(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 38/17

(11) 공개번호 특2001-0085816
(43) 공개일자 2001년09월07일

(21) 출원번호 10-2001-7003430
(22) 출원일자 2001년03월16일
번역문 제출일자 2001년03월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/21547
(86) 국제출원출원일자 1999년09월15일
(87) 국제공개번호 WO 2000/15797
(87) 국제공개일자 2000년03월23일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 남아프리카, 그레나다, 가나, 인도네시아, 크로아티아, 인도, 유고슬라비아, 짐바브웨, 감비아, 시에라리온, 코스타리카, 도미니카연방,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 60/100,858 1998년09월17일 미국(US)
PCT/US98/19437 1998년09월17일 미국(US)

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

(72) 발명자 퐁,쉐르만
미국94502캘리포니아주알라메다베이신사이드웨이19
고다드,오드리
미국94131캘리포니아주샌프란시스코콩고스트리트110
거니,오스틴,엘.
미국94002캘리포니아주벨몬트데비레인1
투마스,다니엘
미국94563캘리포니아주오린다래애비뉴3
우드,윌리엄,아이.
미국94010캘리포니아주힐스보로우사우쓰다운코트35

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 있음

(54) 면역 관련 질환 치료용 조성물 및 치료 방법

요약

본 발명은 신규한 단백질을 함유하는 조성물 및 면역 관련 질병의 진단 및 치료 방법에 관한 것이다.

대표도
도 1a

색인어
면역 관련 질병, 신규 단백질, T 림프구.

명세서

기술분야

본 발명은 면역관련 질환의 진단 및 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

면역 관련성 질환 및 염증성 질환은 보통의 생리 상태에서는 손상 또는 상해에 대한 반응, 손상 또는 상해로부터의 복구 개시 및 외부 유기체에 대항하는 타고난 또는 습득된 방어의 개시에 중요한, 상당히 복잡하고 종종 복수 상호연관적인 생물학적 경로들의 만연이나 결과이다. 이들 보통의 생리적 경로들이 반응의 강도에 직접적으로 연관되거나 또는 자기에 대한 반응으로 또는 이들의 조합에 의해 비정상적 조절 또는 과도한 자극의 결과로서 부가적인 손상 또는 상해를 야기하는 경우 질환 또는 병리 상태가 발생한다.

이들 질환의 발생은 종종 다단계 경로 및 종종 다수 상이한 생물학적 시스템/경로를 수반하지만, 이들 경로의 하나 이상에서 필수적인 지점에 개입함으로써 보상적 또는 치료적 효과를 가져올 수 있다. 치료적 개입은 유해한 프로세스/경로의 길항적 작용 또는 유익한 프로세스/경로의 자극적 작용에 의해 이루어질 수 있다.

많은 면역 관련 질환이 알려져 있고 심도있게 연구되어 왔다. 그러한 질환으로는 면역 매개 염증성 질환, 비면역 매개 염증성 질환, 감염성 질환, 면역결핍성 질환, 종양 등이 있다.

T 임파구(T 세포)는 포유류 면역 반응의 중요한 성분이다. T 세포는 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex)내 유전자에 의해 코딩되는 자기 분자와 결합되어 있는 항원을 인식한다. 이 항원은 항원 표시 세포, 바이러스 감염 세포, 암세포, 이식체 등의 표면 상의 MHC 분자들과 함께 표시될 수 있다. T 세포계는 숙주 포유류에 건강상 위협을 주는 이들 변형된 세포들을 제거한다. T 세포들은 헬퍼 T 세포 및 세포독성 T 세포를 포함한다. 헬퍼 T 세포는 항원 표시 세포 상의 항원-MHC 복합체를 인식 한 후 광범위하게 증식한다. 헬퍼 T 세포는 또한 B 세포, 세포독성 T 세포 및 면역 반응에 참여하는 다양한 다른 세포들을 활성시키는데 중요한 역할을 하는 다양한 사이토카인, 즉 림포카인을 분비한다.

체액성 및 세포 매개성 면역 반응의 핵심적인 사건은 헬퍼 T 세포의 활성화 및 클론 증식(clonal expansion)이다. 헬퍼 T 세포 활성화는 T-세포 수용체(TCR)-CD3 복합체와 항원 표시 세포 표면상의 항원-MHC와의 상호작용에 의해 개시된다. 그 상호작용은 휴지기의 헬퍼 T 세포가 세포 사이클(G0에서 G1으로의 전이)로 들어가도록 유도하는 생화학적 사건의 케스케이드를 매개하고 그 결과 IL-2 및 때때로 IL-4에 대하여 고친화도를 갖는 수용체의 발현을 가져온다. 활성화된 T 세포는 사이클을 통하여 진행하여 증식하고, 메모리 세포 또는 작용 세포(effector cell)로 분화한다.

TCR을 통해 매개되는 신호 이외에, T 세포의 활성화는 항원 표시 세포에 의해 분비되는 사이토카인에 의해 유도되는 추가적인 공동자극 또는 항원 표시 세포 및 T 세포의 막 결합 분자와의 상호작용을 통하여 유도되는 공동자극을 수반한다. 사이토카인 IL-1 및 IL-6은 공동자극적 신호를 제공하는 것으로 밝혀져 있다. 또한, 항원 표시 세포의 표면상에 발현되는 B7 분자 및 T 세포 표면상에 발현되는 CD28 및 CTLA-4와의 상호작용은 T 세포 활성화를 가져온다. 활성화된 T 세포는 증가된 수의 ICAM-1, 인테그린, VLA-4, LFA-1, CD56 등과 같은 세포 부착 분자를 발현한다.

혼합 림프구 배양 또는 혼합 림프구 반응(MLR) 에서의 T 세포 증식은 면역계를 자극하는 화합물의 능력을 표시하는 확립된 표시방법이다. 많은 면역 반응에서, 염증성 세포가 손상 또는 감염 부위에 침투한다. 그 이동하는 세포는 호중구, 호산구, 단핵구 또는 림프구일 수 있다. 손상된 조직의 조직 검사는 면역 자극 또는 억제 반응의 증거를 제공한다 [Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.].

면역 관련 질환은 면역 반응을 억제함으로써 치료될 수 있다. 면역 자극적 활성을 갖는 분자들을 억제하는 중성화 항체를 이용하는 것이 면역 매개성 및 염증성 질환의 치료에 유익할 수 있다. 면역 반응을 억제하는 분자들을 이용하여(단백질을 직접 이용하거나 또는 항체 작용제의 이용을 통하여) 면역 반응을 억제하고 따라서 면역 관련 질환을 치료할 수 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 인간을 포함하는 포유류에서 면역 관련 질환의 진단 및 치료를 위한 조성물 및 방법에 관계된다. 본 발명은 포유류 내에서 면역 반응을 자극하거나 또는 억제하는 단백질(작용제 항체 및 길항적 항체 포함)의 동정에 기초한다. 면역 관련 질환은 면역 반응을 억제하거나 또는 향상시킴으로써 치료될 수 있다. 면역 반응을 향상시키는 분자들은 항원에 대한 면역 반응을 자극하거나 강력하게 한다. 면역 반응을 자극하는 분자들은 면역 반응의 향상이 유익할 수 있는 경우 치료적으로 사용될 수 있다. 이러한 자극성 분자들은 면역반응의 억제가 중요할 경우에는 또한 억제될 수도 있다. 중성화 항체가 면역 자극성 활성을 갖는 분자들을 억제하는 분자의 예이고, 이는 면역 관련 및 염증성 질환의 치료에 유

익할 것이다. 면역반응을 억제하고 따라서 면역 관련 질환을 치료하는 면역반응을 억제하는 분자들(직접적으로 또는 항체 작용제의 이용을 통하여)을 또한 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 유전자에 의해 코딩되는 본 발명의 단백질들은 면역 관련 질환의 진단 및(또는) 치료(예방을 포함)에 유용하다. 자극성 단백질에 결합하는 항체는 면역계 및 면역 반응의 억제에 유용하다. 억제성 단백질에 결합하는 항체는 면역계 및 면역반응의 촉진에 유용하다. 본 발명의 단백질 및 항체는 면역관련 및 염증성 질환의 치료용 의약 제조에 또한 유용하다.

하나의 실시양태에서, 본 발명은 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체에 관한 것이다. 한 면에서, 상기 항체는 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 활성을 모방하거나(작용제 항체) 또는 역으로 상기 항체는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 활성을 억제하거나 중화시킨다(길항제 항체). 다른 측면에서, 상기 항체는 바람직하게는 비인간 상보성 결정 부위(CDR) 잔기 및 인간 프레임워크 부위(FR) 잔기를 갖는 모노클론성 항체이다. 상기 항체는 표지될 수 있고, 고체 지지체상에 고정될 수 있다. 추가적 측면에서, 상기 항체는 항체 단편, 단쇄 항체 또는 항-이디오타입 항체이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드 또는 이들 폴리펩티드에 결합하는 작용제 또는 길항제 항체를 담체 또는 부형제와의 혼합으로 함유하는 조성물에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 상기 조성물은 치료적으로 유효한 양의 상기 펩티드 또는 항체를 함유한다. 또다른 측면에서, 상기 조성물이 면역자극분자를 함유할 때, 그 조성물은 (a) 이를 필요로하는 포유류 조직내로 염증성 세포의 침투를 증가시키거나, (b) 이를 필요로하는 포유류에서 면역반응을 자극 또는 향상시키거나, (c) 항원에 반응하여 이를 필요로하는 포유류내 T-임파구의 증식을 증가시키는데 유용하다. 추가적 측면에서, 상기 조성물이 면역억제분자를 함유할 때는, 그 조성물은 (a) 이를 필요로하는 포유류 조직내로 염증성 세포의 침투를 감소시키거나, (b) 이를 필요로하는 포유류에서 면역반응을 억제 또는 감소시키거나, (c) 항원에 반응하여 이를 필요로하는 포유류내 T-임파구의 증식을 감소시키는데 유용하다. 또다른 측면에서, 본 조성물은 예를 들어 추가 항체 또는 세포독성 또는 화학요법제일 수 있는 추가적 활성 성분을 함유한다. 바람직하게는 이 조성물이 멸균된다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 기술한 용도를 갖는 의약 또는 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 폴리펩티드 및 항체의 용도에 관한 것이다.

추가적 실시양태에서, 본 발명은 항-PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체를 코딩하는 핵산, 및 그러한 핵산을 포함하는 벡터 및 재조합 숙주 세포에 관한 것이다. 또다른 추가적 실시양태에서, 본 발명은 핵산을 발현시키는 조건 하에서 항체를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 세포 배양물로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는 상기 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 하나 이상의 활성 또는 기능을 억제하는 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 길항제 및 작용제에 관한 것이다.

추가적 실시양태에서, 본 발명은 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 보체에 혼성화하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 핵산은 바람직하게는 DNA이고, 혼성화는 바람직하게는 엄격한 조건에서 일어난다. 그러한 핵산 분자들은 본문에서 동정된 증폭된 유전자의 안티센스 분자로서 작용할 수 있고, 이는 각 증폭된 유전자의 조절 또는 증폭 반응에서 안티센스 프라이머로서 이용될 수 있다. 또한, 그러한 서열은 리보자임 및(또는) 3중 나선 서열(triple helix sequence)의 일부로서 사용될 수 있고, 따라서 증

폭된 유전자의 조절에 사용될 수 있다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 세포를 항-PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체에 노출시키고, 상기 항체가 상기 세포에 결합하는지를 측정하는 것을 포함하는 PRO245, PRO217,PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 시료에서 및 (b) 동일한 세포유형의 공지된 보통 조직 세포인 대조군 시료에서, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 발현양을 검출하는 것을 포함하고, 이 때 시험 시료에서의 더 높은 발현양이 시험 조직 세포가 얻어진 그 포유류에서 면역관련 질환의 존재를 나타내는 것인, 포유동물내 면역관련 질환의 진단 방법에 관한 것이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체를 포유류로부터 얻은 조직 세포의 시험 시료와 접촉시키고, (b) 상기 항체와 시험 시료내 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드와의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하는 포유동물내 면역관련 질환의 진단방법에 관한 것이다. 상기 검출은 정량적 또는 정성적일 수 있고, 동일한 세포유형의 공지된 보통 조직 세포인 대조군 시료에서의 복합체 형성을 측정하여 비교함으로써 수행될 수 있다. 시험 시료에서 더 많은 복합체가 형성되었음은 그 시험 조직 세포가 얻어진 포유동물내에 암의 존재를 의미한다. 상기 항체는 바람직하게는 검출가능한 표지를 가진다. 복합체 형성은 예를 들어, 광학 현미경, 플로우 세포계수기, 형광계 등의 당업계에 공지인 기술에 의해 검출될 수 있다. 시험 시료는 일반적으로 면역계의 부족 또는 비정상성이 의심되는 개체로부터 얻는다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체 및 담체(예를 들어, 완충액)을 적당한 포장속에 포함하는 진단 키트에 관한 것이다. 이 키트는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 검출하기 위하여 항체를 사용하는 방법에 관한 지시서를 포함한다.

추가적 실시양태에서 본 발명은, 용기, 용기상의 표지 및 상기 용기내에 포함된 활성 물질을 함유하는 조성물을 포함하는 제품에 관한 것이다. 상기 조성물은 포유동물내 면역 반응을 자극 또는 억제시키는데 효과적이고, 상기 용기상의 표지는 상기 조성물이 면역관련 질환의 치료에 사용될 수 있음을 나타내고, 상기 조성물 내 활성 물질은 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 자극 또는 억제하는 물질이다. 바람직한 양태에서는, 상기 활성 물질이 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드이거나 또는 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체이다.

추가적인 실시양태은, 후보 화합물을 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드와 이들 두 성분들이 상호작용하기에 충분한 조건 및 시간 동안 접촉시킴으로써 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 억제할 수 있는 화합물을 동정하는 방법에 관한 것이다. 특별한 측면에서, 후보 화합물과 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드 중 하나는 고체 지지체상에 고정된다. 또다른 측면에서, 비고정된 성분은 검출가능한 표지를 갖는다.

도면의 간단한 설명

도 1a-d 및 표4는 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램을 이용하여 아미노산 서열 상동성%(도 1a-b) 및 핵산서열 상동성%(도 1c-d)를 결정하는데 하기 방법을 이용하기 위한 가설적 예시화를 보여준다. 여기서, "PRO"는 본 발명의 대상인 가설적 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내고, "비교 단백질"은 대상 폴리펩티드 "PRO"에 대하여 비교될 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내며, "PRO-DNA"는 가설적 "PRO"를 코딩하는 대상 핵산 서열을 나타내고, "비교 DNA"는 대상 핵산 분자 "PRO-DNA" 핵산 분자에 대하여 비교될 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 나타내며, "X", "Y", 및 "Z"는 각각 상이한 가설적 아미노산 잔기를 나타내고, "N", "L" 및 "V"는 각각 상이한 가설적 뉴클레오티드를 나타낸다.

도 2a-p 및 표5는 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램용 완전 소스 코드를 제공한다. 이 소스 코드는 일상적으로 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램을 제공하기 위하여, 유닉스 작동시스템상에서의 사용을 위하여 컴파일된다.

도 3은 PRO245(UNQ219) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 1)은 본문에서 "DNA35638"이라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 4 및 표 6은 도 3의 코딩 서열에서 유래된 PRO245 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 2)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 5는 PRO217(UNQ191) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 3)은 본문에서 "DNA33094"라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 6 및 표 7은 도 5의 코딩 서열에서 유래된 PRO217 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 4)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 7는 PRO301(UNQ264) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 5)은 본문에서 "DNA40628"라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 8 및 표 8은 도 7의 코딩 서열에서 유래된 PRO301 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 6)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 9는 PRO266(UNQ233) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 7)은 본문에서 "DNA37150"라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 10 및 표 9은 도 9의 코딩 서열에서 유래된 PRO266 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 8)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 11는 PRO335(UNQ287V) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 9)은 본문에서 "DNA41388"라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 12 및 표 10은 도 11의 코딩 서열에서 유래된 PRO335 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 10)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 13은 PRO331(UNQ292) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 11)은 본문에서 "DNA40981"라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 14 및 표 11은 도13의 코딩 서열에서 유래된 PRO331 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 12)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

도 15는 PRO326(UNQ287) 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 여기서, 핵산 서열(서열 번호 13)은 본문에서 " DNA37140" 라고 지정한 클론이다. 또한 굵은체 및 밑줄선으로 나타낸 부분은 각각 개시 및 종료 코돈이다.

도 16 및 표 12는 도 15의 코딩 서열에서 유래된 PRO331 폴리펩티드의 천연 서열의 아미노산 서열(서열 번호 14)을 보여준다. 다양한 기타 중요한 폴리펩티드 도메인이 알려진 경우에는 그 적당한 위치가 도시된다.

바람직한 실시예의 상세한 설명

I. 정의

" 면역 관련 질환" 이란 용어는 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 중단이 그 질병의 진행에 보상적인 효과를 갖는 질환을 포함한다. 상기 용어는 면역 매개 염증성 질환, 비면역 매개 염증성 질환, 감염성 질환, 면역결핍 질환, 종양 등을 포함한다.

" T 세포 매개성" 질환은, T 세포가 직접적으로 또는 간접적으로 포유동물에서 병리상태를 매개하거나 또는 기타적으로 공헌하는 질환을 의미한다. 상기 T 세포 매개성 질환은 세포 매개성 효과, 림포카인 매개성 효과 등과 관련있을 수 있고, 또한, 예를 들어 T 세포가 분비하는 림포카인에 의해 B 세포가 자극된다면 B 세포와 관련된 효과일 수도 있다.

일부가 면역 매개성 또는 T 세포 매개성이고 본 발명에 따라 처리될 수 있는 면역 관련 질환 및 염증성 질환의 예로는, 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염, 유년형 만성 관절염, 척추관절증, 전신성 경화증(경피증), 특발성 염증성 근장애(피부근염, 다발성근염), 소그렌증후군(Sjsgre's syndrome), 전신성 맥관염, 유육종증, 자가 면역 용혈성 빈혈(면역성 범혈구감소증, 발작성 야간 혈색소뇨증), 자가면역성 혈소판 감소증(특발성 혈소판 감소성 자반병, 면역매개성 혈소판감소증), 갑상선염(그레이브스병, 하시모도 갑상선염, 유년형 림프종성 갑상선염, 위축성 갑상선염), 당뇨병, 면역매개성 신장 질환(사구체신염, 세뇨관 간질성 신염), 다발성 경화증, 특발성 탈수초 다발성 신경염 또는 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrom) 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경염과 같은 중추 및 말초신경계의 탈수초 질환, 감염성 간염(감염 A,B,C,D,E 바이러스 및 비-간친화성 바이러스), 자가면역 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종성 간염 및 경화성 담관염과 같은 간담즙성 질환, 염증성 장질환(궤양성 대장염; 크론병(Crohn's disease)), 글루텐 민감성 장질환 및 휘플병(Whipple's diesase)과 같은 염증성 및 섬유성 폐 질환, 수포성 피부질환, 다형 삼출성 홍반 및 접촉성 피부염과 같은 자가면역 또는 면역 매개성 피부 질환, 건선, 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식물 과민성 및 담마진과 같은 알레르기성 질환, 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유종 및 과민성 폐렴과 같은 폐의 면역 질환, 이식 거부 및 이식편대 숙주 질환을 포함하는 이식과 관련된 질환 등이 있다. 감염성 질환으로는 AIDS(HIV 감염), 간염 A, B, C, D 및 E, 박테리아 감염, 진균성 감염, 원생동물 감염 및 기생충 감염 등이 있다.

" 치료" 란 질환의 발전을 예방하거나 병리상태의 변경을 목적으로 수행되는 개입을 의미한다. 따라서, " 치료" 란, 처방적 치료, 예방적 또는 방어적 측정 모두를 포함하는 의미이다. 치료가 필요한 대상이란, 질환을 갖고 있는 대상 및 질환의 예방이 필요한 대상을 포함한다. 면역 관련 질환의 치료에서, 처방적 치료제는 면역 반응의 구성성분의 반응 정도를 직접적으로 증가 또는 감소시키거나, 또는 그 질환이 다른 치료제, 예를 들어 항생제, 항진균제, 항염증제, 화학요법제 등에 의해 더 잘 치료될 수 있도록 할 수 있다.

면역 관련 질환의 " 병리(PATHOLOGY)" 란 환자의 상태 호전을 포함하는 모든 현상을 포함한다. 그 비제한적인 예로는, 비정상적 또는 제어불가능한 세포 성장(호중구, 호산구, 단핵구, 림프구 세포), 항체 생산, 자기-항체 생산, 보체 생산, 이웃 세포의 정상적 기능의 간섭, 비정상적 수준으로의 사이토카인 또는 기타 분비성 산물의 방출, 임의의 염증성 또는 면역학적 반응의 억압 또는 강화, 염증세포(호중구, 호산구, 단핵구, 림프구)의 세포간 공간으로의 침투 등이 있다.

치료 대상인 " 포유류" 는 인간, 사육 동물, 농장 동물, 개, 말, 고양이, 소 등과 같은 동물원, 스포츠용 또는 애완용 동물을 포함하는, 포유류로 분류되는 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는 포유류는 인간이다.

하나 이상의 추가적인 치료제와의 " 조합적" 투여란, 동시 및 임의 순서로의 연속적 투여를 포함한다.

" 만성적" 투여란, 초기 치료적 효과(활성)을 연장된 시간 동안 지속시킬 수 있도록, 일시적 형태와는 대조적으로 연속적인 형태로 제제를 투여하는 것을 의미한다. " 간헐적" 투여란, 중단 없이 계속적이지는 않고, 본질적으로 주기적으로 투여되는 치료를 의미한다.

본문에서 " 담체" 란, 사용되는 용량 및 농도에서는 이에 노출되어도 세포나 포유류에게 독성이 없는 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리적으로 허용되는 담체는 pH 완충된 수용액이다. 생리적으로 허용되는 담체의 예로는 인산, 구연산 및 기타 유기산의 완충액; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당알코올; 나트륨과 같은 염 형성 짝이온; 및(또는) TWEEN™ , 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS™ 와 같은 비이온 계면활성제를 포함한다.

본문에서 " 세포독성제" 란 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방해하거나 또는 세포의 파괴를 야기하는 물질을 의미한다. 상기 용어는 방사능 동위원소(예, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , 및 Re^{186}), 화학요법제, 및 효소적으로 활성인 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 유래의 독성제 또는 그 단편을 포함하는 것으로 의도된다.

" 화학요법제" 란, 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제의 예로는, 아드리아마이신, 독소루비신, 에피루비신, 5-플루오로우라실, 시토신 아라비노시드(" 아라-C), 시클로포스파미드, 티오테파, 부술판, 시토신, 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀(탁솔, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), 독세탁셀(Taxotere, Rhone-Poulenc, Rorer, Antony, Rnace), 톡소테레, 메토트렉세이트, 시스플라틴, 멜파란, 빈블라스틴, 블레오마이신, 에토포시드, 이포스파미드, 미토마이신 C, 미토잔트론, 빈크리스틴, 비노렐빈, 카르보플라틴, 테니포시드, 다우노마이신, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신, 에스페라미신(미국 특허 제4,675,187호 참조), 멜파란 및 기타 관련된 질소 머스타드(mustard) 등을 포함한다. 타목시펜 및 오나프리스톤과 같은 종양에 작용하는 호르몬의 활성을 조절 또는 억제하는 호르몬제도 상기 정의에 포함된다.

" 성장 억제제" 란, 본문에서 동정된 임의의 유전자를 생체내 또는 생체외에서 과도하게 발현시키는 세포, 특히 암 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장억제제는 S 기에서 상기 유전자들을 과도하게 발현하는 세포의 비율을 상당히 감소시키는 물질이다. 성장억제제의 예로는, 세포 주기 진행(S 기 이외의 위치에서)을 차단하는 물질, 예를 들어, G1-어레스트 및 M-기 어레스트를 유도하는 물질을 포함한다. 고전적인 M-기 차단제는 빈카스(빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔, 및 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신과 같은 토포II 억제제를 포함한다. 예를 들어, 타목시펜, 프레드니손, 다카바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제인, G1 어레스트를 야기하는 물질들이 또한 S-기 어레스트로 넘어갈 수 있다. 추가 정보를 위하여는 문헌[The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., 1장, 제목: " Cell Cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: 필라델피아, 1995) 특히 13면] 참조.

" 사이토카인" 이란 용어는 하나의 세포 집단에 의해 분비되는 세포간 매개체로서 다른 세포에 작용하는 단백질의 일반 명칭이다. 그러한 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인, 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬 등이 있다. 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소성장호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린

; 리랙신; 프로리랙신; 여포자극호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간성장인자; 섬유아세포 성장인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양괴사인자-알파 및 -베타; 뮐러의 억제물질; 마우스 고나도트로핀-연합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 맥관 내피세포 성장인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF-베타와 같은 신경 성장인자; 혈소판 성장인자; TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 트랜스포밍 성장인자(TGF); 인슐린 유사 성장인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도인자들; 인터페론-알파, -베타, 및 -감마와 같은 인터페론, 대식구-CSF(M-CSF), 과립구-대식구-CSF(GM-CSF) 및 과립구-CSF(G-CSF)와 같은 콜로니 자극인자(CSF); IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12와 같은 인터류킨(IL)들; TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 종양괴사인자; 및 기타 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 폴리펩티드 인자들이 상기 사이토카인에 포함된다. 본문에서, 사이토카인은 천연 기원으로부터의 단백질 또는 재조합 세포배양 및 천연 서열의 사이토카인의 생물학적으로 활성인 등가물을 포함한다.

본문에서, " PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드" 는 천연으로부터 유래된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 아미노산 서열과 동일한 아미노산을 갖는 천연서열의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 의미한다. 그러한 천연서열의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326은 천연으로부터 단리될 수도 있고 또는 재조합 및(또는) 합성적 방법으로 생산될 수도 있다. 상기 용어는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 천연적으로 발생하는 절단된 형태 또는 분비형태(예, 세포밖 도메인 서열), 천연적으로 발생하는 변이체(예, 달리 스플라이싱된 형태) 및 천연적으로 존재하는 대립 변이형을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서는, 천연서열 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326가 도4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 성숙된 또는 전장의 천연서열의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326이다.

" 본 발명의 폴리펩티드" 란 용어는 각각의 개별적 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 의미한다. 본 명세서에서 " 본 발명의 폴리펩티드" 또는 " PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드" 를 의미하는 모든 개시사항들은 각각의 폴리펩티드를 개별적으로 의미할 뿐만아니라 조합하여 의미한다. 예를 들어, --에 순응하는 또는 길항하는 항체의 제조, 항체의 정제, 항체의 유도, 항체의 형성, --를 포함하는 조성물의 투여, --질병의 치료 등의 기재는 개별적으로 본 발명의 폴리펩티드의 각각에 속하는 것이다. " 본 발명의 화합물" 이란 용어는, 본 발명의 폴리펩티드 및 이들 폴리펩티드에 대한 작용제 항체 및 길항제 항체, 그 폴리펩티드로부터 개발된 작용제 또는 길항제 활성을 갖는 펩티드 또는 소분자 등을 포함한다.

" 본 발명의 폴리펩티드" 란 용어는 또한, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 변이체를 포함한다. " 변이체" 폴리펩티드란, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 아미노산 서열과 약 80% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는 하기 정의된 바와 같은 활성 폴리펩티드를 의미한다. 그러한 변이체 폴리펩티드는 예를 들어, N-말단 및(또는) C-말단 뿐만 아니라 하나 이상의 내부 도메인에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 첨가 또는 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 보통 변이체 폴리펩티드는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드와 80% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 81% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 82% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 83% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 84% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 85% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 86% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 87% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 88% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 89% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 90% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 91% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 92% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 93% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 94% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 95% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 96% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 97% 이상

의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 98% 이상의 아미노산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 99% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가질 것이다. 변이체들은 천연 폴리펩티드 서열을 포함하지 않는다.

보통, 본 발명의 변이체 폴리펩티드는 길이가 약 아미노산 10개 이상이고, 종종 약 아미노산 20개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 30개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 40개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 50개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 60개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 70개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 80개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 90개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 100개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 150개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 200개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 200개 이상이고, 더 빈번하게는 약 아미노산 300개 이상이거나 또는 그 이상이다.

본원에서 동정된 폴리펩티드 서열과 관련하여, " % 아미노산 서열 상동성" 이란, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드 서열과 후보 서열을 정렬하고, 최대한의 서열 상동성 퍼센트를 얻기 위하여 필요하면 갭을 도입하여 정렬한 후, 보존적 치환을 서열 상동성의 일부로서 고려하지 않고서, 그 폴리펩티드 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. % 아미노산 서열 상동성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공용 컴퓨터 소프트웨어를 이용할 수 있다. 당업자들은 비교할 서열들의 전장에 걸쳐 최대한의 정렬을 달성하기 위하여 필요한 임의의 연산 방식을 포함하는 정렬 측정을 위한 적당한 변수들을 결정할 수 있다. 그러나, 본원에서는, ALIGN-2 프로그램용 완전 소스 코드가 도2 a-p에 제공되어 있는 ALIGN-2 서열비교 컴퓨터 프로그램을 이용하여 후술하는 바와 같이 % 아미노산 서열 상동성이 구해진다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크사가 저자이고, 도 2a-p에 도시된 소스 코드는 미국 저작권청(와싱턴 D.C. 20559)에 사용자 문헌에 신청되어 있고, 저작권 등록번호 TXU510087호로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크사(캘리포니아주 남샌프란시스코)를 통하여 공개적으로 이용가능하거나 또는 도 2a-p에 제공된 소스 코드로부터 컴파일될 수도 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 프로그램, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D 상에서의 사용을 위하여 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 변수들은 ALIGN-2 프로그램에 의해 정해지므로 변경하기 않는다.

본원에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 상동성(달리, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 특정 % 아미노산 서열 상동성을 포함하는 또는 갖는 주어진 아미노산 서열 A로 기술할 수 있다)은 다음과 같이 계산된다:

$X/Y \times 100$

(여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에서 A 및 B의 프로그램 정렬에 의한 동일한 일치로서 나타나는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 총 아미노산 잔기의 수이다). A 아미노산 서열의 길이가 B 아미노산 서열의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 상동성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 상동성과 동일하지 않음을 알 수 있을 것이다. % 아미노산 서열 상동성 계산의 예로서, 도1A-B는 " PRO" 라고 지정된 아미노산 서열에 대하여 " 비교 단백질" 이라고 지정된 아미노산 서열의 % 아미노산 서열 상동성을 계산하는 방법을 보여준다.

달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 상동성은 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기한 바와 같이 구해진다. 그러나, % 아미노산 서열 상동성은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997))을 이용하여서도 또한 결정할 수 있다.

NCBI-BLAST2 서열비교 프로그램은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov.에서 다운로드 받을 수 있다. NCBI-BLAST2는 몇가지 서치 변수를 사용하는데, 예를 들어 unmask=yes, strand=all, expected occurences=10, minimum low complexity length=15/5, multi-pass e-value=0.01, constant for multi-pass =25, dropoff for final gapped alignment=25 및 scoring matrix =BLOSUM62를 포함하여, 이들 서치 변수들은 10 기본값으로 설정한다.

아미노산 서열 비교를 위하여 NCBI-BLAST2가 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 상동성(달리, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 특정 % 아미노산 서열 상동성을 포함하는 또는 갖는 주어진 아미노산 서열 A로 기술할 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:

$X/Y \times 100$

(여기서, X는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에서 A 및 B의 프로그램 정렬에 의해 동일한 일치로서 나타나는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 총 아미노산 잔기의 수이다). A 아미노산 서열의 길이가 B 아미노산 서열의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 상동성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 상동성과 동일하지 않음을 알 수 있을 것이다.

" 본 발명의 폴리펩티드" 란 용어는 또한 상기와 같이 수행된 아미노산 서열 상동성 비교의 문맥에서의 폴리펩티드를 포함하고, 이는 동일한 것 뿐만 아니라 유사한 성질을 갖는 비교할 서열내 아미노산 잔기를 포함한다. 이들 폴리펩티드를 " 양성" 이라 부른다. 관심있는 아미노산 잔기에 대하여 양성값을 보이는 아미노산 잔기들은 관심있는 아미노산 잔기와 동일한 것 또는 관심 아미노산 잔기의 바람직한 치환인 것(하기 표 1에 정의된 바와 같이)과 같은 것들이다. 본원에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 주어진 아미노산 서열 A의 % 양성값(달리, 주어진 아미노산 서열 B에 대하여 특정 % 양성값을 포함하는 또는 갖는 주어진 아미노산 서열 A로 기술할 수 있다)은 다음과 같이 계산된다:

$X/Y \times 100$

(여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에서 A 및 B의 프로그램 정렬에서 상기 정의한 바와 같이 양의 값을 보이는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 총 아미노산 잔기의 수이다). A 아미노산 서열의 길이가 B 아미노산 서열의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 % 양성값은 A에 대한 B의 % 양성값과 동일하지 않음을 알 수 있을 것이다.

" 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 " 본 발명의 변이체 핵산 서열" 은 본원에 정의된 활성 폴리펩티드를 코딩하고, 핵산 서열 DNA35638, DNA33094, DNA40628, DNA37150, DNA41388, DNA40981 또는 DNA37140과 약 80% 이상의 핵산 서열 상동성을 갖는 핵산 분자 또는 특별히 유도된 그 단편을 의미한다. 보통 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드는 DNA35638, DNA33094, DNA40628, DNA37150, DNA41388, DNA40981 또는 DNA37140의 핵산 서열 또는 그 유도된 단편과 약 80% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 81% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 82% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 83% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 84% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 85% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 86% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 87% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 88% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 89% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 90% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 91% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 92% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 93% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 94% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 95% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 96% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 97% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 98% 이상의 핵산 서열 상동성, 더욱 바람직하게는, 약 99% 이상의 핵산 서열 상동성을 가질 것이다. 변이체들은 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다. 이 점에서, 유전자 코드의 퇴행성으로 인하여, 당업자라면 DNA35638, DNA33094, DNA40628, DNA37150, DNA41388, DNA40981 또는 DNA37140 뉴클레오티드와 약 80% 이상의 핵산 서열 상동성을 갖는 많은 수의 변이체 폴리뉴클레오티드가 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 아미노산 서열 또는 하기하는 ATCC에 기탁된 클론이 코딩하는 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩할 것임을

쉽게 인식할 것이다.

보통, 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드는 길이가 약 뉴클레오티드 30개 이상이고, 종종 약 뉴클레오티드 60개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 90개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 120개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 150개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 180개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 210개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 240개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 270개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 300개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 450개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 600개 이상이고, 더 빈번하게는 약 뉴클레오티드 900개 이상이거나 또는 그 이상이다.

본원에서 동정된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열과 관련하여, " % 핵산 서열 상동성" 이란, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 관심있는 서열내의 뉴클레오티드 서열과 후보 서열을 정렬하고, 최대한의 서열 상동성 퍼센트를 얻기 위하여 필요하면 갭을 도입하여 정렬한 후, 그 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열의 뉴클레오티드의 백분율로서 정의된다. % 핵산 서열 상동성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 당업계에 잘 알려진 다양한 방법으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공용 컴퓨터 소프트웨어를 이용할 수 있다. 당업자들은 비교할 서열들의 전장에 걸쳐 최대한의 정렬을 달성하기 위하여 필요한 임의의 연산 방식을 포함하는, 정렬 측정을 위한 적당한 변수들을 결정할 수 있다. 그러나, 본원에서는, ALIGN-2 프로그램용 완전 소스 코드가 도 2a-p에 제공되어 있는 ALIGN-2 서열비교 컴퓨터 프로그램을 이용하여 후술하는 바와 같이 % 핵산 서열 상동성이 구해진다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크사가 저자이고, 도 2a-p에 도시된 소스 코드는 미국 저작권청(와싱턴 D.C. 20559)에 사용자 문헌에 신청되어 있고, 저작권 등록번호 TXU510087호로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크사(캘리포니아주 남샌프란시스코)를 통하여 공개적으로 이용가능하거나 또는 도 2A-P에 제공된 소스 코드로부터 컴파일될 수도 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 프로그램, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D 상에서의 사용을 위하여 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 변수들은 ALIGN-2 프로그램에 의해 정해지므로 변경하기 않는다.

본원에서, 주어진 핵산 서열 D에 대하여 주어진 핵산 서열 C의 % 핵산 서열 상동성(달리, 주어진 핵산 서열 D에 대하여 특정 % 핵산 서열 상동성을 포함하는 또는 갖는 주어진 핵산 서열 C로 기술할 수 있다)은 다음과 같이 계산된다:

$W/Z \times 100$

(여기서, W는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에서 C 및 D의 프로그램 정렬에 의한 동일한 일치로서 나타나는 핵산의 수이고, Z는 D에서의 총 핵산의 수이다). C 핵산 서열의 길이가 D 핵산 서열의 길이와 동일하지 않을 경우, D에 대한 C의 % 핵산 서열 상동성은 C에 대한 D의 % 핵산 서열 상동성과 동일하지 않음을 알 수 있을 것이다. % 핵산 서열 상동성 계산의 예로서, 도1C-D는 " PRO-DNA" 라고 지정된 핵산 서열에 대하여 " 비교 DNA" 라고 지정된 핵산 서열의 % 핵산 서열 상동성을 계산하는 방법을 보여준다.

달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 핵산 서열 상동성은 ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기한 바와 같이 구해진다. 그러나, % 핵산 서열 상동성은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997)))을 이용하여서도 또한 결정할 수 있다. NCBI-BLAST2 서열비교 프로그램은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov.에서 다운로드 받을 수 있다. NCBI-BLAST2는 몇가지 서치 변수를 사용하는데, 예를 들어 unmask=yes, strand=all, expected occurences=10, minimum low complexity length=15/5, multi-pass e-value=0.01, constant for multi-pass =25, dropoff for final gapped alignment=25 및 scoring matrix =BLOSUM62를 포함하여, 이들 서치 변수들은 기본값으로 설정한다.

핵산 서열 비교를 위하여 NCBI-BLAST2가 사용되는 경우, 주어진 핵산 서열 D에 대한 주어진 핵산 서열 C의 % 핵산 서열 상동성(달리, 주어진 핵산 서열 D에 대하여 특정 % 핵산 서열 상동성을 포함하는 또는 갖는 주어진 핵산 서열 C로 기술할 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:

$W/Z \times 100$

(여기서, W는 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에서 C 및 D의 프로그램 정렬에 의해 동일한 일치로서 나타나는 핵산의 수이고, Z는 D에서의 총 핵산의 수이다). C 핵산 서열의 길이가 D 핵산 서열의 길이와 동일하지 않을 경우, D에 대한 C의 % 핵산 서열 상동성은 C에 대한 D의 % 핵산 서열 상동성과 동일하지 않음을 알 수 있을 것이다.

다른 실시양태에서, 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 엄격한 혼성화 및 세척 조건에서 전장의 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화할 수 있는 본 발명의 활성 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자이다. 본 발명 변이체 폴리펩티드는 본 발명 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것들을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 " 단리된" 핵산 분자란 보통 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 천연원에 보통 함께 결합되어 있는 1종 이상의 오염 핵산분자로부터 동정되고 분리된 핵산 분자를 의미한다. 단리된 폴리펩티드 코딩 핵산 분자는 천연에서 그것이 발견되는 형태 또는 셋팅 이외의 것이다. 단리된 핵산 분자는 따라서 천연적인 세포에 존재하는 폴리펩티드 코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 예를 들어 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 위치에 그 핵산 분자가 존재하는 경우 보통 본 발명의 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 세포내에 함유된 폴리펩티드 코딩 핵산 분자를 포함한다.

" 조절 서열" 이란 용어는 특정 숙주 유기체내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 말한다. 원핵 세포에 적합한 조절 서열로는 예를 들어 프로모터를 포함하고, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인헨서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

핵산이 다른 핵산 서열과 기능적 관계를 갖고 놓여질 때는 " 작동가능하게 연결된" 이라 한다. 예를 들어, 폴리펩티드를 폴리펩티드의 분비에 관련된 프리단백질로서 발현시키려면, 프리서열 또는 분비성 리더 DNA를 그 폴리펩티드의 DNA에 작동가능하게 연결한다거나; 그 서열의 전사에 영향을 주고자 한다면 프로모터 또는 인헨서를 코딩 서열에 작동가능하게 연결하고; 리보좀이 그의 위치를 인식하도록 하여 번역을 용이하게 하고자 한다면 코딩 서열에 리보좀 결합 부위를 작동가능하게 연결한다. 일반적으로, " 작동가능하게 연결된" 이란, 연결되는 DNA 서열이 연속적이고, 분비성 리더의 경우에는 연속적이면서 리딩 위상에 일치하도록 된다. 그러나, 인헨서는 연속적일 필요가 없다. 연결은 통상의 제한 부위에서의 연결에 의해 수행된다. 이러한 부위가 존재하지 않을 때는 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

혼성화 반응에서 " 엄격성" 은 이 기술분야의 당업자에 의해 용이하게 결정되고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 의존적인 실험적 계산으로 정한다. 일반적으로 더 긴 프로브는 적합한 결찰을 위하여 더 높은 온도를 요구할 것이고, 짧은 프로브는 더 낮은 온도가 필요할 것이다. 혼성화는 일반적으로 변성된 DNA가 그 융점 온도 미만에서 그 주변에 상보적인 스트랜드가 존재할 때 재결찰하는 능력에 의존적이다. 프로브와 혼성화될 서열 사이의 원하는 상동성이 높을수록, 사용될 상대적 온도는 더 높다. 결과적으로, 상대적 온도가 높을수록 반응 조건은 더욱 엄격해지고, 낮을수록 덜 엄격해지는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성에 대한 추가적이고 상세한 설명은 문헌 참조[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publisheer (1995)]

본문에 정의된 " 엄격한 조건" 또는 " 고 엄격성 조건" 이란, (1) 낮은 이온력 및 높은 온도를 사용하는 세척, 예를 들어 50℃에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 구연산나트륨/0.1% 소듐 도데실 설페이트; (2) 혼성화 도중 포름아미드와 같은 변성화제의 사용, 예를 들어, 42℃에서 750 mM 염화나트륨, 75 mM 구연산나트륨과 함께, 0.1% 소혈청 알부민/0.1% Ficoll/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50mM 소듐 포스페이트 완충수(pH 6.5)와 함께, 50%(v/v) 포름아미드; 또는 (3) 42℃에서 50% 포름아미드, 5 x SSC(0.75 M NaCl, 0.075 M 구연산나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 소듐 피로포스페이트, 5 x 덴하트(Denhardt's) 용액, 초음파분해된 연어 정자 DNA(50 ug/ml), 0.1% SDS, 및 10% 덱스트란 설페이트를 사용하고, 42℃에서 0.2 x SSC(염화나트륨/구연산나트륨)에서 세척 및 55℃에서 50% 포름아미드 후 55℃에서 EDTA 함유 0.1 x SSC로 이루어진 높은 엄격성 세척에 의한 것.

" 보통 엄격한 조건" 은 삼브루크 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 알 수 있을 것이고, 세척 용액 및 혼성화 조건(예, 온도, 이온력 및 %SDS)는 상기 기술한 것 보다 덜 엄격한 것의 사용을 포함한다. 보통 엄격한 조건의 예로는, 20% 포름아미드, 5 x SSC(150 mM NaCl, 15 mM 트리소듐 시트레이트), 50 mM 소듐 포스페이트(pH 7.6), 5 x 덴하트 용액, 10% 덱스트란 설페이트, 및 20 mg/mL 변성된 쉬어드 연어 정자 DNA를 포함하는 용액중에서 37℃에서 밤새 인큐베이트하고, 그 필터를 1 X SSC 중에서 약 37 - 50℃에서 세척하는 조건이다. 이 기술분야의 당업자는 프로브 길이 등과 같은 요인들을 포용하기 위해 필요한 온도, 이온력 등의 조절 방법을 인식할 것이다.

" 태그 폴리펩티드" 에 융합된 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 키메라 폴리펩티드를 지칭하기 위하여 " 에피토프 태그된" 이란 용어를 사용한다. 이 태그 폴리펩티드는 그 폴리펩티드에 대한 항체를 만들 수 있을 정도로 충분한 잔기를 가지고, 동시에 그 폴리펩티드에 융합된 폴리펩티드의 활성에 영향을 주지 않을 정도로 충분히 짧아야 한다. 또한, 태그 폴리펩티드는 바람직하게는 상당히 독특하여서 그 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 상호 반응하지 않도록 하는 것이다. 일반적으로 적합한 태그 폴리펩티드는 6개 이상의 아미노산 잔기을 갖고, 통상 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기(바람직하게는 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

본 발명의 폴리펩티드의 변이체에 대하여 사용되는 용어 " 활성인" 또는 " 활성" 이란, 천연적 또는 천연적으로 발생하는 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 보유하는 본 발명의 단백질 형태를 지칭한다.

본문에 개시된 스크리닝 검사에 의해 동정될 수 있는 항체 또는 다른 분자(예를 들어, 유기 또는 무기 소분자, 펩티드 등)에 대하여 사용되는 " 생물학적 활성" 이란 용어는 그러한 분자가 염증세포의 조직 침투를 유도 또는 억제하는 능력, T-세포 증식을 자극 또는 억제하는 능력 및 세포에 의한 림포카인 방출을 자극 또는 억제하는 능력을 지칭한다. 또다른 바람직한 활성은 증가된 맥관 투과성 또는 그의 억제이다.

" 길항제" 란 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 본원에 개시된 본 발명의 천연적 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전부 차단, 억제 또는 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. 유사한 방식으로, " 작용제" 라는 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 본원에 개시된 본 발명의 천연적 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 포함한다. 구체적으로 본 발명의 적합한 길항제 또는 작용제는 작용제 또는 길항제 항체 또는 항체 단편, 본 발명의 천연 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 유기 소분자 등을 포함한다.

본문에서 " 소분자" 란 분자량 600 달톤 미만의 분자량을 갖는 것을 의미한다.

" 항체(Abs)" 및 " 면역글로불린(Igs)" 이란 동일한 구조적 특징을 갖는 당단백질이다. 항체는 특정 항원에 대한 결합

특이성을 보이나, 면역글로불린은 항체 뿐만 아니라 항원 특이성을 결한 다른 항체-유사 분자를 포함한다. 후자 종류의 폴리펩티드는 예를 들어, 림프계에 의해 낮은 수준으로 생산되고, 골수종에 의해 높은 수준으로 생산된다. "항체" 란 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 비제한적인 의미에서, 구체적으로는 완전한 모노클론 항체, 폴리클론 항체, 둘 이상의 완전한 항체로부터 형성된 다특이성 항체(예, 2특이성 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 갖는 한도내에서의 항체 단편을 포함한다. 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드에 면역학적으로 결합하는 항체이다. 그 항체는 그 항체와 접촉가능한 본 발명의 폴리펩티드의 어떤 도메인과도 결합할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 폴리펩티드의 임의의 세포밖 도메인에 결합할 수 있고, 전체 폴리펩티드가 분비될 때는 항체가 결합할 수 있는 폴리펩티드의 임의의 도메인과 결합할 수 있다.

"천연 항체" 및 "천연 면역글로불린" 이란, 일반적으로 두 개의 동일한 경쇄 및 두 개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종4량 당단백질이다. 각 경쇄는 공유적 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설파이드 결합의 수는 면역글로불린의 상이한 이소타입의 중쇄 간에 다르다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 간격을 두고 위치하는 쇄내 디설파이드 결합을 갖는다. 각 중쇄는 다수의 불변 도메인에 이어서 일 말단에 하나의 가변 도메인(V_H)을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인(V_C)을 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 나란히 있고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 나란히 있다. 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에는 특정 아미노산 잔기가 접경을 형성할 것으로 믿어진다.

"가변" 이란 용어는 가변 도메인의 특정 부분이 항체간에 그 서열에서 상당히 상이하고, 각 특정 항체의 그 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 이 가변성은 항체의 가변 도메인을 통하여 골고루 분포되지는 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 양쪽의 상보성 결정 부위(CDRs) 또는 과변이(hypervariable) 영역이라고 불리는 3개의 세그먼트에 집중해 있다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부위를 프레임워크(FR)라 부른다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 주로 베타-시트 구조를 갖고, 루프 연결을 형성하고 일부 케이스의 경우 베타 시트구조의 일부를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결되는 4개의 RF 부위를 포함한다. 각 쇄의 CDR은 FR 부위에 의해 FR 부위에 의해 근접하게 유지되고 다른 쇄로부터의 CDR과 연결되어, 항체의 항원 결합 부위를 형성하는데 기여한다(Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I 647-669(1991) 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합에 직접적으로 관여하지 않으나, 항체 의존적 세포 독성에서 항체의 기여와 같은 다양한 효과적 기능을 보인다.

본문에서 "과변이 부위" 또는 "상보성 결정 부위(CDR)" 은 그 항체의 최대 서열 가변성을 갖는 가변 영역내 하부위로 정의되고, 이것이 항원-결합 부위를 형성하고 항원 특이성의 주요 결정인자이다. 한 정의에 따르면, 이들은 예를 들어 경쇄 가변 부위내 잔기(카바트 명명법)24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 중쇄 가변 영역내 잔기(카바트 명명법) 31-35(H1), 50-65(H2), 95-102(H3)일 수 있다. 카바트 등 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. 1991] 참조. 또는, 카바트에 의해 정의된 부위와 조합하여, 과변이 부위는 예를 들어, 경쇄 가변 부위내 잔기(쵸티아 명명법) 26-32(L1), 50-53(L2), 91-96(L3), 및 잔기(쵸티아 명명법) 26-32(H1), 53-55(L2) 및 96-101(L3)를 포함하는 "과변이 루프" 일 수 있다[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)].

"항체 단편" 은 전체 항체의 일부분, 바람직하게는 전체 항체에서 항원 결합 또는 변이 부위를 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편; 디아보디(diabodies); 선형 항체들[Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)]; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 제조된 다특이성 항체 등을 포함한다.

항체의 파파인 절단은 "Fab" 단편이라 불리는, 각각 하나의 항원 결합 부위를 갖는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편을 생산하고, 그들의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326는 이들의 즉각적 결정화 능력을 반영한다. 펩티드 처리는 두 개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원을 교차 연결할 수 있는 하나의 $F(ab')_2$ 단편을 생산한다.

"Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소의 항원 단편이다. 이 부위는 단단한 비공유 결합의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진다. 각 가변 도메인의 세 개의 CDR이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면상에 항원 결합 부위를 이루는 것은 바로 이 구조이다. 총괄적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 하나의 가변 도메인(또는 항원에 대하여 특이적인 3개의 CDR 만을 함유하는 Fv의 절반) 조차도 비록 그 전체 결합 부위에 대한 친화도는 낮지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가진다.

Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1불변 도메인(CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 Fab 단편과 다른데, 이는 항체 힌지 부위로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇개의 잔기의 첨가에 의한다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 자유 티올기를 갖는 Fab'을 표시한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생산되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링도 또한 공지되어 있다.

모든 척추동물 종으로부터의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 뚜렷이 구별되는 두 종의 카파(k) 및 람다(λ)의 하나로 정해질 수 있다.

그 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 면역글로불린은 상이한 클래스로 정해진다. 면역글로불린의 다섯 개의 주 클래스가 있다:IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. 이들 중 일부는 서브클래스(이소타입)로 더 세분될 수 있다:예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원적 구조는 잘 알려져 있다.

"모노클론 항체"란, 실질적으로 균일한 항체의 집단, 즉, 그 집단을 함유하는 개별 항체가 소량으로 존재할 수 있는 자연적으로 생성되는 가능한 돌연변이 이외에는 동일한 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 말한다. 모노클론 항체는 매우 특이적이고, 단일 항원성 부위에 대하여 생성된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정부위(에피토프)에 대하여 생성되는 상이한 항체를 포함하는 전통적인(폴리클론) 항체와 대조적으로, 각 모노클론 항체는 항원상의 하나의 결정부위에 대하여 생성된다. 이 특이성 이외에, 모노클론 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고, 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 변형어 "모노클론성"이란 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻어진 항체로서의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의해 그 항체를 얻는 것을 요구하는 것으로 의도되지는 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클론 항체는 코흘러 등[Kohler et al., Nature 256:495(1975)]에 의해 제조될 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법[미국 특허 제4,816,567호]에 의해 제조될 수도 있다. "모노클론 항체"는 또한 예를 들어 클락슨[Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)] 및 막스[Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수도 있다. 파지미드 및 파지 벡터를 이용하는 항체 제조를 개시하는 문헌[미국특허 번호 제5,750,373호, 제5,571,698호, 제5,403,484호 및 제5,223,409호] 참조.

본문에서 모노클론 항체는 구체적으로, 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유도된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체내의 상응 서열과 동일하거나 유사하지만, 쇄의 나머지 부분은 다른 종으로부터 유도된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체, 이러한 항체의 단편들에서의 상응 서열과 동일하거나 또는 유사한 키메라 항체로서, 이들이 원하는 생물학적 활성을 갖는 한 이를 포함한다[미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad, Sci. USA, 81:6851-6855(1984)].

비인간(예. 쥐과)의 " 인간화된 형태" 는 최소한의 비인간 면역글로불린으로부터 유래하는 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 이의 단편들(예. Fv, Fab, Fab', F(ab)$_2$ 또는 기타 항체의 항원 결합 서브서열)이다. 대부분의 경우, 인간화된 항체는 수혜자의 상보성 결정 부위(CDR)로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 성능을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비인간 종(도너 항체)의 CDR로부터의 잔기로 치환된 인간 면역글로부틸(수혜자 항체)이다. 일부의 경우, 인간 면역글로불린의 Fv 플레임워크(FR) 부위가 상응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화된 항체는 수혜자 항체와 수입된 CDR 또는 프레임워크 서열 어디에서도 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있다. 이들 개질은 항체 성능을 개선하고 최대화하기 위하여 이루어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 부위가 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 부위가 인간 면역글로불린 서열의 것들인 하나 이상의, 일반적으로 두 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이다. 인간화된 항체는 또한 적절하게 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 상세한 것은 문헌[Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329(1988); 및 Prsta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)] 참조. " 인간화된 항체" 란 용어는, 항체의 항원 결합 부위가 짧은 꼬리 원숭이(macaque monkey)를 관심있는 항체로 면역화시켜 제조되는 항체로부터 유도된 " 영장류화(primatized)" 항체를 포함한다. 또한, 올드 월드 원숭이(Old World monkey)로 부터의 잔기를 함유하는 항체도 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,658,570호, 제5,693,780호, 제5,681,722호, 제5,750,105호 및 제5,756,096호 참고.

본 발명에서 항체들 및 그 단편들은 항체 또는 항체 단편들이 결합하는 항원에 대한 그들의 친화도를 변경시키기 위하여 CDR 부위 및(또는) 프레임워크 부위의 하나 이상의 아미노산 서열을 변경하도록 항체를 개질한 " 친화도 성숙된(affinity matured)" 항체를 또한 포함한다. 친화도 성숙은 출발 항체에 비해 성숙된 항체의 항원에 대한 친화도의 증가 또는 감소를 가져올 수 있다. 일반적으로, 출발 항체는 인간화된, 인간, 키메라 또는 쥐과 항체일 것이고, 친화도 성숙된 항체는 출발 항체보다 증가된 친화도를 가질 것이다. 성숙 과정은 CDR내 또는 플레임워크 부위내 하나 이상의 아미노산 잔기가 임의의 표준 방법으로 상이한 잔기로 변화된다. 적합한 방법으로는 잘 알려진 카셋트 돌연변이법[Well et al., 1985, Gene, 34:315] 또는 올리고뉴클레오티드 매개성 돌연변이법[Zoller et al., 1987, Nucleic Acids Res., 10:6487-6504]을 이용하는 것이다. 친화도 성숙은, 많은 돌연변이를 발생시키고 항원 또는 리간드에 대한 개선된 친화도에 기초하여 돌연변이의 풀이나 라이브러리로부터 원하는 친화도를 갖는 돌연변이들을 선택하는, 공지된 선택법을 이용하여 수행될 수도 있다. 공지된 파지 전시 기술이 본 접근법에서 편리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,750,373호 및 미국특허 제5,223,409호 등 참고.

또한 인간 항체가 본 발명의 항체의 범주에 속한다. 인간 항체는, 파지 전시 라이브러리[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227-381(1991); Marks et al., J. Mol.Biol, 222:581(1991)]를 포함하는, 당업계에 잘 알려진 다양한 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 콜레 등(Cole et al.) 및 보에너 등(Boerner et al.)의 기술도 또한 인간 단일클론 항체의 제조에 이용가능하다[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77(1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95(1991); 미국 특허 제5,750,373호]. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 좌위를 내부 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 트랜스제닉 동물(예. 마우스)에 도입함으로써 제조될 수있다. 도전시, 인간 항체 생산을 관찰한다. 이것은 유전자 재정렬, 조합 및 항체 레파토리를 포함하는 모든 관점에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이 접근법은 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호 및 과학문헌[Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783(1992); Lonberg et al., Naure 368 856-859(1994); Morrison, Nature 368, 812-13(1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51(1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826(1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995)]에 기재되어 있다.

" 단쇄 Fv" 또는 " sFv" 항체 단편은 하나의 폴리펩티드 사슬로 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 바람직하게는 Fv 폴리펩티드는 sFv가 원하는 항원 결합 구조를 형성하도록 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. sFv에 대한 검토를 위하여는 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)] 참조.

" 디아보디스(diabodies)" 란 용어는 두 개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편으로서, 이 단편들은 동일한 폴리펩티드 쇄(V_H - V_L)내에서 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함하는 단편을 말한다. 동일 쇄 상에서 두 도메인 사이의 짝을 허락하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 이들 도메인들은 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루고 두 개의 항원 결합 부위를 만들게 된다. 디아보디스에 대한 더욱 자세한 검토를 위해서는 예를 들어 유럽 특허 제404,097호; 국제 특허공보 WO93/11161; 및 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993)] 참조.

단리된 항체란 동정되고, 그 천연적 환경의 성분들로부터 분리 및(또는) 회수된 것을 말한다. 그 천연적 환경의 오염 성분들은 항체의 진단적 또는 치료적 사용을 방해하는 물질들이고, 이로는 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질 등이 있다. 바람직한 실시양태에서는, 본 발명의 화합물은 (1) 로리법(Lowry method)으로 측정시 그 화합물이 95 중량%를 초과하는 순도로 및 가장 바람직하게는 99중량% 이상의 순도로, (2) 시피닝 컵 시퀘네이터(spinning cup sequenator)를 사용하여 15개 잔기 이상의 N-말단 또는 내부적 아미노산 서열을 얻기에 충분한 정도, 또는 (3) 코마시 블루 또는 바람직하게는 은염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 균질화 정도로 정제될 것이다. 단리된 화합물, 예를 들어 항체 또는 폴리펩티드는, 그 화합물의 천연 환경에 존재하는 성분들 중 하나 이상이 존재하지 않을 것이므로, 재조합 세포내에 본래 존재하는 화합물을 포함한다. 그러나 보통 단리된 화합물은 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

본문에서 " 표지" 란, 표지된 화합물을 생성하도록 화합물, 예를 들어 항체 또는 폴리펩티드에 직접적으로 또는 간접적으로 컨쥬게이트되어 있는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수도 있고(예, 방사능 동위원소 표지 또는 형광 표지) 또는 효소적 표지의 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수도 있다.

" 고체상(solid phase)" 란 본 발명의 화합물이 부착될 수 있는 비수상 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고체상의 예로는 부분적으로 또는 전부, 유리(예, 조절된 포아 글래스), 다당류(예, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알코올 및 실리콘으로 형성된 것 들이 있다. 특정 실시양태에서는 문맥에 따라, 고체상이 검사 플레이트의 벽을 포함할 수도 있고, 기타의 경우 고체상이 정제 칼럼(예, 친화성 크로마토그래피 칼럼)이다. 이 용어는 또한 미국특허 제4,275,149호에 개시된 것과 같은 분별적 입자의 불연속적 고체상을 포함한다.

" 리포좀" 은 약(본문에 개시된 항-ErbB2 항체 및 임의로 화학요법제 등)을 포유동물에게로 수송하는데 유용한, 다양한 유형의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 이루어진 소낭이다. 리포좀의 성분들은 생물학적 막의 지질 배열과 유사하게, 일반적으로 이중층 구조로 배열된다.

본문에서 " 면역부착제(immunoadhesin)" 란, 이종 단백질(" 어드헤진,adhesin")의 결합 특이성을 면역글로불린 불변 도메인의 효과 기능과 결합시킨 항체 유사 분자를 의미한다. 구조적으로 면역부착제는 항체의 항원 인식 및 항체 결합 부위 이외의 원하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열(즉 " 이종성")과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합을 함유한다. 면역부착제 분자의 어드헤진 부분은 일반적으로 적어도 리간드 또는 수용체의 결합 부위를 함유하는 연속적 아미노산 서열이다. 면역부착제내 면역글로불린 불변 도메인 서열은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4-서브타입, IgA(IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM과 같은 임의의 면역글로불린으로부터 얻을 수 있다.

II. 본 발명의 조성 및 방법

1. 본 발명의 폴리펩티드의 제조

본 발명은 본원에서 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326(각각 UNQ219, UNQ191, UNQ264, UNQ233, UNQ287V, UNQ292 또는 UNQ287)이라고 명명한 폴리펩티드를 코딩하는 새롭게 동정되고 단리된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 하기 실시예에서 더욱 상세히 개시된 바와 같이, 특히 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA가 동정되고 단리되었다. 별도의 발현 절차로 생성된 단백질들에게는 다른 PRO 번호를 부여할 수도 있으나, 임의의 주어진 DNA 및 그 코딩 단백질에 대하여 UNQ 번호는 유일하고 변하지 않을 것이다. 그러나, 간편성을 위하여, 본 명세서에서, DNA35638, DNA33094, DNA40628, DNA37150, DNA41338, DNA40981 및 DNA37140, 및 상기 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 정의에 포함된 천연 유사체 및 변이체에 의해 코딩되는 단백질은 그 원천이나 제조방법에 상관없이 모두 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326, 또는 간단히 "본 발명의 폴리펩티드" 라고 지칭할 것이다.

하기 설명은 주로 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 트랜스펙션된 세포를 배양함으로써 본 발명의 폴리펩티드를 생산하는 것에 관계된다. 물론, 본 발명의 폴리펩티드를 제조하기 위하여 당업계에 잘 알려진 다른 방법을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 그 폴리펩티드 서열 또는 그 일부는 고체상 기술을 이용한 직접적 펩티드 합성에 의해 생산될 수도 있다[Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 85:2149-2154(1963)참고]. 시험관내 단백질 합성은 수동적 기술 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화된 합성은 예를 들어, 어플라이드 바이오시스템 펩티드 합성기(Foster City, CA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 다양한 부분들은 별도로 화학적으로 합성되어 화학적 또는 효소적 방법으로 연결되어 전장의 폴리펩티드를 생산할 수 있다.

본문에 기재된 전장 천연 서열 폴리펩티드 이외에, 변이체가 제조될 수도 있다. 변이체는 DNA에 적당한 뉴클레오티드 변화를 도입하거나 또는 원하는 폴리펩티드를 합성함으로써 제조할 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 예를 들어 글리코실화 부위의 위치 또는 수를 변화시킨다던지 또는 막부착 특성을 변화시키는 등의 본 발명의 폴리펩티드의 번역후 프로세스를 변화시킬 수도 있음을 이해할 것이다.

본문에 개시된 본 발명의 폴리펩티드의 천연 전장 서열 또는 다양한 도메인에서의 변이는, 예를 들어 미국특허 제5,364,934호에 개시된 바와 같은 보존적 또는 비보존적 돌연변이를 위한 기술 및 가이드라인을 이용하여 이루어질 수 있다. 변이는 천연의 폴리펩티드 서열과 비교하여 그 폴리펩티드의 아미노산 서열에서의 변화를 가져오는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈에서의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 임의로, 그 변이는 본 발명의 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인내 하나 이상의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환하는 것에 의한다. 원하는 활성에 영향을 주지 않는 삽입, 치환 또는 결실이 어느 아미노산에서 이루어져야 하는지를 결정하는 가이드라인은 본 발명의 폴리펩티드 서열을 유사한 공지의 단백질 분자의 서열과 비교하고 높은 상동성을 보이는 부위에서는 변화되는 아미노산의 수를 최소화하는 것일 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및(또는) 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것, 예를 들어 류신과 세린의 치환, 즉 보존적 아미노산 치환의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의적으로 약 1 내지 5개의 아미노산 범위내에서 일어날 수 있다. 가능한 변이는 서열내 삽입, 결실 또는 치환을 체계적으로 만들고 생성된 변이체를 전장 또는 천연 성숙 서열의 활성에 대하여 검사함으로써 결정할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 단편이 또한 본 발명의 범주에 속한다. 그러한 폴리펩티드는 전장 천연 단백질과 비교시 N-말단 또는 C-말단이 절단되거나, 또는 내부 잔기들을 결한 것일 수 있다. 특정 단편은 본 발명 폴리펩티드의 원하는 생물학적 활성에 필수적이지 않는 아미노산 잔기들을 결한다.

폴리펩티드 단편은 수많은 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 원하는 펩티드 단편들은 화학적으로 합성될 수 있다. 다른 방법으로는, 효소적 절단, 예를 들어 특정 아미노산 잔기에 의해 정의된 부위에서 단백질을 절단하는 것으로 알려진 효소로 그 단백질을 처리하는 것 또는 DNA를 적당한 제한 효소로 절단하고 원하는 단편을 단리하는 것에 의하여 단

편을 생산할 수 있다. 또다른 적당한 기술로는, 중합화효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 원하는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 증폭시키고 단리하는 것을 수반한다. DNA 단편의 원하는 말단을 정의하는 올리고뉴클레오티드를 PCR에서 5' 및 3' 프라이머로서 사용한다. 바람직하게는 폴리펩티드 단편들은 본 발명 천연 폴리펩티드와 하나 이상의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 공유한다.

특정 실시양태에서 흥미로운 보존적 치환을 표1에 바람직한 치환이란 표제하에 도시한다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 가져온다면 표1에서 명명된 예시적인 치환 또는 표 아래의 아미노산 클래스별로 더욱 자세히 기술한 바와 같은 더욱 실질적인 변화를 도입하고 그 산물을 스크리닝한다.

표 1

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala(A)Arg(R)Asn(N)Asp(D)Cys(C)Gln(Q)GLu(E)Gly(G)His(H)Ile(I)Leu(L)Lys(K)Met(M)Phe(F)Pro(P)Ser(S)Thr(T)Trp(W)Tyr(Y)Val(V)	val; leu; ilelys; gln; asngln;his;lys;arggluserasnasppro; alaasn; gln; lys; argleu; val; met; ala; phe;norleucinenorleucine; ile; val; met; ala; phearg; gln; asnleu; phe; ileleu; val; ile; ala; tyralathr sertyr,phetrp; phe; thr;serile; leu; met; phe;ala; norleucine	vallysglngluseras naspalaargleuilea rgleuleualathrser tyrpheleu

본 발명 폴리펩티드의 기능 또는 면역적 상동성에서의 실질적인 개질은, (a) 예를 들어 시트 또는 헬릭스 구조와 같은, 치환 영역내 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지함에 있어서 영향이 현저하게 다른 치환을 선택함으로써 수행된다. 천연적으로 생성된 잔기들은 공통된 측쇄 특성에 따라 하기 그룹으로 구분된다.

(1) 소수성 : 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

(2) 중성 친수성: cys,ser, thr;

(3) 산성: asp, glu;

(4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

(5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

(6) 방향족: trp, tyr, phe.

비보존적 치환은 이들 클래스의 일원을 다른 클래스의 것으로 교환하는 것을 수반할 것이다. 이렇게 치환된 잔기들은 또한 보존적 치환 부위 또는 더욱 바람직하게는 나머지(비보존된) 부위내로 도입될 수 있다.

그 변이들은, 올리고뉴클레오티드 매개성(부위-지시적) 돌연변이, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이법과 같은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 부위-지시적 돌연변이[Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331(1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487(1987)], 카셋트 돌연변이법[Wells et al., Gene, 34:315(1985)], 제한효소 선택 돌연변이법[Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415(1986)] 또는 기타 공지된 기술들을 클로닝된 DNA에 사용하여 변이 DNA를 생산할 수 있다.

연속적 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 동정하기 위하여 스캐닝 아미노산 분석을 또한 사용할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산은 작고 중성인 아미노산이다. 그러한 아미노산으로는 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 알라닌이 베타 탄소를 넘는 측쇄를 제거하고 변이체의 주쇄 구조를 가장 적게 변화기키기 때문에[Cunningham and W

ells, Science, 244:1081-1085(1989)], 일반적으로 알라닌이 이 그룹 중 바람직한 스캐닝 아미노산이다. 또한 알라닌이 가장 흔한 아미노산이기 때문에 일반적으로 선호된다. 나아가, 알라닌이 숨겨진 부위 및 노출된 부위 모두에서 종종 발견된다[Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co. N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976)]. 만일 알라닌 치환이 적당한 양의 변이체를 만들지 않는다면 이소테릭 아미노산을 사용할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 공유적 개질도 본 발명의 범주에 포함된다. 공유적 개질의 한 유형으로는 본 발명 폴리펩티드의 표적 아미노산 잔기를 그 폴리펩티드의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응시킬 수 있는 유기 유도화제와 반응시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 발명 폴리펩티드를 항-폴리펩티드 항체를 정제하하는 방법에 사용되는 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 교차 연결시키거나 또는 그 반대를 위하여 2기능화제로 유도화하는 것이 유용하다. 일반적으로 사용되는 교차 연결제는 예를 들어, 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙시니미드 에스테르, 예를 들어, 4-아지도살리실산과의 에스테르, 예를 들어 3,3-디티오비스(숙시니미딜프로피오네이트)와 같은 디숙시니미딜 에스테르를 포함하는 호모2관능성이미도에스테르, 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 2관능성 말레이미드, 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질을 포함한다.

기타 개질로는, 글루타미닐 잔기 및 아스파라기닐 잔기들의 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 수산화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 히드록시기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 아미노기의 메틸화[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86(1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복시기의 아미드화를 포함한다.

본 발명의 범주에 포함되는 본 발명 폴리펩티드의 또다른 유형의 공유적 개질은 폴리펩티드의 천연적 글리코실화 패턴의 변화를 포함한다. " 천연적 글리코실화 패턴의 변화" 란, 천연 서열의 폴리펩티드에서 발견되는 탄수화물 부분의 하나 이상의 결실(글리코실화 부위의 제거, 또는 화학적 및(또는) 효소적 수단에 의한 글리코실화의 제거 중 하나의 방법으로) 및(또는) 천연 서열에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가를 의미한다. 또한, 상기 어구는 존재하는 다양한 탄수화물기의 특성 및 성질에서의 변화를 수반하는 천연 단백질 글리코실화에서의 정성적 변화를 포함한다.

폴리펩티드에 글리코실화의 첨가는 아미노산 서열의 개질에 의해 달성될 수도 있다. 그 개질은 예를 들어 천연 서열 폴리펩티드에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다(O-연결 글리코실화 부위를 위하여). 아미노산 서열은 임의적으로 DNA 수준에서의 개질을 통하여 변경될 수 있다. 특히, 폴리펩티드의 소정 염기 DNA를 돌연변이시켜 코돈을 생성하여 원하는 아미노산으로 번역되도록 함으로써 이루어질 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드상의 탄수화물 부분의 개수를 증가시키는 또다른 방법은 폴리펩티드에 글리코시드를 효소적 또는 화학적으로 커플링시키는 것에 의한다. 이러한 방법은 문헌[1987년 9월 11일 공개된 국제공개 제WO87/05330호; 및 Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp 259-306(1981)]에 기술되어 있다.

본 발명의 폴리펩티드상에 존재하는 탄수화물 부분의 제거는 화학적 또는 효소적으로, 또는 글리코실화의 표적으로 작용하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이적 치환에 의해 수행될 수 있다. 화학적 탈당화 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys.., 259:52(1987) 및 Edge et al., Anal. Biochem., 118:131(1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 부분의 효소적 절단은 토타쿠라의 문헌[Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350(1987)]에 기재된 바와 같은 다양한 엔도- 및 엑소- 글리코시다제의 사용으로 달성될 수 있다.

또다른 유형의 공유적 개질은, 미국특허 제4,640,835호, 제4,496,689호, 제4,301,144호, 제4,670,417호, 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 개시된 것과 같은 방법으로, 본 발명 폴리펩티드를 다양한 비단백질성 폴리머, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리프로필렌글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 연결하는 것을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드는 본 발명 폴리펩티드를 또다른 이형 폴리펩티드 또는 아미노산 서열과 융합하는 것을 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방법으로 개질될 수도 있다.

하나의 실시양태에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 선택적으로 결합하는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 본 발명 폴리펩티드의 융합을 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 본 발명 폴리펩티드의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 놓여진다. 본 발명 폴리펩티드의 이러한 에피토프 태그된 형태의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 에피토프 태그의 제공으로 본 발명 폴리펩티드는 항-태그 항체 또는 기타 유형의 에피토프 태그에 결합하는 친화성 매트릭스를 이용하는 친화도 정제에 의해 쉽게 정제될 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드 및 그들의 각 항체들이 당업계에 잘 알려져 있다. 예로는 폴리-히스티딘(poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신(poly-his-gly)태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그 항체 12CA5[Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165(1988)]; c-myc 태그 및 그 항체 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10[Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616(1985)] 및 허페스 심플렉스 바이러스 당단백질 D(gD) 태그 및 그 항체[Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553(1990)]를 포함한다. 기타 태그 폴리펩티드는, Flag-펩티드[Hopp et al., Biotechnology, 6:1204-1210(1988)], KT3 에피토프 펩티드[Martin et al., Science, 255:192-194(1992)]; 튜불린 에피토프 펩티드[Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166(1991)]; 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그[Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)] 등을 포함한다.

또다른 실시양태에서, 상기 키메라 분자는 본 발명 폴리펩티드와 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 부위와의 융합을 포함할 수 있다. 키메라 분자의 2가 형태(면역부착제라고도 불림)에 대하여는 이러한 융합은 IgG 분자의 Fc 부위에 대한 것일 수 있다. Ig 융합은 바람직하게는 Ig 분자내 하나 이상의 가변 영역 대신에 가용성 형태(막투과 도메인의 결실 또는 불활성화)의 본 발명 폴리펩티드의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 면역 글로불린 융합은 IgG1 분자의 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 부위를 포함한다. 면역글로불린 융합의 생산을 위하여는 1995년 6월 27일 특허된 미국 특허 제5,428,130호 참조.

i. 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 분리

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 폴리펩티드 mRNA를 가지며 검출할 수 있는 수준으로 이를 발현시키는 것으로 여겨지는 조직들로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 DNA는 실시예에 기술된 것과 같은, 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 얻을 수 있다.

라이브러리는 관심있는 유전자 또는 그것에 의해 코딩되는 단백질을 동정하기 위해 설계된 프로브 (본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체 또는 약 20-80개 이상의 염기로 된 올리고뉴클레오티드와 같은)로 스크린될 수 있다. 선별된 프로브로 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크린하는 것은 문헌 [Sambrook et al.,Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기술된 것과 같은, 통상적인 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 분리하는 또다른 수단은 PCR 방법 [Sambrook et al.,supra; Dieffenbach et al.,PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]를 사용하는 것이다.

하기 실시예는 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술을 기술한다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오티드 서열은 잘못된 양성이 최소화된 충분한 길이여야 하고 충분히 명확해야 한다. 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 이것이 스크린되는 라이브러리에 있는 DNA에 대한 혼성화에 의해 검출될 수 있도록 표지된다. 표지 방법은 당업계에 잘 알려져 있고,^{32} P-표지 ATP, 바이오티닐화 또는 효소 표지와 같은 방사성 표지의 사용을 포함한다. 적절한 엄격성 및 고엄격성을 포함한, 혼성화 조건은 상기 Sambrook 등의 문헌에 제공된다.

이러한 라이브러리 스크리닝 방법에서 동정된 서열은 젠뱅크 또는 다른 사설 서열 데이타베이스와 같은 공공 데이타베이스에 기탁되어 이용 가능한 다른 공지의 서열과 비교되고 정렬될 수 있다. 분자의 한정된 영역 내 또는 전장의 서열에 걸친 서열 상동성 (아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서)은 유사성을 측정하기 위해 다양한 연산 방식을 사용하는 얼라인 (ALIGN), 디엔에이스타 (DNAstar), 및 인헤리트 (INHERIT)와 같은 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 사용한 서열 정령을 통해 결정될 수 있다.

단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 본원의 처음에에 개시된 연역된 아미노산 서열을 사용하여 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있고, 필요하다면, 전구체를 검출하기 위해 상기 Sambrook 등의 문헌에 기술된 통상적인 프라이머 확정법을 사용하고 cDNA로 역전사될 수 없는 중간체를 프로세싱함으로써 얻어질 수 있다.

ii. 숙주 세포의 선별 및 형질 전환

속주 세포는 본 발명의 폴리펩티드 생성을 위해 본원에 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 트랜스펙션되거나 또는 형질 전환되고 프로모터를 유도하고, 형질 전환체를 선별하거나, 또는 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증식시키기에 적합하게 변화된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 배지, 온도, pH 등과 같은, 배양 조건은 불필요한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다. 일반적으로 세포 배양의 생산성을 최대화시키는 원리, 프로토콜, 및 실행 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, 편집 (IRL Press, 1991)] 및 상기 Sambrook 등의 문헌에 있다.

트랜스펙션 방법은 예를 들면, 당업자에게 알려져 있는 $CaPO_4$ 및 일렉트로포레이션 등이다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질 전환은 이러한 세포에 적합한 통상적인 기술을 사용하여 수행된다. 상기 Sambrook 등의 문헌에 기술된 바대로, 칼슘 클로라이드를 사용하는 칼슘 처리, 또는 일렉트로포레이션은 일반적으로 실질적인 세포벽 배리어를 함유하는 원핵 세포 또는 다른 세포에 대해 사용된다.Agrobacterium tumefaciens로의 감염은 문헌 [Shaw et al.,Gene,23:315 (1983) 및 1989년 6월 29일 공고된 WO 89/05859]에 기술된 바대로, 특정한 식물 세포의 형질 전환을 위해 사용된다. 이러한 세포벽이 없이 포유류 세포에 대해, 그라함 및 반 데르 에브 (Virology,52:456-457 (1978))의 칼슘 포스페이트 침강법이 사용될 수 있다. 포유류 숙주 세포계 형질 전환의 일반적인 면은 미국 특허 제 4,399,216호에 기술되었다. 효모로의 형질 전환은 대체로 문헌 [Van Solongen et al.,J. Bact.,130:946 (1977) 및 Hsiao et al.,Proc. Natl. Acad. Sci (USA),76: 3829 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 핵 마이크로인젝션, 일렉트로포레이션, 손상되지 않은 세포와의 박테리아 원형질 융합, 또는 폴리캐티온, 예를 들면, 폴리브렌, 폴리오니틴과 같은, DNA를 세포로 도입시키기 위한 다른 방법이 또한 사용될 수 있다. 포유류 세포를 형질 전환시키기 위한 다양한 기술에 대해, 문헌 [Keown et al.,Methods in Enzymology,185:527-537 (1990) 및 Mansour et al.,Nature,336:348-352 (1988)] 참조.

본원의 벡터에서 DNA를 클로닝하고 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포는 원핵 생물, 효모, 또는 고등 진핵 생물 세포를 포함한다. 적합한 원핵 생물은 그램 음성 또는 그램 양성 생물체와 같은 진정 세균 (eubacteria), 예를 들면,E. coli와 같은 장내 세균과의 세균 등을 포함한다.E. coliK12 균주 MM294 (ATCC 31,446);E. coliX1776 (ATCC 31,537);E. coli균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)와 같은, 다양한E. coli균주가 대중적으로 이용 가능하다.

원핵 생물에 덧붙여, 사상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다.Saccharomyces cerevisiae가 통상적으로 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다.

본 발명의 글리코실화된 폴리펩티드의 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 다세포 생물체로부터 유도된다. 무척추 동물 세포의 예는 초파리 S2 및 스포도프테라 (Spodoptera) Sf9과 같은 곤충 세포, 및 식물 세포를 포함한다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 중국 햄스터 난소 (CHO) 및 COS 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 예는 SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 형질 전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 293) 세포 (Graham et al.,J. Gen. Virol.,36:59 (1977)); 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, Urlaub 및 Chasin,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:4216 (1980)); 쥐 세르톨리씨 세포 (TM4, Mather,Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 및 쥐 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51)를 포함한다. 적합한 숙주 세포의 선별은 당업계의 기술 내에 있는 것으로 생각된다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 핵산 (예를 들면, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA 증식) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터로 삽입될 수 있다. 다양한 벡터가 대중적으로 이용 가능하다. 벡터는 예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자, 파아지미드 또는 파아지 형태일 수 있다. 적합한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해 벡터로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 적합한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)로 삽입된다. 벡터 성분은 일반적으로 1개 이상의 신호 서열, 복제원, 1개 이상의 마아커 유전자, 인헨서 입자, 프로모터, 및 전사 종결 서열 등을 포함한다. 1개 이상의 이들 성분을 함유하는 적합한 벡터의 구성은 당업자에게 알려진 통상적인 리게이션을 사용한다.

본 발명의 폴리펩티드는 직접 재조합적으로 생성될 뿐만 아니라 이형 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생성될 수 있고, 이는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특정 절단 부위를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드일 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터로 삽입되는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 및 열 안정성 엔테로톡신 II 리더로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해 신호 서열은 예를 들면, 효모 자당 분해 효소 리더, 알파 인자 리더 (Saccharomyces 및 Kluyneromyces 알파 인자 리더 포함, 후자는 미국 특허 제5,010,182호에 기술됨), 또는 산 포스파타제 리더, C. albicans 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일 공고된 EP 362,179), 또는 1990년 11우러 15일 공고된 WO 90/13646에 기술된 신호일 수 있다. 포유류 세포 발현에서, 포유류 신호 서열은 동일하거나 또는 관련 종에서 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열, 및 바이러스 분비 리더와 같은, 단백질의 분비를 위해 사용될 수 있다.

발현 및 클로닝 벡터 둘다는 1개 이상의 선별된 숙주 세포에서 벡터를 복제시킬 수 있는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모, 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제원은 대부분의 그램 음성 박테리아에 적합하고, 2u 플라스미드원은 효모에 대해 접합하고, 다양한 바이러스원 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유류 세포의 클로닝 벡터에 유용하다.

발현 및 클로닝 벡터는 대체로 선택 가능한 마아커로도 불리우는, 선택 유전자를 함유한다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 톡신, 예를 들면, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트, 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 주고, (b) 영양 요구성 결핍을 보충해주거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용 가능하지 않은 중요한 영양분, 예를 들면,Bacilli에 대해 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자를 공급해주는 단백질을 코딩한다.

포유류 세포에 대해 적합한 선택 가능한 마아커의 예는 DHFR 또는 티미딘 키나제와 같은, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 흡수하기 위해 경쟁적인 세포의 동정을 가능하게 해주는 것들이다. 야생형 DHFR이 사용될 때 적합한 숙주 세포는 문헌 [Urlab et al.,Proc. Natil. Acad. Sci. USA,77:4216 (1980)]에 기술된 바대로 제조되고 증식된 DHFR 활성이 부족한 CHO 세포주이다. 효모에서 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 [Stinchcomb et al.,Nature,282:39 (1979); Kingsman et l.,Gene,7:141 (1979); Tschemper et al.,Gene,10:157 (1980)].trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 없는 효모의 돌연변이 균주의 선택 유전자, 예를 들면, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1을 제공한다 [Jones,Genetics,85:12 (1977)].

발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 mRNA 합성을 지향하는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 알려져 있다. 원핵 숙주와의 용도를 위해 적합한 프로모터는 베타-락타마제 및 락토스 프로모터계 [Chang et al.,Nature,275:615 (1978); Goeddel et al.,Nature,281:544 (1979)], 알카리성 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터계 [Goeddel,Nucleic Acids Res.,8:4057 (1980); EP 36,776], 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터 [deBoer et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,80:21-25 (1983)]를 포함한다. 박테리아계에서의 용도를 위한 프로모터는 또한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된 샤인-달가르노 (S.D.)를 함유할 것이다.

효모 숙주와의 용도를 위해 적합한 프로모팅 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 [Hitzeman et al.,J. Biol. Chem.,255:2073 (1980)] 또는 에놀라제, 글리세랄데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이성질화 효소, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오세포스페이트 이성질화 효소, 포스포글루코스 이성질화 효소, 및 글루코키나제와 같은, 다른 해당 효소 [Hess et al.,J. Adv. Enzyme Reg.,7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]에 대한 프로모터를 포함한다.

성장 조건에 의해 조절된 전사의 추가 잇점을 갖는 유도 가능한 프로모터인, 다른 효모 프로모터는 알콜 디히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세랄데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 및 알토스 및 갈락토스 이용과 관련된 효소를 위한 프로모터 영역이다. 효모 발현에서의 용도를 위해 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기술된다.

포유류 숙주 세포에서의 벡터로부터의 본 발명 폴리펩티드의 전사는 예를 들면, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스 (1989년 7월 5일 공고된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (아데노바이러스 2와 같은), 소 유두종 바이러스, 닭 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 감염-B 바이러스 및 유인원 바이러스 40 (SV40)와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 예를 들면, 액틴 프로모터 또는 면역 글로불린 프로모터와 같은 이형 포유류 프로모터로부터, 및 열-쇼크 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 조절되는 데, 단 이러한 프로모터들이 숙주 세포계와 적합할 때 그러하다.

고등 진핵 생물에 의한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 전사는 벡터로 인헨서 서열을 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인헨서는 그의 전사를 증가시키기 위해 프로모터상에서 작용하는, 통상적으로 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-액팅 (cis-acting) 입자이다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유류 유전자로부터 알려져 있다 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-페토단백질, 및 인슐린). 그러나, 대체로, 인간들은 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 예는 복제원 (bp 100-270)의 후기 면상에 있는 SV 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제원의 후기 면상에 있는 폴리오마 인헨서를 포함한다. 인헨서는 본 발명의 폴리펩티드의 코딩 서열에 대해 5' 또는 3" 위치에서 벡터로 접합될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치된다.

진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 생물체로부터의 다른 핵 세포)에 사용된 발현 벡터는 또한 전사 종결 및 mRNA를 안정화시키기 위해 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진핵 또는 바이러스 DNA들 또는 cDNA들의 5' 비번역 영역 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 이용 가능하다. 이들 영역은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비역 부분에서 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 세그먼트를 함유한다.

재조합 척추 세포 배양에서 본 발명 폴리펩티드 합성을 채택하기 위해 적합한 또다른 방법, 벡터, 및 숙주 세포는 문헌 [Gething et al.,Nature,293:620-625 (1981); Mantei et al.,Nature,281:40-46 (1979); EP 117,060; 및 EP 117,058]에 기술되어 있다.

iii. 유전자 발현 검출

유전자 발현은 예를 들면, 통상적인 서던 블롯팅, mRNA 전사를 정량하기 위한 노던 블롯팅 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], 도트 블롯팅 (DNA 분석)에 의해, 또는 본원에 제공된 서열을 근거로 적합하게 표지된 프로브를 사용하여, 제자리 혼성화로 직접 샘플에서 측정될 수 있다. 선택적으로, 항체는 DNA 듀플렉스, RNA 듀플렉스, 및 DNA-RNA 하이브리드 듀플렉스 또는 DNA-단백질 듀플렉스를 포함한, 특정한 듀플렉스를 인식하는 것으로 사용될 수 있다. 교대로 항체가 표지될 수 있고 분석은 듀플렉스가 표면에 결합되는 곳에서 수행될 수 있어서, 표면상에서의 듀플렉스의 형성에 의해, 듀플렉스에 결합된 항체의 존재가 검출될 수 있다.

선택적으로, 유전자 발현은 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하기 위해서, 세포 또는 조직 부위의 면역 조직 화학적 염색 및 세포 배양 또는 체액 분석과 같은, 면역학적 방법에 의해 측정될 수 있다. 샘플 용액의 면역 조직 화학적 염색 및/또는 분석에 유용한 항체는 모노클론 또는 폴리클론일 수 있고, 포유 동물에 의해 제조될 수 있다. 편리하게는, 항체는 발명 폴리펩티드의 천연적 서열에 대하여 또는 본원에 제공된 DNA 서열에 근거한 합성 펩티드에 대하여 또는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하고 특정한 항체 에피토프를 코딩하는 DNA에 융합된 외인성 서열에 대하여 제조될 수 있다.

iv. 폴리펩티드의 정제

본 발명의 폴리펩티드의 형태는 배양 배지로부터 또는 숙주 세포 용균물로부터 회수될 수 있다. 막에 결합되면, 이는 적합한 세제 용액 (예를 들면, 트리톤-X 100)를 사용하여 또는 효소 절단에 의해 방출될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 발현에 사용되는 세포는 동결 융해 순환, 초음파, 기계적 분해, 또는 세포 용균제와 같은, 다양한 물리적 또는 화학적 수단에 의해 분해될 수 있다.

재조합 세포 또는 폴리펩티드로부터 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 하기 방법들은: 이온 교환 칼럼상에서의 분별법; 에탄올 침강법; 역상 HPLC; 실리카겔상 또는 DEAE와 같은 양이온 교환 수지상 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 암모늄 설페이트 침강법; 예를 들면, 세파덱스 G-75를 이용한 겔 여과법; IgG와 같은 오염물을 제거하는 단백질 A 세파로스 칼럼; 및 본 발명의 폴리펩티드의 에피토프-태그 형태를 결합시키는 킬레이팅 칼럼에 의한 적합한 정제 방법의 예이다. 단백질 정제를 위해 다양한 방법이 사용될 수 있고 이러한 방법은 당업계에 알려져 있고 예를 들면 문헌 [Deutscher,Methods in Enzymology,182(1990); Scopes,Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)]에 기술되어 있다. 선택된 정제 방법(들)은 예를 들면, 사용된 생성 방법의 특성 및 생성된 본 발명의 특정한 폴리펩티드의 성질에 의존할 것이다.

2. 조직 분포

본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 조직의 위치는 다양한 인간 조직에서의 mRNA 발현을 결정함으로써 동정될 수 있다. 이러한 유전자의 위치는 어떠한 조직이 본 발명의 폴리펩티드를 자극하고 억제하는 활성에 의해 영향을 받을 것인지에 대한 정보를 제공한다. 특정한 조직에서의 유전자의 위치는 또한 하기 논의된 활성 차단 분석을 위한 샘플 조직을 제공한다.

상기 주목된 바대로, 다양한 조직에서의 유전자 발현은, 선택적으로, 통상적인 서던 블롯팅, mRNA 전사를 정량하기 위한 노던 블롯팅 [Thomas,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980)], 도트 블롯팅 (DNA 분석)에 의해, 또는 본원에 제공된 서열을 근거로 적합하게 표지된 프로브를 사용하여, 제자리 혼성화에 의해 측정될 수 있다. 선택적으로, 항체는 DNA 듀플렉스, RNA 듀플렉스, 및 DNA-RNA 하이브리드 듀플렉스 또는 DNA-단백질 듀플렉스를 포함한, 특정한 듀플렉스를 인식할 수 있는 것이 사용될 수 있다.

다양한 조직에서의 유전자 발현은, 선택적으로, 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하기 위해서, 세포 또는 조직 부위의 면역 조직 화학적 염색 및 세포 배양 또는 체액 분석과 같은, 면역학적 방법에 의해 측정될 수 있다. 샘플 용액의 면역 조직 화학적 염색 및/또는 분석에 유용한 항체는 모노클론 또는 폴리클론일 수 있고, 포유 동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 항체는 본 발명의 폴리펩티드의 천연적 서열에 대하여 또는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열에 근거한 합성 펩티드에 대하여 또는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하고 특정한 항체 에피토프를 코딩하는 DNA에 융합된 외인성 서열에 대하여 제조될 수 있다. 항체 생성의 일반적인 방법, 및 노던 블롯팅의 특별한 프로토콜 및 제자리 혼성화가 하기에 제공된다.

3. 항체 결합 연구

본 발명의 폴리펩티드의 활성은 조직 세포에 대한 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 효과를 억제하는 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체의 능력이 시험되는 항체 결합 연구에 의해 추가로 명확해질 수 있다. 항체의 예는 폴리클론 항체, 모노클론 항체, 인간화된 항체, 2이특이성 항체, 및 이형 컨쥬게이트 항체를 포함하고, 이의 제조는 본원 하기에 기술될 것이다.

항체 결합 연구는 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역 침강 분석과 같은 공지의 분석 방법으로 수행될 수 있다. Zola,Monoclonal Antibodies: A Manual of Technique, 페이지 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

경쟁적 결합 분석은 제한된 양의 항체와의 결합에 대해 시험 샘플 분석물과 경쟁하는 표지된 표준 물질의 능력에 의존한다. 시험 샘플에서의 표적 단백질의 양은 항체에 결합하게 되는 표준 물질의 양에 역비례한다. 결합하게 되는 표준 물질의 양을 결정하는 것을 용이하게 하기 위해, 항체는 바람직하게는 경쟁 이전 또는 이후에 불용화되어, 항체에 결합된 표준 물질 및 분석물은 편리하게는 결합되지 않은 채로 남아있는 표준 물질 및 분석물로부터 분리될 수 있다.

샌드위치 분석은 검출되는 단백질의 상이한 면역원 부위, 또는 에피토프에 각각 결합할 수 있는, 2개의 항체 사용을 포함한다. 샌드위치 분석에서, 시험 샘플 분석물은 고체 지지대 상에 부동화된 제1 항체에 의해 결합되고, 이후 제2 항체는 이 분석물에 결합하고, 이로 인해 불용성 3부분 복합체를 형성하게 된다. 미국 특허 제4,376,110호 참조. 제2 항체는 스스로 검출 가능한 잔기로 표지될 수 있거나 (직접 샌드위치 분석), 또는 검출 가능한 잔기로 표지된 항-면역 글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다 (간접 샌드위치 분석). 예를 들면, 샌드위치 분석의 한 형태가 ELISA 분석이고, 이 경우에 검출 가능한 잔기는 효소이다.

면역 조직 화학을 위해, 조직 샘플은 신선한거나 또는 동결될 수 있거나 또는 파라핀에 끼워질 수 있고 포르말린과 같은 보존제로 응고될 수 있다.

4. 세포-기저 분석

면역 관련 질병을 위한 세포-기저 분석 및 동물 모델은 본원에 동정된 유전자와 폴리펩티드 사이의 관계 및 면역 관련 질환의 개발 및 병리 발생을 추가로 이해하기 위해 사용될 수 있다.

다른 연구에서, 특정한 면역 관련 질환에 관여되는 것으로 알려진 세포 유형의 세포들이 본원에 기술된 cDNA들로 트랜스펙션되고, 면역 기능을 자극하고 억제하는 이들 cDNA의 능력이 분석된다. 적합한 세포들이 바람직한 유전자로 트랜스펙션되고, 면역 기능 분석을 위해 관찰될 수 있다. 이러한 트랜스펙션된 세포주는 이후 예를 들면, T-세포 증식 또는 염증 세포 침윤을 조절하는 면역 반응을 자극하고 억제하는 폴리- 또는 모노클론 항체 또는 항체 조성물의 능력을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 동정된 유전자의 코딩 서열로 트랜스펙션된 세포는 면역 관련 질병의 치료를 위한 의약품 후보 물질을 동정하기 위해 추가로 사용될 수 있다. 또한, 안정한 세포주가 바람직하지만, 트랜스제닉 동물 (하기 기술된)로부터 유도된 1차 배양액이 본원의 세포-기저 분석에서 사용될 수 있다. 트랜스제닉 동물로부터 연속적 세포주를 유도시키는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들면, Small et al.,Mol. Cell. Bio.,5, 642-648 (1985)).

하나의 적합한 세포 기저 분석이 혼합된 림프구 반응 (MLR)이다. Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Joh n Wiley & Sons, Inc. 출판. 이 분석에서, 활성화된 T 세포의 증식을 자극하는 시험 화합물의 능력이 분석된다. 반응자 T 세포의 현탁액은 알로겐 자극자 세포와 배양되고 T 세포의 증식은 삼중 수소화 티미딘의 흡수에 의해 측정된다. 이 분석은 T 세포 반응성의 일반적 측정법이다. 대부분의 T 세포가 반응하여 활성화됨에 따라 IL-2를 생성하므로, 이 분석에서의 반응성 차이는 부분적으로 반응 세포에 의한 IL-2 생성 차이를 반영한다. MLR 결과는 통상적인 림포카인 (IL-2) 검출 분석에 의해 명확해 질 수 있다. 상기 Current Protocols in Immunology, 3.15, 6.3.

MLR 분석에서 증식 T 세포 반응은 분석된 분자의 직접적인 미토겐 성질 또는 외부 항원 유도 활성화에 의존할 수 있다. 본 발명 폴리펩티드의 T 세포 자극 활성의 추가의 입증은 공자극 분석에 의해 얻어질 수 있다. 세포 활성화는 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 매개되는 항원 특이적 신호 및 제2 리간드 결합 상호작용 예를 들면, B7(CD80, CD86)/CD 28 결합 상호작용을 통해 매개되는 공자극 신호를 필요로 한다. CD28 교차 연결은 활성화된 T 세포에 의한 림포카인 분비를 증가시킨다. T 세포 활성화는 음성적 또는 양성적 효과를 갖는 리간드의 결합을 통한 음성 및 양성 대조군 둘다를 갖는다. CD28 및 CTLA-4는 B7에 결합하는 Ig 초군에 있는 관련 당단백질이다. B7에 결합하는 CD28은 T 세포 활성화의 양성 공자극 효과를 갖고; 역으로, B7에 결합하는 CTLA-4는 음성 T 세포 불활성화 효과를 갖는다. Chamn ers, C. A. 및 Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71:1065; Lin sey, P. S. 및 Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993); June, C. H. et al., Immunol. Today (1994) 15 :321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405. 공자극 분석에서, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 공자극 또는 억제 활성에 대해 분석된다.

본 발명의 폴리펩티드, 및 본 발명의 다른 화합물은 T 세포 증식의 자극자 (공자극자)이며 MLR 및 공자극 분석에 의해 결정된, 항체, 예를 들면, 작용제 항체이고, 열악하고, 최적이 아니거나 또는 부적합한 면역 기능에 의해 특징화되는 면역 관련 질병 치료에 유용하다. 이들 질병은 T 세포 (및 T 세포 매개 면역성)의 증식 및 활성화를 자극시키고 본 발명의 자극 폴리펩티드와 같은, 자극 화합물의 투여를 통해 포유 동물에서의 면역 반응을 증가시킴으로써 치료된다. 자극 폴리펩티드는 예를 들면, PRO245, PRO217, PRO301, RPO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드 또는 이를 위한 작용제 항체일 수 있다.

본 발명에서와 같은 자극 화합물의 직접적 용도는 프라임된 T 세포상에 발현되는 리간드 (4-1BBL) 및 신호 T 세포 활성화 및 성장에 결합하는,괴사 인자 수용체군의 한 요소인, 4-1BB 당단백질로의 실험으로 확인되었다. Alderson, M. E. et al., J. Immunol. (1994) 24:2219.

작용제 자극 화합물의 용도가 또한 실험적으로 확인되었다. 작용제 항4-1BB항체 처리에 의한 4-1BB 활성화는 종양 박멸을 증가시킨다. Hellstrom, I. 및 Hellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18:1. 하기 더욱 상세히 기술된, 종양 치료를 위한 면역 보조제 요법은 본 발명의 자극 화합물의 용도의 또다른 예이다.

면역 자극 또는 증가 효과는 또한 MLR 분석에서 억제하는 것으로 나타난 단백질의 활성을 길항하거나 또는 차단함으로써 얻어질 수 있다. 화합물의 억제 활성을 없애는 것은 실질적 자극 효과를 생성시킨다. 적합한 질항제/차단 화합물은 억제 단백질을 인식하고 결합하여, 단백질과 수용체의 효과적인 상호작용을 차단하고 수용체를 통한 신호화를 억제하게 되는 항체 또는 그의 단편이다. 이 효과는 T 세포 증식을 증가시키는 항-CTLA-4 항체를 사용하는 시험으로 추측컨대, CTLA-4 결합에 의해 야기되는 억제 신호 제거에 의해 확인되었다. Waluna, Y. L. et al., Immunity (1994) 1: 405.

한편, 본 발명의 폴리펩티드, 및 본 발명의 다른 화합물은 T 세포 증식/활성화 및/또는 림포카인 분비의 직접적 억제제이며, 면역 반응을 억제하기 위해 직접적으로 사용될 수 있다. 이들 화합물은 면역 반응 정도를 감소시키고 과반응성, 초적성, 또는 자가 면역 반응에 의해 특징화된 면역 관련 질병을 치료하기에 유용하다. 본 발명의 화합물의 이러한 용도는 수용체 B7에 결합하는 CTLA-4가 T 세포를 불활성화시키는 상기 기술된 실험에 의해 확인되었다. 본 발명의 직접적인 억제 화합물은 유사한 방식으로 작용한다.

선택적으로, 본 발명의 자극 폴리펩티드에 결합하고 이들 분자의 자극 효과를 차단하는 화합물, 예를 들면 항체는 실질적 억제 효과를 생성시키고 T 세포 증식/활성화 및/또는 림포카인 분비를 억제함으로써 T 세포 매개 면역 반응을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 자극 효과를 차단하는것은 포유 동물의 면역 반응을 억제시킨다. 이러한 용도는 항-IL2 항체를 사용한 실험으로 확인되었다. 이들 실험에서, 항체는 IL2에 결합하고 그 수용체에 대한 IL2의 결합을 차단하여 T 세포 억제 효과를 얻게 된다.

5. 동물 모델

세포 기저 시험관 내 분석의 결과는 생체 내 동물 모델 및 T 세포 기능 분석을 사용하여 추가로 확인되었다. 잘 알려져 있는 다양한 동물 모델이 면역 관련 질병의 개발 및 병리 발생에 있어서 본원에서 동정된 유전자의 역할을 추가로 이해하고, 항체, 및 작은 분자 길항체를 포함한, 천연 폴리펩티드의 다른 길항체를 포함한, 후보 치료체 효능을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 모델의 생체 내 성질은 인간 환자에서의 반응을 예견해 준다. 면역 관련 질병의 동물 모델은 비재조합 및 재조합 (형질 전환) 동물 둘다를 포함한다. 비재조합 동물은 예를 들면, 설치류 예를 들면, 쥐 모델을 포함한다. 이러한 모델은 통상적인 기술, 예를 들면, 피하 주사, 꼬리 정맥 주사, 비장 이식, 복강 내 이식, 신장 캡슐하 이식 등을 사용하여 동시 생성 쥐로 세포를 도입시킴으로써 생성될 수 있다.

면역 경쟁 세포가 면역 억제 또는 내성 환자에게 이식될 때 이식편대 숙주 질병이 발생한다. 공여 세포는 숙주 항원을 인식하고 이에 반응한다. 반응은 생명을 위협하는 심각한 염증에서부터 설사 및 체중 감소의 경미한 경우까지 다양할 수 있다. 이식편대 숙주 질병 모델은 MHC 항원 및 소수의 이식 항원에 대한 T 세포 반응성을 평가하는 수단을 제공한다. 적합한 방법은 상기 문헌 [Current Protocols, unit 4.3]에 상세히 기술되어 있다.

피부 동종 이식 거부 반응에 대한 동물 모델은 생체 내 조직 파괴를 매개하는 T 세포의 능력을 시험하는 수단이고 이식 거부 반응에서의 이들의 역할에 대한 측정이다. 가장 통상적으로 수용되는 모델은 위 꼬리-피부 이식을 사용한다. 반복 실험은 피부 동종 이식 거부 반응이 항체가 아닌 T 세포, 헬퍼 T 세포 및 킬러-작용 T 세포에 의해 매개된다. Auchincloss, H. Jr. 및 Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 제2판, W. E. Paul 편집, Raven Press, NY, 1989, 889-992. 적합한 방법은 상기 문헌 [Current Protocols in Immunology, unit 4.4]에 기술되어 있다. 본 발명의 화합물을 시험하기 위해 사용될 수 있는 다른 이식 거부 반응 모델은 문헌 [Tanabe, M.. et al., Transplantation (1994) 58:23 및 Tinubu, S. A. et al., J. Immunol. (1994) 4330-4338]에 기술된 동종 심장 이식 모델이다.

지연된 형태의 과민성 동물 모델은 마찬가지로 세포 매개 면역 기능 분석을 제공한다. 지연된 형태의 과민성 반응은 항원으로 공격된 후 시간이 경과된 후까지의 피크에 도달하지 않은 염증에 의해 특징화된 T 세포 매개 생체 내 면역 반응이다. 이들 반응은 또한 복합 경화증 (MS) 및 실험적 자가 면역 뇌막 척수염 (EAE, MS를 위한 모델)과 같은 조직 특이적 자가 면역 질병에서 발생한다. 적합한 방법은 상기 문헌 [Current Protocols, unit 4.5]에 상세히 기술되어 있다.

EAE는 T 세포 및 단핵 세포 염증 및 이후 중추 신경계에서의 축색 돌기의 탈수초화에 의해 특징화된 T 세포 매개 자가

면역 질병이다. EAE는 일반적으로 인간에서 MS의 관련 동물 모델인 것으로 고려된다. Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143. 정확하고 릴랍싱-리미팅 (relapsing-remitting) 모델이 개발되었다. 본 발명의 화합물은 상기 문헌 [Current Protocols in Immunology, unit 15.1 및 15.2]에 기술된 프로토콜을 사용하여 면역 매개 탈수초화 질병에 대한 T 세포 자극 또는 억제 활성에 대해 시험될 수 있다. 또한 올리고덴드로사이트 또는 슈완 세포가 문헌 [Duncan, I. D. et al., Molec. Med. Today (1997) 554-561]에 기술된 바대로 중추 신경계로 이식되는 수초 질병을 위한 모델 참조.

접촉 과민성은 세포 매개 면역 기능의 생체 내 분석에서 단순한 지연된 형태의 과민성이다. 이 방법에서, 지연된 형태의 과민성 반응을 일으키는 외인성 불완전 항원에 대한 피부 노출이 측정되고 정량화되었다. 접촉 민감성은 초기 감작상에 이어 유발상을 포함한다. 유발상은 T 림프구가 이들이 이전에 접촉했던 항원을 만날 때 일어난다. 부어오름 및 염증이 발생하여 인간 알레르기 접촉 피부염의 우수한 모델이 된다. 적합한 방법은 문헌 [Current Protocols in Immunology, J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach 및 W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unit 4.2]에 상세히 기술되어 있다. 또한 Grabbe, S. 및 Schwartz, T.,Immun. Today19(1):37-44 (1998) 참조.

관절염의 동물 모델은 콜라겐-유도 관절염이다. 이 모델은 인간 자가 면역 류마티스성 관절염의 조직학 및 면역학적 특성을 갖고 인간의 자가 면역 관절염의 허용 가능한 모델이다. 생쥐 및 쥐 모델은 활막염, 연골 및 연골하 골의 침식에 의해 특징화된다. 본 발명의 화합물은 상기 문헌 [Current Protocols in Immunology, unit 15.5]에 기술된 프로토콜을 사용하여 자가 면역 관절염에 대한 활성이 시험될 수 있다. 또한 문헌 [Issekutz, A. C. et al., Immunology (1996) 88:569]에 기술된 CD18 및 VLA-4 인테그린에 대한 모노클론 항체를 사용한 모델 참조.

항원 유도 기도 과반응성, 폐 호산구증다증 및 염증이 오브알부민으로 동물을 감작시키고 이후 에어로졸에 의해 전달된 동일한 단백질로 동물을 공격함으로서 유도된 천식 모델이 기술되었다. 몇몇 동물 모델 (기니아 피그, 쥐, 비인간 영장류)은 에어로졸 항원으로 공격함으로써 인간에서 아토피성 천식과 유사한 증후를 나타낸다. 쥐 모델은 인간 천식의 많은 특징을 갖는다. 천식 치료에서의 활성 및 유효성에 대한 본 발명 화합물을 시험하기 위한 적합한 방법은 문헌 [Wolyniec, W. W. et al., Am. J. Respir. CEll Mol. Biol. (1998) 18:777] 및 본원에 인용된 참고 문헌에 기술되어 있다.

또한, 본 발명의 화합물은 건선류 질병의 동물 모델상에서 시험될 수 있다. 증거는 건선에 대해서 T 세포 병리 발생을 제안한다.

본 발명의 화합물은 문헌 [Schon, M. P. et al., Nat. Med. (1997) 3:183]에 의해 기술된 scid/scid 쥐 모델에서 시험될 수 있고, 여기서 쥐는 건선을 닮은 조직 병리학적 피부 병변을 설명한다. 또다른 적합한 모델은 문헌 [Nickoloff, B. J. et al., Am. J. Path. (1995) 146:580]에 기술된 바대로 제조된 인간 피부/scid 쥐 키메라 (chimera)이다.

재조합 (형질 전환된) 동물 모델은 형질 전환 동물을 생성하는 통상적인 기술을 사용하여 관심있는 동물의 게놈에 본원에서 동정된 유전자의 코딩 부분을 도입함으로써 제조될 수 있다. 형질 전환 조작을 목적으로 작용할 수 있는 동물은 제한 없이, 생쥐, 쥐, 토끼, 기니아 피그, 양, 염소, 돼지, 및 비인간 영장 동물, 예를 들면, 비비, 침팬지 및 원숭이를 포함한다. 이러한 동물에게 형질 유전자를 도입하기 위한 당업계 공지 기술은 프로뉴클레익 마이크로인젝션 (Hoppe 및 Wanger, 미국 특허 제4,873,191호); 배아주로의 레트로바이러스-매개 유전자 전이 (예를 들면, Van der Putten et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA82, 6148-615 [1985]); 배아 주세포에서의 유전자 표적화 (Thompson et al.,Cell 56, 313-321 [1989]); 배아의 일렉트로포레이션 (Lo,Mol. Cel. Biol.3, 1803-1814 [1983]); 정자 매개 유전자 전이 (Lavitrano et al.,Cell57, 717-73[1989])를 포함한다. 고찰을 위해, 예를 들면, 미국 특허 제4,736,866호 참조.

본 발명의 목적을 위해, 형질 전환 동물은 이들의 세포의 부분으로만 트랜스젠(transgene)을 운반하는 것들을 포함한다 (" 모자이크 동물"). 트랜스젠은 단일 트랜스젠으로서, 또는 콘타머 (concatamer)로서, 예를 들면 헤드-투-헤드 또는 헤드-투-테일 텐덤으로 통합될 수 있다. 특정한 세포 유형으로의 형질 유전자의 선택적인 도입은 또한 하기, 예를 들면, 문헌 [Lasko et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA89, 6232-636 (1992)]의 기술에 의해 가능하다.

형질 전환 동물에서 트랜스젠의 발현은 통상적인 기술에 의해 관찰될 수 있다. 예를 들면, 서던 블롯 분석 또는 PCR 증폭이 형질 유전자의 통합을 확인하기 위해 사용될 수 있다. mRNA 발현 수준은 이후 제자리 혼성화, 노던 블롯 분석, PCR, 또는 면역 세포 화학과 같은 기술을 사용하여 분석될 수 있다.

동물은 예를 들면 특정한 세포로의 면역 세포의 침투를 결정하기 위한 조직학적 조사에 의해, 면역 질병 병리 신호가 추가로 조사될 수 있다. 또한 형질 전환 동물이 본 발명 화합물의 T 세포 증식 자극 또는 억제 정도를 결정하기 위해 본 발명 화합물로 처리되는 차단 실험이 또한 수행될 수 있다. 이들 실험에서, 상기 기술된 바대로 제조된, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 차단 항체는 동물에게 투여되어 면역 기능에 대한 효과가 결정된다.

선택적으로, " 녹 아웃 (knock out)" 동물은 폴리펩티드를 코딩하는 내인성 유전자와 동물의 배아 세포로 도입된 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 개질된 게놈 DNA 사이의 이형 재조합 결과로, 본원에 동정된 폴리펩티드를 코딩하는 결함이 있거나 또는 개질된 유전자를 갖는 것으로 해석될 수 있다. 예를 들면, 특정한 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA는 확립된 기술에 따라 그 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 폴리펩티드를 코딩하는 게놈 DNA의 한 부분은 삭제되거나 또는 통합을 관찰하기 위해 사용될 수 있는 선택 가능한 마아커를 코딩하는 유전자와 같은, 또다른 유전자로 대체될 수 있다. 대체로, 개질되지 않은 플랭킹 (flanking) DNA (5' 및 3' 말단에서 모두)의 몇몇 킬로베이스가 벡터에 포함된다 [이형 재조합 벡터의 설명을 위해, 예를 들면, Thomas 및 Capecchi,Cell,51:503 (1987) 참조]. 벡터는 배아 주 세포주 (예를 들면, 일렉트로포레이션에 의해)로 도입되고 도입된 DNA가 내인성 DNA와 이형적으로 재조합된 세포가 선택된다 [예를 들면, Li et al.,Cell,69:915 (1992) 참조]. 선택된 세포는 이후 응집 키메라를 형성하기 위해 동물 (예를 들면, 생쥐 또는 쥐)의 미분화 세포로 주입된다 [예를 들면, Bradley,Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach, E. J. Robertson 편집, (IRL, Oxford, 1987), 페이지 113-152 참조]. 키메라 배아는 이후 적합한 위임신한 암컷 유모 동물에 이식될 수 있고 배아는 " 녹 아웃" 동물을 얻기 위해 텀으로 이동되었다. 이들의 배아 세포에서 동형 재조합된 DNA를 프로제니 하버링(progeny harboring)하는 것은 통상의 기술에 의해 동정되고 동물의 모든 세포가 동형 재조합 DNA를 함유하는 동물을 번식시키기 위해 사용될 수 있다. 녹아웃 동물은 예를 들면, 특정한 병리학적 상태에 대항하여 보호하는 이들의 능력 및 폴리펩티드의 부재에 의한 병리학적 상태의 개발을 위해 특징화될 수 있다.

6. 면역 보조 요법

하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역 자극 화합물은 종양 (암) 치료를 위한 면역 보조 요법에서 사용될 수 있다. MAGE, BAGE 및 GAGE 유전자군에 의해 코딩된, 한 군의 종양 항원은 모든 성인 정상 조직에서 무반응이지만, 흑색종, 폐암, 두암, 목암, 및 방광암과 같은 종양에서 현저한 양으로 발현된다. DeSmet, C. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7149. T 세포의 공자극이 종양 퇴행 및 시험관 내 및 생체 내 모두에서 항종양 반응을 유도하는 것으로 나타났다. Melero, I. et al., Nature Medicine (1997) 3:682::::; Kwon, e. D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:8099; Lynch, D. H. et al., Nature Medicine (1997) 3:625; Finn, O. J. 및 Lotze, M. T., J. Immunol. (1998) 21:114. 본 발명의 자극 화합물은 T 세포 증식/활성화 및 종양 항원에 대한 항종양 반응을 자극하기 위해 보조제로서 단독으로, 또는 성장 조절제, 세포 독성제 또는 화학 요법제와 함께 투여될 수 있다. 성장 조절제, 세포 독성제, 또는 화확 요법제는 공지의 투여 방법을 사용하여 통상의 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물에 의한 면역 자극 활성은 성장 조절제, 세포 독성제, 또는 화학 요법제의 양을 감소시켜 주어 환자의 독성을 잠재적으로 낮추어 준다.

7. 의약 후보의 스크리닝 분석

의약 후보를 위한 스크리닝 분석은 본원에 동정된 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 생물학적으로 활성인 그의 단편과 결합하거나 또는, 복합체를 이루거나, 또는 그렇지 않으면 다른 세포 단백질와 코딩된 폴리펩티드의 상호작용을 방해하는 화합물을 동정하기 위해 설계된다. 이러한 스크린 분석은 화학 라이브러리의 높은 효율의 스크리닝으로 수정할 수 있는 분석을 포함할 것이므로, 이들이 소분자 의약 후보를 동정하기에 특히 적합하게 할 것이다. 포함된 소분자는 펩티드, 바람직하게는 용성 펩티드, (폴리)펩티드-면역 글로불린 융합물을 포함한, 합성 유기 또는 무기 화합물, 및 특히, 제한 없이, 폴리- 및 모노클론 항체 및 항체 단편, 단일쇄 항체, 항전유전 물질형 항체, 및 키메라 또는 인간화된 형태의 이러한 항체 또는 단편, 및 인간 항체 및 항체 단편을 포함한, 항체를 포함한다. 분석은 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석 및 세포 기저 분석을 포함한, 다양한 형태로 수행될 수 있고, 이는 당업계에 잘 특징화되어 있다.

모든 분석은 본원에 동정된 핵산에 의해 코딩된 폴리펩티드와 의약 후보가 이들 2개의 성분들이 상호작용하기에 충분한 조건 및 시간 동안 접촉시키는 것을 필요로한다는 점에서 통상적이다.

결합 분석에서, 상호작용은 결합하는 것이고 형성된 복합체는 반응 혼합물에서 분리되거나 또는 검출될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 동정된 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 의약 후보는 고체상, 예를 들면, 마이크로타이터 판사에 공유 또는 비공유 부착에 의해 부동화된다. 비공유 부착은 일반적으로 폴리펩티드 용액으로 고체 표면을 코팅하고 건조함으로써 이루어진다. 선택적으로, 부동화되는 폴리펩티드에 특이적인, 부동화 항체, 예를 들면 모노클론 항체는 이것을 고체 상에 정착시키기 위해 사용될 수 있다. 이 분석은 부동화되지 않은 성분을 첨가함으로써 수행되고, 이는 부동화된 성분에 예를 들면, 정착된 성분을 함유하는 코팅 표면에 검출 가능한 표지로 표지될 수 있따. 반응이 완결되면, 비반응 성분은 예를 들면, 세척에 의해 제거되고, 고체 표면에 부착된 복합체가 검출된다. 원래 부동화되지 않은 성분은 검출 가능한 표지를 가질 때, 표면상의 부동화되지 않은 표지 검출은 복합체 형성이 일어났음을 보여준다. 원래 부동화되지 않은 성분이 표지를 갖지 않을 때, 복합체 형성은 예를 들면, 부동화된 복합체를 특이적으로 결합시키는 표지 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

후보 화합물이 본원에 동정된 유전자에 의해 코딩된 특정한 단백질에 결합하지는 않으나 상호작용하면, 이 단백질과의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용 검출을 위해 잘 알려진 방법에 의해 분석될 수 있다. 이러한 분석은 교차 연결, 공면역 침강, 및 구배를 통한 공정제 또는 크로마토그래피 칼럼과 같은, 전통적인 방법을 포함한다. 또한, 단백질-단백질 상호작용은 체브레이 및 나탄스 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA89, 5789-5793 (1991)]에 의해 개시된 바대로 필드 및 동료들 [Fields 및 Song,Nature (London)340, 245-246 (1989); Chien et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA88, 9578-9582 (1991)]에 의해 기술된 효모 기저 유전자계를 사용하여 관찰될 수 있다. 효모 GAL4와 같은, 많은 전사 활성화제는 2개의 물리적으로 이산된 모듈라 도메인으로 구성되고, 하나는 DNA-결합 도메인으로 작용하는 반면, 다른 하나는 전사 활성화 도메인으로 작용한다. 상기 출판물에 기술된 효모 발현계 (일반적으로 "2-하이브리드계")는 이런 속성의 잇점을 갖고, 2개의 하이브리드 단백질을 사용하는데, 하나는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합되는 것이고, 또다른 하나는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합되는 것이다. GAL4-활성화 프로모터의 조절 하에 있는 GAL1-lacZ 리포터의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 의존한다. 상호작용하는 폴리펩티드를 함유하는 콜로니는 베타-갈락토시다제의 염색체 기질로 검출된다. 2-하이브리드 기술을 사용한 2개의 특이적 단백질 사이의 단백질-단백질 상호작용을 동정하기 위한 완전한 키트 (매치메이커 (MATCHMAKER))는 클론테크로부터 상업적으로 이용 가능하다. 이 계는 또한 특이적 단백질 상호작용에 포함된 단백질 도메인을 지도화하고 이들 상호작용에 중요한 아미노산 잔기의 위치를 나타내기 위해 확장될 수 있다.

본원에 동정된 유전자의 상호작용 및 시험될 수 있는 다른 세포 내- 또는 세포 외 성분의 상호작용을 방해하는 화합물을 찾기 위해, 반응 혼합물은 통상적으로 유전자 및 세포 내- 또는 세포 외 성분의 생성물을 이 2개의 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 및 시간 동안 함유하도록 제조된다. 결합을 억제하는 시험 화합물의 능력을 시험하기 위해, 반응은 시험 화합물의 부재 및 존재하에서 이루어진다. 또한, 플라세보가 양성 대조군으로 작용하는, 제3의 반응 혼합

물에 첨가될 수 있다. 시험 화합물과 혼합물에 존재하는 세포 내- 또는 세포 외 성분 사이의 결합 (복합체 형성)상기 기술된 바대로 관찰된다. 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물에서가 아니라 대조 반응(들)에서의 복합체 형성은 시험 화합물이 이 시험 화합무과 그의 반응 상대 물질과의 상호작용을 방해한다는 것을 나타낸 준다.

8. 면역 관련 질환 치료용 조성물 및 치료 방법

면역 관련 질병의 치료에 유용한 조성물은 면역 기능, 예를 들면, T 세포 증식/활성화, 림포카인 방출, 또는 면역 세포 침투를 억제하거나 도는 자극하는 항체, 작은 유기 및 무기 분자, 펩티드, 포스포펩티드, 안티센스 및 리보자임 분자, 3중 헬릭스 분자 등을 제한 없이 포함한다.

예를 들면, 안티센스 RNA 및 RNA 분자는 표적 mRNA에 혼성화하고 단백질 번역을 직접적으로 방지하기 위해 작용한다. 안티센스 DNA가 사용될 때, 예를 들면, 표적 유전자 뉴클레오티드 서열의 -10과 +10 위치 사이의 번역 초기화 부위로부터 유도된 올리고데옥시리보뉴클레오티드가 바람직하다.

리보자임은 RNA의 특이적 절단을 촉매화할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 리보자임은 상보적 표적 RNA에 서열-특이적 혼성화하고, 이어 엔도뉴클레오라이틱 절단함으로써 작용한다. 잠재적 RNA 표적 내 특정한 리보자임 절단 부위는 공지 기술에 의해 동정될 수 있다. 더욱 상세한 것을 위해, 문헌 [Rossi, Current Biology 4, 469-471 (1994)] 및 PCT 공개 번호 WO 97/33551 (1997년 9월 18일 공고됨) 참조.

전사를 억제하기 위해 사용되는 3중 헬릭스 형성에 있어서 핵산 분자는 단일 스트랜드이어야 하고 데옥시뉴클레오티드로 구성된다. 이들 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 이것이 후그스틴 염기 쌍 규칙 (Hoogsteen base pairing rules)을 통해 3중 헬릭스 형성을 증진시키도록 설계되고, 이는 일반적으로 듀플렉스의 한 스트랜드 상에 퓨린 또는 피리미딘의 상당한 크기의 스트레치를 필요로 한다. 더욱 상세한 사항을 위해, 상기 PCT 공개 번호 WO 97/33551 참조.

이들 분자는 상기 논의된 스크린닝 분석 또는 그의 조합에 의해서 및/또는 당업자에게 잘 알려진 다른 스크리닝 기술에 의해 동정될 수 있다.

9. 항체

본 발명의 따른 가장 유망한 의약 후보 중 몇몇은 T 세포 증식, 호산구 침투 등을 억제 (길항제)하거나 또는 자극 (작용제)할 수 있는 항체 및 항체 단편이다.

i. 폴리클론 항체

폴리클론 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 폴리클론 항체는 포유 동물에서, 예를 들면, 면역제 및, 바람직하다면 보조제를 1번 이상 주사하여 증가시킬 수 있다. 대체로, 면역제 및/또는 보조제는 다수의 피하 또는 복강내 주사에 의해 포유 동물에 주입될 것이다. 면역제는 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 면역화되는 포유 동물에서 면역원인것으로 알려진 단백질에 면역제를 콘쥬게이트하는 것이 유용할 수 있다. 이러한 면역원 단백질의 예는 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 및 대두 트립신 억제제 등을 포함한다. 사용될 수 있는 보조제의 예는 프레운드의 완전한 보조제 (Freund's complete adjuvant) 및 MPL-TDM 보조제 (모노포스포릴 리피드 A, 합성 트레할로즈 디코리노마이콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 불필요한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다.

ii. 모노클론 항체

본 발명의 폴리펩티드를 인식하고 결합하거나 또는 작용제로서 작용하는 항체는, 선택적으로, 모노클론 항체일 수 있다. 모노클론 항체는 문헌 [Kohler 및 Milstein,Nature,256:495 (1975)]에 기술된 것들과 같은, 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 쥐, 햄스터, 또는 다른 적합한 숙주 동물은 대체로 면역제에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 림프구를 유발시키는 면역제로 면역화된다. 선택적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다.

면역제는 대체로 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질을 포함한다. 일반적으로, 말초 혈액 림프구 (" PBLs")는 인간원의 세포가 바람직할 때 사용되거나, 또는 비장 세포 또는 림프절 세포는 비인간 포유류원이 바람직할 때 사용된다. 림프구는 이후 하이브리도마 세포를 형성하기 위해, 폴리에틸렌 글리콜과 같은, 적합한 융합제를 사용하여 부동화 세포주와 함께 융합된다 [Goding,Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1989) 페이지 59-103]. 불멸화된 세포주는 통상적으로 형질 전환된 포유류 세포, 특히 설치류, 소 및 인간원의 흑색종 세포이다. 통상적으로, 쥐 또는 생쥐 흑색종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 융합되지 않고 불멸화된 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1개 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들면, 모 세포가 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스페라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없을 때, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 대체로 히포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘 (" HAT 배지")를 포함할 것이고, 이 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 막을 것이다.

바람직한 불멸화된 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의해 높은 수준의 안정한 항체 발현을 지지하는 것들이고, HAT 배지와 같은 배지에 민감하다. 더욱 바람직한 불멸화된 세포주는 쥐 흑색종이고, 이는 예를 들면, 캘리포니아주, 샌디에고의 설크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 및 매릴랜드주, 록빌의 아메리컨 타입 컬쳐 콜렉션으로부터 얻어질 수 있다. 인간 흑색종 및 쥐-인간 이형 흑색종 세포주는 또한 인간 모노클론 항체 제조를 위해 기술되었다 [Kozbor,J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, Marcel Dekker, New York, (1987) 페이지 51-63].

하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 이후 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 폴리펩티드와 유사한 활성을 갖는 폴리펩티드에 대한 모노클론 항체의 존재가 분석될 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클론 항체의 결합 특이성은 면역 침강법에 의해 또는 방사선 면역 분석법 (RIA) 또는 효소-연결 면역흡수 분석법 (ELISA)과 같은, 시험관 내 결합 분석에 의해 결정될 수 있다. 이러한 기술 및 분석법은 당업계에 알려져 있다. 모노클론 항체의 결합 친화도는 예를 들면, 문헌 [Scatchard anaysis of Munson and Pollard,Anal. Biochem., 107:220 (1980)]에 의해 결정될 수 있다.

바람직한 하이브리드 항체가 동정된 후에, 클론은 제한 희석 방법에 의해 서브클로닝되고 통상적인 방법에 의해 성장될 수 있다 [상기 Goding]. 이 목적을 위해 적합한 배양 배지는 예를 들면, 둘베코의 변화 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 선택적으로, 하이브리도마 세포는 포유 동물에서 복수종으로 생체 내에서 성장될 수 있다.

서브클론에 의해 분비된 모노클론 항체는 배양 배지 또는 예를 들면, 단백질 A 세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기 영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역 글로불린 정제 방법에 의한 복수종 용액으로부터 분리되거나 또는 정제될 수 있다.

모노클론 항체는 또한 미국 특허 제4,816,567호에 기술된 것들과 같은, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 모노클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 방버을 사용하여 용이하게 분리되고 서열화될 수 있다 (예를 들면, 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써). 본 발명의 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 원료로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터에 배치되고, 이후 유인원 COS 세포와 같은 숙주 세포로 형질 전환된다. 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포는, 또는 흑색종 세포는 재조합 숙주 세포에서 모노클론 항체의 합성을 얻기 위해 면역 글로불린 단백질을 생성하지 않는다. DNA는 또한 예를 들면, 동형 쥐 서열 자리에 인간의 중쇄 및 경쇄의 일정한 도메인을 위한 코딩 서열을 치환함으로써 [미국 특허 제4,816,567호; 상기 Morrison et al.] 또는 비면역 글로불린 폴리펩티드를 위한 코딩 서열의 전부 또는 부분을 면역 글로불린 코딩 서열에 공유적으로 연결시킴으로써 개질될 수 있다. 이러한 면역 글로불린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의

일정한 도메인을 위해 대체될 수 있거나, 또는 키메라 2가 항체를 얻기 위해 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 위해 대체될 수 있다.

항체는 바람직하게는 1가 항체이다. 1가 항체의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 한 방법은 면역 글로불린의 경쇄 및 개질된 중쇄의 재조합 발현을 포함한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄의 교차 연결을 막기 위해 Fc 영역에 있는 지점에서 절단된다. 선택적으로, 관련 시스테인 잔기는 또다른 아미노산 잔기로 대체되거나 또는 교차 연결을 막기 위해 삭제된다.

시험관 내 방법은 또한 1가 항체를 제조하기에 적합하다. 항체 단편, 특히 Fab 단편을 제조하기 위한 항체의 소화는 당업계에 알려진 통상적인 기술을 사용하여 이루어질 수 있다.

iii. 인간 및 인간화된 항체

본 발명의 방법은 인간화된 항체 도는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 비인간 (예를 들면, 쥐) 항체의 인간화된 형태는 비인간 면역 글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역 글로불린, 면역 글로불린 쇄 또는 그의 단편 (Fv, Rab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원-결합 서열과 같은)이다. 인간화된 항체는 수혜자의 상보성 결정 부위 (PCR)으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 쥐, 생쥐 또는 토끼와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된다. 몇몇 경우에, 인간 면역 글로불린의 프레임워크 잔기는 상응하는 비인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화된 항체는 또한 수혜자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 볼 수 없는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 1개 이상의, 및 대체로 2개의 가변 도메인 모두를 포함할 것이고, 여기서 비인간 면역 글로불린 및 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역에 대한 것들에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역 글로불린 교감 작용 서열에 대한 것들이다. 인간화된 항체는 최적으로 또한 면역 글로불린의 일정한 영역 (Fc)의 적어도 한 부분을 포함할 것이고, 대체로 그것은 인간 면역 글로불린의 것이다 [Jones et al.,Nature,321:522-525 (1986); Riechamn et al.,Nature,332:323-329 (1988); 및 Presta,Curr. Op. Struct. Biol.,2:593-596 (1992)].

비인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비인간인 원료로부터 그것에 도입되는 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 흔히 " 유입(import)" 잔기로서 언급되고, 이는 대체로 " 유입" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열 대신 설치류 CDR들 또는 CDR 서열로 대체시킴으로써, 윈터 및 동료들 [Jones et al.,Nature,321:522-525 (1986); Riechmann et al.,Nature,332:323-327 (1988); Verhoeyen et al.,Science,239:1534-1536 (1988)]의 방법에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 " 인간화된" 항체는 키메라 항체이고 (미국 특허 제4,816,567호), 손상되지 않은 인간의 가변 도메인보다 실질적으로 더 적게 비인간 종으로부터 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 실제로, 인간화된 항체는 대체로 몇몇 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇 FR 잔기가 설치류 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기로 치환되는 인간 항체이다.

인간 항체는 또한 상 전시 라이브러리를 포함한, 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다 [Hoogenboom 및 WInter,J. Mol. Biol.,227:381 (1991); Marks et al.,J. Mol. Biol.,222:581 (1991)]. 콜 등 및 뵈르너 등의 기술이 또한 인간의 모노클론 항체 제조를 위해 이용 가능하다 (Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 페이지 77 (1985); Boerner et al.,J. Immunol.,147(1):86-95 (1991); 미국 특허 제 5,750,373호). 유사하게는, 인간 항체는 트랜스제닉 동물, 예를 들면, 내인성 면역 글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 위로 인간 면역 글로불린 좌위를 도입시킴으로써 제조될 수 있다. 공격에 따라, 인간 항체 생성이 관찰되고, 이는 유전자 재배열, 조립, 및 항체 레파토리를 포함한, 모든 면에서 인간에서 보여지는 것과 대단히 닮았다. 이 연구는 예를 들면, 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 5,569,825호; 5,625,126호; 5,633,425호; 5,661,016호, 및 하기 과학 출판물에 기술되어 있다: Marks et al.,Bio/Technology10: 779-783 (1992); Lonberg et al.,Nature368:856-859 (1994); Morrison,Nature368, 812-13 (1994); Fishwild et al.,Nature Biotechnology14, 845-51 (1996); Neuberger,Nature Biotechnology14, 826 (1996); Lonberg and huszar,Intern. rev. Immunol.13: 65-93 (1995).

iv. 2특이성 항체

특이적 항체는 2개 이상의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클론, 바람직하게는 인간 또는 인간화된, 항체이다. 본 발명에서, 결합 특이성 중 하나는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 것이고, 다른 하나는 다른 항원, 및 바람직하게는 세포-표면 단백질 또는 수용체 서브유닛에 대한 것이다.

2특이성 항체 제조 방법은 당업계에 알려져 있다. 전통적으로, 2특이성 항체의 재조합 생성은 2개의 면역 글로불린의 중쇄/경쇄 쌍의 공발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (983)). 면역 글로불린의 중쇄 및 경쇄의 무작위한 분리때문에, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 그 중 오직 하나만이 올바른 2특이성 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성한다. 올바른 분자의 정제는 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어진다. 유사한 방법이 1993년 5월 13일 공개된 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al.,EMBO J.,10:3655-3659 (1991)]에 개시된다.

바람직한 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)은 면역 글로불린의 일정한 도메인 서열에 융합될 수 있따. 융합은 바람직하게는 적어도 힌쥐, CH2, 및 CH3 영역의 부분을 포함하는, 면역 글로불린의 중쇄-경쇄의 일정한 도메인과 이루어진다. 융합 중 적어도 하나에 존재하는 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 제1 경쇄의 일정한 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역 글로불린의 중쇄 융합을 코딩하는 DNA들 및, 바람직하다면, 면역 글로불린의 경쇄는 분리된 발현 벡터로 삽입되고, 적합한 숙주 생물체로 공전이된다. 2특이성 항체 생성에 대한 추가의 상세한 사항을 위해, 예를 들면, 문헌 [Suresh et al.,Methods in Enzymology,121:210 (1986)] 참조.

v. 이형 컨쥬게이트 항체

이형 컨쥬게이트 항체는 2개의 공유적으로 결합된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들면, 면역계 세포를 원하지 않는 세포 [미국 특허 제4,676,980호]에 표적화하기 위해, 그리고 HIV 감염 치료를 위해 [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089] 제안되었다. 항체는 교차 연결제를 포함하는 방법들을 포함한, 합성 단백질 화학에 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들면, 면역 독소가 디설파이드 교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 구조될 수 있다. 이 목적을 위해 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸 4-머캅토부티리미데이트 및 예를 들면 미국 특허 제4,676,980호에 개시된 것들을 포함한다.

vi. 작용자 기능 엔지니어링 (Effector function engineering)

예를 들면 면역 관련 질병 치료에서 항체의 유효성을 증가시키기 위해, 작용자 기능에 대한 본 발명의 항체를 변화시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)는 Fc 영역에 도입되어, 이 영역에서 쇄 간 디설파이드 결합 형성을 하게 한다. 이렇게 생성된 호모다이머 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 상보-매개 세포 킬링 및 항체 의존성 세포 세포 독성 (ADCC)을 가질 수 있다. Caron et al.,J. Ecp. Med.176:1191-1195 (1992) 및 Shopes,B. J. Immunol.148:2918-2922 (1992) 참조. 증가된 항종양 활성을 갖는 호모다이머 항체는 또한 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바대로 이형 이관능성 교차 링커를 사용하여 제조될 수 있다. 선택적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖는 것으로 제조될 수 있고 이로 인해 증가된 상보 용균 작용 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. Stevenson et al.,Anti-Cancer Drug Design3:219-230 (1989) 참조.

vii. 면역 컨쥬게이트

본 발명은 또한 화학 요법제, 독소 (예를 들면, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물원의 효소적 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉 방사컨쥬게이트)와 같은 세포독성제에 컨쥬게이트된 항체를 포함하는 면역 컨쥬게이트에 관한 것이다.

이러한 면역 컨쥬게이트 생성에 유용한 화학 요법제는 상기 기술되었다. 사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 독소의 디프테리아 A 사슬, 비결합 활성 단편, 엑소톡신 A 사슬 (Pseudomonas aeruginosa), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신,Aleurites fordii단백질, 디안틴 단백질,Phytolaca americana단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 커르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 다양한 라디오뉴클라이드는 방사컨쥬게이트된 항체 생성에 이용 가능하다. 예는^{212} Bi,^{131} I,^{131} In,^{90} Y 및^{186} RE를 포함한다.

항체 및 세포 독성 제제의 컨쥬게이트는 N-석시니미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올레인 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (디메틸 아디피미데이트 HCL과 같은), 활성 에스테르 (디석시니미딜 수베레이트와 같은), 알데히드 (글루타르알데히드와 같은), 비스-아지도 화합물 (비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민과 같은), 비스-디아조늄 유도체 (비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민과 같은), 디이소시아네이트 (톨리엔 2,6-디이소시아네이트와 같은), 및 비스-활성 불소 화합물 (1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠과 같은)과 같은 다양한 이관능성 단백질 커플링제를 사용하여 제조된다. 예를 들면, 리신 면역 독소는 문헌 [Vitetta et al.,Science238 : 1098 (1987)]에 기술된 바대로 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)는 항체에 라디오뉴클레오티드를 컨쥬게이션하기 위한 킬레이팅제의 예이다. WO 94/11026 참조.

또다른 실시양태에서, 항체는 항체-수용체 컨쥬게이트가 환장게 투여되고 이어서 클리어링제를 사용하여 순환액으로부터 결합되지 않은 컨쥬게이트를 제거하고 이후 세포 독성제 (예를 들면, 라디오뉴클레오티드)에 컨쥬게이트된 " 리간드" (예를 들면, 아비딘)를 투여하는 미리 표적화된 조직에서의 용도는 위한 " 수용체" (이러한 스트렙타비딘)에 컨쥬게이트될 수 있다.

viii. 면역 리포좀

본원에 개시된 단백질, 항체 등은 또한 면역 리포좀으로서 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 및 미국 특허 제4,485045호 및 제4,544,545호]에 기술된 것과 같은, 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 증가된 순환 시간을 갖는 리포좀은 미국 특허 제5,013,556호에 개시된다.

특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)를 포함하는 지방조성물로 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포좀은 바람직한 직경을 갖는 리포좀을 생상하기 위해 정해진 공극 크기의 여과기를 통해 압출된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설파이드 상호 교환 반응을 통해 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem.257:286-288 (1982)]에 기술된 바대로 리포좀에 컨쥬게이트될 수 있다. 화학 요법제 (독소루비신과 같은)는 임의로 리포좀 내에 함유될 수 있다. Gabizon et al.,J. National Cancer Inst.81(19) 1484 (1989) 참조.

10. 제약 조성물

본 발명의 활성 분자, 폴리펩티드 및 항체, 및 상기 개시된 스크리닝 분석에 의해 동정된 다른 분자는 면역 관련 질환 치료를 위해 제약 조성물 형태로 투여될 수 있다.

본 발명의 활성 분자, 바람직하게는 폴리펩티드 또는 항체의 치료 제제는 바람직한 수준의 순도를 갖는 활성 분자를 임의적인 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 제16판, Osol, A. 편집 (1980))와 혼합함으로써 동결 건조 제제 또는 수성 용액의 형태로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이고, 포스레이트, 시트레이트, 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역 글로불린과 같은, 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함한 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 슈크로스, 만니톨, 트레할로즈 또는 소르비톨과 같은 당; 소듐과 같은 염-형성 대응 이온; 금속 복합체 (예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 트윈 (TWEEN)™, 플러로닉스 (PLURONICS)™ 도는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면 활성제를 포함한다.

본 발명의 스크리닝 분석에 의해 동정된 화합물은 당업계에 알려진 통상적인 기술을 사용하여 유사한 방식으로 제제화될 수 있다.

리포펙션 또는 리포좀은 또한 폴리펩티드, 항체, 또는 항체 단편을 세포로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 항체 단편이 사용될 때, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 가장 작은 억제 단편이 바람직하다. 예를 들면, 항체의 가변 영역 서열을 기준으로, 펩티드 분자는 표적 단백질 서열을 결합시키는 능력을 보유하는 것으로 설계될 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성될 수 있고/또는 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다 (예를 들면, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA90,7889-7893 (1993) 참조).

본원의 제제는 또한 처리되는 특정한 지시에 필요한 1개보다 더 많은 활성 화합물, 바람직하게는 서로 역효과를 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. 선택적으로, 또는 이에 덧붙여, 조성물은 세포 독성제, 사이토카인 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다.

활성 분자는 또한 예를 들면, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합화에 의해 제조된 마이크로캡슐 내에, 예를 들면, 각각 히드록시메틸셀룰로즈 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐 내에 콜로이드 의약 전달계 (예를 들면, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마크로에멀젼, 나노 입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀젼으로 트랩될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [REmington's Pharmaceutical Sciences 제16판, Osol, A. 편집 (1980)]에 개시되어 있다.

생체 내 투여를 위해 사용되는 제제는 멸균이어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통해 여과함으로써 용이하게 이루어진다.

서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형 물품, 예를 들면, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태로 있다. 서방형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겐 (예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산의 공중합체 및 에틸-L-글루타메이트, 비분해 에틸렌-비닐 아세테이트, 루프론 데포트 (LUPRON DEPOT)™ 과 같은 분해 락트산-글리콜산 공중합체 (락트산-글리콜산 공증합체 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주사 가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 분자 방출을 100일 이상 동안 가능하게 하고, 특정한 히드로겔은 더 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 오랜 시간 동안 채 내에 존재할 때, 이들은 37 °C에서 수분에 노출된 결과로 변성하거나 또는 응집할 수 있고, 생물학적 활성 손실 및 면역원성에서의 가능한 변화를 초래한다. 합리적인 전략이 포함된 기전에 의해 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예를 들면, 응집 기전이 티오-디설파이드 상호 교환을 통한 분자가 S-S 결합 형성인 것으로 발견될 때, 안정화는 설프히드릴 잔기, 산 용액으로부터의 동결 건조, 수분 함량 조절, 적합한 첨가제 사용 및 특정한 중합체 매트릭스 조성물 개발에 의해 이루어질 수 있다.

11. 치료 방법

본 발명의 폴리펩티드, 항체 및 다른 활성 화합물은 조직으로의 염증 세포의 침투, T 세포 증식 자극, T 세포 증식 억제, 증가 또는 감소된 혈관 침투성 또는 그의 억제에 의해 특징화된 질병을 포함한 T 세포 매개성 질병과 같은, 다양한 면역 관련 질환 및 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드, 항체 및 다른 화합물로 치료되는 상태 및 질병의 예는 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염, 유년형 만성 관절염, 골관절염, 척추 관절증, 전신 경화증 (경피증), 특발성 염증성 근장애 (피부근염, 다발성 근염), 쇼그렌 증후군, 전신성 맥관염, 유육종증, 자가 면역 용혈성 빈혈 (면역성 범혈구 감소증, 발작성 야간 혈색소뇨증), 자가 면역성 혈소판 감소증, (특발성 혈소판 감소성 자반병, 면역 매개성 혈소판 감소증), 갑상선염 (그레이브스병, 하시모도 갑상선염, 유년형 림프종성 갑상선염, 위축성 갑상선염), 당뇨병, 면역 매개성 신장 질환 (사구체 신염, 세뇨관 간질성 신염), 다발성 경화증, 특발성 탈수초 다발성 신경염 또는 길랑 바레 증후군, 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경염과 같은 중추 및 말초 신경계의 탈수초 질환, 감염성 간염 (A, B, C, D, E형 간염 및 다른 비-간친화성 바이러스), 자가 면역 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종성 간염 및 경화성 담관염과 같은 간 담즙성 질환, 염증성 장질환 (궤양성 대장염: 크론병), 글루텐 민감성 장질환 및 휘플병, 수포성 피부 질환, 다형 삼출성 홍반 및 접촉성 피부염을 포함한 자가 면역 또는 면역 매개 피부 질환, 건선, 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민성 및 담마진과 같은 알레르기 질환, 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유종 및 과민성 폐렴과 같은 폐의 면역 질환, 이식 거부 및 이식편대 숙주 질환을 포함하는 이식 관련 질환 등을 포함한다.

전신성 홍반성 낭창에서, 질병의 중심 매개체는 자기 단백질/조직에 대한 자기 반응성 항체의 생성 및 후행하는 면역 매개 염증 발생이다. 항체는 직접 또는 간접적으로 조직 손상을 매개한다. T 림프구가 조직 손상에 직접적으로 관여되는 것으로 나타나지 않더라도, T 림프구는 자기 반응성 항체의 개발을 위해 필요로 된다. 질병의 발생은 그러므로 T 림프구 의존성이다. 신장, 폐, 근육 골격계, 점막 피부, 눈, 중추 신경계, 심혈관계, 위장관, 골수 및 혈액을 포함한 다수의 조직 및 시스템이 임상적으로 영향받는다.

류마티스성 관절염 (RA)은 관절 연골에 생성되는 손상을 갖는 다수의 관절의 활막을 주로 포함하는 만성 전신성 자가면역 염증 질환이다. 병리 발생은 T 림프구 의존성이고 관절액 및 혈액이 많게 하는 면역 복합체의 결과적 형성을 갖는 자기 IgG 에 대한 자기 항체, 류마티스성 인자의 생성과 관련된다. 관절에서 이들 복합체는 림프구 및 단핵 세포의 활막으로의 현저한 침투 및 이어 현저한 활막 변화를 유도할 수 있고; 수많은 호중구 첨가와 함께 유사한 세포에 의해 침투되면 관절 공간/용액이 변화한다. 영향 받는 조직은 흔히 대칭적 패턴으로 주로 관절이다. 그러나, 관절 외 질병이 또한 2가지 형태로 발생한다. 한 형태는 진행하고 있는 진행성 관절 질병을 갖는 관절 외 병변 및 폐 섬유증, 맥관염, 및 피부 궤양의 전형적인 병변의 발생이다. 다른 한 형태는 관절 질병이 나은 이후에 때때로 RA 질병 과정의 후기에 발생하고, 호중구 감소증, 혈소판 감소증 및 비종의 존재를 포함하는 소위 펠티 증후군이다. 이는 경색, 피부 궤양 및 괴저 형태를 갖는 다수의 기관에서의 맥관염에 수반될 수 있다. 환자들은 또한 흔히 영향 받은 관절 위에 있는 피하 조직에서의 류마티스성 결절을 일으키고; 나중에 결절은 혼합된 세포 침투에 의해 둘러싸이는 괴사 중심을 갖는다. RA에서 발생할 수 있는 다른 질병은 심막염, 흉막염, 관상 동맥염, 급성 간질성 폐렴, 폐 섬유증, 건성각결막염, 및 류마티스성 결절을 포함한다.

유년형 만성 관절염은 흔히 16세 미만에 시작하는 만성 특발성 염증 질환이다. 이 표현형은 RA에 대해 몇가지 유사성을 갖는다: 류마티스 인자가 양성인 몇몇 환자는 유년형 류마티스성 관절염으로서 분류된다. 이 질병은 3개의 주요 범주 즉, 퍼시아티큘러 (pauciarticular), 단관절성, 및 전신성으로 다시 분류된다. 관절염은 심각할 수 있고 대체로 파괴적이고 관절 강직 및 성장 지연을 초래한다. 다른 질병은 만성 전방 포도막염 및 전신성 유전분증을 포함할 수 있다.

척추 관절증은 몇몇 통상적인 임상적 특징 및 HLA-B27 유전자 생성물의 발현과 관련된 공통점을 갖는 질병군이다. 질병은 강직성 척추염, 라이터 증후군 (반응 관절염), 염증성 장질환과 관련된 관절염, 건선과 관련된 경화증, 유년형 척추 관절증 및 비분화된 척추 관절증을 포함한다. 구별되는 특징은 척추염이 있거나 또는 없는 천장골염, 염증성 비대칭 관절염; HLA-B27과의 관련성 (클래스 I MHC의 HLA-B 좌의 혈청학적으로 한정된 대립 형질); 안염증, 및 다른 류마티스성 질병과 관련된 자기 항체의 부재를 포함한다. 질병 유도의 중요 인자로서 가장 많이 관련된 세포는 CD8+ T 림프구이고, 이 세포는 클래스 I MHC 분자에 의해 나타나는 항원이 표적이다. CD8+ T 세포는 클래스 I MHC 대립형질 HLA-B27에 대해 마치 MHC 클래스 I 분자에 의해 발현되는 외부 펩티드인 것 처럼 반응할 수 있다. HLA-B27의 에피트프는 박테리아 또는 다른 미생물 항원 에피토프를 흉내낼 수 있고 그로 인해 CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있는 것이 가설화되었다.

전신 경화증 (경피증)은 알려지지 않은 병인을 갖는다. 이 질병의 표시는 피부의 경화이고, 이는 활성 염증 반응에 의해 유도되는 것 같다. 경피증은 국소적 또는 전신적일 수 있다; 혈관 병변이 통상적이고 미세 혈관에서의 상피 세포 손상이 전신성 경화증의 개발에서 주요한 초기 현상이고; 혈관 손상은 면역 매개될 수 있다. 면역학적 근거는 피부 병변에서의 단핵 세포 침투물 존재 및 많은 환자에서의 항핵 항체 존재를 포함한다. ICAM-1은 흔히 피부 병변에서 섬유아세포의 세포 표면상에서 업레귤레이트되고 이는 T 세포의 이들 세포와의 상호작용이 질병의 병리 발생에 하나의 역할을 할 수 있다는 것을 제안한다. 관여된 다른 기관은 위장관 (평활근 위축 및 비정상적 연동/운동을 초래하는 섬유증); 신장 (결과적 신장 피질 혈류 감소를 갖는 작은 궁형 및 소엽간 동맥에 영향을 주는 동심원적 상피하 세포 동맥 내 증식은 단백뇨, 질소혈증 및 고혈압을 초래함); 골격근 (위측, 간질성 섬유증, 염증); 폐 (급성 간질성 폐렴 및 간질성 섬유증); 및 심장 (수축 밴드 괴사, 스카링(scarring)/섬유증)을 포함한다.

피부근염, 다발성 근염 등을 포함한 특발성 염증성 근장애는 근육 약화를 초래하는 알려지지 않은 병인의 만성 근육 염증 질병이다. 근육 손상/염증은 흔히 대칭성이고 진행성이다. 자기 항체는 많은 형태와 관련된다. 이들 마이오시티스 (myositis)-특이적 자기 항체는 단백질 합성에 포함된, 성분, 단백질 및 RNA 기능을 지향하고 억제한다.

쇼그렌 증후군은 면역 매개성 염증 및 후행하는 누선 및 타액선의 기능적 파괴에 의한다. 이 질병은 염증성 연결 조직 질병과 관련되거나 또는 그것에 수반된다. 이 질병은 Ro 및 La 항원에 대한 자기 항체 생성과 관련되고, 이 둘은 작은 RNA-단백질 복합체이다. 병변은 담즙 경변증, 말초 또는 감각 신경병, 및 촉진할 수 있는 자반병을 포함한 다른 증상 또는 관련성을 갖는, 건성각결막염, 건피증을 초래한다.

전신성 맥관염은 1차 병변이 염증 및 이어서 영향받은 혈관에 의해 공급되는 조직에 대한 허혈/괴사/퇴행 및 몇몇 경우에서 사실상의 말단 기관 기능 장애를 초래하는 혈관 손상인 질병이다. 맥관염은 또한 류마티스성 관절염, 전신 경화증 등과 같은 다른 면역 염증 매개 질병, 특히 면역 복합체 형성과도 관련된 질병에 대한 2차 병변 또는 후유증으로서 발생할 수 있다. 1차 전신성 맥관염군의 질병은 전신성 괴사 맥관염: 결정성 다발 동맥염, 알레르기 맥관염 및 육아종증, 다발성 맥관염; 베그너 육아종증; 임파종류 육아종증; 및 거대 세포 동맥염을 포함한다. 기타 맥관염은: 피부 점막 임파선 증후군 (MLNS 또는 가와사키병), 분리된 CNS 맥관염, 베헤트병, 폐색성 혈전 맥관염 (뷰르거병) 및 피부 괴사 정맥염을 포함한다. 열거된 대부분의 형태의 병리 기전은 주로 혈관벽에서의 면역 글로불린 복합체의 침착 및 이어 ADCC, 상보적 활성화, 또는 둘다를 통한 염증 반응의 유도에 의하는 것으로 여겨진다.

유육종증은 체내 거의 모든 조직에서의 상피 육아종증의 존재에 의해 특징화되는 알려지지 않은 병리 상태이고; 폐가 가장 보편적으로 관여한다. 병리 발생은 이들 세포 형태에 의해 방출된 국소적 및 전신적 활성 생성물의 방출로부터 생성되는 후행하는 만성 후유증을 갖는 질병의 부위에 활성화된 대식 세포 및 임파 세포를 지속시키는 것을 포함한다.

자가 면역 용혈성 빈혈, 면역성 범혈구 감소증, 및 발작성 야간 혈색소뇨증을 포함한 가자 면역 용혈성 빈혈은 적혈구 세포 (및 몇몇 경우에 마찬가지로 혈소판을 포함한 다른 혈액 세포)의 표면상에서 발현되는 항원과 반응하는 항체 생성 결과이고 상보적 매개 용균 및/또는 ADCC/Fc 수용체 매개 기전을 통한 이들 항체 코팅된 세포 제거의 영향이다.

혈소판 감소성 자반병, 및 다른 임상적 상태에서의 면역 매개 혈소판 감소증을 포함한 가가 면역 혈소판 감소증에서, 혈소판 파괴/제거는 혈소판에 대한 항체 또는 상보적 부착 및 후행하는 상보적 용균, ADCC 또는 Fc 수용체 매개 기전에 의한 제거의 결과로서 발생한다.

그레이브스병, 하시모도 갑상선염, 유년형 림프종성 갑상선염, 및 위축성 갑성선염을 포함한 갑상선염은 갑상선에 존재하고 흔히 갑상선에 특이적인 단백질과 반응하는 항체의 생성으로 갑상선 항원에 대한 자가 면역 반응의 결과이다. 자연 발생적인 모델: 쥐 (BUF 및 BB 쥐) 및 닭 (비만 닭 균주); 유도 가능한 모델: 티로굴로불린, 티로이드 마이크로좀 항원 (티로이드 퍼록시다제)로의 동물의 면역화를 포함한 실험 모델이 존재한다.

유형 I 당뇨 또는 인슐린 의존성 당뇨는 췌장 섬 β세포의 자가 면역 파괴이고; 이 파괴는 자기 항체 및 자기 반응성 T 세포에 의해 매개된다. 인슐린 또는 인슐린 수용체에 대한 항체는 또한 인슐린 비반응성의 표현형을 생성할 수 있다.

사구체 신염 및 세뇨관 간질성 신염을 포함한, 면역 매개 신장 질환은 신장 항원에 대한 자기 반응성 항체 또는 T 세포의 생성의 결과로서 직접적으로 또는 다른, 비신장 항원에 반응성인 신장에서의 항체 및/또는 면역 복합체의 침착의 결과로서 간접적으로 신장 조직에 대한 항체 또는 T 림프구 매개 손상의 결과이다. 그로므로 면역 복합체 형성을 초래하는 다른 면역 매개 질환은 또한 간접적 후유증으로서 면역 매개 신장 질환을 유도할 수 있다. 직접 및 간접 면역 기전 둘다는 결과적 기관 기능 손상 및 몇몇 경우에 신장 장애에 대한 진행을 갖는 신장 조직에서의 병변 발생을 생성/유도하는 염증성 반응을 초래한다.

다발성 경화증, 특발성 탈수초 다발성 신경염 또는 길랑-바레 중후군, 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경염을 포함한, 중추 및 말초 신경계의 탈수초 질환은 자가 면역 원인을 갖고 올리고덴드로사이트 또는 수초에 직접적으로 발생되는 손상의 결과로서 신경의 탈수초를 초래한다. MS에서, 질병 유도 및 진행은 T 림프구에 의존적이라는 것을 제안하는 증거가 있다. 다발성 경화증은 T 림프구 의존성이고 릴랩싱-리미팅 과정 또는 만성 진행성 과정을 갖는 탈수초 질병이다. 병인은 알려져 있지 않았으나, 바이러스 감염, 유전적 소인, 환경 및 자가 면역성이 모두 관여한다. 병변은 지배적으로 T 림프구 매개, 소교 세포 및 침투 대식 세포의 침투물을 함유하고; CD4+T 림프구는 병변에서 우세한 세포 형태이다. 올리고덴드로사이트 세포의 사망 및 이후 탈수초의 기전은 알려져 있지 않으나 T 림프구에 의한 것 같다.

호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유종, 및 과민성 폐렴을 포함한 염증 및 섬유 폐 질환은 조절 장애 면역 염증 반응을 포함할 수 있다. 이러한 반응의 억제는 치료적 잇점이 있다.

수포성 피부질환, 다형 삼출성 홍반 및 접촉성 피부염을 포함한 자가 면역 또는 면역 매개 피부 질환은 자기 항체에 의해 매개되고, 이 원인은 T 림프구 의존성이다.

건선은 T 림프구 매개 염증 질환이다. 병변은 T 림프구, 대식 세포 및 하우언 프로세싱 세포의 침투물 및 몇몇 호중구를 함유한다.

천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민성, 및 담마진을 포함한 알레르기 질환은 T 림프구 의존성이다. 이들 질환은 T 림프구 유도 염증, IgE 매개 염증 또는 이 둘의 조합에 의해 지배적으로 매개된다.

이식 거부 및 이식편대 숙주 질환 (GVHD)를 포함한 이식 관련 질환은 T 림프구 의존성이고; T 림프구 기능 억제는 개량적이다.

면역 및/또는 염증 반응의 개재가 잇점을 갖는 다른 질병은 바이러스 감염 (AIDS, 간염 A, B, C, D, E 및 허피스), 박테리아 감염, 진균 감염, 및 원생 동물 및 기생충 감염 (MLR을 자극하는 분자 (또는 유도체/작용제)는 감염제에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 치료적으로 이용될 수 있음), 면역 결핍 질병 (MLR을 자극하는 분자/유도체/작용제는 유

전적, 후천적, 감염 유도적 (HIV 감염), 또는 의사가 원인이 되는 (즉, 화학요법으로부터) 상태에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 치료적으로 이용될 수 있음), 및 신형성 등을 포함한 감염성 질병이다.

몇몇 인간 암환자는 신형성 세포에 대한 항원에 대한 항체 및/또는 T 림프구를 발생기키는 것으로 설명되었다. 면역 반응의 증가는 특정한 신형성의 거부 또는 퇴행을 초래할 수 있는 것으로 또한 신형성 동물 모델에서 나타났다. MLR (또는 작용제 형태로 동일한 수용체에 영향을 주는 작은 분자 작용제 또는 항체)에서의 T 림프구 반응을 증가시키는 분자는 암을 치료하기 위해 치료적으로 사용될 수 있다. MLR에서 림프구 반응을 억제하는 분자는 또한 신형성에 대한 면역 반응을 억제하기 위해 신형성 중에 생체 내에서 기능을 하고; 이러한 분자는 신형성 세포 자체에 의해 발현될 수 있거나 또는 이들의 발현은 다른 세포에서 신형성에 의해 유도될 수 있다. 이러한 억제 분자 (항체, 작은 분자 길항제 또는 다른 수단)의 길항 작용은 면역 매개 종양 거부를 증가시킨다.

또한, 전염증 성질을 갖는 분자의 억제는 재관류 손상, 졸중, 심근 경색, 아테롬성 동맥 경화증, 급성 폐 손상, 출혈성 쇼크, 화상, 패혈증/패혈병성 쇼크, 급성 관상 괴사, 자궁 내막염, 퇴행성 관절 질병 및 췌장염에서 치료적 잇점을 가질 수 있다.

본 발명의 화합물, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 항체는 환제로서 또는 일정한 기간 동안의 연속적 침출에 의한 정맥 내 투여와 같은 공지 방법에 따라, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 동맥내, 활액낭내, 포막내, 경구, 국소, 또는 흡입 (비강내, 폐내) 경로에 의해 포유 동물, 바람직하게는 인간에게 투여된다. 폴리펩티드 및 항체의 정맥 내 또는 흡입 투여가 바람직하다.

면역 보조 요법에서, 항암제 투여와 같은, 다른 치료 방법이 본 발명의 단백질, 항체 또는 화합물과 혼합될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 면역 보조제로 치료되는 환자는 또한 항암제 (화학요법제) 또는 방사선 요법을 받을 수 있다. 이러한 화학 요법제를 위한 제제 및 투약 계획은 제조자의 지시에 따라 사용될 수 있거나 또는 당업자에 의해 실험적으로 결정된다. 이러한 화학 요법의 제제 및 투약 계획은 문헌 [Chemotherapy Service, M. C. Perry 편집, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992]에 또한 기술되어 있다. 화학 요법제는 먼저 투여될 수 있거나, 또는 면역 보조제 투여 이후에 투여될 수 있거나 또는 그들과 동시에 투여될 수 있다. 또한, 타목시펜과 같은 항에스트로겐 화합물 또는 오나프리스톤 (EP 616812)과 같은 항프로게스테론은 이러한 분자를 위해 알려진 투약 형태로 제공될 수 있다.

CD20, CD11a CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, 또는 혈관 상피 인자 (VEGF)에 결합하는 항체와 같은, 다른 면역 질병 관련 또는 종양 관련 항원에 대한 항체를 또한 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 선택적으로, 또는 덧붙여, 본원에 개시된 동일하거나 또는 2개 이상의 상이한 항원을 결합시키는 2개 이상의 항체가 환자에게 같이 투여될 수 있다. 때때로, 환자에게 1개 이상의 사이토카인을 투여하는 것이 또한 이로울 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 성장 억제 제제와 함께 투여된다. 예를 들면, 성장 억제 제제가 먼저 투여될 수 있고, 이후 본 발명의 폴리펩티드가 투여된다. 그러나, 동시 투여 또는 먼저 투여하는 것이 또한 포함된다. 성장 억제제로 적합한 투약 형태는 현재 사용되는 것들이고 성장 억제제 및 본 발명의 폴리펩티드의 혼합 작용 (상승 작용)에 의해 낮춰질 수 있다.

면역 관련 질환 치료 또는 심각성 경감을 위해, 본 발명 화합물의 적합한 투약 형태는 상기 정의된 바대로, 치료되는 질병 형태, 질병의 심각성 및 과정, 제제가 예방 목적을 위해 투여되는지 또는 치료 목적을 위해 투여되는지, 이전 치료법, 환자의 임상 경력 및 화합물의 대한 반응, 및 참여하는 내과 의사의 판단에 의존할 것이다. 화합물은 한 번에 또는 일련의 처치를 통해 환자에게 적합하게 투여된다.

예를 들면, 형태 및 질병의 심각성에 따라, 폴리펩티드 또는 항체 약 1 ug/kg 내지 15 mg/kg (예를 들면, 0.1 - 20 m

g/kg)이 예를 들면, 1회 이상의 분리된 투여에 의해서든지, 또는 연속적 주입에 의해서든지, 환자에게 투여를 위해 초기에 추천되는 투약량이다. 전형적인 1일 투약량은 상기 언급된 인자에 따라, 약 1 ug/kg 내지 100 mg/kg 범위일 수 있다. 수일 이상 동안의 반복 투여를 위해, 상태에 따라, 치료는 질병 증상의 바람직한 억제가 나타날 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투약 형태가 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 관찰된다.

12. 제조 물품

본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기술된 질병의 진단 또는 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 도는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 용기는 질병의 진단 또는 치료에 효과적인 조성물을 보유하고 멸균 억세스 포트를 가질 수 있다 (예를 들면 용기는 정맥내 용액 주머니 또는 진피 주사 바늘에 의해 천공 가능한 뚜껑을 갖는 바이알일 수 있음). 조성물에서 활성 제제는 통상적으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체이다. 라벨이 있거나 또는 관련 용기는 조성물이 선택된 질병의 진단 또는 치료를 위해 사용됨을 나타내 준다. 제조 물품은 포스페이트 완충 염수, 링거 용액 및 덱스트로즈 용액과 같은, 제약학적으로 허용되는 완충제를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 다른 완충제, 희석제, 여과기, 바늘, 주사기, 및 사용 지침 포장 삽입물을 포함한, 상업적이고 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

13. 면역 관련 질환의 진단 및 예후

특정한 면역 관련 질환에서 과잉 발현된 단백질과 같은, 세포 표면 단백질은 의약 후보 및 질병 치료를 위한 탁월한 표적이다. 면역 관련 질병 상태에서 증식된 유전자에 의해 코딩된 분비 단백질과 함께 동일한 단백질은 이들 질병의 진단 및 예후에서 추가의 용도를 발견한다. 예를 들면, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 또는 또다른 면역 관련 질환에서 증식된 유전자의 단백질 생성물에 대한 항체는 진단 또는 예후를 위해 사용될 수 있다.

예를 들면, 항체 단편을 포함한, 항체는 증식되거나 또는 과잉 발현된 유전자 (" 마아커 유전자 생성물")에 의해 코딩된 단백질의 발현을 정성적으로 또는 정량적으로 검출하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 바람직하게는 예를 들면 형광 표지 등의 검출 가능한 표지가 장착되고 광현미경, 플로우 세포계수기, 형광계, 또는 당업계에 알려진 다른 기술에 의해 관찰될 수 있다. 이들 기술은 과잉 발현된 유전자가 세포 표면 단백질을 코딩할 때 특히 적합하다. 이러한 결합 분석은 실질적으로 상기 기술된 바대로 수행된다.

마아커 유전자 생성물에 대한 항체의 동일 반응계 내 검출은 예를 들면, 면역 형광 또는 면역 전자 현미경에 의해 수행될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 조직학적 표본이 환자에게서 제거되고, 표지된 항체는 바람직하게는 생물학적 샘플 상에 그 항체를 놓음으로써 적용된다. 이 방법은 또한 조사되는 조직에서의 마아커 유전자 생성물의 분포를 결정하는 것을 허용한다. 광범위한 조직학적 방법이 동일 반응계 내 검출을 위해 쉽게 이용 가능함이 당업자에게 명백할 것이다.

하기 실시예는 설명적 목적만을 위해 제공되고, 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하려 하지 않는다.

본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고 문헌은 그 내용 전체가 참고로 본원에 혼입된다.

실시예

실시예에서 언급된 상업적으로 허용 가능한 시약들은 달리 지시된 바 없으면 제조자의 지시에 따라 사용되었다. ATCC 접근 번호에 의한 하기 실시예에서 확인된 세포들의 공급원은 명세서 전체를 통해, 버지니아주 마나사스의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 ATCC이다. 달리 언급된 바 없으면, 본 발명은 상기 본문과 하기 교과서 :Sambrook 등 Molecular Cl

oning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989; Ausubel 등 Current Protocols in Molec ular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis 등 PCR Protocols; A G uide to Methods and Application, Academic Press, inc., N.Y., 1990; Harlow 등, Antibodies: A Laborotory M anual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oigonucleotide Synthesis, IRL Pre ss, Oxford, 1984; R.I.Freshney. Animal Cell Culture, 1987; Coligan 등 Current Protocols in Immunology, 1 991.에 기술된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 공정을 사용하였다.

실시예 1

인간 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 코딩하는 cDNA 클론의 분리

I. 인간 PRO245을 코딩하는 cDNA 클론의 분리

발현 서열 태그(expressed sequence tag, EST) 데이타베이스를 탐색하기 위하여 스위스 프랏 공개 단백질 데이타베이스로부터 약 950개의 알려진 분비 단백질로부터의 세포외 도메인 (ECD) 서열(만약 존재한다면 분비 서열을 포함)이 사용되었다. EST 데이타베이스는 공개 EST 데이타베이스(예를 들어 GenBank) 및 독점 EST 데이타베이스(LIFE SEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)을 포함한다. 탐색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2(Alt shul 등, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))을 사용하여 ESR 서열의 번역 6 프레임에 ECD 단백질 서열을 비교하여 수행되었다. BLAST 점수 70(또는 어떤 경우 90) 또는 그 이상으로 알려진 단백질을 코딩하지 않는 비교들은 취합하여 프로그램 " 프랩(phrap)" (Phil Green. University of Washington. Seattle. Washington)을 사용하여 일치 DNA 서열로 집합시켰다.

PRO245을 코딩하는 일치 DNA 서열은 다른 확인된 EST 서열에 비교하여 집합되었고, 일치 서열은 본원에서 DNA30945로 지칭되었으며, 그 폴리펩티드는 막통과 단백질 수용체 티로신 키나제 단백질과 일정한 구조적 유사성을 보였다.

DN30954 일치 서열에 근거하여, 원하는 서열을 가진 cDNA 라이브러리을 PCR로 확인하고 PRO245의 전장 코딩 서열의 클론은 분리하기 위한 프로브로 사용하기 위해 올리고뉴클레오티드를 합성하였다.

PCR 프라이머 쌍(정방향 및 역방향)을 합성하였다.

정방향 PCR 프라이머 5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (서열 번호 15)

역방향 PCR 프라이머 5-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (서열 번호 16)

아울러, 하기 핵산 서열을 가진 일치 DNA30954로부터 합성 올리고뉴클레오티드 혼성화 프로브가 제조되었다.

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3' (서열 번호 17)

전장 클론의 공급원을 위해 여러 개의 라이브러리를 스크린하기 위해, 라이브러리의 DNA을 상기 확인된 PCR 프라이머로 PCR 증폭하여 스크린하였다. 그 후 양성 라이브러리를 사용하고, 프로브 올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 사용하여 PRO245을 코딩하는 클론을 분리하였다.

cDNA라이브러리 제조를 위한 RNA는 인간 태아 간 조직으로부터 분리하였다. cDNA 클론을 분리하기 위해 사용된 cDNA 라이브러리는 Invitrogen, San Diego, CA로부터 구입한 것과 같은 상업적으로 구입할 수 있는 시약을 사용하여 표준 방법에 의해 제조되었다. NotI 절단 부위를 포함한 올리고 dT을 프라이머로 붙인 cDNA는 반인산화된 SalL 어댑터에 블런트(blunt)로 연결되었으며, NotI으로 절단되었으며, 젤 전기 영동에 의해 적절하게 크기를 측정하였으며, 적

합한 클로닝 벡터(예를 들어 pRKB 또는 pRKD; pRK5B는 SfiI 절단 부위를 포함하지 않은 pRK5D의 전구체; Holmes 등 Science, 253:127801280(1991)등을 참조)의 전구체에 정해진 방향으로 유일한 XhoI 및 NotI 절단 부위에 클로닝되었다.

상기 기술한 바와 같이 분리된 클론의 DNA 염기 서열 분석은 PRO245 및의 전장 DNA 서열 및 PRO245의 파생 단백질 서열을 나타내었다[본원에서는 UNQ219(DNA35638)로 지칭]

UNQ219(DNA35638)의 전체 핵산 서열은 도 3에 나타내었다(서열 번호 1). 클론 UNQ219(DNA35638)은 핵산 89-91 위치에 명백한 번역 개시 자리[Kozak 등, 상기 참조]를 가지며 핵산 1025-1027 위치의 종료 코돈에서 끝나는 하나의 열린 해독틀을 포함한다. 예상되는 폴리펩티드 전구체는 312 아미노산 길이이다(도 4:PRO245; 서열 번호 2). 클론 UNQ219(DNA35638)은 1997년 9월 17일 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209265을 부여 받았다.

전장 PRO245의 아미노산 서열 분석은 이것의 일부분이 인간 c-myc 단백질과 60% 의 아미노산 상동성을 가지며, 따라서 막통과 단백질 수용체 티로신 키나제 군의 새로운 구성원일 수 있음을 암시한다.

II. PRO217을 코딩하는 cDNA클론의 분리

발현 서열 태그 데이타베이스를 탐색하기 위하여 스위스 프랏 공개 단백질 데이타베이스로부터 약 950개의 알려진 분비 단백질로부터의 세포외 도메인 (ECD) 서열(만약 존재한다면 분비 서열을 포함)이 사용되었다. EST 데이타베이스는 공개 EST 데이타베이스(예를 들어 Dayhof, GenBank) 및 독점 EST 데이타베이스(LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)을 포함한다. 탐색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2(Altshul, SF 및 Gish(1996), Methods in Enzymology 266: 460-480(1996); http://blast.wustl/edu/blast/README.html)을 사용하여 ESR 서열의 번역 6 프레임에 ECD 단백질 서열을 비교하여 수행되었다. BLAST 점수 70(또는 어떤 경우 90) 또는 그 이상으로 알려진 단백질을 코딩하지 않는 비교들은 취합하여 프로그램 " 프랩(phrap)" (Phil Green. University of Washington. Seattle. WA;(http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html)을 사용하여 일치 DNA 서열로 집합시켰다.

프랩을 사용하여 EGF 유사한 상동체를 코딩하는 일치 DNA 서열을 집합시켰다(DNA28726, DNA28730 및 DNA28760). 몇몇 경우, 상기 열거된 3 개의 EST 서열 공급원을 사용하여 가능한대로 일치 서열을 연장하기 위해 블라스트 및 프랩의 반복된 사이클을 이용하여 일치 DNA 서열을 연장하였다.

일치 서열에 근거하여 다음과 같은 목적으로 올리고뉴클레오티드를 합성하였다: 1)원하는 서열을 포함한 cDNA라이브로리를 PCR로 확인하고, 2)전장 코딩 서열의 클론을 분리하기 위한 프로브로 사용하기 위해서. 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍(각각 *.f 및 *. 로 표시됨)은 20 내지 30 뉴클레오티드(전형적으로는 24)의 범위이며, 길이 100-1000bp의 PCR 산물을 만들기 위해 고안되었다. 프로브 서열(*.p로 표시)은 전형적으로는 길이가 40-55bp 이다(전형적으로는 50). 몇몇 경우 일치 서열이 1-1.5kb 이상일 때 추가적인 올리고뉴클레오티드가 합성되었다. 전장 클론의 공급원을 위해 수 개의 라이브러리를 스크린하기 위해서, Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology에 따라서 PCR 프라이머 쌍을 가지고 라이브러리부터의 DNA을 PCR 증폭에 의해 스크린하였다. 그 후 프로브올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 이용하여 생체 내 클로닝 공정에 의해 원하는 유전자를 코딩하는 클론을 분리하는 데 양성 라이브러리를 사용하였다. DNA32279, DNA32292 및 DNA33094을 분리하는 데 사용된 라이브러리는 각각 태아 신장, 태아 폐 및 태아 폐이다.

cDNA 라이브러리 제작을 위한 RNA는 표준 분리 프로토콜, 예를 들어 Ausubel 등 Current Protocols in Molecular Biology을 사용하여 조직 또는 세포 계열로부터 분리하거나 또는 상업적 공급원(예를 들어 Clontech)으로부터 구입

하였다. cDNA클론을 분리하기 위해 사용된 cDNA 라이브러리는 표준 방법(예를 들어 Ausubel등)에 의해 상업적으로 구입할 수 있는 시약(예를 들어 Invitrogen)을 이용하여 제작되었다. NotI 절단 부위를 포함한 올리고 dT을 프라이머로 붙인 cDNA는 반인산화된 SalL 어댑터에 블런트(blunt)로 연결되었으며, NotI으로 절단되었으며, 젤 전기 영동에 의해 적절하게 크기를 측정하였으며, 적합한 클로닝 벡터(pRK5B 또는 pRK5D)의 유일한 XhoI 및 NotI 절단 부위에 클로닝되었다.

cDNA클론을 전체 염기 서열 분석하였다. EGF 유사한 상동체 PRO217의 전체 핵산 서열을 도 5(서열 번호 3)에 나타내었다. 예상되는 폴리펩티드는 대략 41.52kDa의 분자량을 가지는 379 아미노산 길이이다(PRO217; 도 6; 서열 번호 4)

상기 공정에 사용된 올리고뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

28726.p(OLI 500)(서열 번호 18)

GGGTACACCTGCTCCTGCACCGACGGATATTGGCTTCTGGAAGGCC

28726.p(OLI 502)(서열 번호 19)

ACAGATTCCCACCAGTGCAACC

28726.r(OLI 503)(서열 번호 20)

CACACTCGTTCACATCTTGGC

28730.p(OLI 516)(서열 번호 21)

AGGGAGCACGGACAGTGTGCAGATGTGGACGAGTGCTCACTAGCA

28730.f(OLI 517)(서열 번호 22)

AGAGTGTATCTCTGGCTACGC

28730.r(OLI 518)(서열 번호 23)

TAAGTCCGGCACATTACAGGTC

28760.p(OLI 617)(서열 번호 24)

CCCACGATGTATGAATGGTGGACTTTGTGTGACTCCTGGTTTCTGCATC

28760.f(OLI 618)(서열 번호 25)

AAAGACGCATCTGCGAGTGTCC

28760.r(OLI 619)(서열 번호 26)

TGCTGATTTCACACTGCTCTCCC

III. 인간 PRO301을 코딩하는 cDNA 클론의 분리

발현 서열 태그 데이타베이스를 탐색하기 위하여 스위스 프랏 공개 단백질 데이타베이스로부터 약 950개의 알려진 분비 단백질로부터의 세포외 도메인 (ECD) 서열(만약 존재한다면 분비 서열을 포함)이 사용되었다. EST 데이타베이스는 공개 EST 데이타베이스(예를 들어 Dayhof, GenBank) 및 독점 EST 데이타베이스(LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)을 포함한다. 탐색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2(Altshul 등, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996); http://blast.wustl/edu/blast/README.html)을 사용하여 ESR 서열의 번역 6 프레임에 ECD 단백질 서열을 비교하여 수행되었다. BLAST 점수 70(또는 어떤 경우 90) 또는 그 이상으로 알려진 단백질을 코딩하지 않는 비교들은 취합하여 프로그램 " 프랩(phrap)" (Phil Green. University of Washington. Seattle. WA;(http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html)을 사용하여 일치 DNA 서열로 집합시켰다.

프랩을 사용하여 EGF 유사한 상동체를 코딩하는 DNA35936을 코딩하는 일치 DNA 서열을 집합시켰다. 몇몇 경우, 상기 열거된 3 개의 EST 서열 공급원을 사용하여 가능한대로 일치 서열을 연장하기 위해 블라스트 및 프랩의 반복된 사이클을 이용하여 일치 DNA 서열을 연장하였다.

일치 서열에 근거하여 다음과 같은 목적으로 올리고뉴클레오티드를 합성하였다: 1)원하는 서열을 포함한 cDNA라이브로리를 PCR로 확인하고, 2)전장 코딩 서열의 클론을 분리하기 위한 프로브로 사용하기 위해서. 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍(각각 *.f 및 *. 로 표시됨)은 20 내지 30 뉴클레오티드(전형적으로는 약 24)의 범위이며, 길이 100-1000bp의 PCR 산물을 만들기 위해 고안되었다. 프로브 서열(*.p로 표시)은 전형적으로는 길이가 40-55bp이다(전형적으로는 약 50). 몇몇 경우 일치 서열이 1-1.5kb 이상일 때 추가적인 올리고뉴클레오티드가 합성되었다. 전장 클론의 공급원을 위해 수 개의 라이브러리를 스크린하기 위해서, Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology 에 따라서 PCR 프라이머 쌍을 가지고 라이브러리부터의 DNA을 PCR 증폭에 의해 스크린하였다. 그 후 프로브올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 이용하여 생체 내 클로닝 공정에 의해 원하는 유전자를 코딩하는 클론을 분리하는 데 양성 라이브러리를 사용하였다.

전장 클론의 공급원을 위해 여러 개의 라이브러리를 스크린하기 위해, 라이브러리의 DNA을 상기 확인된 PCR 프라이머로 PCR 증폭하여 스크린하였다. 그 후 양성 라이브러리를 사용하고, 프로브 올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 사용하여 PRO301을 코딩하는 클론을 분리하였다.

cDNA 라이브러리 제작을 위한 RNA는 인간 태아 신장으로부터 분리하였다. cDNA클론을 분리하기 위해 사용된 cDNA 라이브러리는 표준 방법(예를 들어 Ausubel등)에 의해 상업적으로 구입할 수 있는 시약(예를 들어 Invitrogen, San Diego, CA; Clontech 등)을 이용하여 제작되었다. NotI 절단 부위를 포함한 올리고 dT을 프라이머로 붙인 cDNA는 반인산화된 SalL 어댑터에 블런트(blunt)로 연결되었으며, NotI으로 절단(예를 들어 pRKB 또는 pRKD; pRK5B는 SfiI 절단 부위를 포함하지 않는 pRK5D의 전구체; Holmes 등 Science, 253:127801280(1991)등을 참조)의 전구체에 정해진 방향으로 유일한 XhoI 및 NotI 절단 부위에 클로닝되었다.

cDNA클론을 전체 염기 서열 분석하였다. 천연 서열 PRO301의 전장 핵산 서열을 도 7(서열 번호 5)에 나타내었다. 클론 DNA40628은 핵산 52-54 위치에 명백한 번역 개시 자리[Kozak 등, 상기 참조]를 가지는 하나의 열린 해독틀을 포함한다. 예상되는 폴리펩티드는 예상 분자량 32583 달톤 및 pI 8.29의 299 아미노산 길이이다(PRO301; 도 8: 서열 번호 6). 클론 DNA40628은 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209432을 부여 받았다.

전장 서열의 BLAST 및 FastA 서열 비교 분석에 근거하였을 때, PRO301은 A33 항원 전구체(30%)와 코사키 및 아데노바이러스 수용체 단백질(29%)와 아미노산 상동성을 보여주었다.

상기 공정에서 사용된 올리고뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

OLI2162(35936.f1) (서열 번호 27)

TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC

OLI2163(35936.p1) (서열 번호 28)

TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCT

OLI2164(35936.f2) (서열 번호 29)

ACACCTGGTTCAAAGATGGG

OLI2165(35936.r1) (서열 번호 30)

TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG

OLI2166(35936.f3) (서열 번호 31)

TTGCCTTACTCAGGTGCTAC

OLI2167(35936.r2) (서열 번호 32)

ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

IV. 인간 PRO266을 코딩하는 cDNA 클론의 분리

발현 서열 태그 데이타베이스를 탐색하기 위하여 스위스 프랏 공개 단백질 데이타베이스로부터 약 950개의 알려진 분비 단백질로부터의 세포외 도메인 (ECD) 서열(만약 존재한다면 분비 서열을 포함)이 사용되었다. EST 데이타베이스는 공개 EST 데이타베이스(예를 들어 GenBank) 및 독점 EST 데이타베이스(LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)을 포함한다. 탐색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2(Altshul 등, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))을 사용하여 ESR 서열의 번역 6 프레임에 ECD 단백질 서열을 비교하여 수행되었다. BLAST 점수 70(또는 어떤 경우 90) 또는 그 이상으로 알려진 단백질을 코딩하지 않는 비교들은 취합하여 프로그램 " 프랩(phrap)" (Phil Green. University of Washington. Seattle. WA; (http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html)을 사용하여 일치 DNA 서열로 집합시켰다.

일치 서열에 근거하여 다음과 같은 목적으로 올리고뉴클레오티드를 합성하였다: 1)원하는 서열을 포함한 cDNA라이브러리를 PCR로 확인하고, 2)전장 코딩 서열의 클론을 분리하기 위한 프로브로 사용하기 위해서. 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍(각각 *.f 및 *. 로 표시됨)은 20 내지 30 뉴클레오티드의 범위이며, 길이 100-1000bp의 PCR 산물을 만들기 위해 고안되었다. 프로브 서열(*.p로 표시)은 전형적으로는 길이가 40-55bp 이다. 몇몇 경우 일치 서열이 1-1.5kb 이상일 때 추가적인 올리고뉴클레오티드가 합성된다. 전장 클론의 공급원을 위해 수 개의 라이브러리를 스크린하기 위해서, Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology에 따라서 PCR 프라이머 쌍을 가지고 라이브러리부터의 DNA을 PCR 증폭에 의해 스크린하였다. 그 후 프로브올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 이용하여 생체 내 클로닝 공정에 의해 원하는 유전자를 코딩하는 클론을 분리하는 데 양성 라이브러리를 사용하였다.

PCR 프라이머 쌍(정방향 및 역방향)을 다음과 같이 합성하였다.

정방향 PCR 프라이머 5'-GTTGGATCTGGGCAACAATAAC-3' (서열 번호 33)

역방향 PCR 프라이머 5'-ATTGTTGTGCAGGCTGAGTTTAAG-3' (서열 번호 34)

아울러, 하기 핵산 서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오티드 혼성화 프로브를 제조하였다.

혼성화 프로브

5'-GGTGGCTATACATGGATAGCAATTACCTGGACACGCTGTCCCGGG-3'(서열 번호 35)

전장 클론의 공급원을 위해 여러 개의 라이브러리를 스크린하기 위해, 라이브러리의 DNA을 상기 확인된 PCR 프라이머로 PCR 증폭하여 스크린하였다. 그 후 양성 라이브러리를 사용하고, 프로브 올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 사용하여 PRO266을 코딩하는 클론을 분리하였다.

cDNA 라이브러리 제작을 위한 RNA는 인간 태아 뇌 조직으로부터 분리하였다. cDNA클론을 분리하기 위해 사용된 cDNA 라이브러리는 표준 방법에 의해 상업적으로 구입할 수 있는 시약(예를 들어 Invitrogen, San Diego, CA)을 이용하여 제작되었다. NotI 절단 부위를 포함한 올리고 dT을 프라이머로 붙인 cDNA는 반인산화된 SalL 어댑터에 블런트(blunt)로 연결되었으며, NotI으로 절단(예를 들어 pRKB 또는 pRKD; pRK5B는 SfiI 절단 부위를 포함하지 않은 pRK5D의 전구체; Holmes 등 Science, 253:127801280(1991)등을 참조)의 전구체에 정해진 방향으로 유일한 XhoI 및 NotI 절단 부위에 클로닝되었다.

상기 기술한 바와 같이 분리된 클론의 DNA 염기 서열 분석은 PRO266의 전장 DNA 서열[본원에서는 UNQ233(DNA37150)로 지칭] 및 PRO266의 파생 단백질 서열을 나타내었다.

UNQ233(DNA37150)의 전체 핵산 서열을 도 9(서열 번호 7)에 나타내었다. 클론 UNQ233(DNA37150)은 핵산 1-3 위치에 명백한 번역 개시 자리[Kozak 등, 상기 참조]를 가지며 핵산 2088 위치 후의 종료 코돈에서 끝나는 하나의 열린 해독틀을 포함한다. 예상되는 폴리펩티드는 696 아미노산 길이이다(도 10; PRO266; : 서열 번호 8). 클론 UNQ233(DNA37150)은 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209401을 부여 받았다.

전장 PRO266 폴리펩티드의 아미노산 서열 분석은 그 일부가 SLIT 단백질과 상당한 유사성이 있으며, 따라서 PRO266이 신규한 류신 다반복 단백질일 수 있음을 암시한다.

IV. 인간 PRO335, PRO331 또는 PRO326을 코딩하는 cDNA 클론의 분리

발현 서열 태그 데이타베이스를 탐색하기 위하여 스위스 프랏 공개 단백질 데이타베이스로부터 약 950개의 알려진 분비 단백질로부터의 세포외 도메인 (ECD) 서열(만약 존재한다면 분비 서열을 포함)이 사용되었다. EST 데이타베이스는 공개 EST 데이타베이스(예를 들어 GenBank) 및 독점 EST 데이타베이스(LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)을 포함한다. 탐색은 컴퓨터 프로그램 BLAST 또는 BLAST2(Altshul 등, Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))을 사용하여 ESR 서열의 번역 6 프레임에 ECD 단백질 서열을 비교하여 수행되었다. BLAST 점수 70(또는 어떤 경우 90) 또는 그 이상으로 알려진 단백질을 코딩하지 않는 비교들은 취합하여 프로그램 " 프랩(phrap)" (Phil Green. University of Washington. Seattle. WA; (http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html)을 사용하여 일치 DNA 서열로 집합시켰다.

프랩을 사용하여 다른 EST 서열에 대하여 일치 DNA 서열을 집합시켰다.

일치 서열에 근거하여 다음과 같은 목적으로 올리고뉴클레오티드를 합성하였다: 1)원하는 서열을 포함한 cDNA라이브러리를 PCR로 확인하고, 2)PRO335, PRO331 또는 PRO326의 전장 코딩 서열의 클론을 분리하기 위한 프로브로 사용하기 위해서. 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍은 통상 20 내지 30 뉴클레오티드의 범위이며, 길이 약 100-1000 bp의 PCR 산물을 만들기 위해 고안되었다. 프로브 서열은 전형적으로는 길이가 40-55bp 이다. 몇몇 경우 일치 서열이 1-1.5kb 이상일 때 추가적인 올리고뉴클레오티드가 합성되었다. 전장 클론의 공급원을 위해 수 개의 라이브러리를 스크린하기 위해서, Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology에 따라서 PCR 프라이머 쌍을 가지고 라이브러리부터의 DNA을 PCR 증폭에 의해 스크린하였다. 그 후 프로브올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 이용하여 생체 내 클로닝 공정에 의해 원하는 유전자를 코딩하는 클론을 분리하는 데 양성 라이브러리를 사용하였다.

전장 클론의 공급원을 위해 여러 개의 라이브러리를 스크린하기 위해, 라이브러리의 DNA을 상기 확인된 PCR 프라이머로 PCR 증폭하여 스크린하였다. 그 후 양성 라이브러리를 사용하고, 프로브 올리고뉴클레오티드와 PCR 프라이머 중 하나를 사용하여 PRO335, PRO331 또는 PRO326 유전자를 코딩하는 클론을 분리하였다.

cDNA 라이브러리 제작을 위한 RNA는 인간 태아 신장 조직(PRO335 및 PRO326) 과 인간 태아 뇌(PRO331)로부터 분리하였다. cDNA클론을 분리하기 위해 사용된 cDNA 라이브러리는 표준 방법에 의해 상업적으로 구입할 수 있는 시약(예를 들어 Invitrogen, San Diego, CA)을 이용하여 제작되었다. NotI 절단 부위를 포함한 올리고 dT을 프라이머로 붙인 cDNA는 반인산화된 SalL 어댑터에 블런트(blunt)로 연결되었으며, NotI으로 절단(예를 들어 pRKB 또는 pRKD; pRK5B는 SfiI 절단 부위를 포함하지 않는 pRK5D의 전구체; Holmes 등 Science, 253:127801280(1991)등을 참조)의 전구체에 정해진 방향으로 유일한 XhoI 및 NotI 절단 부위에 클로닝되었다.

상기 기술한 바와 같이 분리된 클론의 DNA 염기 서열 분석은 PRO335의 전장 DNA 서열(도 11: 서열 번호 9), PRO331의 전장 DNA 서열(도 13: 서열 번호 11), PRO326의 전장 DNA 서열(도 15: 서열 번호 13), 및 PRO335의 파생 단백질 서열(도 12: 서열 번호 10)을 나타내었다.

PRO335을 코딩하는 핵산은 1998년 6월 2일에 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209927을 부여 받았다; PRO331을 코딩하는 핵산은 1997년 11월 7일에 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209439을 부여 받았다; 또한 PRO326을 코딩하는 핵산은 1997년 11월 21일에 ATCC에 기탁되었으며, ATCC 기탁 번호 제209489을 부여 받았다.

전장 PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 아미노산 서열 분석은 그 일부가 LIG-1 단백질과 상당한 유사성이 있으며, 따라서 PRO335, PRO331 또는 PRO326이 신규한 LIG-1 연관 단백질일 수 있음을 암시한다.

실시예 2

혼합 림프구 반응(MLR) 분석에서의 자극도(No.24)

본 실시예는 본 발명의 폴리펩티드가 자극된 T 림프구의 증식의 자극제로 유효한 것을 나타낸다. 림프구의 증식을 자극하는 화합물은 면역 반응의 증가가 유익할 때 치료적으로 유용하다. 림프구의 증식을 저해하는 화합물은 면역 반응의 억제가 유익할 때 치료적으로 유용하다. 본 발명의 폴리펩티드의 길항제의 형태를 띄는 치료제는 예를 들어 상기 폴리펩타이드에 대한 쥐-인간 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다.

본 분석의 기본적인 프로토콜은 J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober 편저 Current Protocols in Immunology, unit 3.12, National Institutes of Health, Published by Wiley & Sons, Inc.에 기술되어 있다.

보다 상세하게는, 분석의 한 변형에서 말초형 단핵구 세포(PBMC)는 포유류 개체(예를 들어 인간 지원자)로부터 백혈구성분채집술에 의해 분리되었다(한 제공자는 자극자 PBMCs을 공급할 것이고, 다른 제공자는 반응자 PBMCs을 공급할 것이다). 바란다면, 세포는 분리 후에 우태아 혈청 및 DMSO에서 냉동될 것이다. 냉동된 세포는 분석 배지(37℃, 5% CO_2)에서 밤새 해동되었고 세척되었으며 분석 배지(RPMI: 10% 우태아 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민, 1% 헤페스, 1% 비필수 아미노산. 1% 피루브산)에 3×10^6 세포/㎖로 재현탁되었다.

자극자 PBMCs는 세포를 방사선 조사하여 얻었다(약 3000 Rads). 분석은 하기 성분의 혼합물로 웰에 3번씩 플레이팅하여 수행되었다.

1% 또는 0.1%로 희석된 시험 샘플 100 ㎕

방사선 조사된 자극자 세포 50 ㎕ 및

반응자 PBMC 세포 50 ㎕

세포 배양 배지 100 마이크로리터 또는 CD4-IgG 100 마이크로리터가 대조구로 사용되었다. 그 다음 웰을 37℃, 5% CO_2에서 4일간 배양하였다. 5일째에 각 웰을 3중 수소로 펄스를 주었다(1.0 mC/웰;에머샴). 6시간 경과 후에 세포를 3회 세척하였으며 레이블 획득을 평가하였다.

본 분석의 다른 변형에서는, PBMCs를 Balb/c 마우스 및 C57B6 마우스의 비장으로부터 분리하였다. 분석 배지(RPMI; 10% 우태아 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 글루타민, 1% 헤페스, 1% 비필수 아미노산, 1% 피루브산)중에서 새롭게 수거된 비장으로부터 세워낸 세포와 상기 세포들을 림프구 M(Organon Teknika)위에 중첩시켜 분리한 PBMCs을 2000rpm에서 20분 동안 원심분리하였고, 수집하였으며 단핵구 세포 층을 분석 배지 중에서 세척하였고 분석 배지 중에 1×10^7 세포/㎖로 재현탁하였다. 그 후 보존 용액을 희석하여 얻어진 PRO 농도를 가진 샘플을 사용하여 상기에서 기술한 바와 같이 분석을 수행하였다. 본 발명의 화합물에 대한 상기 분석의 결과는 아래 표 2와 같다. 대조구에 대한 양성 증가는 바람직한 180%와 같거나 그 이상의 증가의 양성으로 여겨진다. 여하튼, 대조구보다 큰 어떠한 값도 시험 단백질의 자극 효과를 나타낸다.

표 2

PRO	PRO 농도	대조군에 대한 % 증가
PRO245	0.1%	189.7
"	0.1%	193.7
"	1.0%	212.5
"	1.0%	300.5
PRO217	0.1%	74.5
"	1.0%	89.5
"	0.99nM	97.0
"	9.9nM	122.3
"	0.25nM	144.8
"	2.5nM	126.9
PRO301	50.0%	109.4
"	70.0nM	133.7
"	700.0nM	83.6
"	0.1%	58.7
PRO301	1.0%	127.7
"	0.1%	181.7
"	1.0%	187.3
"	0.1%	127.5
"	1.0%	108.3
PRO266	0.1%	136.4
"	0.1%	139.2
"	1.0%	189.8
"	1.0%	245.1
PRO335	50.0%	91.0
"	50.0%	103.8
"	0.1%	130.0
"	1.0%	180.2
PRO331	50.0%	155.5
"	0.1%	169.3
"	1.0%	128.1
"	0.1%	129.3
"	1.0%	162.5
PRO326	50.0%	91.0
"	50.0%	103.8
"	0.1%	130.0
"	1.0%	180.2

실시예 3

피부 혈관 통과 분석(No.64)

본 분석은 본 발명의 일부 폴리펩티드가 면역 반응을 자극하고 동물의 주사 부위에 단핵구 세포, 호산구 및 PMN 침윤을 유도함으로써 염증을 유도하였다. 본 피부 혈관 침투 분석은 다음과 같이 실시되었다. 350 그램 또는 그 이상의 무모 기니아 피그을 케타민(75-80㎎/Kg) 및 5㎎/Kg 실라진으로 근육내(IM) 마취하였다. 정제된 본 발명의 폴리펩티드의 샘플 또는 조절된 배지 시험 샘플을 주사 부위 당 100㎕로 시험 동물의 등에 피내 주사하였다. 동물 당 10-30, 바람직하게는 16-24의 주사 부위를 가질 수 있다. 에반스 청색 염료 (생리적으로 완충된 염수 중의 1%) 1㎖을 심근내 주사하였다. 그 후 주사 1시간 경과 후와 6시간 경과 후에 주사 부위의 얼룩을 측정하였다(㎜ 지름). 주사 6시간 경과 후 동물을 희생시켰다. 각 피부 주사 부위를 생검하였으며 포르말린에 고정하였다. 그 후 피부를 조직병리학 평가를

위해 준비하였다. 각 부위는 피부 내에 염증 세포 침윤으로 평가되었다. 눈에 보이는 염증 세포 침윤이 있는 부위는 양성으로 계산되었다. 염증 세포는 호중구, 호산구, 단핵구 또는 림프구일 수 있다. 본 발명의 화합물의 본 시험의 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

하기 표 3에서, 최소한 주사 부위에서의 최소 혈관 주위 침윤은 양성으로 계산되었으며, 주사 부위에서 침윤이 없는 것은 음성으로 계산되었다.

표 3

PRO	주사 후 경과시간	침윤 지정
PRO245	24시간	양성
PRO217	24시간	양성
PRO301	24시간	양성
PRO266	24시간	양성
PRO335	24시간	양성
PRO331	24시간	양성
PRO326	24시간	양성

실시예 4

인간 공동 자극 분석

T 세포 수용체에 의해 매개되는 활성 신호와 아울러 T 세포 활성화는 공동자극 신호를 요구한다. 한 공동 자극 신호는 B7(CD3)와 CD28의 상호 작용에 의해 발생한다. 본 분석에서, 96 웰 플레이트는 CD28 과 함께 또는 CD28 없이 CD3로 코딩되었으며, 그 다음 인간 말초 혈액 림프구에 이어 시험 단백질이 첨가되었다. 림프구의 증식은 3중 수소 흡수에 의해 결정되었다. 양성 분석은 림프구 증식을 위한 자극 신호가 제공된 시험 단백질을 나타내었다.

재료:

1)칼슘, 마그네슘이 없는 하이클론 D-PBS

2)넝크 96 웰의 보증된 플레이트 #4-39454

3)항-인간 CD3 아메크0178 200㎍/㎖ 보존액

4)항-인간 CD28 바이오디자인 P42235M

5)배지; 기브코 RPMI 1640 10% 인터젠#1020-90 FBS, 1% Glu, 1% P/S, 50㎍/㎖ 젠타마이신, 10mM 헤페스. 매일 새 것으로.

6)삼중 수소

7)혈구이동 공정에 의해 수집된 냉동된 인간 말초 혈액 림프구(PBL)

항-CD3항체(아메크) 또는 항-CD28항체(바이오디자인) 또는 칼슘 및 마그네슘이 없는 하이클론 D-PBS 중의 두 항체로 96웰 평판 바닥 플레이트를 코팅하여 플레이트를 준비하였다. 전체 부피 100㎕ 중 항-CD3 항체는 10ng/웰 (200ng/㎖의 50㎕) 로 사용되었으며, 항-CD28 항체는 25ng/웰 (0.5㎍/㎖의 50㎕)로 사용되었다.

PBLs는 표준 혈구이동 방법을 사용하여 인간 공여자로부터 분리하였다. 준비된 세포는 분석이 수행될 때까지 50% 우태아 혈청 및 50% DMSO 중에 냉동하였다. 해동하고 배지 중 PBLs로 세척하고, 배지 25㎖ 중 PBLs에 재현탁하고, 37℃, 5% CO_2에 밤새 배양하여서 세포를 준비하였다.

분석 과정 중에서, 코팅된 플레이트는 PBS로 두 번 세척되었으며, PBLs는 세척되었으며 100μL/웰을 이용하여 1×10^6 세포로 재현탁되었다. 시험 단백질 또는 대조구 배지 100㎕을 플레이트에 첨가하여 웰당 200㎕의 최종 부피를 만들었다. 그 다음 삼중 수소로(1mC/웰;에머샴) 플레이트에 6시간 동안 펄스를 주었으며 플레이트로부터 PBLs을 수거하였으며 삼중 수소의 흡수를 평가하였다.

실시예 5

제자리 혼성화

제자리 혼성화는 세포 또는 조직 표본에서의 핵산 서열의 탐지와 국지화를 위한 강력하고 융통성이 있는 기술이다. 이는 예를 들어 유전자 발현의 부위를 확인하고, 전사의 조직 분포를 분석하고, 바이러스 감염을 확인하고 국지화하고, 특정 mRNA 합성에서의 변화를 추적하고 염색체 지도 작성에 있어서 도움을 주는 데에 유용할 수 있다.

제자리 혼성화는 하기와 같이 수행되었으며 루 및 질레트, Cell Vision 1:169-176(1994)의 프로토콜 판에 따라 PCR 생성된^{33}P-표지화된 라이보프로프을 사용하여 최적화하였다. 간단하게, 포르말린 고정화되고, 파라핀에 담긴 인간 조직을 단편화하였고, 파라핀을 제거하였고, 37℃에 15분간 프로티네이즈 K(20g/㎖)에서 단백질을 제거하였으며, 상기 언급된 루 및 질레트에 의해 기술된대로 제자리 혼성화를 위해 더 처리하였다. [^{33}P]UTP-표지화된 역방향 라이보프로브는 PCR 산물로부터 생성되었으며 밤새 55℃에서 혼성화하였다. 슬라이드를 코닥 NTP2 핵 추적 유제액에 적셨으며 4주 동안 노출시켰다.

^{33} 33P-라이보프로브 합성

^{33}P-UTP(에머셤 BF 1002, SA< 2000Ci/mmol) 6.0㎕(125mCi)을 스피드 백으로 건조시켰다. 건조된^{33}P $^{=U}$ TP을 포함한 각 튜브에 하기 성분을 첨가하였다.

2.0㎕ 5x 전사 완충용액

1.0㎕ DTT(100mM)

2.0㎕ NTP 혼합액(2.5mM:10mM GTP, CTP & ATP+10㎕ H20 각각 10㎕)

1.0㎕ UTP(50μM)

1.0㎕ Rnasin

1.0㎕ DNA 주형(1㎍)

1.0㎕ H_20

튜브는 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 1.0㎕ RQ1 DNase을 첨가하였으고 이어서 37℃에서 15 분 동안 반응시켰다. 90㎕ TE(10mM Tris pH7.6/1mM EDTA pH8.0)을 첨가하였으며, 혼합액을 DE81 페이퍼 상에 분주하였다. 잔액을 마이크론-50 한회여과 유닛에 붓고, 프로그램 10(6분)을 사용하여 회전시켰다. 여과액 유닛을 두번째 튜브 위에서 뒤집고 프로그램 2(3분)을 사용하여 회전시켰다. 마지막 회수 회전 후에, 100㎕ TE을 첨가하였다. 마지막 산물의 1㎕을 DE81 페이퍼 상에서 분주하였으며 바이오프루오르 II 6㎖안에서 계측하였다.

프로브를 TBE./유레아 겔에서 달렸다. 프로브 1-3㎕ 또는 RNA Mrk III 5㎕을 3㎕ 로딩 완충용액에 첨가하였다. 3분 동안 95℃ 열 블락에서 가열한 후에, 겔을 재빨리 얼음 위에 놓았다. 겔의 웰을 씻어내고, 샘플을 로딩하였으며 180-250 볼트에서 45분 동안 달렸다. 겔을 사란 랩으로 싸고 강화 스크린과 함께 XAR 필름에 -70℃ 냉동고안에서 1시간 내지 밤새 노출시켰다.

^{33} 33P-혼성화

냉동 단편의 전처리냉동고에서 슬라이드를 제거하고, 알루미늄 접시에 놓고 실온에서 5분 동안 해동시켰다. 응축을 감소시키기 위하여 5분 동안 접시를 55℃ 배양기에 놓았다. 증발 후드 안 얼음 위에서 슬라이드를 4% 파라포름알데하이드에 10분 동안 고정시켰으며, 0.5x SSC에서 5분 동안, 실온에서 세척하였다(25㎖ 20x SSC 975㎖ SQ H2O). 0.5㎍/㎖ 프로티네이즈 K에 37℃에서 10 분 동안 탈단백질한 다음(250㎖ 미리 덥힌 RNase-제거된 RNAse 완충용액 250㎖에 10㎎/㎖ 저장액 12.5㎕), 절편을 실온에서 10분 동안 0.5x SSC에서 세척하였다. 절편은 70%, 95%, 100% 에탄올에서 각각 2분씩 탈수하였다.

파라핀에 담긴 절편의 전처리슬라이드에서 파라핀을 제거하였으며, SQ H2O에 놓았으며, 실온에서 2xSSC로 각 5분씩 두 번 세척하였다. 절편을 20㎍/㎖ 프로티네이즈 K(250㎖ RNase-제거된 RNase 완충용액 중의 10㎎/㎖ 500㎕, 37℃, 15분) -인간 배, 또는 8x 프로티네이즈 K(250㎖ RNase 완충용액 중의 100㎕, 37℃, 30분)-포르말린 조직 안에서 탈단백질하였다. 이어서 0.5xSSC에서 씻었으며 상기에서 언급된 바와 같이 탈수를 수행하였다.

전혼성화박스 완충용액(4x SSC, 50% 포름아미드)으로 적신 여과지에 연결된 플라스틱 박스에 슬라이드를 펼쳐 놓았다. 조직을 50㎕ 혼성화 온충용액(3.75g 덱스트란 설페이트 6㎖ SQ H2O)로 덮은 후, 볼텍스하였고 뚜껑을 느슨히 하고 마이크로웨이브에서 2분 동안 가열하였다. 얼음 위에서 냉각시킨 후, 18.75㎖ 포름아미드, 3.75㎖ 20x SSC 및 9㎖ SQ H2O을 첨가하였으며, 조직을 잘 볼텍스하고 42℃에서 1-4시간 동안 배양시켰다.

혼성화슬라이드마다 1.0x10^{6} cpm 프로브 및 1.0㎕ tRNA(50㎎/㎖ 저장액)을 95℃에서 3분 동안 가열하였다. 슬라이드는 얼음 위에서 냉각하였으며, 48㎕ 혼성화 완충용액을 슬라이드에 첨가하였다. 볼텍싱 후, 50㎕ 33P 혼합액을 슬라이드 위의 50㎕ 전혼성화에 첨가하였다. 슬라이드는 55℃에서 밤새 배양하였다.

세척세척은 2xSSC, EDTA로 실온에서 2x10분 동안 수행되었다(400㎖ 20x SSC 16㎖ 0.25M EDTA, V_f=4L).

DNA 35638(1TM 수용체)

발현은 태아 및 태반의 관의 일부의 내피세포 내층에서 관찰되었다. 내피세포의 발현은 이들 조직 블락에 한정되었다.. 발현은 또한 태반의 중간 영양막 세포 전체에 나타났다.

올리고 C-120N(서열 번호 36)

GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGC GGC GGC TCA GGT CTT CAG TT

올리고 c-120P(서열 번호 37)

CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCA TGG GAT GGG GAG GGA TAC GG

DNA 33094(EGF 유사체)

고도로 확연한 발현 양상이 관찰되었다. 인간 배아 발현에서는 위장관의 외벽 평활근층, 호흡 연골 조직, 분기한 호흡 표피, 골막, 건, 생식선, 시신경 상부 및 발생 진피에서 관찰되었다. 성인에서는 발현은 침팬지 혀의 표피 쐐기, 전립선 및 비뇨기의 기저 표피/근육표피 세포에서 관찰되었다. 발현은 또한 성인 폐의 폐포 내층세포, 음경 및 대뇌 피질(아마도 신경 교질 세포)에서의 발기성 조직에 병치된 간충 조직 세포에서 발견되었다. 신장에서 발현은 질환시, 갑상선화된

신세뇨관을 둘러산 세포에서 발견되었다.

올리고 D-200V(서열 번호 38)

CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ATA GCA GGC CAT CCC AGG ACA

올리고 D-200z(서열 번호 39)

CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCT CTT CCA TGC CAA CCT TC

실시예 6

세포 및 질환 조직에서의 제자리 혼성화

실시예 5의 제자리 혼성화 방법은 유전자 발현을 결정하고, 전사의 조직 분포를 분석하고 특정 질환을 겪고 있는 인간 개개인에서 분리된 질환 조직에서의 본 발명의 유전자/DNA s 및 단백질의 특정 mRNA 합성 변화를 추적하기 위해 사용되었다. 이들 결과는 본 발명의 유전자가 발현된 질환 조직에서 보다 특징적이며 질환에서의 본 발명의 저해성 또는 촉진성 화합물(및 이들의 촉진제 또는 길항제)의 치료적 효과의 특정한 국지화에 보다 예보적이다. 하나 이상의 하기 조직 및 세포 샘플을 이용하여 실시예5의 방법에 따라 혼성화를 수행하였다:

(a)림프구 및 항원 제공 세포(수지상 세포, 랑게르한스 세포, 대식세포 및 단핵구 세포, NK 세포);

(b)림프계 조직: 정상 또는 반응성 림프절, 흉선, 기관지 연관 림프계 조직(BALT), 점막 연관 림프계 조직(MALT);

(c)인간 질환 조직

- 관절염 및 퇴행성 관절 질환 환자의 활액 및 관절
- 궤양성 대장염 및 크로한스 질환을 포함한 염증성 장 질환 환자로부터의 결장
- 건선 및 다른 형태의 피부염으로부터의 피부 병변
- 만성 및 급성 기관지염, 폐렴, 늑막염으로부터의 BALT 및 조직 림프절을 포함한 폐 조직
- 천식으로부터의 BALT 및 조직 림프절을 포함한 폐 조직
- 비염 또는 정맥 동염 환자로부터의 코 및 공동 조직
- 다발성 경화증으로부터의 뇌 및 등골. 알츠아히머 질환 및 발작
- 신장염, 신사구체 신장염 및 전신 낭창 홍반증의 신장
- 감염성 및 비감염성 헤파타이티의 간
- 종양/암의 조직

세포 또는 조직 샘플과 관련된 질환에서의 본 발명의 저해성 또는 촉진성 화합물(및 이들의 촉진제 또는 길항제)의 치료적 효과의 국지화를 나타내는 하나 이상의 세포 또는 조직 샘플에서 발현이 관찰되었다.

DNA 35638(PRO245)는 염증이 일어난 인간 조직(건선, 염증성 장 질환(IBD), 염증이 일어난 신장, 염증이 일어난 폐, 감염(간 블락). 정상 편도선, 성인 및 침팬지(멀티블락)에서 발현되는 것이 발견되었다. 발현은 만성 염증을 겪는 폐에서의 큰 관의 내피 세포/내층, 건선 피부의 표피 진피 관, 만성 경화증 신장염에서의 소동맥 및 편도선의 말초 여포성 공동을 포함한 모세 혈관에 존재하였다. 이들 결과는 PRO245가 면역자극성이며(MLR 및 공동자극에서 T 림프구의 증식을 강화한다) 전염증성 성질을 갖고 있는 것을(생체 내에서 중성 백혈구의 침윤을 유도한다) 나타낸다.

실시예 7

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 혼성화 프로브로 사용

하기 방법은 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 코딩하는 핵산 서열을 혼성화 프로브로 사용하는 것을 기술한다.

전장 또는 성숙한 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 코딩 서열을 포함하는 DNA(도 4, 6, 8, 10, 12, 14, 및 16)가 인간 조직 cDNA 라이브러리 또는 인간 조직 게놈 라이브러리에서 유사한 DNAs(예를 들어 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 자연적으로 발생하는 변이체를 코딩하는 것들)을 스크린하기 위한 프로브로서 쓰였다.

각각의 라이브러리 DNAs을 포함한 여과지의 혼성화와 세척은 엄격한 혼성화 조건을 따라 수행되었다. 방사능 표지화된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 유도된 프로브의 여과지로의 혼성화는 50% 포름아미드, 5xSSC, 0.1% SDS, 0.1% 피로인산산 나트륨, 50mM 인산 나트륨, pH6.8, 2x 덴하르드트 용액 및 10% 덱스트란 설페이트 중에서 42℃에서 20시간 동안 수행하였다. 여과지의 세척은 42℃에서 0.1x SSC 및 0.1% SDS의 수용액중에서 수행하였다.

그 후 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 전장 천연 서열을 코딩하는 DNA와 원하는 서열 상동성을 가지는 DNAs는 본 발명의 기술 분야에서 알려진 표준 기술을 사용하여 확인될 수 있었다.

실시예 8

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 대장균에서의 발현

본 실시예는 대장균에서의 재조합 발현에 의한 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 당화되지 않은 형태의 제조를 예시한다.

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 코딩하는 DNA 서열은 초기에는 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 프라이머는 선택된 발현 벡터상의 제한 효소 부위에 해당하는 제한 효소 부위를 포함하고 있어야 한다. 다양한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예는 앰피실린 및 테트라사이클린 저항성을 위한 유전자를 포함한 pBR322(대장균 유래; Bolivar 등 참조, Gene, 2:95(1997))이다. 벡터는 제한 효소는 제한 효소로 절단되고 탈인산화되었다. 그 후 PCR 증폭된 서열은 벡터에 연결되었다. 벡터는 바람직하게는 항생제 저항성 유전자, trp 프로모터, 폴리히스티딘 리더(먼저 6개의 STII 코돈, 폴리히스 서열 및 엔테로카이네이즈 절단 부위), PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 코딩 부위, 람다 전사 종결자 및 argU 유전자를 코딩하는 서열을 포함한다.

그 다음 상기에서 언급한 Sambrook 등에 기술된 방법을 사용하여 선택된 대장균을 형질전환하기 위하여 연결 혼합물이 사용되었다. 형질 전환체는 LB 플레이트 상에서 자랄 수 있는 능력으로 확인하였으며 그 다음 항생제 저항성 콜로니를 선택하였다. 플라스미드 DNA를 분리하였으며 제한효소 분석과 DNA 염기 서열 분석으로 확증하였다.

선택된 콜로니는 항생제가 부가된 LB 브로스와 같은 액체 배양 배지에서 밤새 배양될 수 있다. 이어서 밤샘 배양은 더 큰 규모의 배양을 접종하는 데 사용될 수 있다. 그 후 세포를 원하는 광학 밀도까지 키웠으며, 그 동안 발현 프로모터가 켜지게 되었다.

수시간 동안 세포를 배양한 후에, 원심분리에 의해 세포를 수집하였다. 원심 분리에 의해 얻은 세포 펠릿은 본 기술 분야에서 공지의 다양한 약제를 사용하여 녹일 수 있었으며, 그 다음 용해된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 단백질은 단백질의 단단한 결합을 하게 하는 조건하에서 금속 킬레이팅 컬럼을 사용하여 정제하였다.

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266는 폴리-히스 꼬리 표지화된 형태로 대장균내에서 하기 공정을 따라 발현되었다. PRO245, PRO217, PRO301, PRO266을 코딩하는 DNA는 초기에는 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭되었다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한 효소 부위에 해당하는 제한 효소 부위를 포함하며, 효율적이고 신쇠할 수 있는 번역 개시, 금속 킬레이션 컬럼 상에서의 신속한 정제 및 엔테로카이네이즈에 의한 단백질 분해에 의한 제거를 제공하는 다른 유용한 서열을 가진다. 그 다음 PCR 증폭된, 폴리 His 꼬리 표지화된 서열이 벌현 벡터에 연결되었으며 이는 균주 52에 근거한 대장균 숙주 세포(W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoH ts(htpRst) clipP(lacIq))를 형질전환하는 데에 사용되었다. 형질전환체는 처음에는 50㎎/㎖ 카베니실린을 함유한 LB에서 30℃, 교반하면서 3-5 O.D. 600에 도달할 때가지 키웠다. 그 다음 배양액을 50-100배로 CARP배지(3.57g (NH4)2SO4, 0.71g 시트르산나트륨. 2H$_2$O, 1.07g KCl, 5.36g 디프코 효소 추출액, 500㎖ 물 중의 5.36g 세필드 하이케이스 SF, 또한 110mM MPOS, pH7.3, 0.55%(w/v) 포도당 및 7mM MgSO$_4$)에 희석하여 30℃에서 교반하면서 약 20-30 시간 동안 키웠다. SDS-PAGE 분석으로 발현을 확인하기 위해 샘플을 제거하였으며, 대량 배양액을 세포를 펠릿화하기 위해 원심분리하였다. 세포 펠릿은 정제 및 재접힘을 할 때까지 얼려놓았다.

0.5 내지 1L 발효액으로부터의 대장균 반죽(6-10g 펠릿)을 10배 부피(w/v)의 7M 구아니딘, 20mM Tris, pH 8 완충용액에 재현탁하였다. 고체 아황산나트륨 및 사티온나트륨을 첨가하여 각각 최종 농도 0.1 M 및 0.02 M을 만들었으며, 용액을 4℃에서 밤새 교반하였다. 이 단계는 모든 시스테인 잔기가 아황산화된 변성화된 단백질을 생성하게 하였다. 용액을 벡맨 한외여과기에서 30분 동안 40,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 3-5 부피의 금속 킬레이트 컬럼 완충용액(6M 구아니딘, 20mM Tris, pH7.4)에 희석화였으며, 용액을 맑게 하기 위해 0.22 마이크론 여과지로 여과하였다. 종속하는 맑게 된 추출물을 금속 킬레이트 컬럼 완충용액으로 평형화된 5㎖ 퀴아젠 Ni-NTA 금속 킬레이트 컬럼에 부었다. 50mM 이미다졸(Calbiochem, Ultol grade), pH7.4을 포함하는 추가적인 완충용액으로 컬럼을 세척하였다. 250mM 이미다졸을 포함한 완충용액으로 단백질을 용출하였다. 원하는 단백질을 포함한 부분을 합하고 4℃에서 보관하였다. 아미노산 서열에 근거하여 계산된 흡광 계수를 사용한 280nm에서 그 흡광도에 의해 단백질 농도를 추정하였다.

단백질은 새로 준비된 재접힘 완충용액(20mM Tris, pH8.6, 0.3M NaCl, 2.5M 유레아, 5mM 시스테인, 20mM 글라이신 및 1mM EDTA)안으로 샘플을 천천히 희석하여 다시 접혀졌다. 재접힘 부피는 최종 단백질 농도가 50 내지 100 마이크로그램/㎖ 사이에 들어가도록 선택되었다. 재접힘 용액은 4℃에서 12-36 시간 동안 부드럽게 교반되었다. 재접힘 반응은 TFA을 최종 농도 0.04%(pH 약 3)로 첨가하여 종결되었다. 단백질을 더 정제하기 전에, 용액을 0.22 마이크론 여과지를 통해 여과하였으며 아세코나이트릴을 최종 농도 2-10%로 첨가하였다. 재접힘 단백질은 Poros R1/H 역상 컬럼 상에서 0.1% TFA 유동 완충용액으로 아세토나이트릴 농도구배 10 내지 80%로 크로마토그램하였다. A 280 흡광도의 부분의 분취량을 SDS 폴리아클릴아미드 겔에서 분석하였으며 균일 재접힘 단백질을 포함한 부분을 합하였다. 통상적으로, 대부분의 단백질의 알맞게 재접힘된 종류는 이들 종류가 그 소수성 내부가 역상 수지와의 상호작용으로부터 숨겨지기 때문에 가장 치밀하므로 가장 낮은 아세토나이트릴 농도에서 용출되었다. 응집된 종류는 일반적으로 가장 높은 아세토나이트릴 농도에서 용출되었다. 잘못 접힌 형태의 단백질을 원하는 형태로부터 분리하는 것과 아울러,

역상 단계는 샘플로부터 엔도톡신을 제거하였다.

원하는 접힌 PRO245, PRO217, PRO301 및 PRO266 단백질을 각각 포함한 부분을 합하였고 용액을 향한 부드러운 질소 유출을 이용하여 아세토나이트릴을 제거하였다. 단백질은 20mM 헤페스, pH6.8의 0.14M 염화나트륨 및 4% 만니톨 중으로 투석 또는 제형화 완충 용액 및 여과한 멸균제에서 평형화된 G25 Superfine(Pharmacia) 수지 를 이용한 겔 여과에 의해 제형화되었다.

실시예 9

포유동물 세포 중 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 발현

이 실시예는 포유동물 세포 중 재조합 발현에 의한 잠재적으로 글리코실화된 형태의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 제조를 예시한다.

벡터 pRK5(1989년 3월 15일 발행된 EP 307,247 참조)를 발현 벡터로서 사용한다. 임의적으로, 선택된 제한 효소에 의해 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 DNA를 pRK5로 결찰시켜, 상기 샘브룩 등의 문헌에 기재된 것과 같은 결찰 방법을 사용하여 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 DNA를 삽입시킨다. 생성된 벡터를 pRK5-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326이라 한다.

일 실시양태에서, 선택된 숙주 세포는 293 세포일 수 있다. 인간 293 세포(ATCC CCL 1573)를, 태아 송아지 혈청 및 임의적으로 영양 성분 및(또는) 항생제가 보충된 DMEM과 같은 배지 중에서 조직 배양 플레이트 중에서 컨플루언스가 되도록 생장시킨다. 약 10 μg의 pRK5-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 DNA를 VA RNA 유전자를 암호화하는 DNA 약 1 μg과 혼합하고[Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)] 500 μl의 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M $CaCl_2$ 중에 녹인다. 이 혼합물에 500 μl의 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM $NaPO_4$를 적가하고 25℃에서 10분간 침전을 형성시킨다. 침전을 현탁하고 293 세포에 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 침전시킨다. 배양 배지를 흡인하고 PBS 중의 20% 글리세롤 2 ml를 30초간 첨가한다. 이어, 293 세포를 무혈청 배지로 세척하고 신선 배지를 첨가하고 세포를 약 5일간 배양한다.

트랜스펙션 후 약 24시간 후, 배양 배지를 제거하고 배양 배지(단독) 또는 200 μCi/ml ^{35}S-시스테인 및 200 μCi/ml ^{35}S-메티오닌을 함유하는 배양 배지로 대체한다. 12시간 배양 후, 컨디셔닝한 배지를 수집하고 스핀 필터 상에서 농축하고 15% SDS 겔 상에 로딩한다. 처리한 겔을 건조시키고 선택 시간 동안 필름에 노출시켜 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 존재를 밝힐 수 있다. 트랜스펙션된 세포를 함유하는 배양물을 추가로 (무혈청 배지 중에서) 배양할 수 있으며, 배지를 선택된 생 검정분석(bioassay)으로 테스트한다.

대체적인 기술로는, 문헌[Somparyac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)]에 기술된 덱스트란 술페이트 방법을 일시적으로 사용하여 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 293 세포 중으로 도입할 수 있다. 293 세포를 스피너 플라스크 중에서 최대 밀도까지 성장시키고 700 μg pRK5-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 DNA를 첨가한다. 세포를 먼저 원심분리에 의해 스피너 플라스크로부터 농축시키고 PBS로 세척한다. DNA-덱스트란 침전을 세포 펠릿 상에서 4시간 동안 배양한다. 세포를 20% 글리세롤로 90초간 처리하고, 조직 배양 배지로 세척하여, 조직 배양 배지, 5 μg/ml 소 인슐린 및 0.1 μg/ml 소 트랜스페린을 함유하는 스피너 플라스크로 재도입한다. 약 4일 후, 컨디셔닝한 배지를 원심분리 및 여과하여 세포 및 잔해를 제거한다. 이어, 투석 및(또는) 컬럼 크로마토그래피와 같은 임의의 선택된 방법에 의해, 발현된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 함유하는 샘플을 농축 및 정제할 수 있다.

또다른 실시양태에서, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 CHO 세포 중에서 발현시킬 수 있다. $CaPO_4$ 또는 DEAE-덱스트란과 같은 공지 시약을 사용하여 pRK5-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 CHO 세포 중으로 트랜스펙션시킬 수 있다. 상기한 바와 같이, 세포 배양물을 배양하고 배지를 배양 배지(단독) 또는 ^{35}S-메티오닌과 같은 방사능 표지를 함유하는 배지로 대체할 수 있다. PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 존재를 결정한 후에, 배양 배지를 무혈청 배지로 대체할 수 있다. 바람직하게는, 배양물을 약 6일간 배양한 후 컨디셔닝된 배지를 수확한다. 이어, 발현된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 함유하는 배지를 임의의 선택된 방법으로 농축 및 정제할 수 있다.

에피토프 태그를 단 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 또한 숙주 CHO 세포 중에서 발현될 수 있다. PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 pRK5 벡터로부터 서브클로닝할 수 있다. 서브클론 삽입체를 PCR하여 폴리-his 태그와 같은 선택된 에피토프 태그와 함께 바큘로바이러스 발현 벡터 중으로 프레임 내 융합할 수 있다. 이어, 안정한 클론을 선택하기 위해, DHFR과 같은 선택 마아커를 함유하는 SV40 유래 벡터 중으로 폴리-his 태그를 단 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 삽입체를 서브클로닝할 수 있다. 최종적으로, CHO 세포를 SV40 유래 벡터로 (상기한 바와 같이) 트랜스펙션할 수 있다. 상기한 바와 같이 표지화를 수행하여 발현을 확인할 수 있다. 이어, Ni^{2+}-킬레이트 친화성 크로마토그래피와 같은 임의의 선택된 방법에 의해, 발현된 폴리-His 태그 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 함유하는 배양 배지를 농축 및 정제할 수 있다.

일시적 및 안정적 발현 과정 모두에 의해 PRO245, PRO217 및 PRO301을 CHO 세포 중에서 발현시켰다.

CHO 세포 중의 안정한 발현은 하기 과정을 사용하여 수행되었다. 단백질을 IgG 구축물 (면역부착)으로서 발현시키고, 그 중에서 개개 단백질의 가용성 형태 (예. 세포외 도메인)에 대한 암호화 서열을, 경첩, CH2 및 CH2 도메인을 함유하는 IgG1 불변 지역 서열에 및(또는) 폴리-His 태그 형태로 융합시켰다.

PCR 증폭에 이어, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)]에 기재된 표준 기술을 사용하여 각각의 DNA를 CHO 발현 벡터 중으로 서브클로닝하였다. CHO 발현 벡터를 관심있는 DNA의 양립성 제한 부위 5' 및 3'를 갖도록 구축하여 cDNA가 편리하게 왕복되도록 한다. CHO 세포 중에서의 발현에 사용된 벡터는 문헌[Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 pp.1774-1779 (1996)]에 기재되어 있으며, SV40 초기 프로모터/인핸서를 사용하여 관심있는 cDNA 및 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR)의 발현을 유도한다. DHFR 발현은 트랜스펙션 후의 플라스미드의 안정한 생존을 선택할 수 있게 한다.

상업적으로 구입 가능한 트랜스펙션 시약 수퍼펙트(Superfect)(Quiagen), 도스퍼(Dosper) 또는 푸진(Fugene)(Boehringer Mannheim)을 사용하여 12 μg의 목적하는 플라스미드 DNA를 약 천만개의 CHO 세포 중으로 도입하였다. 세포를 성장시키고 상기 루카스 등의 문헌에 기재하였다. 후술하는 바와 같이, 추가의 생장 및 생산을 위해 약 3×10^{-7} 개의 세포를 앰플 중에 동결시켰다.

플라스미드 DNA를 함유하는 앰플을 수조에 넣어 해동시키고 와류하여 혼합하였다. 배지 10 mL를 함유하는 원심분리 튜브 중으로 내용물을 피펫팅하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 흡인하고 세포를 10 mL의 선택 배지 (0.2 ㎛ 여과된 PS20 및 5% 0.2 ㎛ 다이아필터링(diafilter)된 태아 송아지 혈청) 중에 재현탁하였다. 이어 90 mL의 선택 배지를 함유하는 100 mL 스피너 중으로 세포를 분액하였다. 1 - 2일 후, 세포를 150 mL 선택 생장 배지로 채운 250 mL 스피너로 이동시키고 37℃에서 배양하였다. 2 - 3일 후, 250 mL, 500 mL 및 2000 mL 스피너를 3 x 10^5 세포/mL로 접종하였다. 원심분리 및 생산 배지에의 재현탁에 의해 세포 배지를 신선 배지로 교환하였다. 비록 임의의 적합한 CHO 배지를 사용할 수 있지만, 1992년 6월 16일에 발행된 미국 특허 제5,112,469호에 기재된 생산 배지를 실제적으로 사용하였다. 3 L 생산 스피너를 1.2 x 10^6 세포/mL로 파종한다. 제0일에, 세포 수 pH를 측정하였다. 제1일에, 스피너에서 샘플을 채취하고, 여과 공기로 살포를 시작하였다. 제2일에, 스피너로부터 샘플을 채취하고, 온도를 33℃로 변화시키고 30 mL의 500 g/L 글루코스 및 0.6 mL의 10% 지포제 (예. 35% 폴리디메틸실록산 유화액, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)을 첨가하였다. 생산 과정을 통해, pH를 필요에 따라 7.2 근처를 유지하도록 조정하였다. 10일 후, 또는 생존도가 70% 미만으로 떨어질 때까지, 원심분리 및 0.22 ㎛ 필터를 통한 여과에 의해 세포 배양물을 수확하였다. 여액을 4℃에서 저장하거나 또는 즉시 컬럼 상에 로딩하여 정제하였다.

폴리-His 태그 된 구축물의 경우, Ni-NTA 컬럼(Quiagen)을 사용하여 단백질을 정제하였다. 정제 전에, 이미다졸을 컨디셔닝된 배지에 첨가하여 5 mM 농도가 되게 하였다. 컨디셔닝한 배지를, 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM Hepes, pH 7.4 완충액으로 평형시킨 6 ml Ni-NTA 컬럼 상에, 4℃에서 4 - 5 ml/분의 유속으로 펌프하였다. 로딩 후, 컬럼을 추가의 평형 완충액으로 세척하고, 0.25 M 이미다졸을 함유하는 평형 완충액으로 단백질을 용출하였다. 이어, 25 ml G25 수퍼화인(Superfine)(Pharmacia) 컬럼으로, 고도로 정제된 단백질을 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 및 4% 만니톨을 함유하는 pH 6.8 저장 완충액 중으로 탈염하고 -80℃에서 저장하였다.

면역흡착(Fc 함유) 구축물을 다음과 같이 컨디셔닝된 매질로부터 정제하였다. 20 mM 인산나트륨 완충액, pH 6.8로 평형시킨 5 ml 단백질 에이(Protein A) 컬럼(Pharmacia) 상에, 컨디셔닝된 매질을 펌프하였다. 로딩 후, 컬럼을 평형 완충액으로 충분히 세척한 후, 100 mM 시트르산, pH 3.5로 용출하였다. 275 ㎕의 1 M 트리스 완충액 pH 9를 함유하는 튜브 내로 1 ml 분획을 수집함으로써, 용출된 단백질을 즉시 중화시켰다. 이어 폴리-His 태그된 단백질에 대해 상기한 바와 같이 고도로 정제된 단백질을 저장 완충액 중으로 탈염하였다. SDS 폴리아크릴아미드 겔 및 에드만(Edman) 분해에 의한 N-말단 아미노산 서열화에 의해 균일성을 평가하였다.

PRO326 또한 COS 세포 중에서의 일시적인 발현에 의해 생산하였다.

실시예 10

효모 중 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 발현

하기 방법은 효모 중에서의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 재조합 발현을 기술한다.

먼저, ADH2/GAPDH 프로모터로부터의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 세포내 생산 또는 분비를 위한 효모 발현 벡터를 구축한다. PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 암호화하는 DNA 및 프로모터를 선택된 플라스미드의 적합한 제한 효소 부위에 삽입하여 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 세포내 발현을 유도한다. 분비의 경우, ADH2/GAPDH 프로모터, 천연 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 시그널 펩티드 또는 기타 포유동물 시그널 펩티드, 또는 예를 들어 효모 알파-인자 또는 인버타제 분비 시그널/리더 서열, 및 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 발현에 필요한 링커 서열(필요한 경우)을 암호화하는 DNA와 함께, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 암호화하는 DNA를 선

택된 플라스미드 중으로 클로닝할 수 있다.

이어, 효모 균주 AB110과 같은 효모 세포를 상기 발현 플라스미드로 형질전화시키고 선택된 발효 배지에서 배양할 수 있다. 10% 트리클로로아세트산에 의한 침전 및 SDS-PAGE에 의한 분리 및 이에 이은 쿠매씨 블루 염색에 의한 겔 염색에 의해, 형질전환된 효모 상청액을 분석할 수 있다.

원심분리 및 선택된 카트리지 필터를 사용한 배지의 농축에 의해 발효 배지로부터 효모 세포를 제거함으로써 재조합 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 후속적으로 단리 및 정제할 수 있다. 선택된 컬럼 크로마토그래피 수지를 이용하여 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을 함유하는 농축물을 추가로 정제할 수 있다.

실시예 11

바큘로바이러스-감염된 곤충 세포 중 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 발현

하기 방법은 바큘로바이러스-감염된 곤충 세포 중에서의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 재조합 발현을 기술한다.

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 암호화하는 서열을, 바큘로바이러스 발현 벡터 내에 함유된 에피토프 태그의 상류에 융합시킨다. 그러한 에피토프 태그는 폴리-his 태그 및 이뮤노글로불린 태그(IgG의 Fc 지역과 같은)를 포함한다. pVL1393(Novagen)과 같은 상업적으로 이용할 수 있는 플라스미드로부터 유래한 플라스미드를 포함하여, 다양한 플라스미드를 사용할 수 있다. 간단히, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 암호화 서열 또는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326의 암호화 서열의 요망 부분[막횡단 단백질의 세포외 도메인을 암호화하는 서열 또는 단백질이 세포외 단백질인 경우 성숙 단백질을 암호화하는 서열과 같은]을, 5' 및 3' 지역에 상보적인 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시킨다. 5' 프라이머는 인접(선택된) 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 이어, 생성물을 선택된 제한 효소로 분해하고 발현 벡터 중으로 서브클로닝한다.

리포펙틴(GIBCO-BRL로부터 시판)을 사용하여 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera fugiperda; "Sf9") 세포(ATCC CRL 1711) 내로 상기 플라스미드 및 상표명 바큘로골드(BaculoGold) 바이러스 DNA(Pharmigen)를 공동 트랜스펙션시킴으로써 재조합 바큘로바이러스를 생성한다. 28℃에서 4 - 5일간 배양 후, 방출된 바이러스를 수확하여 추가의 증폭에 사용한다. 바이러스 감염 및 단백질 발현을 문헌[O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)]에 기재된 바와 같이 수행한다.

이어, 발현된 폴리-his 태그된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326을, 예를 들어 Ni^{2+}-킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 다음과 같이 정제할 수 있다. 문헌[Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993)]에 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염된 Sf9 세포로부터 추출물을 제조한다. 간략히 설명하면, Sf9 세포를 세척하고, 초음파 분해 완충액(25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 10% 글리세롤; 0.1% NP-40; 0.4M KCl) 중에 재현탁하고, 얼음 상에서 20초간 2회 초음파분해한다. 초음파분해물을 원심분리에 의해 제거하고 상청액을 로딩 완충액(50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 7.8) 중에 50배 희석하고 0.45 ㎛ 필터를 통해 여과한다. 충전 부피가 5 mL인 Ni^{2+}-NTA 아가로스 컬럼(Quiagen으로부터 구입 가능)을 제조하고, 25 mL의 물로 세척하고 25 mL의 로딩 완충액으로 평형시킨다. 여과된 세포 추출물을 0.5 mL/분으로 컬럼 상에 로딩한다. 컬럼을 로딩 완충액으로 기저선 A_{280} 까지 세척하고, 이 지점에서 분획 수집을 시작한다. 다음, 컬럼을 제2 세척 완충액(50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 6.0)으로 세척하여 비특이적으로 결합된 단백질을 용출해낸다. A_{280} 기저선에 재도달한 후, 제2 세척 완충액 중에서 0 내지 500 mM 이미다졸 구배로 컬럼을 전개한다. 1 mL 분획을 수집하여 SDS-PAGE 및 은 착색 또는 알칼리성 포스파타제(Quiagen)에 컨쥬게이트된 Ni^{2+}-NTA에 의한 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 용출된 His_{10}-태그된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 함유하는 분획을 한데 모으고 로딩 완충액에 대해 투석한다.

별법으로는, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼 크로마토그래피를 포함하는 공지된 크로마토그래피 기술을 사용하여, IgG 태그된 (또는 Fc 태그된) PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 정제할 수 있다.

바큘로바이러스 감염된 Sf9 곤충 세포 중에서 PRO245, PRO301 및 PRO266를 발현시켰다. 발현을 0.5 - 2 L 규모로 실제적으로 수행하였지만, 이는 더 큰(예. 8 L) 규모의 제조의 경우 쉽게 규모를 키울 수 있다. 단백질을 IgG 구축물(면역흡착)로서 발현시켰으며, 이 중에서 경첩인 CH2 및 CH3 도메인을 함유하는 IgG1 불변 지역 서열에 및(또는) 폴리-His 태그된 형태로 단백질 세포외 지역을 융합시켰다.

PCR 증폭 후, 각각의 암호화 서열을 바큘로바이러스 발현 벡터(IgG 융합의 경우 pb.PH.IgG, 및 폴리-His 태그된 단백질의 경우 pb.PH.His.c) 내로 서브클로닝하고, 벡터 및 바큘로골드 바큘로바이러스 DNA(Pharmigen)를, 리포펙틴(Gibco BRL)을 사용하여 105 스포도프테라 프루기페르다(" Sf9") 세포(ATCC CRL 1711) 중으로 공동 트랜스펙션시켰다. pb.PH.IgG 및 pb.PH.His는 시판되는 바큘로바이러스 발현 벡터 pVL1393(Pharmigen)의 변형체로서, 변형된 폴리링커 지역을 가져 His 또는 Fc 태그 서열을 포함한다. 10% FBS(Hyclone)이 보충된 힝크(Hink) TNM-FH 배지에서 세포를 성장시켰다. 28℃에서 5일간 세포를 배양하였다. 상청액을 수확하고, 약 10의 감염 복제수(MOI)로 10% FBS가 보충된 힝크 TNM-FH 배지에서 Sf9 세포를 감염시킴으로써 최초의 바이러스 증폭에 후속적으로 사용하였다. 세포를 28℃에서 3일간 배양하였다. 상청액을 수확하고, 히스티딘 태그된 단백질에 대해서는 Ni-NTA 비드(QIAGEN) 또는 IgG 태그된 단백질에 대해서는 단백질-A 세파로스 CL-4B 비드(Pharmacia) 25mL에 상청액 1ml를 뱃치 결합시킨 후, 쿠매씨 블루 염색에 의해 공지 농도의 단백질 표준과 비교하며 SDS-PAGE를 함으로써, 바큘로바이러스 발현 벡터 중에서의 구축물의 발현을 측정하였다.

최초의 바이러스 증폭 상청액을 사용하여, ESF-921 배지(Expression System LLC)에서 약 0.1의 MOI로 자란 Sf9 세포의 스피너 배양물(500 ml)을 감염시켰다. 28℃에서 3일간 세포를 배양하였다. 상청액을 수확 및 여과하였다. 필요에 따라 뱃치 결합 및 SDS-PAGE 분석을 반복하여, 스피너 배양물의 발현을 확인하였다.

원심분리에 의해 트랜스펙션된 세포(0.5 내지 3 L)로부터 컨디셔닝된 배지를 수확하여 세포를 제거하고 0.22 미크론 필터를 통해 여과하였다. 폴리-His 태그된 구축물의 경우, Ni-NTA 컬럼(Quiagen)을 사용하여 단백질 구축물을 정제하였다. 정제 전에, 컨디셔닝된 배지에 이미다졸을 5 mM의 농도로 첨가하였다. 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM Hepes, pH 7.4 완충액으로 평형시킨 6 ml Ni-NTA 컬럼 상에 컨디셔닝된 배지를 4℃에서 4-5 ml/분의 유속으로 펌프하였다. 로딩 후, 추가의 평형 완충액으로 컬럼을 세척하고 0.25 M 이미다졸을 함유하는 평형 완충액으로 단백질을 용출하였다. 25 ml G25 수퍼화인(Pharmacia) 컬럼으로, 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 및 4% 만니톨을 함유하는 pH 6.8 저장 완충액 중으로 고도로 정제된 단백질을 후속적으로 탈염시키고 -80℃에서 저장하였다.

면역부착(Fc 함유) 단백질 구축물을 다음과 같이 컨디셔닝된 배지로부터 정제하였다. 20 mM Na 포스페이트 완충액, pH 6.8로 미리 평형시킨 5 ml 단백질 A 컬럼(Pharmacia) 상으로 컨디셔닝된 배지를 펌프하였다. 로딩 후, 평형 완충액으로 컬럼을 철저히 세척한 후, pH 3.5의 100 mM 시트르산으로 용출하였다. 275mL의 pH 9의 1M Tris 완충액을 함유하는 튜브 내로 1 ml 분획을 수집함으로써 용출된 단백질을 즉시 중화시켰다. 폴리-His 태그된 단백질에 대해 상기한 바와 같이 고도로 정제된 단백질을 후속적으로 저장 완충액 중으로 탈염시켰다. SDS 폴리아크릴아미드 겔(PEG) 전기영동 및 에드만 분해에 의한 N-말단 아미노산 서열화에 의해 단백질의 균일성을 확증하였다.

유사한 과정을 사용하여 바쿨로바이러스 감염된 High-5 세포에서도 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 및 PRO326를 발현시켰다.

실시예 12

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326에 결합하는 항체의 제조

이 실시예는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클론성 항체의 제조를 예시한다.

모노클론성 항체를 생산하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 상기 고딩(Goding)의 문헌에 기재되어 있다. 사용 가능한 면역원으로는 정제된 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326; PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 함유하는 융합 단백질; 및 세포 표면 상에 재조합 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326를 발현시키는 세포가 포함된다. 면역원의 선택은 당업자에 의해 부적절한 실험 없이도 가능하다.

Balb/c와 같은 마우스를 완전 프로인트 보조액 중에 유화시킨 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 면역원으로 면역화시키고, 1-100 마이크로그램의 양으로 피하 또는 복강내 주사한다. 별법으로는, 면역원을 MPL-TDM 보조액(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) 중에 유화시키고 동물의 뒷발바닥에 주사한다. 이어, 선택된 보조액 중에 유화된 추가의 면역원으로, 10 내지 12일 뒤에 면역화된 마우스를 증가시킨다. 그 후, 수 주 동안, 추가의 면역화 주사로 마우스를 증가시킬 수도 있다. 레트로-오비탈 출혈에 의해 마우스로부터 혈청 샘플을 주기적으로 얻어 ELISA 검정분석으로 테스트하여 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체를 검출할 수 있다.

적합한 항체 역가를 검출한 후, 항체에 대해 "양성"인 동물을 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 최종 정맥 주사로 주사할 수 있다. 3 내지 4일 후, 마우스를 죽이고 비장 세포를 수확한다. 이어, ATCC 기탁번호 CRL 1597로부터 구할 수 있는, P3X63AgU.1과 같은 선택된 쥐 골수종 세포주에, (35% 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여) 비장 세포를 융합시킨다. 융합에 의해 하이브리도마 세포가 생성되며, 이어 이를 HAT(히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘) 배지를 함유하는 96 웰 조직 배양 플레이트 중에 플레이팅하여 비 융합 세포, 골수종 하이브리드 및 비장 세포 하이브리드의 증식을 억제할 수 있다.

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326에 대한 반응성에 대해 ELISA에서 하이브리도마 세포를 스크리닝할 것이다. PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326에 대한 요망하는 모노클론성 항체를 분비하는 "양성" 하이브리도마 세포의 결정은 당업계의 기술 범위 내이다.

양성 하이브리도마 세포를 공통유전자(syngenic) Balb/c 마우스 내로 복강내로 주사하여, 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 모노클론성 항체를 함유하는 복수를 생산할 수 있다. 별법으로는, 하이브리도마 세포를 조직 배양 플라스크 또는 롤러 병 중에서 키울 수 있다. 암모늄 술페이트 침전 및 이어 겔 배제 크로마토그래피를 사용하여, 복수 중에서 생산된 모노클론성 항체를 정제할 수 있다. 별법으로는, 단백질 A 또는 단백질 G에의 항체의 결합이 기초한 친화성 크로마토그래피를 사용할 수 있다.

물질의 기탁

하기 물질들을, 미국 버지니아주 20110-2209, 마나사스, 10801 유니버시티 불레바드에 소재한 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)에 기탁하였다.

물질	ATCC 기탁번호	기탁일
DNA40981	209439	1997년 11월 7일
DNA37140	209489	1997년 11월 21일
DNA41388	209927	1998년 6월 2일
DNA35638	209265	1997년 9월 17일
DNA37150	209401	1997년 10월 17일
DNA33094	209256	1997년 9월 16일
DNA32292	209258	1997년 9월 16일
DNA32279	209259	1997년 9월 16일
DNA40628	209432	1997년 11월 7일

이 기탁은 특허 절차 목적을 위한 미생물 기탁의 국제적 인지에 관한 부다페스트 조약의 협약 및 규칙(부다페스트 조약) 하에 이루어졌다. 이는 기탁일로부터 30년간 기탁물의 살아있는 배양을 유지함을 확보한다. 기탁은 부다페스트 조약 하에 ATCC에 의해 분양 가능할 것이며, 제넨테크, 인크. 및 ATCC 간의 계약에 따르고, 이는 관련된 미국 특허의 발행 또는 임의의 미국 또는 외국 특허출원의 공중에의 공개 시에 (어느 것이든 빠른 것) 기탁물의 배양물의 자손의 영속적이고 비제한적인 공중에의 이용가능성을 보증하며, 35 USC 122 및 그에 따른 특허청장 규칙에 따라 권한을 가진 미국 특허 및 상표청장에 의해 결정된 자의 자손의 이용가능성을 보증한다 (886 OG 638을 특히 참조하여 37 CFR 1.14 포함).

본 출원의 양수인은 기탁된 물질의 배양물이 적합한 조건 하에서 배양되었을 때 죽거나 손실되거나 손상되면 통지에 따라 물질을 다른 동일한 물질로 즉시 대체할 것에 동의하였다. 기탁된 물질의 이용가능성은, 특허법에 따라 임의의 정부의 권한 하에 부여된 권리를 위반하여 본 발명을 실시할 권한으로 간주되어서는 안된다.

상기 기재된 명세서는 당업자로 하여금 본 발명을 실시할 수 있도록 하는 데 충분하다고 생각된다. 기탁물은 본 발명의 특정 양태의 일 예시로서 의도된 것이므로, 본 발명은 기탁된 구축물에 의해 범위가 한정되어서는 안 되며, 기능적으로

동등한 임의의 구축물도 본 발명의 범위 내에 속한다. 여기에서 물질의 기탁은 여기 포함된 기재된 설명이 최상의 양태을 포함하여 본 발명의 임의의 면을 실시할 수 있도록 하는 데 부적절하다는 것에 대한 인정을 구성하지 않으며, 특허청구범위를 기탁이 나타내는 특정 예시로 한정하는 것으로 생각해서도 안 된다. 사실상, 본 명세서에 나타나고 기재된 것들 외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재로부터 당업자에게 자명할 것이며, 첨부된 특허청구범위 내에 속한다.

표 4

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

% 아미노산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 2개의 폴리펩티드 서열 사이에 일치하는 아미노산 잔기의 수)
나누기 (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)

5 나누기 15 = 33.3%

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

% 아미노산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 2개의 폴리펩티드 서열 사이에 일치하는 아미노산 잔기의 수)
나누기 (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)

5 나누기 10 = 50%

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

% 핵산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 2개의 핵산 서열 사이에 일치하는 뉴클레오티드의 수) 나누기
(PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)

6 나누기 14 = 42.9%

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

% 핵산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 2개의 핵산 서열 사이에 일치하는 뉴클레오티드의 수) 나누기
(PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)

4 나누기 12 = 33.3%

표 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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



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

#include "nw.h"

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];
                        }
```

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

                        more++;

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

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

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

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



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

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

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

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix) putline
        int         ix;
{
```

```
        int                     i;
        register char           *px;

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

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


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

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

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

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



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

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

}
```

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

...readjm

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
                }
                else
                        break;
        }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* td = xx - yy + len1 - 1
                         */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}
}                                                                       Page 3 of nwsubr.c
```

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

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

표 6

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVSS
RLEWKKLGRSVSFVYYQQTLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQG
QNLEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLE
NPRLGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYRRCPGKRMQVDDLN
ISGIIAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTPV
IPALWKAAAGGSRGQEF

N-글리코실화 잔기의 위치 :

98-102
187-191
236-240
277-281

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

39-43
59-63
100-104
149-153
205-209
284-288

N-미리스토일화 잔기의 위치

182-188
239-245
255-261
257-263
305-311

아미드화 잔기의 위치 :

226-230

표 7

MARRSAFPAAALWLWSILLCLLALRAEAGPPQEESLYLWIDAHQARVLIGFEEDILIVS
EGKMAPFTHDFRKAQQRMPAIPVNIHSMNFTWQAAGQAEYFYEFLSLRSLDKGIMADPT
VNVPLLGTVPHKASVVQVGFPCLGKQDGVAAFEVDVIVMNSEGNTILQTPQNAIFFKTC
QQAECPGGCRNGGFCNERRICECPDGFHGPHCEKALCTPRCMNGGLCVTPGFCICPPGF
YGVNCDKANCSTTCFNGGTCFYPGKCICPPGLEGEQCEISKCPQPCRNGGKCIGKSKCK
CSKGYQGDLCSKPVCEPGCGAHGTCHEPNKCQCQEGWHGRHCNKRYEASLIHALRPAGA
QLRQHTPSLKKAEERRDPPESNYIW

N-글리코실화 잔기의 위치 :

88-92
245-249

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치

319-323

티로신 키나제 인산화 잔기의 위치

370-378

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

184-190
185-191
189-195
315-321

잔기 중 ATP/GTP-결합 부위 모티브 A (P-루프) :

285-293

잔기 중 EGF-유사 도메인 시스테인 패턴 사인 :

198-210
230-242
262-274
294-306
326-338

표 8

MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPR
VEWKFDQGDTTRLVCYNNKITASYEDRVTFLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGGNS
YGEVKVKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNP
KSTRAFSNSSYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVRMEAVERNV
GVIVAAVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTS
SFLV

N-글리코실화 잔기의 위치 :

185-189

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치

270-274

카세인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

34-38
82-86
100-108
118-122
152-156
154-158
193-197
203-207
287-291

N-미리스토일화 잔기의 위치

105-111
116-122
158-164
219-225
237-243
256-262

표 9

MLLWILLLETSLCFAAGNVTGDVCKEKICSCNEIEGDLHVDCEKKGFTSLQRFTAPTSQ
FYHLFLHGNSLTRLFPNEFANFYNAVSLHMENNGLHEIVPGAFLQLQLVKRLHINNNKI
KSFRKQTFLGLDDLEYLQADFNLLRDIDPGAFQDLNKLEVLILNDNLISTLPANVFQYV
PITHLDLRGNRLKTLPYEEVLEQIPGIAEILLEDNPWDCTCDLLSLKEWLENIPKNALI
GRVVCEAPTRLQGKDLNETTEQDLCPLKNRVDSSLPAPPAQEETFAPGPLPTPFKTNGQ
EDHATPGSAPNGGTKIPGNWQIKIRPTAAIATGSSRNKPLANSLPCPGGCSCDHIPGSG
LKMNCNNRNVSSLADLKPKLSNVQELFLRDNKIHSIRKSHFVDYKNLILLDLGNNNIAT
VENNTFKNLLDLRWLYMDSNYLDTLSREKFAGLQNLEYLNVEYNAIQLILPGTFNAMPK
LRILILNNNLLRSLPVDVFAGVSLSKLSLHNNYFMYLPVAGVLDQLTSIIQIDLHGNPW
ECSCTIVPFKQWAERLGSEVLMSDLKCETPVNFFRKDFMLLSNDEICPQLYARISPTLT
SHSKNSTGLAETGTHSNSYLDTSRVSISVLVPGLLLVFVTSAFTVVGMLVFILRNRKRS
KRRDANSSASEINSLQTVCDSSYWHNGPYNADGAHRVYDCGSHSLSD

N-글리코실화 잔기의 위치 :

18-22
253-257
363-367
416-420
595-599
655-659

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치 :

122-126
646-650

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

30-34
180-184
222-226
256-260
366-370
573-577
608-612
657-661
666-670

693-697

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

17-23
67-73
100-106
302-308
328-334
343-349
354-360
465-471
493-499
598-604
603-609

원핵성 막 지질 단백질 지질 부착 잔기의 위치 :

337-348

표 10

MVDVLLLFSLCLLFHISRPDLSHNRLSFIKASSMSHLQSLREVKLNNNELETIPNLGPV
SANITLLSLAGNRIVEILPEHLKEFQSLETLDLSSNNISELQTAFPALQLKYLYLNSNR
VTSMEPGYFDNLANTLLVLKLNRNRISAIPPKMFKLPQLQHLELNRNKIKNVDGLTFQG
LGALKSLKMQRNGVTKLMDGAFWGLSNMEILQLDHNNLTEITKGWLYGLLMLQELHLSQ
NAINRISPDAWEFCQKLSELDLTFNHLSRLDDSSFLGLSLLNTLHIGNNRVSYIADCAF
RGLSSLKTLDLKNNEISWTIEDMNGAFSGLDKLRRLILQGNRIRSITKKAFTGLDALEH
LDLSDNAIMSLQGNAFSQMKKLQQLHLNTSSLLCDCQLKWLPQWVAENNFQSFVNASCA
HPQLLKGRSIFAVSPDGFVCDDFPKPQITVQPETQSAIKGSNLSFICSAASSSDSPMTF
AWKKDNELLHDAEMENYAHLRAQGGEVMEYTTILRLREVEFASEGKYQCVISNHFGSSY
SVKAKLTVNMLPSFTKTPMDLTIRAGAMARLECAAVGHPAPQIAWQKDGGTDFPAARER
RMHVMPEDDVFFIVDVKIEDIGVYSCTAQNSAGSISANATLTVLETPSFLRPLLDRTVT
KGETAVLQCIAGGSPPPKLNWTKDDSPLVVTERHFFAAGNQLLIIVDSDVSDAGKYTCE
MSNTLGTERGNVRLSVIPTPTCDSPQMTAPSLDDDGWATVGVVIIAVVCCVVGTSLVWV
VIIYHTRRRNEDCSITNTDETNLPADIPSYLSSQGTLADRQDGYVSSESGSHHQFVTSS
GAGFFLPQHDSSGTCHIDNSSEADVEAATDLFLCPFLGSTGPMYLKGNVYGSDPFETYH
TGCSPDPRTVLMDHYEPSYIKKKECYPCSHPSEESCERSFSNISWPSHVRKLLNTSYSH
NEGPGMKNLCLNKSSLDFSANPEPASVASSNSFMGTFGKALRRPHLDAYSSFGQPSDCQ
PRAFYLKAHSSPDLDSGSEEDGKERTDFQEENHICTFKQTLENYRTPNFQSYDLDT

N-글리코실화 잔기의 위치 :

62-66
96-100
214-218
382-386
409-413
455-459
628-632
669-673
845-849
927-931
939-943
956-960

글리코스아미노글리칸 부착 잔기의 위치 :

826-830

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

17-21

39-43
120-124
203-207
254-258
264-268
314-318
323-327
347-351
464-468
548-552
632-636
649-653
671-675
739-743
783-787
803-807
847-851
943-947
958-962
1013-1017
1019-1023
1021-1025

티로신 키나제 인산화 잔기의 위치 :

607-615

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

179-185
197-203
320-326
367-373
453-459
528-534
612-618
623-629
714-720
873-879

표 11

MLNKMTLHPQQIMIGPRFNRALFDPLLVVLLALQLLVVAGLVRAQTCPSVCSCSNQFSK
VICVRKNLREVPDGISTNTRLLNLHENQIQIIKVNSFKHLRHLEILQLSRNHIRTIEIG
AFNGLANLNTLELFDNRLTTIPNGAFVYLSKLKELWLRNNPIESIPSYAFNRIPSLRRL
DLGELKRLSYISEGAFEGLSNLRYLNLAMCNLREIPNLTPLIKLDELDLSGNHLSAIRP
GSFQGLMHLQKLWMIQSQIQVIERNAFDNLQSLVEINLAHNNLTLLPHDLFTPLHHLER
IHLHHNPWNCNCDILWLSWWIKDMAPSNTACCARCNTPPNLKGRYIGELDQNYFTCYAP
VIVEPPADLNVTEGMAAELKCRASTSLTSVSWITPNGTVMTHGAYKVRIAVLSDGTLNF
TNVTVQDTGMYTCMVSNSVGNTTASATLNVTAATTTPFSYFSTVTVETMEPSQDEARTT
DNNVGPTPVVDWETTNVTTSLTPQSTRSTEKTFTIPVTDINSGIPGIDEVMKTTKIIIG
CFVAITLMAAVMLVIFYKMRKQHHRQNHHAPTRTVEIINVDDEITGDTPMESHLPMPAI
EHEHLNHYNSYKSPFNHTTTVNTINSIHSSVHEPLLIRMNSKDNVQETQI

N-글리코실화 잔기의 위치 :

278-282
364-368
390-394
412-416
415-419
434-438
442-446
488-492
606-610

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치 :

183-187

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

268-272
417-421
465-469
579-583
620-624

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

40-46
73-79
118-124
191-197
228-234
237-243
391-397
422-428
433-439
531-537

표 12

MSAPSLRARAAGLGLLLCAVLGRAGRSDSGGRGELGQPSGVAAERPCPTTCRCLGDLLD
CSRKRLARLPEPLPSWVARLDLSHNRLSFIKASSMSHLQSLREVKLNNNELETIPNLGP
VSANITLLSLAGNRIVEILPEHLKEFQSLETLDLSSNNISELQTAFPALQLKYLYLNSN
RVTSMEPGYFDNLANTLLVLKLNRNRISAIPPKMFKLPQLQHLELNRNKIKNVDGLTFQ
GLGALKSLKMQRNGVTKLMDGAFWGLSNMEILQLDHNNLTEITKGWLYGLLMLQELHLS
QNAINRISPDAWEFCQKLSELDLTFNHLSRLDDSSFLGLSLLNTLHIGNNRVSYIADCA
FRGLSSLKTLDLKNNEISWTIEDMNGAFSGLDKLRRLILQGNRIRSITKKAFTGLDALE
HLDLSDNAIMSLQGNAFSQMKKLQQLHLNTSSLLCDCQLKWLPQWVAENNFQSFVNASC
AHPQLLKGRSIFAVSPDGFVCDDFPKPQITVQPETQSAIKGSNLSFICSAASSSDSPMT
FAWKKDNELLHDAEMENYAHLRAQGGEVMEYTTILRLREVEFASEGKYQCVISNHFGSS
YSVKAKLTVNMLPSFTKTPMDLTIRAGAMARLECAAVGHPAPQIAWQKDGGTDFPAARE
RRMHVMPEDDVFFIVDVKIEDIGVYSCTAQNSAGSISANATLTVLETPSFLRPLLDRTV
TKGETAVLQCIAGGSPPPKLNWTKDDSPLVVTERHFFAAGNQLLIIVDSDVSDAGKYTC
EMSNTLGTERGNVRLSVIPTPTCDSPQMTAPSLDDDGWATVGVVIIAVVCCVVGTSLVW
VVIIYHTRRRNEDCSITNTDETNLPADIPSYLSSQGTLADRQDGYVSSESGSHHQFVTS
SGAGFFLPQHDSSGTCHIDNSSEADVEAATDLFLCPFLGSTGPMYLKGNVYGSDPFETY
HTGCSPDPRTVLMDHYEPSYIKKKECYPCSHPSEESCERSFSNISWPSHVRKLLNTSYS
HNEGPGMKNLCLNKSSLDFSANPEPASVASSNSFMGTFGKALRRPHLDAYSSFGQPSDC
QPRAFYLKAHSSPDLDSGSEEDGKERTDFQEENHICTFKQTLENYRTPNFQSYDLDT

N-글리코실화 잔기의 위치 :

122-126
156-160
274-278
442-446
469-473
515-519
688-692
729-733
905-909
987-991
999-1003
1016-1020

글리코스아미노글리칸 부착 잔기의 위치 :

886-890

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

99-103
180-184
263-267
314-318
324-328
374-378
383-387
407-411
524-528
608-612
692-696
709-713
731-735
799-803
843-847
863-867
907-911
1003-1007
1018-1022
1073-1077
1079-1083
1081-1085

티로신 키나제 인산화 잔기의 위치 :

667-675

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

14-20
36-42
239-245
257-263
380-386
427-433
513-519
588-594
672-678
683-689
774-780
933-999

류신 지퍼 패턴 잔기의 위치 :

58-80
65-87

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 포유동물의 조직 내로의 염증성 세포의 침윤 증가,

(b) 포유동물의 면역 반응의 자극 또는 강화, 또는

(c) 항원에 반응하여 포유동물의 T-림프구의 증식 증가

에 유용한, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드, 작용제 또는 그의 단편, 및 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 2.

(a) 포유동물의 조직 내로의 염증성 세포의 침윤 증가,

(b) 포유동물의 면역 반응의 자극 또는 강화, 또는

(c) 항원에 반응하여 포유동물의 T-림프구의 증식 증가

에 유용한 조성물을 제조하기 위한 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드, 작용제 또는 그의 단편의 용도.

청구항 3.

(a) 포유동물의 조직 내로의 염증성 세포의 침윤 감소,

(b) 포유동물의 면역 반응의 억제 또는 감소, 또는

(c) 항원에 반응하여 포유동물의 T-림프구의 증식 감소

에 유용한, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드, 길항제 또는 그의 단편, 및 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 4.

(a) 포유동물의 조직 내로의 염증성 세포의 침윤 감소,

(b) 포유동물의 면역 반응의 억제 또는 감소, 또는

(c) 항원에 반응하여 포유동물의 T-림프구의 증식 감소

에 유용한 조성물을 제조하기 위한 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드, 길항제 또는 그의 단편의 용도.

청구항 5.

치료를 필요로 하는 포유동물에게 유효량의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드, 그의 작용제 항체, 그 길항제 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 포함하는, T 세포 매개 질환과 같은 면역 관련 질병의 치료 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 질병이 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염, 유년형 만성 관절염, 척추관절증, 전신성 경화증(경피증), 특발성 염증성 근장애(피부근염, 다발성근염), 쇼그렌 증후군, 전신성 맥관염, 유육종증, 자가면역성 용혈성 빈혈(면역성 범혈구 감소증, 발작성 야간 혈색소뇨증), 자가면역성 혈소판감소증(특발성 혈소판감소성 자반병, 면역 매개성 혈소판 감소증), 갑상선염(그레이브스병, 하시모도 갑상선염, 유년형 림프종성 갑상선염, 위축성 갑상선염), 당뇨병, 면역 매개 신장 질환(사구체신염, 세뇨관 간질성 신염), 다발성 경화증, 특발성 탈수초 다발성 신경염 또는 길랑랑-바레 증후군 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경염과 같은 중추 및 말초 신경계의 탈수초 질환, 감염성 간염(A, B, C, D, E형 간염 및 기타 비-간친화성 바이러스), 자가 면역성 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종성 간염 및 경화성 담관염과 같은 간담즙성 질환, 염증성 장질환(궤양성 대장염: 크론병), 글루텐-민감성 장질환 및 휘플병과 같은 염증성 및 섬유성 폐 질환, 수포성 피부 질환, 다형 삼출성 홍반 및 접촉성 피부염을 포함하는 자가면역 또는 면역 매개성 피부 질환, 건선, 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 음식물 과민증 및 담마진과 같은 알레르기성 질환, 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유종 및 과민성 폐렴과 같은 폐 면역질환, 이식 거부 및 이식편대 숙주 질환을 포함하는 이식 관련 질병으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 7.

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클론 항체인 조성물 또는 용도.

청구항 8.

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편 또는 단일쇄 항체인 조성물 또는 용도.

청구항 9.

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 비 인간 상보성 결정 부위(CDR) 잔기 및 인간 골격 부위(FR) 잔기를 갖는 것인 조성물 또는 용도.

청구항 10.

PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 세포를 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체에 노출시키고 항체의 세포에 대한 결합을 측정하는 것을 포함하는, PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법.

청구항 11.

(a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포의 시험 샘플 및 (b) 동일한 세포 유형의 공지된 정상 조직 세포의 대조군 샘플 중의 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 검출하는 것을 포함하고, 여기서 시험 샘플에서의 더 높은 발현 수준이 시험 조직 세포를 얻은 포유동물 중에 면역 관련 질병이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서의 면역 관련 질병의 진단 방법.

청구항 12.

(a) 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체를 포유동물로부터 얻은 조직 세포 시험 샘플과 접촉시키고, (b) 항체와 시험 샘플 중의 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 면역 관련 질병의 진단 방법.

청구항 13.

적합한 포장 중에 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체 또는 그의 단편 및 담체를 포함하는, 면역 관련 질병 진단 키트.

청구항 14.

제13항에 있어서, 항체를 사용하여 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드를 검출하는 것에 관한 지시서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 15.

용기,

용기 상의 라벨; 및

용기 내에 함유된 유효 성분을 포함하는 조성물

을 포함하고, 여기서 조성물은 포유동물에서의 면역 반응을 자극 또는 강화시키는 데 유효하고, 용기 상의 라벨은 조성물을 사용하여 면역 관련 질병을 치료할 수 있음을 나타내고, 조성물 중의 활성 제제는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드의 발현 및(또는) 활성을 억제하는 제제인, 제품.

청구항 16.

제21항에 있어서, 상기 활성 제제가 항-PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 항체인 제품.

청구항 17.

두 성분이 상호작용하는 데 충분한 조건 하 및 시간 동안, 후보 화합물을 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함하는, PRO245 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물의 동정 방법.

청구항 18.

제17항에 있어서, 후보 화합물 또는 PRO245, PRO217, PRO301, PRO266, PRO335, PRO331 또는 PRO326 폴리펩티드가 고체 지지체 상에 고정화된 것인 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 비 고정화된 성분이 검출 가능한 표지를 운반하는 것인 방법.

도면

도면 1a

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

% 아미노산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 두개의 폴리펩티드 서열 사이에 일치하는 아미노산 잔기의 수)
나누기 (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)

5 나누기 15 = 33.3%

도면 1b

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

% 아미노산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 두개의 폴리펩티드 서열 사이에 일치하는 아미노산 잔기의 수)
나누기 (PRO 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수)

5 나누기 10 = 50%

도면 1c

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(길이 = 14 뉴클레오티드)
비교 DNA	NNNNNNLLLLLLLLLL	(길이 = 16 뉴클레오티드)

% 핵산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 두개의 핵산 서열 사이에 일치하는 뉴클레오티드의 수)
나누기 (PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)

6 나누기 14 = 42.9%

도면 1d

PRO-DNA	NNNNNNNNNNN	(길이 = 12 뉴클레오티드)
Comparison DNA	NNNNLLLVV	(길이 = 9 뉴클레오티드)

% 핵산 서열 상동성 =

(ALIGN-2에 의해 측정시 두개의 핵산 서열 사이에 일치하는 뉴클레오티드의 수)
나누기 (PRO-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수)

4 나누기 12 = 33.3%

도면 2a

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

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

도면 2b

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

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

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

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

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

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

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

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

도면 2c

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

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

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

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

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

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

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

도면 2d

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

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

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

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

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

도면 2e

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

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

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

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

도면 2f

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

도면 2g

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

도면 2h

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

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

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

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

도면 2i

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

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

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

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

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

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];
                        }
```

도면 2j

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

                        more++;

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

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

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

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

도면 2k


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

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

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

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix) putline
        int         ix;
{
```

도면 2l

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

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

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


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

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

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

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

도면 2m

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

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

}
```

도면 2n

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

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

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

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

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

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

도면 2o

...getseq

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

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

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

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

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

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

도면 2p

...readjmps

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

도면 2q

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

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

도면 3

CCCAGAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCTCGACCTCCT

CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCCGGGAAGATGGCGAGGAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCT

GCTGCTGCTGCGCTACCTGGTGGTCGCCCTGGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGC

CCCAAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTTAGCCTGCAA

AACCCCAAAGAAGACTGTTTCCTCCAGATTAGAGTGGAAGAAACTGGGTCGGAGTGTCTC

CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGA

TTTCAATATCCGGATCAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCGGGGAAATATCGTTGTGAAGT

TAGTGCCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATT

AGTGGCTCCAGCAGTTCCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCTGAGTGGAACTGTGGT

AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAGGA

TGGCATCCGTTTGCTAGAAAATCCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATACAC

AATGAATACAAAAACTGGAACTCTGCAATTTAATACTGTTTCCAAACTGGACACTGGAGA

ATATTCCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGTCCTGGGAAACGAATGCA

AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGAT

TTCCGTTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAAGAAAC

CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTG

GCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGAAGGCCGCGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGA

GTTCTAGACCAGTCTGGCCAATATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAAATTAG

CTGGGCATGGTGGCATGTGCCTGCAGTTCCAGCTGCTTGGGAGACAGGAGAATCACTTGA

ACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAA

CAGAGCAAGATTCCATCTCAAAAAATAAAATAAATAAATAAATAAATACTGGTTTTTACC

TGTAGAATTCTTACAATAAATATAGCTTGATATTC

도면 4

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEALLACKTPKKTVSS
RLEWKKLGRSVSFVYYQQTLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQG
QNLEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLE
NPRLGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYRRCPGKRMQVDDLN
ISGIIAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTPV
IPALWKAAAGGSRGQEF

N-글리코실화 잔기의 위치 :

98-102
187-191
236-240
277-281

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

39-43
59-63
100-104
149-153
205-209
284-288

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

182-188
239-245
255-261
257-263
305-311

아미드화 잔기의 위치 :

226-230

도면 5

CCAGGCCGGGAGGCGACGCGCCCAGCCGTCTAAACGGGAACAGCCCTGGCTGAGGGAGCT
GCAGCGCAGCAGAGTATCTGACGGCGCCAGGTTGCGTAGGTGCGGCACGAGGAGTTTTCC
CGGCAGCGAGGAGGTCCTGAGCAGCATGGCCCGGAGGAGCGCCTTCCCTGCCGCCGCGCT
CTGGCTCTGGAGCATCCTCCTGTGCCTGCTGGCACTGCGGGCGGAGGCCGGGCCGCCGCA
GGAGGAGAGCCTGTACCTATGGATCGATGCTCACCAGGCAAGAGTACTCATAGGATTTGA
AGAAGATATCCTGATTGTTTCAGAGGGGAAAATGGCACCTTTTACACATGATTTCAGAAA
AGCGCAACAGAGAATGCCAGCTATTCCTGTCAATATCCATTCCATGAATTTTACCTGGCA
AGCTGCAGGGCAGGCAGAATACTTCTATGAATTCCTGTCCTTGCGCTCCCTGGATAAAGG
CATCATGGCAGATCCAACCGTCAATGTCCCTCTGCTGGGAACAGTGCCTCACAAGGCATC
AGTTGTTCAAGTTGGTTTCCCATGTCTTGGAAAACAGGATGGGGTGGCAGCATTTGAAGT
GGATGTGATTGTTATGAATTCTGAAGGCAACACCATTCTCCAAACACCTCAAAATGCTAT
CTTCTTTAAAACATGTCAACAAGCTGAGTGCCCAGGCGGGTGCCGAAATGGAGGCTTTTG
TAATGAAAGACGCATCTGCGAGTGTCCTGATGGGTTCCACGGACCTCACTGTGAGAAAGC
CCTTTGTACCCCACGATGTATGAATGGTGGACTTTGTGTGACTCCTGGTTTCTGCATCTG
CCCACCTGGATTCTATGGAGTGAACTGTGACAAAGCAAACTGCTCAACCACCTGCTTTAA
TGGAGGGACCTGTTTCTACCCTGGAAAATGTATTTGCCCTCCAGGACTAGAGGGAGAGCA
GTGTGAAATCAGCAAATGCCCACAACCCTGTCGAAATGGAGGTAAATGCATTGGTAAAAG
CAAATGTAAGTGTTCCAAAGGTTACCAGGGAGACCTCTGTTCAAAGCCTGTCTGCGAGCC
TGGCTGTGGTGCACATGGAACCTGCCATGAACCCAACAAATGCCAATGTCAAGAAGGTTG
GCATGGAAGACACTGCAATAAAAGGTACGAAGCCAGCCTCATACATGCCCTGAGGCCAGC
AGGCGCCCAGCTCAGGCAGCACACGCCTTCACTTAAAAAGGCCGAGGAGCGGCGGGATCC
ACCTGAATCCAATTACATCTGGTGAACTCCGACATCTGAAACGTTTTAAGTTACACCAAG
TTCATAGCCTTTGTTAACCTTTCATGTGTTGAATGTTCAAATAATGTTCATTACACTTAA
GAATACTGGCCTGAATTTTATTAGCTTCATTATAAATCACTGAGCTGATATTTACTCTTC
CTTTTAAGTTTTCTAAGTACGTCTGTAGCATGATGGTATAGATTTTCTTGTTTCAGTGCT
TTGGGACAGATTTTATATTATGTCAATTGATCAGGTTAAAATTTTCAGTGTGTAGTTGGC
AGATATTTTCAAAATTACAATGCATTTATGGTGTCTGGGGGCAGGGGAACATCAGAAAGG
TTAAATTGGGCAAAAATGCGTAAGTCACAAGAATTTGGATGGTGCAGTTAATGTTGAAGT
TACAGCATTTCAGATTTTATTGTCAGATATTTAGATGTTTGTTACATTTTTAAAAATTGC
TCTTAATTTTTAAACTCTCAATACAATATATTTTGACCTTACCATTATTCCAGAGATTCA
GTATTAAAAAAAAAAAAATTACACTGTGGTAGTGGCATTTAAACAATATAATATATTCTA
AACACAATGAAATAGGGAATATAATGTATGAACTTTTTGCATTGGCTTGAAGCAATATAA
TATATTGTAAACAAAACACAGCTCTTACCTAATAAACATTTTATACTGTTTGTATGTATA
AAATAAAGGTGCTGCTTTAGTTTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

도면 6

MARRSAFPAAALWLWSILLCLLALRAEAGPPQEESLYLWIDAHQARVLIGFEEDILIVS
EGKMAPFTHDFRKAQQRMPAIPVNIHSMNFTWQAAGQAEYFYEFLSLRSLDKGIMADPT
VNVPLLGTVPHKASVVQVGFPCLGKQDGVAAFEVDVIVMNSEGNTILQTPQNAIFFKTC
QQAECPGGCRNGGFCNERRICECPDGFHGPHCEKALCTPRCMNGGLCVTPGFCICPPGF
YGVNCDKANCSTTCFNGGTCFYPGKCICPPGLEGEQCEISKCPQPCRNGGKCIGKSKCK
CSKGYQGDLCSKPVCEPGCGAHGTCHEPNKCQCQEGWHGRHCNKRYEASLIHALRPAGA
QLRQHTPSLKKAEERRDPPESNYIW

N-글리코실화 잔기의 위치 :

88-92

245-249

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

319-323

티로신 카나제 인산화 잔기의 위치 :

370-378

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

184-190

185-191

189-195

315-321

잔기 중 ATP/GTP-결합 부위 모티브 A (P-루프) :

285-293

잔기 중 EGF-유사 도메인 시스테인 패턴 사인 :

198-210

230-242

262-274

294-306

326-338

도면 7

GTCTGTTCCCAGGAGTCCTTCGGCGGCTGTTGTGTCAGTGGCCTGATCGCGATGGGGACA
AAGGCGCAAGTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCTCTTCATATTGGCGATCCTGTTGTGCTCC
CTGGCATTGGGCAGTGTTACAGTGCACTCTTCTGAACCTGAAGTCAGAATTCCTGAGAAT
AATCCTGTGAAGTTGTCCTGTGCCTACTCGGGCTTTTCTTCTCCCCGTGTGGAGTGGAAG
TTTGACCAAGGAGACACCACCAGACTCGTTTGCTATAATAACAAGATCACAGCTTCCTAT
GAGGACCGGGTGACCTTCTTGCCAACTGGTATCACCTTCAAGTCCGTGACACGGGAAGAC
ACTGGGACATACACTTGTATGGTCTCTGAGGAAGGCGGCAACAGCTATGGGGAGGTCAAG
GTCAAGCTCATCGTGCTTGTGCCTCCATCCAAGCCTACAGTTAACATCCCCTCCTCTGCC
ACCATTGGGAACCGGGCAGTGCTGACATGCTCAGAACAAGATGGTTCCCCACCTTCTGAA
TACACCTGGTTCAAAGATGGGATAGTGATGCCTACGAATCCCAAAAGCACCCGTGCCTTC
AGCAACTCTTCCTATGTCCTGAATCCCACAACAGGAGAGCTGGTCTTTGATCCCCTGTCA
GCCTCTGATACTGGAGAATACAGCTGTGAGGCACGGAATGGGTATGGGACACCCATGACT
TCAAATGCTGTGCGCATGGAAGCTGTGGAGCGGAATGTGGGGGTCATCGTGGCAGCCGTC
CTTGTAACCCTGATTCTCCTGGGAATCTTGGTTTTTGGCATCTGGTTTGCCTATAGCCGA
GGCCACTTTGACAGAACAAAGAAAGGGACTTCGAGTAAGAAGGTGATTTACAGCCAGCCT
AGTGCCCGAAGTGAAGGAGAATTCAAACAGACCTCGTCATTCCTGGTGTGAGCCTGGTCG
GCTCACCGCCTATCATCTGCATTTGCCTTACTCAGGTGCTACCGGACTCTGGCCCCTGAT
GTCTGTAGTTTCACAGGATGCCTTATTTGTCTTCTACACCCCACAGGGCCCCCTACTTCT
TCGGATGTGTTTTTAATAATGTCAGCTATGTGCCCCATCCTCCTTCATGCCCTCCCTCCC
TTTCCTACCACTGCTGAGTGGCCTGGAACTTGTTTAAAGTGTTTATTCCCCATTTCTTTG
AGGGATCAGGAAGGAATCCTGGGTATGCCATTGACTTCCCTTCTAAGTAGACAGCAAAAA
TGGCGGGGGTCGCAGGAATCTGCACTCAACTGCCCACCTGGCTGGCAGGGATCTTTGAAT
AGGTATCTTGAGCTTGGTTCTGGGCTCTTTCCTTGTGTACTGACGACCAGGGCCAGCTGT
TCTAGAGCGGGAATTAGAGGCTAGAGCGGCTGAAATGGTTGTTTGGTGATGACACTGGGG
TCCTTCCATCTCTGGGGCCCACTCTCTTCTGTCTTCCCATGGGAAGTGCCACTGGGATCC
CTCTGCCCTGTCCTCCTGAATACAAGCTGACTGACATTGACTGTGTCTGTGGAAAATGGG
AGCTCTTGTTGTGGAGAGCATAGTAAATTTTCAGAGAACTTGAAGCCAAAAGGATTTAAA
ACCGCTGCTCTAAAGAAAAGAAAACTGGAGGCTGGGCGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCC
CAGAGGCTGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCGGGATCAGCCTGACCAACAT
GGAGAAACCCTACTGGAAATACAAAGTTAGCCAGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAGTCCC
AGCTGCTCAGGAGCCTGGCAACAAGAGCAAAACTCCAGCTCAAAAAAAAAAAAAAAA

도면 8

MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPR
VEWKFDQGDTTRLVCYNNKITASYEDRVTFLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGGNS
YGEVKVKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNP
KSTRAFSNSSYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVRMEAVERNV
GVIVAAVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTS
SFLV

N-글리코실화 잔기의 위치 :

185-189

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치 :

270-274

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

34-38
82-86
100-108
118-122
152-156
154-158
193-197
203-207
287-291

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

105-111
116-122
158-164
219-225
237-243
256-262

도면 9a

GGGGGTTAGGGAGGAAGGAATCCACCCCCACCCCCCCAAACCCTTTTCTTCTCCTTTCCT

GGCTTCGGACATTGGAGCACTAAATGAACTTGAATTGTGTCTGTGGCGAGCAGGATGGTC

GCTGTTACTTTGTGATGAGATCGGGGATGAATTGCTCGCTTTAAAAATGCTGCTTTGGAT

TCTGTTGCTGGAGACGTCTCTTTGTTTTGCCGCTGGAAACGTTACAGGGGACGTTTGCAA

AGAGAAGATCTGTTCCTGCAATGAGATAGAAGGGGACCTACACGTAGACTGTGAAAAAAA

GGGCTTCACAAGTCTGCAGCGTTTCACTGCCCCGACTTCCCAGTTTTACCATTTATTTCT

GCATGGCAATTCCCTCACTCGACTTTTCCCTAATGAGTTCGCTAACTTTTATAATGCGGT

TAGTTTGCACATGGAAAACAATGGCTTGCATGAAATCGTTCCGGGGGCTTTTCTGGGGCT

GCAGCTGGTGAAAAGGCTGCACATCAACAACAACAAGATCAAGTCTTTTCGAAAGCAGAC

TTTTCTGGGGCTGGACGATCTGGAATATCTCCAGGCTGATTTTAATTTATTACGAGATAT

AGACCCGGGGGCCTTCCAGGACTTGAACAAGCTGGAGGTGCTCATTTTAAATGACAATCT

CATCAGCACCCTACCTGCCAACGTGTTCCAGTATGTGCCCATCACCCACCTCGACCTCCG

GGGTAACAGGCTGAAAACGCTGCCCTATGAGGAGGTCTTGGAGCAAATCCCTGGTATTGC

GGAGATCCTGCTAGAGGATAACCCTTGGGACTGCACCTGTGATCTGCTCTCCCTGAAAGA

ATGGCTGGAAAACATTCCCAAGAATGCCCTGATCGGCCGAGTGGTCTGCGAAGCCCCCAC

CAGACTGCAGGGTAAAGACCTCAATGAAACCACCGAACAGGACTTGTGTCCTTTGAAAAA

CCGAGTGGATTCTAGTCTCCCGGCGCCCCCTGCCCAAGAAGAGACCTTTGCTCCTGGACC

CCTGCCAACTCCTTTCAAGACAAATGGGCAAGAGGATCATGCCACACCAGGGTCTGCTCC

AAACGGAGGTACAAAGATCCCAGGCAACTGGCAGATCAAAATCAGACCCACAGCAGCGAT

AGCGACGGGTAGCTCCAGGAACAAACCCTTAGCTAACAGTTTACCCTGCCCTGGGGGCTG

CAGCTGCGACCACATCCCAGGGTCGGGTTTAAAGATGAACTGCAACAACAGGAACGTGAG

CAGCTTGGCTGATTTGAAGCCCAAGCTCTCTAACGTGCAGGAGCTTTTCCTACGAGATAA

CAAGATCCACAGCATCCGAAAATCGCACTTTGTGGATTACAAGAACCTCATTCTGTTGGA

TCTGGGCAACAATAACATCGCTACTGTAGAGAACAACACTTTCAAGAACCTTTTGGACCT

CAGGTGGCTATACATGGATAGCAATTACCTGGACACGCTGTCCCGGGAGAAATTCGCGGG

GCTGCAAAACCTAGAGTACCTGAACGTGGAGTACAACGCTATCCAGCTCATCCTCCCGGG

CACTTTCAATGCCATGCCCAAACTGAGGATCCTCATTCTCAACAACAACCTGCTGAGGTC

CCTGCCTGTGGACGTGTTCGCTGGGGTCTCGCTCTCTAAACTCAGCCTGCACAACAATTA

CTTCATGTACCTCCCGGTGGCAGGGGTGCTGGACCAGTTAACCTCCATCATCCAGATAGA

CCTCCACGGAAACCCCTGGGAGTGCTCCTGCACAATTGTGCCTTTCAAGCAGTGGGCAGA

ACGCTTGGGTTCCGAAGTGCTGATGAGCGACCTCAAGTGTGAGACGCCGGTGAACTTCTT

TAGAAAGGATTTCATGCTCCTCTCCAATGACGAGATCTGCCCTCAGCTGTACGCTAGGAT

CTCGCCCACGTTAACTTCGCACAGTAAAAACAGCACTGGGTTGGCGGAGACCGGGACGCA

CTCCAACTCCTACCTAGACACCAGCAGGGTGTCCATCTCGGTGTTGGTCCCGGGACTGCT

GCTGGTGTTTGTCACCTCCGCCTTCACCGTGGTGGGCATGCTCGTGTTTATCCTGAGGAA

CCGAAAGCGGTCCAAGAGACGAGATGCCAACTCCTCCGCGTCCGAGATTAATTCCCTACA

도면 9b

GACAGTCTGTGACTCTTCCTACTGGCACAATGGGCCTTACAACGCAGATGGGGCCCACAG

AGTGTATGACTGTGGCTCTCACTCGCTCTCAGACTAAGACCCCAACCCCAATAGGGGAGG

GCAGAGGGAAGGCGATACATCCTTCCCCACCGCAGGCACCCCGGGGGCTGGAGGGGCGTG

TACCCAAATCCCCGCGCCATCAGCCTGGATGGGCATAAGTAGATAAATAACTGTGAGCTC

GCACAACCGAAAGGGCCTGACCCCTTACTTAGCTCCCTCCTTGAAACAAAGAGCAGACTG

TGGAGAGCTGGGAGAGCGCAGCCAGCTCGCTCTTTGCTGAGAGCCCCTTTTGACAGAAAG

CCCAGCACGACCCTGCTGGAAGAACTGACAGTGCCCTCGCCCTCGGCCCCGGGGCCTGTG

GGGTTGGATGCCGCGGTTCTATACATATATACATATATCCACATCTATATAGAGAGATAG

ATATCTATTTTTCCCCTGTGGATTAGCCCCGTGATGGCTCCCTGTTGGCTACGCAGGGAT

GGGCAGTTGCACGAAGGCATGAATGTATTGTAAATAAGTAACTTTGACTTCTGAC

도면 10

MLLWILLLETSLCFAAGNVTGDVCKEKICSCNEIEGDLHVDCEKKGFTSLQRFTAPTSQ
FYHLFLHGNSLTRLFPNEFANFYNAVSLHMENNGLHEIVPGAFLGLQLVKRLHINNNKI
KSFRKQTFLGLDDLEYLQADFNLLRDIDPGAFQDLNKLEVLILNDNLISTLPANVFQYV
PITHLDLRGNRLKTLPYEEVLEQIPGIAEILLEDNPWDCTCDLLSLKEWLENIPKNALI
GRVVCEAPTRLQGKDLNETTEQDLCPLKNRVDSSLPAPPAQEETFAPGPLPTPFKTNGQ
EDHATPGSAPNGGTKIPGNWQIKIRPTAAIATGSSRNKPLANSLPCPGGCSCDHIPGSG
LKMNCNNRNVSSLADLKPKLSNVQELFLRDNKIHSIRKSHFVDYKNLILLDLGNNNIAT
VENNTFKNLLDLRWLYMDSNYLDTLSREKFAGLQNLEYLNVEYNAIQLILPGTFNAMPK
LRILILNNNLLRSLPVDVFAGVSLSKLSLHNNYFMYLPVAGVLDQLTSIIQIDLHGNPW
ECSCTIVPFKQWAERLGSEVLMSDLKCETPVNFFRKDFMLLSNDEICPQLYARISPTLT
SHSKNSTGLAETGTHSNSYLDTSRVSISVLVPGLLLVFVTSAFTVVGMLVFILRNRKRS
KRRDANSSASEINSLQTVCDSSYWHNGPYNADGAHRVYDCGSHSLSD

N-글리코실화 잔기의 위치 :

18-22
253-257
363-367
416-420
595-599
655-659

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치 :

122-126
646-650

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

30-34
180-184
222-226
256-260
366-370
573-577
608-612
657-661
666-670
693-697

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

17-23
67-73
100-106
302-308
328-334
343-349
354-360
465-471
493-499
598-604
603-609

원핵성 막 지질 단백질 지질 부착 잔기의 위치 :

337-348

도면 11a

GTAACTGAAGTCAGGCTTTTCATTTGGGAAGCCCCCTCAACAGAATTCGGTCATTCTCCA
AGTTATGGTGGACGTACTTCTGTTGTTCTCCCTCTGCTTGCTTTTTCACATTAGCAGACC
GGACTTAAGTCACAACAGATTATCTTTCATCAAGGCAAGTTCCATGAGCCACCTTCAAAG
CCTTCGAGAAGTGAAACTGAACAACAATGAATTGGAGACCATTCCAAATCTGGGACCAGT
CTCGGCAAATATTACACTTCTCTCCTTGGCTGGAAACAGGATTGTTGAAATACTCCCTGA
ACATCTGAAAGAGTTTCAGTCCCTTGAAACTTTGGACCTTAGCAGCAACAATATTTCAGA
GCTCCAAACTGCATTTCCAGCCCTACAGCTCAAATATCTGTATCTCAACAGCAACCGAGT
CACATCAATGGAACCTGGGTATTTTGACAATTTGGCCAACACACTCCTTGTGTTAAAGCT
GAACAGGAACCGAATCTCAGCTATCCCACCCAAGATGTTTAAACTGCCCCAACTGCAACA
TCTCGAATTGAACCGAAACAAGATTAAAAATGTAGATGGACTGACATTCCAAGGCCTTGG
TGCTCTGAAGTCTCTGAAAATGCAAAGAAATGGAGTAACGAAACTTATGGATGGAGCTTT
TTGGGGGCTGAGCAACATGGAAATTTTGCAGCTGGACCATAACAACCTAACAGAGATTAC
CAAAGGCTGGCTTTACGGCTTGCTGATGCTGCAGGAACTTCATCTCAGCCAAAATGCCAT
CAACAGGATCAGCCCTGATGCCTGGGAGTTCTGCCAGAAGCTCAGTGAGCTGGACCTAAC
TTTCAATCACTTATCAAGGTTAGATGATTCAAGCTTCCTTGGCCTAAGCTTACTAAATAC
ACTGCACATTGGGAACAACAGAGTCAGCTACATTGCTGATTGTGCCTTCCGGGGGCTTTC
CAGTTTAAAGACTTTGGATCTGAAGAACAATGAAATTTCCTGGACTATTGAAGACATGAA
TGGTGCTTTCTCTGGGCTTGACAAACTGAGGCGACTGATACTCCAAGGAAATCGGATCCG
TTCTATTACTAAAAAAGCCTTCACTGGTTTGGATGCATTGGAGCATCTAGACCTGAGTGA
CAACGCAATCATGTCTTTACAAGGCAATGCATTTTCACAAATGAAGAAACTGCAACAATT
GCATTTAAATACATCAAGCCTTTTGTGCGATTGCCAGCTAAAATGGCTCCCACAGTGGGT
GGCGGAAAACAACTTTCAGAGCTTTGTAAATGCCAGTTGTGCCCATCCTCAGCTGCTAAA
AGGAAGAAGCATTTTTGCTGTTAGCCCAGATGGCTTTGTGTGTGATGATTTTCCCAAACC
CCAGATCACGGTTCAGCCAGAAACACAGTCGGCAATAAAAGGTTCCAATTTGAGTTTCAT
CTGCTCAGCTGCCAGCAGCAGTGATTCCCCAATGACTTTTGCTTGGAAAAAAGACAATGA
ACTACTGCATGATGCTGAAATGGAAAATTATGCACACCTCCGGGCCCAAGGTGGCGAGGT
GATGGAGTATACCACCATCCTTCGGCTGCGCGAGGTGGAATTTGCCAGTGAGGGGAAATA
TCAGTGTGTCATCTCCAATCACTTTGGTTCATCCTACTCTGTCAAAGCCAAGCTTACAGT
AAATATGCTTCCCTCATTCACCAAGACCCCCATGGATCTCACCATCCGAGCTGGGGCCAT
GGCACGCTTGGAGTGTGCTGCTGTGGGGCACCCAGCCCCCCAGATAGCCTGGCAGAAGGA
TGGGGGCACAGACTTCCCAGCTGCACGGGAGAGACGCATGCATGTGATGCCCGAGGATGA
CGTGTTCTTTATCGTGGATGTGAAGATAGAGGACATTGGGGTATACAGCTGCACAGCTCA
GAACAGTGCAGGAAGTATTTCAGCAAATGCAACTCTGACTGTCCTAGAAACACCATCATT
TTTGCGGCCACTGTTGGACCGAACTGTAACCAAGGGAGAAACAGCCGTCCTACAGTGCAT
TGCTGGAGGAAGCCCTCCCCCTAAACTGAACTGGACCAAAGATGATAGCCCATTGGTGGT
AACCGAGAGGCACTTTTTTGCAGCAGGCAATCAGCTTCTGATTATTGTGGACTCAGATGT

도면 11b

CAGTGATGCTGGGAAATACACATGTGAGATGTCTAACACCCTTGGCACTGAGAGAGGAAA
CGTGCGCCTCAGTGTGATCCCCACTCCAACCTGCGACTCCCCTCAGATGACAGCCCCATC
GTTAGACGATGACGGATGGGCCACTGTGGGTGTCGTGATCATAGCCGTGGTTTGCTGTGT
GGTGGGCACGTCACTCGTGTGGGTGGTCATCATATACCACACAAGGCGGAGGAATGAAGA
TTGCAGCATTACCAACACAGATGAGACCAACTTGCCAGCAGATATTCCTAGTTATTTGTC
ATCTCAGGGAACGTTAGCTGACAGGCAGGATGGGTACGTGTCTTCAGAAAGTGGAAGCCA
CCACCAGTTTGTCACATCTTCAGGTGCTGGATTTTTCTTACCACAACATGACAGTAGTGG
GACCTGCCATATTGACAATAGCAGTGAAGCTGATGTGGAAGCTGCCACAGATCTGTTCCT
TTGTCCGTTTTTGGGATCCACAGGCCCTATGTATTTGAAGGGAAATGTGTATGGCTCAGA
TCCTTTTGAAACATATCATACAGGTTGCAGTCCTGACCCAAGAACAGTTTTAATGGACCA
CTATGAGCCCAGTTACATAAAGAAAAAGGAGTGCTACCCATGTTCTCATCCTTCAGAAGA
ATCCTGCGAACGGAGCTTCAGTAATATATCGTGGCCTTCACATGTGAGGAAGCTACTTAA
CACTAGTTACTCTCACAATGAAGGACCTGGAATGAAAAATCTGTGTCTAAACAAGTCCTC
TTTAGATTTTAGTGCAAATCCAGAGCCAGCGTCGGTTGCCTCGAGTAATTCTTTCATGGG
TACCTTTGGAAAAGCTCTCAGGAGACCTCACCTAGATGCCTATTCAAGCTTTGGACAGCC
ATCAGATTGTCAGCCAAGAGCCTTTTATTTGAAAGCTCATTCTTCCCCAGACTTGGACTC
TGGGTCAGAGGAAGATGGGAAAGAAAGGACAGATTTTCAGGAAGAAAATCACATTTGTAC
CTTTAAACAGACTTTAGAAAACTACAGGACTCCAAATTTTCAGTCTTATGACTTGGACAC
ATAGACTGAATGAGACCAAAGGAAAAGCTTAACATACTACCTCAAGTGAACTTTTATTTA
AAAGAGAGAGAATCTTATGTTTTTTAAATGGAGTTATGAATTTTAAAAGGATAAAAATGC
TTTATTTATACAGATGAACCAAAATTACAAAAAGTTATGAAAATTTTTATACTGGGAATG
ATGCTCATATAAGAATACCTTTTTAAACTATTTTTTAACTTTGTTTTATGCAAAAAAGTA
TCTTACGTAAATTAATGATATAAATCATGATTATTTTATGTATTTTTATAATGCCAGATT
TCTTTTTTATGGAAAATGAGTTACTAAAGCATTTTAAATAATACCTGCCTTGTACCATTTT
TTAAATAGAAGTTACTTCATTATATTTTGCACATTATATTTAATAAAATGTGTCAATTTG
AA

도면 12a

MVDVLLLFSLCLLFHISRPDLSHNRLSFIKASSMSHLQSLREVKLNNNELETIPNLGPV
SANITLLSLAGNRIVEILPEHLKEFQSLETLDLSSNNISELQTAFPALQLKYLYLNSNR
VTSMEPGYFDNLANTLLVLKLNRNRISAIPPKMFKLPQLQHLELNRNKIKNVDGLTFQG
LGALKSLKMQRNGVTKLMDGAFWGLSNMEILQLDHNNLTEITKGWLYGLLMLQELHLSQ
NAINRISPDAWEFCQKLSELDLTFNHLSRLDDSSFLGLSLLNTLHIGNNRVSYIADCAF
RGLSSLKTLDLKNNEISWTIEDMNGAFSGLDKLRRLILQGNRIRSITKKAFTGLDALEH
LDLSDNAIMSLQGNAFSQMKKLQQLHLNTSSLLCDCQLKWLPQWVAENNFQSFVNASCA
HPQLLKGRSIFAVSPDGFVCDDFPKPQITVQPETQSAIKGSNLSFICSAASSSDSPMTF
AWKKDNELLHDAEMENYAHLRAQGGEVMEYTTILRLREVEFASEGKYQCVISNHFGSSY
SVKAKLTVNMLPSFTKTPMDLTIRAGAMARLECAAVGHPAPQIAWQKDGGTDFPAARER
RMHVMPEDDVFFIVDVKIEDIGVYSCTAQNSAGSISANATLTVLETPSFLRPLLDRTVT
KGETAVLQCIAGGSPPPKLNWTKDDSPLVVTERHFFAAGNQLLIIVDSDVSDAGKYTCE
MSNTLGTERGNVRLSVIPTPTCDSPQMTAPSLDDDGWATVGVVIIAVVCCVVGTSLVWV
VIIYHTRRRNEDCSITNTDETNLPADIPSYLSSQGTLADRQDGYVSSESGSHHQFVTSS
GAGFFLPQHDSSGTCHIDNSSEADVEAATDLFLCPFLGSTGPMYLKGNVYGSDPFETYH
TGCSPDPRTVLMDHYEPSYIKKKECYPCSHPSEESCERSFSNISWPSHVRKLLNTSYSH
NEGPGMKNLCLNKSSLDFSANPEPASVASSNSFMGTFGKALRRPHLDAYSSFGQPSDCQ
PRAFYLKAHSSPDLDSGSEEDGKERTDFQEENHICTFKQTLENYRTPNFQSYDLDT

N-글리코실화 잔기의 위치 :

62-66
96-100
214-218
382-386
409-413
455-459
628-632
669-673
845-849
927-931
939-943
956-960

클리코스아미노글리칸 부착 잔기의 위치 :

826-830

도면 12b

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

17-21
39-43
120-124
203-207
254-258
264-268
314-318
323-327
347-351
464-468
548-552
632-636
649-653
671-675
739-743
783-787
803-807
847-851
943-947
958-962
1013-1017
1019-1023
1021-1025

티로신 키나제 인산화 잔기의 위치 :

607-615

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

179-185
197-203
320-326
367-373
453-459
528-534
612-618
623-629
714-720
873-879

도면 13

GGGGAGAGGAATTGACCATGTAAAAGGAGACTTTTTTTTTTGGTGGTGGTGGCTGTTGGG
TGCCTTGCAAAAATGAAGGATGCAGGACGCAGCTTTCTCCTGGAACCGAACGCAATGGAT
AAACTGATTGTGCAAGAGAGAAGGAAGAACGAAGCTTTTTCTTGTGAGCCCTGGATCTTA
ACACAAATGTGTATATGTGCACACAGGGAGCATTCAAGAATGAAATAAACCAGAGTTAGA
CCCGCGGGGGTTGGTGTGTTCTGACATAAATAAATAATCTTAAAGCAGCTGTTCCCCTCC
CCACCCCCAAAAAAAAGGATGATTGGAAATGAAGAACCGAGGATTCACAAAGAAAAAAGT
ATGTTCATTTTTCTCTATAAAGGAGAAAGTGAGCCAAGGAGATATTTTTGGAATGAAAAG
TTTGGGGCTTTTTTAGTAAAGTAAAGAACTGGTGTGGTGGTGTTTTCCTTTCTTTTTGAA
TTTCCCACAAGAGGAGAGGAAATTAATAATACATCTGCAAAGAAATTTCAGAGAAGAAAA
GTTGACCGCGGCAGATTGAGGCATTGATTGGGGGAGAGAAACCAGCAGAGCACAGTTGGA
TTTGTGCCTATGTTGACTAAAATTGACGGATAATTGCAGTTGGATTTTTCTTCATCAACC
TCCTTTTTTTTAAATTTTTATTCCTTTTGGTATCAAGATCATGCGTTTTCTCTTGTTCTT
AACCACCTGGATTTCCATCTGGATGTTGCTGTGATCAGTCTGAAATACAACTGTTTGAAT
TCCAGAAGGACCAACACCAGATAAATTATGAATGTTGAACAAGATGACCTTACATCCACA
GCAGATAATGATAGGTCCTAGGTTTAACAGGGCCCTATTTGACCCCCTGCTTGTGGTGCT
GCTGGCTCTTCAACTTCTTGTGGTGGCTGGTCTGGTGCGGGCTCAGACCTGCCCTTCTGT
GTGCTCCTGCAGCAACCAGTTCAGCAAGGTGATTTGTGTTCGGAAAAACCTGCGTGAGGT
TCCGGATGGCATCTCCACCAACACACGGCTGCTGAACCTCCATGAGAACCAAATCCAGAT
CATCAAAGTGAACAGCTTCAAGCACTTGAGGCACTTGGAAATCCTACAGTTGAGTAGGAA
CCATATCAGAACCATTGAAATTGGGGCTTTCAATGGTCTGGCGAACCTCAAGACTCTGGA
ACTCTTTGACAATCGTCTTACTACCATCCCGAATGGAGCTTTTGTATACTTGTCTAAACT
GAAGGAGCTCTGGTTGCGAAACAACCCCATTGAAAGCATCCCTTCTTATGCTTTTAACAG
AATTCCTTCTTTGCGCCGACTAGACTTAGGGGAATTGAAAAGACTTTCATACATCTCAGA
AGGTGCCTTTGAAGGTCTGTCCAACTTGAGGTATTTGAACCTTGCCATGTGCAACCTTCG
GGAAATCCCTAACCTCACACCGCTCATAAAACTAGATGAGCTGGATCTTTCTGGGAATCA
TTTATCTGCCATCAGGCCTGGCTCTTTCCAGGGTTTGATGCACCTTCAAAAACTGTGGAT
GATACAGTCCCAGATTCAAGTGATTGAACGGAATGCCTTTGACAACCTTCAGTCACTAGT
GGAGATCAACCTGGCACACAATAATCTAACATTACTGCCTCATGACCTCTTCACTCCCTT
GCATCATCTAGAGCGGATACATTTACATCACAACCCTTGGAACTGTAACTGTGACATACT
GTGGCTCAGCTGGTGGATAAAAGACATGGCCCCCTCGAACACAGCTTGTTGTGCCCGGTG
TAACACTCCTCCCAATCTAAAGGGGAGGTACATTGGAGAGCTCGACCAGAATTACTTCAC
ATGCTATGCTCCGGTGATTGTGGAGCCCCCTGCAGACCTCAATGTCACTGAAGGCATGGC
AGCTGAGCTGAAATGTCGGGCCTCCACATCCCTGACATCTGTATCTTGGATTACTCCAAA
TGGAACAGTCATGACACATGGGGCGTACAAAGTGCGGATAGCTGTGCTCAGTGATGGTAC
GTTAAATTTCACAAATGTAACTGTGCAAGATACAGGCATGTACACATGTATGGTGAGTAA
TTCCGTTGGGAATACTACTGCTTCAGCCACCCTGAATGTTACTGCAGCAACCACTACTCC
TTTCTCTTACTTTTCAACCGTCACAGTAGAGACTATGGAACCGTCTCAGGATGAGGCACG
GACCACAGATAACAATGTGGGTCCCACTCCAGTGGTCGACTGGGAGACCACCAATGTGAC
CACCTCTCTCACACCACAGAGCACAAGGTCGACAGAGAAAACCTTCACCATCCCAGTGAC
TGATATAAACAGTGGGATCCCAGGAATTGATGAGGTCATGAAGACTACCAAAATCATCAT
TGGGTGTTTTGTGGCCATCACACTCATGGCTGCAGTGATGCTGGTCATTTTCTACAAGAT
GAGGAAGCAGCACCATCGGCAAAACCATCACGCCCCAACAAGGACTGTTGAAATTATTAA
TGTGGATGATGAGATTACGGGAGACACACCCATGGAAAGCCACCTGCCCATGCCTGCTAT
CGAGCATGAGCACCTAAATCACTATAACTCATACAAATCTCCCTTCAACCACACAACAAC
AGTTAACACAATAAATTCAATACACAGTTCAGTGCATGAACCGTTATTGATCCGAATGAA
CTCTAAAGACAATGTACAAGAGACTCAAATCTAAAACATTTACAGAGTTACAAAAAACAA
ACAATCAAAAAAAAAGACAGTTTATTAAAAATGACACAAATGACTGGGCTAAATCTACTG
TTTCAAAAAAGTGTCTTTACAAAAAAACAAAAAAGAAAAGAAATTTATTTATTAAAAATT
CTATTGTGATCTAAAGCAGACAAAAA

도면 14

MLNKMTLHPQQIMIGPRFNRALFDPLLVVLLALQLLVVAGLVRAQTCPSVCSCSNQFSK
VICVRKNLREVPDGISTNTRLLNLHENQIQIIKVNSFKHLRHLEILQLSRNHIRTIEIG
AFNGLANLNTLELFDNRLTTIPNGAFVYLSKLKELWLRNNPIESIPSYAFNRIPSLRRL
DLGELKRLSYISEGAFEGLSNLRYLNLAMCNLREIPNLTPLIKLDELDLSGNHLSAIRP
GSFQGLMHLQKLWMIQSQIQVIERNAFDNLQSLVEINLAHNNLTLLPHDLFTPLHHLER
IHLHHNPWNCNCDILWLSWWIKDMAPSNTACCARCNTPPNLKGRYIGELDQNYFTCYAP
VIVEPPADLNVTEGMAAELKCRASTSLTSVSWITPNGTVMTHGAYKVRIAVLSDGTLNF
TNVTVQDTGMYTCMVSNSVGNTTASATLNVTAATTTPFSYFSTVTVETMEPSQDEARTT
DNNVGPTPVVDWETTNVTTSLTPQSTRSTEKTFTIPVTDINSGIPGIDEVMKTTKIIIG
CFVAITLMAAVMLVIFYKMRKQHHRQNHHAPTRTVEIINVDDEITGDTPMESHLPMPAI
EHEHLNHYNSYKSPFNHTTTVNTINSIHSSVHEPLLIRMNSKDNVQETQI

N-글리코실화 잔기의 위치 :

278-282
364-368
390-394
412-416
415-419
434-438
442-446
488-492
606-610

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나제 인산화 잔기의 위치 :

183-187

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

268-272
417-421
465-469
579-583
620-624

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

40-46
73-79
118-124
191-197
228-234
237-243
391-397
422-428
433-439
531-537

도면 15a

AGCCGACGCTGCTCAAGCTGCAACTCTGTTGCAGTTGGCAGTTCTTTTCGGTTTCCCTCC
TGCTGTTTGGGGGCATGAAAGGGCTTCGCCGCCGGGAGTAAAAGAAGGAATTGACCGGGC
AGCGCGAGGGAGGAGCGCGCACGCGACCGCGAGGGCGGGCGTGCACCCTCGGCTGGAAGT
TTGTGCCGGGCCCCGAGCGCGCGCCGGCTGGGAGCTTCGGGTAGAGACCTAGGCCGCTGG
ACCGCGATGAGCGCGCCGAGCCTCCGTGCGCGCGCCGCGGGGTTGGGGCTGCTGCTGTGC
GCGGTGCTGGGGCGCGCTGGCCGGTCCGACAGCGGCGGTCGCGGGGAACTCGGGCAGCCC
TCTGGGGTAGCCGCCGAGCGCCCATGCCCCACTACCTGCCGCTGCCTCGGGGACCTGCTG
GACTGCAGTCGTAAGCGGCTAGCGCGTCTTCCCGAGCCACTCCCGTCCTGGGTCGCTCGG
CTGGACTTAAGTCACAACAGATTATCTTTCATCAAGGCAAGTTCCATGAGCCACCTTCAA
AGCCTTCGAGAAGTGAAACTGAACAACAATGAATTGGAGACCATTCCAAATCTGGGACCA
GTCTCGGCAAATATTACACTTCTCTCCTTGGCTGGAAACAGGATTGTTGAAATACTCCCT
GAACATCTGAAAGAGTTTCAGTCCCTTGAAACTTTGGACCTTAGCAGCAACAATATTTCA
GAGCTCCAAACTGCATTTCCAGCCCTACAGCTCAAATATCTGTATCTCAACAGCAACCGA
GTCACATCAATGGAACCTGGGTATTTTGACAATTTGGCCAACACACTCCTTGTGTTAAAG
CTGAACAGGAACCGAATCTCAGCTATCCCACCCAAGATGTTTAAACTGCCCCAACTGCAA
CATCTCGAATTGAACCGAAACAAGATTAAAAATGTAGATGGACTGACATTCCAAGGCCTT
GGTGCTCTGAAGTCTCTGAAAATGCAAAGAAATGGAGTAACGAAACTTATGGATGGAGCT
TTTTGGGGGCTGAGCAACATGGAAATTTTGCAGCTGGACCATAACAACCTAACAGAGATT
ACCAAAGGCTGGCTTTACGGCTTGCTGATGCTGCAGGAACTTCATCTCAGCCAAAATGCC
ATCAACAGGATCAGCCCTGATGCCTGGGAGTTCTGCCAGAAGCTCAGTGAGCTGGACCTA
ACTTTCAATCACTTATCAAGGTTAGATGATTCAAGCTTCCTTGGCCTAAGCTTACTAAAT
ACACTGCACATTGGGAACAACAGAGTCAGCTACATTGCTGATTGTGCCTTCCGGGGGCTT
TCCAGTTTAAAGACTTTGGATCTGAAGAACAATGAAATTTCCTGGACTATTGAAGACATG
AATGGTGCTTTCTCTGGGCTTGACAAACTGAGGCGACTGATACTCCAAGGAAATCGGATC
CGTTCTATTACTAAAAAAGCCTTCACTGGTTTGGATGCATTGGAGCATCTAGACCTGAGT
GACAACGCAATCATGTCTTTACAAGGCAATGCATTTTCACAAATGAAGAAACTGCAACAA
TTGCATTTAAATACATCAAGCCTTTTGTGCGATTGCCAGCTAAAATGGCTCCCACAGTGG
GTGGCGGAAAACAACTTTCAGAGCTTTGTAAATGCCAGTTGTGCCCATCCTCAGCTGCTA
AAAGGAAGAAGCATTTTTGCTGTTAGCCCAGATGGCTTTGTGTGTGATGATTTTCCCAAA
CCCCAGATCACGGTTCAGCCAGAAACACAGTCGGCAATAAAAGGTTCCAATTTGAGTTTC
ATCTGCTCAGCTGCCAGCAGCAGTGATTCCCCAATGACTTTTGCTTGGAAAAAAGACAAT
GAACTACTGCATGATGCTGAAATGGAAAATTATGCACACCTCCGGGCCCAAGGTGGCGAG
GTGATGGAGTATACCACCATCCTTCGGCTGCGCGAGGTGGAATTTGCCAGTGAGGGGAAA
TATCAGTGTGTCATCTCCAATCACTTTGGTTCATCCTACTCTGTCAAAGCCAAGCTTACA
GTAAATATGCTTCCCTCATTCACCAAGACCCCCATGGATCTCACCATCCGAGCTGGGGCC
ATGGCACGCTTGGAGTGTGCTGCTGTGGGGCACCCAGCCCCCCAGATAGCCTGGCAGAAG

도면 15b

GATGGGGGCACAGACTTCCCAGCTGCACGGGAGAGACGCATGCATGTGATGCCCGAGGAT
GACGTGTTCTTTATCGTGGATGTGAAGATAGAGGACATTGGGGTATACAGCTGCACAGCT
CAGAACAGTGCAGGAAGTATTTCAGCAAATGCAACTCTGACTGTCCTAGAAACACCATCA
TTTTTGCGGCCACTGTTGGACCGAACTGTAACCAAGGGAGAAACAGCCGTCCTACAGTGC
ATTGCTGGAGGAAGCCCTCCCCCTAAACTGAACTGGACCAAAGATGATAGCCCATTGGTG
GTAACCGAGAGGCACTTTTTTGCAGCAGGCAATCAGCTTCTGATTATTGTGGACTCAGAT
GTCAGTGATGCTGGGAAATACACATGTGAGATGTCTAACACCCTTGGCACTGAGAGAGGA
AACGTGCGCCTCAGTGTGATCCCCACTCCAACCTGCGACTCCCCTCAGATGACAGCCCCA
TCGTTAGACGATGACGGATGGGCCACTGTGGGTGTCGTGATCATAGCCGTGGTTTGCTGT
GTGGTGGGCACGTCACTCGTGTGGGTGGTCATCATATACCACACAAGGCGGAGGAATGAA
GATTGCAGCATTACCAACACAGATGAGACCAACTTGCCAGCAGATATTCCTAGTTATTTG
TCATCTCAGGGAACGTTAGCTGACAGGCAGGATGGGTACGTGTCTTCAGAAAGTGGAAGC
CACCACCAGTTTGTCACATCTTCAGGTGCTGGATTTTTCTTACCACAACATGACAGTAGT
GGGACCTGCCATATTGACAATAGCAGTGAAGCTGATGTGGAAGCTGCCACAGATCTGTTC
CTTTGTCCGTTTTTGGGATCCACAGGCCCTATGTATTTGAAGGGAAATGTGTATGGCTCA
GATCCTTTTGAAACATATCATACAGGTTGCAGTCCTGACCCAAGAACAGTTTTAATGGAC
CACTATGAGCCCAGTTACATAAAGAAAAAGGAGTGCTACCCATGTTCTCATCCTTCAGAA
GAATCCTGCGAACGGAGCTTCAGTAATATATCGTGGCCTTCACATGTGAGGAAGCTACTT
AACACTAGTTACTCTCACAATGAAGGACCTGGAATGAAAAATCTGTGTCTAAACAAGTCC
TCTTTAGATTTTAGTGCAAATCCAGAGCCAGCGTCGGTTGCCTCGAGTAATTCTTTCATG
GGTACCTTTGGAAAAGCTCTCAGGAGACCTCACCTAGATGCCTATTCAAGCTTTGGACAG
CCATCAGATTGTCAGCCAAGAGCCTTTTATTTGAAAGCTCATTCTTCCCCAGACTTGGAC
TCTGGGTCAGAGGAAGATGGGAAAGAAAGGACAGATTTTCAGGAAGAAAATCACATTTGT
ACCTTTAAACAGACTTTAGAAAACTACAGGACTCCAAATTTTCAGTCTTATGACTTGGAC
ACATAGACTGAATGAGACCAAAGGAAAAGCTTAACATACTACCTCAAGTGAACTTTTATT
TAAAAGAGAGAGAATCTTATGTTTTTTAAATGGAGTTATGAATTTTAAAAGGATAAAAAT
GCTTTATTTATACAGATGAACCAAAATTACAAAAAGTTATGAAAATTTTTATACTGGGAA
TGATGCTCATATAAGAATACCTTTTTAAACTATTTTTTAACTTTGTTTTATGCAAAAAAG
TATCTTACGTAAATTAATGATATAAATCATGATTATTTTATGTATTTTTATAATGCCAGA
TTTCTTTTTATGGAAAATGAGTTACTAAAGCATTTTAAATAATACCTGCCTTGTACCATT
TTTTAAATAGAAGTTACTTCATTATATTTTGCACATTATATTTAATAAAATGTGTCAATT
TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

도면 16a

MSAPSLRARAAGLGLLLCAVLGRAGRSDSGGRGELGQPSGVAAERPCPTTCRCLGDLLD
CSRKRLARLPEPLPSWVARLDLSHNRLSFIKASSMSHLQSLREVKLNNNELETIPNLGP
VSANITLLSLAGNRIVEILPEHLKEFQSLETLDLSSNNISELQTAFPALQLKYLYLNSN
RVTSMEPGYFDNLANTLLVLKLNRNRISAIPPKMFKLPQLQHLELNRNKIKNVDGLTFQ
GLGALKSLKMQRNGVTKLMDGAFWGLSNMEILQLDHNNLTEITKGWLYGLLMLQELHLS
QNAINRISPDAWEFCQKLSELDLTFNHLSRLDDSSFLGLSLLNTLHIGNNRVSYIADCA
FRGLSSLKTLDLKNNEISWTIEDMNGAFSGLDKLRRLILQGNRIRSITKKAFTGLDALE
HLDLSDNAIMSLQGNAFSQMKKLQQLHLNTSSLLCDCQLKWLPQWVAENNFQSFVNASC
AHPQLLKGRSIFAVSPDGFVCDDFPKPQITVQPETQSAIKGSNLSFICSAASSSDSPMT
FAWKKDNELLHDAEMENYAHLRAQGGEVMEYTTILRLREVEFASEGKYQCVISNHFGSS
YSVKAKLTVNMLPSFTKTPMDLTIRAGAMARLECAAVGHPAPQIAWQKDGGTDFPAARE
RRMHVMPEDDVFFIVDVKIEDIGVYSCTAQNSAGSISANATLTVLETPSFLRPLLDRTV
TKGETAVLQCIAGGSPPPKLNWTKDDSPLVVTERHFFAAGNQLLIIVDSDVSDAGKYTC
EMSNTLGTERGNVRLSVIPTPTCDSPQMTAPSLDDDGWATVGVVIIAVVCCVVGTSLVW
VVIIYHTRRRNEDCSITNTDETNLPADIPSYLSSQGTLADRQDGYVSSESGSHHQFVTS
SGAGFFLPQHDSSGTCHIDNSSEADVEAATDLFLCPFLGSTGPMYLKGNVYGSDPFETY
HTGCSPDPRTVLMDHYEPSYIKKKECYPCSHPSEESCERSFSNISWPSHVRKLLNTSYS
HNEGPGMKNLCLNKSSLDFSANPEPASVASSNSFMGTFGKALRRPHLDAYSSFGQPSDC
QPRAFYLKAHSSPDLDSGSEEDGKERTDFQEENHICTFKQTLENYRTPNFQSYDLDT

N-글리코실화 잔기의 위치 :

122-126
156-160
274-278
442-446
469-473
515-519
688-692
729-733
905-909
987-991
999-1003
1016-1020

글리코스 아미노글리칸 부착 잔기의 위치 :

도면 16b

886-890

카제인 키나제 II 인산화 잔기의 위치 :

99-103

180-184

263-267

314-318

324-328

374-378

383-387

407-411

524-528

608-612

692-696

709-713

731-735

799-803

843-847

863-867

907-911

1003-1007

1018-1022

1073-1077

1079-1083

1081-1085

티로신 키나제 인산화 잔기의 위치 :

667-675

N-미리스토일화 잔기의 위치 :

14-20

36-42

239-245

257-263

380-386

427-433

513-519

588-594

672-678

683-689

도면 16c

774-780

933-999

류신 지퍼 패턴 잔기의 위치 :

58-80

65-87

<110> Genentech, Inc.
Fong, Sherman
Audrey Goddard
Gurney, Austin L.
Tumas, Daniel
Wood, William I.
<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF IMMUNE RELATED DISEASES
<130> P1624R2
<140> PCT/US99/21547
<141> 1999-09-15
<150> US 60/100,858
<151> 1998-09-17
<150> PCT/US98/19437
<151> 1998-09-17
<160> 39
<210> 1
<211> 1295
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
cccagaagtt caagggcccc cggcctcctg cgctcctgcc gccgggaccc 50
tcgacctcct cagagcagcc ggctgccgcc ccgggaagat ggcgaggagg 100
agccgccacc gcctcctcct gctgctgctg cgctacctgg tggtcgccct 150
gggctatcat aaggcctatg ggttttctgc cccaaaagac caacaagtag 200
tcacagcagt agagtaccaa gaggctattt tagcctgcaa aaccccaaag 250

aagactgttt cctccagatt agagtggaag aaactgggtc ggagtgtctc 300
ctttgtctac tatcaacaga ctcttcaagg tgattttaaa aatcgagctg 350
agatgataga tttcaatatc cggatcaaaa atgtgacaag aagtgatgcg 400
gggaaatatc gttgtgaagt tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct 450
ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttccat 500
catgtgaagt accctcttct gctctgagtg gaactgtggt agagctacga 550
tgtcaagaca aagaagggaa tccagctcct gaatacacat ggtttaagga 600
tggcatccgt ttgctagaaa atcccagact tggctcccaa agcaccaaca 650
gctcatacac aatgaataca aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt 700
tccaaactgg acactggaga atattcctgt gaagcccgca attctgttgg 750
atatcgcagg tgtcctggga aacgaatgca agtagatgat ctcaacataa 800
gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ccttagtgat ttccgtttgt 850
ggccttggtg tatgctatgc tcagaggaaa ggctactttt caaaagaaac 900
ctccttccag aagagtaatt cttcatctaa agccacgaca atgagtgaaa 950
atgtgcagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggaa ggccgcggcg 1000
ggcggatcac gaggtcagga gttctagacc agtctggcca atatggtgaa 1050
accccatctc tactaaaata caaaaattag ctgggcatgg tggcatgtgc 1100
ctgcagttcc agctgcttgg gagacaggag aatcacttga acccgggagg 1150
cggaggttgc agtgagctga gatcacgcca ctgcagtcca gcctgggtaa 1200
cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa taaataaata aataaatact 1250
ggtttttacc tgtagaattc ttacaataaa tatagcttga tattc 1295

<210> 2
<211> 312
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Ala Arg Arg Ser Arg His Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg
1 5 10 15
Tyr Leu Val Val Ala Leu Gly Tyr His Lys Ala Tyr Gly Phe Ser
20 25 30
Ala Pro Lys Asp Gln Gln Val Val Thr Ala Val Glu Tyr Gln Glu
35 40 45
Ala Ile Leu Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Val Ser Ser Arg
50 55 60
Leu Glu Trp Lys Lys Leu Gly Arg Ser Val Ser Phe Val Tyr Tyr
65 70 75
Gln Gln Thr Leu Gln Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile
80 85 90
Asp Phe Asn Ile Arg Ile Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly
95 100 105
Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn
110 115 120
Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu Glu Val Leu Val Ala Pro Ala
125 130 135
Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser Ala Leu Ser Gly Thr Val
140 145 150
Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly Asn Pro Ala Pro Glu
155 160 165
Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu Glu Asn Pro Arg
170 175 180

Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met Asn Thr Lys
185 190 195
Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp Thr Gly
200 205 210
Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg Cys
215 220 225
Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile
230 235 240
Ile Ala Ala Val Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly
245 250 255
Leu Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu
260 265 270
Thr Ser Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met
275 280 285
Ser Glu Asn Val Gln Trp Leu Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu Trp
290 295 300
Lys Ala Ala Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gln Glu Phe
305 310 312

<210> 3
<211> 2033
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
ccaggccggg aggcgacgcg cccagccgtc taaacgggaa cagccctggc 50
tgagggagct gcagcgcagc agagtatctg acggcgccag gttgcgtagg 100
tgcggcacga ggagttttcc cggcagcgag gaggtcctga gcagcatggc 150
ccggaggagc gccttccctg ccgccgcgct ctggctctgg agcatcctcc 200
tgtgcctgct ggcactgcgg gcggaggccg ggccgccgca ggaggagagc 250
ctgtacctat ggatcgatgc tcaccaggca agagtactca taggatttga 300
agaagatatc ctgattgttt cagaggggaa aatggcacct tttacacatg 350
atttcagaaa agcgcaacag agaatgccag ctattcctgt caatatccat 400
tccatgaatt ttacctggca agctgcaggg caggcagaat acttctatga 450
attcctgtcc ttgcgctccc tggataaagg catcatggca gatccaaccg 500
tcaatgtccc tctgctggga acagtgcctc acaaggcatc agttgttcaa 550
gttggtttcc catgtcttgg aaaacaggat ggggtggcag catttgaagt 600
ggatgtgatt gttatgaatt ctgaaggcaa caccattctc caaacacctc 650
aaaatgctat cttctttaaa acatgtcaac aagctgagtg cccaggcggg 700
tgccgaaatg gaggcttttg taatgaaaga cgcatctgcg agtgtcctga 750
tgggttccac ggacctcact gtgagaaagc cctttgtacc ccacgatgta 800
tgaatggtgg actttgtgtg actcctggtt tctgcatctg cccacctgga 850
ttctatggag tgaactgtga caaagcaaac tgctcaacca cctgctttaa 900
tggagggacc tgtttctacc ctggaaaatg tatttgccct ccaggactag 950
agggagagca gtgtgaaatc agcaaatgcc cacaaccctg tcgaaatgga 1000
ggtaaatgca ttggtaaaag caaatgtaag tgttccaaag gttaccaggg 1050
agacctctgt tcaaagcctg tctgcgagcc tggctgtggt gcacatggaa 1100
cctgccatga acccaacaaa tgccaatgtc aagaaggttg gcatggaaga 1150
cactgcaata aaaggtacga agccagcctc atacatgccc tgaggccagc 1200
aggcgcccag ctcaggcagc acacgccttc acttaaaaag gccgaggagc 1250
ggcgggatcc acctgaatcc aattacatct ggtgaactcc gacatctgaa 1300
acgttttaag ttacaccaag ttcatagcct ttgttaacct ttcatgtgtt 1350

gaatgttcaa ataatgttca ttacacttaa gaatactggc ctgaatttta 1400
ttagcttcat tataaatcac tgagctgata tttactcttc cttttaagtt 1450
ttctaagtac gtctgtagca tgatggtata gattttcttg tttcagtgct 1500
ttgggacaga ttttatatta tgtcaattga tcaggttaaa attttcagtg 1550
tgtagttggc agatattttc aaaattacaa tgcatttatg gtgtctgggg 1600
gcaggggaac atcagaaagg ttaaattggg caaaaatgcg taagtcacaa 1650
gaatttggat ggtgcagtta atgttgaagt tacagcattt cagattttat 1700
tgtcagatat ttagatgttt gttacatttt taaaaattgc tcttaatttt 1750
taaactctca atacaatata ttttgacctt accattattc cagagattca 1800
gtattaaaaa aaaaaaaatt acactgtggt agtggcattt aaacaatata 1850
atatattcta aacacaatga aatagggaat ataatgtatg aacttttttgc 1900
attggcttga agcaatataa tatattgtaa acaaaacaca gctcttacct 1950
aataaacatt ttatactgtt tgtatgtata aaataaaggt gctgctttag 2000
ttttttggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2033

<210> 4
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Ala Arg Arg Ser Ala Phe Pro Ala Ala Ala Leu Trp Leu Trp
1 5 10 15
Ser Ile Leu Leu Cys Leu Leu Ala Leu Arg Ala Glu Ala Gly Pro
20 25 30
Pro Gln Glu Glu Ser Leu Tyr Leu Trp Ile Asp Ala His Gln Ala
35 40 45
Arg Val Leu Ile Gly Phe Glu Glu Asp Ile Leu Ile Val Ser Glu
50 55 60
Gly Lys Met Ala Pro Phe Thr His Asp Phe Arg Lys Ala Gln Gln
65 70 75
Arg Met Pro Ala Ile Pro Val Asn Ile His Ser Met Asn Phe Thr
80 85 90
Trp Gln Ala Ala Gly Gln Ala Glu Tyr Phe Tyr Glu Phe Leu Ser
95 100 105
Leu Arg Ser Leu Asp Lys Gly Ile Met Ala Asp Pro Thr Val Asn
110 115 120
Val Pro Leu Leu Gly Thr Val Pro His Lys Ala Ser Val Val Gln
125 130 135
Val Gly Phe Pro Cys Leu Gly Lys Gln Asp Gly Val Ala Ala Phe
140 145 150
Glu Val Asp Val Ile Val Met Asn Ser Glu Gly Asn Thr Ile Leu
155 160 165
Gln Thr Pro Gln Asn Ala Ile Phe Phe Lys Thr Cys Gln Gln Ala
170 175 180
Glu Cys Pro Gly Gly Cys Arg Asn Gly Gly Phe Cys Asn Glu Arg
185 190 195
Arg Ile Cys Glu Cys Pro Asp Gly Phe His Gly Pro His Cys Glu
200 205 210
Lys Ala Leu Cys Thr Pro Arg Cys Met Asn Gly Gly Leu Cys Val
215 220 225
Thr Pro Gly Phe Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Val Asn

```
                230                 235                 240
 Cys Asp Lys Ala Asn Cys Ser Thr Thr Cys Phe Asn Gly Gly Thr
                245                 250                 255
 Cys Phe Tyr Pro Gly Lys Cys Ile Cys Pro Pro Gly Leu Glu Gly
                260                 265                 270
 Glu Gln Cys Glu Ile Ser Lys Cys Pro Gln Pro Cys Arg Asn Gly
                275                 280                 285
 Gly Lys Cys Ile Gly Lys Ser Lys Cys Lys Cys Ser Lys Gly Tyr
                290                 295                 300
 Gln Gly Asp Leu Cys Ser Lys Pro Val Cys Glu Pro Gly Cys Gly
                305                 310                 315
 Ala His Gly Thr Cys His Glu Pro Asn Lys Cys Gln Cys Gln Glu
                320                 325                 330
 Gly Trp His Gly Arg His Cys Asn Lys Arg Tyr Glu Ala Ser Leu
                335                 340                 345
 Ile His Ala Leu Arg Pro Ala Gly Ala Gln Leu Arg Gln His Thr
                350                 355                 360
 Pro Ser Leu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Arg Asp Pro Pro Glu Ser
                365                 370                 375
 Asn Tyr Ile Trp
            379
<210> 5
<211> 1857
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
 gtctgttccc aggagtcctt cggcggctgt tgtgtcagtg gcctgatcgc 50
 gatggggaca aaggcgcaag tcgagaggaa actgttgtgc ctcttcatat 100
 tggcgatcct gttgtgctcc ctggcattgg gcagtgttac agtgcactct 150
 tctgaacctg aagtcagaat tcctgagaat aatcctgtga agttgtcctg 200
 tgcctactcg ggcttttctt ctccccgtgt ggagtggaag tttgaccaag 250
 gagacaccac cagactcgtt tgctataata acaagatcac agcttcctat 300
 gaggaccggg tgaccttctt gccaactggt atcaccttca agtccgtgac 350
 acgggaagac actgggacat acacttgtat ggtctctgag gaaggcggca 400
 acagctatgg ggaggtcaag gtcaagctca tcgtgcttgt gcctccatcc 450
 aagcctacag ttaacatccc ctcctctgcc accattggga accgggcagt 500
 gctgacatgc tcagaacaag atggttcccc accttctgaa tacacctggt 550
 tcaaagatgg gatagtgatg cctacgaatc ccaaaagcac ccgtgccttc 600
 agcaactctt cctatgtcct gaatcccaca acaggagagc tggtctttga 650
 tcccctgtca gcctctgata ctggagaata cagctgtgag gcacggaatg 700
 ggtatgggac acccatgact tcaaatgctg tgcgcatgga agctgtggag 750
 cggaatgtgg gggtcatcgt ggcagccgtc cttgtaaccc tgattctcct 800
 gggaatcttg gtttttggca tctggtttgc ctatagccga ggccactttg 850
 acagaacaaa gaaagggact tcgagtaaga aggtgattta cagccagcct 900
 agtgcccgaa gtgaaggaga attcaaacag acctcgtcat tcctggtgtg 950
 agcctggtcg gctcaccgcc tatcatctgc atttgcctta ctcaggtgct 1000
 accggactct ggcccctgat gtctgtagtt tcacaggatg ccttatttgt 1050
 cttctacacc ccacagggcc ccctacttct tcggatgtgt ttttaataat 1100
 gtcagctatg tgccccatcc tccttcatgc cctccctccc tttcctacca 1150
 ctgctgagtg gcctggaact tgtttaaagt gtttattccc catttctttg 1200
```

agggatcagg aaggaatcct gggtatgcca ttgacttccc ttctaagtag 1250
acagcaaaaa tggcgggggt cgcaggaatc tgcactcaac tgcccacctg 1300
gctggcaggg atctttgaat aggtatcttg agcttggttc tgggctcttt 1350
ccttgtgtac tgacgaccag ggccagctgt tctagagcgg gaattagagg 1400
ctagagcggc tgaaatggtt gtttggtgat gacactgggg tccttccatc 1450
tctggggccc actctcttct gtcttcccat gggaagtgcc actgggatcc 1500
ctctgccctg tcctcctgaa tacaagctga ctgacattga ctgtgtctgt 1550
ggaaaatggg agctcttgtt gtggagagca tagtaaattt tcagagaact 1600
tgaagccaaa aggatttaaa accgctgctc taaagaaaag aaaactggag 1650
gctgggcgca gtggctcacg cctgtaatcc cagaggctga ggcaggcgga 1700
tcacctgagg tcgggagttc gggatcagcc tgaccaacat ggagaaaccc 1750
tactggaaat acaaagttag ccaggcatgg tggtgcatgc ctgtagtccc 1800
agctgctcag gagcctggca acaagagcaa aactccagct caaaaaaaaa 1850
aaaaaaa 1857

<210> 6
<211> 299
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe
1 5 10 15
Ile Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr
20 25 30
Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro
35 40 45
Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val
50 55 60
Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr
65 70 75
Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu
80 85 90
Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly
95 100 105
Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly
110 115 120
Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro
125 130 135
Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val
140 145 150
Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr
155 160 165
Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr
170 175 180
Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly
185 190 195
Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr
200 205 210
Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn
215 220 225
Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val

```
                230                 235                 240
 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe
                245                 250                 255
 Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys
                260                 265                 270
 Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala
                275                 280                 285
 Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
                290                 295             299
<210> 7
<211> 2755
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7
 gggggttagg gaggaaggaa tccaccccca ccccccccaaa ccctttttctt 50
 ctcctttcct ggcttcggac attggagcac taaatgaact tgaattgtgt 100
 ctgtggcgag caggatggtc gctgttactt tgtgatgaga tcggggatga 150
 attgctcgct ttaaaaatgc tgctttggat tctgttgctg gagacgtctc 200
 tttgttttgc cgctggaaac gttacagggg acgtttgcaa agagaagatc 250
 tgttcctgca atgagataga aggggaccta cacgtagact gtgaaaaaaa 300
 gggcttcaca agtctgcagc gtttcactgc cccgacttcc cagttttacc 350
 atttatttct gcatggcaat tccctcactc gacttttccc taatgagttc 400
 gctaactttt ataatgcggt tagtttgcac atggaaaaca atggcttgca 450
 tgaaatcgtt ccgggggctt ttctggggct gcagctggtg aaaaggctgc 500
 acatcaacaa caacaagatc aagtcttttc gaaagcagac ttttctgggg 550
 ctggacgatc tggaatatct ccaggctgat tttaatttat tacgagatat 600
 agacccgggg gccttccagg acttgaacaa gctggaggtg ctcattttaa 650
 atgacaatct catcagcacc ctacctgcca acgtgttcca gtatgtgccc 700
 atcacccacc tcgacctccg gggtaacagg ctgaaaacgc tgccctatga 750
 ggaggtcttg gagcaaatcc ctggtattgc ggagatcctg ctagaggata 800
 acccttggga ctgcacctgt gatctgctct ccctgaaaga atggctggaa 850
 aacattccca agaatgccct gatcggccga gtggtctgcg aagcccccac 900
 cagactgcag ggtaaagacc tcaatgaaac caccgaacag gacttgtgtc 950
 ctttgaaaaa ccgagtggat tctagtctcc cggcgccccc tgcccaagaa 1000
 gagacctttg ctcctggacc cctgccaact cctttcaaga caaatgggca 1050
 agaggatcat gccacaccag ggtctgctcc aaacggaggt acaaagatcc 1100
 caggcaactg gcagatcaaa atcagaccca cagcagcgat agcgacgggt 1150
 agctccagga acaaaccctt agctaacagt ttaccctgcc ctgggggctg 1200
 cagctgcgac cacatcccag ggtcgggttt aaagatgaac tgcaacaaca 1250
 ggaacgtgag cagcttggct gatttgaagc ccaagctctc taacgtgcag 1300
 gagcttttcc tacgagataa caagatccac agcatccgaa aatcgcactt 1350
 tgtggattac aagaacctca ttctgttgga tctgggcaac aataacatcg 1400
 ctactgtaga gaacaacact ttcaagaacc ttttggacct caggtggcta 1450
 tacatggata gcaattacct ggacacgctg tcccgggaga aattcgcggg 1500
 gctgcaaaac ctagagtacc tgaacgtgga gtacaacgct atccagctca 1550
 tcctcccggg cactttcaat gccatgccca aactgaggat cctcattctc 1600
 aacaacaacc tgctgaggtc cctgcctgtg gacgtgttcg ctggggtctc 1650
 gctctctaaa ctcagcctgc acaacaatta cttcatgtac ctcccggtgg 1700
 caggggtgct ggaccagtta acctccatca tccagataga cctccacgga 1750
 aacccctggg agtgctcctg cacaattgtg cctttcaagc agtgggcaga 1800
```

acgcttgggt tccgaagtgc tgatgagcga cctcaagtgt gagacgccgg 1850
tgaacttctt tagaaaggat ttcatgctcc tctccaatga cgagatctgc 1900
cctcagctgt acgctaggat ctcgcccacg ttaacttcgc acagtaaaaa 1950
cagcactggg ttggcggaga ccgggacgca ctccaactcc tacctagaca 2000
ccagcagggt gtccatctcg gtgttggtcc cgggactgct gctggtgttt 2050
gtcacctccg ccttcaccgt ggtgggcatg ctcgtgttta tcctgaggaa 2100
ccgaaagcgg tccaagagac gagatgccaa ctcctccgcg tccgagatta 2150
attccctaca gacagtctgt gactcttcct actggcacaa tgggccttac 2200
aacgcagatg gggcccacag agtgtatgac tgtggctctc actcgctctc 2250
agactaagac cccaacccca ataggggagg gcagagggaa ggcgatacat 2300
ccttccccac cgcaggcacc ccgggggctg gaggggcgtg tacccaaatc 2350
cccgcgccat cagcctggat gggcataagt agataaataa ctgtgagctc 2400
gcacaaccga aagggcctga ccccttactt agctccctcc ttgaaacaaa 2450
gagcagactg tggagagctg ggagagcgca gccagctcgc tctttgctga 2500
gagccccttt tgacagaaag cccagcacga ccctgctgga agaactgaca 2550
gtgccctcgc cctcggcccc ggggcctgtg gggttggatg ccgcggttct 2600
atacatatat acatatatcc acatctatat agagagatag atatctattt 2650
ttcccctgtg gattagcccc gtgatggctc cctgttggct acgcagggat 2700
gggcagttgc acgaaggcat gaatgtattg taaataagta actttgactt 2750
ctgac 2755

<210> 8
<211> 696
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Met Leu Leu Trp Ile Leu Leu Leu Glu Thr Ser Leu Cys Phe Ala
1 5 10 15
Ala Gly Asn Val Thr Gly Asp Val Cys Lys Glu Lys Ile Cys Ser
20 25 30
Cys Asn Glu Ile Glu Gly Asp Leu His Val Asp Cys Glu Lys Lys
35 40 45
Gly Phe Thr Ser Leu Gln Arg Phe Thr Ala Pro Thr Ser Gln Phe
50 55 60
Tyr His Leu Phe Leu His Gly Asn Ser Leu Thr Arg Leu Phe Pro
65 70 75
Asn Glu Phe Ala Asn Phe Tyr Asn Ala Val Ser Leu His Met Glu
80 85 90
Asn Asn Gly Leu His Glu Ile Val Pro Gly Ala Phe Leu Gly Leu
95 100 105
Gln Leu Val Lys Arg Leu His Ile Asn Asn Asn Lys Ile Lys Ser
110 115 120
Phe Arg Lys Gln Thr Phe Leu Gly Leu Asp Asp Leu Glu Tyr Leu
125 130 135
Gln Ala Asp Phe Asn Leu Leu Arg Asp Ile Asp Pro Gly Ala Phe
140 145 150
Gln Asp Leu Asn Lys Leu Glu Val Leu Ile Leu Asn Asp Asn Leu
155 160 165
Ile Ser Thr Leu Pro Ala Asn Val Phe Gln Tyr Val Pro Ile Thr
170 175 180
His Leu Asp Leu Arg Gly Asn Arg Leu Lys Thr Leu Pro Tyr Glu

```
               185                 190                 195
Glu Val Leu Glu Gln Ile Pro Gly Ile Ala Glu Ile Leu Leu Glu
                200                 205                 210
Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Asp Leu Leu Ser Leu Lys Glu
                215                 220                 225
Trp Leu Glu Asn Ile Pro Lys Asn Ala Leu Ile Gly Arg Val Val
                230                 235                 240
Cys Glu Ala Pro Thr Arg Leu Gln Gly Lys Asp Leu Asn Glu Thr
                245                 250                 255
Thr Glu Gln Asp Leu Cys Pro Leu Lys Asn Arg Val Asp Ser Ser
                260                 265                 270
Leu Pro Ala Pro Pro Ala Gln Glu Glu Thr Phe Ala Pro Gly Pro
                275                 280                 285
Leu Pro Thr Pro Phe Lys Thr Asn Gly Gln Glu Asp His Ala Thr
                290                 295                 300
Pro Gly Ser Ala Pro Asn Gly Gly Thr Lys Ile Pro Gly Asn Trp
                305                 310                 315
Gln Ile Lys Ile Arg Pro Thr Ala Ala Ile Ala Thr Gly Ser Ser
                320                 325                 330
Arg Asn Lys Pro Leu Ala Asn Ser Leu Pro Cys Pro Gly Gly Cys
                335                 340                 345
Ser Cys Asp His Ile Pro Gly Ser Gly Leu Lys Met Asn Cys Asn
                350                 355                 360
Asn Arg Asn Val Ser Ser Leu Ala Asp Leu Lys Pro Lys Leu Ser
                365                 370                 375
Asn Val Gln Glu Leu Phe Leu Arg Asp Asn Lys Ile His Ser Ile
                380                 385                 390
Arg Lys Ser His Phe Val Asp Tyr Lys Asn Leu Ile Leu Leu Asp
                395                 400                 405
Leu Gly Asn Asn Asn Ile Ala Thr Val Glu Asn Asn Thr Phe Lys
                410                 415                 420
Asn Leu Leu Asp Leu Arg Trp Leu Tyr Met Asp Ser Asn Tyr Leu
                425                 430                 435
Asp Thr Leu Ser Arg Glu Lys Phe Ala Gly Leu Gln Asn Leu Glu
                440                 445                 450
Tyr Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ala Ile Gln Leu Ile Leu Pro Gly
                455                 460                 465
Thr Phe Asn Ala Met Pro Lys Leu Arg Ile Leu Ile Leu Asn Asn
                470                 475                 480
Asn Leu Leu Arg Ser Leu Pro Val Asp Val Phe Ala Gly Val Ser
                485                 490                 495
Leu Ser Lys Leu Ser Leu His Asn Asn Tyr Phe Met Tyr Leu Pro
                500                 505                 510
Val Ala Gly Val Leu Asp Gln Leu Thr Ser Ile Ile Gln Ile Asp
                515                 520                 525
Leu His Gly Asn Pro Trp Glu Cys Ser Cys Thr Ile Val Pro Phe
                530                 535                 540
Lys Gln Trp Ala Glu Arg Leu Gly Ser Glu Val Leu Met Ser Asp
                545                 550                 555
Leu Lys Cys Glu Thr Pro Val Asn Phe Phe Arg Lys Asp Phe Met
```

```
                560                 565                 570
 Leu Leu Ser Asn Asp Glu Ile Cys Pro Gln Leu Tyr Ala Arg Ile
                575                 580                 585
 Ser Pro Thr Leu Thr Ser His Ser Lys Asn Ser Thr Gly Leu Ala
                590                 595                 600
 Glu Thr Gly Thr His Ser Asn Ser Tyr Leu Asp Thr Ser Arg Val
                605                 610                 615
 Ser Ile Ser Val Leu Val Pro Gly Leu Leu Leu Val Phe Val Thr
                620                 625                 630
 Ser Ala Phe Thr Val Val Gly Met Leu Val Phe Ile Leu Arg Asn
                635                 640                 645
 Arg Lys Arg Ser Lys Arg Arg Asp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Glu
                650                 655                 660
 Ile Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Asp Ser Ser Tyr Trp His Asn
                665                 670                 675
 Gly Pro Tyr Asn Ala Asp Gly Ala His Arg Val Tyr Asp Cys Gly
                680                 685                 690
 Ser His Ser Leu Ser Asp
                695 696
<210> 9
<211> 3659
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
 gtaactgaag tcaggctttt catttgggaa gccccctcaa cagaattcgg 50
 tcattctcca agttatggtg gacgtacttc tgttgttctc cctctgcttg 100
 ctttttcaca ttagcagacc ggacttaagt cacaacagat tatctttcat 150
 caaggcaagt tccatgagcc accttcaaag ccttcgagaa gtgaaactga 200
 acaacaatga attggagacc attccaaatc tgggaccagt ctcggcaaat 250
 attacacttc tctccttggc tggaaacagg attgttgaaa tactccctga 300
 acatctgaaa gagtttcagt cccttgaaac tttggacctt agcagcaaca 350
 atatttcaga gctccaaact gcatttccag ccctacagct caaatatctg 400
 tatctcaaca gcaaccgagt cacatcaatg gaacctgggt attttgacaa 450
 tttggccaac acactccttg tgttaaagct gaacaggaac cgaatctcag 500
 ctatcccacc caagatgttt aaactgcccc aactgcaaca tctcgaattg 550
 aaccgaaaca agattaaaaa tgtagatgga ctgacattcc aaggccttgg 600
 tgctctgaag tctctgaaaa tgcaaagaaa tggagtaacg aaacttatgg 650
 atggagcttt ttgggggctg agcaacatgg aaattttgca gctggaccat 700
 aacaacctaa cagagattac caaaggctgg ctttacggct tgctgatgct 750
 gcaggaactt catctcagcc aaaatgccat caacaggatc agccctgatg 800
 cctgggagtt ctgccagaag ctcagtgagc tggacctaac tttcaatcac 850
 ttatcaaggt tagatgattc aagcttcctt ggcctaagct tactaaatac 900
 ctgcacattg ggaacaacag agtcagctac attgctgatt gtgccttccg 950
 ggggctttcc agtttaaaga ctttggatct gaagaacaat gaaatttcct 1000
 ggactattga agacatgaat ggtgctttct ctgggcttga caaactgagg 1050
 cgactgatac tccaaggaaa tcggatccgt tctattacta aaaaagcctt 1100
 cactggtttg gatgcattgg agcatctaga cctgagtgac aacgcaatca 1150
 tgtctttaca aggcaatgca ttttcacaaa tgaagaaact gcaacaattg 1200
 catttaaata catcaagcct tttgtgcgat tgccagctaa aatggctccc 1250
 acagtgggtg gcggaaaaca actttcagag ctttgtaaat gccagttgtg 1300
```

cccatcctca gctgctaaaa ggaagaagca tttttgctgt tagcccagat 1350
ggctttgtgt gtgatgattt tcccaaaccc cagatcacgg ttcagccaga 1400
aacacagtcg gcaataaaag gttccaattt gagtttcatc tgctcagctg 1450
ccagcagcag tgattcccca atgacttttg cttggaaaaa agacaatgaa 1500
ctactgcatg atgctgaaat ggaaaattat gcacacctcc gggcccaagg 1550
tggcgaggtg atggagtata ccaccatcct tcggctgcgc gaggtggaat 1600
ttgccagtga ggggaaatat cagtgtgtca tctccaatca ctttggttca 1650
tcctactctg tcaaagccaa gcttacagta aatatgcttc cctcattcac 1700
caagaccccc atggatctca ccatccgagc tggggccatg gcacgcttgg 1750
agtgtgctgc tgtggggcac ccagcccccc agatagcctg gcagaaggat 1800
gggggcacag acttcccagc tgcacgggag agacgcatgc atgtgatgcc 1850
cgaggatgac gtgttcttta tcgtggatgt gaagatagag gacattgggg 1900
tatacagctg cacagctcag aacagtgcag gaagtatttc agcaaatgca 1950
actctgactg tcctagaaac accatcattt ttgcggccac tgttggaccg 2000
aactgtaacc aagggagaaa cagccgtcct acagtgcatt gctggaggaa 2050
gccctccccc taaactgaac tggaccaaag atgatagccc attggtggta 2100
accgagaggc actttttgc agcaggcaat cagcttctga ttattgtgga 2150
ctcagatgtc agtgatgctg ggaaatacac atgtgagatg tctaacaccc 2200
ttggcactga gagaggaaac gtgcgcctca gtgtgatccc cactccaacc 2250
tgcgactccc ctcagatgac agccccatcg ttagacgatg acggatgggc 2300
cactgtgggt gtcgtgatca tagccgtggt ttgctgtgtg gtgggcacgt 2350
cactcgtgtg ggtggtcatc atataccaca caaggcggag gaatgaagat 2400
tgcagcatta ccaacacaga tgagaccaac ttgccagcag atattcctag 2450
ttatttgtca tctcagggaa cgttagctga caggcaggat gggtacgtgt 2500
cttcagaaag tggaagccac caccagtttg tcacatcttc aggtgctgga 2550
tttttcttac cacaacatga cagtagtggg acctgccata ttgacaatag 2600
cagtgaagct gatgtggaag ctgccacaga tctgttcctt tgtccgtttt 2650
tgggatccac aggccctatg tatttgaagg gaaatgtgta tggctcagat 2700
ccttttgaaa catatcatac aggttgcagt cctgacccaa gaacagtttt 2750
aatggaccac atgagcccag ttacataaag aaaaaggagt gctacccatg 2800
ttctcatcct tcagaagaat cctgcgaacg gagcttcagt aatatatcgt 2850
ggccttcaca tgtgaggaag ctacttaaca ctagttactc tcacaatgaa 2900
ggacctggaa tgaaaaatct gtgtctaaac aagtcctctt tagattttag 2950
tgcaaatcca gagccagcgt cggttgcctc gagtaattct ttcatgggta 3000
cctttggaaa agctctcagg agacctcacc tagatgccta ttcaagcttt 3050
ggacagccat cagattgtca gccaagagcc ttttatttga aagctcattc 3100
ttccccagac ttggactctg ggtcagagga agatgggaaa gaaaggacag 3150
attttcagga agaaaatcac atttgtacct taaacagact ttagaaaact 3200
acaggactcc aaattttcag tcttatgact tggacacata gactgaatga 3250
gaccaaagga aaagcttaac atactacctc aagtgaactt ttatttaaaa 3300
gagagagaat cttatgtttt ttaaatggag ttatgaattt taaaaggata 3350
aaaatgcttt atttatacag atgaaccaaa attacaaaaa gttatgaaaa 3400
tttttatact gggaatgatg ctcatataag aatacctttt taaactattt 3450
tttaactttg ttttatgcaa aaaagtatct tacgtaaatt aatgatataa 3500
atcatgatta ttttatgtat ttttataatg ccagatttct ttttatggaa 3550
aatgagttac taaagcattt taaataatac ctgccttgta ccatttttta 3600
aatagaagtt acttcattat attttgcaca ttatatttaa taaaatgtgt 3650
caatttgaa 3659

<210> 10
<211> 1059

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

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

```
                350                 355                 360
Ala Ile Met Ser Leu Gln Gly Asn Ala Phe Ser Gln Met Lys Lys
                365                 370                 375
Leu Gln Gln Leu His Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Cys Asp Cys
                380                 385                 390
Gln Leu Lys Trp Leu Pro Gln Trp Val Ala Glu Asn Asn Phe Gln
                395                 400                 405
Ser Phe Val Asn Ala Ser Cys Ala His Pro Gln Leu Leu Lys Gly
                410                 415                 420
Arg Ser Ile Phe Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Val Cys Asp Asp
                425                 430                 435
Phe Pro Lys Pro Gln Ile Thr Val Gln Pro Glu Thr Gln Ser Ala
                440                 445                 450
Ile Lys Gly Ser Asn Leu Ser Phe Ile Cys Ser Ala Ala Ser Ser
                455                 460                 465
Ser Asp Ser Pro Met Thr Phe Ala Trp Lys Lys Asp Asn Glu Leu
                470                 475                 480
Leu His Asp Ala Glu Met Glu Asn Tyr Ala His Leu Arg Ala Gln
                485                 490                 495
Gly Gly Glu Val Met Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Arg Leu Arg Glu
                500                 505                 510
Val Glu Phe Ala Ser Glu Gly Lys Tyr Gln Cys Val Ile Ser Asn
                515                 520                 525
His Phe Gly Ser Ser Tyr Ser Val Lys Ala Lys Leu Thr Val Asn
                530                 535                 540
Met Leu Pro Ser Phe Thr Lys Thr Pro Met Asp Leu Thr Ile Arg
                545                 550                 555
Ala Gly Ala Met Ala Arg Leu Glu Cys Ala Ala Val Gly His Pro
                560                 565                 570
Ala Pro Gln Ile Ala Trp Gln Lys Asp Gly Gly Thr Asp Phe Pro
                575                 580                 585
Ala Ala Arg Glu Arg Arg Met His Val Met Pro Glu Asp Asp Val
                590                 595                 600
Phe Phe Ile Val Asp Val Lys Ile Glu Asp Ile Gly Val Tyr Ser
                605                 610                 615
Cys Thr Ala Gln Asn Ser Ala Gly Ser Ile Ser Ala Asn Ala Thr
                620                 625                 630
Leu Thr Val Leu Glu Thr Pro Ser Phe Leu Arg Pro Leu Leu Asp
                635                 640                 645
Arg Thr Val Thr Lys Gly Glu Thr Ala Val Leu Gln Cys Ile Ala
                650                 655                 660
Gly Gly Ser Pro Pro Pro Lys Leu Asn Trp Thr Lys Asp Asp Ser
                665                 670                 675
Pro Leu Val Val Thr Glu Arg His Phe Phe Ala Ala Gly Asn Gln
                680                 685                 690
Leu Leu Ile Ile Val Asp Ser Asp Val Ser Asp Ala Gly Lys Tyr
                695                 700                 705
Thr Cys Glu Met Ser Asn Thr Leu Gly Thr Glu Arg Gly Asn Val
                710                 715                 720
Arg Leu Ser Val Ile Pro Thr Pro Thr Cys Asp Ser Pro Gln Met
```

```
                725                 730                 735
 Thr Ala Pro Ser Leu Asp Asp Asp Gly Trp Ala Thr Val Gly Val
                740                 745                 750
 Val Ile Ile Ala Val Val Cys Cys Val Val Gly Thr Ser Leu Val
                755                 760                 765
 Trp Val Val Ile Ile Tyr His Thr Arg Arg Arg Asn Glu Asp Cys
                770                 775                 780
 Ser Ile Thr Asn Thr Asp Glu Thr Asn Leu Pro Ala Asp Ile Pro
                785                 790                 795
 Ser Tyr Leu Ser Ser Gln Gly Thr Leu Ala Asp Arg Gln Asp Gly
                800                 805                 810
 Tyr Val Ser Ser Glu Ser Gly Ser His His Gln Phe Val Thr Ser
                815                 820                 825
 Ser Gly Ala Gly Phe Phe Leu Pro Gln His Asp Ser Ser Gly Thr
                830                 835                 840
 Cys His Ile Asp Asn Ser Ser Glu Ala Asp Val Glu Ala Ala Thr
                845                 850                 855
 Asp Leu Phe Leu Cys Pro Phe Leu Gly Ser Thr Gly Pro Met Tyr
                860                 865                 870
 Leu Lys Gly Asn Val Tyr Gly Ser Asp Pro Phe Glu Thr Tyr His
                875                 880                 885
 Thr Gly Cys Ser Pro Asp Pro Arg Thr Val Leu Met Asp His Tyr
                890                 895                 900
 Glu Pro Ser Tyr Ile Lys Lys Lys Glu Cys Tyr Pro Cys Ser His
                905                 910                 915
 Pro Ser Glu Glu Ser Cys Glu Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ser Trp
                920                 925                 930
 Pro Ser His Val Arg Lys Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Ser His Asn
                935                 940                 945
 Glu Gly Pro Gly Met Lys Asn Leu Cys Leu Asn Lys Ser Ser Leu
                950                 955                 960
 Asp Phe Ser Ala Asn Pro Glu Pro Ala Ser Val Ala Ser Ser Asn
                965                 970                 975
 Ser Phe Met Gly Thr Phe Gly Lys Ala Leu Arg Arg Pro His Leu
                980                 985                 990
 Asp Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Gln Pro Ser Asp Cys Gln Pro Arg
                995                1000                1005
 Ala Phe Tyr Leu Lys Ala His Ser Ser Pro Asp Leu Asp Ser Gly
               1010                1015                1020
 Ser Glu Glu Asp Gly Lys Glu Arg Thr Asp Phe Gln Glu Glu Asn
               1025                1030                1035
 His Ile Cys Thr Phe Lys Gln Thr Leu Glu Asn Tyr Arg Thr Pro
               1040                1045                1050
 Asn Phe Gln Ser Tyr Asp Leu Asp Thr
               1055            1059
<210> 11
<211> 2906
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 11
```

ggggagagga attgaccatg taaaaggaga ctttttttt tggtggtggt 50
ggctgttggg tgccttgcaa aaatgaagga tgcaggacgc agctttctcc 100
tggaaccgaa cgcaatggat aaactgattg tgcaagagag aaggaagaac 150
gaagcttttt cttgtgagcc ctggatctta acacaaatgt gtatatgtgc 200
acacagggag cattcaagaa tgaaataaac cagagttaga cccgcggggg 250
ttggtgtgtt ctgacataaa taaataatct taaagcagct gttcccctcc 300
ccacccccaa aaaaaaggat gattggaaat gaagaaccga ggattcacaa 350
agaaaaaagt atgttcattt ttctctataa aggagaaagt gagccaagga 400
gatatttttg gaatgaaaag tttggggctt ttttagtaaa gtaaagaact 450
ggtgtggtgg tgttttcctt tctttttgaa tttcccacaa gaggagagga 500
aattaataat acatctgcaa agaaatttca gagaagaaaa gttgaccgcg 550
gcagattgag gcattgattg ggggagagaa accagcagag cacagttgga 600
tttgtgccta tgttgactaa aattgacgga taattgcagt tggatttttc 650
ttcatcaacc tccttttttt taaatttta ttccttttgg tatcaagatc 700
atgcgttttc tcttgttctt aaccacctgg atttccatct ggatgttgct 750
gtgatcagtc tgaaatacaa ctgtttgaat tccagaagga ccaacaccag 800
ataaattatg aatgttgaac aagatgacct tacatccaca gcagataatg 850
ataggtccta ggtttaacag ggccctattt gacccccctgc ttgtggtgct 900
gctggctctt caacttcttg tggtggctgg tctggtgcgg gctcagacct 950
gcccttctgt gtgctcctgc agcaaccagt tcagcaaggt gatttgtgtt 1000
cggaaaaacc tgcgtgaggt tccggatggc atctccacca acacacggct 1050
gctgaacctc catgagaacc aaatccagat catcaaagtg aacagcttca 1100
agcacttgag gcacttggaa atcctacagt tgagtaggaa ccatatcaga 1150
accattgaaa ttggggcttt caatggtctg gcgaacctca acactctgga 1200
actctttgac aatcgtctta ctaccatccc gaatggagct tttgtatact 1250
tgtctaaact gaaggagctc tggttgcgaa acaaccccat tgaaagcatc 1300
ccttcttatg cttttaacag aattccttct ttgcgccgac tagacttagg 1350
ggaattgaaa agactttcat acatctcaga aggtgccttt gaaggtctgt 1400
ccaacttgag gtatttgaac cttgccatgt gcaaccttcg ggaaatccct 1450
aacctcacac cgctcataaa actagatgag ctggatcttt ctgggaatca 1500
tttatctgcc atcaggcctg gctctttcca gggtttgatg caccttcaaa 1550
aactgtggat gatacagtcc cagattcaag tgattgaacg gaatgccttt 1600
gacaaccttc agtcactagt ggagatcaac ctggcacaca ataatctaac 1650
attactgcct catgacctct tcactccctt gcatcatcta gagcggatac 1700
atttacatca caacccttgg aactgtaact gtgacatact gtggctcagc 1750
tggtggataa aagacatggc cccctcgaac acagcttgtt gtgcccggtg 1800
taacactcct cccaatctaa aggggaggta cattggagag ctcgaccaga 1850
attacttcac atgctatgct ccggtgattg tggagccccc tgcagacctc 1900
aatgtcactg aaggcatggc agctgagctg aaatgtcggg cctccacatc 1950
cctgacatct gtatcttgga ttactccaaa tggaacagtc atgacacatg 2000
gggcgtacaa agtgcggata gctgtgctca gtgatggtac gttaaatttc 2050
acaaatgtaa ctgtgcaaga tacaggcatg tacacatgta tggtgagtaa 2100
ttccgttggg aatactactg cttcagccac cctgaatgtt actgcagcaa 2150
ccactactcc tttctcttac ttttcaacg tcacagtaga gactatggaa 2200
ccgtctcagg atgaggcacg gaccacagat aacaatgtgg gtcccactcc 2250
agtggtcgac tgggagacca ccaatgtgac cacctctctc acaccacaga 2300
gcacaaggtc gacagagaaa accttcacca tcccagtgac tgatataaac 2350
agtgggatcc caggaattga tgaggtcatg aagactacca aaatcatcat 2400
tgggtgtttt gtggccatca cactcatggc tgcagtgatg ctggtcattt 2450
tctacaagat gaggaagcag caccatcggc aaaaccatca cgccccaaca 2500

aggactgttg aaattattaa tgtggatgat gagattacgg gagacacacc 2550
catggaaagc cacctgccca tgcctgctat cgagcatgag cacctaaatc 2600
actataactc atacaaatct cccttcaacc acacaacaac agttaacaca 2650
ataaattcaa tacacagttc agtgcatgaa ccgttattga tccgaatgaa 2700
ctctaaagac aatgtacaag agactcaaat ctaaaacatt tacagagtta 2750
caaaaaacaa acaatcaaaa aaaaagacag tttattaaaa atgacacaaa 2800
tgactgggct aaatctactg tttcaaaaaa gtgtctttac aaaaaaacaa 2850
aaaagaaaag aaatttattt attaaaaatt ctattgtgat ctaaagcaga 2900
caaaaa 2906

<210> 12
<211> 640
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

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

```
Glu Ile Asn Leu Ala His Asn Asn Leu Thr Leu Leu Pro His Asp
                275                 280                 285
Leu Phe Thr Pro Leu His His Leu Glu Arg Ile His Leu His His
                290                 295                 300
Asn Pro Trp Asn Cys Asn Cys Asp Ile Leu Trp Leu Ser Trp Trp
                305                 310                 315
Ile Lys Asp Met Ala Pro Ser Asn Thr Ala Cys Cys Ala Arg Cys
                320                 325                 330
Asn Thr Pro Pro Asn Leu Lys Gly Arg Tyr Ile Gly Glu Leu Asp
                335                 340                 345
Gln Asn Tyr Phe Thr Cys Tyr Ala Pro Val Ile Val Glu Pro Pro
                350                 355                 360
Ala Asp Leu Asn Val Thr Glu Gly Met Ala Ala Glu Leu Lys Cys
                365                 370                 375
Arg Ala Ser Thr Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Ile Thr Pro Asn
                380                 385                 390
Gly Thr Val Met Thr His Gly Ala Tyr Lys Val Arg Ile Ala Val
                395                 400                 405
Leu Ser Asp Gly Thr Leu Asn Phe Thr Asn Val Thr Val Gln Asp
                410                 415                 420
Thr Gly Met Tyr Thr Cys Met Val Ser Asn Ser Val Gly Asn Thr
                425                 430                 435
Thr Ala Ser Ala Thr Leu Asn Val Thr Ala Ala Thr Thr Thr Pro
                440                 445                 450
Phe Ser Tyr Phe Ser Thr Val Thr Val Glu Thr Met Glu Pro Ser
                455                 460                 465
Gln Asp Glu Ala Arg Thr Thr Asp Asn Asn Val Gly Pro Thr Pro
                470                 475                 480
Val Val Asp Trp Glu Thr Thr Asn Val Thr Thr Ser Leu Thr Pro
                485                 490                 495
Gln Ser Thr Arg Ser Thr Glu Lys Thr Phe Thr Ile Pro Val Thr
                500                 505                 510
Asp Ile Asn Ser Gly Ile Pro Gly Ile Asp Glu Val Met Lys Thr
                515                 520                 525
Thr Lys Ile Ile Ile Gly Cys Phe Val Ala Ile Thr Leu Met Ala
                530                 535                 540
Ala Val Met Leu Val Ile Phe Tyr Lys Met Arg Lys Gln His His
                545                 550                 555
Arg Gln Asn His His Ala Pro Thr Arg Thr Val Glu Ile Ile Asn
                560                 565                 570
Val Asp Asp Glu Ile Thr Gly Asp Thr Pro Met Glu Ser His Leu
                575                 580                 585
Pro Met Pro Ala Ile Glu His Glu His Leu Asn His Tyr Asn Ser
                590                 595                 600
Tyr Lys Ser Pro Phe Asn His Thr Thr Thr Val Asn Thr Ile Asn
                605                 610                 615
Ser Ile His Ser Ser Val His Glu Pro Leu Leu Ile Arg Met Asn
                620                 625                 630
Ser Lys Asp Asn Val Gln Glu Thr Gln Ile
                635                 640
```

<210> 13
<211> 4051
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
agccgacgct gctcaagctg caactctgtt gcagttggca gttcttttcg 50
gtttccctcc tgctgtttgg gggcatgaaa gggcttcgcc gccgggagta 100
aaagaaggaa ttgaccgggc agcgcgaggg aggagcgcgc acgcgaccgc 150
gagggcgggc gtgcaccctc ggctggaagt ttgtgccggg ccccgagcgc 200
gcgccggctg ggagcttcgg gtagagacct aggccgctgg accgcgatga 250
gcgcgccgag cctccgtgcg cgcgccgcgg ggttggggct gctgctgtgc 300
gcggtgctgg ggcgcgctgg ccggtccgac agcggcggtc gcggggaact 350
cgggcagccc tctggggtag ccgccgagcg cccatgcccc actacctgcc 400
gctgcctcgg ggacctgctg gactgcagtc gtaagcggct agcgcgtctt 450
cccgagccac tcccgtcctg ggtcgctcgg ctggacttaa gtcacaacag 500
attatctttc atcaaggcaa gttccatgag ccaccttcaa agccttcgag 550
aagtgaaact gaacaacaat gaattggaga ccattccaaa tctgggacca 600
gtctcggcaa atattacact tctctccttg gctggaaaca ggattgttga 650
aatactccct gaacatctga aagagtttca gtcccttgaa actttggacc 700
ttagcagcaa caatatttca gagctccaaa ctgcatttcc agccctacag 750
ctcaaatatc tgtatctcaa cagcaaccga gtcacatcaa tggaacctgg 800
gtattttgac aatttggcca acacactcct tgtgttaaag ctgaacagga 850
accgaatctc agctatccca cccaagatgt ttaaactgcc ccaactgcaa 900
catctcgaat tgaaccgaaa caagattaaa aatgtagatg gactgacatt 950
ccaaggcctt ggtgctctga agtctctgaa aatgcaaaga aatggagtaa 1000
cgaaacttat ggatggagct ttttgggggc tgagcaacat ggaaattttg 1050
cagctggacc ataacaacct aacagagatt accaaaggct ggctttacgg 1100
cttgctgatg ctgcaggaac ttcatctcag ccaaaatgcc atcaacagga 1150
tcagccctga tgcctgggag ttctgccaga agctcagtga gctggaccta 1200
actttcaatc acttatcaag gttagatgat tcaagcttcc ttggcctaag 1250
cttactaaat acactgcaca ttgggaacaa cagagtcagc tacattgctg 1300
attgtgcctt ccgggggctt tccagtttaa agactttgga tctgaagaac 1350
aatgaaattt cctggactat tgaagacatg aatggtgctt tctctgggct 1400
tgacaaactg aggcgactga tactccaagg aaatcggatc cgttctatta 1450
ctaaaaaagc cttcactggt ttggatgcat tggagcatct agacctgagt 1500
acaacgcaat catgtcttta caaggcaatg cattttcaca aatgaagaaa 1550
ctgcaacaat tgcatttaaa tacatcaagc cttttgtgcg attgccagct 1600
aaaatggctc ccacagtggg tggcggaaaa caactttcag agctttgtaa 1650
atgccagttg tgcccatcct cagctgctaa aaggaagaag cattttgct 1700
gttagcccag atggctttgt gtgtgatgat tttcccaaac cccagatcac 1750
ggttcagcca gaaacacagt cggcaataaa aggttccaat ttgagtttca 1800
tctgctcagc tgccagcagc agtgattccc caatgacttt tgcttggaaa 1850
aaagacaatg aactactgca tgatgctgaa atggaaaatt atgcacacct 1900
ccgggcccaa ggtggcgagg tgatggagta taccaccatc cttcggctgc 1950
gcgaggtgga atttgccagt gaggggaaat atcagtgtgt catctccaat 2000
cactttggtt catcctactc tgtcaaagcc aagcttacag taaatatgct 2050
tccctcattc accaagaccc ccatggatct caccatccga gctggggcca 2100
tggcacgctt ggagtgtgct gctgtggggc acccagcccc ccagatagcc 2150
tggcagaagg atgggggcac agacttccca gctgcacggg agagacgcat 2200
gcatgtgatg cccgaggatg acgtgttctt tatcgtggat gtgaagatag 2250

aggacattgg ggtatacagc tgcacagctc agaacagtgc aggaagtatt 2300
tcagcaaatg caactctgac tgtcctagaa acaccatcat ttttgcggcc 2350
actgttggac cgaactgtaa ccaagggaga aacagccgtc ctacagtgca 2400
ttgctggagg aagccctccc cctaaactga actggaccaa agatgatagc 2450
ccattggtgg taaccgagag gcacttttt gcagcaggca atcagcttct 2500
gattattgtg gactcagatg tcagtgatgc tgggaaatac acatgtgaga 2550
tgtctaacac ccttggcact gagagaggaa acgtgcgcct cagtgtgatc 2600
cccactccaa cctgcgactc ccctcagatg acagccccat cgttagacga 2650
tgacggatgg gccactgtgg gtgtcgtgat catagccgtg gtttgctgtg 2700
tggtgggcac gtcactcgtg tgggtggtca tcatatacca cacaaggcgg 2750
aggaatgaag attgcagcat taccaacaca gatgagacca acttgccagc 2800
agatattcct agttatttgt catctcaggg aacgttagct gacaggcagg 2850
atgggtacgt gtcttcagaa agtggaagcc accaccagtt tgtcacatct 2900
tcaggtgctg gatttttctt accacaacat gacagtagtg ggacctgcca 2950
tattgacaat agcagtgaag ctgatgtgga agctgccaca gatctgttcc 3000
ttgtccgttt ttgggatcca caggccctat gtatttgaag ggaaatgtgt 3050
atggctcaga tccttttgaa acatatcata caggttgcag tcctgaccca 3100
agaacagttt taatggacca ctatgagccc agttacataa agaaaaagga 3150
gtgctaccca tgttctcatc cttcagaaga atcctgcgaa cggagcttca 3200
gtaatatatc gtggccttca catgtgagga agctacttaa cactagttac 3250
tctcacaatg aaggacctgg aatgaaaaat ctgtgtctaa acaagtcctc 3300
tttagatttt agtgcaaatc cagagccagc gtcggttgcc tcgagtaatt 3350
ctttcatggg taccttgga aaagctctca ggagacctca cctagatgcc 3400
tattcaagct ttggacagcc atcagattgt cagccaagag ccttttattt 3450
gaaagctcat tcttccccag acttggactc tgggtcagag gaagatggga 3500
aagaaaggac agattttcag gaagaaaatc acatttgtac ctttaaacag 3550
actttagaaa actacaggac tccaaatttt cagtcttatg acttggacac 3600
atagactgaa tgagaccaaa ggaaaagctt aacatactac ctcaagtgaa 3650
cttttattta aaagagagag aatcttatgt tttttaaatg gagttatgaa 3700
ttttaaaagg ataaaaatgc tttatttata cagatgaacc aaaattacaa 3750
aaagttatga aaatttttat actgggaatg atgctcatat aagaatacct 3800
ttttaaacta ttttttaact ttgttttatg caaaaaagta tcttacgtaa 3850
attaatgata taaatcatga ttattttatg tatttttata atgccagatt 3900
tctttttatg gaaaatgagt tactaaagca ttttaaataa tacctgcctt 3950
gtaccatttt ttaaatagaa gttacttcat tatattttgc acattatatt 4000
taataaaatg tgtcaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4050
a 4051

<210> 14
<211> 1119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Met Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Arg Ala Ala Gly Leu Gly Leu
1 5 10 15
Leu Leu Cys Ala Val Leu Gly Arg Ala Gly Arg Ser Asp Ser Gly
20 25 30
Gly Arg Gly Glu Leu Gly Gln Pro Ser Gly Val Ala Ala Glu Arg
35 40 45
Pro Cys Pro Thr Thr Cys Arg Cys Leu Gly Asp Leu Leu Asp Cys
50 55 60

```
Ser Arg Lys Arg Leu Ala Arg Leu Pro Glu Pro Leu Pro Ser Trp
                 65                  70                  75
Val Ala Arg Leu Asp Leu Ser His Asn Arg Leu Ser Phe Ile Lys
                 80                  85                  90
Ala Ser Ser Met Ser His Leu Gln Ser Leu Arg Glu Val Lys Leu
                 95                 100                 105
Asn Asn Asn Glu Leu Glu Thr Ile Pro Asn Leu Gly Pro Val Ser
                110                 115                 120
Ala Asn Ile Thr Leu Leu Ser Leu Ala Gly Asn Arg Ile Val Glu
                125                 130                 135
Ile Leu Pro Glu His Leu Lys Glu Phe Gln Ser Leu Glu Thr Leu
                140                 145                 150
Asp Leu Ser Ser Asn Asn Ile Ser Glu Leu Gln Thr Ala Phe Pro
                155                 160                 165
Ala Leu Gln Leu Lys Tyr Leu Tyr Leu Asn Ser Asn Arg Val Thr
                170                 175                 180
Ser Met Glu Pro Gly Tyr Phe Asp Asn Leu Ala Asn Thr Leu Leu
                185                 190                 195
Val Leu Lys Leu Asn Arg Asn Arg Ile Ser Ala Ile Pro Pro Lys
                200                 205                 210
Met Phe Lys Leu Pro Gln Leu Gln His Leu Glu Leu Asn Arg Asn
                215                 220                 225
Lys Ile Lys Asn Val Asp Gly Leu Thr Phe Gln Gly Leu Gly Ala
                230                 235                 240
Leu Lys Ser Leu Lys Met Gln Arg Asn Gly Val Thr Lys Leu Met
                245                 250                 255
Asp Gly Ala Phe Trp Gly Leu Ser Asn Met Glu Ile Leu Gln Leu
                260                 265                 270
Asp His Asn Asn Leu Thr Glu Ile Thr Lys Gly Trp Leu Tyr Gly
                275                 280                 285
Leu Leu Met Leu Gln Glu Leu His Leu Ser Gln Asn Ala Ile Asn
                290                 295                 300
Arg Ile Ser Pro Asp Ala Trp Glu Phe Cys Gln Lys Leu Ser Glu
                305                 310                 315
Leu Asp Leu Thr Phe Asn His Leu Ser Arg Leu Asp Asp Ser Ser
                320                 325                 330
Phe Leu Gly Leu Ser Leu Leu Asn Thr Leu His Ile Gly Asn Asn
                335                 340                 345
Arg Val Ser Tyr Ile Ala Asp Cys Ala Phe Arg Gly Leu Ser Ser
                350                 355                 360
Leu Lys Thr Leu Asp Leu Lys Asn Asn Glu Ile Ser Trp Thr Ile
                365                 370                 375
Glu Asp Met Asn Gly Ala Phe Ser Gly Leu Asp Lys Leu Arg Arg
                380                 385                 390
Leu Ile Leu Gln Gly Asn Arg Ile Arg Ser Ile Thr Lys Lys Ala
                395                 400                 405
Phe Thr Gly Leu Asp Ala Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Asp Asn
                410                 415                 420
Ala Ile Met Ser Leu Gln Gly Asn Ala Phe Ser Gln Met Lys Lys
                425                 430                 435
```

```
Leu Gln Gln Leu His Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Cys Asp Cys
                440                 445                 450
Gln Leu Lys Trp Leu Pro Gln Trp Val Ala Glu Asn Asn Phe Gln
                455                 460                 465
Ser Phe Val Asn Ala Ser Cys Ala His Pro Gln Leu Leu Lys Gly
                470                 475                 480
Arg Ser Ile Phe Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Val Cys Asp Asp
                485                 490                 495
Phe Pro Lys Pro Gln Ile Thr Val Gln Pro Glu Thr Gln Ser Ala
                500                 505                 510
Ile Lys Gly Ser Asn Leu Ser Phe Ile Cys Ser Ala Ala Ser Ser
                515                 520                 525
Ser Asp Ser Pro Met Thr Phe Ala Trp Lys Lys Asp Asn Glu Leu
                530                 535                 540
Leu His Asp Ala Glu Met Glu Asn Tyr Ala His Leu Arg Ala Gln
                545                 550                 555
Gly Gly Glu Val Met Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Arg Leu Arg Glu
                560                 565                 570
Val Glu Phe Ala Ser Glu Gly Lys Tyr Gln Cys Val Ile Ser Asn
                575                 580                 585
His Phe Gly Ser Ser Tyr Ser Val Lys Ala Lys Leu Thr Val Asn
                590                 595                 600
Met Leu Pro Ser Phe Thr Lys Thr Pro Met Asp Leu Thr Ile Arg
                605                 610                 615
Ala Gly Ala Met Ala Arg Leu Glu Cys Ala Ala Val Gly His Pro
                620                 625                 630
Ala Pro Gln Ile Ala Trp Gln Lys Asp Gly Gly Thr Asp Phe Pro
                635                 640                 645
Ala Ala Arg Glu Arg Arg Met His Val Met Pro Glu Asp Asp Val
                650                 655                 660
Phe Phe Ile Val Asp Val Lys Ile Glu Asp Ile Gly Val Tyr Ser
                665                 670                 675
Cys Thr Ala Gln Asn Ser Ala Gly Ser Ile Ser Ala Asn Ala Thr
                680                 685                 690
Leu Thr Val Leu Glu Thr Pro Ser Phe Leu Arg Pro Leu Leu Asp
                695                 700                 705
Arg Thr Val Thr Lys Gly Glu Thr Ala Val Leu Gln Cys Ile Ala
                710                 715                 720
Gly Gly Ser Pro Pro Pro Lys Leu Asn Trp Thr Lys Asp Asp Ser
                725                 730                 735
Pro Leu Val Val Thr Glu Arg His Phe Phe Ala Ala Gly Asn Gln
                740                 745                 750
Leu Leu Ile Ile Val Asp Ser Asp Val Ser Asp Ala Gly Lys Tyr
                755                 760                 765
Thr Cys Glu Met Ser Asn Thr Leu Gly Thr Glu Arg Gly Asn Val
                770                 775                 780
Arg Leu Ser Val Ile Pro Thr Pro Thr Cys Asp Ser Pro Gln Met
                785                 790                 795
Thr Ala Pro Ser Leu Asp Asp Asp Gly Trp Ala Thr Val Gly Val
                800                 805                 810
```

```
 Val Ile Ile Ala Val Val Cys Cys Val Val Gly Thr Ser Leu Val
                 815                 820                 825
 Trp Val Val Ile Ile Tyr His Thr Arg Arg Arg Asn Glu Asp Cys
                 830                 835                 840
 Ser Ile Thr Asn Thr Asp Glu Thr Asn Leu Pro Ala Asp Ile Pro
                 845                 850                 855
 Ser Tyr Leu Ser Ser Gln Gly Thr Leu Ala Asp Arg Gln Asp Gly
                 860                 865                 870
 Tyr Val Ser Ser Glu Ser Gly Ser His His Gln Phe Val Thr Ser
                 875                 880                 885
 Ser Gly Ala Gly Phe Phe Leu Pro Gln His Asp Ser Ser Gly Thr
                 890                 895                 900
 Cys His Ile Asp Asn Ser Ser Glu Ala Asp Val Glu Ala Ala Thr
                 905                 910                 915
 Asp Leu Phe Leu Cys Pro Phe Leu Gly Ser Thr Gly Pro Met Tyr
                 920                 925                 930
 Leu Lys Gly Asn Val Tyr Gly Ser Asp Pro Phe Glu Thr Tyr His
                 935                 940                 945
 Thr Gly Cys Ser Pro Asp Pro Arg Thr Val Leu Met Asp His Tyr
                 950                 955                 960
 Glu Pro Ser Tyr Ile Lys Lys Lys Glu Cys Tyr Pro Cys Ser His
                 965                 970                 975
 Pro Ser Glu Glu Ser Cys Glu Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ser Trp
                 980                 985                 990
 Pro Ser His Val Arg Lys Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Ser His Asn
                 995                1000                1005
 Glu Gly Pro Gly Met Lys Asn Leu Cys Leu Asn Lys Ser Ser Leu
                1010                1015                1020
 Asp Phe Ser Ala Asn Pro Glu Pro Ala Ser Val Ala Ser Ser Asn
                1025                1030                1035
 Ser Phe Met Gly Thr Phe Gly Lys Ala Leu Arg Arg Pro His Leu
                1040                1045                1050
 Asp Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Gln Pro Ser Asp Cys Gln Pro Arg
                1055                1060                1065
 Ala Phe Tyr Leu Lys Ala His Ser Ser Pro Asp Leu Asp Ser Gly
                1070                1075                1080
 Ser Glu Gl Asp Gly Lys Glu Arg Thr Asp Phe Gln Glu Glu Asn
                1085                1090                1095
 His Ile Cys Thr Phe Lys Gln Thr Leu Glu Asn Tyr Arg Thr Pro
                1100                1105                1110
 Asn Phe Gln Ser Tyr Asp Leu Asp Thr
                1115            1119
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA30954
<400> 15
 atcgttgtga agttagtgcc cc 22
```

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR primer DNA30954
<400> 16
acctgcgata tccaacagaa ttg 23
<210> 17
<211> 48
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> hybridization probe DNA30954
<400> 17
ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttcc 48
<210> 18
<211> 46
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> hybridization probe DNA 33094
<400> 18
gggtacacct gctcctgcac cgacggatat tggcttctgg aaggcc 46
<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA33094
<400> 19
acagattccc accagtgcaa cc 22
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR primer DNA33094
<400> 20
cacactcgtt cacatcttgg c 21
<210> 21
<211> 45
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> hybridization probe DNA33094
<400> 21
agggagcacg gacagtgtgc agatgtggac gagtgctcac tagca 45
<210> 22
<211> 21

<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA33094
<400> 22
agagtgtatc tctggctacg c 21
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR primer DNA33094
<400> 23
taagtccggc acattacagg tc 22
<210> 24
<211> 49
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> hybridization probe DNA33094
<400> 24
cccacgatgt atgaatggtg gactttgtgt gactcctggt ttctgcatc 49
<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA33094
<400> 25
aaagacgcat ctgcgagtgt cc 22
<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR primer DNA33094
<400> 26
tgctgatttc acactgctct ccc 23
<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA40628
<400> 27
tcgcggagct gtgttctgtt tccc 24
<210> 28
<211> 50
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> hybridization probe DNA40628
<400> 28
tgatcgcgat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct 50
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning oligo DNA40628
<400> 29
acacctggtt caaagatggg 20
<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning oligo DNA40628
<400> 30
taggaagagt tgctgaaggc acgg 24
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR oligo DNA40628
<400> 31
ttgccttact caggtgctac 20
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR oligo DNA40628
<400> 32
actcagcagt ggtaggaaag 20
<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> forward cloning PCR primer DNA37150
<400> 33
gttggatctg ggcaacaata ac 22
<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> reverse cloning PCR primer DNA37150

<400> 34
attgttgtgc aggctgagtt taag 24
<210> 35
<211> 45
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> hybridization probe, DNA37150
<400> 35
ggtggctata catggatagc aattacctgg acacgctgtc ccggg 45
<210> 36
<211> 50
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> in situ oligo DNA35638
<400> 36
ggattctaat acgactcact atagggctgc ggcggctcag gtcttcagtt 50
<210> 37
<211> 50
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> in situ oligo DNA35638
<400> 37
ctatgaaatt aaccctcact aaagggagca tgggatgggg agggatacgg 50
<210> 38
<211> 48
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> in situ oligo DNA33094
<400> 38
ctatgaaatt aaccctcact aaagggaata gcaggccatc ccaggaca 48
<210> 39
<211> 47
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> in situ oligo DNA33094
<400> 39
ctatgaaatt aaccctcact aaagggatgt cttccatgcc aaccttc 47
1