분비 후에 프로영역의 단백질분해성 제거로 효소적 활성 단백질이 생성된다. 단백질분해성 프로세싱에 대한 필요는 절단되지 않았을 때에도 효소적으로 활성을 띠는 프로콜라게나제 변이체의 사용으로 우회된다. 트랜스진으로 사용된 구성적 활성 MMP13 변이체는 MMP들 간에 고도로 보존되며 효소 잠재성 조절에 중요한 PRCGVPDV(서열번호 7) 영역을 암호화하는 서열에 프롤린에서 발린으로의 치환을 함유한다.

변성된 MMP13 단백질의 활성을 카제인 지모그램에 대해 측정한다(데이터 비예시). 3 종의 MMP가 대조군 헬라 세포에서 분비된다. 하나는 젤라티나제 B로도 불리는 92 kDa MMP9 효소에 대한 정확한 분자량에서 러닝한다. 효소 활성화 동안 MMP의 프로 도메인의 절단은 대략 10 kDa의 감소를 일으킨다. 제 2 밴드의 분자량은 젤라티나제 B의 프로세싱된 형태와 일치한다. 스트로멜라이신-1(MMP3)과 스트로멜라이신-2(MMP10)는 모두 54 kDa이고 하나 또는 둘 모두 제 4 밴드를 나타낼 수 있다. Pro-MMP13은 비절단 재조합 MMP13을 함유하는 라인 1에서 관찰되는 약 60 kDa로 이동할 것으로 예상된다. 헬라 세포는 친주 및 돌연변이주 MMP13 모두를 발현하는 작제물로 형질감염된다. 약 60-kDa pro-MMP13 형태만이 두 작제물 모두를 발현하는 세포로부터 검출되었는데, 이는 전효소→성숙형으로의 자가단백질 분해가 외생성 시스템에서는 일어날 것 같지 않다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 프롤린에서 발린으로의 치환이 천연 MMP13 활성 또는 기질 특이성을 방해하지 않았음을 보여준다.

본 방법은 MMP13 효소 활성을 보유하는 MMP13 변이체에 대한 고속 스크린을 제공한다.

## 실시에 3: 트랜스제닉 벡터의 작제

### tet07에 연결된 MMP-13\*의 작제

추가 단계에서, MMP-13\*을 암호화하는 cDNA를 다음과 같이 tet07 프로모터로부터 유도된 전사 조절 서열에 작동적으로 연결시킨다:

BS(SK-) 벡터(Stratagene)를 KpnI과 NotI으로 분해한다. 하기의 서열을 갖는 합성 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드를 KpnI과 NotI으로 분해한 다음 벡터에 연결한다:

5'-GGTACCACTAGTAAGCTTAGATCTCATATGGTTCGACCCCGGGGAATTCCTGC

AGGGATCCTCTAGAAGTACTCCATGGGTATACATCGATGCGGCCGC-3', 서열번호 10

상기와 같이 변형된 BS(SK-) 벡터를 XbaI 및 NcoI로 분해한다. pcDNA1/Amp(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 XbaI와 NcoI로 분해하여 수득되는, SV40 스플라이스 부위 및 폴리아데닐화 시그널을 함유하는 745 bp 단편을 이 벡터에 연결시킨다.

생성되는 벡터를 XhoI과 EcoRI으로 분해시켜 선형화하고 pUHD 10-3[참조문헌:Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547, 1992]로부터의 tetO7 프로모터 영역을 함유하는 460 bp XhoI-EcoRI 단편에 연결시킨다. 이어서, 이 벡터를 SpeI으로 분해시키고 클레나우 폴리머라제에 평활말단화 한 다음, EcoRI으로 분해시킨다. pAlter-MMP13\*을 HindIII로 분해하고, 클레나우 폴리머라제에 평활말단화 한 다음 EcoRI으로 분해시켜 MMP13\*-암호화 단편을 수득한다. MMP13\* EcoRI 단편을 상기에서 수득한 EcoRI 분해 벡터 중으로 클로닝한다.

2792 bp 트랜스진, 서열번호 11(도 2b)을 XhoI와 NotI으로 분해시켜 절단한 다음 수정란 중으로의 미세주사에 앞서 CsCl 구배 원심분리를 이용하여 정제한다.

### II형 콜라겐-프로모터-연결된 tTA 유전자의 작제

tTA 억제자-활성자 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 관절-특이성(II형 콜라겐) 프로모터에 작동적으로 연결시킨다.

상기 실시예 1에서 기술한 바와 같이 SV40 스플라이스 부위 및 폴리아데닐화 시그널을 함유하는 변형된 BS(SK-) 벡터를 NdeI과 SmaI으로 분해시킨 다음 콜라겐 II 프로모터와 증강자를 함유하는 1897 bp 단편에 연결시킨다. 이 단편은 플라스미드 PBS $\Delta$ H1을 HindIII로 분해함으로써 수득되며, 그 후에 클레나우로 평활말단화 한 다음 NdeI으로 분해한다.

이어서, 플라스미드를 EcoRI과 BamHI으로 분해한 다음 EcoRI과 BamHI을 사용하여 pUHG15-1 플라스미드(Gossen et al., supra)로부터 절단시킨 테트라사이클린/VP16 억제자-활성자 융합 단백질을 암호화하는 1025 bp 단편에 연결시킨다. 플라스미드를 BglIII로 분해시켜 선형화하고, 송아지 장 포스포타제를 사용하여 탈인산화한 다음, 플라스미드 PBS $\Delta$ H1으로부터 수득된 1554 BamHI 증강자 단편에 연결시킨다.

최종적으로, 5276 bp 트랜스진, 서열번호 12(도 2a)를 벡터로부터 KpnI과 NotI으로 분해시켜 절단하고, 겔 정제, CsCl 구배 원심분리 정제하여, 미세주사 완충액(5 mM 트리스-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA pH 8.0)에 대해 투석한 다음 미세주사용으로 사용한다.

### II형 콜라겐 프로모터- $\beta$ -갈락토시다제 유전자

II형 콜라겐 프로모터에 의해 부여된 조직-특이성 발현의 평가에 적당한 리포터 유전자를 II형 콜라겐 프로모터에 작동적으로 연결시킨다.

$\beta$ -글로빈 스플라이스 서열과 폴리아데닐화 시그널에 융합된  $\beta$ -갈락토시다제 유전자를 함유하는 4179 bp BamHI-BglIII 단편을 플라스미드 pUGH16-3(Gossen et al., supra)로부터 절단하고 비변형 BS(SK-)(Stratagene)의 BamHI 부위 중으로 클로닝한다. 이 플라스미드를 EcoRI과 HindIII로 분해한 다음 전술한 플라스미드로부터 절단한 II형 콜라겐 프로모터 서열을 함유하는 655 bp HindIII-EcoRI 단편에 연결시킨다. 이어서, 플라스미드를 EcoRI으로 분해한 다음 전술한 II형 콜라겐 프로모터 플라스미드로부터 절단된 2807 bp EcoRI 단편에 연결시킨다. 제한지도 작성을 이용하여 각 삽입체의 배향을 증명한다. 7664 bp 트랜스진, 서열번호 13(도 3a)를 HindIII와 NotI로 분해하고, 겔 정제, CsCl 구배 원심분리 정제하여 미세주사 완충액(5 mM 트리스 pH 7.4, 0.1 mM EDTA pH 8.0)에 대해 투석한 다음, 마우스 배아 미세주사용으로 사용한다.

### 결과

도 2a 및 2b는 연골세포내 MMP13의 조절된 발현을 달성하기 위해 생성된 합성 유전자의 개략도이다. 트랜스진의 유도성 발현은 테트라사이클린 조절가능한 유전자 발현 시스템[참조문헌:Gossen et al., supra; Furth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9302-9306, 1994]을 사용하여 달성된다. 도 2a에 도시된 제 1 작제물은 테트라사이클린-통제 VP16 전사 활성자 융합 단백질의 발현을 II형 콜라겐 유전자 프로모터의 통제하에 둔다. 이러한 작제물은 연골세포에 VP16 융합 단백질의 발현을 지시한다. 도 2b에 도시된 제 2 작제물은 MMP13 단백질의 변형된 버전(MMP13\*)을 암호화하는 cDNA의 발

현을 VP16 융합 단백질의 지시하에 둔다. 식수에 제공된 테트라사이클린 동족체인 독시사이클린의 존재하에서, VP16 융합 단백질은 합성 MMP13\* 유전자의 TetO7 프로모터에 결합하지 않으며 유전자는 사일런트이다. 독시사이클린의 제거 시, 전사활성자는 인간 MMP13\* cDNA의 전사 및 변형된 단백질 산물의 생성을 자극한다.

MMP13\* 활성을 입증하는 외에도, 미세주사에 앞서, 도 2a와 2b에 도시된 두 트랜스진 작제물을 1차 소 연골세포에서 및 배아 마우스 섬유아세포에서 시험한다. 결과는 TetO7-루시페라제 또는 TetO7-MMP13\*를 함유하는 제 2 작제물의 발현을 유도하는 II형 콜라겐 프로모터의 능력을 보여준다(데이터 비예시).

도 3a는 II형 콜라겐 프로모터에 의해 부여된 조직-특이성 조절의 평가에 사용된 트랜스진의 개략도이다. 핵산 작제물은 (i) 래트 II형 콜라겐 프로모터; (ii) 박테리아  $\beta$ -갈락토시다제(Lac Z)을 암호화하는 서열; 및 (iii)  $\beta$ -글로빈 스플라이스 및 폴리아데닐화 시그널을 포함하는 서열을 포함한다.

실시에 4:관절 조직에서 테트라사이클린-조절된 LacZ 또는 MMP-13\*을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 생산과 특징규명

하기 실험을 수행하여 MMP-13\* 또는 LacZ( $\beta$ -갈락토시다제) 리포터 유전자를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 생산한다.

재료 및 방법

트랜스제닉 마우스의 제조와 시험

테트라사이클린 조절하에서 MMP-13\*을 발현하는 마우스를 생산하기 위하여, 약 2784 염기쌍의 XhoI-NotI tetO7-MMP-13\* DNA 단편(도 2b) 및 약 5265 염기쌍의 KpnI-NotI CPE-tTA DNA 단편(도 2a)을 등몰량으로 수정된 마우스 배아에 함께 미세주사한다. 리포터 유전자를 발현하는 마우스를 생산하기 위하여, HindIII-NotI LacZ 7641 염기쌍 단편(도 3a)을 전술한 바와 같이 (FVB/N) 수정란에 주사한다[참조문헌:Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratories, 1996]. (제한단편의 크기는 실시예 3에서 기술된 트랜스진보다 작으며, 이유는 엔도뉴클레아제 절단부위가 트랜스진에 대해 내부에 있기 때문이다.)

화운더 동물은 우선 다음과 같이 PCR에 의해 확인한다. tTA 서열에 상응하는 프라이머(5'-CGAGGGCCTGCTCGATCTCC-3', 서열번호 14) 및 3'비해독 서열에 상응하는 프라이머(5'-GGCATTCACCACTGCTCCC-3', 서열번호 15)를 사용하여 tTA-암호화 트랜스진을 확인한다. 생성되는 PCR 산물은 크기가 584 bp였다. MMP13\*을 각각 암호화하는 서열에 상응하는 프라이머(5'-GAGCACCTTCTCATGACCTC-3', 서열번호 16) 및 3'비해독 영역에 상응하는 프라이머를 사용하여 MMP13\*-암호화 트랜스진을 확인한다. 생성되는 PCR 산물은 크기가 731 bp였다.

$\beta$ -갈락토시다제 유전자의 핵 국제 시그널에 상응하는 프라이머(5'-GTTGGTGTAGATGGGCGCATCG-3', 서열번호 17) 및 콜라겐 프로모터에 상응하는 프라이머(5'-GCGGGTCTCAGGTTACAGCC-3', 서열번호 18)를 사용하여 LacZ-암호화 트랜스진을 확인한다. 생성되는 PCR 산물은 크기가 673 bp였다.

BamHI/NcoI 또는 PvuII/NcoI으로 분해하고 고도의 엄격한 조건하에서 3'비해독 영역에 하이브리드화시킨 테일 DNA의 서던 블롯 분석을 수행하여 PCR을 이용하여 수득된 결과를 확인한다. 트랜스제닉 마우스로부터의 하이브리드화 시그널의 상대 강도와 주사된 동일 DNA의 10 및 100 배 농도를 함유하는 대조 DNA를 사용하여 수득된 것을 비교함으로써 배농중으로 통합된 트랜스진 DNA의 카피수를 측정한다.

제조업자의 사양서(Perkin Elmer)에 따라 Taqman 정량 PCR을 이용하여 카피수를 확인한다. 트랜스제닉 계통은 화운더 동물을 FVB/N 야생형 마우스와 교배함으로써 생성되며 후속 세대는 PCR로 확인된다.

모든 마우스에 50% 에탄올 중의 100 mg/ml 원액으로 제조되고, 산성 식수에 최종농도 1.0 mg/ml로 희석한 독시사이클린(Sigma Chemical Co., St. Louis MO)을 투여하며, 1일별로 변화시킨다[참조문헌:Schultze et al., Nature Biotech. 14:499, 1996].

$\beta$ -갈락토시다제(lacZ) 활성에 대한 전 배아 염색



야생형 암컷을 CPE-lacZ 작제물을 지니고 있는 트랜스제닉 수컷과 교미시킨다. 배아 일수 16(E16)이 되는 날, 암컷을 참수시켜, 전술한 바와 같이  $\beta$ -갈락토시다제에 대해 염색한다(Hogan et al., supra, 1996). 고정하기에 앞서, E16 배아로부터 미부를 제거하여 분해한 다음 PCR에 의해 트랜스진 전달에 대해 분석한다.

#### RT-PCR을 통한 발현 분석

트랜스진 발현은 RT-PCR에 의해 평가된다. 전체 RNA를 트리졸(Trizol)(Life Technologies)에서 균질화한 뒤에 조직으로부터 분리해낸다. Gibco/BRL에 의한 슈퍼스크립트 예비증폭 키트를 사용하여 제 1 본쇄를 합성한다. 간단히 말하면, 전체 RNA 5  $\mu$ g을 RT에서 15분간 DNase I으로 처리하고, 이어서 25 mM EDTA 2  $\mu$ l를 첨가하여 불활성화한 다음 65°C로 15분간 가열한다. 뒤이어, 제조업자의 사양서에 따라 RNA를 0.5  $\mu$ g 올리고 dT에 어닐링하고 역전사시킨다. cDNA의 PCR 분석은 하기의 프라이머 세트(5'→ 3'서열)를 사용하여 수행한다: tet 활성화자:

CGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAG(서열번호 19) 및

CGGCCATATCCAGAGCGCCG(서열번호 20); MMP13\*

GCCCTCTGGCCTGCTGGCTCATG(서열번호 21) 및

CAGGAGAGTCTTGCCTGTATCCTC(서열번호 22).

생성되는 PCR 산물은 각각 859 bp 및 648 bp이다. mRNA의 보존성 및 역전사효소의 효율을 시험하기 위하여, 각각의 PCR 반응은 하기의 c-fos 프라이머 세트도 아울러 포함한다:

5'-AGGAGGGAGCTGACAGATACTCC-3 '(서열번호 23) 및

5'-AGGCCACAGACATCTCCTCTGG-3 '(서열번호 24).

PCR 분석을 95°C에서 10분간 Taq-골드(Perkin Elmer)를 사용하여 cDNA에 대해 수행하며, 이어 96°C에서 60초간, 67°C에서 90초간, 및 72°C에서 60초간 35 사이클을 수행한다. 최종 12분 연장을 72°C에서 수행한다. 반응산물을 2.0% 아가로스 겔 상에서 러닝시킨 다음 에티뉼 브로마이드 염색에 의해 가시화한다.

#### 배아 섬유아세포/RT-PCR

Tet07-lacZ 암컷을 CPE-tTA 및 Tet07-MMP13\* 트랜스진 모두를 지니고 있는 트랜스제닉 수컷과 교미시킨다. E15에서, 암컷을 참수시켜, 배아로부터 섬유아세포를 제조한다[참조문헌:Graham et al., Virology, 52:456, 1973; Lopata et al., Nucl. Acids Res., 12:5707, 1984]. 섬유아세포를 10% FBS(Gibco/BRL)를 함유하는 DMEM(Gibco/BRL)에서 배양한다. 뒤이어, 섬유아세포를 칼슘 포스페이트 침전법을 통해 목적하는 발현 플라스미드로 형질감염시킨다. 형질감염 48 시간 후에, 트리졸법(Gibco/BRL)을 사용하여 형질감염 세포로부터 전체 RNA를 제조한다. 슈퍼스크립트 예비증폭 시스템(Gibco/BRL)을 사용하여 제 1 본쇄 cDNA를 합성한다. MMP13\* 발현을 인간 MMP13에 특이적인 프라이머(GCCCTCTGGCCTGCTGGCTCATG)(서열번호 21) 및

(CAGGAGAGTCTTGCCTGTATCCTC)(서열번호 22)를 사용하여 확인한다. 생성되는 PCR 산물은 크기가 648 bp였다.

#### 면역조직화학

이중 트랜스제닉 계통에서의 MMP13\*의 발현을 MMP13-유도된 II형 콜라겐 절단 단편에 특이적인 항체를 사용하여 면역조직화학에 의해 추가 분석한다. 이를 위해, 관절을 중성 pH에서 60분간 실온에서 PBS 중의 4% 파라포름알데하이드에 고정시킨다. 이어서, 이들을 PBS에서 2회 세정하고, 0.1 M 트리스-HCl, pH 7.4에서 밤새 배양한 다음, 중성 pH에서 0.2 M EDTA에서 부분적으로 탈석회화한다. 샘플을 TOC 배지에 옮기고 Hacker/Bright 저온유지 장치를 이용하여 6 mm 동결 절편을 수득한다. 절편을 II형 콜라겐의 분해산물에, 구체적으로는 TC<sup>A</sup> 분해산물(3/4 피스로도 지칭)에 존재하는 에피토프를 인식하는 항체로 염색시킨다. [참조문헌:Billingham et al., J. Clin. Invest. 99:1534, 1997].

**결과**

테트라사이클린 및 이의 동족체는 MMP 활성의 공지된 억제자이다. 결과적으로, 본 발명자는 1 mg/ml가 식수에 첨가되었을 때 DOX의 혈청 수준과 시험관내 IC<sub>50</sub>을 비교하였다. MCA 형광분석에서, IC<sub>50</sub> = 59.1 μM인 반면에, 혈청 수준은 억제 분석의 준을 사용하여 2.64 μM로 측정되었다. 이러한 데이터는 혈청내 DOX의 양이 MMP 활성의 50%가 억제될 수 있는 수준보다 22.4배 이하임을 보여준다. 따라서, DOX에 기인한 유의한 억제가 존재할 것 같지는 않다.

도 3b는 도 3a에 도시된 트랜스진을 발현하는 배아일수 16일째 트랜스제닉 마우스 배아의 β-갈락토시다제 활성에 대해 전체 고정 염색의 사진이다. 청색 염색부위(화살표)는 트랜스제닉 동물의 신체 전반에 걸쳐 관절에서 명백하며, 반면에 비-트랜스제닉 야생형 한배 새끼에서는 염색이 관찰되지 않는다. 구체적으로 말해서, 발목, 무릎, 엉덩이, 지골(指骨), 팔목, 팔꿈치, 어깨, 및 척추를 포함한 관절은 트랜스진의 발현을 보였다. 관절의 연골 외에도, 이러한 발생 단계에서 뼈로 골화되지 않은 연골, 즉 안면골, 두개골 및 갈비뼈의 일부도 청색으로 염색되었다. 도 3c는 팔꿈치와 발의 확대도이다. 이러한 데이터는 II형 콜라겐 프로모터의 발현능을 확인시켜 주고, MMP13\* 트랜스진을 발현하게 될 그들 조직(관절)의 측정에 유용하다.

도 2a와 2b에 도시된 작제물을 수태한 마우스 배아 증으로 함께 미세주사한다. 112 마리의 신생 마우스 중에서, 두 트랜스진을 모두 지닌 7 마리의 트랜스제닉 화운더가 확인되었지만, 이들 트랜스제닉 계통 중 4 마리만이 번식될 수 있었다. 트랜스진을 PCR에 의해 확인하고 트랜스진-특이성 탐침을 사용하여 서던 블롯 분석에 의해 증명한다(데이터 비예시). 4 마리의 트랜스제닉체 각각에 대한 카피수를 Taqman 정량 PCR을 이용하여 평가한다(데이터 비예시). 간략히 말해서, 트랜스진 카피수는 tet 활성화자 및 MMP13\*에 대해 각각 1-32 및 1-20 범위였다. 구체적으로 말하면, 계통 6은 tet 활성화자 약 8 카피 및 MMP13\* 트랜스진 약 3 카피를 함유하였다.

TA 및 MMP13\* 트랜스진의 발현은 생후 4개월된 마우스(계통 6)의 뒷무릎 관절에서 초기에 평가한다. c-fos 내생성 cDNA의 증폭을 각 반응의 효능을 증명하기 위한 대조군으로 사용한다. 도 4는 TA-특이성 프라이머 세트로부터 생성되는 890 bp 단편의 증폭을 도시한다. RT-PCR은 DOX가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우 모두의 트랜스제닉 마우스에서 TA 트랜스진이 발현되지만, 비-트랜스제닉 대조군에서는 발현되지 않았음을 보여준다(레인 4-5). 구성적 활성 프로모터에 의해 추진되는 이유로 해서 TA의 구성적 발현이 예상된다. 더욱이, TA의 발현은 관절에 국한되며 뇌, 심장, 간, 신장, 비장, 또는 골격근을 포함한 타 조직에서는 RT-PCR에 의해 관찰되지 않았다(데이터 비예시).

도 4b는 MMP13\* 특이성 프라이머 세트로부터 생성되는 645 bp 단편의 증폭을 도시한다. 주의:MMP13\* 프라이머 세트는 인간 MMP13에 특이성을 띠며 이의 내생성 마우스 동족체인 콜라게나제-1과는 반응하지 않는다. RT-PCR은 MMP13\*이 비-트랜스제닉 대조군에서는 발현되지 않았음을 보여준다(레인 4-5). 레인 6-7은 DOX 상에서 유지된 마우스에서 MMP13\* 트랜스진의 발현이 존재함을 보여준다. 식수에서 DOX를 제거하면 상당량의 발현이 유도된다(레인 8-9). 본 발명자는 5-10배 유도된 것으로 평가하였다. 더욱이, 젤 전기영동 후에, PCR 단편을 나일론 막으로 옮기고 TA 또는 MMP13\* 특이성 탐침과 하이브리드화시켜 PCR 산물의 동일성을 증명한다(데이터 비예시).

수 종의 트랜스제닉 계통(예를 들면, 계통 8과 42)으로부터의 섬유아세포는 예상된 크기의 PCR 산물의 출현에 의해 입증되는 바와 같이, MMP13\*를 발현할 수 있었다. 비히클만으로 형질감염된 세포로부터는 MMP13\* RT-PCR 밴드가 검출되지 않았다. 이러한 결과는 이들 마우스에서, MMP13\* 트랜스진이 염색질의 전사 활성 영역 증으로 통합됨을 시사한다.

독시사이클린으로부터 마우스를 제거한지 3일 후에는 이미 MMP-13 절단산물이 면역학적으로 검출될 수 있었다. 독시사이클린 없이 30일 후에, 성장판에서 및 관절 연골에서 염색의 상당한 증가가 나타날 수 있지만(도 5), 결과는 마우스의 상이한 계통 간에 차이가 났다(하기 표 1 참조).

**[표 1]**

면역조직화학				
F1 동물	DOX 투여 중지 일수	hMMP13 Ab	II형 콜라겐 절단 단편 Ab	사프라닌 O 염색의 감수
계통 8	wt	-	-	현저하지 않음
계통 8	0 d	-	-	" "
	3 d	+	+	" "

	7 d	++	++	온화
	14 d	+++	+++	적당
	wt	-	-	현저하지 않음
계통 6	30 d			적당
계통 8	30 d	+++	+++	적당
계통 42	30 d	+	-	현저하지 않음

실시에 5: MMP13\* 트랜스제닉 마우스의 표현형

재료 및 방법

성체 트랜스제닉 동물에서 연골에 대한 MMP13\* 활성의 영향을 연구하기 위하여, 마우스를 시간을 증가시키기 위해 독시사이클린으로부터 제거한 후, 이들을 참수시킨다. 탈석회화 연골의 파라핀에 묻은 포름알데하이드-고정 절편을 절개하여 (i)헤마톡실린과 에오신(H&E) 및 (ii)사프라닌 O로, 이어서 웨스트 그린(American Histo Labs, Gaithersburg MD)으로 염색한다. 관절 연골의 염색 기술은 문헌[참조:Peter et al., J. Exp. Pathol. 71:19, 1990]에 기재되어 있다.

결과

MMP13\* 발현이 결여된 대조군 트랜스제닉 동물은 이들의 슬개골의 관절 연골 및 성장판 모두에서 상당량의 사프라닌 O 염색이 잔류한다(도 6a). 이와는 대조적으로, 계통 8로부터의 트랜스제닉 동물은 독시사이클린 제거 후 이들의 관절에서 사프라닌 O 염색의 상당한 감소를 보인다. 7일 후, 사프라닌 O 염색의 온화한 감소가 슬개골의 관절 연골에서 관찰되고(도 6b), 이러한 현상은 14일째까지 관절 연골 및 성장판에서 염색의 적당한 감소로 진행된다(도 6c). 사프라닌 O 염색의 상당한 감소는 부골과 대퇴골, 및 팔목과 손가락 관절의 연골을 포함한 타 관절에서도 관찰되며, 이는 대조군과 비교하여 이들 영역에서 프로테오글리칸 농도가 감소되었음을 시사한다.

트랜스진 발현으로 인한 관절 연골에서의 변화를 평가하기 위하여, 계통 6로부터의 마우스를 114일간 DOX로부터 유지시키거나 제거하고, 이들의 관절을 절개하여 H&E로 염색한다. 연령 매치된 한배 새끼와 비교시, DOX로부터 제거된 트랜스제닉 대조군은 골관절염을 생각나게 하는 병리가 발병하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 대조군 동물은 어떠한 병변이나 기타 골관절염 병리도 보이지 않은 반면에, 트랜스제닉 동물은 관절 연골에서 병변의 형성을 보인다(도 7b). 좀더 구체적으로 말해서, H&E 절편은 연골의 상당한 감소, 병소 미란, 골 증으로 확장하는 미란, 및 부어오른 활액막을 보인다. 활액막내에는 섬유성 괴사, 화생(化生), 및 활액막 세포 과형성의 증거가 존재한다. 골관절염의 이러한 증후 외에도, 관찰된 일부 변화는 류머티스성 관절염의 특징이다. 이러한 변화는 적혈구, 단핵구, 및 대식구의 침윤에 의해 보여지는 바와 같이 맥관형성을 포함한다. 도 7c 및 7d는 고배율로 활액막을 본 것이다.

논의

성체 동물의 관절 연골에서 구성적 활성 인간 MMP13 단백질을 발현하는 트랜스제닉 마우스가 성공적으로 창작되었다. 본 발명자는 기술, 즉 테트라사이클린 조절가능한 유전자 발현 시스템 및 구성적 활성 MMP 단백질의 연골세포 특이성 발현의 고유한 조합이 본 발명자로 하여금 병변 형성 및 기타 골관절염 병리를 일으키는 트랜스제닉 모델을 개발할 수 있도록 하였음을 보였다. 조절/유도가능한 시스템의 사용은 본 발명자로 하여금 성체 마우스에서의 상당한 hMMP13\* 발현을 허용하면서, 유해한 배아 효과를 우회할 수 있도록 하였다. 도 3에 도시된 Lac Z 염색은 II형 콜라겐 발현이 대략 단계 E16에서 발생 중에 일어나고 II형 콜라겐이 골격의 형성 동안 수반됨을 입증한다. II형 콜라겐, 및 I형 콜라겐은 MMP13에 의한 단백질분해성 절단을 위한 기질인 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자는 배발생 동안 MMP13의 비조절 발현이 치사적일 것으로 예상하였다.

두 트랜스진을 모두 함유하는 4 종의 트랜스제닉 계통을 설정한다. hMMP13\*을 발현한 두 계통에서, 하나는 매우 낮은 수준으로 발현한 반면에, 다른 한 계통은 상당량의 hMMP13\*를 발현하였다. 소량의 트랜스진만을 발현한 계통은 프로테오글리칸 감소의 조직학적 증거를 보였다. 그러나, DOX 투여중지 6개월 후에는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다. 상당히 더 많은 양의 hMMP13\*을 발현한 계통 6은 DOX 투여중지 4개월 후 병변 형성, 연골 분해, 및 부어오른 활액막을 포함한 골

관절염 병리를 나타내었다. 더욱이, 계통 6에서의 hMMP13\*의 발현은 조절될 수 있고, 즉 연구자에 의해 턴 온 및 턴 오프 될 수 있다. 이러한 결과는 표현형이 hMMP13\*의 발현에 기인하며 염색질내 통합 부위의 결과가 아니라는 추가의 증거를 제공한다.

계통 6에서 관찰되는 바와 같이, 골관절염 환자에서 관찰되는 병리로는 관절 파괴/미란, 병변, 섬유성 피사, 화생, 활액막 세포 과형성 및 부어오른 활액막(T 세포의 부재하)이 있다. 그러나, 트랜스제닉체에서 관찰된 모든 병리가 골관절염을 생각나게 하는 것은 아니다. 예를 들면, 맥관형성 및 단핵구와 대식구의 침윤은 류머티스성 관절염과 관련된 염증 과정 중에 관찰된 병리이다. 주:활액 중에는 호중구가 부재함. 염증 부위로 호중구의 이동은 류머티스성 관절염의 증명 병리이다.

본원에 제시된 데이터는 MMP13이 골관절염 발병에 중요한 플레이어라는 직접적인 증거를 제공한다. 또한, 본원에 기술된 트랜스제닉체는 치료제의 효능을 시험하기 위한 동물 모델을 제공한다. MMP13의 활성을 조절하거나 골관절염의 진행을 억제하는 화합물은 병변 형성 및 기타 OA 병리를 질환의 진행 중에 다양한 시간대에서 측정함으로써 모니터링될 수 있다. hMMP13\* 발현의 턴 온 및 턴 오프능, 즉 병변 형성의 생성/타이밍 조절은 화합물 효능 측정에 유리할 것이다.

이러한 OA-유사 트랜스제닉 모델은 또한 산적한 생물학적 현안의 해결에도 사용될 수 있다. MMP13 외에도, 간질성 콜라게나제(MMP1) 및 호중구 콜라게나제(MMP8)는 II형 콜라겐을 절단하는 것으로 나타났다. 따라서, 구성적 활성 MMP1 또는 MMP8을 발현하는 트랜스제닉 마우스는 이들의 관절 연골에서 유사한 표현형을 나타낼 것으로 예상된다.

#### 실시예 6: MMP-13 트랜스제닉 마우스에서 관절 퇴행성 질환의 증후 발생의 증가

본 발명의 트랜스제닉 동물에 의해 나타난 관절 퇴행 증후를 증진시키기 위하여 다음과 같이 처리한다.

트랜스제닉 마우스의 그룹을 생후 4 내지 12주째에서 트랜스진의 발현을 유도하도록 처리한다. 유도한지 2 내지 6주 후, 마우스에 제한 없이 리포폴리사카라이드(10 내지 100  $\mu$ g), 지모산(1 내지 10 mg), 수퍼항원 스테필로코커스 엔테로톡신 B(1 내지 100  $\mu$ g), 또는 TGF- $\beta$ (1 내지 10  $\mu$ g)를 포함하여 염증제를 복강내 주사한다. 이와 달리, 동물에 제한 없이 리포폴리사카라이드(1 내지 100 ng), 지모산(50 내지 250  $\mu$ g), 파파인(10 내지 100  $\mu$ g), TGF- $\beta$ (0.01 내지 1  $\mu$ g), 골 형태인 단백질-2(2 내지 1000 ng), IL-1(1 내지 100 ng), TGF- $\alpha$ (10 내지 200 ng), IGF(0.01 내지 1  $\mu$ g), 또는 FGF(0.01 내지 1  $\mu$ g)를 포함하여 염증성 또는 연골세포 기능-조절제로 관절내 주사한다. 트랜스진이 발현되지 않는 섭생하에 유지시킨 연령 및 성별-매치된 트랜스제닉 마우스에 동일 처리를 하여 대조군으로 사용한다.

퇴행성 관절 질환 증후의 발생은 관절의 팽윤 및 기능의 전체적인 관찰, 및 염증제에 노출 후 선택된 시점에서 관절의 조직학적 평가에 의해 모니터링된다.

제제는 급성 염증반응 및/또는 지속기간이 1주 이하인 프로테오글리칸의 일시적 감소를 유도할 것이다. 급성 염증반응 및/또는 일시적 연골 변화는 연골세포에서의 유전자 발현을 상향조절할 것이고, 이에 따라 트랜스진의 발현을 증진시키고 생성된 MMP-13의 수준을 증가시키게 된다.

전술한 모든 특허, 출원, 논문, 간행물, 및 시험방법은 본원에서 전부 참조로 인용된다.

전술한 상세한 설명에 비추어 당업자에게 본 발명의 다수의 변형이 제시될 것이다. 이러한 자명한 변형은 첨부된 특허청구의 범위의 의도하는 전범위내에 들어온다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

삭제

##### 청구항 2.

삭제

##### 청구항 3.

삭제

청구항 4.  
삭제

청구항 5.  
삭제

청구항 6.  
삭제

청구항 7.  
삭제

청구항 8.  
삭제

청구항 9.  
삭제

청구항 10.  
삭제

청구항 11.  
삭제

청구항 12.  
삭제

청구항 13.  
삭제

청구항 14.  
삭제

청구항 15.  
삭제

청구항 16.  
삭제

청구항 17.  
삭제

청구항 18.  
삭제

청구항 19.  
삭제

청구항 20.  
삭제

**청구항 21.**

삭제

**청구항 22.**

삭제

**청구항 23.**

삭제

**청구항 24.**

삭제

**청구항 25.**

삭제

**청구항 26.**

삭제

**청구항 27.**

삭제

**청구항 28.**

(a) 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 암호화하고, 조절가능한 프로모터에 작동적으로 연결되어 있으며, 그 발현은 조절가능한 프로모터의 통제하에 있는 제 1 재조합 유전자; 및

(b) tTA 단백질-결합 화합물의 부재시에는 조절가능한 프로모터에 결합하며 tTA 단백질-결합 화합물의 존재시에는 조절가능한 프로모터에 결합하지 않는 tTA 단백질을 암호화하고, 관절-특이성 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 제 2 재조합 유전자

를 안정하게 통합된 형태로 함유하는 체세포 및 생식세포를 갖고,

상기 매트릭스 메탈로프로테이나제의 발현은 비-인간 포유동물에서 성장할 때까지 억제될 수 있고, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 성장한 상태에서 발현될 수 있으며,

표현형으로 나타난 발현 결과가 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i) 관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii) 골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 29.**

삭제

**청구항 30.**

제 28 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17로 구성된 그룹 중에서 선택되는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 31.**

제 30 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-13인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 32.**

제 31 항에 있어서, MMP-13가 인간 기원인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 33.**

제 28 항에 있어서, 제 1 재조합 유전자가 효소적 활성 proMMP-13을 포함하는 변이체 MMP-13 폴리펩타이드를 암호화하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 34.**

제 33 항에 있어서, 제 1 재조합 유전자가 서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 35.**

제 28 항에 있어서, 동물이 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 염소 및 돼지로 구성된 그룹 중에서 선택되는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 36.**

제 35 항에 있어서, 동물이 마우스인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 37.**

제 28 항에 있어서, 관절-특이성 프로모터가 II형 콜라겐 프로모터인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 38.**

제 28 항에 있어서, 조절가능한 프로모터가 tetO7을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 39.**

제 38 항에 있어서, 조절가능한 프로모터가 서열번호 5에 나타난 서열을 갖는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 40.**

삭제

**청구항 41.**

(a) 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 암호화하고, 조절가능한 프로모터에 작동적으로 연결되어 있으며 그 발현은 조절가능한 프로모터의 통제하에 있는 제 1 재조합 유전자; 및

(b) 전사 활성 단백질-결합 화합물의 존재시에는 조절가능한 프로모터에 결합하고 전사 활성 단백질-결합 화합물의 부재시에는 조절가능한 프로모터에 결합하지 않는 전사 활성 단백질을 암호화하고, 관절-특이성 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 제 2 재조합 유전자

를 안정하게 통합된 형태로 함유하는 체세포 및 생식세포를 갖고,

매트릭스 메탈로프로테이나제는 비-인간 포유동물에게서 성장할 때까지 억제될 수 있고, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 비-인간 포유동물에게서 성장한 상태에서 발현될 수 있으며,

표현형으로 나타난 발현 결과는 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i) 관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii) 골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 42.**

삭제

**청구항 43.**

제 41 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17로 구성된 그룹 중에서 선택된 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 44.**

제 43 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-13인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 45.**

제 44 항에 있어서, MMP-13가 인간 기원인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 46.**

제 41 항에 있어서, 제 1 재조합 유전자가 효소적 활성 proMMP-13을 포함하는 변이체 MMP-13 폴리펩타이드를 암호화하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 47.**

제 46 항에 있어서, 재조합 유전자가 서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.



**청구항 48.**

제 41 항에 있어서, 동물이 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 염소 및 돼지로 구성된 그룹 중에서 선택되는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 49.**

제 48 항에 있어서, 동물이 마우스인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 50.**

제 41 항에 있어서, 관절-특이성 프로모터가 II형 콜라겐 프로모터인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 51.**

(a) 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 암호화하고 테트라사이클린-조절가능한 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 제 1 재조합 유전자; 및

(b) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 부재시에는 테트라사이클린-조절가능한 프로모터에 결합하고 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 존재시에는 상기 조절가능한 프로모터에 결합하지 않는 tTA 단백질을 암호화하고, 관절-특이성 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 제 2 재조합 유전자

를 안정하게 통합된 형태로 함유하는 체세포 및 생식세포를 갖고,

매트릭스 메탈로프로테이나제의 발현은 비-인간 포유동물에게서 성장할 때까지 억제될 수 있고, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 비-인간 포유동물에게서 성장한 상태에서 발현될 수 있고,

표현형으로 나타난 발현 결과는 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i) 관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii) 골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 52.**

삭제

**청구항 53.**

제 51 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17로 구성된 그룹 중에서 선택된 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 54.**

제 53 항에 있어서, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 MMP-13인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 55.**

제 54 항에 있어서, MMP-13가 인간 기원인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 56.**

제 51 항에 있어서, 제 1 재조합 유전자가 효소적 활성 proMMP-13을 포함하는 변이체 MMP-13 폴리펩타이드를 암호화하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 57.**

제 56 항에 있어서, 재조합 유전자가 서열번호 3에 나타난 서열을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 58.**

제 51 항에 있어서, 동물이 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 염소 및 돼지로 구성된 그룹 중에서 선택되는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 59.**

제 58 항에 있어서, 동물이 마우스인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 60.**

제 51 항에 있어서, 관절-특이성 프로모터가 II형 콜라겐 프로모터인 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 61.**

제 51 항에 있어서, 테트라사이클린-조절가능한 프로모터가 tetO7을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 62.**

삭제

**청구항 63.**

(i) MMP-13\*을 포함하는 변이체 MMP-13 폴리펩타이드를 암호화하고, tetO7 프로모터에 작동적으로 연결된 서열을 포함하는 제 1 재조합 유전자; 및

(ii) II형 콜라겐 프로모터로부터 유도된 서열에 작동적으로 연결된 tTA 단백질을 암호화하는 제 2 재조합 유전자

를 안정하게 통합된 형태로 함유하는 체세포 및 생식세포를 지닌 트랜스제닉 비-인간 포유동물 또는 이의 후대.

**청구항 64.**

비-인간 포유동물이 성장한 후에 제 28 항의 비-인간 포유동물에서의 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화하는 단계를 포함하는,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이들 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

**청구항 65.**

비-인간 포유동물이 성장한 후에 제 41 항의 비-인간 포유동물에서의 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화하는 단계를 포함하는,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이들 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

**청구항 66.**

비-인간 포유동물이 성장한 후에 제 51 항의 비-인간 포유동물에서의 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화하는 단계를 포함하는,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이들 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

**청구항 67.**

비-인간 포유동물이 성장한 후에 제 63 항의 비-인간 포유동물에서의 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화하는 단계를 포함하는,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이들 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

**청구항 68.**

- (a) 성장할 때까지 tTA 단백질-결합 화합물의 존재하에 제 28 항의 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 유지하는 단계; 및
- (b) 포유동물이 성장한 후에 비-인간 포유동물로부터 tTA 단백질-결합 화합물을 억제시켜 트랜스제닉 비-인간 포유동물 내 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 활성화함으로써, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 트랜스제닉 비-인간 포유동물의 관절내 표현형을 생산하는 단계

를 포함하고,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

### 청구항 69.

(a) 성장할 때까지 전사 활성화 단백질-결합 화합물의 부재하에 제 41 항의 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 유지하는 단계; 및

(b) 포유동물이 성장한 후에 비-인간 포유동물에게로 전사 활성화 단백질 결합 화합물을 투여하여 트랜스제닉 비-인간 포유동물내 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화함으로써, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 트랜스제닉 비-인간 포유동물의 관절내 표현형을 생산하는 단계

를 포함하고,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

### 청구항 70.

(a) 성장할 때까지 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 존재하에 제 51 항의 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 유지하는 단계; 및

(b) 포유동물이 성장한 후에 비-인간 포유동물로부터 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체를 억제시켜 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화함으로써, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 트랜스제닉 비-인간 포유동물의 관절에서의 표현형을 생산하는 단계

를 포함하고,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

### 청구항 71.

제 70 항에 있어서, 테트라사이클린 동족체가 테옥시사이클린인 방법.

### 청구항 72.

(a) 비-인간 포유동물이 성장할 때까지 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체의 존재하에 제 63 항의 트랜스제닉 비-인간 포유동물을 유지하는 단계; 및

(b) 포유동물이 성장한 후에 비-인간 포유동물로부터 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 동족체를 억제시켜 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화함으로써, 매트릭스 메탈로프로테이나제가 트랜스제닉 비-인간 포유동물의 관절내 표현형을 생산하는 단계

를 포함하고,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

비-인간 포유동물에서의 표현형 생산 방법.

### 청구항 73.

제 72 항에 있어서, 테트라사이클린 동족체가 데옥시사이클린인 방법.

### 청구항 74.

(a) 트랜스제닉 포유동물이 성장한 상태에서 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화시켜 표현형을 변화시킨 제 28 항의 비-인간 트랜스제닉 포유동물에 조성물을 투여하는 단계; 및

(b) (a) 단계의 비-인간 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위를 조성물을 투여하지 않은 대조군 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위와 비교하는 단계를 포함하고,

대조군 포유동물과 비교하여 조성물을 투여시킨 포유동물에서 표현형 변화가 발생하는데에 요구되는 시간이 증가되거나 또는 표현형 변화의 성질 또는 범위가 덜 광범위하게 발생된다는 것은 조성물의 표현형 변화 중화 포텐셜을 나타내는 것인,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

조성물의 표현형 관련 증후 중화 포텐셜 측정 방법.

### 청구항 75.

(a) 트랜스제닉 포유동물이 성장한 상태에서 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화시켜 표현형을 변화시킨 제 41 항의 비-인간 트랜스제닉 포유동물에 조성물을 투여하는 단계; 및

(b) (a) 단계의 비-인간 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위를 조성물을 투여하지 않은 대조군 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위와 비교하는 단계를 포함하고,

대조군 포유동물과 비교하여 조성물을 투여시킨 포유동물에서 표현형 변화가 발생하는데에 요구되는 시간이 증가되거나 또는 표현형 변화의 성질 또는 범위가 덜 광범위하게 발생된다는 것은 조성물의 표현형 변화 중화 포텐셜을 나타내는 것인,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

조성물의 표현형 관련 증후 중화 포텐셜 측정 방법.

**청구항 76.**

(a) 트랜스제닉 포유동물이 성장한 상태에서 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화시켜 표현형을 변화시킨 제 51 항의 비-인간 트랜스제닉 포유동물에 조성물을 투여하는 단계; 및

(b) (a) 단계의 비-인간 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위를 조성물을 투여하지 않은 대조군 트랜스제닉 포유동물내 표현형의 변화 범위와 비교하는 단계를 포함하고,

대조군 포유동물과 비교하여 조성물을 투여시킨 포유동물에서 표현형 변화가 발생하는데에 요구되는 시간이 증가되거나 또는 표현형 변화의 성질 또는 범위가 덜 광범위하게 발생된다는 것은 조성물의 표현형 변화 중화 포텐셜을 나타내는 것인,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

조성물의 표현형 관련 증후 중화 포텐셜 측정 방법.

**청구항 77.**

(a) 트랜스제닉 포유동물이 성장한 상태에서 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)의 발현을 활성화시켜 표현형을 변화시킨 제 63 항의 비-인간 트랜스제닉 포유동물에 조성물을 투여하는 단계; 및

(b) (a) 단계의 비-인간 트랜스제닉 포유동물의 표현형의 변화 범위를 조성물을 투여하지 않은 대조군 트랜스제닉 포유동물의 표현형의 변화 범위와 비교하는 단계를 포함하고,

대조군 포유동물과 비교하여 조성물을 투여시킨 포유동물에서 표현형 변화가 발생하는데에 요구되는 시간이 증가되거나 또는 표현형 변화의 성질 또는 범위가 덜 광범위하게 발생된다는 것은 조성물의 표현형 변화 중화 포텐셜을 나타내는 것인,

표현형이 프로테오글리칸의 감소, II형 콜라겐의 절단, 관절 기능 변화의 총체적인 관찰, (i)관절 연골의 피브릴화와 감소 및 (ii)골증식체 형성의 조직학적 증거, 관절 공간 협소화 및 이러한 표현형의 조합으로 구성된 그룹 중에서 선택되는,

조성물의 표현형 관련 증후 중화 포텐셜 측정 방법.

**청구항 78.**

삭제

**청구항 79.**

삭제

**청구항 80.**

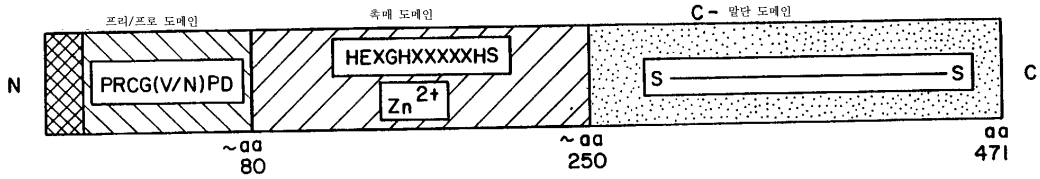
삭제

**청구항 81.**

삭제

도면

도면1a



도면1b

CAAGATGCATCCAGGGGCTCGGCTGCCTTCTTCTTGAGCTGGACTCATTGTGCGGGCCCTGCCCTTCCCAGTGGTGGTGAAGA  
M H P G V L A A F L F L S W T H C R A L P L P S G G D E D  
TGATTGCTCTGAGGAAGACCTCCAGTTTGCAGAGCGCTACCTGAGATCATACTACCATCCTACAAATCTCGCGGAATCCTGAAGGAGAA  
D L S E E D L Q F A E R Y L R S Y Y H P T N L A G I L K E N  
TGCAGCAAGCTCCATGACTGAGAGGCTCCGAGAAATGCAGTCTTTCTTCGGCTTAGAGGTGACTGGCAAATGACGATAACACCTTAGA  
A A S S M T E R L R E M Q S F F G L E V T G K L D D N T L D  
TGTCATGAAAAAGCCAAGATGCGGGTGTGTGATGTGGGTGAATACAATGTTTCCCTCGAACTCTTAAATGGTCCAAAATGAATTAAC  
V M K K P R C G V V D V G E Y N V F P R T L K W S K M N L T  
CTACAGAATTGTGAATTACCCCTGATGACTCATTCTGAAGTCGAAAAGGCATTCAAAAAGCCTTCAAAGTTTGGTCCGATGTAAC  
Y R I V N Y T P D M T H S E V E K A F K K A F K V W S D V T  
TCCTCTGAATTTACCAGACTTCACGATGGCATTGCTGACATCATGATCTCTTTTGAATTAAGGAGCATGGCGACTTCTACCCATTGA  
P L N F T R L H D G I A D I M I S F G I K E H G D F Y P F D  
TGGGCCCTCTGGCTGCTGGCTCATGCTTTCTCTCGGGCAAATATGAGGAGATGCCAATTTTGAATGATGATGAACCTGGACAAG  
G P S G L L A H A F P P G P N Y G G D A H F D D D E T W T S  
TAGTTCCAAAGGCTACAACCTGTTTCTTGTGCTGCGCATGAGTTCGGCCACTCTTAGGTCTTGACCCTCCAAGGACCTGGAGCACT  
S S K G Y N L F L V A A H E F G H S L G L D H S K D P G A L  
CATGTTTCTATCTACACCTACACCGCAAAGCCACTTTATGCTTCTGATGACGATGTACAAGGATCCAGTCTCTCTATGGTCCAGG  
M F P I Y T Y T G K S H F M L P D D D V O G I O S L Y G P G

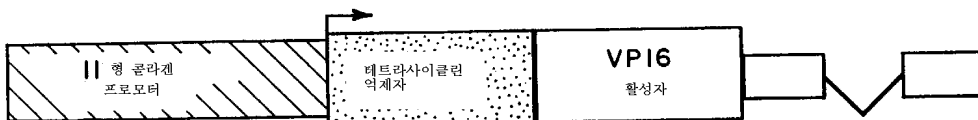
A \_\_\_\_\_ A

도면1c

AGATGAAGACCCCAACCTAAACATCCAAAAAGCCAGACAAATGTGACCCTTCTTATCCCTTGATGCCATTACCAGTCTCCGAGGAGA  
D E D P N P K H P K T P D K C D P S L S L D A I T S L R G E  
AACAAATGATCTTTAAAGACAGATTCTTCTGGCGCTGCATCTCAGCAGGTGATGCGGAGCTGTTTTAACGAAATCATTTGGCCAGA  
T M I F K D R F F W R L H P Q Q V D A E L F L T K S F W P E  
ACTTCCCAACCGTATTGATGCTGCATATGAGCACCCCTTCTCATGACTCATCTTCACTTCAAGAGGTAGAAAATTTGGGCTCTTAATGG  
L P N R I D A A Y E H P S H D L I F I F R G R K F W A L N G  
TTATGACATTCTGGAAGTTATCCAAAAAATATCTGAACTGGTCTTCCAAAAGAAGTTAAGAAGATAAGTGCAGCTGTTCACTTTGA  
Y D I L E G Y P K K I S E L G L P K E V K K I S A A V H F E  
GGATACAGCAAGACTCTCTGTTCTCAGGAAACCGGTCTGGAGATGATGATACTAACCATATTATGGATAAAGACTATCCGAGACT  
D T G K T L L F S G N Q V W R Y D D T N H I M D K D Y P R L  
AATAGAAGAAGACTTCCAGGAATTGGTGATAAAGTAGATGCTGTCTATGAGAAAATGGTTATATCTATTTTTTCAACGGACCCATACA  
I E E D F P G I G D K V D A V Y E K N G Y I Y F F N G P I Q  
GTTTGAATACAGCATCTGGAGTAACCGTATTGTTTCGGCTCATGCCAGCAAATTCATTTTGTGGTGTAAAGTGTCTTTTTAAAAATGTT  
F E Y S I W S N R I V R V M P A N S I L W C \*  
ATTTAAATCTGAAGAGCATTGGGGTAATACTTCCAGAAGTGGGGTAGGGGAAGAAGAGCTATCAGGAGAAAGCTTGG

A \_\_\_\_\_ A

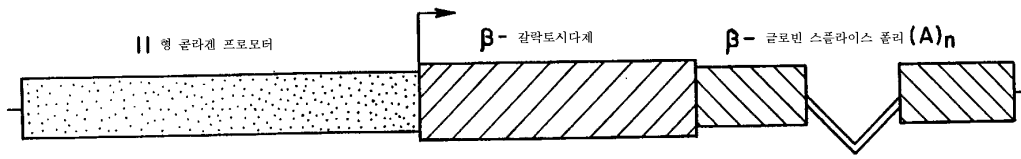
도면2a



도면2b



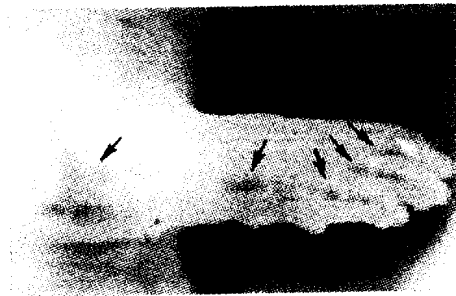
도면3a



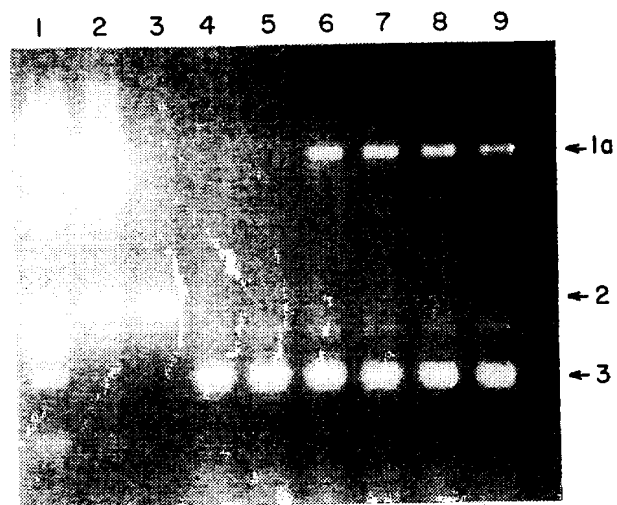
도면3b



도면3c

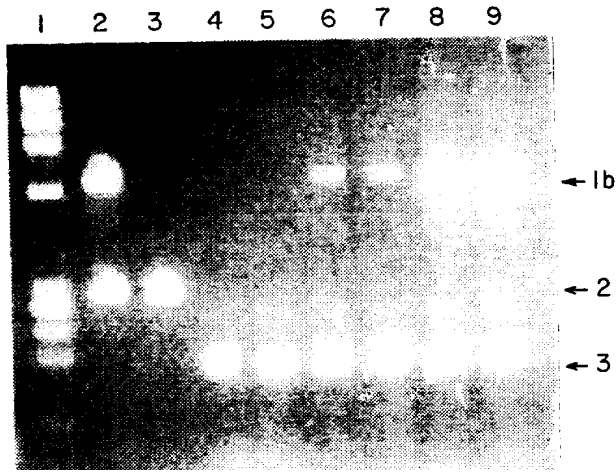


도면4a

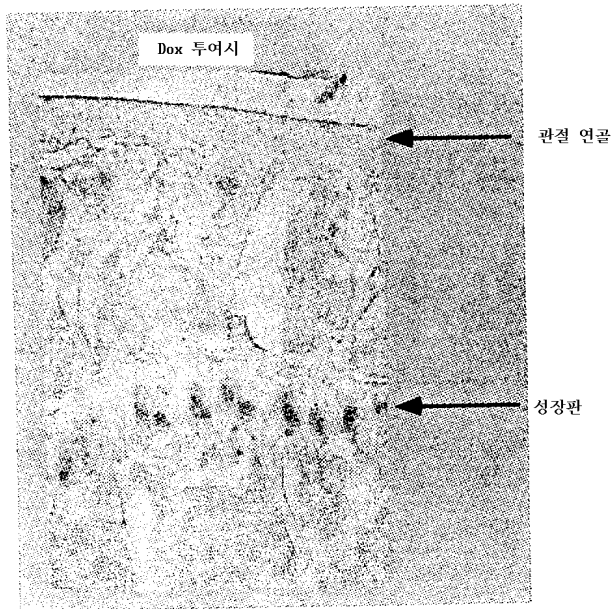




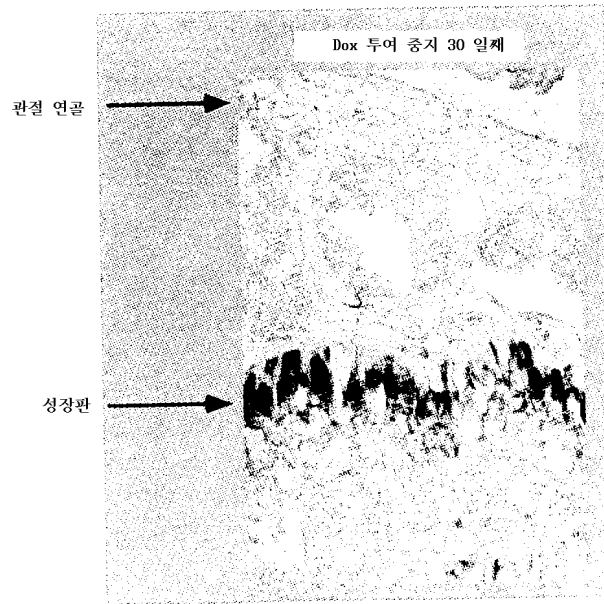
도면4b



도면5a



도면5b



도면6a



Dox 투여시

도면6b



Dox 투여 중지 7 일째

도면6c



Dox 투여 중지 14 일째

도면7a



대퇴골

슬개골

도면7b



대퇴골

슬개골

도면7c



슬개골

도면7d



슬개골

서열목록

- <110> American Home Products Corporation
- <120> TRANSGENIC ANIMAL MODEL FOR DEGENERATIVE DISEASES OF CARTILAGE
- <130> AHP-97285
- <150> US 60/068,312
- <151> 1997-12-19
- <150> US 08/994,689
- <151> 1997-12-19
- <160> 24

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Pro Arg Cys Gly Xaa Pro Asp

1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Glu Xaa Gly His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 1521

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

caagatgcat ccaggggtcc tggctgcctt cctcttcttg agctggactc attgtcgggc      60
cctgcccctt cccagtggtg gtgatgaaga tgatttgtct gaggaagacc tccagtttgc      120
agagcgctac ctgagatcat actaccatcc tacaaatctc gcgggaatcc tgaaggagaa      180
tgcagcaagc tccatgactg agaggctccg agaaatgcag tctttcttcg gcttagaggt      240
gactggcaaa cttgacgata acaccttaga tgatcatgaaa aagccaagat gcgggggttg      300
cgatgtgggt gaatacaatg ttttccctcg aactcttaaa tggtcacaaa tgaatttaac      360
ctacagaatt gtgaattaca ccctgatat gactcattct gaagtcgaaa aggcattcaa      420
aaaagccttc aaagtttggt ccgatgtaac tcctctgaat tttaccagac ttcacgatgg      480
cattgctgac atcatgatct cttttggaat taaggagcat ggcgacttct acccatttga      540
tgggccctct ggctgctggt ctcatgcttt tcctcctggg ccaaattatg gaggagatgc      600
ccattttgat gatgatgaaa cctggacaag tagttccaaa ggctacaact tgtttcttgt      660
tgctgcgcat gagttcggcc actccttagg tcttgaccac tccaaggacc ctggagcact      720
catgtttcct atctacacct acaccggcaa aagccacttt atgcttcctg atgacgatgt      780
acaagggatc cagtctctct atgggtccagg agatgaagac cccaacccta aacatccaaa      840
aacgccagac aaatgtgacc cttccttatc ccttgatgcc attaccagtc tccgaggaga      900
aacaatgatc tttaaagaca gattcttctg ggcctgcat cctcagcagg ttgatgcgga      960
gctgttttta acgaaatcat tttggccaga acttcccaac cgtattgatg ctgcatatga     1020
gcacccttct catgacctca tcttcatctt cagaggtaga aaattttggg ctcttaatgg     1080
ttatgacatt ctggaagggt atccccaaaa aatatctgaa ctgggtcttc caaagaagt     1140
taagaagata agtgcagctg ttcactttga ggatacaggc aagactctcc tgttctcagg     1200
aaaccaggtc tggagatatg atgatactaa ccatattatg gataaagact atccgagact     1260
aatagaagaa gacttcccag gaattggtga taaagtagat gctgtctatg agaaaaatgg     1320
ttatatctat tttttcaacg gaccataca gtttgaatac agcatctgga gtaaccgtat     1380
tgttcgcgtc atgccagcaa attccatfff gtgggtgtaa gtgtctffff aaaaattggt     1440
atttaaacc tgaagagcat ttggggtaat acttccagaa gtgcggggta ggggaagaag     1500
agctatcagg agaaagcttg g

```

<210> 4

<211> 471

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met His Pro Gly Val Leu Ala Ala Phe Leu Phe Leu Ser Trp Thr His

1	5	10	15
Cys Arg Ala Leu Pro Leu Pro Ser Gly Gly Asp Glu Asp Asp Leu Ser			
	20	25	30
Glu Glu Asp Leu Gln Phe Ala Glu Arg Tyr Leu Arg Ser Tyr Tyr His			
	35	40	45
Pro Thr Asn Leu Ala Gly Ile Leu Lys Glu Asn Ala Ala Ser Ser Met			
	50	55	60
Thr Glu Arg Leu Arg Glu Met Gln Ser Phe Phe Gly Leu Glu Val Thr			
65	70	75	80
Gly Lys Leu Asp Asp Asn Thr Leu Asp Val Met Lys Lys Pro Arg Cys			
	85	90	95
Gly Val Val Asp Val Gly Glu Tyr Asn Val Phe Pro Arg Thr Leu Lys			
	100	105	110
Trp Ser Lys Met Asn Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp			
	115	120	125
Met Thr His Ser Glu Val Glu Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Val			
	130	135	140
Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Asn Phe Thr Arg Leu His Asp Gly Ile			
145	150	155	160
Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe Gly Ile Lys Glu His Gly Asp Phe Tyr			
	165	170	175
Pro Phe Asp Gly Pro Ser Gly Leu Leu Ala His Ala Phe Pro Pro Gly			
	180	185	190
Pro Asn Tyr Gly Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Thr Trp Thr			
	195	200	205
Ser Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Phe			
	210	215	220
Gly His Ser Leu Gly Leu Asp His Ser Lys Asp Pro Gly Ala Leu Met			
225	230	235	240
Phe Pro Ile Tyr Thr Tyr Thr Gly Lys Ser His Phe Met Leu Pro Asp			
	245	250	255
Asp Asp Val Gln Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Gly Asp Glu Asp			
	260	265	270
Pro Asn Pro Lys His Pro Lys Thr Pro Asp Lys Cys Asp Pro Ser Leu			
	275	280	285
Ser Leu Asp Ala Ile Thr Ser Leu Arg Gly Glu Thr Met Ile Phe Lys			
	290	295	300
Asp Arg Phe Phe Trp Arg Leu His Pro Gln Gln Val Asp Ala Glu Leu			
305	310	315	320
Phe Leu Thr Lys Ser Phe Trp Pro Glu Leu Pro Asn Arg Ile Asp Ala			
	325	330	335
Ala Tyr Glu His Pro Ser His Asp Leu Ile Phe Ile Phe Arg Gly Arg			
	340	345	350
Lys Phe Trp Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Ile Leu Glu Gly Tyr Pro Lys			
	355	360	365
Lys Ile Ser Glu Leu Gly Leu Pro Lys Glu Val Lys Lys Ile Ser Ala			
	370	375	380
Ala Val His Phe Glu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Leu Phe Ser Gly Asn			
385	390	395	400
Gln Val Trp Arg Tyr Asp Asp Thr Asn His Ile Met Asp Lys Asp Tyr			
	405	410	415
Pro Arg Leu Ile Glu Glu Asp Phe Pro Gly Ile Gly Asp Lys Val Asp			

	420		425		430	
Ala Val Tyr Glu Lys Asn Gly Tyr Ile Tyr Phe Phe Asn Gly Pro Ile						
	435		440		445	
Gln Phe Glu Tyr Ser Ile Trp Ser Asn Arg Ile Val Arg Val Met Pro						
	450		455		460	
Ala Asn Ser Ile Leu Trp Cys						
465			470			
<210>	5					
<211>	470					
<212>	DNA					
<213>	Unknown					
<220>						
<223>	Artificial Sequence					
<400>	5					
ctcgagttta ccaactcccta tcagtgatag agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc						60
tatcagtgat agagaaaagt gaaagtgcgag tttaccactc cctatcagtg atagagaaaa						120
gtgaaagtcg agtttaccac tccctatcag tgatagagaa aagtgaaagt cgagtttacc						180
actccctatc agtgatagag aaaagtgaaa gtcgagttta ccaactcccta tcagtgatag						240
agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc tatcagtgat agagaaaagt gaaagtgcgag						300
ctcgggtacc gggtcgagta ggcgtgtacg gtgggaggcc tatataagca gagctcgttt						360
agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca						420
ccgggaccga tccagcctcc gcggccccga attagcttga tatcgaattc						470
<210>	6					
<211>	3479					
<212>	DNA					
<213>	Unknown					
<220>						
<223>	Unknown					
<400>	6					
ggtaccacta gtaagcttag atccactgtc tgggattata tcaggacaac cgaagcctgg						60
aaagtgtatt aggtagagca ttttcttcca cgtgtttggg cacgtttccg acagctagga						120
ttccagctct gtctttgtat gttacagact gtaaataaat cgcaggtgaa actgtttgga						180
cagtaggtgg ggatcaaaaga ccctccgccc gtgagactct aggcgctttc ccctgccacc						240
agcctgtctc cagagatgct ctggaaggag gcgggccccg gcggtctttc tgctctttag						300
cgtggcggac gcggcggcgg gggcagggct ggagcagaga gcgctgcagt gatagaactt						360
tctgaccccg ctgcgcaggg cggcaggggtg gcaggggtggc aggggtggcga gctaagccag						420
agccgaacgc tggagctctg ggaggaacat cgaaggtttg tatgtggtct gagatcggcc						480
tgactatatt tttttgtcct aaatttgcaa gcacacacc acaaagctgc ggtcttgacc						540
ggtattcttt atagagcgca atggagtgag ctgagtgctt aaacgatttc cctaattcat						600
ctgatagcag aggcgctctc ctaattggcg aagagctgcc tcatgtccgc aactttttgg						660
cagagtgaat tccacagctt tgtgtgtgtg tgtggggggg ggtgtaaggg gtgtctaaaa						720
cttccggtct cctactattc tgtatctoga ccggttggtt ttacaccccg gctcatctca						780
tcaacgcaa cacccccact ctccatgga cccaaggacc tgacgtgggg gaaggtggac						840
attaggaatg tcagaaacct agagtccacg ctccctctct ccatctttcc acgagtttg						900
gaaacttctt ggctgcgaag actttgacct acatctgcat ttctcagccc cagcttccaa						960
aagtgtgca ggttcgggag gggagacctc agtcctcctt tgtgaggctt gtttgcgttg						1020
agggattggc agcagtggtc tccagatggg ctgaaacctc gcccgatttt atttaaactg						1080
gttctcgtg gagagctgtg aatcgggctc tgtatgcgct cgagaaaagc ccattcatg						1140
agaggcaagg cccagtggtt cccccgact ccccgacccc cctctcccac aatataatccc						1200
ccctccctgt gcccgcctgc cgccacctcc cgggctccgg ccccgcgcgc agcggcgacg						1260
aagcaacaca gttccccgaa agaggtagct ttttaattgg ccagccaaa agaatactt						1320
atgccgcacg gcggtaacga ggggaaccgg atcggggcggc caggatgcta tctgtgtagc						1380



ccttttcgtg ccacaattag ggtggtgctg gcttcctccg accgcaccta ggcgatctgg 1440  
 ttacactggt ggctcctttc ttgggcagtc atttaatcct actttttact ctacgaatgt 1500  
 ctgtctgatg gagggctgtg tccggagccc catccacaaa gagtcagcca gcagctctca 1560  
 caccggctg gatctcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 1620  
 aagccagcca agctagcttg cgcaagctag cttgcgatcc gtaaaaatgt gtgagagtta 1680  
 caaaatgtct tccgggctaa gatccgacag ccatggtcca aagaagactt cggcactgca 1740  
 gacttaaaac cagctttcta gcagaggcag aaggatctag agccaaaggc aaagacttga 1800  
 ataggctggg aagatgcaag aatggcattt tacataaaga acactctctc cttttccagc 1860  
 cagcacactt gcatagaaat taagttttac acttgaagtt ctttgtttcc atcctgagaa 1920  
 gctccaaagt ctgagtggtt gtggtatgct gggtaattct cccacacccc caacattccc 1980  
 tgggggttcc atggggtagt cttctcccaa ggacttccag cggcaacaca gaaatcccac 2040  
 ttcgagacaa aggagttact gcttaaatca ggccctaatt tccaaggttc cttttgctta 2100  
 aagttcccta gaggaccatc tcacttctaa agaaaagggtg tattcgggga cccatcctca 2160  
 acctccttgt tatggaagga gacttcggga acagagcaag ggctgagcct ccggcagttt 2220  
 ggggtaaggt tggggttggg gggagcaagg aaggcaagtg aggctggagg cccagggata 2280  
 ggggaagatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc tcggggatgg 2340  
 tgggtgtgga caactaggaa actctggcgc tttctcctcc cctcacaaaa ctgagtccag 2400  
 ctggagccgc ctccagactc tctggccagg gcctcagagt ggtcaacagt ccctggccag 2460  
 cgttgctctc tccaggctaa gggcacccac tcccctggag attcctgaac ctgggcccag 2520  
 aagagccgaa ttagacaagt gtctccaatc cggctgcgtg cggattttgt tgcgggtgtcc 2580  
 ctcggttgtc tgcagttcct ttagtccctt ccctggcctg ccccttacac ctccacacag 2640  
 gtccccctct gtgtaggaat acaccagacc ctctcttagc cacacacacc tccagtcccc 2700  
 cgtctaccta gatttttttc atagctagtt ggatggggga tgggttaggg aggctgggtt 2760  
 tgcgagcctc caggtgggag ttcaccgaca ggtactccgc aaaggagctg gaaggcaggt 2820  
 ctggaaaact gtccccaga tttaggattc tgggcagctt ccatcagctt atactttggc 2880  
 tccccgccc ctaaactcc ccatccccac ctctcttct cccgttactt cgtcctccct 2940  
 cgcctttcca gccttgagtc taaagctcca tgcttatgcc tctgcaaaca acccctccc 3000  
 ttctaaccctc agcagaactc cgaggaaagg ggcgggaggc ccccttctc gcctgtgggt 3060  
 agagggggca gtgtggcagt cccaagtggg ggcgaccgga ggccgtctcg gtgccccgcc 3120  
 cgatcaggcc actgggcaca tcgggggagg gaagctgggc tcaccaaagg ggcgactggc 3180  
 cttggcaggt gtgggctctg gtccggcctg ggcaggctcc gggggcgggg tctcaggtta 3240  
 cagccccgcg gggggctggg gggcgcccgc cggtttgggc tggtttgcca gcctttggag 3300  
 cgaccgggag catataaccg gagcctctgc tgggagaaga cgcagagcgc cgctgggctg 3360  
 ccgggtctcc tgctcctcc tctgtctct agagcctcct gcatgagggc gcggtagaga 3420  
 cccggaaccg ctccgtgctc tgccgcctcg ccgagcttcg cccgcaagct ggggaattc 3479

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val

1 5

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 8

aagccaagat gcggggttgt cgatgtgggt gaatacaat

39

<210> 9

<211> 40

<212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 9  
 gaaaaagcca agatgcgggg gtcctgatgt ggggtgaatac 40  
 <210> 10  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 10  
 ggtaccacta gtaagcttag atctcatatg gtcgaccccc ggaattcct gcagggatcc 60  
 tctagaagta ctccatgggt atacatcgat gcgggccgc 98  
 <210> 11  
 <211> 2792  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 11  
 ctcgagttta cactcccta tcagtgatag agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc 60  
 tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag tttaccactc cctatcagtg atagagaaaa 120  
 gtgaaagtcg agtttaccac tccctatcag tgatagagaa aagtgaaagt cgagtttacc 180  
 actccctatc agtgatagag aaaagtgaaa gtcgagttta cactcccta tcagtgatag 240  
 agaaaagtga aagtcgagtt taccactccc tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag 300  
 ctcggtaccc gggtcgagta ggcgtgtaag gtgggaggcc tatataagca gagctcgttt 360  
 agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctc atagaagaca 420  
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccccga attagcttga tatcgaattc gagctcggta 480  
 cccggggatc ctctagacaa gatgcatcca ggggtcctgg ctgccttctt cttcttgagc 540  
 tggactcatt gtcggggcct gcccttccc agtggtggtg atgaagatga tttgtctgag 600  
 gaagacctcc agtttgacga gcgctacctg agatcatact accatcctac aaatctcgcg 660  
 ggaatcctga aggagaatgc agcaagctcc atgactgaga ggctccgaga aatgcagtct 720  
 ttcttcggct tagaggtagc tggcaactt gacgataaca ccttagatgt catgaaaaag 780  
 ccaagatgag gggttgtcga tgtgggtgaa tacaatgttt tcctcgaac tcttaaattg 840  
 tccaaaatga atttaacctc cagaattgtg aattacacct ctgatatgac tcattctgaa 900  
 gtcgaaaagg cattcaaaaa agccttcaaa gtttgggtccg atgtaactc tctgaatttt 960  
 accagacttc acgatggcat tgctgacatc atgatctctt ttggaattaa ggagcatggc 1020  
 gacttctacc catthgatgg gccctctggc ctgctggctc atgcttttcc tcttgggcca 1080  
 aattatggag gagatgcccc ttttgatgat gatgaaacct ggacaagtag ttccaaaggc 1140  
 tacaacttgt ttcttggtgc tgcgcatgag ttcgccact ccttaggtct tgaccactcc 1200  
 aaggacctg gagcactcat gtttcctatc tacacctaca ccggcaaaaag ccactttatg 1260  
 cttcctgatg acgatgtaca agggatccag tctctctatg gtccaggaga tgaagacccc 1320  
 aaccctaaac atccaaaaac gccagacaaa tgtgacctt cttatccct tgatgccatt 1380  
 accagtctcc gaggagaaac aatgatcttt aaagacagat tcttctggcg cctgcatcct 1440  
 cagcaggttg atgaggagct gtttttaacg aaatcatttt ggccagaact tcccaaccgt 1500  
 attgatgctg catatgagca cccttctcat gacctatct tcatcttcag aggtagaaaa 1560  
 ttttgggctc ttaattggtta tgacattctg gaaggttatc ccaaaaaaat atctgaactg 1620  
 ggtcttccaa aagaagttaa gaagataagt gcagctgttc actttgagga tacaggcaag 1680  
 actctcctgt tctcaggaaa ccaggctctgg agatatgatg atactaacca tattatggat 1740  
 aaagactatc cgagactaat agaagaagac ttcccaggaa ttggtgataa agtagatgct 1800

```

gtctatgaga aaaatgggta tatctatfff ttcaacggac ccatacagtt tgaatacagc 1860
atctggagta accgtattgt tgcgctcatg ccagcaaatt ccattttgtg gtgtaagtg 1920
tctttttaa aattgttatt taaatcctga agagcatttg gggtaatact tccagaagtg 1980
cggggtaggg gaagaagagc tatcaggaga aagctctagt tctagagggc cctattctat 2040
agtgtcacct aaatgctaga ggatctttgt gaaggaacct tacttctgtg gtgtgacata 2100
attggacaaa ctacctacag agattttaaag ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt 2160
ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt ttgtgtatff tagattccaa cctatggaac 2220
tgatgaatgg gagcagtggg ggaatgcctt taatgaggaa aacctgtfff gctcagaaga 2280
aatgccatct agtgatgatg aggctactgc tgactctcaa cattctactc ctccaaaaaa 2340
gaagagaaa gtagaagacc ccaaggactt tccttcagaa ttgctaagtt ttttgagtca 2400
tgctgtgtff agtaatagaa ctcttgcttg ctttgctatt tacaccacaa aggaaaaagc 2460
tgactgcta tacaagaaaa ttatggaaaa atatttgatg tatagtgcct tgactagaga 2520
tcataatcag ccataaccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctccacacc 2580
tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgcag 2640
cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatff cacaaataaa gcattttfff 2700
cactgcattc tagttgtggg ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca 2760
tcccgccatg ggtatacatc gatgcggccg cc 2792
<210> 12
<211> 5276
<212> DNA
<213> Unknown
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 12
ggtaccacta gtaagcttag atccactgtc tgggattata tcaggacaac cgaagcctgg 60
aaagtgtatt aggtagagca ttttcttcca cgtgtttggg cacgtttccg acagctagga 120
ttccagctct gtctttgtat gttacagact gtaaataaat cgcagggtgaa actgtttgga 180
cagtaggtgg ggatcaaaga ccctccgccg gtgagactct aggcgctttc ccctgccacc 240
agcctgtctc cagagatgct ctggaaggag gcgggcccgg gcggtctttc tgctctttag 300
cgtggcggac gcggcggcgg gggcagggct ggagcagaga gcgctgcagt gatagaactt 360
tctgaccccg ctgctcaggg cggcaggggtg gcaggggtggc aggggtggcga gctaagccag 420
agccgaacgc tggagctctg ggaggaacat cgaagtgtff gtatgtggtc tgagatcggc 480
ctgactatat ttttttgtcc taaatttgca agcacacacc cacaaagctg cggctctgac 540
cggatattctt tatagagcgc aatggagtga gctgagtgtc taaacgattt ccctaattca 600
tctgatagca gaggcgtct cctaattggc gaagagctgc ctcatgtccg caactttttg 660
gcagagtgaa ttccacagct ttgtgtgtgt gtgtgggggg ggggtgtaagg ggtgtctaaa 720
actttcggtc tcctactatt ctgtatctcg accggttggg tttacacccc ggctcatctc 780
atcaacgcaa acacccccac tctcctatgg acccaaggac ctgacgtggg ggaagggtgga 840
cattaggaat gtcagaaacc tagagtccac gctcctcctc tccatctttc cacgagtttg 900
ggaaacttct tggctgcgaa gactttgacc cacatctgca tttctcagcc ccagcttcca 960
aaagtgtctc aggttcggga ggggagacct cagtcctcct ttgtgaggct tgtttgcggt 1020
gagggattgg cagcgatggc ttccagatgg gctgaaacct tgcccgtatt tatttaact 1080
ggttcctcgt ggagagctgt gaatcgggct ctgtatgcgc tcgagaaaag cccattcat 1140
gagaggcaag gccagtggg tcccccgac tccccgacc cctctccca caatataatc 1200
ccctccctg tgcccgcctg ccgccacctc ccgggctccg gccccgcgag cagcggcgac 1260
gaagcaacac agttccccga aagaggtagc tttttaattg gccagccaca aagaatcact 1320
tatgccgcac ggcggtaacg aggggaaccg gatcggggcg ccaggatgct atctgtgtag 1380
cccttttcgt gccacaatta ggggtgggtgt ggttctctcc gaccgcacct aggcgatctg 1440
gttacctgt tggctcctff ctggggcagt ctttaatcc tactttttac tctacgaatg 1500
tctgtctgat ggagggctgt gtccggagcc ccataccaaa agagtcagcc agcagctctc 1560
acaccgggct ggatctcata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt 1620
taagccagcc aagctagctt gcgcaagcta gcttgcgac cgtaaaaatg tgtgagagtt 1680

```

acaaaatgtc	ttccgggcta	agatccgaca	gccatgggtcc	aaagaagact	tcggcactgc	1740
agacttaaaa	ccagctttct	agcagaggca	gaaggatcta	gagccaaagg	caaagacttg	1800
aataggctgg	gaagatgcaa	gaatggcatt	ttacataaag	aacactctct	ccttttccag	1860
ccagcacact	tgcatagaaa	ttaagtttta	caottgaagt	tctttgtttc	catcctgaga	1920
agctccaaaag	tctgaggtgg	tgtgggtatgc	tgggtaattc	tccccacccc	ccaacattcc	1980
ctggggggttc	catgggggta	gcttctccca	aggacttcca	gcggaacac	agaaatccca	2040
cttcgagaca	aaggagttac	tgcttaaadc	aggcccta	ttccaagggt	ccctttgctt	2100
aaagttccct	agaggaccat	ctcacttcta	aagaaaagg	gtattcgggg	acccatcctc	2160
aacctccttg	ttatggaagg	agacttcggg	aacagagcaa	gggctgagcc	tccggcagtt	2220
tggggtaagg	ttgggggttg	ggggagcaag	gaaggcaagt	gaggctggag	gcccagggat	2280
aggggaagat	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	ctcggggatg	2340
gtgggtgggtg	acaactagga	aactctggcg	ctttctcctc	ccctcacaaa	actgagtcca	2400
gctggagccg	cctccagact	ctctggccag	ggcctcagag	tgggtcaacag	tccctggcca	2460
gcgttgctct	ctccaggcta	agggcaccca	ctcccctgga	gattcctgaa	cctggggcag	2520
gaagagccga	attagacaag	tgtctccaat	ccggctgcgt	gcggttttg	ttgagggtgc	2580
cctcggttgt	ctgcagttcc	tttagtccct	tccctggcct	gccccttaca	cctccacaca	2640
ggtccccctc	tgtgtaggaa	tacaccagac	cctctcttag	ccacacacac	ctccagtccc	2700
ccgtctacct	agattttttt	catagctagt	tggatggggg	atgggttagg	gaggctgggt	2760
ttgcgagcct	ccaggtggga	gttcaccgac	aggtactccg	caaaggagct	ggaaggcagg	2820
tctggaaaac	tgtccccag	atthaggtat	ctgggcagct	tccatcagct	tatactttgg	2880
ctccccgcc	ccctaaactc	cccataccca	ccttcttttc	tcccgttact	tcgtcctccc	2940
tcgcctttcc	agccttgagt	ctaaagctcc	atgcttatgc	ctctgcaaac	aaccccctcc	3000
cttctaacc	cagcagaact	ccgaggaaag	gggcccggag	cccccttct	cgctgtgggt	3060
tagagggggc	agtgtggcag	tcccagtggt	ggggcaccgg	aggcctctc	ggtgccccgc	3120
ccgatcaggc	cactgggcac	atcggggggc	ggaagctggg	ctcaccaaag	gggcgactgg	3180
ccttggcagg	tgtgggctct	ggtccggcct	gggcaggctc	cgggggcggg	gtctcagggt	3240
acagccccgc	ggggggctgg	ggggcgccc	gcggtttggg	ctggtttgcc	agcctttgga	3300
gcgaccggga	gcatataacc	ggagcctctg	ctgggagaag	acgcagagcg	ccgctgggct	3360
gccgggtctc	ctgcctcctc	ctcctgctcc	tagagcctcc	tgcattgagg	cgcggtagag	3420
accgggacc	gctccgtgct	ctgccgcctc	gcccagcttc	gcccgcaagc	tggggaattc	3480
atatgtctag	attagataaa	agtaaagtga	ttaacagcgc	attagagctg	cttaatgagg	3540
tcggaatcga	aggtttaaca	acccgtaaac	tcgccagaa	gctaggtgta	gagcagccta	3600
cattgtattg	gcatgtaaaa	aataagcggg	ccttctctga	cgcttagacc	attgagatgt	3660
tagataggca	ccatactcac	ttttgccctt	tagaagggga	aagctggcaa	gattttttac	3720
gtaataacgc	taaaagtttt	agatgtgctt	tactaagtca	tcgcgatgga	gcaaaagtac	3780
atttaggtac	acggcctaca	gaaaaacagt	atgaaactct	cgaaaatcaa	ttagcctttt	3840
tatgccaca	aggtttttca	ctagagaaatg	cattatatgc	actcagcgt	gtggggcatt	3900
ttactttagg	ttgcgtattg	gaagatcaag	agcatcaagt	cgctaaagaa	gaaagggaaa	3960
cacctactac	tgatagtatg	ccgccattat	tacgacaagc	tatcgaatta	tttgatcacc	4020
aaggtgcaga	gccagccttc	ttattcggcc	ttgaattgat	catatgcgga	ttagaaaaac	4080
aacttaaatg	tgaaagtggg	tccgcgtaca	gcccgcgcgc	tacgaaaaac	aattacgggt	4140
ctaccatcga	ggcctgctc	gatctcccgg	acgacgacgc	ccccgaagag	gccccggctg	4200
cggctccgcg	cctgtccttt	ctccccgcgg	gacacacgcg	cagactgtcg	acggcccccc	4260
cgaccgatgt	cagcctgggg	gacgagctcc	acttagacgg	cgaggacgtg	gcatggcgc	4320
atgccgacgc	gctagacgat	ttcgatctgg	acatgtttgg	ggacggggat	tccccgggtc	4380
cgggatttac	ccccacgac	tccgccccct	acggcgctct	ggatatggcc	gacttcgagt	4440
ttgagcagat	gtttaccgat	gcccttggaa	ttgacgagta	cggtgggtag	ggggcgcgag	4500
gatcctctag	agggccctat	tctatagtgt	cacctaaatg	ctagaggatc	tttgtgaagg	4560
aaccttactt	ctgtgggtgtg	acataattgg	acaaaactacc	tacagagatt	taaagctcta	4620
aggtaaatat	aaaattttta	agtgtataat	gtgttaaact	actgattcta	attgtttgtg	4680
tatttttagat	tccaacctat	ggaactgatg	aatgggagca	gtgggtggaat	gcctttaatg	4740
aggaaaaact	gttttgctca	gaagaaatgc	catctagtga	tgatgaggct	actgctgact	4800

ctcaacattc	tactcctcca	aaaaagaaga	gaaaggtaga	agaccccaag	gactttcctt	4860
cagaattgct	aagttttttg	agtcattgctg	tgttttagtaa	tagaactctt	gcttgctttg	4920
ctatttacac	cacaaaggaa	aaagctgcac	tgctatacaa	gaaaattatg	gaaaaatatt	4980
tgatgtatag	tgcttgact	agagatcata	atcagccata	ccacatttgt	agaggtttta	5040
cttgctttaa	aaaacctccc	acacctcccc	ctgaacctga	aacataaaat	gaatgcaatt	5100
gttgttgta	acttgtttat	tgcaagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	5160
aatttcacaa	ataaagcatt	tttttactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	5220
aatgtatctt	atcatgtctg	gatcatcccc	ccatgggtat	acatcgatgc	ggccgc	5276
<210>	13					
<211>	7664					
<212>	DNA					
<213>	Unknown					
<220>						
<223>	Artificial Sequence					
<400>	13					
ggtaccacta	gtaagcttag	atccactgtc	tgggattata	tcaggacaac	cgaagcctgg	60
aaagtgtatt	aggtagagca	ttttcttcca	cgtgtttggg	cacgtttccg	acagctagga	120
ttccagctct	gtctttgtat	gttacagact	gtaaataaat	cgcaggtgaa	actgtttgga	180
cagtaggtgg	ggatcaaaga	ccctccgccc	gtgagactct	agggcgtttc	ccctgccacc	240
agcctgtctc	cagagatgct	ctggaaggag	gcgggcccgg	gcggtctttc	tgctctttag	300
cgtggcggac	gcggcggcgg	gggcagggct	ggagcagaga	gcgctgcagt	gatagaactt	360
tctgaccccg	ctgcgcaggg	cggcagggtg	gcagggtggc	aggggtggcg	gctaagccag	420
agccgaacgc	tggagctctg	ggaggaacat	cgaagtgttt	gtatgtggtc	tgagatcggc	480
ctgactatat	ttttttgtcc	taaatttgca	agcacacacc	cacaaagctg	cggtcttgac	540
cggtattctt	tatagagcgc	aatggagtga	gctgagtgtc	taaacgattt	ccctaattca	600
tctgatagca	gaggcgtctc	cctaattggc	gaagagctgc	ctcatgtccg	caactttttg	660
gcagagtga	ttccacagct	ttgtgtgtgt	gtgtgggggg	gggtgtaagg	ggtgtctaaa	720
actttcggtc	tcctactatt	ctgtatctcg	accggttggg	tttacacccc	ggctcatctc	780
atcaacgcaa	acacccccac	tctcctatgg	acccaaggac	ctgacgtggg	ggaagggtgga	840
cattaggaat	gtcagaaacc	tagagtccac	gctcctcctc	tccatctttc	cacgagtttg	900
ggaaacttct	tggctgcgaa	gactttgacc	cacatctgca	tttctcagcc	ccagcttcca	960
aaagtgtctg	aggttcggga	ggggagacct	cagtccctct	ttgtgaggct	tgtttgcggt	1020
gagggattgg	cagcgtatgg	ttccagatgg	gctgaaacct	tgcccgtatt	tatttaaact	1080
ggttcctcgt	ggagagctgt	gaatcgggct	ctgtatgcgc	tcgagaaaag	ccccattcat	1140
gagaggcaag	gcccagtggg	tcccccgac	tccccgacct	ccctctccca	caatataatc	1200
cccctccctg	tgcccgcctg	ccgccacctc	ccgggctccg	gccccgcgcg	cagcggcgac	1260
gaagcaacac	agttccccga	aagaggtagc	tttttaattg	gccagccaca	aagaatcact	1320
tatgccgcac	ggcggtaacg	aggggaaccg	gatcggggcg	ccaggatgct	atctgtgtag	1380
cccttttcgt	gccacaatta	gggtggtgct	ggcttcctcc	gaccgcacct	aggcgatctg	1440
gttacactgt	tggctccttt	cttgggcagt	catttaatcc	tactttttac	tctacgaatg	1500
tctgtctgat	ggagggctgt	gtccggagcc	ccatccacaa	agagtcagcc	agcagctctc	1560
acaccggct	ggatctcata	tggtgcactc	tcagtacaat	ctgctctgat	gccgcatagt	1620
taagccagcc	aagctagctt	gcgcaagcta	gcttgcgatc	cgtaaaaatg	tgtgagagtt	1680
acaaaatgtc	ttccgggcta	agatccgaca	gccatggctc	aaagaagact	tcggcactgc	1740
agacttaaaa	ccagctttct	agcagaggca	gaaggatcta	gagccaaagg	caaagacttg	1800
aataggctgg	gaagatgcaa	gaatggcatt	ttacataaag	aacactctct	ccttttccag	1860
ccagcacact	tgcatagaaa	ttaagtttta	cacttgaagt	tctttgtttc	catcctgaga	1920
agctccaaaag	tctgaggtgg	tgtgggatgc	tgggtaattc	tccccacccc	ccaacattcc	1980
ctgggggttc	catgggggta	gcttctccca	aggacttcca	gcggaacac	agaaatccca	2040
cttcgagaca	aaggagttac	tgcttaaatac	aggccctaata	ttccaagggtt	ccctttgctt	2100
aaagttccct	agaggaccat	ctcacttcta	aagaaaaggt	gtattcgggg	accatcctc	2160
aacctccttg	ttatggaagg	agacttcggg	aacagagcaa	gggctgagcc	tccggcagtt	2220

tgggtaag	ttgggttg	ggggagca	gaaggcaag	gaggctgg	gcccagggat	2280
aggggaag	gtgtgtgt	gtgtgtgt	gtgtgtgt	gtgtgtgt	ctcggggatg	2340
gtgggtgg	acaactag	aactctgg	ctttctctc	ccctcacia	actgagtcca	2400
gctggagcc	cctccagac	ctctggcc	ggcctcag	tggtcaac	tccctggcca	2460
gcgttgct	ctccaggct	agggcacca	ctcccctgg	gattcctg	cctgggccag	2520
gaagagcc	attagaca	tgtctcca	ccggctgct	gcggatttt	ttgcggtgt	2580
cctcggtgt	ctgcagtt	tttagtcc	tccttgcc	gccccttaca	cctccacaca	2640
ggtccccct	tgtgtagg	tacaccgac	cctctcttag	ccacacacac	ctccagtccc	2700
ccgtctacct	agatttttt	catagctag	tggatgggg	atgggttag	gaggctgggt	2760
ttgcgagcc	ccaggtgg	gttcaccg	aggactcc	caaaggag	ggaaggcag	2820
tctggaaa	tgtccccag	atthagatt	ctgggcag	tccatcag	tatactttg	2880
ctccccgcc	ccctaaact	cccataccc	ccttctctt	tcccgttact	tcgtcctccc	2940
tcgctttcc	agccttgag	ctaaagct	atgcttat	ctctgcaaa	aacccccct	3000
cttctaacc	cagcagaac	ccgaggaa	gggcccgg	cccccttct	cgctgtggt	3060
tagaggggg	agtgtggc	tcccagtg	gggagacc	aggcctctc	ggtgccccg	3120
ccgatcagg	cactgggc	atcggggg	ggaagctg	ctcacciaa	gggcgactg	3180
ccttggcag	tgtgggct	ggtccggc	gggcaggct	cgggggcgg	gtctcagg	3240
acagcccc	gggggctg	ggggcgccc	gcggtttgg	ctggtttg	agcctttg	3300
gcgaccgg	gcatataa	ggagcctc	ctgggaga	acgcagag	ccgctggg	3360
gccgggtct	ctgcctct	ctcctgct	tagagcct	tgcatgagg	cgcggtag	3420
accggacc	gctccgtg	ctgcccct	gccgagct	gcccgcaag	tggggaatt	3480
ggatcccc	gatcgaaa	gcctgctaa	gcaaaaaa	agtcaccat	tcgtttact	3540
tgaccaaca	gaacgtgat	ttcgttgcc	gtctgggag	cattggtct	gacaccag	3600
aggagctgt	caagcgcg	cccgtcgt	tacaacgt	tgactggga	aaccctgg	3660
ttacccaac	taatcgcct	gcagcacat	cccctttcg	cagctggct	tatagcga	3720
aggccccac	cgatcgcc	tcccacagt	tgcgcagc	gaatggcg	tggcgcttt	3780
cctggtttc	ggcaccaga	gcggtgcc	aaagctgg	ggagtgcg	cttctgag	3840
ccgatactg	cgctgcct	tcaaactgg	agatgcag	ttacgatg	cccataca	3900
ccaacgta	ctattccat	acggctca	cgccgttt	tcccacgg	aatccgag	3960
gttgttact	gctcacatt	aatggtgat	aaagctgg	acaggaagg	cagacgcg	4020
ttattttga	tggcgtaac	ttggcgtt	atctgtgg	caacgtgc	tgggtcgg	4080
acggccagg	cagtcgttt	ccgtctgat	ttgacctg	cgcatttta	cgcgccgg	4140
aaaaccgc	cgcggtgat	gtgctgcgt	ggagtgcg	cagttatct	gaagatcag	4200
atatgtgg	gatgagcgg	attttccgt	acgtctcgt	gctgcata	ccgactac	4260
aatcagcg	tttccatgt	gccactcgt	ttaatgat	tttcagcc	gctgaact	4320
aggctgaag	tcagatgt	ggcgagtt	gtgactacc	acgggta	gtttcttt	4380
ggcagggta	aacgcagg	gccagcgg	ccgcgcct	cgcggtg	attatcga	4440
agcgtggt	ttatgccg	cgcgctcac	tacgtctg	cgctcga	ccgaaact	4500
ggagcgcc	aatcccga	ctctatcgt	cggtggtg	actgcac	gccgacgg	4560
cgctgatt	agcagaag	tgcgatgt	gtttccgc	ggtgcgg	gaaaatgg	4620
tgctgctgt	gaacggca	ccgttgct	ttcgaggc	taaccgtc	gagcatcat	4680
ctctgcat	tcaggctc	gatgagc	cgatggtg	ggatatac	ctgatgag	4740
agaacaact	taacgccg	cgctgttc	attatccg	ccatccg	tggtacac	4800
tgtgcgacc	ctacggct	tatgtggt	atgaagcc	tattgaa	cacggcat	4860
tgccaatg	tctgctg	gatgatcc	gctggct	ggcgatg	gaacgcgt	4920
cgcgaatg	gcagcgcg	cgtaatac	cgagtgtg	catctggt	ctgggga	4980
aatcaggcc	cggcgcta	cacgacgc	tgtatcgt	gatcaaat	gtcgatc	5040
cccgccgg	gcagtatg	ggcgccgg	ccgacacc	ggccaccg	attatttg	5100
cgatgtac	gcgcgtgg	gaagaccg	ccttcccgg	tgtgccg	tggtccat	5160
aaaaatgg	ttcgctac	ggagagac	gcccgcgt	cctttgcg	tacgccc	5220
cgatgggta	cagtcttg	ggtttcg	aatactgg	ggcgtttc	cagtatccc	5280
gtttacagg	cggtctcg	tgggactgg	tggatcag	gctgatta	tatgatg	5340

acggcaaccg gtggctcggt tacggcggtg attttggcga tacgccgaac catcgccagt 5400  
tctgtatgaa cggctctggtc tttgccgacc gcacgccgca tccagcgctg acggaagcaa 5460  
aacaccagca gcagtttttc cagttccggt tatccgggca aaccatcgaa gtgaccagcg 5520  
aatacctggt ccgctcatagc gataacgagc tcctgcaact gatggtggcg ctggatggta 5580  
agccgctggc aagcggtgaa gtgcctctgg atgtcgctcc acaaggtaaa cagttgattg 5640  
aactgcctga actaccgagc ccggagagcg ccgggcaact ctggctcaca gtacgcgtag 5700  
tgcaaccgaa cgcgaccgga tggtcagaag ccgggcacat cagcgcctgg cagcagtggc 5760  
gtctggcgga aaacctcagt gtgacgctcc ccgcccgcgt ccacgccatc ccgcatctga 5820  
ccaccagcga aatggatttt tgcacgagc tgggtaataa gcgttggcaa tttaacgcc 5880  
agtcaggctt tctttcacag ctgtggattg gcgataaaaa acaactgctg acgccgctgc 5940  
gcgatcagtt caccctgca ccgctggata acgacattgg cgtaagtga gcgaccgca 6000  
ttgaccctaa cgcctgggtc gaacgctgga agggcgggg ccattaccag gccgaagcag 6060  
cgttggtgca gtgcacggca gatacacttg ctgatgcggt gctgattacg accgctcacg 6120  
cgtggcagca tcaggggaaa acctatttta tcagccgga aacctaccg attgatggta 6180  
gtggtcaaaat ggcgattacc gttgatggtg aagtggcgag cgataaccg catccggcg 6240  
ggattggcct gaactgccag ctggcgcagg tagcagagcg ggtaaactgg ctcgattag 6300  
ggccgcaaga aaactatccc gaccgcctta ctgccgcctg ttttgaccgc tgggatctgc 6360  
cattgtcaga catgtatacc ccgtacgtct tcccagcga aaacggctct cgctgcggga 6420  
cgcgcgaatt gaattatggc ccacaccagt ggcgcggcga cttccagttc aacatcagcc 6480  
gctacagtca acagcaactg atggaaacca gccatcgcca tctgctgcac gcggaagaag 6540  
gcacatggct gaatatcgac ggtttccata tggggattgg tggcgacgac tcctggagcc 6600  
cgtcagtatc ggcggaatta cagctgagcg ccggtcgcta ccattaccag ttggtctggt 6660  
gtcaaaaata ataataaccg gcaggccatg tctgaaagta ttcgcgtaag gaaatccatt 6720  
atgtactatt taaaaaacac aaacttttgg atggtcgggt tattcttttt cttttacttt 6780  
tttatcatgg gagcctactt cccgtttttc ccgatttggc tacatgacat caaccatag 6840  
agcaaaagtg atacgggtat tatttttggc gctatctctc tgttgtcgct attattccaa 6900  
ccgctgttgg tctgctttct gacaaactcg gcctcgactc tagactgaga acttcagggt 6960  
gagtttgggg acccttgatt gttctttctt tttcgtatt gaaaaattca tgttatatgg 7020  
agggggcaaa gttttcaggg tgttgtttag aatgggaaga tgtcccttgt atccatgg 7080  
accctcatga taattttggt tctttcactt tctactctgt tgacaacat tgtctcctct 7140  
tattttcttt tcattttctg taactttttt cgttaaactt tagcttgcac ttgtaacgaa 7200  
tttttaaatt cactttcggt tattttgtcag attgtaagta ctttctctaa tcactttttt 7260  
ttcaaggcaa tcagggtaat tatattgtac ttcagcacag ttttagagaa caattgttat 7320  
aattaaatga taaggtagaa tattttctgca tataaattct ggctggcgtg gaaatattct 7380  
tattggtaga aacaactaca tcctggtaat catcctgcct ttctctttat ggttacaatg 7440  
atatacactg tttgagatga ggataaaata ctctgagtc aaaccgggccc cctctgctaa 7500  
ccatgttcat gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttgttgtgct 7560  
gtctcatcat tttggcaaaag aattcactcc tcaggtgcag gctgcctatc agaaggtgg 7620  
ggctggtgtg gccaatgccc tggctcacia ataccactga gatc 7664

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 14

cgagggcctg ctcgatctcc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Artificial Sequence  
 <400> 15  
 ggcattccac cactgctccc 20  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 gagcaccctt ctcatgacct c 21  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 17  
 gttggtgtag atgggcgcat cg 22  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 18  
 gcggggtctc aggttacagc c 21  
 <210> 19  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 19  
 cgcccagaag ctaggtgtag ag 22  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 20  
 cgcccatatc cagagcgccg 20  
 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21  
 gccctctggc ctgctggctc atg 23  
 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22  
 caggagagtc ttgcctgtat cctc 24  
 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> DNA



<213> Unknown  
 <220>  
 <223> Mus muscalis  
 <400> 23  
 aggagggagc tgacagatac actcc 25  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Mus muscalis  
 <400> 24  
 aggccacaga catctcctct gg 22