

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷ (11) 공개번호 10-2005-0106459
C12N 15/00 (43) 공개일자 2005년11월09일

(21) 출원번호 10-2005-7015947
(22) 출원일자 2005년08월26일
 번역문 제출일자 2005년08월26일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/002402 (87) 국제공개번호 WO 2004/076658
 국제출원일자 2004년02월27일 국제공개일자 2004년09월10일

(30) 우선권주장 JP-P-2003-00054670 2003년02월28일 일본(JP)
 JP-P-2003-00194643 2003년07월09일 일본(JP)

(71) 출원인 미쯔비시 웰 파마 가부시키키가이샤
일본국 오오사카후 오오사카시 츄우오오구 히라노마치 2쵸오메 6반 9고오
각고호우징 게이오기주크
일본국 도쿄토 미나토쿠 미타 2쵸메 15-45

(72) 발명자 호소카와, 사이코
일본 103-8405 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2쵸메 2-6 미쯔비시웰 파
마 가부시키키가이샤 도쿄 오피스나이
아오키, 마사히코
일본 160-8582 도쿄도 신주쿠쿠 신아노마치 35반치 게이오기주크다이
가쿠 이가쿠부나이
히라카와, 요코
일본 103-8405 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2쵸메 2-6 미쯔비시웰 파
마 가부시키키가이샤 도쿄 오피스나이
이타미, 세이마
일본 103-8405 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2쵸메 2-6 미쯔비시웰 파
마 가부시키키가이샤 도쿄 오피스나이
우메키, 히로에
일본 103-8405 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2쵸메 2-6 미쯔비시웰 파
마 가부시키키가이샤 도쿄 오피스나이
사이카와, 요시로
일본 160-8582 도쿄도 신주쿠쿠 신아노마치 35반치 게이오기주크다이
가쿠 이가쿠부나이
구마이, 고이치로
일본 160-8582 도쿄도 신주쿠쿠 신아노마치 35반치 게이오기주크다이
가쿠 이가쿠부나이
후쿠다, 가즈마사
일본 160-8582 도쿄도 신주쿠쿠 신아노마치 35반치 게이오기주크다이
가쿠 이가쿠부나이

(74) 대리인 주성민
 위혜숙

심사청구 : 없음

(54) 단일클론 항체, 이를 코딩하는 유전자, 하이브리도마, 의약조성물 및 진단 시약

요약

본 발명은 암 환자의 암 조직 유래의 림프구와 마우스 골수종 세포를 융합시켜 하이브리도마를 제조하고, 비-소세포(non-small cell) 폐암, 췌장암, 위암 등의 암세포를 특이적으로 인식하는 신규한 인간 단일클론 항체를 생산하는 것에 관한 것이다. 상기 항체를 단독으로, 또는 독소나 항암제를 내포하는 리포솜의 표면에 담지하여 사용함으로써 암 치료약을 얻는다. 보다 구체적으로는 중쇄 가변 영역이 서열 115의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체를 단독으로, 또는 독소나 항암제를 내포하는 리포솜의 표면에 담지하여 사용함으로써 암 치료약을 얻는다.

대표도

도 2

색인어

비-소세포 폐암, 췌장암, 위암, 인간 단일클론 항체, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 하이브리도마

명세서

기술분야

본 발명은 암의 치료 및 진단에 사용할 수 있는 신규한 단일클론 항체, 이 항체를 코딩하는 DNA, 이 항체를 생산하는 하이브리도마, 및 이 항체를 포함하는 의약 조성물 및 진단 시약에 관한 것이다.

배경기술

암의 치료 분야에서는 충분한 효과를 나타내는 치료약이 없는 고형암에 대하여 특정한 암세포를 표적으로 한 표적화 요법의 연구가 종래부터 이루어져 왔다. 이러한 표적화에는 암세포를 특이적으로 인식하는 단일클론 항체가 유효하지만, 마우스 단일클론 항체를 이용하면 면역 반응에 기인하는 아나필락시스(anaphylaxis) 등의 부작용으로부터 연속 투여가 어렵다는 등의 문제점이 있었다 (문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 86, p4220, 1989]).

이러한 문제점을 해결하기 위해서 부작용이 적은 단일클론 항체의 취득이 시도되어 왔다. 유전자 재조합에 의해 항체의 정상 영역을 인간 유래의 것으로 하는 키메라 항체 제조 기술이나 초가변 영역 이외의 영역을 인간 유래의 것으로 하는 인간화 항체 제조 기술 등이 있지만, 부작용 감소의 관점에서는 완전한 인간 단일클론 항체가 보다 바람직하다고 여겨져 왔다. 이러한 완전한 인간 단일클론 항체를 얻는 방법으로서 인간 유래의 림프구를 이용한 하이브리도마법 (문헌[Cancer Res. vol. 45, p263, 1985])가 있지만, 완전한 인간 단일클론 항체의 제조는 마우스 단일클론 항체의 제조법에 비하여 목적으로 하는 항체를 생산하는 인간 B 세포를 효율적으로 얻기 위한 능동적 면역법이 곤란하다는 것, 항체 생산 세포를 무한 증식시키는 효율적인 방법이 확립되어 있지 않은 것 등의 이유로 종양 세포에 충분하게 반응하는 인간 단일클론 항체를 취득하였다는 보고는 극히 조금밖에 존재하지 않으며 (특히 제3236667호 공보), 여전히 곤란한 상황에 있다.

이러한 상황하에 있어서도, 느리기는 하지만, 인간화 항체 기술 등을 이용하여 단독으로 또는 항암제와의 병용에 의해서 특정한 암세포에 대하여 살상 효과나 증식 억제 효과를 갖는 단일클론 항체의 개발이 이루어져 오고 있고, 최근에는 항 Her2 인간화 항체 (하세프틴)의 유방암으로의 적용 (문헌[Oncology vol. 63 Suppl 1, pp25-32, 2002]), 항EGF 수용체 항체 (문헌[Semin Oncol. vol. 29, No.5 Suppl 14, pp18-30, 2002])나 항VEGF (혈관 내피 증식 인자) 항체 (문헌[Semin Oncol. vol. 29, No. 6 Suppl 16, pp10-14, 2002]) 등을 이용한 임상적 시험이 진행되고 있다. 그러나, 많은 환자들이 앓고 있는 비-소세포(non-small cell) 폐암이나 특히 난치성의 암종인 췌장암 등에 대하여 특이적인 표적화 요법에 이용할 수 있는 항체는 아직 존재하지 않고, 이러한 암종에 대응하기 위해서, 부작용이 적고, 암 조직에의 특이성이 높은 단일클론 항체의 취득이 요망되고 있다.

비멘틴 (vimentin)은 간엽계 세포 내지 비상피 세포의 세포 골격의 필라멘트 단백질로서, 세포 자극에 의해 그 유전자 발현이 상승하는 것이 알려져 있다 (문헌[Mol Cell Biol. 1987, vol. 7, No. 11, p3908-15]). 또한, 통상의 상피 세포에서는 발현이 확인되지 않는데 대하여 폐 선암종, 위암, 자궁내막암 또는 배아 암종 등의 일부 저분화 종양 세포의 세포질 내에서는 그 발현 경향이 높다는 것이 알려져 있다 (문헌[Mol Cell Biol. 1987, vol. 7, No. 11, p3908-15]). 그러나 비멘틴 자신이 항원 단백질로서 기능하는 등의 현상은 알려져 있지 않았다.

발명의 개시

본 발명의 과제는 암, 특히 비-소세포 폐암, 췌장암, 위암의 진단 및 치료에 유용하고, 부작용이 적은 단일클론 항체를 제공하는 것이다.

본 발명자들은 암 조직에 대한 표적화 요법에 이용하기 위한 단일클론 항체를 제공하고자 예의 검토한 결과, HLC-1, PANC-1 및 MKN 45 등의 암세포를 특이적으로 인식하는 신규한 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 제조하고, 본 항체를 이용함으로써 표적화 요법에 유용한 암 치료약이 얻어진다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

즉, 본 발명은 이하와 같다.

- (1) 중쇄 가변 영역에 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (2) 상기 (1)에 있어서, 중쇄 가변 영역에 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (3) 상기 (1)에 있어서, 중쇄 가변 영역에 서열 115의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (4) 경쇄 가변 영역에 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (5) 상기 (4)에 있어서, 경쇄 가변 영역에 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (6) 상기 (4)에 있어서, 경쇄 가변 영역에 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (7) 중쇄 가변 영역이 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (8) 상기 (7)에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 82의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (9) 상기 (7)에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 115의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.
- (10) 상기 (1) 내지 (9) 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체인 단일클론 항체.
- (11) 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항의 단일클론 항체를 코딩하는 DNA.
- (12) 상기 (11)에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 85, 87 및 89의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 91, 93 및 95의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.
- (13) 상기 (11) 또는 (12)에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 81의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 83의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.
- (14) 상기 (11) 또는 (12)에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 114의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 116의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.
- (15) 상기 (11) 내지 (14) 중 어느 하나의 DNA를 포함하는 재조합 벡터.

(16) 상기 (15)의 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체.

(17) 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항의 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마.

(18) 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항의 단일클론 항체를 포함하는 의약 조성물.

(19) 상기 (18)에 있어서, 암 치료약인 의약 조성물.

(20) 상기 (19)에 있어서, 암 치료약이, 비-소세포 폐암, 췌장암 및 위암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 암에 대한 암 치료약인 의약 조성물.

(21) 상기 (18) 내지 (20) 중 어느 한 항에 있어서, 단일클론 항체를, 독소 또는 항암제를 내포하는 리포솜의 표면에 담지시킨 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

(22) 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 하나에 따른 단일클론 항체를 포함하는 진단 시약.

(23) (a) 세포 골격의 필라멘트에 반응성을 갖는 성질 및(또는)

(b) 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 성질을 갖는 폴리펩티드.

(24) (a) 서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질을 특이적으로 인식하는 성질 및(또는)

(b) 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 성질을 갖는 폴리펩티드.

(25) 상기 (24)에 있어서, 약 55 kDa의 단백질이 비멘틴인 폴리펩티드.

(26) 상기 (23) 내지 (25) 중 어느 한 항에 있어서, 형태 변화가, 축색(軸索)상의 형태, 섬유 아세포-유사 형태 및 신경 돌기를 갖는 신경 세포-유사 형태로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 형태의 형태 변화인 폴리펩티드.

(27) 상기 (23) 내지 (26) 중 어느 하나에 있어서, 상기 (1) 내지 (10) 중 어느 한 항의 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

(28) 상기 (23) 내지 (26) 중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물.

도면의 간단한 설명

도 1은 HoAKs-1 항체를 배양 암세포주에 작용시켰을 때의 각 세포의 형태 변화를 나타낸 도면 (사진)이다.

도 2는 HoAKs-1 항체의 배양 암세포주 HLC-1, MKN 45 및 HUVECs에 대한 증식억제 효과를 나타내는 그래프 도면이다.

도 3은 HoAKs-1 항체의 췌장암 세포주 PANC-1에 대한 증식 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 HoAKs-1 항체의 각종 조직 세그먼트에 대한 반응성을 나타낸 도면 (사진)이다.

도 5는 HoAKs-1 항체가 반응하는 항원 단백질에 대한 분석 결과를 나타낸 도면 (사진)이다.

도 6은 배양 암세포주에 HoAKs-1 항체를 일정 기간 작용시켜, 그 후 항체를 제거하였을 때의 각 세포의 형태 변화를 나타낸 도면 (사진)이다.

도 7은 HoAKs-1 항체의 각각의 생 암세포 표면에 대한 결합 활성을 나타낸 도면이다.

도 8은 항 55 kDa 마우스 단일클론 항체의 각각의 생 암세포 표면에서의 결합 활성을 나타낸 도면 (사진)이다.

도 9는 γ -HoA. 항체의 각각의 생 암세포 표면에 대한 결합 활성을 나타낸 도면 (사진)이다.

발명의 상세한 설명

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<1> 본 발명의 단일클론 항체

본 발명의 단일클론 항체는 도 5에 나타내는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 (ATCC No. CRL 1469) 유래의 약 55 kDa의 항원 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체이다. 또한, 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 단일클론 항체이다. 또한, 도 5에 나타내는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식하고, 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 단일클론 항체이다. 상기 약 55 kDa의 항원 단백질로서는 비멘틴을 예시할 수 있다. 또한, 형태 변화란, 예를 들면 도 1의 B 및 D에 나타낸 바와 같은 축색상의 형태, 섬유 아세포-유사 형태, 및 신경 돌기를 갖는 신경 세포-유사 형태로의 정상 세포의 형태 변화를 들 수 있다.

본 발명의 단일클론 항체로서 구체적으로는 중쇄 가변 영역에 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역에 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 포함하는 것을 들 수 있다. 여기서, 서열 88의 아미노산 서열에 있어서, 10 번째의 아미노산은 Cys일 수도 Tyr일 수도 있다. 즉, 중쇄 가변 영역으로서는 10 Cys의 것과 10 Tyr의 것의 2 종류를 들 수 있다. 또한 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 항원 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식한다는 상기한 특이성을 갖는 한, 본 발명의 항체는, 상기 6 종류의 서열 중 하나 또는 복수에 있어서, 1개 또는 여러개의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가가 있을 수도 있다. 여기서, 여러개란 바람직하게는 2 내지 5 개, 보다 바람직하게는 2개 또는 3개, 특히 바람직하게는 2개를 의미한다.

상기 6 종류의 서열은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 중에서 『초가변 영역』이라 불리는 영역의 서열이다. 항체는 중쇄와 경쇄를 포함하고, 또한 각각의 쇠는 정상 영역과 가변 영역을 포함한다. 가변 영역에는 또한 초가변 영역이 존재하고, 이러한 영역이 면역 글로불린의 항체로서의 특이성, 항원 결정기와 항체의 결합 친화성을 결정하고 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 초가변 영역에 상기 각각의 서열을 포함하는 것이지만, 이러한 초가변 영역 이외의 영역은 다른 항체 유래의 것일 수도 있다. 여기서, 다른 항체란 인간 이외의 생물 유래의 항체도 포함하지만 부작용 감소의 관점에서는 인간 유래의 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서 특히 바람직한 단일클론 항체로서는, 중쇄 가변 영역에 서열 82의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역에 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 항체, 또는 중쇄 가변 영역에 서열 115의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역에 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 항체를 들 수 있다. 여기서, 서열 82 또는 115의 서열에 있어서, 14 번째와 51 번째의 아미노산의 조합은 (Cys, Tyr) 또는 (Tyr, Cys)의 어느 하나일 수도 있다. 즉, 중쇄 가변 영역의 서열로서 14 Cys, 51 Tyr의 것과 14 Tyr, 51 Cys의 사물의 2 종류를 들 수 있다. 또한, 서열 84 또는 117의 서열에 있어서, 13 번째의 아미노산은 Val일 수도 Ile일 수도 있다. 즉, 경쇄 가변 영역의 서열로서 13 Val의 것과 13 Ile의 것 2 종류를 들 수 있다.

본 발명에 있어서, 단일클론 항체란 단일클론 항체, 그의 단편, F(ab')₂화 항체, F(ab')화 항체, 단쇄 항체 (scFv), 디아바디 (Diabody) 및 미니바디 (Minibody)를 포함하는 것으로 한다. 정상 영역을 포함하는 경우에 있어서는 중쇄 및 경쇄의 정상 영역의 아미노산 서열은 문헌[Nucleic Acids Research vol. 14, p1779, 1986], 문헌[The Journal of Biological

Chemistry vol. 257, p1516, 1982] 및 문헌[Cell vol. 22, p197, 1980]에 기재된 것이 바람직하다. 정상 영역 및 가변 영역을 포함하는 본 발명의 항체로서는, 예를 들면 서열 130 (중쇄) 또는 서열 132 (경쇄)의 아미노산 서열을 갖는 항체를 들 수 있다.

본 발명의 단일클론 항체는 예를 들면 본 항체를 생산하는 하이브리도마를 소태아 혈청 함유 RPMI 1640 배양액 등을 사용하여 배양하거나, 또는 서열 81 및 83의 염기 서열을 갖는 가변 영역을 코딩하는 DNA에, 중쇄 및 경쇄의 정상 영역을 코딩하는 DNA를 각각 연결한 유전자 (예를 들면 서열 129 (중쇄) 또는 131 (경쇄)의 유전자)를 PCR법 또는 화학 합성에 의해 합성하고, 종래법에 따라 그 유전자의 발현을 가능하게 하는 공지된 발현 벡터 (pcDNA3.1 (Invitrogen) 등)에 조립하여 CHO 세포 (차이니스 하이스터 난소 세포)나 대장균 등의 숙주 중에서 발현시킴으로써 항체를 생산하고, 이들 배양액으로부터 단백질 A 칼럼 등을 이용하여 항체를 정제함으로써 얻을 수 있다.

본 발명의 단일클론 항체는 또한 서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질, 바람직하게는 비멘틴(GenBank 수탁번호 M14144)으로 면역한 동물로부터 하이브리도마를 제조하고, 이 하이브리도마를 배양한 후, 얻어진 단일클론 항체 중에서 생 암세포 표면의 결합 활성을 갖는 것을 선택함으로써 얻을 수 있다. 이러한 단일클론 항체로서는 후술하는 실시예로 표시되는 하이브리도마 2F6-1주 및 3F9-1주로부터 생산되는 단일클론 항체를 들 수 있다.

<2> 본 발명의 DNA

본 발명의 DNA는 본 발명의 단일클론 항체를 코딩하는 DNA이지만, 예를 들면 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 각각 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 각각 포함하는 DNA를 들 수 있다. 그 중에서도, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 85, 87 및 89의 염기 서열을 각각 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 91, 93 및 95의 염기 서열을 각각 포함하는 DNA가 바람직하다. 여기서, 서열 87의 서열은 29 번째의 염기가 a일 수도 g일 수도 있다. 즉, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열로서 29 a의 것과 29 g의 것의 2 종류를 들 수 있다. 또한, 서열 95의 서열은 18 번째의 염기가 c일 수도 t일 수도 있다. 즉, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열로서 18 c의 것과 18 t의 것의 2 종류를 들 수 있다.

이들 서열의 DNA에 의해서 코딩되는 초가변 영역이, 항체의 특이성을 결정하는 영역이기 때문에 다른 영역을 코딩하는 서열은 다른 항체 유래의 서열일 수도 있다. 여기서, 다른 항체란 인간 이외의 생물 유래의 항체도 포함하지만 부작용 감소의 관점에서는 인간 유래의 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서 특히 바람직한 DNA는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 82의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 84의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA, 또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 115의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 117의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 DNA이다. 그 중에서도 특히 바람직한 DNA는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열이 서열 81의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 83의 염기 서열을 포함하는 DNA, 또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열이 서열 114의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 116의 염기 서열을 포함하는 DNA이다. 여기서, 서열 81 또는 114의 서열에서, 41 번째와 152 번째의 염기의 조합이, (a, g)일 수도 (g, a)일 수도 있다. 즉, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열로서, 41 a, 152 g의 것과 41 g, 152 a의 것의 2 종류를 들 수 있다. 또한, 서열 83 또는 116의 서열에 있어서, 37 번째, 183 번째 및 258 번째의 염기의 조합이, (a, a, t), (a, a, c) 및 (g, g, t)중 어느 하나 일 수 있다. 즉, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열로서 37 a, 183 a, 258 t의 것, 37 a, 183 a, 258 c의 것 및 37 g, 183 g, 258 t의 것의 3 종류를 들 수 있다.

또한 본 발명의 DNA는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 항원 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체를 코딩하는 한, 상기 서열 81의 염기 서열 및 서열 83의 염기 서열, 또는 서열 114의 염기 서열 및 서열 116의 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화하는 것일 수도 있다. 여기서, 엄격한 조건으로는 예를 들면 써던(Southern) 혼성화의 세정 조건인 60 °C, 1×SSC, 0.1 % SDS, 바람직하게는, 0.1×SSC, 0.1 % SDS에 상당하는 염 농도로 혼성화하는 조건을 들 수 있다.

본 발명의 DNA는 중쇄와 경쇄의 정상 영역과 가변 영역의 모두를 코딩하는 것일 수도 있지만 중쇄와 경쇄의 가변 영역만을 코딩하는 것일 수도 있다. 정상 영역과 가변 영역의 모두를 코딩하는 경우에 있어서의 중쇄 및 경쇄의 정상 영역의 염기 서열은 문헌[Nucleic Acids Research vol. 14, p1779, 1986], 문헌[The Journal of Biological Chemistry vol. 257, p1516, 1982] 및 문헌[Cell vol. 22, p197, 1980]에 기재된 것이 바람직하다. 정상 영역 및 가변 영역을 코딩하는 본 발명의 DNA로서는 예를 들면 서열 129 (중쇄), 서열 131 (경쇄)의 염기 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

본 발명의 DNA는 예를 들면 이하의 방법에 의해서 얻을 수 있다. 우선, 본 발명의 하이브리도마 등의 세포로부터 시판된 RNA 추출 키트를 이용하여 전 RNA를 제조하고, 랜덤 프라이머 등을 이용하여 역전사 효소에 의해 cDNA를 합성한다. 이어서, 이미 알려진 인간 항체의 중쇄 유전자 및 경쇄 유전자의 가변 영역에서, 각각 보존되는 서열의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하는 PCR법에 의해 항체를 코딩하는 cDNA를 증폭시킨다. 정상 영역을 코딩하는 서열에 대해서는 이미 알려진 서열을 PCR법으로 증폭함으로써 얻을 수 있다. DNA의 염기 서열은 서열 결정용 플라스미드에 조립하는 등으로 통상법에 의해 결정할 수 있다.

본 발명은 또한 본 발명의 DNA를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다. 재조합 벡터로서는 대장균 (*Escherichia coli*)와 같은 원핵 세포에서 발현가능한 벡터 (예를 들면 pBR322, pUC119 또는 이들 파생물)일 수도 있지만, 진핵 세포에서 발현가능한 벡터가 바람직하고, 포유 동물 유래의 세포에 있어서 발현가능한 벡터가 보다 바람직하다. 포유 동물 유래의 세포에 있어서 발현가능한 벡터로서는 예를 들면 pcDNA3.1 (Invitrogen사 제조)와 같은 플라스미드 벡터, pDON-AI DNA (다카라 바이오사 제조)등의 바이러스 벡터를 들 수 있다. 본 발명의 재조합 벡터가 도입된 형질전환체는 대장균과 같은 원핵 세포일 수도 있지만 진핵 세포가 바람직하고, 포유 동물 유래의 세포가 보다 바람직하다. 포유 동물 유래의 세포로서는 예를 들면 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO 세포)등을 들 수 있다.

<3> 본 발명의 하이브리도마

본 발명의 하이브리도마는, 상술한 바와 같은 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마이다. 본 발명의 하이브리도마로서는 후술하는 실시예에 나타내는 하이브리도마 HoAKs-1주, 2F6-1주, 3F9-1주 등을 들 수 있다. 본 발명의 하이브리도마는 이하의 방법에 의해서 얻을 수 있다. 우선, A. Imam 등의 방법 (문헌[Cancer Research vol. 45, 263, 1985])에 준하여, 폐암 환자로부터 적출된 암조직으로부터 암침윤 림프구를 단리하고, 림프구를 포함하는 세포를 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 마우스 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 얻는다. 다음으로 얻어진 하이브리도마의 상청액을 사용하여 효소 면역 분석법을 행하고, 파라포름알데히드로 고정된 각종 암세포주에 대하여 양성을 나타내는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택한 후, 상기 하이브리도마를 한계 희석에 의해 클로닝한다. 또한, 본 발명의 하이브리도마는 도 5의 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 이용하여 마우스를 면역시키고, 얻어진 림프구와 마우스 골수종 세포를 융합시킴으로써도 얻을 수 있다.

<4> 본 발명의 의약 조성물

본 발명의 의약 조성물은 본 발명의 단일클론 항체를 의약상 허용가능한 담체와 함께 포함하여 이루어지는 것이다. 의약상 허용가능한 담체의 예로서는 이미 알려진 생리학적으로 허용가능한 완충액 (예를 들면 인산 완충액)와 같은 가용성 담체, 또는 라텍스 비드와 같은 고체 상태의 담체를 들 수 있다.

본 발명의 의약 조성물은 암, 특히 비-소세포 폐암, 췌장암 또는 위암의 치료약으로서 바람직하게 사용된다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은 단일클론 항체 자신의 세포 살상 효과나 증식 억제 효과를 이용하는 것일 수도 있고, 아드리아마이신 등의 항암제에 본 발명의 단일클론 항체를 결합시켜 항암제를 암 조직에 표적화시키는 것일 수도 있다.

본 발명에 있어서 특히 바람직한 의약 조성물은 독소나 항암제 등을 포함한 리포솜에 본 발명의 항체를 결합시킨 것이다. 항체를 담지하는 리포솜은 2종의 지질층을 포함하는 것이지만 상기 지질층이 다중층으로 된 것 또는 1층으로 된 것 모두 사용할 수 있다. 리포솜의 구성 성분으로서의 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 포스파티딜에탄올아민, 또한 전하를 제공하는 물질로서의 포스파티딘산 등이 사용된다. 구성 성분의 사용 비율로서, 예를 들면 포스파티딜콜린 1 mol에 대하여, 콜레스테롤은 0.3 내지 1 mol, 바람직하게는 0.4 내지 0.6 mol, 포스파티딜에탄올아민은 0.01 내지 0.2 mol 바람직하게는 0.02 내지 0.1 mol, 포스파티딘산은 0 내지 0.4 mol, 바람직하게는 0 내지 0.15 mol의 조성비를 사용할 수 있다.

리포솜의 제조 방법에는 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면 용매를 제거한 지질 혼합물을 균질기 등으로 유화하여, 동결 용해 후, 다층 리포솜을 얻고, 또한 적당한 입경으로 조정하기 위해서 초음파 처리, 고속 균질화 또는 균일한 공극을 갖는 멤브레인으로 가압 여과하는 방법 (문헌[Biochimica et Biophysica Acta vol. 812, p55, 1985])를 이용함으로써 제조할 수 있다. 리포솜의 크기는 30 nm에서 200 nm가 바람직하다.

리포솜에 내봉시키는 약제로서는 아드리아마이신, 다우노마이신, 미토마이신, 시스플라틴, 빈크리스틴, 에피루비신, 메토포레이트, 5Fu(5-플루오로우라실) 및 아클라시노마이신 등의 항암제; 리신 A 및 디프테리아 독소 등의 독소; 및 안티

센스 RNA 등을 사용할 수 있다. 약제의 봉입은 지질을 약제 수용액으로 수화함으로써 리포솜에 봉입할 수 있다. 또한 아드리아마이신, 다우노마이신, 에피루비신에 대해서는 pH 구배를 이용한 리모트 로딩법(remote-loading method) (문헌 [Cancer Res. vol. 49, p5922, 1989])를 이용하여 봉입할 수 있다.

리포솜 표면 상에 단일클론 항체를 결합시키는 방법으로서 정제 항체에 소수성의 물질을 가함으로써 리포솜에 삽입시키는 방법, 포스파티딜에탄올아민 항체를 글루타르알데히드로 가교시키는 방법 등도 있지만, 적합하게는 항체를 티올화한 후, 말레이미드기를 도입한 지질을 포함하는 리포솜을 제조하여 항암제 또는 독소를 봉입하고, 양자를 반응시킴으로써 리포솜의 표면에 항체를 결합시키는 방법을 사용할 수 있다. 또한, 아미노기와 반응 부위 및 티올기 또는 잠재적 티올기 부분을 갖는 수용성 고분자 유도체도 바람직하게 사용할 수 있다 (일본 특허 공개 평 11-152234호). 한편, 잔존 말레이미드기에 티올화한 폴리알킬렌글리콜 부분을 포함하는 화합물 등을 반응시킴으로써 리포솜의 표면 변형을 행할 수도 있다.

항체에의 티올기의 부여는 항체의 아미노기에 대하여 단백질의 티올화에 통상사용되는 N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티오)프로피오네이트 (SPDP)나 이미노티올란, 머캅토알킬이미데이트 등의 화합물을 이용하여 행하는 방법, 또는 항체의 내재성 디티올기를 환원하여 티올기로 하는 방법이 이용되지만, 내재성 티올기를 사용하는 방법이 활성 유지의 점에서 보다 바람직하다. 또한, 항체는 펩신 등의 효소로 F(ab')₂화하고, 디티오프레이틀 (DTT) 등으로 환원하여 F(ab')₂화함으로써 새롭게 생기는 1 내지 3 개의 티올기를 리포솜의 결합 반응에 제공할 수 있다. 말레이미드기 함유 리포솜과 티올화 항체의 결합은 중성의 완충액 (pH 6.5-7.5) 중, 2내지 16 시간 반응시킴으로써 달성할 수 있다.

본 발명의 암 치료약의 제제화에는, 공지된 방법, 즉 탈수법 (일본 특허 공표 평 2-502348호 공보), 안정화제를 가하여 액제로서 이용하는 방법 (일본 특허 공개 소 64-9331호 공보), 동결 건조법 (일본 특허 공개 소 64-9931호 공보) 등의 제제화법을 사용할 수 있다. 본 발명의 암 치료약은 혈관내 투여법이나 복강내 등 국소 투여법으로 사용할 수 있고, 그 투여량은 리포솜에 함유된 약제에 의해, 각각 최적의 양으로 할 수 있다. 아드리아마이신 봉입체를 예로 들면 투여량은 아드리아마이신량으로 50 mg/kg 이하, 바람직하게는 10 mg/kg 이하, 보다 바람직하게는 5 mg/kg 이하로 사용할 수 있다.

<5> 본 발명의 진단 시약

본 발명의 진단 시약으로서 본 발명의 항체의 암세포 특이성을 이용하는 진단 시약을 들 수 있지만, 구체적으로는 본 발명의 항체, 이차 항체 및 검출 기질 등을 포함하는 암의 진단 시약 등을 들 수 있다.

<6> 본 발명의 폴리펩티드

본 발명의 폴리펩티드는, 도 5에 나타내는 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약55 kDa의 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식하는 폴리펩티드이다. 또한, 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대하여는 형태 변화를 일으키는 폴리펩티드이다. 또한, 도 5에 나타내는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질 (서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 단백질)을 특이적으로 인식하고, 또한 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대하여는 형태 변화를 일으키는 폴리펩티드이다. 상기 약 55 kDa의 항원 단백질로서는 비멘틴을 예시할 수 있다. 여기서, 형태 변화란 예를 들면 도 1의 B 및 D에 나타낸 바와 같은 축색상의 형태, 섬유 아세포- 유사 형태, 및 신경 돌기를 갖는 신경 세포- 유사 형태로의 정상 세포의 형태 변화를 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드로서 구체적으로는 후술하는 실시예에 나타내는 PROSEP-A에 흡착되는 폴리펩티드를 들 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 단일클론 항체를 들 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 암세포 특이적으로 형태 변화를 일으키기 때문에 의약 조성물, 특히, 비-소세포 폐암, 췌장암, 위암 등의 암의 치료약을 제조하기 위해서 사용할 수 있다.

실시예

이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 자세하게 설명하지만, 그 요지를 넘지 않는 한 이하에 한정되는 것은 아니다.

(1) 암 환자의 암 침윤성 림프구와 마우스 골수종과의 세포 융합에 의한 하이브리도마의 제조

(1)-1. 림프구의 제조

폐암 환자로부터 적출한 암 조직을 메스로 작은 덩어리로 하고, 배양액 A (RPMI 1640+ 50 μg/ml 겐타마이신 황산염) 중 에서 잘 흔든 후, 그 배양액 I를 회수하였다. 또한 암 조직의 작은 덩어리를 면도 칼에 의해서 가늘게 풀고 새로운 배양액 A

중에서 피펫팅을 행하여 세포를 분산시켰다. 이 세포 현탁액을 1000 rpm으로 5 분간 원심 분리하고 상청액 II를 회수하였다. I과 II를 합하여 3000 rpm으로 5분간 원심 분리를 행하여 최종적으로 암 침윤성 림프구를 포함하는 약 4×10^7 개의 세포를 얻었다.

(1)-2. 세포 융합

암 침윤성 림프구를 포함하는 세포는, 폴리에틸렌글리콜 1500 (로슈 다이아그노스틱스)를 사용하여 마우스 골수종 세포 (약 4×10^7 개)와 통상법 (문헌[Cancer Research vol. 45, 263, 1985])에 따라서 융합시켰다. 융합시킨 세포는 배양액 B (배양액 A에 10 % 소태아 혈청 (FCS)을 가한 것)에 세포수가 5×10^5 /ml의 밀도가 되도록 현탁하여 100 μ l씩 96 웰-플레이트에 접종하고, 37 °C의 CO₂ 인큐베이터 중에서 배양을 개시하였다. 2 일째에 10 μ M 히포크산틴, 0.04 μ M 아미노프테린, 1.6 μ M 티미딘을 첨가한 배양액 B (HAT 첨가 배양액)을 각 웰에 100 μ l씩 첨가하여 하이브리도마의 콜로니가 출현할 때까지 배양을 행하였다. 그 결과, 하이브리도마의 콜로니가 10 웰 중에 확인되었다.

(2) 인간 단일클론 항체의 암세포주에의 반응성의 검토

(2)-1. 암세포주와 그의 유지

출현한 하이브리도마의 배양 상청액을 사용하고, 고정암 세포주, 즉, 폐암주 HLC-1 (문헌[Cancer vol. 67, No. 4, pp 483-492, 1976], 게이오기주쿠 다이가쿠 의학부, 스즈끼씨로부터 입수), 위암주 MKN 45 (문헌[암과 화학 요법, vol. 5, p89, 1978], 면역 생물 연구소에서 입수) 및 췌장암주 SUI2 (국립병원 큐슈 암 센터, 이구찌씨로부터 입수)에 대한 반응성을 측정하여 목적의 하이브리도마를 선택하였다. 이들 암세포주는 배양액 C (D-MEM/F₁₂+ 50 μ g/ml 젠타마이신 황산염)에 5 % FCS를 첨가한 배양액 D에서, 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 유지하고 증식시켰다.

(2)-2. 암세포주에 대한 반응성의 측정

상기 암세포주는 96 웰-플레이트로 3 일 내지 4 일간, 1층이 될 때까지 배양을 행하고, 상청액을 제거 후, 10 mM 인산 완충액 (pH 7.4, 0.15M NaCl) (PBS)로 1회 세정한 후, 2 % 파라포름알데히드 고정 (실온, 20 분)을 행하였다. PBS에서 5회 세정한 후, 5 % BSA (소혈청 알부민) 함유 PBS 용액을 150 μ l/웰씩 투입하고 블로킹을 행하였다. 이 플레이트를 PBS에서 5 회 세정하고, 50 μ l의 하이브리도마 배양 상청액을 가하여 37 °C, 1 시간 반응한 반응시켰다. 다음으로 PBS에서 5 회 세정하여 50 μ l의 홍당무 퍼옥시다아제 (HRP)를 콘주게이션시킨 인간 항체에 대한 염소 항체 (1000배 희석, 카펠사)를 가하고, 37 °C, 1 시간의 반응을 행하였다. 다음으로, Tween 20을 0.05 %를 포함한 PBS (PBS-T)로 플레이트를 세정하고, o-페닐렌디아민이염산염 (5.2 %)과 H₂O₂ (0.015 %)를 함유한 인산-시트르산 완충액을 50 μ l/웰씩 가하여, 실온에서 발색을 확인할 수 있을 때까지 반응시킨 후, 490 nm에서의 흡광도를 마이크로포토미터 (닛본 인터메드(Nihon Intermed))에 의해 측정하였다. 반응성을 확인할 수 있었던 웰에서의 한계 희석에 의해서 클로닝을 행하고, 하이브리도마 주 HoAKs-1을 얻었다. 이하, 이 주로부터 얻어지는 단일클론 항체를 HoAKs-1 항체라 한다.

(3) 단일클론 항체 HoAKs-1의 정제와 표지화

(3)-1. 하이브리도마 HoAKs-1의 배양과 단일클론 항체 HoAKs-1의 정제

먼저, 소태아 혈청을 단백질 A-유리 비드 칼럼 (PROSEP-A) (bio PROCESSING)에 그냥 통과시켜 PROSEP-A에 흡착하는 물질을 제거한 혈청을 제조하고, 이 혈청을 7내지 10 % 첨가한 배양액 A를 이용하여 하이브리도마 HoAKs-1을 배양하였다. 다음으로, 하이브리도마 HoAKs-1을 배양한 배양액을 PROSEP-A에 가하여 PROSEP-A 흡착 폴리펩티드를 흡착시키고, 그 후 용출시킴으로써 PROSEP-A 흡착 폴리펩티드를 정제하였다. 이 PROSEP-A 흡착 폴리펩티드를 이후 HoAKs-1 항체로 이용하였다. 상기한 혈청을 배양에 사용함으로써 혈청 유래의 항체 등 PROSEP-A에 흡착하는 물질의 혼입이 없는 정제 HoAKs-1 항체가 얻어진 것으로 생각되었다. 또한 도면에는 나타내지 않았지만 HoAKs-1 항체는 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)으로 순수한 IgM인 것이 확인되었다.

(3)-2. HoAKs-1 항체의 비오틴 표지

PROSEP-A에서 정제한 HoAKs-1 항체를 비오틴닐화제 (아머샴 파마시아 바이오텍(Amersharm Pharmacia Biotech))을 사용하여 설명서에 따라서 비오틴 표지시킨 후, 겔 여과법에 의해서 표지 항체와 유리의 비오틴을 분리하였다.

(4) 생 암세포주 및 혈관 내피 세포에의 작용의 검토

(4)-1. 암세포주 및 혈관 내피 세포와 이들의 유지

인간 암세포주로서 폐암주 HLC-1, 위암주 MKN 45, 췌장암주 PANC-1 (ATCC No. CRL1469), 정상 인간 세포로서 혈관 내피 세포 HUVECs (다이넛뽀세이야꾸)를 사용하였다. 이들 암 세포주는 배양액 D에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 유지하고 증식시켰다. 인간 혈관 내피 세포 HUVECs는 배양액 CS-C 배양액 (CeLL System)을 사용하여 유지하고 증식시켰다.

(4)-2. 암세포주 및 혈관 내피 세포의 형태에 대한 영향의 검토

HoAKs-1 항체를 필터 여과하고 무균화하여, 약 140 µg/ml의 농도가 되도록 배양액 C 또는 CS-C 배양액으로 희석하고, 96-웰 플레이트에 100 µl/웰씩 분주하였다. 다음으로 각 배양 암세포 및 혈관 내피 세포 HUVECs를 각각 10 % 인간 혈청 (ICN Biomedicals)을 함유한 배양액 C 또는 CSC-배양액으로 3×10⁴/ml의 밀도로 희석하고, 그 세포 함유 용액을 100 µl/웰씩 접종하여, 웰 중의 세포수가 1.5×10³/웰, HoAKs-1 항체의 농도가 약 70 µg/ml이 되도록 제조하였다. 이 플레이트를 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 배양하였다. 1일 간격으로 3 회, 배양 상청액을 상기와 동일한 조건이 되도록 교환하여 6 일째에 세포의 형태 변화를 광학 현미경하에서 관찰하였다.

관찰 결과를 도 1에 나타내었다. 정상 세포인 혈관 내피 세포 HUVECs에서는 항체의 첨가에 따라 세포의 형태 변화가 확인되지 않음에 (도 1-G, H) 대하여, 폐암 세포주 HLC-1 (도 1-A, B), 췌장암 세포주 PANC-1 (도 1-C, D)에서는 항체의 첨가에 의해서 현저한 형태 변화가 확인되었다. 이들 세포는 축삭상의 형태, 섬유 아세포-유사 형태, 혹은 신경 돌기를 갖는 신경 세포-유사 형태로 변화하였다. 특히 폐암주 PANC-1은 기아 상태에 이른 경우의 형태와 유사한 변화를 나타내었다. 또한, 위암 세포주 MKN45에 대해서도 약간의 형태 변화가 확인되었다 (도 1-E, F). 이상으로부터 HoAKs-1 항체는 암세포주에 대하여 어떠한 작용을 제공할 가능성이 시사되었다.

(4)-3. 암세포주에 대한 증식 억제 효과의 검토

상기에서 형태 변화가 확인된 폐암 세포주 HLC-1, 위암 세포주 MKN 45 및 형태 변화가 확인되지 않은 정상 세포인 혈관 내피 세포 HUVECs에 대하여, 동일한 조건하에서 96 웰-플레이트에 암세포를 접종하고, HoAKs-1 항체의 농도가 약 70 µg/ml이 되는 조건하에서 37 °C, 5 % CO₂의 환경에서 배양하여 1 일 간격으로 3 회, 배양 상청액을 상기 동일한 조건이 되도록 교환한 후, 6 일째에 MTT 분석법 (문헌[J. Immunol. Methods vol. 70, p257, 1984])에 의해서 생 암세포수의 비교를 행하였다. 비교로서, 인간 항체 IgM (케미콘(Chemicon)사 제조)를 이용하여 같은 실험을 행하였다.

결과를 도 2에 나타내었다. 항체를 첨가하지 않은 대조군 조건에서의 세포수를 100 %로 한 경우, HoAKs-1 항체를 첨가함으로써, 폐암 세포주 HLC-1에서는 약 60 %, 위암 세포주 MKN 45에서는 약 50 %의 증식 억제 효과가 확인되었다. 한편, 혈관 내피 세포 HUVECs에서는 차이가 확인되지 않았다. 또한, 비교로서 이용한 인간 IgM에서는 그 첨가에 의한 암세포주의 증식 억제 효과는 확인되지 않았다.

형태 변화가 확인된 폐암 세포주 PANC-1을, 웰 중의 세포수가 1×10³/웰이 되도록 96 웰-플레이트에 접종하고, HoAKs-1 항체의 농도가 300 µg/ml, 100 µg/ml, 30 µg/ml의 각 농도가 되는 조건하에서, 37 °C, 5 % CO₂의 환경에서 배양하고, 1 일 간격으로 3 회, 배양 상청액을 상기와 동일한 조건이 되도록 교환하여 6 일째에 브로모테옥시우리딘 (BrdU) 세포 증식 분석 키트 (Oncogene사 제조)에 의해 생 암세포수의 비교를 행하였다. 6 일째에 키트의 설명에 따라서 BrdU 용액을 각 웰에 첨가하고, 하룻밤 동안 배양을 행한 후, 그 사이에 생 암세포에 의해 흡수된 BrdU량을 7 일째에 측정하였다. 비교로서 인간 항체 IgM을 이용하여 동일한 실험을 행하였다.

결과를 도 3에 나타내었다. 항체를 첨가하지 않은 대조군 조건에서의 BrdU 흡수량을 100 %로서 표시하였다. HoAKs-1 항체를 첨가함으로써 폐암 세포주 PANC-1의 증식이 농도 의존적으로 억제되어 있는 것이 확인되었다. 비교로서 사용한 인간 IgM에서는 그 첨가에 의한 암세포주의 증식 억제 효과는 확인되지 않았다.

(5) 각종 조직 세그먼트에 대한 반응성의 검토

(5)-1. 각종 조직 세그먼트의 제조

HoAKs-1 생산 하이브리도마의 제조에 이용한 림프구가 유래한 폐암 조직편 및 이 암 조직 주변의 비암부 폐 조직편을 통상법에 따라서 포르말린 용액으로 담지하고, 파라핀에 삽입시켜 세그먼트를 제조하였다. 또한, 각종 암 세포주(폐암 세포주: HLC-1 (케이오기주꾸 다이가꾸), A 549 및 PC-9 (면역 생물 연구소), 췌장암 세포주: SUIT2 (큐슈 암 센터), PANC-1 및 PK8 (도호꾸 다이가꾸 가레이 이가꾸 쟁큐쇼, 의료용 세포 자원 센터), 위암 세포주: MKN 45, MKN 74, HSC-3 (모두 면역 생물 연구소), 대장암 세포주: HT 29 (ATCC No. HTB38), DLD-1 (ATCC No. CCL221), LoVo (ATCC No. CCL229), COLO205 (ATCC No. CCL222)에 대해서는 각각 배양액 D에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 증식시켜 각각 약 1×10⁶ 내지 1×10⁷ 개의 세포를 누드 마우스 (닛본 구레아(CLEA Japan, Inc))의 피하에 이식하고, 종양을 형성시켰다. 형성한 종양을 적출하고, 상기와 동일하게 처리를 행하여 종양 조직 세그먼트를 제조하였다.

(5)-2. 각종 조직 세그먼트에 대한 반응성의 검출

제조한 각종 조직 세그먼트를 통상법에 따라서 탈파라핀 처리하고, 블로킹 조작을 행한 후에, 실시예 (3)-2.에 기재한 비오틴 표지한 HoAKs-1 항체를 반응시켰다. 검출에는 DAKO 촉매성 신호 증폭(Catalyzed Signal Amplification, CSA) 시스템 (DAKO)를 이용하고, 그 반응성은 디아미노벤지딘의 적갈색의 염색으로서 검출하였다. 또한 상기 면역 염색을 행한 조직 세그먼트는 조직상을 확인하기 위하여 헤마톡시린에 의해 조직중의 세포의 핵을 청색으로 염색시켰다.

반응성이 확인된 각종 암조직 세그먼트 및 자가 폐 비암부 조직 세그먼트의 염색상을 도 4에 나타내었다. HoAKs-1 항체는 그 하이브리도마가 유래한 자가 폐암 조직 세그먼트 중의 암세포 및 누드 마우스에서 형성된 폐암주 종양: HLC-1 및 A549, 췌장암주 종양: SUIT2, PANC-1 및 PK-8, 위암주 종양: MKN45의 종양 조직 세그먼트 중의 암세포에서 명확한 반응성이 확인되었다. 한편, 비암부 조직 세그먼트에 대한 반응은 확인되지 않았다.

또한, 도 4에는 도시되어 있지 않지만, 대조군으로서 인간 혈청으로부터 HoAKs-1 항체와 동일하게 PROSEP-A 칼럼을 이용하여 정제한 인간 항체, 또는 동일하게 취득한 HoAKs-1 항체와 동일한 서브타입을 갖는 IgM형 인간 단일클론 항체 A를 사용하여 상기와 동일한 순서로 염색시켰다. 이러한 항체는 후술하는 PANC-1 세포의 불용성 분획에 대한 반응성을 가지지 않았지만, 상기 각 조직 세그먼트에 대해서도 특징적인 반응성을 나타내지 않았다.

(6) HoAKs-1 항체가 인식하는 항원의 분석

(6)-1. 암세포주로부터의 항원 샘플의 제조

세포 형태의 현저한 변화가 일어나고 누드 마우스 이식 종양에서의 항체 반응성이 확인된 췌장암 세포주 PANC-1 유래 단백질을 재료로 하여, 웨스턴 블롯팅(Western Blotting)법에 의해 HoAKs-1 항체가 반응하는 물질의 동정을 시도하였다. 폐암 세포주 PANC-1을 플라스크 중, 배양액 D에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건으로 증식시켰다. 플라스크 중의 배양 상청액을 제거하고, PBS에서 1 회 세정한 후, 소량의 PBS를 플라스크에 첨가하여 셀 스크레이퍼(scraper)로 세포를 박리한 다음 원심관에 옮겨 1000 rpm, 5 분간의 원심을 의해서 세포를 회수하였다. 또한 PBS로 2회 세정한 후, TNE-완충액 (10 mM Tris-HCL (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)+ 프로테아제 저해제 (5 µg/ml 류펩틴, 5 µg/ml 펩스타틴 A, 5 µg/ml 키모스타틴 (모두 펩티드 연구소))를 회수한 세포의 10 배량 (v/v) 가하고, 빙냉 중에서 유리제 균질기를 이용하여 세포를 파괴한 후, 10000 g, 20 분간 원심을 행하여 가용성의 상청액 분획과 불용성의 침전물을 얻었다. 침전물에 대해서는 RIPA-완충액 (50 mM Tris-HCL(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % 데옥시콜산, 0.1 % SDS)+ 프로테아제 저해제 (5 µg/ml 류펩틴, 5 µg/ml 펩스타틴 A, 5 µg/ml 키모스타틴)을, 먼저 가한 TNE-완충액과 동량 첨가하여 현탁시켜 초음파 파쇄기에서 약 3 분간 동안 침전을 분산시켰다.

(6)-2. 웨스턴 블롯팅에 의한 분석

상기한 PANC-1 유래 가용성 분획 단백질 및 RIPA 완충액으로 가용화시킨 불용성 분획 단백질을 각각 약 20 µg씩 사용하고, 2 내지 15 % 아크릴아미드 구배 겔로 전기 영동을 행하였다. 전기 영동 후, 겔로부터 PVDF막에 단백질을 옮기고, PVDF 막을 블로킹한 후에, HoAKs-1 항체를 4 °C에서 하룻밤 동안 및 이어서 37 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. PVDF 막을 PBS-T로 세정하고, 홍당무 퍼옥시다아제 (HRP)를 콘주게이션시킨 인간 항체에 대한 염소 항체 (1000 배, 카펠 (Cappel))을 가한 후, 37 °C, 1 시간의 반응을 행하였다. 다음으로, PBS-T에서 PVDF막을 세정하고, HoAKs-1의 반응 물질을 웨스턴 블롯팅 루미놀 시약 (Santa Cruz Biotechnology)로 검출하였다.

PANC-1 세포 유래 단백질의 전기 영동 패턴 (코오마시에 브릴리언트 블루(코오마시에 브릴리언트 블루) 염색)과 웨스턴 블롯팅의 결과를 도 5에 나타내었다. HoAKs-1 항체는 체장암 세포주 PANC-1 세포 균질화물의 불용성 분획 (막 분획) 중, 약 55 kDa의 단일 단백질에 대하여 반응성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

(6)-3. 아미노산 서열 분석

상기한 RIPA 완충액으로 가용화시킨 PANC-1 유래의 불용성 분획 약 560 μ g을, 아머삼사 제조 Plus One 2-D Clean-Up kit를 사용하여 처리한 후, 약 40 μ g씩 이차원 전기 영동에 걸었다. 일차원 께의 전기 영동으로서는 ZOOM STRIP (pH 3-10 NL) (Invitrogen사 제조)에서 샘플을 팽윤시켜 등전점 전기 영동을 행하고, 이차원 께는 10 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 SDS-전기 영동을 행하였다. 상기 웨스턴 블롯팅법과 동일한 방법을 이용하여 2차원 전기 영동 패턴 상에서 HoAKs-1의 반응 물질을 검출하였다. 동일 샘플에 대해서 13회의 2차원 전기 영동을 행하여 전기 영동 후의 겔을 코오마시에 브릴리언트 블루로 염색하고, 웨스턴 블롯팅의 결과를 참조하여 HoAKs-1 항체 반응 물질에 상당하는 13개의 스폿트(spot)를 겔로부터 추출하였다.

추출한 겔편을 세정하고 라이실-말단 펩티다제를 포함하는 트리스 완충액 (pH 8.5)를 가하여 35°C에서 하룻밤 동안 처리를 행하였다. 그 후, 용액을 역상 HPLC (TSK 겔 ODS-80 Ts)에 제공하고 단편 펩티드를 분리하였다. 분리된 펩티드 중, 단편 번호 58에 대하여 아미노산 서열 분석 장치 (Procise 494 HT Protein Sequencing System)를 행하여, 주로 검출된 아미노산으로부터 N 말단이 Val로 시작되는 펩티드의 서열을 12 잔기 께까지 확정하였다. 그 서열은 VELQELNDRFAN (서열 107)이고, 상동성 조사 결과, 각종 비멘틴 (문헌[Mol. Cell. Biol. Vol. 6, p3614-3620, 1986], GenBank 수탁번호 M14144) 및 데스민 (문헌[Gene vol. 78, p243-254, 1989])의 내부 서열과 일치하였다. 비멘틴 및 데스민은 세포 골격의 필라멘트이므로, HoAKs-1 항체는 세포 골격의 필라멘트에 반응성을 갖는 항체임을 생각할 수 있었다.

HoAKs-1 항체는 이 아미노산 서열 VELQELNDRFAN (서열 107)을 포함하는 단백질을 통하여 암세포에 형태 변화 (도 1)나 증식 억제 효과 (도 2 또는 3)를 미치게 하였다고 생각할 수 있지만, HoAKs-1 항체를 배양액 중에 첨가함으로써 암세포가 형태 변화 등을 일으켰기 때문에 이 항원 단백질은 암세포의 막 표면에 존재한다는 것이 예상되었다.

(7) 인간 단일클론 항체 HoAKs-1 유전자의 수득과 염기 서열의 결정

HoAKs-1 항체 생산 하이브리도마로부터 알엔이지 프로젝트 미니키트(RNeasy Protect Minikit) (QIAGEN)를 이용하여 전 RNA를 제조하였다. 역전사 반응은 랜덤 9량체를 프라이머로 하여 RNA PCR 키트 (AMV) (TaKaRa)를 사용하여 행하고, cDNA를 합성하였다.

PCR 증폭용 프라이머로서는 이미 알려진 항체 서열 (문헌[J Mol Biol. Vol. 222, pp581-597, 1991])에 기초하여, 중쇄 가변 영역의 증폭용으로는 인간 항체 중쇄 가변 영역의 프레임 1에서 보존되고 있는 N 말단 아미노산 서열 (서열 2, 4, 6, 8, 10 및 12)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 VH 1 (서열 1), VH 2 (서열 3), VH 3 (서열 5), VH 4 (서열 7), VH 5 (서열 9), VH 6 (서열 11)의 등량 혼합물을 5'측에 사용하고, 인간 항체 중쇄 가변 영역의 프레임 4로 보존되어 있는 C 말단 아미노산 서열 (서열 14, 16, 18 및 20)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 JH 1 (서열 13), JH 2 (서열 15), JH 3 (서열 17), JH 4 (서열 19)의 등량 혼합물을 3'측에 이용하였다.

κ 쇄 가변 영역의 증폭용 프라이머에는, 인간 항체 κ 쇄 가변 영역의 프레임으로 보존되어 있는 N 말단 아미노산 서열 (서열 22, 24, 26, 28, 30 및 32)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 VK 1 (서열 21), VK 2 (서열 23), VK 3 (서열 25), VK 4 (서열 27), VK 5 (서열 29), VK 6 (서열 31)의 등량 혼합물을 5'측에 이용하고, 인간 항체 κ 쇄 가변 영역의 프레임 4로 보존되어 있는 C 말단 아미노산 서열 (서열 34, 36, 38, 40 및 42)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 JK1 (서열 33), JK2 (서열 35), JK3 (서열 37), JK4 (서열 39), JK5 (서열 41)의 등량 혼합물을 3'측에 이용하였다.

λ 쇄 가변 영역의 증폭용 프라이머에는, 인간 항체 λ 쇄 가변 영역의 프레임 1로 보존되어 있는 N 말단 아미노산 서열 (서열 44, 46, 48, 50, 52, 54 및 56)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 VL1 (서열 43), VL2 (서열 45), VL3 (서열 47), VL4 (서열 49), VL5 (서열 51), VL6 (서열 53), VL7 (서열 55)의 등량 혼합물을 5' 말단에 이용하고, 인간 항체 λ 쇄 가변 영역의 프레임 4로 보존되어 있는 C 말단 아미노산 서열 (서열 58, 60 및 62)에 각각 대응하는 PCR 프라이머 JL1 (서열 57), JL2 (서열 59), JL3 (서열 61)의 등량 혼합물을 3' 말단에 이용하였다.

PCR 반응은 퍼킨 엘머 유전자 증폭 PCR 시스템(Perkin Elmer Gene Amp PCR System) 2400을 사용하고, RNA PCR 키트 (AMV) (TaKaRa)를 사용하여 설명서에 따라서 행하였다. 그 결과, 경쇄에 대해서는, κ 쇄용 프라이머에 의한 PCR에서는 증폭되었지만, λ 쇄용 프라이머에서는 증폭되지 않았기 때문에, 하이브리도마로부터 생산되는 항체의 경쇄는 κ 쇄인 것을 알았다.

증폭된 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역의 DNA 단편은 민엘루트 PCR 정제 키트(MinElute PCR Purification kit) (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 다음으로, TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen)을 이용하여 pCR2.1-TOPO와 상기한 정제 PCR 산물을 연결시켜, 대장균의 형질전환을 행하였다. 출현한 콜로니를 픽업(pick-up)하고, QIAGEN 플라스미드 미니키트 (QIAGEN)를 사용하여 플라스미드를 정제하고, EcoRI로 37 °C 15 분간 분해하여, 2% 아가로오스 전기 영동으로 목적 DNA 단편이 조립되어 있다는 것을 확인하였다.

염기 서열은 목적하는 DNA 단편이 조립된 복수의 콜로니에 대해서 M13 프라이머를 이용하여 CEQ 2000 DNA 분석 시스템 (Beckman)에 의해 분석하였다. 그 결과, 중쇄의 분석으로부터는 H09 (서열 63), H12 (서열 65), H27 (서열 67), H30 (서열 69)의 4 종류의 서열이 얻어졌다. K쇄의 분석으로부터는 K30 (서열 71), K31 (서열 73), K32 (서열 75), K35 (서열 77), K39 (서열 79), KMO5 (서열 97), KMO6 (서열 99), KMO26 (서열 101), KMO36 (서열 103), KMO40 (서열 105)의 10 종류의 서열이 얻어졌다. 이들 중, H09, H12, H27, H30, K30, K31, K32, K35, K39가 인간의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하고 있다고 생각되었다. 이들 염기 서열, 및 대응하는 아미노산 서열 (중쇄: 서열 64, 66, 68, K쇄: 서열 70, 72, 74, 76, 78, 80)을 비교함으로써 중쇄 및 경쇄 각각에 대하여 가변 영역의 염기 서열 (중쇄: 서열 81, 경쇄: 서열 83) 및 아미노산 서열 (중쇄: 서열 82, 경쇄: 서열 84)를 결정하였다.

HoAKs-1 항체 유전자에 대해서 상기에서 결정한 서열에 대해 3'측 영역의 서열을 추가로 결정하였다. 중쇄 유전자의 3'측 영역의 증폭은, 인간 항체 중쇄 가변 영역의 프레임 1로 보존되어 있는 N 말단 아미노산 서열에 대응하는 PCR 프라이머 VH3 (서열 5)을 5'측 프라이머에, 인간 항체 중쇄 정상 영역 중의 아미노산 서열에 대응하는 PCR 프라이머 IgMFOR (서열 108)을 3'측 프라이머에 사용한 PCR에 의해 행하였다. 얻어진 PCR 산물을, 상기와 같이 하여 플라스미드에 조립하여 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 상기 중쇄 가변 영역의 염기 서열 (서열 81)의 3'측에 계속되는 57개의 염기의 서열 (서열 110)을 새롭게 결정할 수가 있었다. 이 염기 서열은 19개의 아미노산 (서열 111)을 코딩하고 있다고 예상되었다. 이 57개의 염기를 가한 HoAKs-1 항체 중쇄 유전자의 염기 서열과 예상되는 아미노산 서열을, 각각 서열 118 및 서열 119에 나타내었다. 한편, 이 57개의 염기에는 정상 영역을 코딩하는 서열도 포함되기 때문에, 가변 영역을 코딩하고 있는 부분 (24개의 염기)만을 가한 HoAKs-1 항체 중쇄 가변 영역 유전자의 염기 서열과 예상되는 아미노산 서열을 각각 서열 114 및 서열 115에 나타내었다.

HoAKs-1 항체의 κ 쇄 유전자의 증폭은, 인간 항체 κ 쇄 가변 영역의 프레임 1로 보존되어 있는 N 말단 아미노산 서열에 대응하는 PCR 프라이머 VK 4 (서열 27)을 5'측 프라이머에, 인간 항체 κ 쇄 정상 영역의 C 말단 아미노산 서열에 대응하는 PCR 프라이머 GKFOR (서열 109)를 3'측 프라이머에 이용한 PCR에 의해 행하였다. 얻어진 PCR 산물을, 상기와 같이 하여 플라스미드에 조립하여 염기 서열을 결정하였다. 그 결과, 상기 κ 쇄 가변 영역의 염기 서열 (서열 83)의 3'측에 계속되는 99개의 염기의 서열 (서열 112)를 새롭게 결정할 수가 있었다. 이 염기 서열은 33개의 아미노산 (서열 113)을 코딩하고 있다고 예상되었다. 이 99개의 염기를 가한 HoAKs-1 항체 κ 쇄 유전자의 염기 서열과 예상되는 아미노산 서열을 각각 서열 120 및 서열 121에 나타내었다. 한편, 이 99개의 염기에는 정상 영역을 코딩하는 서열도 포함되기 때문에, 가변 영역을 코딩하고 있는 부분 (24개의 염기)만을 가한 HoAKs-1 항체 κ 쇄 가변 영역 유전자의 염기 서열과 예상되는 아미노산 서열을 서열 116 및 서열 117에 나타내었다.

초가변 영역 (CDR)과 외곽구조의 경계선은 Kabat 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, fifth edition National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991년]을 참고로 하여 결정하였다. 그 결과, 중쇄의 CDR은 HCDR1 (염기 서열: 서열 85, 아미노산 서열: 서열 86), HCDR2 (염기 서열: 서열 87, 아미노산 서열: 서열 88) 및 HCDR3 (염기 서열: 서열 89, 아미노산 서열: 서열 90)으로, 경쇄의 CDR은 LCDR1 (염기 서열: 서열 91, 아미노산 서열: 서열 92), LCDR2 (염기 서열: 서열 93, 아미노산 서열: 서열 94) 및 LCDR3 (염기 서열: 서열 95, 아미노산 서열: 서열 96)으로 결정할 수가 있었다.

(8) 형태 변화의 지속성

HoAKs-1 항체의 첨가에 의해서 형태 변화가 확인된 췌장암 세포주 PANC-1을 이용하여, 그 형태 변화의 지속성을 검토하였다. HoAKs-1 항체의 농도가 약 100 $\mu\text{g/ml}$ 가 되는 조건하에서, 37 °C, 5 % CO₂의 환경에서 췌장암 세포주

PANC-1을 5 일간 배양한 후, HoAKs-1 항체를 함유하지 않는 배양액과 교환하여 이어서 7 일간 배양을 계속하였다. HoAKs-1 항체를 제거한지 3 일 후, 6 일 후 및 7 일 후의 세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과를 도 6에 나타내었다. HoAKs-1 항체에 의해서 야기된 PANC-1 세포의 형태 변화는 항체를 제거한 후도 장기간 계속되었고 확인되었다.

(9) HoAKs-1 항체의 생 암세포 표면에서의 결합 활성

췌장암 세포주 PANC-1, 폐암 세포주 HLC-1 및 혈관 내피 세포 HUVECs를 96-웰 플레이트 (3603, 코닝사(Corning, Inc.) 제조)에 접종하고, 37 °C, 5 % CO₂의 환경에서 배양을 1 일 행한 후, 실시예 (3)-2에 기재된 비오틴 표지한 HoAKs-1 항체를 50 µg/ml의 농도 (0.05 % 아지드화나트륨 함유)로 첨가하여, 실온에서 60 분간 반응시켰다. 항체 용액을 제거한 후, 20 nM-Qdot TM 565 스트랩트아비딘 표지 (Quantm Dot Corporation사 제조) 용액 (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 가하여 실온에서 30 분간 반응을 행한 다음, 본 용액을 제거하고 PBS (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 첨가하여, 공초점 형광 현미경 (CSU10, 요코가와 덴키 가부시끼 가이샤 제조)에서의 관찰을 행하였다. 각 생세포 표면에 대한 HoAKs-1 항체의 결합 활성을 도 7에 나타내었다. HoAKs-1 항체는 PANC-1 세포 및 HLC-1 세포의 생세포 표면에 결합 활성을 나타내었지만 (도 7-A, C), HUVECs 세포에 대하여는 결합 활성을 나타내지 않았다 (도 7-E). 대조군으로서 이용한 인간 IgM 항체는 모든 세포에 대하여도 결합 활성을 나타내지 않았다 (도 7-B, D, F).

(10) 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa 단백질에 대한 마우스 단일클론 항체의 제조

(10)-1. 마우스에의 면역 및 세포 융합

실시예 (6)-1과 동일한 방법으로 PANC-1 세포의 균질화물로부터 RIPA 완충액으로 가용화시킨 불용성 분획 단백질을 제조하고, 약 180 µg 분에 대해서 10 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 전기 영동을 행하였다. 전기 영동 후, 겔을 코오마시 에 브릴리언트 블루로 염색하고, HoAKs-1 항체가 반응성을 나타내는 약 55 kDa 단백질에 상당하는 밴드를 추출하였다.

추출한 겔을 파쇄하고, 0.2 ml의 프로인트의 완전 보조제(Freund's complete ad(DIFCO LABORATORIES사 제조)와 혼합하여 마우스 (Balb/cA Jcl, 6 주령, 암컷, 닛본 구레아)의 복강에 주입하고, 첫회 면역을 행하였다. 또한 2 주간 후, 불완전 보조제와 겔을 혼합하고, 상기와 동일하게 제조를 하여 동일 마우스에 재차 면역을 실시하였다. 그 4 일 후, 동일 마우스의 췌장을 적출하고 림프구를 제조 (2.4×10⁸ 개)한 후, 표준법 (단일클론 항체 실험 메뉴얼, 고단사 사이언티픽 (Kodansha scientific) 출판)에 따라서 마우스 골수종 세포 P3U1과 융합시켰다. 융합시킨 세포는 배양액 D (eRDF+ 50 µg/ml 겐타마이신 황산염 + 10 % FCS)에 통상 사용되는 농도의 HAT를 첨가한 배양액에 현탁하고, 96 웰-플레이트에 접종하여, 37 °C, CO₂ 인큐베이터로 배양을 개시하였다. 융합으로부터 약 2 주간 후, 하이브리도마의 출현을 확인하고, 그 배양 상청액을 이용하여 약 55 kDa 단백질에 대한 반응성을 웨스턴 블롯팅법에 의해서 검출하여 목적의 하이브리도마를 선택하였다.

(10)-2. 약 55 kDa 단백질에 대한 반응성의 검출

PANC-1 세포의 균질화물로부터 RIPA 완충액으로 가용화시킨 불용성 분획 단백질 약 4 mg 분에 대해서 10 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 전기 영동을 행하고, 겔로부터 PVDF막에 단백질을 옮겨 블로킹하였다. (10)-1의 96 웰-플레이트의 각 웰에 대해서 그 배양 상청액을 회수하고, 옮긴 PVDF막과 37 °C에서 1 시간 반응시켰다. PVDF막을 PBS-T로 세정하고, HRP를 콘주게이션시킨 마우스 항체에 대한 염소 항체 (1000 배 희석, 카펠)을 가하여, 또한 37 °C에서 1 시간의 반응을 행하였다. 다음으로, PBS-T에서 PVDF막을 세정하고, 배양 상청액의 약 55 kDa의 단백질에 대한 반응성을 코니카 이뮤노스테인(Konica Immunostain) HRP-1000 (코니카 가부시끼 가이샤 제조)를 이용하여 검출하였다. 반응성이 검출된 웰에서 한계 희석법에 의해서 클로닝을 행하여, 하이브리도마주 2F6-1 및 3F9-1을 수립하였다.

(11) 항 55 kDa 마우스 단일클론 항체의 생 암세포 표면에서의 결합 활성

(11)-1. 항 55 kDa 마우스 단일클론 항체의 정제와 표지화

(10)-2에서 수립한 하이브리도마주 2F6-1 및 3F9-1을 배양하고, 각각의 배양 상청액을 회수하여 PROSEP-A에 걸어, 항체를 정제하였다. SDS-PAGE에 의해서 각각의 단일클론 항체는 모두 IgM인 것이 확인되었다. 정제한 각 항체를 비오틴닐화제를 사용하여 설명서에 따라서 비오틴 표지시킨 후, 겔 여과법에 의해서 표지 항체와 우리의 비오틴을 분리하였다.

(11)-2. 생 암세포 표면에서의 결합 활성

(9)와 동일하게 채장 세포주 PANC-1, 폐암 세포주 HLC-1 및 혈관 내피 세포 HUVECs를 96-웰 플레이트 (3603, 코닝사 제조)에 접종하고, 37 °C, 5 % CO₂의 환경에서 하루 배양한 후, (11)-1에 기재된 비오틴 표지한 항 55 kDa 마우스 단일클론 항체를 50 µg/ml의 농도 (0.05 % 아지드화나트륨 함유)로 첨가하고, 실온에서 60 분간 반응시켰다. 항체 용액을 제거한 후, 20 nM-Qdot™ 565 스트렙트아비딘 표지 (Quantm Dot Corporation사 제조) 용액 (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 가하여 실온에서 30 분간 반응을 행한 다음, 본 용액을 제거하고 PBS (0.05 % 아지드화나트륨함유)를 첨가하여, 공초점 형광 현미경 (CSU10, 요코가와 덴키 가부시키 가이샤 제조)에서의 관찰을 행하였다. 각 생세포 표면에 대한 항체의 결합 활성을 도 8에 나타내었다. 2F6-1 및 3F9-1 유래의 항체는 (9)에 기재된 HoAKs-1과 같이 PANC-1 세포와 HLC-1 세포에 대하여 그 생세포 표면에 결합 활성을 나타내었지만 (도 8-A, B, D, E), HUVECs 세포에 대한 결합 활성은 나타내지 않았다 (도 8-G, H).

(12) 웨스턴 블롯팅에 의한 항 비멘틴 항체 및 항 데스민 항체의 약 55 kDa 단백질에 대한 반응성

PANC-1 세포의 균질화물로부터 RIPA 완충액으로 가용화시킨 불용성 분획 단백질을 10 % 아크릴아미드 겔의 각 레인에 대하여 약 10 µg 올려 전기 영동을 행하고, 겔로부터 PVDF막에 단백질을 옮겨 블로킹을 행하였다. 항 비멘틴 마우스 단일클론 항체 (sc-6260, Santa Cruz Biotechnology사 제조) 및 염소 항 데스민 항체 (sc-7559, Santa Cruz Biotechnology사 제조)를 PVDF막과 37 °C, 1 시간 반응시킨 후, PVDF막을 PBS-T로 세정하여, HRP를 콘주게이션시킨 마우스 항체에 대한 염소 항체(1000 배 희석, 카펠) 또는 염소 항체에 대한 마우스 항체 (1000 배 희석)을 가한 다음, 37 °C에서 1 시간의 반응을 행하였다. 다음으로, PBS-T에서 PVDF막을 세정하고, 항체의 반응 물질을 웨스턴 블롯팅 시약으로 검출하였다. 항 비멘틴 항체는, 약 55 kDa의 단백질에 대하여 반응성을 나타내었지만, 항 데스민 항체의 반응성은 검출되지 않았다.

이들 결과로부터, HoAKs-1 항체가 인식하는 PANC-1 유래의 약 55 kDa 단백질은 비멘틴인 것으로 판단되고, 상기 단백질에 반응성을 갖는 항체에는 생 암세포 표면에 결합 활성을 갖는 것도 존재한다는 것이 증명되었다.

(13) γ-HoA. (재조합 HoAKs-1 항체)의 제조

(13-1) cDNA의 제조 및 HoAKs-1 가변 영역 DNA 단편의 취득

전 RNA (실시에 (7)에 기재)로부터의 cDNA의 조정 및 PCR 반응은 퍼킨 엘머 유전자 증폭 PCR 시스템 2400을 사용하고, 씨모 스크립트 RT-PCT 시스템 플러스 백금 태그 DNA 폴리머라아제 하이 피델리티(Thermo Script RT-PCR Systems plus platinum Tag DNA polymerase High Fidelity) (Invitrogen)를 이용하여 설명서에 따라서 행하였다. 중쇄의 cDNA를 제조하기 위한 프라이머에는 키트에 부속된 랜덤 6량체를 이용하였다. κ쇄의 cDNA를 제조하기 위한 프라이머에는, P1 (서열 122)를 사용하였다.

중쇄 및 κ쇄의 가변 영역의 증폭에는, 발현 플라스미드와 연결하기 위해 제한 효소 부위를 도입한 프라이머를 이용하였다. 중쇄 가변 영역의 증폭에는 5' 말단측에 Hind III 부위 및 신호 서열을 포함하는 P2 (서열 123), 3' 말단측에 Nhe I 부위를 포함하는 P3 (서열 124)를 이용하였다. κ쇄 가변 영역의 증폭에는 5' 말단측에 Hind III 부위 및 신호 서열을 포함하는 P4 (서열125), 3' 말단측에 BsiWI 부위를 포함하는 P5 (서열 126)을 이용하였다.

증폭된 중쇄 및 κ쇄 각각의 가변 영역 DNA 단편은 QIA 퀵(quick) PCR 정제 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 다음으로, 발현 벡터와 연결하기 위해서 DNA 단편을 제한 효소로 분해하였다. 중쇄 DNA 단편은 Hind III 및 Nhe I로 37 °C에서 2 시간 분해하였다. κ쇄 DNA 단편은 처음에 BsiWI에서 37 °C에서 2 시간 분해한 후, QIA 퀵 PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 정제하고, 또한 Hind III으로 37 °C에서 2 시간 분해하였다. 분해된 DNA 단편은 1.5 % 아가로스 전기 영동하여, 목적하는 DNA 단편을 QIA 퀵 겔 추출 키트 (QIAGEN)를 사용하여 정제하였다.

(13-2) 발현 플라스미드의 절단 및 플라스미드 단편의 취득

HoAKs-1의 인간 IgG1형 재조합 항체를 발현시키기 위해서 중쇄 발현용 플라스미드로서 중쇄 정상 영역의 서열을 포함하는 pEX-G1-WLpHy, κ쇄 발현용 플라스미드로서 κ쇄 정상 영역의 서열을 포함하는 pKS-κ'-Hind-5를 이용하였다. pEX-G1-WLpHy는 Hind III 및 Spe I에서 37 °C, 2 시간 분해하였다. pKS-κ'-Hind-5는 Asp 718에서 37 °C, 2 시간 분해한 후, QIA 퀵 PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 정제하고, 또한 Hind III에서 37 °C, 2 시간 분해하였다. 분해된 단편은 0.8 % 아가로오스 전기 영동하여 목적의 단편을 QIA 퀵 겔 추출 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다.

(13-3) HoAKs-1 가변 영역의 발현 플라스미드에의 연결

상기한 방법에 의해 얻어진 HoAKs-1의 중쇄 가변 영역을 포함하는 DNA 단편과 절단된 발현 플라스미드 pEX-G1-WLpHy는, 연결 키트(Ligation Kit) 버전 2. 1 (TAKARA)를 이용하여 설명서에 따라서 연결시켜 대장균 DH 5 α -T1 (Invitrogen)을 설명서에 따라서 형질전환하였다. 출현한 콜로니를 픽업하고, 인간 QIA 프랩 스핀 미니프랩 키트(프랩 스핀 미니프랩 키트) (QIAGEN)를 이용하여 플라스미드를 정제하였다. 중쇄 염기 서열을 포함하는 플라스미드는 Nde I에서 37 °C, 1 시간 분해하고, 1.5 % 아가로오스 전기 영동을 행하여 원하는 플라스미드 pEX-HoAKs-H를 얻었다. 얻어진 플라스미드는, 5' 말단측에 P6 (서열 127), 3' 말단측에 P7 (서열 128)를 이용하여 염기 서열을 확인하였다. HoAKs-1 재조합 항체의 중쇄 구조 유전자의 염기 서열을 서열 129에 나타낸다.

한편, HoAKs-1의 κ 쇄 가변 영역을 포함하는 DNA 단편과 절단된 발현 플라스미드 pKS- κ' -Hind-5는, 연결 키트 버전 2. 1 (TAKARA)를 이용하여, 설명서에 따라서 연결시켜, 대장균 DH5 α -T1 (Invitrogen)을 형질전환하였다. 출현된 콜로니를 픽업하여, QIA 프랩 스핀 미니프랩 키트 (QIAGEN)를 사용하여 플라스미드를 정제하였다. κ 쇄 염기 서열을 포함하는 플라스미드는 BsiWI에서 37 °C, 1 시간 분해하고, 1.5 % 아가로오스 전기 영동을 행하여 원하는 플라스미드 pKS-HoAKs-K를 얻었다. 얻어진 플라스미드는 5'말단 측에 P6, 3' 말단 측에 P1을 사용하여 염기서열을 확인하였다. HoAKs-1 재조합 항체의 κ 쇄 구조 유전자의 염기 서열을 서열 131에 나타낸다.

(13-3) HoAKs-1 중쇄와 HoAKs-1 κ 쇄를 포함하는 플라스미드의 연결

HoAKs-1의 중쇄와 κ 쇄를 하나의 플라스미드에 연결하기 위해서 상기에서 얻어진 플라스미드를 제한 효소로 분해하였다. pEX-HoAKs-H는 Nhe I에서 37 °C, 2 시간 분해하여, pKS-HoAKs-K는 NheI 및 SpeI에서 37 °C, 2 시간 분해하였다. 얻어진 단편은 QIA 퀵 PCR 정제 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 각각의 단편을 연결 키트 버전 2. 1 (TAKARA)를 이용하여 설명서에 따라서 연결시켜, 대장균 DH5 α -T1 (Invitrogen)을 형질전환하였다. 출현된 콜로니를 픽업하여, QIA 프랩 스핀 미니프랩 키트 (QIAGEN)를 이용하여 플라스미드를 정제하였다. 얻어진 플라스미드를 NheI에서 37 °C, 30 분간 분해하고, 0.8 % 아가로오스 전기 영동을 행하여 원하는 플라스미드 pEX-HoAKs-HK를 얻었다.

(13-4) γ -HoA. 발현 플라스미드의 제조

상기에서 얻어진 pEX-HoAKs-HK와 dhfr 유전자를 포함하는 플라스미드 pSV2 dhfr"를 연결시키고, γ -HoA. 발현용 플라스미드를 제조하였다. 방법으로는 우선 pEX-HoAKs-HK를 BamHI 및 NheI에서 37 °C, 2 시간 분해한 후, 0.8 % 아가로오스 전기 영동하여, 목적의 DNA 단편을 QIA 퀵 겔 추출 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. pSV2dhfr"는 BamHI 및 NheI에서 37 °C, 2 시간 분해한 후, 알칼리성 포스파타아제 (TAKARA)를 첨가하여 65 °C, 15 분간 처리하여 QIA 퀵 PCR 정제 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다. 그 후 0.8 % 아가로오스 전기 영동하여, 목적의 DNA 단편을 QIA 퀵 겔 추출 키트 (QIAGEN)를 이용하여 정제하였다.

각각의 단편을 연결 키트 버전 2. 1 (TAKARA)를 이용하여, 설명서에 따라서 연결시켜, 대장균 DH5 α -T1 (Invitrogen)을 형질전환하였다. 출현된 콜로니를 픽업하여 QIA 프랩 스핀 미니프랩 키트 (QIAGEN)를 이용하여 플라스미드를 정제하였다. 얻어진 플라스미드를 NdeI에서 37 °C, 1 시간 분해한 후, 1.5 % 아가로오스 전기 영동을 행하여 재조합 항체를 발현시키기 위한 원하는 플라스미드 pEX-HoAKs-HK/pSV2dhfr"를 얻었다.

(13-5) γ -HoA. 생산 세포의 제조

γ -HoA. 생산을 위한 세포주로서, 무혈청 배지에서 배양 가능한 CHO (DG325)세포주를 사용하였다. CHO (DG325)를 CHO-S-SFMII (GIBCO)로써 1 \times 10⁶ 세포/ml로 조정하였다. 2 μ g의 pEX-HoAKs-HK/pSV2dhfr" DNA와 6 μ L의 FuGENE 6 (Roche)를 혼합하고, 설명서에 따라서 CHO (DG325)에 형질감염시켰다. 형질감염된지 5 시간 후에 EX-CELL325-PF (니치레이(Nichirei))를 첨가하였다. 2 일간 배양 후, G418 술페이트 (Promega) 400 μ g/ml 및 메토트렉세이트 (Sigma) 0, 25, 또는 50 nM을 선택 시약으로서 배지에 첨가하여 배양하고 γ -HoA.을 생산하는 세포를 얻었다.

(13-6) ELISA 분석법을 이용한 항체 생산량의 측정

세포가 생산하는 γ -HoA.의 생산량은 샌드위치 ELISA법에 의해 측정하였다. 우선, 토끼 항 인간 면역 글로불린 항체 (CAPPEL)를 50 μ g/ml에 용액 1 (PBS)로 희석하고, 96 웰 가요성 플레이트 (FALCON)에 50 μ L/웰씩 첨가하여, 37 °C에

서 2 시간 처리하였다. 그 후, 웰의 용액을 버리고, 각 웰에 용액 2를 200 μ L씩 첨가하여, 4 $^{\circ}$ C에서 16 시간 이상 처리하였다. 각 웰의 용액을 버리고, 용액 2(0.1 % 젤라틴/PBS/0.05 % Tween 20)으로 희석한 배양 상청액을 50 μ L/웰씩 첨가하여, 4 $^{\circ}$ C에서 16 시간 이상 반응시켰다. 반응 후, 각 웰의 용액을 버리고, 용액 3 (PBS/0.05 % Tween 20)으로 5 회 세정한 후, 용액 2로 1000 배로 희석한 HRP 표지 토끼 항 인간 면역 글로불린 항체(CAPPEL)를 50 μ L/웰씩 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 반응시켰다. 각 웰의 용액을 버리고, PBS/0.05 % Tween 20으로 5 회 세정한 후, o-페닐렌디아민정 (와코 준야꾸)를 50 mM 시트르산 완충액 (pH 5.0)으로 용해되고 과산화 수소수가 첨가된 기질액 (차광 · 사용전 조정)을 50 μ L/웰로 첨가하였다. 실온에서 3 분간 정도 발색시킨 후, 1N H₂SO₄를 50 μ L/웰을 첨가하여 반응을 정지시키고, 멀티 플레이트 리더 SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices)로 L1=495 nm 및 L2=650 nm의 흡광도 A1 및 A2를 측정하여 (A1-A2)를 산출하였다. 인간 IgG1 κ (CAPPEL)을 희석하여 표준 용액으로서 검량선을 제조하고, 배양 상청액 중의 항체량을 산출하였다. 산출한 결과로부터 항체의 생산량이 가장 높은 세포를 선택하고, γ -HoA의 생산에 이용하였다.

(13-7) γ -HoA의 정제

상기에서 얻어진 γ -HoA. 생산 세포주를 G418 술페이트 (Promega) 및 메토틱렉세이트 (Sigma)을 첨가한 EX-CELL 325-PF (니치레이)로 배양하고, γ -HoA.를 포함하는 배양액을 얻었다. 다음으로, 그 배양액을 PROSEP-A에 가함으로써 γ -HoA.를 흡착시키고, 그 후 용출시킴으로써 γ -HoA.를 정제하였다. 또한 도면에는 나타나지 않았지만 γ -HoA.는 SDS-PAGE에서 순수한 IgG인 것이 확인되었다.

(14) 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa 단백질에 대한 γ -HoA.의 반응성의 검출

PANC-1 세포의 균질화물로부터 RIPA 완충액으로 가용화시킨 불용성 분획 단백질을 각 10 μ g 분에 대해서 10 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 전기 영동을 행하고, 겔로부터 PVDF막에 단백질을 옮겨 블로킹하였다. 옮긴 PVDF막을 상기 (13-7)에 기재된 정제 γ -HoA.와 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 반응시켰다. PVDF막을 PBS-T에서 세정하고, HRP를 콘쥬게이션시킨 인간 항체에 대한 염소 항체 (1000 배 희석, 카펠)을 가하여 또한 37 $^{\circ}$ C, 1 시간의 반응을 행하였다. 다음으로, PBS-T에서 PVDF막을 세정하고, 약 55 kDa의 단백질에 대한 γ -HoA.의 반응성을 웨스턴 블롯팅 루미놀 시약 (Santa Cruz Biotechnology)로 검출한 결과, γ -HoA.는 HoAKs-1과 마찬가지로 약 55 kDa의 단백질에 대하여 반응성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

(15) γ -HoA.의 생 암세포 표면에서의 결합 활성

췌장암 세포주 PANC-1, 폐암 세포주 HLC-1 및 혈관 내피 세포 HUVECs를 96-웰 플레이트 (3603, 코닝사 제조)에 접종하여, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂의 환경에서 배양을 1 일 행한 후, (13-7)에 기재된 정제 γ -HoA. (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 첨가하여, 실온에서 60 분간 반응시켰다. γ -HoA.용액을 제거한 후, FITC를 콘쥬게이션시킨 인간 항체에 대한 염소 항체 (20 배 희석, 카펠) (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 실온에서 30 분간 반응시키고, 본 용액을 제거하고 PBS (0.05 % 아지드화나트륨 함유)를 첨가하여, 공초점 형광 현미경 (CSU 10, 요코가와 덴끼 가부시키 가이샤 제조)에서 관찰을 행하였다. 각 생세포 표면에 대한 항체의 결합 활성을 도 9에 나타내었다. γ -HoA.는, (9)에 기재된 HoAKs-1과 같이 PANC-1 세포와 HLC-1 세포에 대하여 그 생세포 표면에 결합 활성을 나타내었지만 (도 9-A, C), HUVECs 세포에 대한 결합 활성은 나타나지 않았다 (도 9-E).

산업상 이용 가능성

본 발명에서 얻어진 단일클론 항체를 이용함으로써, 암조직, 특히 비-소세포 폐암, 췌장암 또는 위암을 선택적으로 공격하는 암 치료약을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 인간 단일클론 항체를 이용한 경우, 부작용이 적고 연속 투여 가능한 암 치료약을 제공할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

중쇄 가변 영역에 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 2.

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역에 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 3.

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역에 서열 115의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 4.

경쇄 가변 영역에 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 5.

제4항에 있어서, 경쇄 가변 영역에 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 6.

제4항에 있어서, 경쇄 가변 영역에 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 7.

중쇄 가변 영역이 서열 86, 88 및 90의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 92, 94 및 96의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 8.

제7항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 82의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 9.

제7항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 115의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열 117의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체.

청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체인 단일클론 항체.

청구항 11.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체를 코딩하는 DNA.

청구항 12.

제11항에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 85, 87 및 89의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 91, 93 및 95의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 13.

제11항 또는 제12항에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 81의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 83의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 14.

제11항 또는 제12항에 있어서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 114의 염기 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 영역이 서열 116의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 15.

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 DNA를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 16.

제15항에 따른 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 17.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 18.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체를 포함하는 의약 조성물.

청구항 19.

제18항에 있어서, 암 치료약인 의약 조성물.

청구항 20.

제19항에 있어서, 암 치료약이 비-소세포(non-small cell) 폐암, 췌장암 및 위암으로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암에 대한 암 치료약인 의약 조성물.

청구항 21.

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단일클론 항체를, 독소 또는 항암제를 내포하는 리포솜의 표면에 담지시킨 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 22.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체를 포함하는 진단 시약.

청구항 23.

- (a) 세포 골격의 필라멘트에 대해 반응성을 갖는 성질 및(또는)
- (b) 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 성질을 갖는 폴리펩티드.

청구항 24.

- (a) 서열 107의 아미노산 서열을 포함하는 인간 췌장암 세포주 PANC-1 유래의 약 55 kDa의 단백질을 특이적으로 인식하는 성질 및(또는)
- (b) 정상 세포에 대해서는 형태 변화를 일으키지 않고, 암세포에 대해서는 형태 변화를 일으키는 성질을 갖는 폴리펩티드.

청구항 25.

제24항에 있어서, 약 55 kDa의 단백질이 비멘틴(vimentin)인 폴리펩티드.

청구항 26.

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 형태 변화가, 축색상의 형태, 섬유 아세포-유사 형태 및 신경 돌기를 갖는 신경 세포-유사 형태로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 형태로의 형태 변화인 폴리펩티드.

청구항 27.

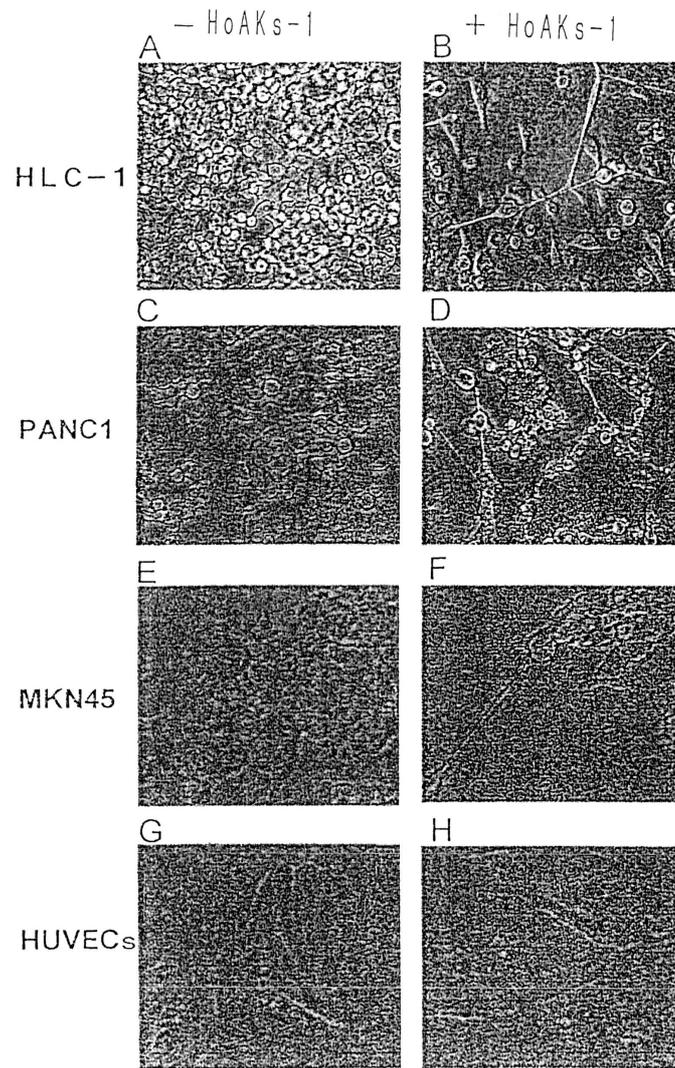
제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 28.

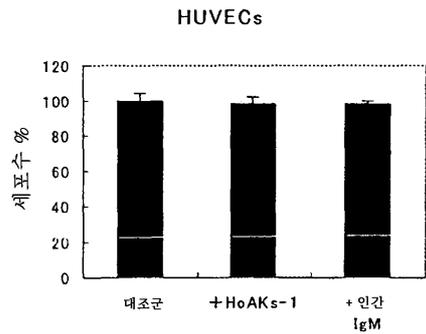
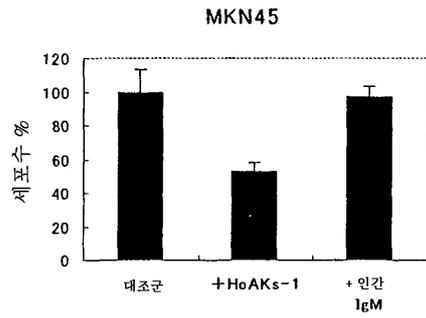
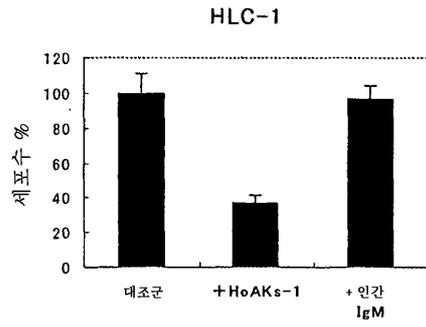
제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물.

도면

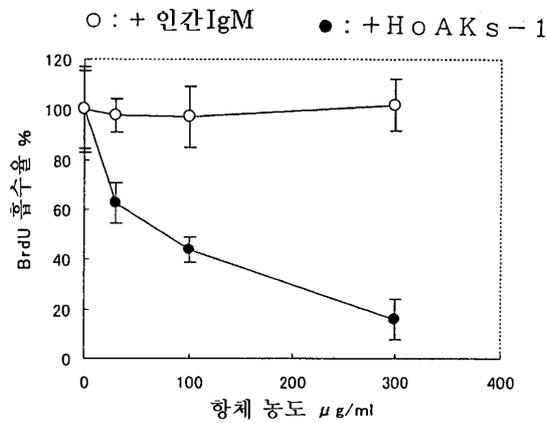
도면1



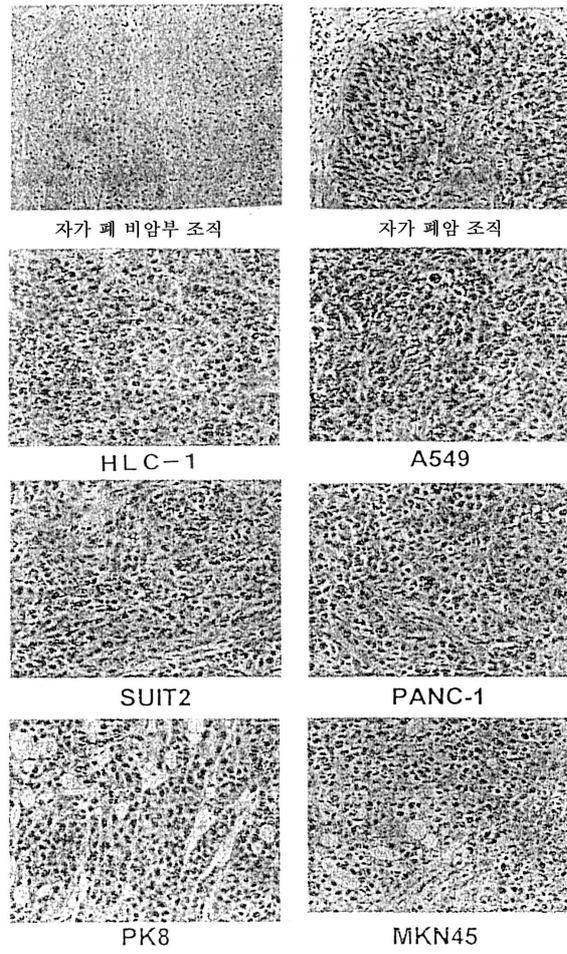
도면2



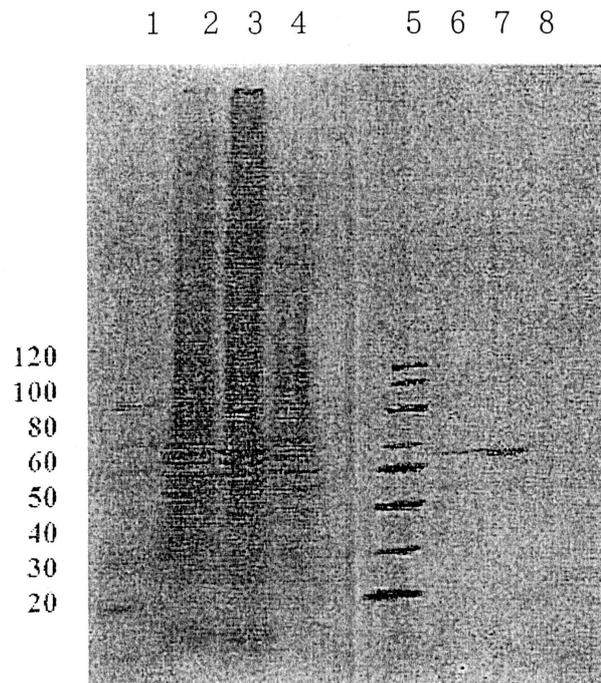
도면3



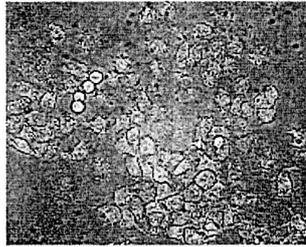
도면4



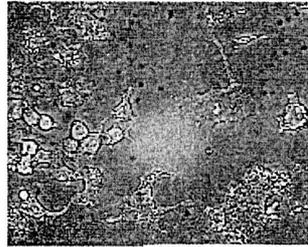
도면5



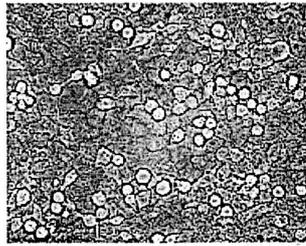
도면6



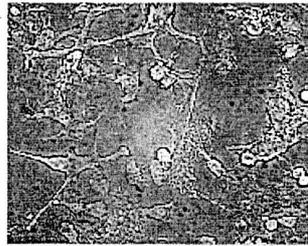
-HoAKs-1 8-일간 배양



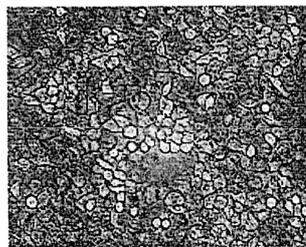
+ HoAKs-1 5-일간 배양 후,
- HoAKs-1 3-일간 배양



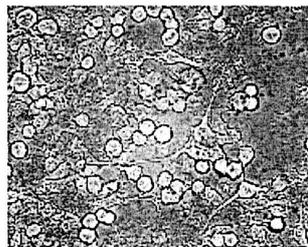
- HoAKs-1 11-일간 배양



+ HoAKs-1 5-일간 배양 후,
- HoAKs-1 6-일간 배양

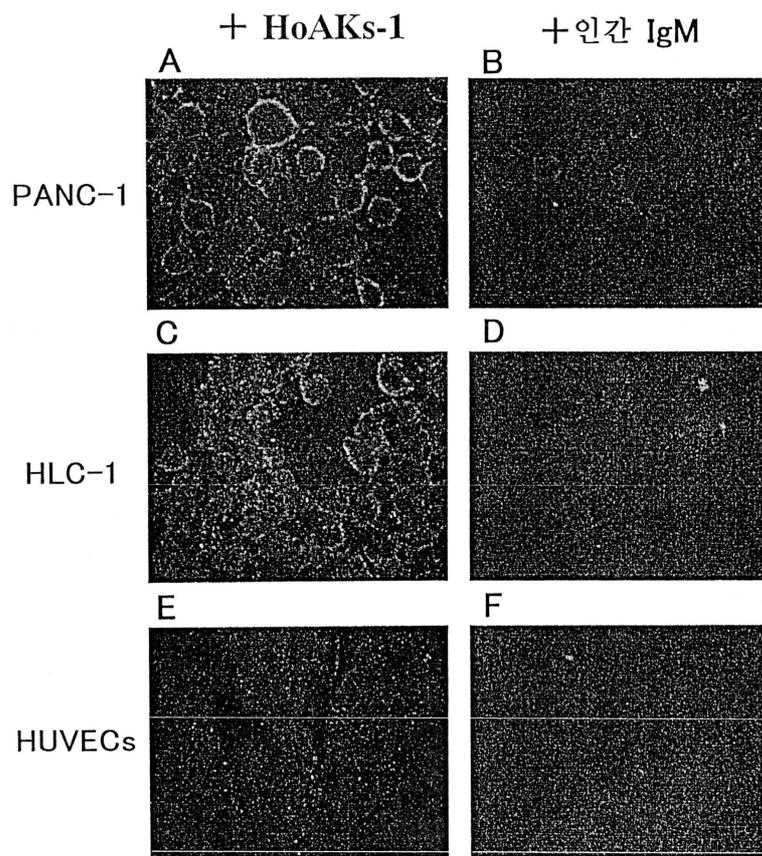


- HoAKs-1 12-일간 배양

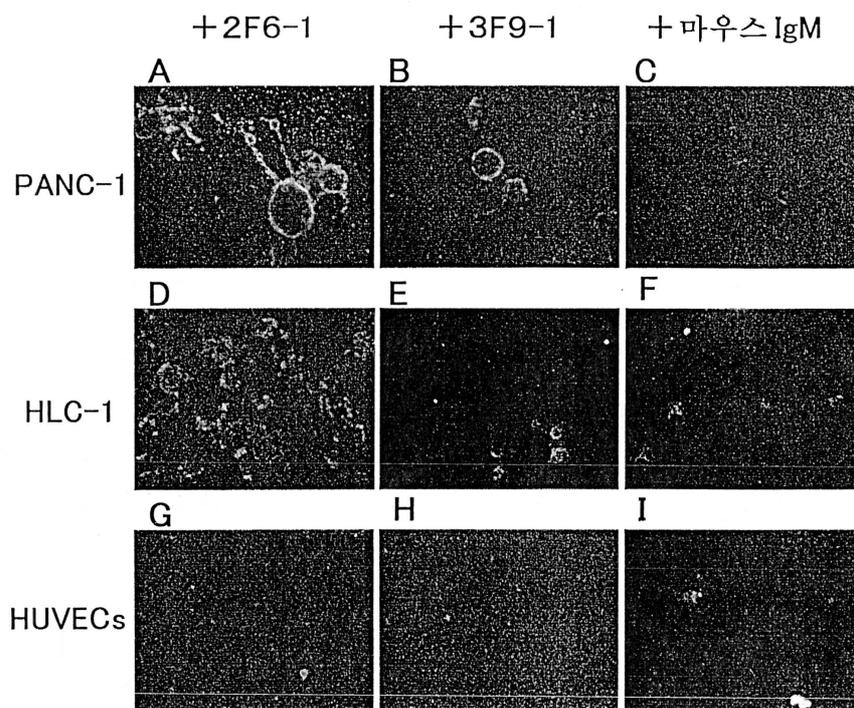


+ HoAKs-1 5-일간 배양 후,
- HoAKs-1 7-일간 배양

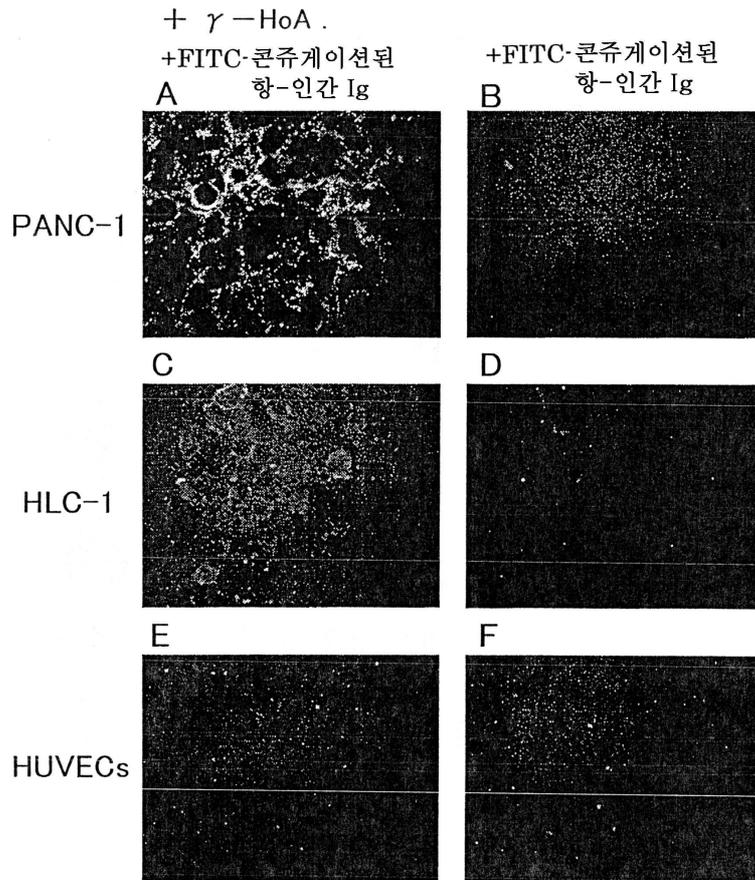
도면7



도면8



도면9



SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Pharma Corporation
Keio University

<120> MONOCLONAL ANTIBODY AND GENE ENCODING THE SAME, HYBRIDOMA, PHARMACEUTICAL
COMPOSITION, AND DIAGNOSTIC REAGENT

<130> MP5014-1736

<150> JP 2003/54670

<151> 2003-02-28

<150> JP 2003/194643

<151> 2003-07-09

<160> 132

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 1

cag gtg cag ctg gtg cag tct gg

23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser

1 5

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 3

cag gtc aac tta agg gag tct gg

23

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser

1 5

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 5
 gag gtg cag ctg gtg gag tct gg 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 7
 cag gtg cag ctg cag gag tcg gg 23
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
1 5

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 9

gag gtg cag ctg ttg cag tct gc 23
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser
1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser
1 5

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 11

cag gta cag ctg cag cag tca gg 23
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
1 5

<210> 12

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 13
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

24

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 15
 ggg aca atg gtc acc gtc tct tca
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

24

1 5

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 17

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

24

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 19
 ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 21
 gac atc cag atg acc cag tct cc
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 1 5

23

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 23

gat gtt gtg atg act cag tct cc 23

Asp Val Val Met Thr Gln Ser

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Val Val Met Thr Gln Ser

1 5

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 25

gaa att gtg ttg acg cag tct cc 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser

1 5

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 27

gac atc gtg atg acc cag tct cc

23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser

1 5

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 29

gaa acg aca ctc acg cag tct cc

23

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser

1 5

<210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 31
 gaa att gtg ctg act cag tct cc 23
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
 1 5

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 33
 ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt 24
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 35
 ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 24
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 37
 ggg acc aaa gtg gat atc aaa cgt 24
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 1 5

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1 5

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 39

ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5

24

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 41

ggg aca cga ctg gag att aaa cgt
Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5

24

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5

<210> 43
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 43

cag tct gtg ttg acg cag ccg cc
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 1 5

23

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 1 5

<210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 45
 cag tct gcc ctg act cag cct gc
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 1 5

23

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 1 5

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 47
 tcc tat gtg ctg act cag cca cc
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro
 1 5

23

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro
 1 5

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 49

tct tct gag ctg act cag gac cc 23

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp

1 5

<210> 51

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 51

cac gtt ata ctg act caa ccg cc 23

His Val Ile Leu Thr Gln Pro

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

His Val Ile Leu Thr Gln Pro

1 5

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 53

cag gct gtg ctc act cag ccg tc
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro
1 5

23

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro
1 5

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 55

aat ttt atg ctg act cag ccc ca
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro
1 5

23

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro
1 5

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 57

ggg acc aag gtc acc gtc cta ggt
 Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 1 5

24

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 1 5

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> primer

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 59

ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 1 5

24

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 1 5

<210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> primer

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 61
 ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt 24
 Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 1 5

<210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 1 5

<210> 63
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <223>

<400> 63
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac 336
 Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65

<211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <223>

<400> 65
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac 336
 Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110
 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 66
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```

                20                25                30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35                40                45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50                55                60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                70                75                80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85                90                95

Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
          100                105                110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115                120

```

<210> 67
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <223>

```

<400> 67
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                5                10                15

tcc ctg aga ctc tcc tat gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Tyr Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20                25                30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35                40                45

gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tgc tac gca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Cys Tyr Ala Asp Ser Val
          50                55                60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                70                75                80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

85 90 95
 gcg aga gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac 336
 Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Tyr Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Cys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (369)
 <223>

<400> 69

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac 336
 Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

<213> Homo sapiens

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 73

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223>

<400> 73

gac atc gtg atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat aag gca tct agt tta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tat tct aac 288
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn
 85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 75
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223>

<400> 75

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

100

105

<210> 77
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223>

<400> 77
 gac atc gtg atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 gac aga gtc acc gtc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

 ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 tat aag gca tct agt tta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 agt gga tct ggg acg gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tat tct aac 288
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn
 85 90 95

 act ttt ggc cag ggg acc aaa gtg gat atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

<210> 78
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 80
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 81
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <223>

<400> 81

gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc trt gca gcc 48
 Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
 1 5 10 15

tct gga ttc acc ttc agt agc tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct 96
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc 144
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser

```

          35                40                45
aat aaa trc tac gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga      192
Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
      50                55                60

gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct      240
Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
65                70                75                80

gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat cgg cac tcc tac gat      288
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp
      85                90                95

ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac tgg ggc cag                          321
Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
      100                105

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)
<223> The 'Xaa' at location 14 stands for Cys, or Tyr.

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)
<223> The 'Xaa' at location 51 stands for Cys, or Tyr.

<400> 82

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
1                5                10                15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
      20                25                30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
      35                40                45

Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
      50                55                60

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
65                70                75                80

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp
      85                90                95

```

Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105

<210> 83
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(276)
 <223>

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (258)
 <223> n = t or c

<400> 83
 tcc acc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc rtc act tgc cgg 48
 Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Xaa Thr Cys Arg
 1 5 10 15

gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca 96
 Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 20 25 30

ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat aag gca tct agt tta gaa agt 144
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 35 40 45

ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act 192
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 50 55 60

ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc 240
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 65 70 75 80

caa cag tat aat agt tan tct aac act ttt ggc cag 276
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln
 85 90

<210> 84
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)

<223> The 'Xaa' at location 13 stands for Val, or Ile.

<400> 84

Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Xaa Thr Cys Arg
 1 5 10 15

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 20 25 30

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 35 40 45

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 50 55 60

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 65 70 75 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln
 85 90

<210> 85

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 85

agc tat gct atg cac
 Ser Tyr Ala Met His
 1 5

15

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 87

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<223>

<400> 87

gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa trc tac gca gac tcc gtg aag 48

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

ggc 51

Gly

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)

<223> The 'Xaa' at location 10 stands for Cys, or Tyr.

<400> 88

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 89

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(42)

<223>

<400> 89

gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac 42

Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 90

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 91
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)
 <223>

<400> 91

cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc 33
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 93
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 93

aag gca tct agt tta gaa agt 21
 Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 95
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)
 <223> n = t or c

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(27)
 <223>

<400> 95
 caa cag tat aat agt tan tct aac act
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr
 1 5

27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 332
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Homo sapiens or Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 <223>

<400> 97
 gaa att gtg ctg act cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

48

cag agg gcc acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

96

20	25	30	
ggc tat agt tat atg cac tgg aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc			144
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35	40	45	
aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc			192
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala			
50	55	60	
agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat			240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His			
65	70	75	80
cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg			288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg			
85	90	95	
gag ctt aca cgt tcg gag ggg gga cca agg tgg aaa tca aac ga			332
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Arg Trp Lys Ser Asn			
100	105	110	
<210> 98			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> Unknown			
<220>			
<223> Homo sapiens or Mus musculus			
<400> 98			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
20	25	30	
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35	40	45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His			
65	70	75	80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg			
85	90	95	
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Arg Trp Lys Ser Asn			
100	105	110	

<210> 99
 <211> 332
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Homo sapiens or Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 <223>

<400> 99
 gat gtt gtg atg act cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

cag agg gcc acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

ggc tat agt tat atg cac tgg aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc 192
 Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg 288
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
 85 90 95

gag ctt aca cgt tcg gag ggg gga cca agg tgg aaa tca aac ga 332
 Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Arg Trp Lys Ser Asn
 100 105 110

<210> 100
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> Homo sapiens or Mus musculus

<400> 100
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

<400> 103
gat gtt gtg atg act cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg 48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
cag agg gcc acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
ggc tat agt tat atg cac tgg aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc 192
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95
gag ctt aca cgt tcg gag ggg gga cca agc tgg aga tca aac ga 332
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
100 105 110

<210> 104
<211> 110
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Homo sapiens or Mus musculus

<400> 104
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

<213> Unknown

<220>

<223> Homo sapiens or Mus musculus

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
 85 90 95

Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
 100 105 110

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Val Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Arg Phe Ala Asn
 1 5 10

210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 108

tggaagaggc acgttctttt cttt

24

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 109

agactctccc ctgttgaagc tctt

24

<210> 110

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<223>

<400> 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg agt gca tcc gcc cca acc ctt

48

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu

1 5 10 15

ttc ccc ctc

57

Phe Pro Leu

<210> 111

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu

1 5 10 15

Phe Pro Leu

<210> 112

<211> 99

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(99)

<223>

<400> 112

ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc

48

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

1 5 10 15

atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt 96
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 20 25 30

gtg 99
 Val

<210> 113
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 20 25 30

Val

<210> 114
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)
 <223>

<400> 114

gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc trt gca gcc 48
 Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
 1 5 10 15

tct gga ttc acc ttc agt agc tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct 96
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc 144
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
 35 40 45

aat aaa trc tac gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga 192
 Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 50 55 60

gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct 240
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 65 70 75 80

gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat cgg cac tcc tac gat 288
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp
 85 90 95

ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc 336
 Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

gtc tcc tca 345
 Val Ser Ser
 115

<210> 115
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)
 <223> The 'Xaa' at location 14 stands for Cys, or Tyr.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)
 <223> The 'Xaa' at location 51 stands for Cys, or Tyr.

<400> 115

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
 35 40 45

Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 50 55 60

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp
 85 90 95

Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

```

100                               105                               110

Val Ser Ser
    115

<210> 116
<211> 300
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (258)
<223> n = t or c

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(300)
<223>

<400> 116
tcc acc ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc rtc act tgc cgg      48
Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Xaa Thr Cys Arg
1                               5                               10                               15

gcc agt cag agt att agt agc tgg ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca      96
Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                20                               25                               30

ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tat aag gca tct agt tta gaa agt      144
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
                35                               40                               45

ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act      192
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
                50                               55                               60

ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc      240
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
65                               70                               75                               80

caa cag tat aat agt tan tct aac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg      288
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
                85                               90                               95

gag atc aaa cga
Glu Ile Lys Arg
    100

<210> 117
<211> 100
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)

<223> The 'Xaa' at location 13 stands for Val, or Ile.

<400> 117

```

Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Xaa Thr Cys Arg
1          5          10          15

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
20          25          30

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
35          40          45

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
50          55          60

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
65          70          75          80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
85          90          95

Glu Ile Lys Arg
100
    
```

<210> 118

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

<223>

<400> 118

```

gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc trt gca gcc      48
Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
1          5          10          15

tct gga ttc acc ttc agt agc tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct      96
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
20          25          30

cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc      144
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
35          40          45
    
```

aat aaa trc tac gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga 192
 Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 50 55 60

gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct 240
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 65 70 75 80

gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat cgg cac tcc tac gat 288
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp
 85 90 95

ttt tgg agt ggg tcc ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc 336
 Phe Trp Ser Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

gtc tcc tca ggg agt gca tcc gcc cca acc ctt ttc ccc ctc 378
 Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu
 115 120 125

<210> 119
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)
 <223> The 'Xaa' at location 14 stands for Cys, or Tyr.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)
 <223> The 'Xaa' at location 51 stands for Cys, or Tyr.

<400> 119

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Xaa Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
 35 40 45

Asn Lys Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 50 55 60

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca 336
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 100 105 110

tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg 375
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 115 120 125

<210> 121
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)
 <223> The 'Xaa' at location 13 stands for Val, or Ile.

<400> 121

Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Xaa Thr Cys Arg
 1 5 10 15

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 20 25 30

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 35 40 45

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 50 55 60

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 65 70 75 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 85 90 95

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 100 105 110

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 115 120 125

<210> 122
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 122
 cctgggagtt acccgattgg agggc 25

<210> 123
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 123
 cccaagcttc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60

ggtcctgtcc gaggtgcagc tgggtggagtc tggg 94

<210> 124
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 124
 cccgctagct gaggagacgg tgaccagggt 30

<210> 125
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 125
 cccaagctta tggcgttgca gaccagggtc ttcatttctc tgttgctctg gatctctggt 60

gcctacgggg acatcgtgat gaccagtct cc 92

<210> 126
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 126
 ccccgtagct ttgatctcca gcttggtccc 30

<210> 127
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 127
 ccactgctt actggcttat cg 22

<210> 128
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 128
 ggtgctcttg gaggagg 18

<210> 129
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1419)
 <223>

<400> 129
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtc ctg tcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

agt agc tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac gca 240
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gcg aga gat cgg cac tcc tac gat ttt tgg agt ggg tcc 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser
 115 120 125

ctt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agt 432
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc 480
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160

tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc 528
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175

gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg 576
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190

cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc 624
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205

agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc 672
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220

tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt 720
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca 768
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 816
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 864
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 912
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag 960
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320

tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 1008
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc 1056
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 1104
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc 1152
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 1200
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 1248
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac 1296
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 1344
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cat aag 1392
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr His Lys
 450 455 460

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

1419

<210> 130
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 130

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser
 115 120 125

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

<211> 705
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(705)
 <223>

<400> 131
 atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48
 Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggg gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
 20 25 30

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

att agt agc tgg ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192
 Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

aag ctc ctg atc tat aag gca tct agt tta gaa agt ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat 336
 Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

agt tat tct aac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 384
 Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

acc gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165	170	175	
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc			576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
180	185	190	
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa			624
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
195	200	205	
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc			672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
210	215	220	
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag			705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230		
<210> 132			
<211> 234			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 132			
Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser			
1 5 10 15			
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser			
20 25 30			
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser			
35 40 45			
Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
50 55 60			
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
65 70 75 80			
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
85 90 95			
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn			
100 105 110			
Ser Tyr Ser Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
115 120 125			
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
130 135 140			

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230