

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 16/24

(11) 공개번호 특1999-008335
(43) 공개일자 1999년01월25일

(21) 출원번호	특1997-707861		
(22) 출원일자	1997년11월05일		
번역문제출일자	1997년11월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 95/009058	(87) 국제공개번호	WO 96/034891
(86) 국제출원출원일자	1995년06월23일	(87) 국제공개일자	1996년11월07일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 중국 일본 대한민국 멕시코 뉴질랜드 슬로베니아		
(30) 우선권주장	8/446,881 1995년05월05일 미국(US)		
(71) 출원인	휴먼제논사이언시즈, 인코오포레이티드 로버트 에리치. 벤슨 미국, 매릴랜드 20850-3338, 록빌, 키 웨스트 애비뉴 9410		
(72) 발명자	크레익에이.로젠 미국, 매릴랜드 20882, 레이톤스빌, 롤링 힐 로드 22400 스티븐엠.루벤 미국, 매릴랜드 20832, 올니, 헤리테이지 힐스 드라이브 18528 하오동리 미국, 매릴랜드 20878, 게이터스버그, 루트리지 드라이브 11033 마크디.아담스 미국, 매릴랜드 20878, 노스 포토막, 두피프 드라이브 15205		
(74) 대리인	이상섭, 나영환		

심사청구 : 없음

(54) 인체 케모킨 베타-8, 케모킨 베타-1 및 대식세포 염증 단백질-4

요약

본 발명은 인체 Ckβ-8, MIP-4 및 Ckβ-1 및 케모킨 폴리펩티드를 암호화하는 DNA(RNA)에 관한 것이며, 재조합 기술에 의해서 이 폴리펩티드를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 또한 백혈병, 종양, 만성 감염, 자가면역 질환, 섬유증 질환, 상처 치유 및 건선을 위해 케모킨 폴리펩티드를 사용하는 방법을 개시하고 있다. 케모킨 폴리펩티드에 대한 길항 물질 및 류마티스 관절염, 자가 면역 및 만성 및 급성 염증 및 감염성 질환, 알러지 반응, 포스트글란딘-의존 열 및 골수염에 대한 길항 물질의 사용을 개시하고 있다. 또한 핵산 서열의 변이와 관련된 질환 및 폴리펩티드의 농도 변경을 검출하기 위한 진단 분석이 개시되어 있다.

대표도

도1

명세서

기술분야

본 출원은 미국 특허청에 1995년 5월 5일자로 출원된 계류중인 출원 08/446,881호의 일부 연속 출원이다.

본 발명은 새롭게 동정된 폴리뉴클레오티드, 이 폴리뉴클레오티드로 암호된 폴리펩티드, 이 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드의 용도 및 이 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 인체 케모킨 β-8(Ckβ-8), 대식세포 염증 단백질-4(MIP-4) 및 케모킨 β-1(Ckβ-1)으로서 추정된다. 또한, 본 발명은 이러한 폴리펩티드들의 작용을 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

인터크린 시토킨이라고 하는 케모킨은 구조적, 기능적으로 관련이 있는 시토킨의 아군이다. 이 분자들은

크기가 8 내지 10kd이다. 일반적으로, 케모킨은 아미노산 수준에서 20% 내지 75%의 상동성을 나타내고, 2개의 이황화 결합을 형성하는 4개의 보존적 시스테인 잔기를 특징으로 한다. 케모킨은 처음 2개의 시스테인 잔기의 배열에 근거하여, 2개의 아군, 즉 알파 및 베타로 분류하였다. 알파 아군에서는 처음 2개의 시스테인이 1개의 아미노산에 의해 분리되어 있고, 따라서 C-X-C 아군이라고도 한다. 베타 아군에서는 2개의 시스테인이 인접하고 있고, 따라서 C-C 아군이라고 한다. 지금까지 인체에서는 이 군에 속하는 8개 이상의 상이한 성분들이 확인되었다.

인터크린 시토킨은 다양한 기능을 나타낸다. 그 고유 특징은 단핵구, 호중구, T 림프구, 호염기구 및 섬유아세포를 비롯하여 독특한 세포 종류의 화학주성적 이동을 유인하는 성질이 있다는 것이다. 많은 케모킨은 전염증(proinflammatory) 활성을 갖고 있고 염증 반응동안 다단계에 관여한다. 이러한 활성들로는 히스타민 방출 자극, 리소좀 효소와 류코트리엔 방출, 내피 세포에 대한 표적 면역 세포의 증가된 유착성, 보체 단백질의 증가된 결합성, 과립구 유착 분자와 보체 수용체의 유도된 발현성 및 호흡폭발을 포함한다. 염증에 대한 관련성외에도 특정 케모킨은 다른 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 대식세포 염증 단백질 1(MIP-1)은 조혈 간상부 세포의 증식을 억제할 수 있고, 혈소판 인자-4(PF-4)는 내피 세포 증식의 강력한 억제제이며, 인터루킨-8(IL-8)은 각질세포의 증식을 촉진하고 GR0는 흑색종 세포의 오토크린 성장인자이다.

다양한 생물학적 활성의 견지에서 케모킨이 림프구 이동, 상처 치유, 조혈 작용 조절과, 알러지, 천식 및 관절염과 같은 염증 질환을 비롯하여 다수의 생리적 상태와 질병 상태에 연루되어 있다는 것은 놀라운 것이 아니다. 조혈제 조절제의 일 예는 MIP-1이다. MIP-1은 본래 대식세포로부터 생성되는 내독소-유도성 전염증 시토킨인 것으로 동정되었다. 그 이후의 연구를 통해 MIP-1이 2개의 상이하지만 관련있는 단백질 MIP-1 α 및 MIP-1 β 로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌다. MIP-1 α 및 MIP-1 β 는 대식세포, 단핵구 및 T 림프구에 대한 화학주성인자이다. 흥미로운 사실은 다능성 간상부 세포 억제제(SCI)를 생화학적으로 정제하고 연속 서열 분석한 결과 SCI가 MIP-1 α 와 동일한 것으로 밝혀졌다. 더욱이, MIP-1 β 는 조혈성 간상부 세포 증식을 억제하는 MIP-1 α 의 성질에 반작용할 수 있다. 이러한 발견으로 MIP-1의 1차적인 생리적 역할이 골수내의 조혈작용을 조절하는 것이며 제안된 염증 작용은 2차적이라는 가설이 유도된다. 간상부 세포 억제제로서 MIP-1 α 의 작용 방식은 G1/S 분열중간기에서 세포 사이클을 차단하는 성질과 관련이 있다. 또한, MIP-1 α 의 억제 효과는 미숙한 선조 세포에는 제한되지만 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)의 존재하에서 후기 선조세포들에 대해서는 사실상 자극적인 것으로 추정된다.

여러 그룹들은 MIP-1 α 및 MIP-1 β 의 인체 동족체일 가능성이 있는 것을 클로닝하였다. 모든 경우마다, 활성화된 T-세포 RNA에 대하여 제조된 라이브러리로부터 cDNA를 분리하였다.

MIP-1 단백질은 초기 상처부의 염증 세포중에서 검출할 수 있으며 상처부의 섬유아세포로부터 IL-1 및 IL-6의 생산을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 정제된 천연 MIP-1(MIP-1, MIP-1 α 및 MIP-1 β 폴리펩티드 함유)은 마우스의 족부에 경피적으로 주입하거나 래브의 뇌척수액내로 주사 주입했을 때 급성 염증을 일으킨다(Wolpe and Cerami, 1989, FASKB J. 3:2565-73). 이러한 직접적 또는 간접적 성질일 수 있는 MIP-1의 전염증 성질외에도, MIP-1은 말균 상처 처리 챔버를 이용하는 실험용 마우스 모델에서 상처 치유의 초기 염증 단계에서도 수거되었다(Fahey et al., 1990, Cytokine, 2:92). 예를 들면, 키론 코모포레이션에서 출원한 PCT 출원 WO 92/05198호는 효모에서 포유류 대식세포 염증 단백질(MIP)을 생산하는 주형으로서 활성적인 DNA 분자를 개시하고 있다.

위의 MIP-1 α 및 MIP-1 β 는 별개의 것이나 밀접한 관련이 있는 시토킨이다. 이 2가지 단백질의 부분 정제 혼합물은 호중구 기능에 영향을 미치고 국소 염증과 열병을 일으킨다. MIP-1 α 는 효모 세포중에서 발견되었고, 균질물로 정제되었다. 이것을 구조 분석한 결과, MIP-1 α 는 제한된 서열 상동성을 공유하는 PF-4 및 IL-8과 매우 유사한 2차 구조 및 3차 구조를 갖고 있는 것으로 확인되었다. 또한, MIP-1 α 는 생체내에서 활성적이어서 마우스 간상부 세포가 연속적인 삼중수소화된 티미딘 처리에 의한 시험관내 사멸을 억제하는 것으로 증명되었다. 또, MIP-1 α 는 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자에 대한 응답반응으로 보다 항원감작된 선조 과립구 대식세포 콜로니-형성 세포의 증식을 향상시키는 것으로 나타났다(Clemens, J.M., et al., Cytokine, 4:76-82(1992)).

발명의 상세한 설명

본원의 모출원에서 MIP-1 γ 라고 명명한 본 발명의 폴리펩티드 Ck β -1은 아미노산 서열 상동성에 근거할 때 β 케모킨류의 신규 성분이다. 상기 모출원에서 본래 MIP-3이라고 한 Ck β -8 폴리펩티드도 또한 아미노산 서열 상동성에 근거할 때 β 케모킨류의 신규 성분이다.

본 발명의 제1양태에 따르면, 인체 Ck β -8, 인체 MIP-4 및 인체 Ck β -1인 신규 성숙 폴리펩티드 및 이의 생물학적 활성이고, 진단적 또는 치료적으로 유용한 단편, 이의 유사체 및 유도체를 제공한다.

본 발명의 제2양태에 따르면, mRNA, DNA, cDNA, 게놈 DNA를 비롯하여 상기 폴리펩티드를 암호하는 분리된 핵산 분자 뿐만 아니라 이의 생물학적 활성이고 진단적 또는 치료적으로 유용한 단편, 이의 유사체 및 유도체를 제공한다.

본 발명의 제3양태에 따르면, 핵산 서열을 함유하는 재조합 원핵 숙주 세포 및/또는 진핵 숙주 세포를 배양하는 것으로 이루어지는 재조합 기법으로, 상기 단백질의 발현 및 이어서 상기 단백질 회수를 증진시키는 조건하에서 상기 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명의 제4양태에 따르면, 상기 폴리펩티드 또는 이 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드를, 치료용, 예컨대 화학요법동안 화학치료제로부터 골수 간상부 세포를 보호하고, 백혈병 세포를 제거하며, 면역응답반응을 자극하고, 조혈작용 및 림프구 유인을 조절하며, 건선과 종양체를 치료하고, 내성적 만성 및 급성 감염에 대한 숙주 방어기작을 향상시키며 상처 치유를 자극하는데 이용하는 방법을 제공한다.

본 발명의 제5양태에 따르면, 상기 폴리펩티드에 대한 항체를 제공한다.

본 발명의 제6양태에 따르면, 상기 폴리펩티드의 작용을 억제하는데, 예컨대 IL-1 및 TNF- α 의 생성을 억

제하고, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 천식 및 관절염을 치료하는데 사용할 수 있는, 상기 폴리펩티드에 대한 길항물질을 제공한다.

본 발명의 제7양태에 따르면, 본 발명은 또한 Ck β -8, Ck β -1 및 MIP-4 핵산 서열에 특이적으로 하이브리드하기에 충분한 길이의 핵산 분자를 함유하는 핵산 프로브를 제공한다.

본 발명의 제8양태에 따르면, 본 발명은 폴리펩티드의 저발현 및 과잉발현과 관련된 질환을 검출하고 이러한 폴리펩티드를 암호하는 핵산 서열내의 돌연변이를 검출하는 진단 분석법을 제공한다.

본 발명의 제9양태에 따르면, 본 발명은 상기 폴리펩티드 또는 이 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드를, 과학적 연구, DNA 합성 및 DNA 벡터 제조와 관련된 시험관내 시험용, 및 인체 질환을 치료하기 위한 치료제 및 진단제 개발용 연구 시약으로서 이용하는 방법을 제공한다.

이러한 본 발명의 양태 및 기타 다른 양태는 본원의 교시로부터 당업자라면 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

첨부되는 도면은 청구의 범위에 의해 한정되는 본 발명의 영역을 제한하고자 하기 위한 것이 아니다.

도 1은 Ck β -8을 암호하는 cDNA 서열 및 이에 상응하는 추론된 아미노산 서열을 도시한 것이다. 처음 21개 아미노산은 추정되는 리더 서열을 나타낸다. 시그널 서열은 모두 배큐로비루스 발현 단백질의 N-말단 펩티드 서열 결정으로 결정된 것과 같다.

도 2는 Ck β -1을 암호하는 cDNA 서열 및 이에 상응하는 추론된 아미노산 서열을 도시한 것이다. 처음 19개 아미노산은 리더 서열을 나타낸다.

도 3은 MIP-4를 암호하는 cDNA 서열 및 이에 상응하는 추론된 아미노산 서열을 도시한 것이다. 처음 20개 아미노산은 리더 서열을 나타낸다.

도 4는 Ck β -8(위) 및 인체 MIP-1 α (아래) 간의 아미노산 상동성을 예시한 것이다. 모든 케모킨에 특징적인 4개의 시스테인이 나타나 있다.

도 5는 2개의 아미노산 서열을 도시한 것으로, 상부 서열은 인체 MIP-4 아미노산 서열이고 하부 서열은 인체 MIP-1 α (인체 편도 림프구 LD78 베타 단백질 전구체)이다.

도 6은 Ck β -1(위)과 인체 MIP-1 α (아래)간의 아미노산 서열을 정렬한 것이다.

도 7은 COS 세포내에서 HA-태그된 Ck β -1을 발현시킨 후 전기영동한 Ck β -1의 겔 사진이다.

도 8은 배큐로비루스 발현계내에서 Ck β -1을 발현 및 정제한 후 SDS-PAGE한 겔 사진이다.

도 9는 배큐로비루스 발현계에서 Ck β -8을 발현하고 3단계 정제한 후 SDS-PAGE한 겔 사진이다.

도 10A 및 도 10B는 48-웰 마이크로챔버 기구(Neuro Probe, Inc.)를 사용하여 화학주성 분석법으로 측정된 Ck β -8의 화학주성인자 활성을 도시한 것이다. 그 실험 절차는 제조업자의 매뉴얼에 기재된 바와 같이 수행하였다. 시험한 Ck β -8의 각 농도에 있어서, 5의 고전력장에서의 이동성을 조사하였다. 제시된 결과는 2가지 각각의 실험에서 수득한 평균값을 나타낸 것이다. THP-1(A) 세포 및 인체 PBMC(B)에 대한 화학주성인자 활성을 도시하였다.

도 11은 히다치 F-2000 형광 분광광도계를 사용하여 측정된 Ck β -8에 대한 응답반응시의 세포내 칼슘 농도의 변화를 도시한 것이다. 세균 발현성 Ck β -8을 최종 50nM의 농도로 Indo-1 부하된 THP-1 세포에 첨가하고 칼슘 농도의 세포내 농도를 모니터하였다.

도 12는 단핵구 세포주 THP-1을 LPS(0.1 내지 10 ng/ml) 또는 Ck β -8(50 ng/ml)로 16시간동안 처리한 후, 그 조직 배양물의 상등액을 ELISA 분석하여 TNF- α 분비량을 정량한 것이다.

도 13A 및 도 13B는 용출법으로 정제한 인체 말초 혈액 단핵구를 증가량의 Ck β -8(배큐로비루스의 생성물)로 16시간동안 처리한 후, 그 조직 배양 상등액을 ELISA 분석하여 TNF- α , IL-6, IL-1, GM-CSF 및 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)의 분비량을 정량한 것이다.

도 14는 마우스 골수 세포의 저밀도 개체군을, 제시된 케모킨(100ng/ml)을 함유하거나 함유하지 않는 한천 배지중에서, IL-3(5ng/ml), SCF(100ng/ml), IL-1 α (10ng/ml) 및 M-CSF(5ng/ml)의 존재하에 평판배양한 것이다(1,500 세포/접시). 제시된 데이터는 2가지 각 실험(각각 2반복항)에서 수득한 평균값을 나타낸 것이다. 평판 배양후 14일 후에 콜로니를 계수하였다. 케모킨의 존재하에 생성된 콜로니의 수는 첨가된 임의의 케모킨의 부재하에 생성된 평균 콜로니수(%)로서 나타내었다.

도 15A 및 도 15B는 HPP-CFC(A) 및 LPP-CFC(B)에 의해 나타나는 마우스 골수 콜로니 형성시의 Ck β -8 및 Ck β -1의 효과를 도시한 것이다.

도 16은 새로 분리된 골수 세포의 M-CFS 및 SCF-자극된 콜로니 형성에 대한 배큐로비루스-발현성 Ck β -1 및 Ck β -8의 효과를 예시한 것이다.

도 17은 골수 세포의 동족 개체군의 IL-3 및 SCF-자극된 증식 및 분화에 대한 Ck β -8 및 Ck β -1의 효과를 도시한 것이다.

도 18A 및 도 18B는 골수 세포의 동족 개체군중에서 GR-1 및 Mac-1(표면 표식) 양성의 세포 개체군의 생성에 대한 Ck β -8 및 Ck β -1의 효과를 도시한 것이다. 동족 세포는 IL-3(5ng/ml) 및 SCF(100ng/ml) 단독 물을 보충한 증식 배지(a) 및 Ck β -8(50ng/ml)이나 Ck β -1(50ng/ml)을 보충한 증식 배지(b)중에서 항온배양하였다. 그 다음 세포를 골수양 분화 GR-1, Mac-1, Sca-1 및 CD45R 표면 항원에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 염색한 뒤, FACScan으로 분석하였다. 데이터는 대세포 개체군(A) 및 소세포 개체군(B)중에서

의 양성 세포의 백분율(%)로서 나타내었다.

도 19는 Ck β -8(+)의 존재가 IL-3, M-CSF 및 GM-CSF에 대한 응답반응으로 골수 세포 콜로니 형성을 억제한다는 것을 예시한 것이다.

도 20은 골수 세포 콜로니 형성을 억제하는 Ck β -8의 용량 응답 반응이다. 세포는 도 19에서와 같이 분리하여 처리하였다. 이와 같이 처리된 세포를, Ck β -8을 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml 및 100 ng/ml로 함유하거나 함유하지 않고 IL-3, GM-CSF 또는 M-CSF(5 ng/ml)의 존재하에 한천계 콜로니 형성 분석법중에서 1,000 세포/접시의 밀도로 평판배양하였다. 데이터는 상기 특정 인자 단독물에 의해 형성된 콜로니수(%)로서 콜로니 형성율을 나타내었다. 이 데이터는 표준 편차를 나타내는 오차 바아와 함께 2반복 배양 접시의 평균값으로 나타내었다.

도 21은 조혈성 성장 인자의 존재 또는 부재하에 Ck β -8 및 Ck β -1에 의한 세포소멸 유도반응을 도시한 것이다. 마우스 골수 세포는 대퇴골 및 경골에서 관류시켜 피골 밀도 구배로 분리한 뒤, 플라스틱 부착성에 의해 단핵구를 분리하였다. 수득한 세포 개체군을 그다음 Ck β -8(50ng/ml) 또는 Ck β -1(250ng/ml)을 첨가하거나 첨가함이 없이 IL-3(5ng/ml), GM-CSF(5ng/ml), M-CSF(10ng/ml) 및 G-CSF(10ng/ml)을 보충한 MEM-계 배지중에서 하룻밤동안 항온배양하였다. 또한, 세포를 Ck β -8 및 Ck β -1을 함유하거나 함유하지 않는 배지 단독물중에서 배양하였다. 24시간 후, 세포를 수거하고 보링거 맨하임 세포 사멸 ELISA 키트를 사용하여 세포소멸 반응으로 처리하였다. 데이터는 각 성장 인자의 존재하에 배양한 배양물중에서 나타나는 세포소멸의 양으로서 간주되는 기준치를 사용하여 이 기준치 이상의 증가율로서 나타내었다.

도 22는 인체 단핵구내에서 Ck β -8을 암호하는 RNA의 발현율을 도시한 것이다. 새로 용출된 단핵구로부터 총 RNA를 분리하고 hu rIFN-g 100 U/ml, LPS 100 ng/ml 또는 그 혼합물로 처리하였다. 각 처리후의 RNA를 1.2% 아가로스 겔상에서의 전기영동으로 분리하고 나일론 막으로 전이시켰다. ³²P-표지된 cDNA로 탐침하여 Ck β -8 mRNA를 정량하고 수득되는 자동방사능사진상의 밴드를 밀도계측적으로 정량하였다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 도 1, 도 2 및 도 3(각각 서열 2, 4 및 6)의 추론된 아미노산 서열을 갖는 성숙 폴리펩티드 또는 1994년 2월 9일자로 기탁된 ATCC 수탁번호 75676인 클론(들)의 cDNA에 의해 암호화된 성숙 Ck β -8 폴리펩티드, 및 1994년 2월 9일자로 기탁된 ATCC 수탁번호 75675인 클론의 cDNA에 의해 암호화된 성숙 MIP-4 폴리펩티드 및 1993년 10월 13일자로 기탁된 ATCC 수탁번호 75572인 클론의 cDNA에 의해 암호화된 성숙 Ck β -1 폴리펩티드를 암호하는 분리된 핵산(폴리뉴클레오티드)이 제공된다.

본 발명의 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드는 시토킨 또는 케모킨류에 속하는 전-염증성 상위유전자(supergene)인 인터크린과 구조적으로 관련이 있다. Ck β -8 및 MIP-4는 모두 MIP-1 동족체이고 MIP-1 β 보다는 MIP-1 α 에 대해 상동성이 보다 크다. Ck β -8을 암호하는 폴리뉴클레오티드는 대동맥 내피 cDNA 라이브러리에서 유래된 것이고, 다수의 케모킨과 상당한 상동성을 나타내는 120개 아미노산 잔기의 폴리펩티드를 암호하는 개방 판독 프레임을 포함하고 있다. 상부 정합율은 인체 대식세포 염증 단백질 1 α 에 대한 것으로 동질성 36% 및 유사성 66%를 나타내고 있다(도 4).

MIP-4를 암호하는 폴리뉴클레오티드는 인체 성인 폐 cDNA 라이브러리로부터 유래된 것이고, 다수의 케모킨과 상당한 상동성을 나타내는 89개 아미노산 잔기의 폴리펩티드를 암호하는 개방 판독 프레임을 포함하고 있다. 상부 정합율은 인체 편도 림프구 LD78 β 단백질에 대한 것으로 동질성 60% 및 유사성 89%를 나타내고 있다(도 5). 또한, 특징적인 모티브중에서 모든 케모킨에 나타나는 4개의 시스테인 잔기는 양 클론(들)에서 보존적이다. 이 유전자들중 처음 2개의 시스테인 잔기가 인접 위치에 있다는 사실로 인해 이 유전자들은 케모킨의 C-C 또는 β 아군으로서 분류된다. 다른 아군인 CXC 또는 α 아군에서 처음 2개의 시스테인 잔기사이에는 1개의 아미노산이 중재하고 있다.

Ck β -1을 암호하는 폴리뉴클레오티드는 처음 19개가 리더 서열이고 성숙 폴리펩티드가 74개의 아미노산 잔기를 함유하는 93개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 암호하는 개방 판독 프레임을 함유한다. Ck β -1은 인체 대식세포 염증 단백질 α 에 대해 상당한 상동성을 나타내는데, 80개 아미노산 스트레치에 대해 48%의 동질성과 72%의 유사성을 갖고 있다. 또한, 특징적인 모티브를 구성하는 4개의 시스테인 잔기도 보존되어 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 형태일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함한다. DNA는 이분쇄 또는 일본쇄일 수 있고, 일본쇄라면 암호 가닥이거나 비암호(앤티센스) 가닥일 수 있다. 성숙 폴리펩티드를 암호하는 암호 서열은 도 1, 도 2 및 도 3(각각 서열 1, 3 및 5)에 도시한 암호 서열이나 기탁된 클론(들)의 암호 서열과 동일한 암호 서열이거나, 암호 서열이 도 1, 도 2 및 도 3(각각 서열 1, 3 및 5) 또는 기탁된 cDNA(들)의 DNA와 같이 동일한 성숙 폴리펩티드를 암호하지만 유전자 암호의 풍부성이나 축퇴성으로 인해 상이한 암호 서열일 수 있다.

도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 성숙 폴리펩티드 또는 기탁된 cDNA(들)에 의해 암호화된 성숙 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드는 성숙 폴리펩티드의 암호 서열; 성숙 폴리펩티드의 암호 서열과 선도 또는 분비 서열이나 전단백질 서열과 같은 부가의 암호 서열; 성숙 폴리펩티드에 대한 암호 서열(및 임의의 부가 암호 서열) 및 상기 성숙 폴리펩티드의 암호 서열중 5' 및/또는 3'의 비암호 서열 또는 인트론과 같은 비암호 서열을 함유할 수 있다.

따라서, 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드란 용어는 폴리펩티드의 암호 서열 뿐만 아니라 부가 암호 서열 및/또는 비암호 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다.

또한, 본 발명은 도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 추론된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드나 기탁된 클론(들)의 cDNA에 의해 암호화된 폴리펩티드들의 단편, 유사체 및 유도체를 암호하는 전술한 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드의 변이체는 폴리뉴클레오티드의 자연발생적 대립유전자 변이체 또는 폴리뉴클레오티드의 비자연발생적 변이체일 수 있다.

따라서, 본 발명은 도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)에 도시한 바와 같은 동일한 성숙 폴리펩티드 또는 기탁된 클론(들)의 cDNA에 의해 암호화된 동일한 성숙 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드, 뿐만

아니라 도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 폴리펩티드들 또는 기탁된 클론(들)의 cDNA에 의해 암호화된 폴리펩티드들의 단편, 유도체 또는 유사체를 암호하는 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포함한다. 이러한 뉴클레오티드 변이체로는 결실 변이체, 치환 변이체 및 첨가 또는 삽입 변이체를 포함한다.

전술한 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 도 1, 도 2 및 도 3(서열 1, 3 및 5)에 도시된 암호 서열이나 기탁된 클론(들)의 암호 서열의 자연 발생적 대립유전자 변이체인 암호 서열을 가질 수 있다. 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는 암호된 폴리펩티드의 기능을 실질적으로 변화시키지 않는 1개 이상의 뉴클레오티드의 치환, 결실 또는 첨가가 있을 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 대안적인 형태이다.

또한, 본 발명은 성숙 폴리펩티드의 암호 서열이, 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 발현과 분비를 돕는 폴리뉴클레오티드 서열, 예컨대 세포로부터 폴리펩티드의 수송을 조절하는 분비 서열로서 작용하는 리더 서열에 대해 동일한 판독 프레임에 융합될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 리더 서열을 가진 폴리펩티드는 전단백질이고, 숙주 세포에 의해 절단되어 폴리펩티드의 성숙 형태를 형성하는 리더 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 성숙 단백질 + 부가 5' 아미노산 잔기인 전단백질을 암호할 수 있다. 전구서열을 갖는 성숙 단백질은 전단백질이고 상기 단백질의 불활성 형태이다. 전구서열이 일단 절단되면 활성의 성숙 단백질이 남게 된다.

따라서, 예컨대 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 성숙 단백질, 또는 전구서열을 갖는 단백질, 또는 전구서열과 전서열(리더 서열)을 모두 가진 단백질을 암호할 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드를 정제할 수 있도록 하는 표식 서열에 대해 프레임내에서 융합된 암호 서열을 가질 수 있다. 표식 서열은 숙주가 세균인 경우에는 표식에 융합된 성숙 폴리펩티드를 정제할 수 있도록 하는 pQE-9 벡터에 의해 공급되는 헥사히스티딘 태그이거나, 또는 예를 들면 숙주가 포유류, 예컨대 COS-7 세포인 경우에는 헤마글루티닌(HA)일 수 있다. HA 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질 유래의 에피토프에 상응한다(Wilson, I. et al., Cell, 37:767(1984)).

본 발명은 또한, 서열간의 동질성이 50% 이상, 바람직하게는 70%인 경우에는 전술한 서열에 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 엄격한 조건하에서 전술한 폴리뉴클레오티드에 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같은 엄격한 조건이란 용어는 하이브리드가 서열간의 동질성이 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상인 경우에만 일어난다는 것을 의미한다. 바람직한 일 양태에서 전술한 폴리뉴클레오티드에 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드는 도 1, 도 2 및 도 3(서열 1, 3 및 5)의 cDNA 또는 기탁된 cDNA에 의해 암호된 성숙 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능이나 활성을 보유하는 폴리펩티드를 암호한다.

또는, 상기 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같은 동질성을 갖지만 활성은 보유하지 않으면서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 하이브리드하는 20개 이상의 염기, 바람직하게는 30개 이상, 보다 바람직하게는 50개 이상의 염기를 갖는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 서열 1, 3 및 5의 폴리뉴클레오티드를 회수하기 위한 상기 폴리뉴클레오티드의 프로브로서, 또는 진단 프로브나 PCR 프라이머로서 이용할 수 있다.

본원에 언급한 기탁물(들)은 특허 절차에 있어서 미생물 기탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약하에 기탁된 것이다. 이 기탁물은 단지 당업자가 편리하게 이용할 수 있도록 제공된 것이지만, 35 U.S.C § 112하에서 기탁이 필수적이라는 인정에 따른 것이 아니다. 기탁물내에 함유된 폴리뉴클레오티드의 서열 뿐만 아니라 이 서열에 의해 암호된 폴리펩티드의 아미노산 서열은 본원에 참고적으로 포함되며, 본원에 제시된 서열들과 어떤 논쟁이 생기는 경우 중재하는 역할을 한다. 기탁물을 제조하거나 사용하거나 판매하는 데에는 허가증이 필요할 수도 있으나 이러한 허가증이 허여되지는 않을 것이다.

본 발명은 추가로, 도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 추론된 아미노산 서열을 갖거나, 기탁된 cDNA에 의해 암호된 아미노산 서열, 이 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체를 갖는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 폴리펩티드에 관한 것이다.

도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 폴리펩티드, 또는 기탁된 cDNA에 의해 암호된 폴리펩티드와 관련하여 사용된 단편, 유도체 및 유사체란 용어는 상기 폴리펩티드와 본질적으로 동일한 생물학적 기능이나 활성을 보유하는 폴리펩티드를 의미한다. 따라서, 유사체에는 전단백질 부의 절단에 의해 활성화되어 활성의 성숙 폴리펩티드를 생성할 수 있는 전단백질을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 천연 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드, 바람직하게는 재조합 폴리펩티드일 수 있다.

도 1, 도 2 및 도 3(서열 2, 4 및 6)의 폴리펩티드, 또는 기탁된 cDNA에 의해 암호된 폴리펩티드의 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 1개 이상의 아미노산 잔기가 보존성 또는 비보존성 아미노산 잔기(바람직하게는 보존성 아미노산 잔기)로 치환되고 이와 같이 치환된 아미노산 잔기가 유전자 암호에 의해 암호되거나 암호되지 않는 것이거나, 또는 (ii) 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환기를 함유하는 것이거나, 또는 (iii) 성숙 폴리펩티드가 이 폴리펩티드의 반강기를 증가시키는 화합물(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜)과 같은 다른 화합물과 융합하고 있는 것, 또는 (iv) 성숙 폴리펩티드 또는 전단백질 서열의 정제에 사용되는 서열이나 선도 또는 분비 서열과 같이 성숙 폴리펩티드에 부가 아미노산들이 융합되어 있는 것일 수 있다. 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 당업자라면 본원의 교시로부터 본원의 범위내에 속하는 것이라는 것을 알 수 있을 것이다.

본 발명의 폴리펩티드는 분리형으로 제공하는 것이 바람직하고, 균질물로 정제된 것이 보다 바람직하다.

유전자 또는 시스트론이라는 용어는 폴리펩티드쇄의 생산에 관여하는 DNA의 단편을 의미하며; 암호 영역 이전 영역과 이후 영역(리더 서열과 후위(trailer) 서열) 뿐만 아니라 개개의 암호 단편(엑손)간의 중재 서열(인트론)을 포함한다.

분리된이란 용어는 본래의 환경(예컨대, 자연발생인 경우에는 천연 환경)에서 물질이 분리되어 있는 것을

의미한다. 예를 들면, 동물 생체내에 존재하는 자연발생의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 분리된 것이 아니고, 자연계중에서 공존하는 물질 일부나 전체로부터 분리된 상기 폴리뉴클레오티드 또는 DNA 또는 폴리펩티드는 분리된 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부일 수 있으며(또는) 상기 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 조성물의 일부일 수 있고, 상기 벡터나 조성물은 천연 환경중의 일부가 아니라는 점에서 분리된 것이다.

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전적으로 조작한 숙주 세포 및 재조합 기법을 이용하는 본 발명의 폴리펩티드의 제조에 관한 것이다.

숙주 세포는 예를 들어 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 본 발명의 벡터를 이용하여 유전적으로 조작된다(형질도입 또는 형질전환 또는 형질감염). 상기 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 비루스 입자, 파지 등일 수 있다. 상기 유전적으로 조작된 숙주 세포는 필요에 따라 프로모터의 활성화, 형질전환체의 선택 또는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 유전자의 증폭을 위해 변형된 통상적인 배양 배지 내에서 배양할 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현용으로 선택된 숙주 세포 이용시 이미 사용되었으며, 당업자에게는 자명한 것들이다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 재조합 기법을 이용하여 폴리펩티드를 제조하는데 사용할 수 있다. 따라서, 상기 폴리펩티드 서열은 여러 가지 발현 매개체중 임의의 하나, 특히 폴리펩티드 발현용 벡터 또는 플라스미드 내에 포함될 수 있다. 이러한 벡터의 예로는 염색체 DNA 서열, 비염색체 DNA 서열 및 합성 DNA 서열, 예를 들어 SV40의 유도체; 박테리아 플라스미드; 파지 DNA; 효모 플라스미드; 플라스미드와 파지 DNA, 백시니아, 아데노비루스, 계두 비루스 및 슈도라비에스와 같은 비루스 DNA의 조합에 의해 유도된 벡터를 들 수 있다. 그러나, 복제할 수 있고, 숙주 세포 내에서 생존할 수 있는 기타 임의의 플라스미드 또는 벡터를 사용할 수도 있다.

적합한 DNA 서열은 다양한 방법으로 벡터 내로 삽입할 수 있다. 일반적으로, 상기 DNA 서열은 당업계에 공지된 적합한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 이러한 방법 및 기타 방법은 당업자가 용이하게 수행할 수 있는 것들이다.

발현 벡터 내의 DNA 서열은 적합한 발현 조절 서열(들)(프로모터)에 작동가능하게 연결되어 mRNA 합성을 유도한다. 이러한 프로모터의 대표적인 예로는 LTR 또는 SV40 프로모터, 이. 콜리 lac 또는 trp, 파지 람다 P_L 프로모터 및 기타 원핵세포 또는 진핵세포 또는 이들의 비루스 내에서 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지된 기타 프로모터를 들 수 있다. 또한, 상기 발현 벡터는 해독 개시를 위한 리보솜 결합 위치 및 전사 종결자를 함유한다. 또한, 상기 벡터는 발현을 증폭하기 위해 적합한 서열을 포함할 수 있다.

또한, 상기 발현 벡터는 디히드폴레이트 리덕타아제 또는 진핵세포 배양을 위한 네오마이신 내성 또는 이. 콜리 내의 테트라사이클린 또는 암피실린 내성과 같은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 위한 표현형 추적자를 제공하는 유전자를 함유하는 것이 바람직하다.

상기한 바와 같은 적합한 DNA 서열 뿐만 아니라 적합한 프로모터 또는 조절 서열을 함유하는 벡터는 숙주 세포를 형질전환하고, 이 숙주 세포를 이용하여 단백질을 발현하도록 할 수 있다.

적합한 숙주의 예로는 박테리아 세포, 예를 들어 이. 콜리, 스트렙토마이세스속, 살모넬라 타이피무리움; 진균류 세포, 예를 들어 효모; 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라 S2 및 Sf9; 아데노비루스; 동물 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 보웬스 흑색종; 식물 세포 등을 들 수 있다. 상기 숙주의 적합한 선택은 본 명세서의 교시로부터 당업자에게 명백할 것이다.

구체적으로, 본 발명은 또한 광범위하게 상술한 바와 같은 서열 하나 이상을 포함하는 재조합 구성물을 포함한다. 상기 구성물은 본 발명의 서열이 순방향 또는 역방향으로 삽입된 플라스미드 또는 비루스 벡터와 같은 벡터를 포함한다. 일양태의 바람직한 관점에서, 상기 구성물은 조절 서열, 예를 들어 상기 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 조절 서열을 추가로 포함한다. 다수의 적합한 벡터 및 프로모터는 당업자에게 공지되어 있으며, 또한 시판되고 있다. 그 예로서 하기 벡터를 제시한다: 박테리아용: pQE70, pQE60, pQE-9(퀴아젠), pbs, pD10, 파지스크립트, psiX174, 피블루스크립트 SK, pBSKS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A(스트라타젠); pTRC99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5(파마시아). 진핵세포용: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG(스트라타젠), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL(파마시아). 그러나, 숙주 내에서 복제할 수 있고, 생존할 수 있는 한 기타 플라스미드 또는 벡터를 사용할 수도 있다.

프로모터 영역은 CAT(클로람페니콜 트랜스퍼라아제) 벡터 또는 기타 선택성 마커를 보유하는 벡터를 이용하여 임의의 바람직한 유전자로부터 선택할 수 있다. 두 개의 적합한 벡터는 PKK232-8 및 PCM7 이다. 특정 박테리아 프로모터의 예로는 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P_R, P_L 및 trp 들 수 있다. 진핵세포 프로모터의 예로는 CMV 초기, HSV 티미딘 키나제, 초기 및 후기 SV40, 레트로비루스의 LTR 및 쥐 메탈로티오네인-1을 들 수 있다. 적합한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업자에게 널리 알려져 있다.

추가 일양태에서, 본 발명은 상기 구성물을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 상기 숙주 세포는 고등 진핵세포, 예를 들어 포유류 세포 또는 하등 진핵세포, 예를 들어 효모 세포를 일 수 있으며, 상기 숙주 세포는 원핵세포, 예를 들어 박테리아 세포일 수 있다. 상기 숙주 세포내로 상기 구성물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염 또는 전기영동으로 수행할 수 있다(Davis, L., Dibner, M., Battey, L., Basic Methods in Molecular Biology (1986)).

숙주 세포 내에서 상기 구성물은 통상적인 방법으로 재조합 서열에 의해 암호화되는 유전자 생성물을 제조하는데 사용할 수 있다. 대안으로, 본 발명의 폴리펩티드는 통상적인 펩티드 합성기를 이용하여 합성할 수도 있다.

성숙 단백질은 적합한 프로모터의 조절 하에서 포유류 세포, 효모, 박테리아 또는 기타 세포 내에서 발현될 수 있다. 또한, 무세포 해독 시스템을 사용하여 본 발명의 DNA 구성물로부터 유도된 RNA를 이용하여 상기 단백질을 제조할 수 있다. 원핵세포 및 진핵세포와 함께 사용하기에 적합한 클로닝 및 발현 벡터는 본 명세서에 참고 인용한 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2판, 뉴욕, 콜드

스프링 하버 (1989)]에 기재되어 있다.

고등 진핵세포에 의해 이루어지는 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 DNA의 전사는 상기 벡터 내에 인핸서 서열을 삽입함으로써 증가된다. 인핸서는 일반적으로 약 10 내지 300 bp 이며, 프로모터에 작용하여 그의 전사를 증가시키는 DNA의 시스-작용성 요소이다. 그 예로는 복제 원점의 bp 100 내지 270 후미의 SV40 인핸서, 복제 원점 후미의 폴리오마 인핸서 및 아데노비루스 인핸서를 들 수 있다.

일반적으로 재조합 발현 벡터는 복제 원점 및 선택성 마커, 예를 들어 이. 콜리 및 에스. 세레비제 TRP1 유전자의 앰피실린 내성 유전자 및 고발현된 유전자로부터 유도된 프로모터를 포함하여 숙주를 형질전환시키고, 하류 구조 유전자의 전사를 가능하게 한다. 이러한 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 (PGK)와 같은 당분해 효소, 알파-인자, 산 포스파타제 또는 열 충격 단백질 등을 암호화하는 오페론으로부터 유도할 수 있다. 이중 구조 서열은 해독 개시 서열 및 종결 서열, 바람직하게는 주변세포질 간격 또는 외세포성 매질 내로 해독된 단백질의 분비를 유도할 수 있는 리더 서열을 보유하는 적합한 파지 내에서 조립된다. 임의로, 상기 이중 서열은 발현된 재조합 생성물의 안정화 또는 단순화된 정제와 같은 바람직한 특성을 부여하는 N-말단 동정 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 암호화할 수 있다.

박테리아용으로 유용한 발현 벡터는 목적하는 단백질을 암호화하는 구조 DNA 서열과 함께 작용 프로모터를 보유하는 적합한 해독 개시 및 종결 서열을 작동가능한 해독상 내에 삽입함으로써 구성된다. 상기 벡터는 하나 이상의 표현형 선택성 마커 및 복제 원점을 포함하여 벡터의 보존 및 필요에 따라 숙주 내에서의 증폭을 보장한다. 형질전환을 위해 적합한 원핵세포 숙주의 예로는 이. 콜리, 바실러스 셉틸러스, 살모넬라 타이피우리움 및 슈도모나스, 스트렙토마이세스 및 스타필로코쿠스속에 속하는 여러 가지 종을 들 수 있으며, 기타 원핵세포도 숙주로 이용할 수 있다.

박테리아용 발현 벡터의 비제한적인 대표예는 널리 알려진 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 유전적 요소를 포함하는 시판되는 플라스미드로부터 유도된 선택성 마커 및 박테리아 복제 원점을 포함할 수 있다. 이러한 시판 벡터의 예로는 pKK223-3(스웨덴, 읍살라에 소재하는 파마시아 파인 케미칼스) 및 GEM1(미국, 위스콘신, 메디슨에 소재하는 프로메가 바이오텍)을 들 수 있다. 이들 pBR322 백본 부위는 적합한 프로모터 및 발현하려는 구조 서열과 조합된다. 이하, 적합한 숙주균의 형질전환, 상기 숙주균의 적합한 세포 밀도로의 성장, 선택된 프로모터의 적합한 수단(예를 들어, 온도 이동 또는 화학적 유도)에 의한 유도 및 추가 기간 동안의 세포 배양에 대해 기술한다.

세포는 전형적으로 원심분리, 물리적 또는 화학적 수단에 의한 분쇄 및 생성된 조 추출물의 추가 정제를 위한 보존에 의해 수집된다.

단백질의 발현을 위해 사용된 미생물 세포는 임의의 편리한 방법, 예를 들어 냉동-해동 반복 처리, 초음파 처리, 기계적 분쇄 또는 세포 용해제를 이용하는 방법에 의해 분쇄할 수 있으며, 상기 방법들은 당업자에게 공지되어 있다.

또한, 여러 가지 포유류 세포 배양 시스템을 사용하여 재조합 단백질을 발현시킬 수 있다. 포유류 발현 시스템의 예로는 문헌[Gluzman, Cell, 23:175 (1981)]에 기재된 원숭이 신장 섬유아세포인 COS-7 세포주 및 상용성 벡터를 발현할 수 있는 기타 세포주, 예를 들어 C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 들 수 있다. 포유류 발현 벡터는 복제 원점, 적합한 프로모터 및 인핸서를 포함하며, 또한 임의의 필요한 리보솜 결합 위치, 폴리아데닐화 위치, 결찰 공여체 및 수용체 위치, 전사 종결 서열 및 5' 인접 비전사된 서열을 포함한다. SV40 결찰로부터 유도된 DNA 서열 및 폴리아데닐화 위치를 이용하여 필요한 비전사된 유전 요소를 제공할 수 있다.

Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 황산 암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로즈 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수한다. 필요에 따라 단백질 재조합 단계를 사용하여 성숙한 단백질의 배치를 완전하게 할 수 있다. 최종적으로, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 최종 정제 단계를 수행할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 천연 정제된 생성물 또는 화학 합성된 생성물 또는원핵 또는 진핵 숙주(예를 들어, 배양물 내의 박테리아, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포)로부터 재조합 기법에 의해 생성된 생성물일 수 있다. 재조합 생성 기법에 사용된 숙주에 따라, 본 발명의 폴리펩티드는 포유류 또는 기타 진핵생물 탄수화물에 의해 글리코실화되거나, 글리코실화되지 않을 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 초기 메티오닌 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 여러 가지 면역조절성 및 염증성 작용에 사용될 수 있으며, 다수의 질병에도 사용할 수 있다. Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 케모카인에 속하며, 따라서 이들은 백혈구(예를 들어, 단핵구, 호중구, T 임파구, 호산구, 호염기구등)에 대한 주화인자이다.

노던 블롯 분석 결과, 우성적으로 발현되는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 조혈원의 조직인 것으로 확인되었다.

Ck β -8은 면역 반응 및 염증에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 도 22에서 확인할 수 있는 바와 같이, 리포다당류는 인체 단핵구로부터 Ck β -8을 유도한다. 따라서, 내독소의 존재에 대한 반응으로 Ck β -8은 단핵구로부터 발현되며, Ck β -8을 투여하여 숙주의 면역 반응을 조절할 수 있다.

도 10A 및 도 10B에 예시한 바와 같이, THP-1 세포(A) 및 PBMC(B)에 대한 Ck β -8의 주화인자 활성화는 현저하다. 또한, Ck β -8은 THP-1 세포 내에서 현저한 칼슘 이동을 유도하는데(도 11), 이는 Ck β -8이 단핵구에 대한 생물학적 효과를 보유하고 있음을 나타내는 것이다. 또한, Ck β -8은 인간 단핵구 내에서 투여량의존성 화학주성 및 칼슘 이동 반응을 나타낸다.

따라서, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 표적 면역 세포의 상처 부위로의 침윤을 조절함으로써 상처 치료를 용이하게 하는데 사용할 수 있다. 유사한 방식으로, 본 발명의 폴리펩티드는 임상적 감염, 예를 들어 마이코박테리아의 친화성 및 살균성 별혈구의 활성화에 의한 마이코박테리아의 감염에 대한 숙주 방어를 증

강시킬 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드는 항종양 치료법에 사용할 수 있는데, 그 이유는 종양 내로 주입된 케모킨 발현 세포가 종양, 예를 들어 카포시 육종의 치료에서 종양의 감소를 야기시킨다는 증거가 있기 때문이다. 도 12 및 13의 분석은 Ck β -8이 THP-1 세포로 하여금 종양을 억제하는 공지된 제제인 TNF- α 를 분비하게 한다는 것을 예시하고 있다. Ck β -8 250 ng/ml는 TNF- α 1200 pg/ml의 생성 및 분비를 유도한다. 또한, Ck β -8은 인간 단핵구에 의한 IL-6, IL-1 및 G-CSF와 같은 기타 종양 및 암 억제제의 분비를 현저히 유도한다. 또한, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 숙주 방어(종양사멸) 세포, 예를 들어 세포독성 T 세포 및 대식세포의 화학주성 활성화에 의한 침입 및 활성화를 자극하며, 이와 같은 방식으로 고형 종양을 치료할 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 조혈세포의 증식 및 분화를 억제할 수 있으며, 따라서 이를 이용하여 화학요법 중에 화학요법제로부터 골수 간상 세포를 보호할 수 있다. 도 14 및 15는 Ck β -8 및 Ck β -1이 저증식성 잠재 콜로니 형성 세포의 콜로니 형성을 억제하며, Ck β -8은 LPP-CFC 콜로니 증식의 강력하고, 특이적인 억제제임을 예시하고 있다. 도 16은 Ck β -1이 M-CSF 자극된 콜로니 형성을 특이적으로 억제하나, Ck β -8은 억제하지 않음을 예시하고 있다. 그러나, 상기 도면으로 확인할 수 있는 바와 같이, Ck β -8 및 Ck β -1 모두 골수 세포의 성장 또는 분화를 특이적으로 억제한다. 이러한 항증식성 효과는 화학요법제에 대한 더 큰 노출을 가능하게 하며, 따라서 더 효과적인 화학치료 효과를 가능하게 한다.

항원 감작된 선조 세포(예를 들어, 과립구 및 대식세포/단핵세포)의 아군에 대한 Ck β -1 및 Ck β -8 폴리펩티드의 억제 효과는 치료적으로 사용하여 백혈병 세포의 증식을 억제할 수 있다.

도 17, 18 및 19에서, 사용된 세포중에서 항원 감작된 세포를 제거하고, 생성된 세포 군집은 Ck β -1 및 Ck β -8과 접촉시킨다. Ck β -1은 거의 50% 까지 Mac-1 양성 세포 군집의 감소를 야기시켰으며, 이는 Ck β -1이 M-CSF 반응성 콜로니-형성 세포의 억제를 야기시킨다는 도 16의 결과와 일치하는 것이다. 도 19에서 확인할 수 있는 바와 같이, Ck β -8은 IL-3, GM-CSF 및 M-CSF에 반응하여 콜로니를 형성할 수 있는 항원 감작된 선조 세포의 능력을 억제한다. 또한, 도 20에서 확인할 수 있는 바와 같이, Ck β -8의 용량 반응은 콜로니 형성을 억제하는 것으로 확인되었다. 이 억제는 이들 인자에 의해 매개되는 분화성 신호의 특이적인 차단 또는 상기 선조 세포에 대한 세포독성 효과에 기인할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 예를 들어, 자가면역 질환 및 임파구성 백혈병에서 IL-2 생합성의 억제에 의한 T-세포 증식의 억제에 사용할 수 있다.

또한, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 건선을 위한 표피 각질세포 증식(각질세포과다 증식)을 억제하는데 사용할 수 있다. 그 이유는 피부내의 랑게르한스 세포가 MIP-1 α 를 생성하는 것으로 밝혀졌기 때문이다.

Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 조직파편 세정 및 연결 조직-촉진 염증성 세포의 보충 및 과량의 TGF β -매개된 섬유증의 조절에 의해 상처 치료중 흉터를 예방하는데 사용할 수 있다. 또한, 이들 폴리펩티드는 발작, 혈소판증다증, 폐 색전 및 골수증식성 질환의 치료에 사용할 수 있는데, 그 이유는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1이 혈관 투과성을 증가시키기 때문이다.

또한, Ck β -8은 세포소멸에 의해 백혈병 및 비정상적으로 증식하는 세포, 예를 들어 종양 세포를 치료하는데 사용할 수 있다. Ck β -8은 도 21에 나타난 바와 같이 조혈 선조 세포의 개체군 내에서 세포소멸을 유도한다.

본 발명의 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 시험관 내에서 과학적 연구, DNA의 합성 및 DNA 벡터의 제조와 관련된 목적 및 인간 질병의 치료를 위한 치료학 및 진단학의 개발을 목적으로 한 연구 시약으로 사용할 수도 있다. 예를 들어, Ck β -1 및 Ck β -8은 미성숙 조혈 선조 세포, 예를 들어 과립구, 대식세포 또는 단핵구의 분화를 일시적으로 방해하므로써 그들의 평창을 위해 사용할 수 있다. 이들 골수 세포는 시험관 내에서 배양할 수 있다.

전장 Ck β -8, MIP-4 또는 Ck β -1 유전자의 단편은 cDNA 라이브러리를 위한 하이브리드화 프로브로 사용하여 상기 전장 유전자를 분리하고, 상기 유전자에 대한 높은 서열 유사성 또는 유사한 생물학적 활성을 보유하는 기타 유전자를 분리할 수 있다. 그러나, 상기 프로브는 30개 이상의 염기를 보유하는 것이 바람직하며, 예를 들어 50개 이상의 염기를 함유할 수도 있다. 또한, 상기 프로브를 이용하여 조절 영역 및 프로모터 영역, 엑손 및 인트론을 포함하는 완전한 유전자를 함유하는 전장 전사체 및 게놈 클론(들)에 상응하는 cDNA 클론을 동정할 수 있다. 스크린의 한 예는 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성하기 위해 공지된 DNA 서열을 이용하므로써 상기 유전자의 암호화 영역을 분리하는 단계를 포함한다. 본 발명의 유전자의 서열에 상보적인 서열을 보유하는 표지된 올리고뉴클레오티드는 인간 cDNA, 게놈 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 스크린하는데 사용되어 상기 프로브가 하이브리드화하는 라이브러리의 수를 결정할 수 있다.

또한, 본 발명은 핵산 서열 내의 돌연변이의 존재에 관련된 질병 또는 이 질병에 대한 감수성을 검출하기 위한 진단 분석법의 일부분으로서 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1을 사용하는 방법에 관한 것이다. 이러한 질병은 케모킨 폴리펩티드의 기준 이하의 발현에 관련되어 있다.

Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 내에 돌연변이를 보유하는 개체는 DNA 수준에서 여러 가지 기법에 의해 검출할 수 있다. 진단용 핵산은 환자의 세포, 예를 들어 혈액, 뇨, 타액, 조직 생체 검사 재료 및 부검 재료로부터 획득할 수 있다. 게놈 DNA는 검출을 위해 직접 사용하거나, 분석 이전에 PCR에 의해 효소적으로 증폭시킬 수 있다(Saiki 등, Nature, 324: 163-166 (1986)). 또한, RNA 또는 cDNA도 동일한 목적에 사용할 수 있다. 예를 들어, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1을 암호화하는 핵산에 상보적인 PCR 프라이머는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 돌연변이를 동정하고, 분석하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 결실 및 삽입은 정상적인 유전형에 비해 증폭된 생성물의 크기 변화에 의해 검출할 수 있다. 점 돌연변이는 방사능 표지된 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 RNA 또는 대안으로 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 안티센스 DNA 서열에 대해 증폭된 DNA를 하이브리드하므로써 동정할 수 있다. 완벽하게 쌍을 이룬 서열은 RNase A 분해 또는 융점 차이에 의해 잘못된 쌍을 이룬 이중 서열과 구별할 수 있다.

DNA 서열 차이에 기초한 유전 테스트는 변성제의 존재 또는 부재하에서 DNA 단편의 겔 내에서의 전기영동

적 이동의 변경을 검출하므로써 수행할 수 있다. 작은 서열 결실 및 삽입은 고 해상 결 전기영동에 의해 가시화할 수 있다. 상이한 서열의 DNA 단편은 상이한 DNA 단편의 이동이 그들의 특이적인 용점 또는 부분적인 용점에 따라 상이한 위치에서 지연되는 변성 포름아미드 구배 결 상에서 구별할 수 있다(예, Myers 등, Science, 230: 1242 (1985)).

또한, 특정 위치에서의 서열 변화는 RNase 및 S1 방어와 같은 뉴클레아제 방어 분석 또는 화학적 절단법에 의해 확인할 수 있다(예, Cotton 등, PNAS, USA, 85:4397-4401 (1985)).

따라서, 특이적인 DNA 서열의 검출은 하이브리드화, RNase 방어, 화학적 절단, 직접적인 DNA 서열결정 또는 제한 효소를 이용하는 방법(예를 들어, 제한 단편 길이 다형성(RFLP)) 및 게놈 DNA의 서던 블로팅과 같은 방법으로 수행할 수 있다.

더 통상적인 결 전기영동 및 DNA 서열 결정 이외에, 돌연변이도 동일계내 분석에 의해 검출할 수 있다.

또한, 본 발명은 여러 가지 조직 내에서 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 단백질의 변경된 수준을 검출하기 위한 진단 분석법에 관한 것인데, 그 이유는 정상적인 대조용 조직 샘플과 비교하여 상기 단백질의 과발현이 질병, 예를 들어 종양의 존재 또는 이에 대한 민감성을 검출할 수 있기 때문이다. 숙주로부터 유도된 샘플 내에서 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 단백질의 수준을 검출하기 위해 사용된 분석법은 당업자에게 공지되어 있으며, 그 예로는 방사능면역 분석법, 경쟁적-결합 분석법, 웨스턴 블롯 분석법, ELISA 분석법 및 샌드위치 분석법을 들 수 있다. ELISA 분석법(Coligan 등, Current Protocols in Immunology, 1(2), Chapter 6 (1991))은 초기에 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 항원에 특이적인 항체, 바람직하게는 단일클론 항체를 제조하는 단계를 포함한다. 또한, 리포터 항체는 상기 단일클론 항체에 대해 제조한다. 상기 리포터 항체에 부착되는 검출가능한 시약의 예로는 방사능, 형광 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제 효소를 들 수 있으며, 본 예에서는 호스래디쉬 퍼옥시다아제 효소를 사용한다. 샘플은 숙주로부터 제거하고, 상기 샘플 내에서 단백질을 결합하는 고형 지지체, 예를 들어 폴리스티렌 접시 상에서 배양한다. 상기 접시 상의 임의의 자유 단백질 결합 위치는 BSA와 같은 비특이성 단백질과 함께 배양하여 피복한다. 이어서, 상기 단일클론 항체는 이 단일클론 항체가 상기 폴리스티렌 접시에 부착된 임의의 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 단백질에 부착하는 시간 동안 상기 접시 내에서 배양한다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제에 결합된 상기 리포터 항체는 상기 접시 내에 위치하고 있으며, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1에 결합된 임의의 단일클론 항체에 대한 상기 리포터 항체의 결합으로 귀착된다. 이어서, 상기 접시에 퍼옥시다아제 기질을 첨가하고, 주어진 시간 동안 현상된 색의 양은 표준 곡선에 대해 비교시 주어진 환자 샘플내에 존재하는 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 단백질의 양으로 측정한다.

경쟁 분석을 사용할 수도 있는데, 이때 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1에 특이적인 항체가 고형 지지체에 부착되어 있고, 표지된 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 및 숙주로부터 유도된 샘플이 상기 지지체를 통과하며, 예를 들어 액체 섬광 크로마토그래피에 의해 검출된 표지의 양은 샘플내의 단백질의 양과 관련되어 있다.

샌드위치 분석은 ELISA 분석과 유사하다. 샌드위치 분석에서, Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1은 고형 지지체 위를 통과하고, 상기 고형 지지체에 부착된 항체에 결합한다. 이어서, 제 2 항체를 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1에 결합시킨다. 이어서, 제 2 항체에 특이적인, 표지된 제 3 항체를 상기 지지체 위로 통과시켜 상기 제 2 항체에 결합시키므로써 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1의 양을 측정할 수 있다.

본 발명은 케모킨 폴리펩티드에 대한 수용체의 동정 방법을 제공한다. 상기 수용체를 암호화하는 유전자는 당업자에게 공지된 여러 가지 방법, 예를 들어 리간드 패닝(panning) 및 FACS 분류법(Coligan 등, Current Protocols in Immun. 1(2), Chapter 5 (1991))으로 동정할 수 있다. 발현 클로닝을 사용할 수 있는데, 이때 폴리아데닐화된 RNA는 상기 폴리펩티드에 반응성인 세포로부터 제조하고, 이 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리는 푸울로 나누고, COS 세포 및 상기 폴리펩티드에 비반응성인 기타 세포의 형질감염에 사용한다. 유리 슬라이드에서 성장한 형질감염된 세포는 표지된 폴리펩티드에 노출시킨다. 상기 폴리펩티드는 요오드화 또는 위치-특이성 단백질 키나아제에 대한 인식 위치의 삽입을 포함하는 여러 가지 수단에 의해 표지할 수 있다. 고정화 및 배양한 후, 상기 슬라이드는 자동방사능 분석법으로 분석한다. 양성 푸울은 동정하고, 서브푸울을 제조하고, 반복적인 서브푸울링 및 재스크리닝 과정을 이용하여 재형질 감염하고, 추정적인 수용체를 암호화하는 단일 클론을 실질적으로 수득한다.

수용체 동정을 위한 다른 방법으로서, 표지된 폴리펩티드를 세포막에 광활성 결합시키거나, 수용체 분자를 발현하는 제조물을 추출할 수 있다. 가교 결합된 물질은 PAGE 분석으로 용해하고, X-선 필름에 노출시킨다. 상기 폴리펩티드의 수용체를 함유하는 표지된 복합체는 배제하고, 펩티드 단편 내로 채용해하고, 단백질 미세서열결정을 수행할 수 있다. 미세서열결정으로 획득한 아미노산 서열은 한 세트의 퇴화 올리고뉴클레오티드 프로브를 설계하는데 사용하여 추정적인 수용체를 암호화하는 유전자를 동정하기 위한 cDNA 라이브러리의 스크리닝에 사용할 수 있다.

본 발명은 본 발명의 케모킨 폴리펩티드에 대한 길항물질 및 작용물질을 동정하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 작용물질은 상기 폴리펩티드와 유사한 생물학적 기능을 갖는 화합물이지만, 길항물질은 이러한 기능을 차단한다. 화학주성은 본 발명의 폴리펩티드중 어느 하나에 의해 주화된 세포를 이 세포가 투과하기에 충분한 직경(약 5 μ m)의 세공을 보유한 필터의 상부에 위치시키므로써 분석할 수 있다. 잠재적인 작용물질의 용액은 상부 구획 내의 적합한 대조용 배지를 갖는 챔버의 바닥에 위치시키는데, 상기 작용물질의 농도 구배는 시간이 경과함에 따라 상기 다공성 막 내로 또는 상기 다공성 막을 통하여 이동하는 세포를 계수하므로써 측정한다.

길항물질에 대해 분석하는 경우, 본 발명의 케모킨 폴리펩티드는 상기 챔버의 바닥에 위치시키고, 잠재적인 길항물질을 첨가하여 상기 세포의 화학주성이 방해되는지의 여부를 결정한다.

대안으로, 상기 폴리펩티드의 수용체를 발현하는 포유류 세포 또는 막 제조물은 표지된 케모킨 폴리펩티드, 예를 들어 상기 화합물의 존재 하에서 방사능과 함께 배양한다. 그후, 이 상호작용을 차단할 수 있는 화합물의 능력을 측정할 수 있다. 이러한 방식으로 길항물질에 대해 분석하는 경우, 상기 케모킨은 사용하지 않으며, 상기 수용체와 상호작용할 수 있는 작용물질 자체의 능력을 측정한다.

잠재적인 Ck β -8, MIP-4 및 Ck β -1 길항물질의 예로는 상기 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 몇몇 경우에 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다. 잠재적인 길항물질의 다른 예로는 상기 폴리펩티드의 음성 우성 돌연변이체를 들 수 있다. 음성 우성 돌연변이체는 야생형 폴리펩티드의 수용체에는 결합하나, 생물학적 활성을 보유하지 않는 폴리펩티드이다.

또한, 안티센스 구성물은 안티센스 기법을 이용하여 제조한다. 안티센스 기법을 이용하여 삼중 나선 형성 또는 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 유전자 발현을 조절할 수 있는데, 상기 두 가지 방법은 모두 DNA 또는 RNA에 대한 폴리펩티드의 결합에 기초한다. 예를 들어, 본 발명의 성숙 폴리펩티드를 암호화하는 상기 폴리펩티드 서열의 5' 암호화 부위를 사용하여 길이가 약 10 내지 40개의 염기쌍인 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 설계할 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드는 전사에 관련된 유전자 영역에 상보적이라도 설계하므로써[삼중 나선; 참조: Lee 등, Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney 등, Science, 241: 456 (1988); 및 Dervan 등, Science, 251: 1360 (1991)], 전사 및 케모킨 폴리펩티드의 생성을 방지할 수 있다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드는 생체 내에서 mRNA에 하이브리드화하며, 상기 mRNA 분자의 폴리펩티드로의 해독을 차단한다[안티센스; 참조: Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, 미국, 플로리다, 보카 라톤에 소재하는 CRC 출판사 (1988)]. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 세포에 전달되어 상기 안티센스 RNA 또는 DNA가 생체 내에서 발현되어 케모킨 폴리펩티드의 생성을 억제할 수 있다.

다른 잠재적인 케모킨 길항물질은 상기 폴리펩티드의 자연적으로 또는 합성적으로 변형된 유사체인 상기 폴리펩티드의 펩티드 유도체인데, 상기 유도체는 생물학적 기능을 상실했음에도 불구하고, 상기 폴리펩티드의 수용체를 인식하고, 이 수용체에 결합하므로써 상기 수용체를 효과적으로 차단한다. 이러한 펩티드 유도체의 예로는 작은 펩티드 또는 펩티드 유사 분자를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 길항물질은 MIP-유도된 또는 증강된 질병, 예를 들어 자가면역 질병 및 만성 염증성 질병 및 감염성 질병을 치료하는데 사용할 수 있다. 자가 면역 질병의 예로는 다발성 경화증 및 인슐린 의존성 당뇨병을 들 수 있다.

또한, 상기 길항물질은 단핵 식세포의 보충 및 활성화를 방지하므로써 규폐증, 유육종증, 특발성 폐 섬유증을 포함하는 감염성 질병을 치료하는데 사용할 수 있다. 또한, 이들은 호산구 생성 및 이동을 방지하므로써 특발성 호산구과다 증후군을 치료하는데 사용할 수 있다. 또한, 내독소 쇼크도 대식세포의 이동을 방지하고, 그들의 본 발명의 케모킨 폴리펩티드의 생성을 방지하므로써 상기 길항물질에 의해 치료할 수 있다.

또한, 상기 길항물질은 동맥 벽 내에서 단핵구 침윤을 방지하므로써 죽상동맥 경화증을 치료하는데 사용할 수 있다.

또한 길항 물질은 케모킨-유발 유양 돌기 세포 및 호염기구 탈과립 및 히스타민의 방출에 의해 억제되는 후기상 알러지 반응, 만성적 두드러기, 아토피성 피부염을 비롯하여 히스타민에 의한 알러지 반응 및 면역 질환 치료에 사용할 수 있다. 알러지성 천식, 비염, 및 습진과 같은 IgE에 의한 알러지 반응의 치료에도 사용될 수 있다.

또한 길항 물질은 상처 부근에 단핵구의 유인을 방지하므로써 만성 및 급성 염증 치료에 사용할 수 있다. 만성 및 급성 염증성 폐 질환은 폐에서의 단핵 식세포의 격리와 관련이 있으므로, 길항 물질은 정상적인 폐의 대식세포를 조절하는데 사용될 수 있다.

길항 물질은 환자의 관절내의 활액으로 단핵세포가 유인되는 것을 방지하므로써 루마티스 관절염을 치료하는데 사용될 수 있다. 단핵구 유입 및 활성화는 변성 및 염증성 관절염의 병인론에 중요한 역할을 한다.

길항 물질은 1차적으로 IL-1 및 TNF에 기인하는 유해한 다단계를 방지하는데 사용될 수 있으며, 이는 기타 염증성 시토킨의 생성성을 방지한다. 이런 방식으로 길항 물질은 염증을 방지할 수 있다. 길항물질은 케모킨에 의해 유발된 프로스타글란딘-의존 열병을 저해하기 위해 사용할 수 있다.

길항 물질은 예를 들어, 재생 불량성 빈혈증 및 골수이형성 증후군과 같은 골수 부전의 경우를 치료하는데 사용할 수 있다.

길항 물질은 또한 폐에서의 호산구 축적을 방지하므로써 천식 및 알러지를 치료하는데 사용할 수 있다. 또한 길항 물질은 천식성 폐의 현저한 특징인 상피하 기저막 섬유 조직 증식을 치료하는데 사용할 수 있다.

길항 물질은 예를 들어 후술할 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물에 사용할 수 있다.

케모킨 폴리펩티드 및 작용물질 및 길항물질은 적절한 약학적 담체와 혼합하여 사용할 수 있다. 이 조성물은 폴리펩티드의 치료학적 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체는 염수, 완충된 염수, 덱스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이의 조합물을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 제제는 투여 방식에 적절해야 한다.

또한 본 발명은 1종 이상의 본 발명의 약학적 조성물 성분으로 충전시킨 1종 이상의 용기를 포함하는 약학적 포장 또는 키트를 제공한다. 상기 용기들과 관련하여, 약학적 또는 생물학적 생성물의 제조, 사용 또는 판매를 조절하는 정부 기관에 의해 규정된 형태로 주목할 수 있는데 이는 인체 투여용으로 제조, 사용 또는 판매 기관에 의해 승인된 것이다. 추가로, 폴리펩티드 및 작용 물질 및 길항 물질을 기타 치료학적 화합물과 함께 사용할 수 있다.

약학적 조성물은 국소, 정맥, 복강내, 근육내, 피하, 비강내 또는 피내 경로와 같은 통상적인 방법으로 투여할 수 있다. 약학적 조성물은 특정 전조를 치료 및/또는 예방하기 위한 유효량으로 투여할 수 있다. 일반적으로, 폴리펩티드는 체중 1kg 당 약 10 μ g 이상을 투여하며, 대부분의 경우에는 1일에 체중 1 kg당 약 8 mg을 초과하지 않는 양을 투여한다. 대부분의 경우에, 투여 경로, 증상 등을 고려하여 매일 체중 1kg당 약 10 μ g 내지 약 1 mg으로 복용한다.

케모킨 폴리펩티드, 및 폴리펩티드인 작용 물질 또는 길항 물질은 생체내에서 이 폴리펩티드를 발현시키는 본 발명에 따라 사용할 수 있으며, 이를 종종 유전자 요법이라고 칭한다.

따라서, 예를 들어 생체 외에서 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)로 환자의 세포를 조작한 후, 조작된 세포를 환자에게 제공하여 폴리펩티드로 치료할 수 있다. 이 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 RNA를 포함하는 레트로바이러스 입자를 사용하는 당업계에 공지된 방법에 의해서 세포를 유전자 조작할 수 있다.

유사하게, 예를 들어 당업계에 공지된 과정으로 생체내에서 폴리펩티드를 발현시키기 위해서 생체내에서 조작할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 RNA를 포함하는 레트로바이러스 입자를 생산하는 생산 세포를 환자에게 투여하여 생체내에서 세포를 조작하고 생체내에서 폴리펩티드를 발현시킨다. 이러한 방법에 의한 본 발명의 폴리펩티드를 투여하는 상기 및 기타 방법은 본 발명의 교시로부터 당업자들에게 분명해질 것이다. 예를 들어, 유전자 조작 세포의 발현 매개물은 레트로바이러스 이외의 것, 예를 들면, 적절한 이송 매개물과 조합한 후 생체내에서 사용할 수 있는 아데노바이러스일 수 있다.

레트로바이러스 플라스미드 벡터는 몰로니(Moloney) 쥐 육종 바이러스, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 로스(Rous) 육종 바이러스 및 하베이(Harvey) 육종 바이러스를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

바람직한 일양태에서, 레트로바이러스 발현 벡터, pMV-7은 몰로니 쥐 육종 바이러스의 긴말단 반복부(LTRs)에 의해 측면 연결되어 있고, 헤르페스 단일 바이러스(HVS) 티미딘 키나아제(tk) 촉진 인자의 조절하에 선택적인 의약품 내성 유전자 네오(neo)를 포함한다. 유일한 EcoRI 및 Hind III 부위는 암호 서열의 삽입을 용이하게 한다(kirschmeier, P.T. 등 DNA, 7: 219-25 (1988))

벡터는 이에 한정되는 것은 아니지만 Miller 등의 문헌 [Biotechnology vol. No. 9, 980-990 (1989)]에 기재된 레트로바이러스 LTR; SV40 촉진 인자; 및 인체 시토메갈로바이러스 (CMV) 촉진 인자를 포함하는 포함하는 1종 이상의 적절한 촉진 인자, 또는 기타 임의의 촉진 인자(예, 이에 한정되는 것은 아니지만, 히스톤, pol III, 및 β -액틴 촉진 인자를 비롯한 진행 세포 촉진 인자와 같은 촉진 인자)를 포함한다. 적절한 촉진 인자의 선택은 본 명세서의 내용으로 당업자들에게 분명해질 것이다.

본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 헤르페스 단일 티미딘 키나아제 촉진 인자와 같은 바이러스 티미딘 키나아제 촉진 인자; 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 조절하는 레트로바이러스 LTRs, β -액틴 촉진 인자, 및 고유 촉진 인자를 비롯하여 적절한 촉진 인자의 조절하에 있다.

레트로 바이러스 플라스미드 벡터는 생산자 세포주를 형성하기 위해서 패키징 세포주로 형질 도입하는데 사용된다. 형질 감염시킬 수 있는 패키징 세포는, PE501, PA317 및 GP+am12를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 벡터는 당업계에 공지된 임의의 방법을 통하여 패키징 세포로 형질 도입할 수 있다. 이 방법으로는 전기 영동, 리포솜 사용 및 CaPO₄ 침전을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

생산자 세포주는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자를 생성한다. 이어서, 레트로바이러스 벡터 입자는 생체내 또는 생체 외에서 진행 세포로 형질 도입하는데 사용할 수 있다. 형질 도입된 레트로 바이러스 벡터는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 발현시킬 수 있다. 형질 도입된 진행 세포는 섬유 아세포 및 내피 세포를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 서열은 염색체 동정에 이용할 수 있다. 특별하게 서열은 각각의 인간 염색체 상의 특정 위치를 표적으로 하고, 이 위치에 하이브리드시킬 수 있다. 추가로, 현재 염색체 상의 특정 부위에 대한 동정이 요구되고 있다. 실제 서열 자료(반복 다형 현상)를 근거로 한 염색체 표시 시약중 염색체 위치를 표시하기 위해 사용할 수 있는 것은 거의 없다. 본 발명에 따른 염색체의 DNA 매핑은 질병과 관련된 유전자를 갖는 서열과 상관 관계를 갖는 중요한 제 1 단계이다.

간단히, 서열은 cDNA로 부터 PCR 프라이머(바람직하게는 15-25bp)를 제조하여 염색체에 매핑할 수 있다. cDNA의 컴퓨터 분석은 게놈 DNA내의 하나 이상의 엑손을 연결하지 않는 프라이머를 신속하게 선택하는데 사용되며, 따라서 증폭 프로세스가 어려워진다. 이어서, 이들 프라이머는 각 인간 염색체를 포함하는 체 세포 하이브리드의 PCR 스크리닝을 위해 사용된다. 프라이머에 해당하는 인간 유전자를 포함하는 하이브리드만이 증폭된 단편을 생성할 수 있다.

체세포 하이브리드의 PCR 매핑은 특정 염색체에 특정 DNA를 배정하는 신속한 과정이다. 동일한 올리고뉴클레오티드 프라이머와 함께 본 발명을 사용하여, 유사한 방식으로 특정 염색체 또는 거대 게놈 클론의 푸울로부터 단편의 패널을 통하여 서브 위치를 측정할 수 있다. 유사한 방법으로 염색체에 매핑할 수 있는 기타 매핑 방법은 하이브리드화 방법, 표지된 흐름-분류 염색체를 사용한 예비 스크리닝 방법, 및 염색체 특정-cDNA 라이브러리를 구성하기 위한 예비선택 방법을 포함한다.

중기 염색체 확산중에 cDNA 클론의 하이브리드화 위치에 있는 형광물질(FISH)은 1 단계에서 정확한 염색체 위치를 제공하는데 사용된다. 이 기술은 500 또는 600 염기와 같이 짧은 cDNA에 사용될 수 있다. 이 기술에 대한 내용은 Verma 등의 문헌[Human Chromosomes: a Manual of Basic Technique, Pergamon Press, 뉴욕 (1988)]을 참조.

일단 서열이 정확한 염색체 위치에 매핑되면, 염색체 상에 서열의 물리적 위치는 유전자 매핑 자료와 상관 관계를 갖을 수 있다. 이 자료는 예를 들어, 문헌 [V. McXusick, Mendelian Inheritance in Man(존 홉킨스 대학 웰치 의학 도서관 이용)]에서 찾을 수 있다. 동일한 염색체 부위에 매핑된 유전자 및 질병의 관계는 연계 분석을 통하여 동정할 수 있다(물리적으로 인접한 유전자의 공동 유전).

이어서, 병에 걸린 개체 및 병에 걸리지 않은 개체사이의 cDNA 또는 게놈 서열의 차이를 결정할 필요가 있다. 만약 임의의 정상적인 개체에서는 관찰되지 않지만 병에 걸린 일부 또는 전부에서 변이가 관찰된다면, 이 변이는 질병의 원인성으로 볼 수 있을 것 같다.

물리적 매핑 및 유전자 매핑 기술의 현재 분석으로, 질병과 관련된 염색체 부위상에 위치한 cDNA의 정확한 위치는 50 내지 500의 잠재성 원인 유전자이다(이를 1메가염기 매핑 분석 및 20 kb당 1 유전자로 추정한다).

폴리펩티드, 이의 단편 또는 유도체, 또는 이의 유사체, 또는 이를 발현시키는 세포는 이에 대한 항체를 생성하기 위해서 면역원으로 사용될 수 있다. 이들 항체는 예를 들어, 다중 클론 또는 단일 클론 항체일 수 있다. 본 발명은 또한 Fab 단편 또는 Fab 발현 라이브러리의 생성물 뿐만 아니라 키메라, 단일 사슬 및 인체에 적용시킬 수 있는 항체를 포함한다. 당업계에 공지된 각종 과정은 항체 및 단편의 생성에 사용 가능하다.

본 발명의 서열에 상응하는 폴리펩티드 또는 생체내 이의 수용체에 대항하여 생성되는 항체는 동물내로 폴리펩티드를 직접 주입하거나, 또는 동물, 바람직하게는 인체에 폴리펩티드를 투여함으로써 얻을 수 있다. 이렇게 얻어진 항체는 폴리펩티드에 결합한다. 이 방법에서, 폴리펩티드 단편을 암호화하는 서열만이 전체 고유 폴리펩티드와 결합하는 항체를 생성하는데 사용할 수 있다. 이어서, 항체는 폴리펩티드를 발현하는 조직으로부터 폴리펩티드를 분리하는데 사용된다.

단일 클론 항체를 제조하기 위해서, 연속 세포주 배양액에 의해 생성된 항체를 제공하는 임의의 기술을 사용할 수 있다. 예는 하이브리도마 기술(Kohler 및 Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), 트리오마 기술, 인체 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor 등, 1983, Immunology Today 4: 72), 및 인체 단일 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술(Cole 등, 1985, in Monoclonal Antibodies 및 Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc, p 77-96)을 포함한다.

단일 사슬 항체의 생성(미국 특허 4,946,778)을 위한 기술은 본 발명의 면역원의 폴리펩티드 생성물에 대한 단일 사슬 항체를 생성하기 위해 적용할 수 있다. 또한 유전자를 전환시킨 쥐를 본 발명의 면역원 폴리펩티드 생성물에 대한 인체에 적용할 수 있는 항체를 발현시키기 위해서 사용할 수 있다.

추가로 본 발명은 하기의 실시예들을 참고로 기재할 것이나, 이는 본 발명을 이들 실시예에 제한하려는 것이 아니라는 것을 인지해야 한다. 특별한 지시가 없으면 모든 부 또는 양은 총량을 기준으로 한다.

하기의 실시예의 이해를 용이하게 하기 위해서 일부 빈번하게 발생하는 방법 및/또는 용어를 기재할 것이다.

플라스미드는 대문자 및/또는 숫자의 앞 및/또는 뒤에 소문자 p로 나타낸다. 본 명세서에서 개시 플라스미드는 시판용, 공개적으로 이용할 수 있는 비제한 영기, 또는 공고된 과정에 따른 이용가능한 플라스미드로부터 구조화된 것일 수 있다. 추가로, 기재된 것들에 대한 등가 플라스미드는 당업계에 공지되어 있으며, 일반 당업자들에게 분명해질 것이다.

DNA의 분해는 DNA의 특정 부위에 작용하는 제한 효소로 DNA를 촉매 분열시키는 것을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 각종 제한 효소는 시판용이며, 당업자들에게 공지된 반응 조건, 보조인자 및 기타 필요사항들을 사용하였다. 분석을 위하여, 전형적으로 플라스미드 또는 DNA 단편 1 μ g을 약 20 μ l 완충용액내에 효소 약 2 단위체와 함께 사용한다. 플라스미드 구조를 위한 DNA 단편을 분리하기 위해서, 전형적으로 DNA 5 내지 50 μ g을 더 큰 용량에서 20 내지 250 효소 단위체로 분해한다. 적절한 완충액 및 특정 제한 효소의 기질 양은 제조업자에 의해 결정된다. 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간의 배양시간이 사용되나, 공급자의 지시에 따라 다양할 수 있다. 분해 후에, 반응물을 폴리아미드겔에 직접 전기영동시켜 원하는 단편을 분리한다.

분열된 단편의 크기별 분리는 Goeddel, D. 등의 문헌[Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980)]에 기재된 8% 폴리아미드 겔을 사용하여 수행한다.

올리고뉴클레오티드는 화학적으로 합성될 수 있는 단일쇄의 폴리데옥시뉴클레오티드 또는 2개의 상보적 폴리데옥시뉴클레오티드 쌍을 지칭한다. 합성 올리고뉴클레오티드는 5' 포스페이트가 없으며, 따라서 키나제의 존재하에 ATP를 이용하여 포스페이트를 첨가하지 않으면 올리고뉴클레오티드 상호간에 연결할 수 없다. 합성 올리고뉴클레오티드는 탈인산화되지 않은 단편에 연결된다.

연결은 2분쇄의 핵산 단편사이에 포스포디에스테르를 형성하는 과정을 의미한다(Maniatis, T. 등, Id., p 146). 기타 제한이 없으면, 연결은 공지된 완충액 및 대략 동일한 몰의 연결된 DNA 단편 0.5 μ g당 T4 DNA 리가아제(리가아제) 10 단위체를 사용하여 수행할 수 있다.

기타의 언급이 없으면, 형질 전환은 Graham, F. 및 Van der Eb. A., Virology의 방법에 기재된 방법으로 수행하였다.

실시예

실시예 1

Ck β -8의 박테리아 발현 및 정제

Ck β -8, ATCC # 75676를 암호화하는 DNA 서열은 프로세싱된 Ck β -8 단백질의 5' 및 3' 말단 서열(시그널 펩티드 서열은 제외) 및 벡터 서열 3'에 해당하는 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 초기에 Ck β -8로 증폭된다. 추가로 Bam HI 및 XbaI에 해당하는 뉴클레오티드를 각각 5' 및 3' 서열에 첨가한다. 5' TCAGGATCCGTCACAAAGATGCAGA 3'(서열 번호 7)을 갖는 5' 올리고뉴클레오티드 프라이머는 BamHI 제한 효소 부위에 이어서, 프로세싱된 단백질의 말단으로 추정되는 아미노산으로부터 출발하는 Ck β -8 암호 서열의 18 뉴클레오티드를 포함한다. 3' 서열 5' CGCTCATAGAGTAAAACGACGGCCAGT 3'(서열 번호 8)은 XbaI 부위에 대한 상보 서열을 포함한다. 이 제한 효소 부위는 박테리아 발현 벡터 pQE-9상의 제한 효소 부위에 해당한다(퀴아겐 인코오포레이티드). pQE-9은 항생제 내성(Amp^r), 박테리아 복제 원점(ori), IPTG-조절 가능한 촉진 작동인자(P/O), 리보솜 결합 부위(RBS), 6-His 태그 및 제한 효소 부위를 암호화한다. 이어서 pQE-9은 BamHI 및 XbaI로 분해된다. 증폭된 서열은 pQE-9내로 결합되고 히스티딘 태그 및 RBS를 암호화하는 서열을 프레임내로 삽입한다. 이어서 결합 혼합물은 퀴아겐 인코오포레이티드에서 입수 가능한

이.콜리 균주 M15/rep4내로 형질 전환시키는데 사용한다. M15/rep4는 플라스미드 pREP4의 다수 복사를 포함하며, 이는 lacI 억제 인자를 발현시키고 카나마이신 내성(Kan^r)을 부여한다. LB 판상에서 증식할 수 있는 능력에 의해 형질 전환체를 동정하고 옴피실린/카나마이신 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 분리하고 제한 분석을 수행하였다. 원하는 구조를 포함하는 콜론을 Amp(100 ug/ml) 및 Kan(25 ug/ml)를 보충한 LB 배지의 액상 배양액에서 밤새(0/N) 증식시켰다. 0/N 배양액은 1:100 내지 1:250의 비율로 거대 배양액에 접종하기 위해서 사용하였다. 세포를 0.4 내지 0.6의 광학 밀도 600(0.D⁶⁰⁰)에서 증식시켰다. IPTG(이소프로필-β-D-티오칼락토 피라노시드)를 최종 농도 1 mM에 첨가하였다. 유전자 발현의 증가와 관련된 P/O를 소거하는 lacI 억제 인자를 불활성화시켜서 IPTG를 유도하였다. 세포를 추가의 3 내지 4 시간 동안 증식시켰다. 이어서, 세포를 원심 분리하여 수득하였다. 세포 펠렛을 카오트로픽제(chaotropic) 6몰 구아니딘 HCl내에서 가용화하였다. 분류후에, 가용화된 Ck β-8을 6-His 태그를 함유하는 단백질과 강하게 결합시키는 조건하에서 니켈-킬레이트 칼럼의 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 정제하였다(Hochuli, E 등, J. Chromatography 411:177-184 (1984)). Ck β-8(95% 순도)는 6몰 구아니딘 HCl pH 5.0 하에서 칼럼으로부터 용출시키고, 복원을 위해서는 3몰 구아니딘 HCl, 100 mM 나트륨 포스페이트, 10 mM 글루타티온(산화) 및 2 mM 글루타티온(산화)으로 조정한다. 용액을 12 시간 동안 배양한 후에, 단백질을 10 mM 나트륨 포스페이트로 투석한다.

실시예 2

MIP-4의 박테리아 발현 및 정제

MIP-4, ATCC # 75675를 암호화하는 DNA 서열은 프로세싱한 MIP-4 단백질의 5' 및 3' 서열(시그널 펩티드 서열은 제외)에 해당하는 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 초기에 증폭시켰다. 추가로 Bam HI 및 XbaI에 해당하는 뉴클레오타이드를 각각 5' 및 3'말단에 첨가하였다. 서열 5' TCAGGATCCTGTGCACAAGTTGGTACC 3'(서열 번호 9)을 갖는 5' 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 BamHI 제한 효소 부위에 이은 프로세싱된 단백질 코돈의 말단으로 추정되는 아미노산으로부터 출발하는 MIP-4 암호 서열의 18 뉴클레오타이드를 포함한다; 3' 서열 5' CGCTCTAGAGTAAAACGACGCCAGT 3'(서열 번호 10)은 XbaI 부위에 대한 상보 서열을 포함한다. 이 제한 효소 부위는 박테리아 발현 벡터 pQE-9상의 제한 효소 부위에 해당한다(캘리포니아, 샤쓰워스에 위치한 퀴아겐 인코오포레이티드). pQE-9은 항생제 내성(Amp^r), 박테리아의 복제 원점(ori), IPTG-조절 가능한 촉진제 작동인자(P/O), 리보솜 결합 부위(RBS), 6-His 태그 및 제한 효소 부위를 암호화한다. 이어서 pQE-9은 BamHI 및 XbaI로 분해되고 증폭된 서열은 pQE-9내로 결합되고 히스티딘 태그 및 RBS를 암호화하는 서열을 프레임내로 삽입한다. 이어서 결합 혼합물은 퀴아겐 인코오포레이티드에서 입수 가능한 이.콜리 균주 M15/rep4내로 형질 전환시키는데 사용한다. M15/rep4는 플라스미드 pREP4의 다수 복사를 포함하며, 이는 lacI 억제 인자를 발현시키고 카나마이신 내성(Kan^r)을 부여한다. LB 판상에서 증식할 수 있는 능력에 의해 형질 전환체를 동정하고 옴피실린/카나마이신 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 분리하고 제한 분석을 수행하였다. 원하는 구조를 포함하는 콜론을 Amp(100 ug/ml) 및 Kan(25 ug/ml)를 보충한 LB 배지의 액상 배양액에서 밤새(0/N) 증식시켰다. 0/N 배양액은 1:100 내지 1:250의 비율로 거대 배양액에 접종하기 위해서 사용하였다. 세포를 0.4 내지 0.6의 광학 밀도 600(0.D⁶⁰⁰)에서 증식시켰다. IPTG(이소프로필-β-D-티오칼락토 피라노시드)를 최종 농도 1 mM에 첨가하였다. 유전자 발현의 증가와 관련된 P/O를 소거하는 lacI 억제 인자를 불활성화시켜서 IPTG를 유도하였다. 세포를 추가의 3 내지 4 시간 동안 증식시켰다. 이어서, 세포를 원심 분리하여 수득하였다. 세포 펠렛을 카오트로픽제(chaotropic) 6몰 구아니딘 HCl내에서 가용화하였다. 분류후에, 가용화된 MIP-4를 6-His 태그를 함유하는 단백질과 강하게 결합시키는 조건하에서 니켈-킬레이트 칼럼의 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 정제하였다(Hochuli, E 등, J. Chromatography 411:177-184 (1984)). MIP-4(95% 순도)는 6몰 구아니딘 HCl pH 5.0 하에서 칼럼으로부터 용출시키고, 복원을 위해서는 3몰 구아니딘 HCl, 100 mM 나트륨 포스페이트, 10 mM 글루타티온(산화) 및 2 mM 글루타티온(산화)으로 조정한다. 용액을 12 시간 동안 배양한 후에, 단백질을 10 mM 나트륨 포스페이트로 투석한다.

실시예 3

Ck β-1의 박테리아 발현 및 정제

Ck β-1, ATCC # 75572를 암호화하는 DNA 서열은 프로세싱한 Ck β-1 단백질의 5' 및 3' 서열(시그널 펩티드 서열은 제외)에 해당하는 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 초기에 증폭시키고, 추가로 Bam HI 및 XbaI에 해당하는 뉴클레오타이드를 각각 5' 및 3' 말단에 첨가하였다. 서열 5' GCCCGCGGATCCTCCTCAGGGGACCTTAC 3'(서열 번호 11)을 갖는 5' 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 BamHI 제한 효소 부위에 이은 프로세싱된 단백질 코돈의 말단으로 추정되는 아미노산으로부터 출발하는 Ck β-1 암호 서열의 15 뉴클레오타이드를 포함한다; 3' 서열 5' GCCTGCTCTAGATCAAAGCAGGGAAGCTCCAG 3'(서열 번호 12)은 XbaI 부위에 대한 상보 서열, 번역 중지 코돈 및 Ck β-1 암호 서열의 최종 20 뉴클레오타이드를 포함한다. 이 제한 효소 부위는 박테리아 발현 벡터 pQE-9상의 제한 효소 부위에 해당한다(캘리포니아, 샤쓰워스에 위치한 퀴아겐 인코오포레이티드). pQE-9은 항생제 내성(Amp^r), 박테리아의 복제 원점(ori), IPTG-조절 가능한 촉진 작동인자(P/O), 리보솜 결합 부위(RBS), 6-His 태그 및 제한 효소 부위를 암호화한다. 이어서 pQE-9은 BamHI 및 XbaI로 분해되고 증폭된 서열은 pQE-9내로 결합되고 히스티딘 태그 및 RBS를 암호화하는 서열을 프레임내로 삽입한다. 이어서 결합 혼합물은 퀴아겐 인코오포레이티드에서 입수 가능한 이.콜리 균주 M15/rep4내로 형질 전환시키는데 사용한다. M15/rep4는 플라스미드 pREP4의 다수 복사를 포함하며, 이는 lacI 억제 인자를 발현시키고 카나마이신 내성(Kan^r)을 부여한다. LB 판상에서 증식할 수 있는 능력에 의해 형질 전환체를 동정하고 옴피실린/카나마이신 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 분리하고 제한 분석을 수행하였다. 원하는 구조를 포함하는 콜론을 Amp(100 ug/ml) 및 Kan(25 ug/ml)를 보충한 LB 배지의 액상 배양액에서 밤새(0/N) 증식시켰다. 0/N 배양액은 1:100 내지 1:250의 비율로 거대 배양액에 접종하기 위해서 사용하였다. 세포를 0.4 내지 0.6의 광학 밀도 600(0.D⁶⁰⁰)에서 증식시켰다. IPTG(이소프로필-β-D-티오칼락토 피라노시드)를 최종 농도 1 mM에 첨가하였다. 유전자 발현의 증가와 관련된 P/O를 소거하는 lacI 억제 인자를 불활성화시켜서 IPTG를 유도하였다. 세포를 추가의 3 내지 4 시간

동안 증식시켰다. 이어서, 세포를 원심 분리하여 수득하였다. 세포 펠렛을 카오트로픽제(chaotropic) 6몰 구아니딘 HCl내에서 가용화하였다. 분류후에, 가용화된 MIP-4를 6-His 태그를 함유하는 단백질과 강하게 결합시키는 조건하에서 니켈-킬레이트 칼럼의 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 정제하였다(Hochuli, E 등, J. Chromatography 411:177-184 (1984)). Ck β -1(95% 순도)는 6몰 구아니딘 HCl pH 5.0 하에서 칼럼으로부터 용출시키고, 복원을 위해서는 3몰 구아니딘 HCl, 100 mM 나트륨 포스페이트, 10 mM 글루타티온(산화) 및 2 mM 글루타티온(산화)으로 조정한다. 용액을 12 시간 동안 배양한 후에, 단백질을 10 mM 나트륨 포스페이트로 투석한다.

실시예 4

COS 세포에서의 재조합 Ck β -8의 발현

플라스미드 CMV-Ck β -8 HA의 발현은 1) SV40 복제 원점, 2) 앰피실린 내성 유전자, 3) 이. 콜리 복제 원점, 4) 다중 결합 부위, SV40 인트론 및 폴리아데닐화 부위에 이어지는 CMV 촉진 인자를 포함하는 벡터 pcDNA1/Amp(세포외 생성)으로부터 유도된다. 완전한 Ck β -8 전구체 및 3' 말단에 프레임내로 융합시킨 HA 태그를 암호화하는 단편은 벡터의 다중 결합된 영역으로 클론하므로, 재조합 단백질 발현은 CMV 촉진 인자에 의해 규제된다. 에피토프에 상응하는 HA 태그는 전술한 바와 같이 인프루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유도되었다(I. Wilson 등, Cell, 37:767 (1984)). 표적 단백질에 HA 태그를 주입하면 HA 에피토프에 의해 인식되는 항체를 갖는 재조합 단백질을 용이하게 검출할 수 있다.

플라스미드 구조 방법은 하기와 같다:

Ck β -8, ATCC # 75676을 암호화하는 DNA 서열은 2개의 프라이머를 사용한 PCR에 의해서 구조화된다; 5' 프라이머 5' GGAAAGCTTATGAAGGTCTCGTGGCT 3'(서열 번호 13)은 HindIII 부위 뒤에 개시 코돈으로부터 출발하는 Ck β -8 암호 서열의 18 뉴클레오티드를 포함한다; 3' 서열 5' CGCTCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAA TTCTTCTGGTCTTGATCC 3' (서열 번호 14)는 XbaI 부위에 대한 상보 서열, 번역 중지 코돈, HA 태그 및 Ck β -1 암호 서열의 최종 20 뉴클레오티드(중지 코돈을 포함하지 않음)를 포함한다. 따라서, PCR 생성물은 HindIII 부위, 프레임내에 융합된 HA 태그로 이어지는 Ck β -8 서열, HA 태그에 이웃한 번역 종결 중지 코돈, 및 XbaI 부위를 포함한다. PCR 증폭된 DNA 단편 및 벡터, pcDNA1/Amp은 HindIII 및 XbaI 제한 효소에 의해 분해되고 연결된다. 연결 혼합물을 이. 콜리 균주 SURE (캘리포니아, 라즐리아에 위치한 스트라타젠 클로닝 시스템)내로 형질 전환시키고, 형질 전환된 배양액을 앰피실린 배지판상에 평판 배양시키며, 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 형질 전환체로부터 분리하고 정확한 단편의 존재를 위해 제한 분석법으로 시험한다. 재조합 Ck β -8의 발현을 위해, COS 세포를 DEAE-DEXTRAN 방법(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))으로 발현 벡터로 형질 감염시킨다. Ck β -8-HA 단백질의 발현은 방사능표지 및 면역 침전 방법을 사용하여 검출한다(E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). 형질 감염 2일 후에 세포를 8 시간 동안 ³⁵S-시스테인으로 라벨한다. 배양액을 수거하고 세포를 세제로 용해시킨다(RIPA 완충액 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.1% DOC, 50mM 트리스, pH 7.5)(Wilson, I 등, Id. 37: 767 (1984))). 세포 용해물 및 세포 배양액을 HA 특정 단일 클론 항체로 침전시킨다. 침전된 단백질은 15% SDS-PAGE 겔상에서 분석한다.

실시예 5

COS 세포에서의 재조합 MIP-4의 발현

플라스미드 CMV-MIP-4 HA의 발현은 1) SV40 복제 원점, 2) 앰피실린 내성 유전자, 3) 이. 콜리 복제 원점, 4) 다중 결합 부위, SV40 인트론 및 폴리아데닐화 부위에 이어지는 CMV 촉진 인자를 포함하는 벡터 pcDNA1/Amp(세포외 생성)으로부터 유도된다. 완전한 Ck β -8 전구체 및 3' 말단에 프레임내로 융합시킨 HA 태그를 암호화하는 단편은 벡터의 다중 결합된 영역으로 클론하므로, 재조합 단백질 발현은 CMV 촉진 인자에 의해 규제된다. 에피토프에 상응하는 HA 태그는 전술한 바와 같이 인프루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유도되었다(I. Wilson 등, Cell, 37:767 (1984)). 표적 단백질에 HA 태그를 주입하면 HA 에피토프에 의해 인식되는 항체를 갖는 재조합 단백질을 용이하게 검출할 수 있다.

플라스미드 구조 방법은 하기와 같다:

MIP-4, ATCC # 75675을 암호화하는 DNA 서열은 2개의 프라이머를 사용한 PCR에 의해서 구조화된다; 5' 프라이머 5' GGAAAGCTTATGAAGGGCTTGCAGCTGCC 3'(서열 번호 15)은 HindIII 부위 뒤에 개시 코돈으로부터 출발하는 MIP-4 암호 서열의 20 뉴클레오티드를 포함한다; 3' 서열 5' CGCTCTAGATCAABCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAG GCATTGAGTTCAGGTC 3' (서열 번호 16)는 XbaI 부위에 대한 상보 서열, 번역 중지 코돈, HA 태그 및 MIP-4 암호 서열의 최종 19 뉴클레오티드(중지 코돈을 포함하지 않음)를 포함한다. 따라서, PCR 생성물은 HindIII 부위, 프레임내에 융합된 HA 태그로 이어지는 MIP-4 서열, HA 태그에 이웃한 번역 종결 중지 코돈, 및 XbaI 부위를 포함한다. PCR 증폭된 DNA 단편 및 벡터, pcDNA1/Amp은 HindIII 및 XbaI 제한 효소에 의해 분해되고 연결된다. 연결 혼합물을 이. 콜리 균주 SURE (캘리포니아, 라즐리아에 위치한 스트라타젠 클로닝 시스템)내로 형질 전환시키고, 형질 전환된 배양액을 앰피실린 배지판상에 평판 배양시키며, 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 형질 전환체로부터 분리하고 정확한 단편의 존재를 위해 제한 분석법으로 시험한다. 재조합 MIP-4의 발현을 위해, COS 세포를 DEAE-DEXTRAN 방법(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))으로 발현 벡터로 형질 감염시킨다. MIP-4-HA 단백질의 발현은 방사능 표지 및 면역 침전 방법을 사용하여 감지한다(E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). 형질 감염 2일 후에 세포를 8 시간 동안 ³⁵S-시스테인으로 라벨한다. 배양액을 수거하고 세포를 세제로 용해시킨다(RIPA 완충액 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.1% DOC, 50mM 트리스, pH 7.5)(Wilson, I 등, Id. 37: 767 (1984))). 세포 용해물 및 세포 배양액을 HA 특정 단일 클론 항체로 침전시킨다. 침전된 단백질은 15% SDS-PAGE 겔상에서

분석한다.

실시예 6

COS 세포에서의 재조합 Ck β -1의 발현

CMV-Ck β -1 HA의 발현은 1) SV40 복제 원점, 2) 앰피실린 내성 유전자, 3) 이. 콜리 복제 원점, 4) 다중 결합 부위, SV40 인트론 및 폴리아데닐화 부위에 이어지는 CMV 촉진 인자를 포함하는 벡터 pcDNA1/Amp(세포외 생성)으로부터 유도된다. 완전한 Ck β -1 전구체 및 3' 말단에 프레임내로 융합시킨 HA 태그를 암호화하는 단편은 벡터의 다중 결합된 영역으로 클론하므로, 재조합 단백질 발현은 CMV 촉진 인자에 의해 규제된다. 에피토프에 상응하는 HA 태그는 전술한 바와 같이 인프루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유도되었다(I. Wilson 등, Cell, 37:767 (1984)). 표적 단백질에 HA 태그를 주입하면 HA 에피토프에 의해 인식되는 항체를 갖는 재조합 단백질을 용이하게 검출할 수 있다.

플라스미드 구조 방법은 하기와 같다:

Ck β -1, ATCC # 75572를 암호화하는 DNA 서열은 2개의 프라이머를 사용한 PCR에 의해서 구조화된다; 5' 프라이머 5' GGAAAGCTTATGAAGATTCGGTGGCTGC 3'(서열 번호 17)은 HindIII 부위 뒤에 개시 코돈으로부터 출발하는 Ck β -1 암호 서열의 20 뉴클레오티드를 포함한다; 3' 서열 5' CGCTCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAG TTCTCCTTCATGTCCTTG 3' (서열 번호 18)는 XbaI 부위에 대한 상보 서열, 번역 중지 코돈, HA 태그 및 Ck β -1 암호 서열의 최종 19 뉴클레오티드(중지 코돈을 포함하지 않음)를 포함한다. 따라서, PCR 생성물은 HindIII 부위, 프레임내에 융합된 HA 태그로 이어지는 Ck β -1 서열, HA 태그에 이웃한 번역 종결 중지 코돈, 및 XbaI 부위를 포함한다. PCR 증폭된 DNA 단편 및 벡터, pcDNA1/Amp은 HindIII 및 XbaI 제한 효소에 의해 분해되고 연결된다. 연결 혼합물을 이. 콜리 균주 SURE (캘리포니아, 라졸리아에 위치한 스트레타젠 클로닝 시스템)내로 형질 전환시키고, 형질 전환된 배양액을 앰피실린 배지판상에 평판 배양시키며, 내성 콜로니를 선택한다. 플라스미드 DNA를 형질 전환체로부터 분리하고 정확한 단편의 존재를 위해 제한 분석법을 시험한다. 재조합 Ck β -1의 발현을 위해, COS 세포를 DEAC-DEXTRAN 방법(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))으로 발현 벡터로 형질 감염시킨다. Ck β -1-HA 단백질의 발현은 방사능 표지 및 면역 침전 방법을 사용하여 검출한다(E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). 형질 감염 2일 후에 세포를 8 시간 동안 35 S-시스테인으로 표지한다. 배양액을 수거하고 세포를 세제로 용해시킨다(RIPA 완충액 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.1% DOC, 50mM 트리스, pH 7.5)(Wilson, I 등, Id. 37: 767 (1984)). 세포 용해물 및 세포 배양액을 HA 특정 단일 클론 항체로 침전시킨다. 침전된 단백질은 15% SDS-PAGE 겔상에서 분석한다.

실시예 7

인체 조직에서 Ck β -8의 발현 패턴

노던 블롯 분석은 인체 조직에서 Ck β -8의 발현 정도를 시험하기 위해서 수행하였다. 총 세포의 RNA 시료는 RNazol™ B 시스템(텍사스주 77033, 휴스톤에 위치한 바이오텍스 래보러토리 인코오포레이션)으로 분리하였다. 각 특정 인체 조직으로부터 분리된 총 RNA의 약 10 ug을 1% 한천 겔에서 분리하고, 나일론 필터로 블롯한다(Sambrook, Fritsch, 및 Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, (1989)). 표지 반응물은 50ng DNA 단편으로 스트라타젠 Prime-It kit에 따라 수행한다. 표지된 DNA는 셀렉트-G-50 칼럼으로 정제한다(5 프라임-3 프라임, Inc. Boulder, CO). 이어서, 65°C에서 방새 필터를 0.5M NaPO₄, pH 7.4 및 7% SDS 중의 1,000,000 cpm/ml 방사능 라벨된 총 길이 Ck β -8 유전자와 하이브리드시킨다. 0.5×SSC, 0.1% SDS로 실온에서 2회, 60°C에서 2회 세척한 후, 강화 스크린을 사용하여 필터를 -70°C에서 방새 노출시킨다.

실시예 8

인체 조직에서 MIP-4의 발현 패턴

노던 블롯 분석은 인체 조직에서 MIP-4의 발현 정도를 시험하기 위해서 수행하였다. 총 세포의 RNA 시료는 RNazol™ B 시스템(텍사스주, 휴스톤에 위치한 바이오텍스 래보러토리 인코오포레이션)으로 분리하였다. 각 특정 인체 조직으로부터 분리된 총 RNA의 약 10 ug을 1% 한천 겔에서 분리하고, 나일론 필터로 블롯한다(Sambrook, Fritsch, 및 Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, (1989)). 표지 반응물은 50ng DNA 단편으로 스트라타젠 Prime-It kit에 따라 수행한다. 표지된 DNA는 셀렉트-G-50 칼럼으로 정제한다(5 프라임-3 프라임, Inc. Boulder, CO). 이어서, 65°C에서 방새 필터를 0.5M NaPO₄, pH 7.4 및 7% SDS 중의 1,000,000 cpm/ml 방사능 라벨된 총 길이 MIP-4 유전자와 하이브리드시킨다. 0.5×SSC, 0.1% SDS로 실온에서 2회, 60°C에서 2회 세척한 후, 강화 스크린을 사용하여 필터를 -70°C에서 방새 노출시킨다.

실시예 9

인체 조직에서 Ck β -1의 발현 패턴

노던 블롯 분석은 인체 조직에서 Ck β -1의 발현 정도를 시험하기 위해서 수행하였다. 총 세포의 RNA 시료는 RNazol™ B 시스템(텍사스주, 휴스톤에 위치한 바이오텍스 래보러토리 인코오포레이션)으로 분리하였다. 각 특정 인체 조직으로부터 분리된 총 RNA의 약 10 ug을 1% 한천 겔에서 분리하고, 나일론 필터로 블롯한다(Sambrook, Fritsch, 및 Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, (1989)). 표지 반응물은 50ng DNA 단편으로 Stratagene Prime-It kit에 따라 수행한다. 표지된 DNA는 셀렉트-G-50 칼럼으로 정제한다(5 프라임-3 프라임, Inc. Boulder, CO). 이어서, 65°C에서 방새 필터를 0.5 NaPO₄, pH 7.4 및 7% SDS 중의 1,000,000 cpm/ml 방사능 라벨된 총 길이 Ck β -1 유전자와 하이브리드시킨

다. 0.5×SSC, 0.1% SDS로 실온에서 2회, 60°C에서 2회 세척한 후, 강화 스크린을 사용하여 필터를 -70°C에서 밤새 노출시킨다.

실시에 10

배큐로바이러스 발현 시스템을 사용한 케모킨 Ck β-8의 발현 및 정제

SF9 세포를 Ck β-8 cDNA를 발현시키기 위해 재조합 배큐로바이러스로 감염시켰다. 세포를 2 MOI에서 감염시키고 28°C에서 72-96 시간 동안 배양하였다. 감염된 배양액으로부터 세포 파편을 저속 원심분리기로 제거하였다. 프로테아제 억제제 콕테일을 최종 농도 20 μg/ml Pefabloc SC, 1 μg/ml 류펩틴, 1 μg/ml E-64 및 1 mM EDTA에서 상등액에 첨가하였다. 상등액내의 Ck β-8의 농도는 상등액 20-30 μl를 15% SDS-PAGE 겔에 적재하여 모니터링하였다. Ck β-8은 1리터당 몇 mg의 발현 농도에 해당하는 가시가능한 9Kd 밴드로 감지하였다. 추가로 Ck β-8을 3단계 정제 과정에 의해서 정제하였다: 헤파린 결합 친화성 크로마토그래피. 배큐로바이러스 배양액의 상등액을 100mM HEPES/MES/NaOAc pH 6을 포함하는 1/3 부피의 완충액과 혼합하고 0.22 μm막으로 여과시켰다. 이어서, 시료를 헤파린 결합 칼럼(HE1 다공성 20, 바이오-퍼셉티브 시스템 인코오포레이티드)에 적용시켰다. Ck β-8을 pH 6의 50mM HEPES/MES/NaOAc내에 50 내지 500 mM NaCl의 선형 구배중에서 약 300 mM NaCl에서 용출시켰다; 양이온 교환 크로마토그래피. 헤파린 크로마토그래피로부터 농축된 Ck β-8은 pH 6의 50mM HEPES/MES/NaOAc를 포함하는 완충액으로 5배 희석시킨다. 생성 혼합물을 양이온 교환 칼럼(S/M 다공성 20, 바이오-퍼셉티브 시스템 인코오포레이티드)에 적용하였다. Ck β-8을 pH 6의 50mM HEPES/MES/NaOAc중의 25 내지 300 mM NaCl 선형 구배중에서 약 250mM NaCl에서 용출시켰다; 크기 배제 크로마토그래피. 양이온 교환 크로마토그래피에 이어서, Ck β-8을 추가로 크기 배제 칼럼(HW50, TOSO HAAS, 1.4×45 cm)에 적용시켜 정제하였다. Ck β-8은 단백질의 이량체 형태에 해당하는 13.7 Kd 분자량 기준(RNase A)에 근접한 위치에 분획되었다.

상기 3 단계 정제 후, 생성 Ck β-8은 SDS-PAGE 겔의 코마씨 블루 염색으로부터 90% 초과 순도를 갖는 것으로 판단하였다(도9).

또한 정제된 Ck β-8은 내독소/LPS 불순물에 대해 시험하였다. LPS 함량은 LAL분석(BioWhittaker)에 따라 0.1 ng/ml 미만이었다.

실시에 11

M-CSF상에 배큐로바이러스-발현된 Ck β-1 및 Ck β-8의 효과 및 새로 분리된 골수 세포의 SCF-자극된 콜로니 형성

쥐 골수 세포의 저 밀도 개체군을 37°C에서 1시간 동안 처리된 조직 배양액 접시에서 배양시켜 단핵구, 대식세포, 및 플라스틱 표면에 부착되는 기타 세포를 제거하였다. 세포의 비-부착 개체군을 도 16에 나타난 인자의 존재 또는 부재하에 성장 배지를 포함하는 한천내에서 평판배양시켰다(10,000 세포/접시). 배양액을 37°C에서 10일 동안 배양하고(88% N₂, 5% CO₂, 및 7% O₂) 콜로니를 역 현미경하에서 계수하였다. 자료를 평균 콜로니수로 나타내고 3회 수행된 분석으로 얻었다.

실시에 12

IL-3상에 Ck β-8 및 Ck β-1의 효과 및 골수 세포 동족개체군의 SCF 자극된 증식 및 분화

원조혈제의 선조 세포내에 농축된 쥐 골수 세포의 개체군은 음성 선택 방법을 사용하여 얻었으며, 일련의 관련 세포 대부분은 단일 클론 항체의 패널(항 cd11b, CD4, CD8, CD45R, 및 Gr-1 항원) 및 자기 비드를 사용하여 제거하였다. 생성된 개체군(동족 세포)을 IL-3(5ng/ml)와 SCF(100 ng/ml)로 보충시킨 증식 배지에서 제시된 케모킨(50 ng/ml)의 존재 또는 부재하에 평판 배양하였다. 습도가 조절되는 항온조의 37°C에서 7일간 배양한 후에(5% CO₂, 7% O₂ 및 88% N₂ 조건), 세포를 수득하고 HPP-CFC 및 미숙 선조세포를 분석하였다. 추가로, 세포를 FACScan에 의한 특정 분화 항원의 발현에 대하여 분석하였다. 콜로니 자료는 평균 콜로니수+/-표준 편차로 나타내고, 세포의 각 개체군에 대하여 6개의 접시에서 수행한 분석으로 부터 자료를 수득하였다(도 17).

실시에 13

IL-3, M-CSF 및 GM-CSF에 응답하는 콜로니 형성에 대한 Ck β-8의 억제

쥐 골수 세포는 대퇴골 및 경골에서 관류시켜, 피콜(picol)밀도 구배로 분리하고 플라스틱 부착에 의해 단핵구를 제거하였다. 생성 세포의 개체군을 IL-3(5ng/ml), GM-CSF(5ng/ml), M-CSF(10ng/ml) 또는 G-CSF(10 ng/ml)로 보충시킨MEK-계 배지에서 밤새 배양시켰다. 이들 세포를 50 ng/ml의 Ck β-8의 존재 또는 부재하에 IL-3(5ng/ml), GM-CSF(5ng/ml) 또는 M-CSF(5ng/ml)하에서 한천계 콜로니 형성 분석을 위해 1,000 세포/접시로 평판배양시켰다. 자료는 각 특정 인자로 형성된 콜로니의 수의 백분율로 콜로니 형성을 나타낸다. 2개의 실험은 각 실험의 표준 편차를 나타내는 오차 바와 함께 2 반복 배양 접시의 평균 값으로 나타낸다(도 19).

실시에 14

유전자 요법에 의한 발현

섬유아세포는 피부 생체 검사에 의해 검체로부터 획득하였다. 생성된 조직은 조직 배양 배지 내에 위치시켰으며, 소 단편으로 분리하였다. 조직의 작은 덩어리는 조직 배양 플라스크의 습윤 표면상에 위치시키고, 약 10개의 단편을 각각의 플라스크에 위치시켰다. 상기 플라스크는 뒤집고, 철저히 봉인하고, 실온에서 하룻밤 동안 유지하였다. 실온에서 24 시간후, 상기 플라스크를 뒤집고, 조직 덩어리를 플라스크의 바닥에 고정시킨 상태에서 새로운 배지(예를 들어, 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 보유하는 항의 F12 배지)를 첨가하였다. 이어서, 37°C에서 약 1 주일 동안 배양하였다. 이 시점에서, 새로운 배지를 첨가하고, 이어서 7일에 한 번 교환하였다. 추가로 2주일 동안 배양한 후, 섬유아세포로 이루어진 단층이 나타났다. 상기 단층은 트립신 처리하고, 더 큰 플라스크로 확대하였다.

몰로니 쥐 육종 바이러스의 긴 말단 반복부에 인접한 pMV-7(Kirschmeier, P.T. 등, DNA 7:219-25 (1988))은 EcoRI 및 HindIII로 분해하였으며, 이어서 송아지 체장 포스파타아제로 처리하였다. 상기 선형 벡터는 한 천 겔 상에서 분획화하고, 유리 비드를 사용하여 정제하였다.

본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA는 각각 5' 서열 및 3' 서열에 상응하는 PCR 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 상기 5' 프라이머는 EcoRI 위치를 함유하였고, 3' 프라이머는 HindIII 위치를 함유하였다. 동일한 양의 몰로니 쥐 육종 바이러스 선형 벡터 및 EcoRI 및 HindIII 단편은 T4 DNA 리가제의 존재하에서 함께 첨가하였다. 생성된 혼합물은 상기 두 단편의 연결을 위해 적합한 조건 하에서 유지하였다. 상기 연결 혼합물을 사용하여 박테리아 HB101을 형질전환하였으며, 이어서 상기 벡터에 소정의 유전자가 적합하게 삽입되었는가를 확인하기 위해 카나마이신을 함유하는 한천 상에서 평판 배양하였다.

암포트로픽(amphotropic) pA317 또는 GP+am12 패키징 세포를 10% 송아지 혈청(CS), 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 돌베코의 변형된 이글 배지 냉서 조직 배양하여 함유 밀도로 성장시켰다. 이어서 상기 유전자를 함유하는 MSV 벡터를 상기 배지에 첨가하고, 상기 패키징 세포는 상기 벡터로 형질전환하였다. 상기 패키징 세포는 상기 유전자를 함유하는 감염성 바이러스 입자를 생성하였다(이하, 상기 패키징 세포는 제조자 세포로 칭한다).

새로운 배지를 형질도입된 생산 세포에 첨가하고, 이어서 배지를 군집된 생산자 세포의 10 cm 평판으로부터 수득한다. 감염 바이러스 입자를 포함하는 산란 배지를 밀리 다공성 필터로 여과하여 부착된 생산자 세포를 제거하고, 이 배지를 섬유아세포로 감염시키기 위해서 사용한다. 배지를 섬유아세포의 아군집 평판으로부터 제거하고, 신속하게 생산자 세포로 배지를 대체한다. 이 배지를 제거하고 새로운 배지로 대체한다. 바이러스의 역가가 높으면, 결국 모든 섬유아세포는 감염되고 선택할 필요가 없다. 만약 역가가 매우 낮으면, *neo* 또는 *his*같은 표식을 선택하기 위해서 레트로바이러스 벡터를 사용할 필요가 있다.

조작된 섬유 아세포는 단독으로 또는 시토맥스 3 마이크로담체 비드상에 군집시키기 위해 증식시킨 속주에 주입한다. 이 후 섬유아세포는 단백질 생성물을 생산할 수 있다.

본 발명의 각종 변형 및 다양성이 상기 기술로 미루어보아 가능하며, 따라서 본 발명은 특별하게 기재된 것 이외에도 첨부된 청구항내에서 실시될 수 있다.

서 열 목 록

(1) 일반 정보 :

(i) 출원인 :

(A) 성명 : 리, 등

(ii) 발명의 명칭 : 인체 케모킨 베타-8, 케모킨 베타-1 및 대식세포 염증 단백질-4

(iii) 서열의 수 : 18

(iv) 서신 주소:

(A) 수신인 : 카엘라, 바이른, 베인, 길필란, 세치, 스투워드 및 올스테인

(B) 스트리트 : 베커 팜 로드 6

(C) 도시 : 로즈랜드

(D) 주 : 뉴저지

(E) 국가 : 미국

(F) ZIP : 07068

(v) 컴퓨터 판독 형태 :

(A) 매체 유형 : 3.5인치 디스켓

(B) 컴퓨터 : IBM PS/2

(C) 작동 체계 : MS-DOS

(D) 소프트웨어 : WordPerfect 5.1

(vi) 선행 출원 자료 :

(A) 출원 번호 :

(B) 출원 일자 :

(C) 분류 기호:

(vii) 종래 출원 데이터:

(A) 출원 번호 : 미국 08/173,209

(B) 출원 일자 : 1993년 12월 22일

(viii) 종래 출원 데이터:

(A) 출원 번호 : 미국 08/208,339

B) 출원 일자 : 1994년 3월 8일

(ix) 종래 출원 데이터:

(A) 출원 번호 : PCT/US94/07256

(B) 출원 일자 : 1994년 6월 28일

(ix) 대리인 정보 :

(A) 성명 : 페라로, 그레고리 디.

(B) 등록번호 : 36,134

(C) 참조번호 : 325800-289

(x) 통신 정보 :

(A) 전화 : 201-994-1700

(B) 팩스 : 201-994-1744

(2) 서열 번호 1 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 363 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

(C) 썬의 수 : 1본썬

(D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 1:

서열 1

```

ATGAAGGTCT CCGTGGCTGC CCTCTCCTGC CTCATGCTTG TTACTGCCCT TGGATCCCAG 60
GCCCGGTCA CAAAAGATGC AGAGACAGAG TTCATGATGT CAAAGCTTCC ATTGGAAAAT 120
CCAGTACTTC TGGACAGATT CCATGCTACT AGTGCTGACT GCTGCATCTC CTACACCCCA 180
CGAAGCATCC CGTCTTCACT CCTGGAGAGT TACTTTGAAA CGAACAGCGA GTGCTCCAAG 240
CCGGTGTCA TCTTCCTCAC CAAGAAGGGG CGACGTTTCT GTGCCAACC CAGTGATAAG 300
CAAGTTCAGG TTTGCATGAG AATGCTGAAG CTGGACACAC GGATCAAGAC CAGGAAGAAAT 360
TGA 363

```

(2) 서열 번호 2 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 120 아미노산

(B) 서열형 : 아미노산

(C) 썬의 수 :

(D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : 단백질

(xi) 서열 : 서열 번호 2:

서열 2

```

Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Lys Val Thr
  -20                               -15           -10
Ala Leu Gly Ser Gln Ala Arg Val Thr Lys Asp Ala Glu Thr Glu
  -5                               1             5
Phe Met Met Ser Lys Leu Pro Leu Glu Asn Pro Val Leu Leu Asp
 10                               15           20
Arg Phe His Ala Thr Ser Ala Asp Cys Cys Ile Ser Tyr Thr Pro
 25                               30           35
Arg Ser Ile Pro Cys Ser Leu Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Thr Asn
 40                               45           50
Ser Glu Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Lys Gly
 55                               60           65
Arg Arg Phe Cys Ala Asn Pro Ser Asp Lys Gln Val Gln Val Cys
 70                               75           80
Met Arg Met Leu Lys Leu Asp Thr Arg Ile Lys Thr Arg Lys Asn
 85                               90           95

```

(2) 서열 번호 3 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

- (A) 길이 : 282 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 썬의 수 : 1본썬
- (D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 3:

서열 3

```

ATGAAGATCT CCGTGGCTGC AATTCCTTC TTCTCTCTCA TCACCATCGC CCTAGGGACC 60
AAGACTGAAT CCTCCTCAG GGGACCTTAC CACCCCTCAG AGTGCTGCTT CACCTACACT 120
ACCTACAAGA TCCCGGTCA GCGGATTATG GATTACTATG AGACCAACAG CCAGTGCTCC 180
AAGCCCGGAA TTGTCTTCAT CACCAAAAGG GGCCATTCCG TCTGTACCAA CCCAGTGAC 240
AAGTGGGTCC AGGACTATAT CAAGGACATG AAGGAGAACT GA 282

```

(2) 서열 번호 4 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

- (A) 길이 : 93 아미노산
- (B) 서열형 : 아미노산
- (C) 썬의 수 :
- (D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : 단백질

(xi) 서열 : 서열 번호 4:

서열 4

```

Met Lys Ile Ser Val Ala Ala Ile Pro Phe Phe Leu Leu Ile Thr
-15 -10 -5
Ile Ala Leu Gly Thr Lys Thr Glu Ser Ser Ser Arg Gly Pro Tyr
1 5 10
His Pro Ser Glu Cys Cys Phe Thr Tyr Thr Thr Tyr Lys Ile Pro
15 20 25
Arg Gln Arg Ile Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys Ser
30 35 40
Lys Pro Gly Ile Val Phe Ile Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys
45 50 55
Thr Asn Pro Ser Asp Lys Trp Val Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met
60 65 70
Lys Glu Asn

```

(3) 서열 번호 5 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

- (A) 길이 : 270 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 썬의 수 : 1본썬
- (D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : cDNA

(xi) 서열 : 서열 번호 5:

서열 5

```

ATGAAGGGCC TTGCAGCTGC CCTCCTTGTC CTCGTCTGCA CCATGGCCCT CTGCTCCTGT 60
GCACAAGTTG GTACCAACAA AGAGCTCTGC TGCCTCGTCT ATACCTCCTG GCAGATTCCA 120
CAAAAGTTCA TAGTTGACTA TTCTGAAACC AGCCCCCAGT GCCCCAGCC AGGTGTCATC 180
CTCCTAACCA AGAGAGGCCG GCAGATCTGT GCTGACCCCA ATAAGAAGTG GGTCCAGAAA 240
TACATCAGCG ACCTGAAGCT GAATGCCTGA 270

```

(4) 서열 번호 6 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

- (A) 길이 : 89 아미노산
- (B) 서열형 : 아미노산
- (C) 썬의 수 :
- (D) 형태 : 직썬상

(ii) 분자 형태 : 단백질

(xi) 서열 : 서열 번호 6:

서열 6

```

Met Lys Gly Leu Ala Ala Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Thr Met
-20 -15 -10
Ala Leu Cys Ser Cys Ala Gln Val Gly Thr Asn Lys Glu Leu Cys
-5 1 5 10
Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe Ile Val
15 20 25
Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln Cys Pro Lys Pro Gly Val Ile
30 35 40
Leu Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys
45 50 55
Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Asp Leu Lys Leu Asn Ala
60 65

```

(2) 서열 번호 7 에 대한 정보 :

- (i) 서열 특성 :
- (A) 길이 : 26 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 쌍의 수 : 1본쇄
- (D) 형태 : 직쇄상
- (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
- (xi) 서열 : 서열 번호 7:

서열 7**TCAGGATCCG TCACAAAAGA TGCAGA****26**

- (2) 서열 번호 8 에 대한 정보 :
- (i) 서열 특성 :
- (A) 길이 : 26 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 쌍의 수 : 1본쇄
- (D) 형태 : 직쇄상
- (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
- (xi) 서열 : 서열 번호 8:

서열 8**CGCTCTAGAG TAAAACGACG GCCAGT****26**

- (2) 서열 번호 9 에 대한 정보 :
- (i) 서열 특성 :
- (A) 길이 : 27 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 쌍의 수 : 1본쇄
- (D) 형태 : 직쇄상
- (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
- (xi) 서열 : 서열 번호 9:

서열 9**TCAGGATCCT GTGCACAAGT TGGTACC****27**

- (2) 서열 번호 10 에 대한 정보 :
- (i) 서열 특성 :
- (A) 길이 : 26 염기쌍
- (B) 서열형 : 핵산
- (C) 쌍의 수 : 1본쇄
- (D) 형태 : 직쇄상
- (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
- (xi) 서열 : 서열 번호 10:

서열 10**CGCTCTAGAG TAAAACGACG GCCAGT****26**

(2) 서열 번호 11 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 30 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쌍의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드

(xi) 서열 : 서열 번호 11:

서열 11**GCCCCGGGAT CCTCCTCACG GGGACCTTAC****30**

(2) 서열 번호 12 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 32 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쌍의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드

(xi) 서열 : 서열 번호 12:

서열 12**GCCTGCTCTA GATCAAAGCA GGGAGCTCC AG****32**

(2) 서열 번호 13 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 27 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쌍의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드

(xi) 서열 : 서열 번호 13:

서열 13**GGAAAGCTTA TGAAGGTCTC CGTGGCT****27**

(2) 서열 번호 14 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 59 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

- (C) 쌍의 수 : 1본쇄
 (D) 형태 : 직쇄상
 (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
 (xi) 서열 : 서열 번호 14:

서열 14

CGCTCTAGAT CAAGCGTAGT CTGGGACGTC GTATGGGTAA TTCTTCCTGG TCTTGATCC 59

- (2) 서열 번호 15 에 대한 정보 :
 (i) 서열 특성 :
 (A) 길이 : 30 염기쌍
 (B) 서열형 : 핵산
 (C) 쌍의 수 : 1본쇄
 (D) 형태 : 직쇄상
 (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
 (xi) 서열 : 서열 번호 15:

서열 15

GGAAAGCCTTA TGAAGGGCCT TGCAGCTGCC

30

- (2) 서열 번호 16 에 대한 정보 :
 (i) 서열 특성 :
 (A) 길이 : 57 염기쌍
 (B) 서열형 : 핵산
 (C) 쌍의 수 : 1본쇄
 (D) 형태 : 직쇄상
 (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
 (xi) 서열 : 서열 번호 16:

서열 16

CGCTCTAGAT CAABCCTAGT CTGGGACGTC GTATGGGTAG GCATTCAGCT TCAGGTC 57

- (2) 서열 번호 17 에 대한 정보 :
 (i) 서열 특성 :
 (A) 길이 : 28 염기쌍
 (B) 서열형 : 핵산
 (C) 쌍의 수 : 1본쇄
 (D) 형태 : 직쇄상
 (ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드
 (xi) 서열 : 서열 번호 17:

서열 17

GGAAAGCCTTA TGAAGATTCC GTGGCTGC

28

(2) 서열 번호 18 에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 58 염기쌍

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쇠의 수 : 1본쇄

(D) 형태 : 직쇄상

(ii) 분자 형태 : 올리고뉴클레오티드

(xi) 서열 : 서열 번호 18:

서열 18

CGCTCTAGAT CAAGCGTAGT CTGGGACGTC GTATGGGTAG TTCTCCTTCA TGTCCTTG 58

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 (a) 내지 (d)로 구성된 군에서 선택된 성분을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드:

(a) 서열 번호 2의 아미노산 -21 내지 아미노산 99를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드;

(b) 서열 번호 2의 아미노산 1 내지 아미노산 99를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드;

(c) (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드와 하이브리드할 수 있고, 70% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드;

(d) (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드 단편.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 DNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 RNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 서열 번호 2의 아미노산 -21 내지 99를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 서열 번호 2의 아미노산 1 내지 99를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

하기 (a) 내지 (c)로 구성된 군에서 선택된 성분을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드:

(a) ATCC 기탁 번호 75676에 포함된 DNA에 의해 발현되는 아미노산을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드;

(b) (a)의 폴리뉴클레오티드와 하이브리드할 수 있고 70% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드;

(c) (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드 단편.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 서열 1의 뉴클레오티드 1 내지 뉴클레오티드 363 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제 2 항에서 정의한 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 10

제 9 항에서 정의한 벡터를 사용하여 유전자 조작한 숙주 세포.

청구항 11

제 10 항의 숙주 세포로부터 상기 DNA에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 발현시키는 것을 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 방법.

청구항 12

제 9 항의 벡터로 유전자 조작한 세포를 포함하는 폴리펩티드를 발현할 수 있는 세포를 생성하는 방법.

청구항 13

(i) 서열 2에서 유래된 아미노산 서열 및 단편, 유사체 및 이의 유도체를 갖는 폴리펩티드; 및 (ii) ATCC 기탁 번호 75676의 cDNA에 의해 암호화되는 폴리펩티드 및 단편, 유사체 및 상기 폴리펩티드의 유도체로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 폴리펩티드가 서열 번호 2에서 유래된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드.

청구항 15

제 13 항에서 정의한 폴리펩티드에 대한 작용 물질.

청구항 16

제 13 항에서 정의한 폴리펩티드에 대한 길항 물질.

청구항 17

제 13 항에서 정의한 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하여 Ck β-8가 필요한 환자를 치료하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 치료학적 유효량이 폴리펩티드를 암호화하고 생체내에서 이를 발현하는 DNA를 환자에게 제공함으로써 투여되는 방법.

청구항 19

제 16 항의 길항물질의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하여 Ck β-8 폴리펩티드의 억제가 필요한 환자를 치료하는 방법.

청구항 20

폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열에 변이를 결정하는 것을 포함하여 제 13 항의 폴리펩티드의 발현하에서 관련된 질병 또는 질병에 대한 감수성을 진단하는 방법.

청구항 21

숙주 세포로부터 유래된 시료내에 제 13 항의 폴리펩티드의 존재를 분석하는 것을 포함하는 진단 방법.

청구항 22

다공성 필터에 의해 폴리펩티드로부터 분리되는 세포, 스크린되는 화합물 및 상기 폴리펩티드의 조합; 및 화합물이 효과적인 길항 물질 또는 작용 물질인지의 여부를 결정하기 위한 세포의 이동 범위 결정을 포함하여, 제 13 항의 폴리펩티드에 대한 길항 물질 및 작용 물질을 동정하는 방법.

도면

ATGAAGGTCCTCCGCTGGCCTGCCCTCTCCCTGCCCTCATGCTTGTACTGCCCCTTGGATPCCAG 60
M K V S V A A L S C L M L V T A L G S Q

GCCCCGGTCAAAAGATGCGAGACAGAGTCCATGATGTCAAGCTTCCATTGGAAAT 120
A R V T K D A E T E F M M S K L P L E N

CCAGTACTTCTGGACAGATTCCTCAATGCTACTAGTCTGACTGCTGCATCTCTTACACCCCA 180
P V L L D R F H A T S A D C C I S Y T T

CGAAGCATCCCGTGTTCACCTCTGGAGAGTTACTTTGAAAACGAACAGGAGTGCCTCCAAG 240
R S I P C S L L E S Y F E T N S E C S K

CCGGGTGTCATCTTCCCTACCAAGAAGGGGCGACGTTTCTGTGCCAACCCCAAGTGAATAAG 300
P G V I F L T K K G R R F C A N P S D K

CAAGTTCAGGTTTGCATGAGATGCTGAAGCTGGACACACCGGATCAAGACCAAGGAAGAAT 360
Q V Q V C M R M L K L D T R I K T R K N

TGA 363
*

581

ATGAAGATCTCCGGTGGCTGCATTCCTTCTTCTCCTGCATCACCATCGCCCTAGGACC
M K I S V A A I P F F L L I T I A L G T

AAGACTGAATCCTCCTCAGCGGACCTTACCACCCCTCAGAGTGCCTTCCACCTACACT
 K T E S S S R G P Y H P S E C C F T Y T

ACCTACAGATCCCGCGTCCAGCCGATTTATGATTTACTATAGACCAACAGCCAGTGCCTCC
 T Y K I P R Q R I M D Y Y E T N S Q C S

AAGCCCGAATGTCTTCAATCACCMAAAGGGCCATTCGGTCTGTACCAACCCCAAGTGAC
 K P G I V F I T K R G H S V C T N P S D

AAGTGGTCCAGACTATATCAAGACATGAGAGAACTGA
 K M V Q D Y I K D M K E N *

도면2

5B3

```

1  A N G A A G G G C C T T G C A G C T G C C C T C C T T G T C C C T G C T G C A C C A T G G C C C T C T G C C T C C T G T   60
M  K  G  L  A  A  A  L  L  V  L  V  C  T  M  A  L  C  S  C

61  G C A C A G T T G T G A C C A C A A A G A G C T C T G C C T C C G T C T A T A C C T C C T G G C A G A T T C C A   120
A  Q  V  G  T  N  K  E  L  C  C  L  V  Y  T  S  W  Q  I  P

121  C A A A G T T C A T A G T T G A C T A T T C T G A A A C C A G C C C C C A G T G C C C C A G C C A G C C A G T G G T C A T C   180
Q  K  F  I  V  D  Y  S  E  T  S  P  Q  C  P  K  P  G  V  I

181  C T C C T A A C C A A G A G A G G C C G G C A G A T C T G T G C T G A C C C C A A T A A G A A G T G G G T C C A G A A A   240
L  L  T  K  R  G  R  Q  I  C  A  D  P  N  K  K  W  V  Q  K

241  T A C A T C A G C G A C C T G A A G C T G A A T G C C T G A   270
Y  I  S  D  L  K  L  N  A  *

```


1 MKGLAAALVIVCTMALC...SCAQVGTNKELCCIVYTSWQIPQKFIVD 46

1 MÖVSTAALAVLLCTMALCNÖVLSAPLAADTPFACCFSYTSRQIPÖNFIAD 50

47 YSETSPQCPKPGVILLTKRGRQICADPNKKWVQKYISDLKINA 89

51 YFETSSQCSKPSVIFLTKRGRQVCADPSEEWQKYVSDLEISA 93

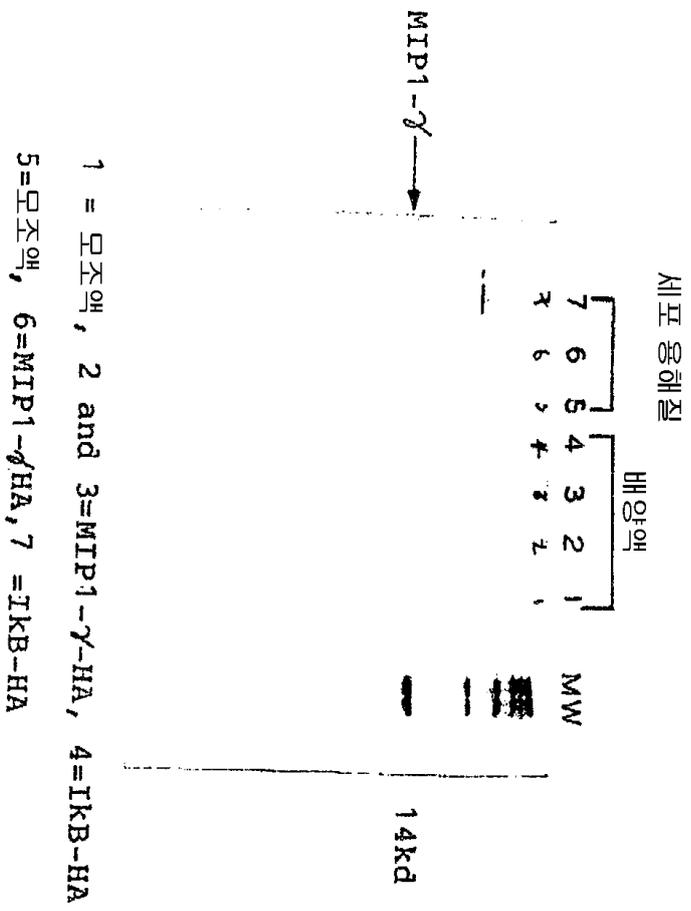
5B5

도면6

CKB-1 MKISVAAI PPFLLITLITLALGKTJESSRRGPIHPSECCFTYTYTKIPQRIM 50
 |.:|.||:|.||.||:|.||... |.|| :|.|||.||. .||.. |
 MIP-1a MQVSTALAL.VLICTMALCNOF.SASLADPTACCFSYTSRQIPONFIA 48

CKB-1 DYETNSQCSKPGIVEFTYTRKRGHVCCTNPSDKWQDYIKDMKEN 94
 ||:|.|||.|||.||:|.||:|.||:|.|||.||. |.:|. |:
 MIP-1a DYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWQKYVSDLESA 93

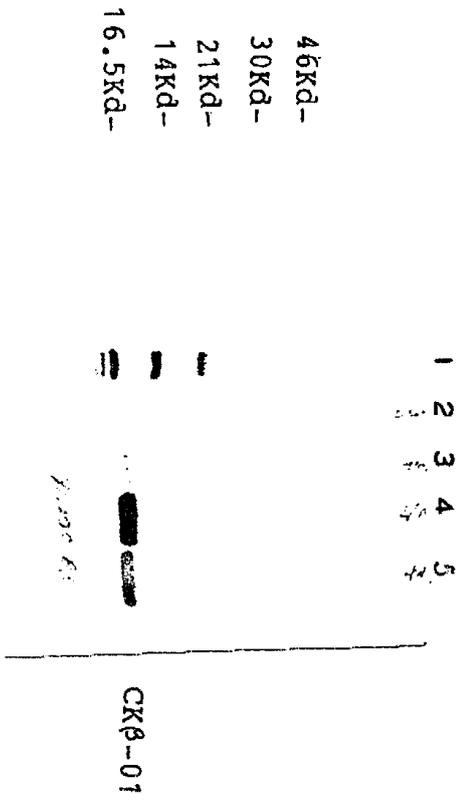
Cos 세포에서의 HA-태그된 MIP1- γ 의 발현



도면7

바쿠로비루스 발현 시스템에서 CKβ-1 의 발현 및 정제

CKβ-1 의 정제

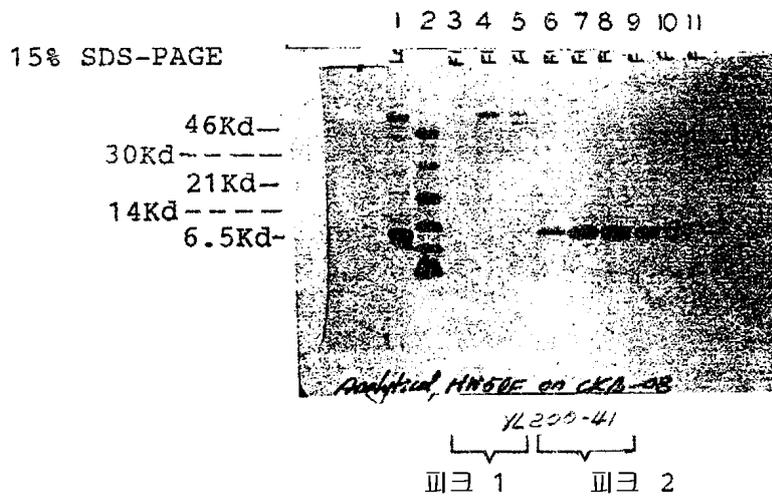
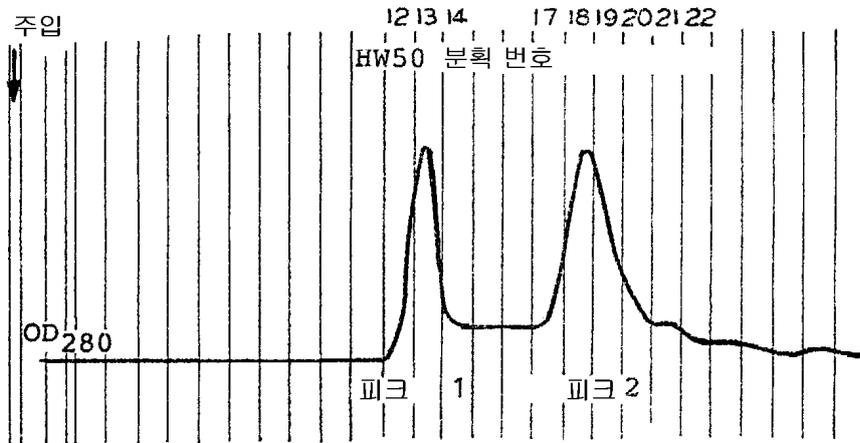


레인 #	시료
1	저 MV 표식
2	CKβ-1 바쿠로비루스 상등액
3	헤파린 칼럼으로 정제된 CKβ-1
4	S/M 칼럼으로 정제된 CKβ-1
5	HW50 으로 정제된 CKβ-1

도면8

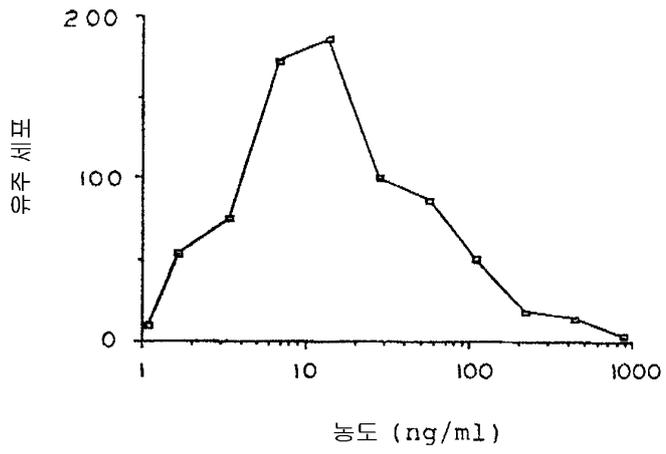
도면9

크기 배제 크로마토그래픽에 의한 CKβ-8 (HG301-4B) 정제

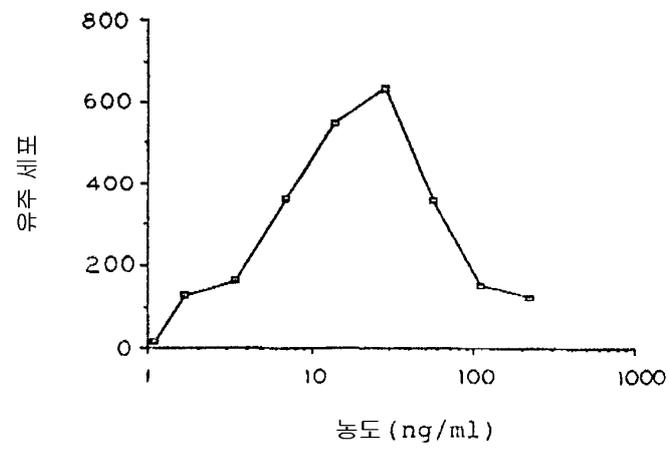


레인 #	시료	
1	HW50 적재	
2	저 MW 표식	12
3	HW50 분획	13
4		14
5		15
6		16
7		17
8		18
9		19
10		21
11		22

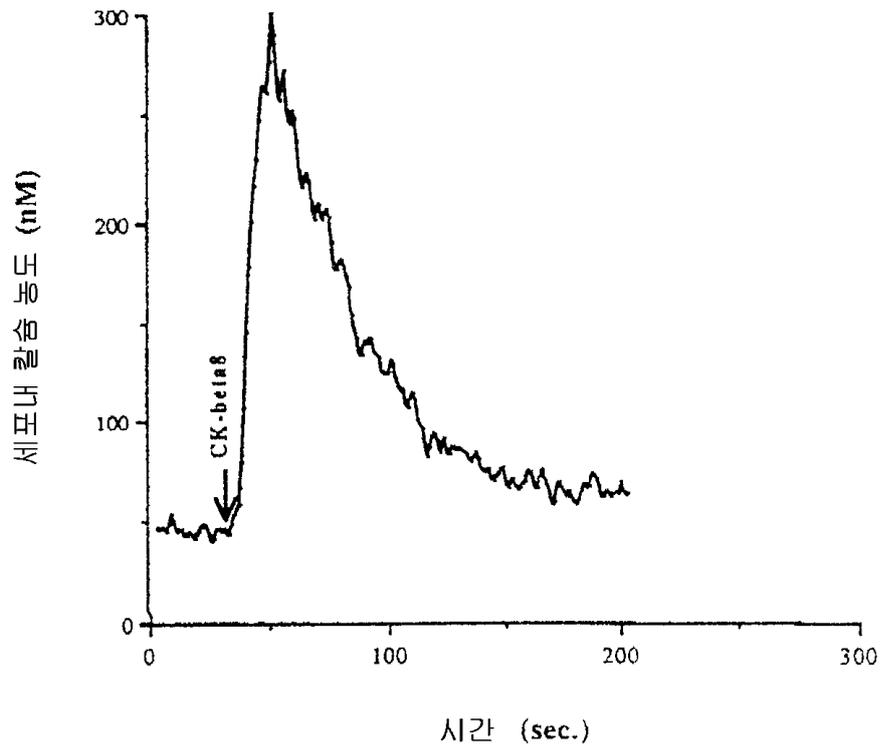
도면 10A



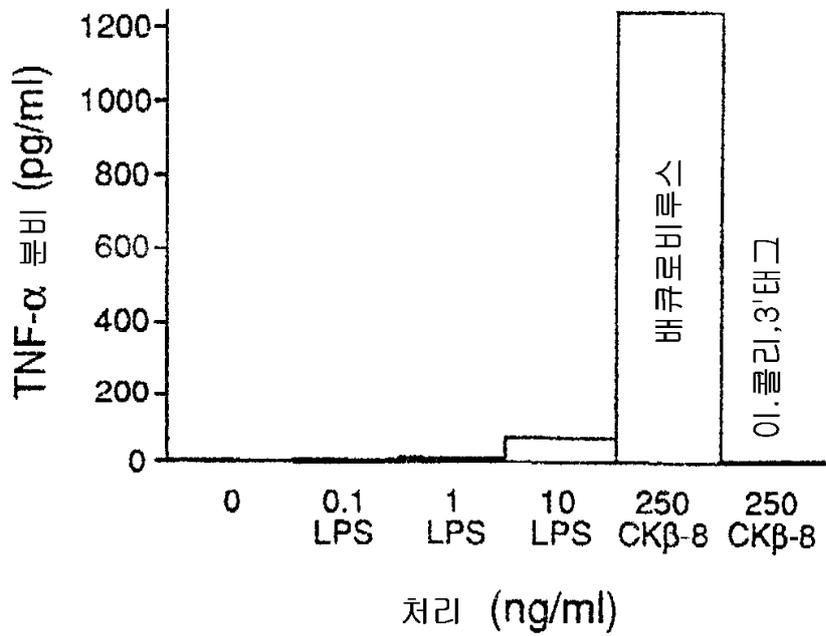
도면 10B



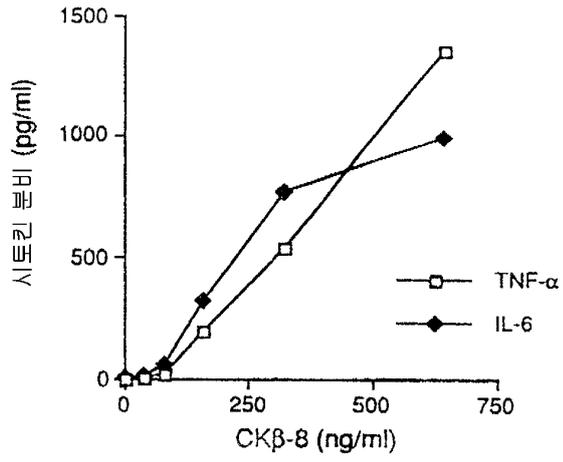
도면11



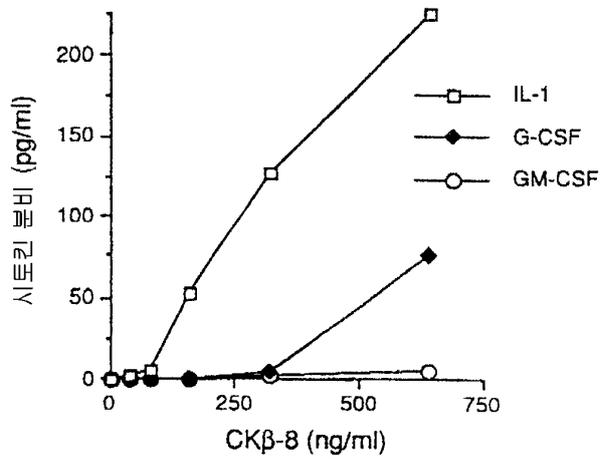
도면12



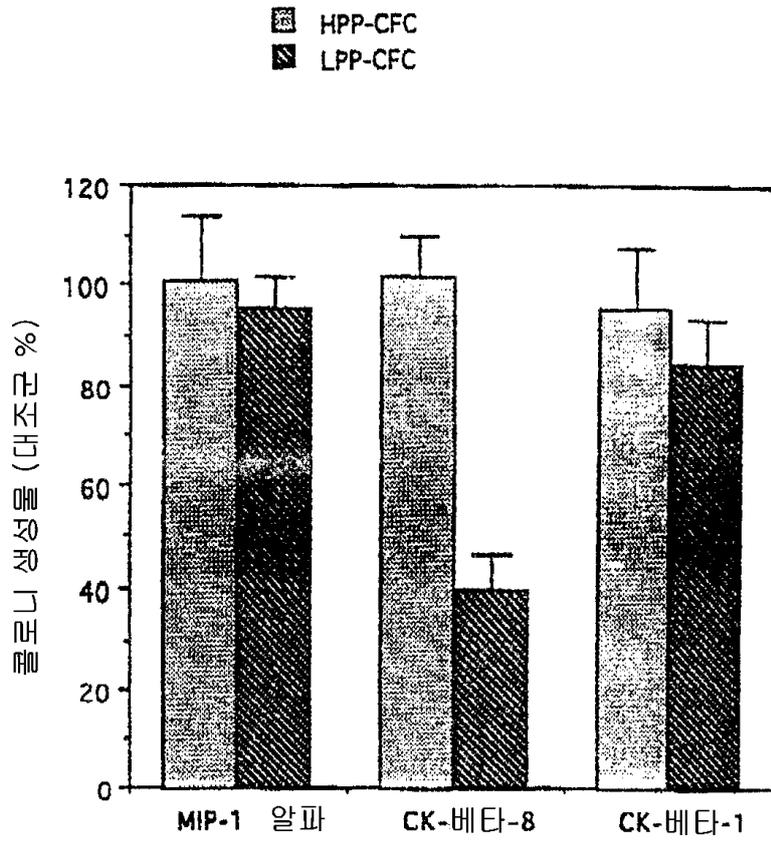
도면 13A



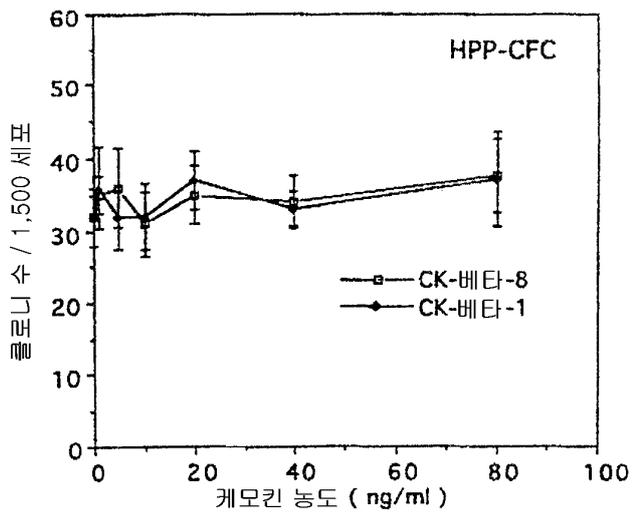
도면 13B



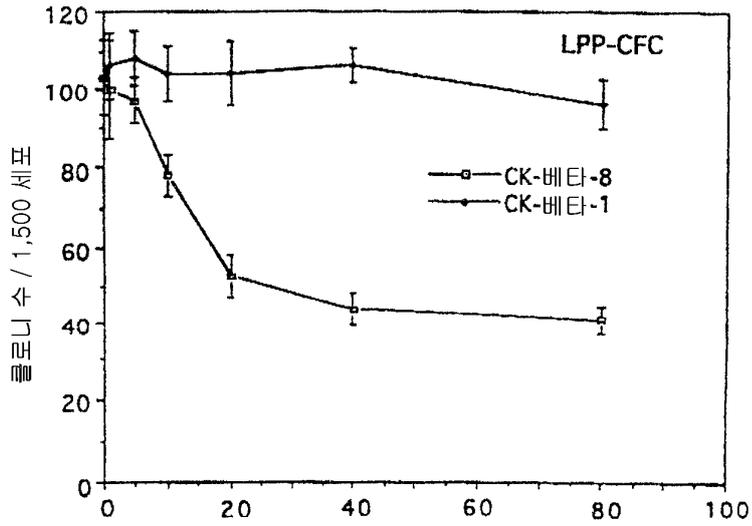
도면 14



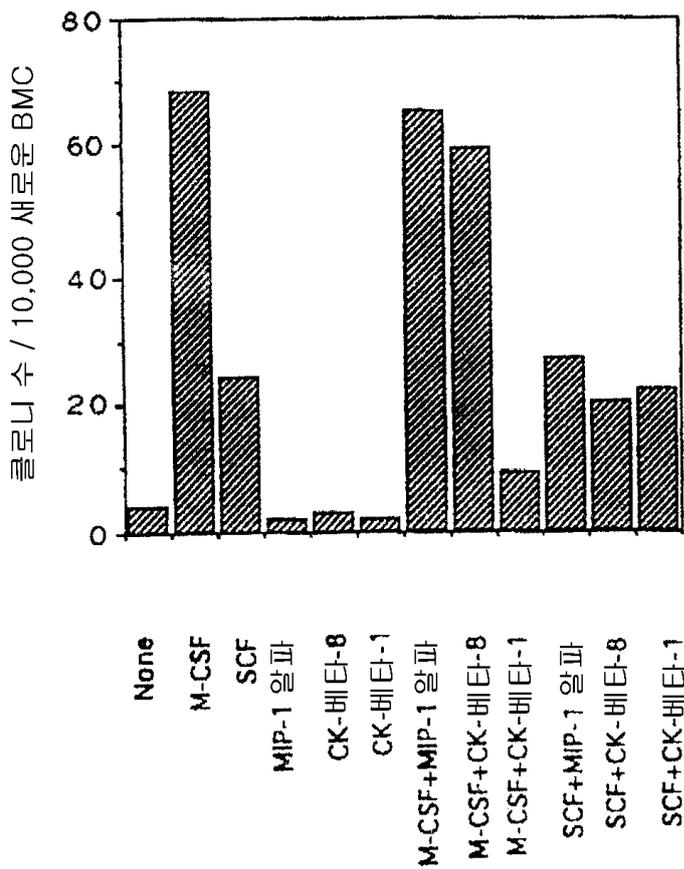
도면 15A



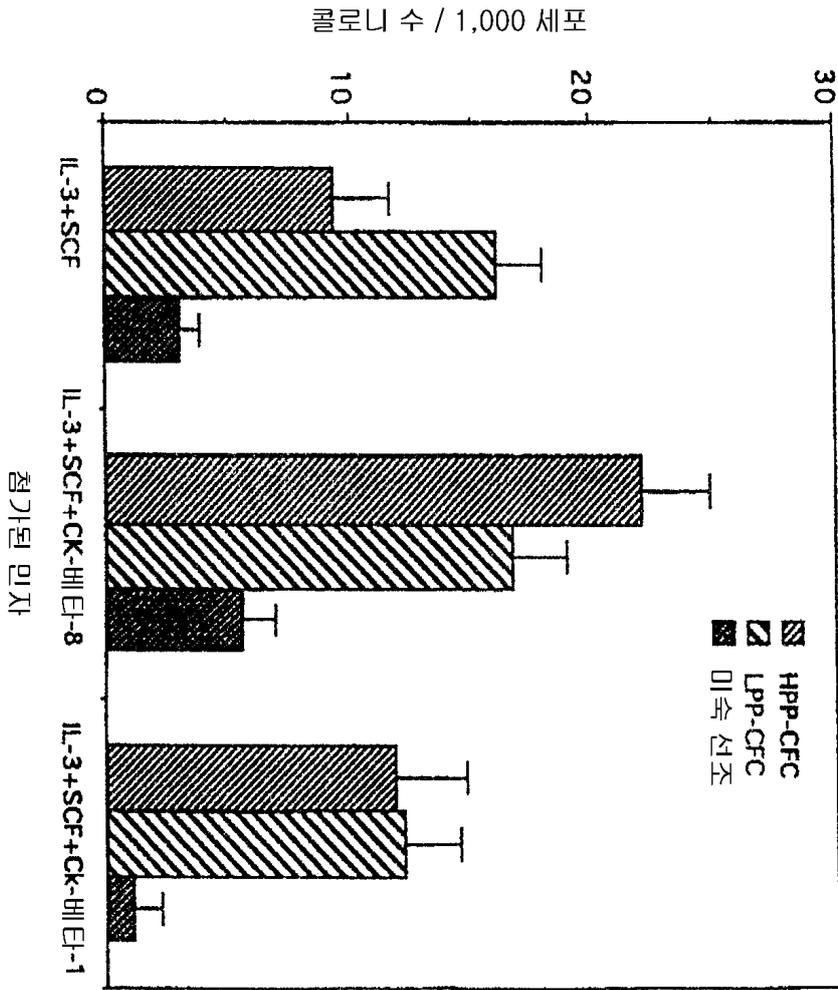
도면 15B



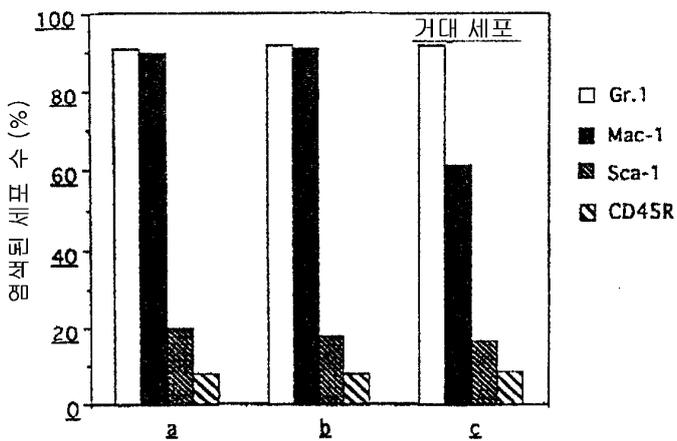
도면 16



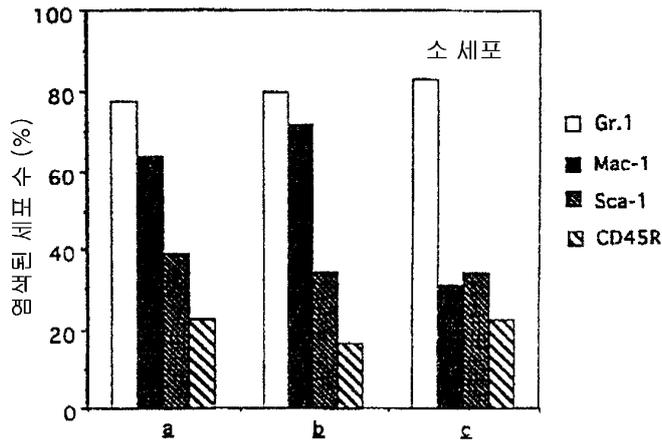
도면17



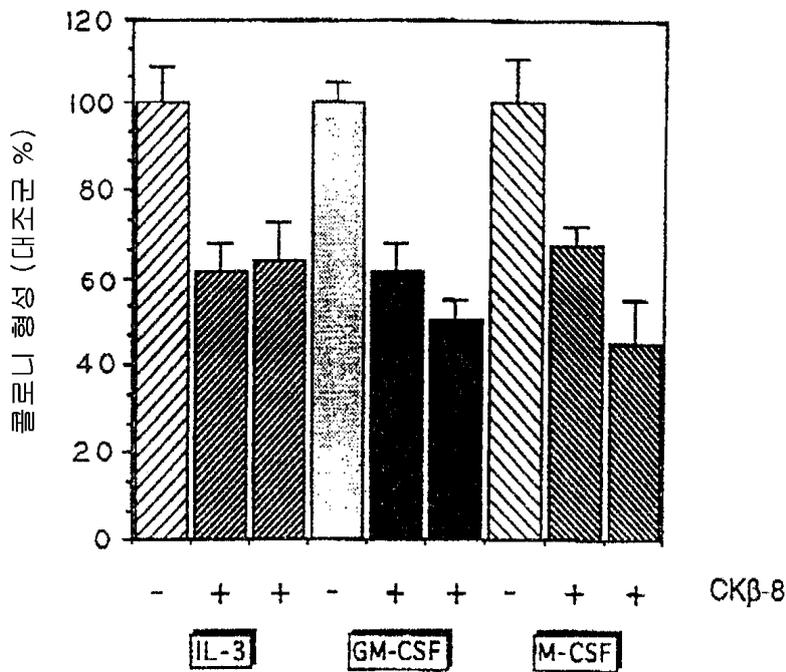
도면18A



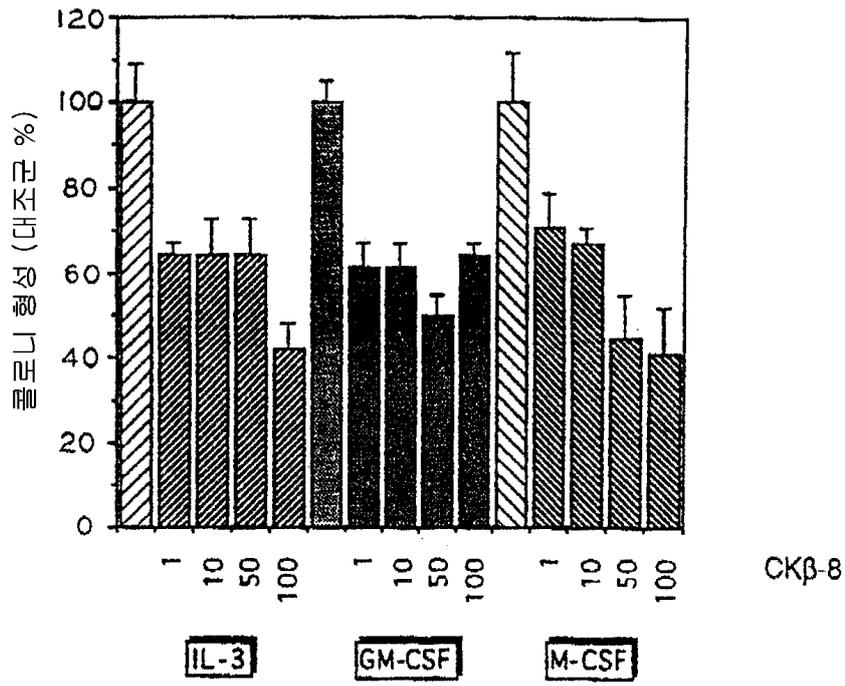
도면 18B



도면 19



도면20



도면21

