(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월06일
(11) 등록번호 10-2161657
(24) 등록일자 2020년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7021908(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 2019년08월26일
(85) 번역문제출일자 2019년07월25일
(65) 공개번호 10-2019-0090884
(43) 공개일자 2019년08월02일
(62) 원출원 특허 10-2013-7031347
원출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 2017년04월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/035614
(87) 국제공개번호 WO 2012/149440
국제공개일자 2012년11월01일
(30) 우선권주장
61/480,961 2011년04월29일 미국(US)
61/617,241 2012년03월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20050158307 A1
US20080242845 A1
US20110081345 A1

(73) 특허권자
유니버시티 오브 워싱톤 스루 이츠 센터 포 커머셜리제이션
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 캠퍼스 박스 354990 스위트 500 노오스이스트 11 애비뉴 4311
(72) 발명자
레드베터, 제프리, 에이.
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 스위트 500 노오스이스트 11 애비뉴 4311 유니버시티 오브 워싱톤 사업화 센터 내
헤이든-레드베터, 마사
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 스위트 500 노오스이스트 11 애비뉴 4311 유니버시티 오브 워싱톤 사업화 센터 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

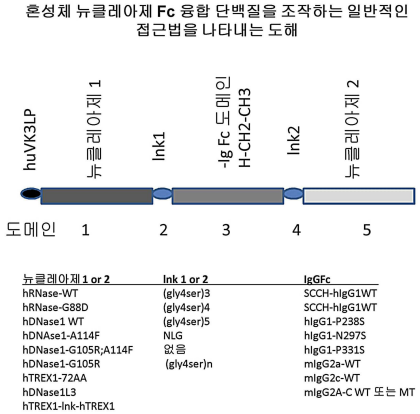
전체 청구항 수 : 총 28 항 심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 **치료적 뉴클레아제 조성물 및 방법**

(57) 요 약

포유류에서 면역-관련 질환 또는 장애를 치료하기 위한 혼성체 뉴클레아제 분자 및 방법, 및 포유류에서 면역-관련 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/68 (2017.08)
A61K 47/6815 (2017.08)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 16/44 (2013.01)
C12Y 301/27005 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
(72) 발명자
엘콘, 키이스
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 스위트 500 노오스 이스트 11 애비뉴 4311 유니버시티 오브 워싱톤 사업화 센터 내
썬, 시장
미국 워싱턴 98105-4608 시애틀 스위트 500 노오스 이스트 11 애비뉴 4311 유니버시티 오브 워싱톤 사업화 센터 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

RNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하는데 유효한 뉴클레아제-함유 조성물이고,

상기 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체, 및 RNase 도메인 및 변형된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 RNase 도메인은 상기 변형된 Fc 도메인에 작동가능하게 연결되고, 상기 변형된 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함하며,

상기 폴리펩티드는 서열번호 96, 92, 62, 또는 78에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 3

RNA, DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하는데 유효한 뉴클레아제-함유 조성물이고,

상기 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체, 및 RNase 도메인, DNase 도메인 및 변형된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 RNase 도메인 및 DNase 도메인은 상기 변형된 Fc 도메인에 작동가능하게 연결되고, 상기 변형된 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함하며,

상기 폴리펩티드는 서열번호 98 또는 94에 제시된 아미노산 서열을 포함하고,

상기 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 5

RNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하는데 유효한 뉴클레아제-함유 조성물이고,

상기 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체, 및 RNase 도메인 및 변형된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 이량체를 포함하고, 상기 RNase 도메인은 상기 변형된 Fc 도메인에 작동가능하게 연결되고, 상기 변형된 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함하며,

상기 폴리펩티드는 서열번호 96, 92, 62, 또는 78에 제시된 아미노산 서열을 포함하고,

상기 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 7

RNA, DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하는데 유효한 뉴클레아제-함유 조성물이고,

상기 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체, 및 RNase 도메인, DNase 도메인 및 변형된 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 이량체를 포함하고, 상기 RNase 도메인 및 DNase 도메인은 상기 변형된 Fc 도메인에 작동가능하게 연결되고, 상기 변형된 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함하며,

상기 폴리펩티드는 서열번호 98 또는 94에 제시된 아미노산 서열을 포함하고,

상기 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것인, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 Fc 도메인은 Fcγ 수용체, 보체 단백질, 또는 이들 모두에 대한 결합이 감소하도록 변형된 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 비해서 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5배 적은 세포독성을 갖는 것인 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 Fc 도메인은

C220S;

C220S, C226S, C229S;

G236R;

L328R;

L234A; 및

L235A;

로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 변형된 Fc 도메인은 C220S 돌연변이를 포함하는 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 13

제1항, 제2항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNase 도메인 단독에 비해서 증가된 혈청 반감기를 갖는 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 14

제3항, 제4항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNase 도메인 단독 또는 DNase 도메인 단독에 비해서 증가된 혈청 반감기를 갖는 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 인터페론-α 생성을 저해하는 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNase의 활성은 대조군 야생형 RNase 분자의 활성보다 약 9배 적은 것 이상인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNase의 활성은 대조군 야생형 RNase 분자의 활성과 대략 동등한 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 18

제3항, 제4항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNase의 활성은 대조군 야생형 DNase 분자의 활성보다 약 9배 적은 것 이상인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 19

제3항, 제4항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNase의 활성은 대조군 야생형 DNase 분자의 활성과 대략 동등한 것인, 뉴클레아제-함유 조성물.

청구항 20

대상의 RNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하기 위한 의약이고, 상기 의약은 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 의약은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것이며, 상기 의약은 자가면역질환의 예방 또는 치료용인, 의약.

청구항 21

대상의 RNA, DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 면역 복합체를 분해하기 위한 의약이고, 상기 의약은 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 상기 의약은 정맥내 투여를 위해 제형화된 것이며, 상기 의약은 자가면역질환의 예방 또는 치료용인, 의약.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 이량체(dimeric) 폴리펩티드이고,

상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 의약.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 동종이량체(homodimer)인, 의약.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 이량체(dimeric) 폴리펩티드이고,

상기 제1 폴리펩티드는 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 의약.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 동종이량체(homodimer)인, 의약.

청구항 26

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역질환은 SLE인, 의약.

청구항 27

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역질환은 루푸스 신장염(lupus nephritis)인, 의약.

청구항 28

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역질환은 쇼그렌 증후군인, 의약.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2011년 4월 29일 제출된 미국 가 출원 No. 61/480,961 및 2012년 3월 29일 제출된 미국 가 출원 61/617,241에 대하여 우선권을 주장한다. 또한, 본 출원은 2010년 11월 2일 제출된 국제 특허출원 No. PCT/US2010/055131, 2009년 11월 2일 제출된 미국 가 출원 No. 61/257,458, 및 2010년 8월 4일 제출된 미국 가 출원 No. 61/370,752와 관련된다. 전술한 출원들의 전체 명세서는 그 전체가 모든 목적을 위해서 본원에 참고 자료로서 포함된다. 국내건강학회(Grants AI44257, NS065933 및 AR048796), 루프스연구협회 및 워싱턴주 생명 과학개발기금(2087750)의 지원을 받아 본 발명은 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 가진다.

배 경 기 술

[0002] 죽은 세포와 죽어가는 세포로부터 (리보)뉴클레오단백질 입자들의 과도한 방출은 두 가지 메커니즘에 의해서 루프스 병증을 일으킬 수 있는데,(i) 염색질/항염색질 복합체의 부착 또는 제자리(in situ) 형성이 신장염을 일으켜 신장 기능의 손실을 초래하고,(ii) 뉴클레오단백질이 톨(toll)-유사 수용체(TLR) 7, 8 및 9는 물론 TLR-독립적 경로(들)을 통해 선천적 면역을 활성화한다. 뉴클레오단백질의 방출은 SLE에서 자기항체에 대한 효능 있는 항원으로 작용할 수 있으며, 항원 수용체와 TLR의 공동-연계를 통해서 B 세포 및 DC 활성화의 증폭을 제공한다. 따라서, 필요한 대상에서 자극성 항원을 제거하고 및/또는 면역 자극, 면역 증폭 및 면역 복합체 매개 질환을 약화시키기 위한 수단에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0003] 제1 뉴클레아제 도메인 및 변형된 Fc 도메인을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자가 본원에 개시되며, 상기 제1 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인에 작동 가능하게 연결된다. Fc 도메인은 해당 분자가 미변형된 Fc 도메인을 갖는 혼성체 뉴클레아제 분자에 비해서 감소된 세포독성을 갖도록 변형된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fcɣ 수용체, 보체 단백질, 또는 둘 다에 대한 결합이 감소하도록 변형된 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 대조군 분자, 예를 들어 변형된 Fc 도메인을 갖지 않는 혼성체 뉴클레아제 분자와 비교하여 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5-배 감소된 세포독성을 가진다.

[0004] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 제1 링커 도메인을 더 포함하며, 제1 뉴클레아제 도메인이 제1 링커 도메인에 의해서 변형된 Fc 도메인에 작동 가능하게 연결된다.

[0005] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형인 변형된 Fc 도메인인 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 힌지, CH2 및/또는 CH3 도메인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, Fc 도메인은 돌연변이 P238S, P331S, SCC, SSS(잔기 220, 226 및 229), G236R, L328R, L234A 및 L235A 중 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S를 포함하고, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인 중 하나에(EU 넘버링에 따라서 잔기 220에 위치된) SCC(CCC는 야생형 힌지 도메인에 존재하는 3개 시스테인을 말한다)로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에(EU 넘버링에 따라서 잔기 220, 226 및 229에 위치된) SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 SCC를 포함한다. 일부

양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 및 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 및 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인에 SCC로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 SSS를 포함한다.

[0006] 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인을 암호화하는 핵산은 서열번호(SEQ ID NO) 59에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 60에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인를 암호화하는 핵산은 서열번호 71에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 72에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인를 암호화하는 핵산은 서열번호 73에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 74에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인를 암호화하는 핵산은 서열번호 75에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 76에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인를 암호화하는 핵산은 서열번호 87에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 88에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인를 암호화하는 핵산은 서열번호 89에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 90에 도시된 대로이다.

[0007] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에, 또는 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산은 서열번호 61, 77, 또는 91에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 209, 62, 78, 92, 또는 94에 도시된 대로이다.

[0008] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에, 또는 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)_4$ 링커 도메인을 통해서 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산은 서열번호 63, 또는 79에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 64, 또는 79에 도시된 대로이다.

[0009] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 사람 RNase1 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S을 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)_4$ 링커 도메인을 통해서 연결된 사람 DNase1 G105R A114F 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 사람 RNase1 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SSS, P238S, 및 P331S을 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)_4$ 링커 도메인을 통해서 연결된 사람 DNase1 G105R A114F 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산은 서열번호 65, 또는 81에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 66, 또는 82에 도시된 대로이다.

[0010] 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 62, 64, 78, 80, 92, 또는 96에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 62, 64, 78, 80, 92, 또는 96에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 66, 68, 70, 82, 84, 86, 94 또는 98에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 66, 68, 70, 82, 84, 86, 94 또는 98에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다. 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)_4$ 링커 도메인을 통해 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)_4$ 링커 도메인을 통해 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산은 서열번호 67, 또는 83에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제

분자는 서열번호 68, 또는 84에 도시된다.

[0012] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산은 서열번호 69, 85, 또는 93에 도시된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 70, 86, 94, 또는 98에 도시된다.

[0013] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자에 의해서 유도된 세포독성은 대조군 분자와 비교하여 감소된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자에 의해서 유도된 세포독성은 대조군 분자와 비교하여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 감소된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 미변형된 Fc 도메인(예를 들어, 야생형 Fc 도메인)을 갖는 혼성체 뉴클레아제 분자와 비교하여 약 3-5배, 또는 적어도 약 3배 감소된 세포독성을 가진다.

[0014] 일부 양태에서, DNase를 가진 혼성체 뉴클레아제 분자 활성은 대조군 DNase 분자의 활성의 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 >30배 이상이다. 일부 구체예에서, DNase를 가진 혼성체 뉴클레아제 분자의 활성은 대조군 DNase 분자의 활성과 대략 동등하다. 일부 양태에서, RNase를 가진 혼성체 뉴클레아제 분자 활성은 대조군 RNase 분자의 활성보다 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 >30배 이상이다. 일부 양태에서, RNase를 가진 혼성체 뉴클레아제 분자의 활성은 대조군 RNase 분자의 활성과 대략 동등하다.

[0015] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드이며, 이때 제1 뉴클레아제 도메인의 아미노산 서열은 사람 야생형 RNase 아미노산 서열을 포함하고, 제1 링커 도메인은 (Gly4Ser)n이며, 여기서 n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고, Fc 도메인의 아미노산 서열은 사람 돌연변이형 IgG1 Fc 도메인 아미노산 서열을 포함하며, 제1 링커 도메인이 제1 뉴클레아제 도메인의 C-말단과 Fc 도메인의 N-말단에 결합된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 표 1에 나타낸 서열을 포함하거나 구성된 폴리펩티드이다.

[0016] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 DNase1를 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 $(Gly_4Ser)n$ 링커 도메인에 의해서 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 사람 DNase1 G105R A114F를 포함하며, 여기서 n = 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 사람 DNase1에 연결된 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F에 연결된 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드이며, 이때 제1 뉴클레아제 도메인의 아미노산 서열은 RNase 아미노산 서열을 포함하고, 제1 링커 도메인은 5 내지 32 아미노산 길이이며, Fc 도메인의 아미노산 서열은 사람 Fc 도메인 아미노산 서열을 포함하고, 제1 링커 도메인이 제1 뉴클레아제 도메인의 C-말단과 Fc 도메인의 N-말단에 결합된다. 일부 구체예에서, 링커 도메인은 $(Gly_4Ser)5$ 및 제한 부위 BglII, AgeI, 및 XhoI를 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드이며, 이때 제1 뉴클레아제 도메인의 아미노산 서열은 사람 RNase 아미노산 서열을 포함하고, 제1 링커 도메인은 5 내지 32 아미노산 길이의 NLG 펩티드이며, Fc 도메인의 아미노산 서열은 사람 돌연변이형 Fc 도메인 아미노산 서열을 포함하고, 제1 링커 도메인이 제1 뉴클레아제 도메인의 C-말단과 Fc 도메인의 N-말단에 결합된다.

[0017] 일부 구체예에서, Fc 도메인은 사람 세포 상에서 Fc 수용체와 실질적으로 결합하지 않는다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 FcɣR 수용체, 보체 단백질, 또는 이들 모두에 대한 결합이 감소하도록 변형된다. 일부 양태에서, Fc 수용체 결합은 대조군 분자와 비교하여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 감소된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 미변형된 Fc 도

메인(예를 들어, 야생형 Fc 도메인)을 갖는 혼성체 뉴클레아제 분자와 비교하여 3-5배, 또는 적어도 약 3배까지 감소된 Fc 수용체 결합을 가진다.

[0018] 일부 구체예에서, 분자의 혈청 반감기는 제1 뉴클레아제 도메인 단독의 혈청 반감기보다 상당히 더 길다. 일부 구체예에서, 분자의 제1 뉴클레아제 도메인의 뉴클레아제 활성은 뉴클레아제 도메인 단독과 동일하거나 더 크다. 일부 구체예에서, 마우스에 분자의 투여는 마우스 루푸스 모델 분석에 의해서 측정된바에 따르면 마우스의 생존율을 증가시킨다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 순환하는 RNA, DNA 또는 이들 모두를 분해한다. 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 면역 복합체 중의 RNA, DNA 또는 이들 모두를 분해한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 인터페론-α 생성을 저해한다. 일부 양태에서 인터페론-α 생성은 대조군 분자와 비교하여 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 감소된다.

[0019] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 리더 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 리더 서열은 사람 카파 경쇄 패밀리의 사람 VK3LP 펩티드이고, 리더 서열은 제1 뉴클레아제 도메인의 N-말단에 결합된다. 구체예들에서, VK3LP는 서열번호 100에 제시된 서열을 가진다.

[0020] 일부 구체예에서, 분자는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 분자는 폴리뉴클레오티드이다.

[0021] 일부 구체예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 RNase를 포함한다. 일부 구체예에서, RNase는 사람 RNase이다. 일부 구체예에서, RNase는 표 1에 제시된 RNase 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, RNase는 사람 RNase A 패밀리 구성원이다. 일부 구체예에서, RNase는 사람 췌장 RNase1이다.

[0022] 일부 구체예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 DNase를 포함한다. 일부 구체예에서, DNase은 사람 DNase이다. 일부 구체예에서, DNase은 표 1에 제시된 DNase 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, DNase는 사람 DNase I, TREX1, 및 사람 DNase 1L3로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0023] 일부 구체예에서, Fc 도메인은 사람 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 돌연변이형 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 SSS, P238S, 및/또는 P331S를 포함하는 돌연변이형 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 사람 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 표 1에 제시된 Fc 도메인 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

[0024] 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 약 1 내지 약 50 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일 구체예에서 제1 링커 도메인은 약 5 내지 약 31 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일 구체예에서 제1 링커 도메인은 약 15 내지 약 25 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일 구체예에서 제1 링커 도메인은 약 20 내지 약 32 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 제1 링커 도메인은 약 20 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일 구체예에서 제1 링커 도메인은 약 25 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일 구체예에서 제1 링커 도메인은 약 18 아미노산의 아미노산 길이를 가진다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 gly/ser 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, gly/ser 펩티드는 식 $(Gly_4Ser)_n$을 가지며, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10로 구성되는 군으로부터 선택된 양의 정수이다. 일부 구체예에서, gly/ser 펩티드는 $(Gly_4Ser)_3$을 포함한다. 일부 구체예에서, gly/ser 펩티드는 $(Gly_4Ser)_4$을 포함한다. 일부 구체예에서, gly/ser 펩티드는 $(Gly_4Ser)_5$을 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 적어도 하나의 제한 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 적어도 하나의 제한 부위를 포함하는 약 12 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 둘 이상의 제한 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 복수의 제한 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 NLG 펩티드를 포함한다. NLG 펩티드는 N-연결된 글리코실화 공통(consensus) 서열을 함유한다. 구체예들에서, NLG 펩티드는 서열번호 99에 제시된 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 제1 링커 도메인은 N-연결된 글리코실화 부위이다.

[0025] 일부 구체예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0026] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 제2 뉴클레아제 도메인을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 뉴클레아제 도메인은 별개의 뉴클레아제 도메인이다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 뉴클레아제 도메인은 동일한 뉴클레아제 도메인이다. 일부 구체예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 C-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 제1 뉴클레아제 도메인의 C-말단에 연결된다. 일부 구체예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 제1 뉴클레아제 도메인의 N-말단에 연결된다.

[0027] 또한, 본원에는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 이량체 폴리펩티드가 개시되며, 여기서 제1 폴리펩티드는 제1 뉴클레아제 도메인 및 Fc 도메인을 포함하고, 제1 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인에 작동 가능하게 결합된다. 일부 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 제2 뉴클레아제 도메인 및 제2 Fc 도메인을 포함하는 제2 혼성체 뉴클레아제 분자이고, 여기서 제2 뉴클레아제 도메인은 제2 Fc 도메인에 작동 가능하게 결합된다.

[0028] 또한, 본원에 설명된 적어도 하나의 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 적어도 하나의 이량체 폴리펩티드, 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 본원에 개시된다.

[0029] 또한, 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 분자가 본원에 개시된다. 또한, 본원에 개시된 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터가 본원에 개시된다. 또한, 본원에 개시된 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 본원에 개시된다.

[0030] 또한, 본원에는 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제를 제조하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계; 및 혼성체 뉴클레아제 분자가 발현되는 조건하에서 숙주 세포를 유지하는 단계를 포함한다.

[0031] 또한, 본원에는 비정상 면역반응과 관련된 상태를 치료 또는 예방하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 본원에 개시된 분리된 혼성체 뉴클레아제 분자의 유효량을 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 상태는 자가면역 질환이다. 일부 구체예에서, 자가면역 질환은 인슐린-의존성 당뇨병, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌척수염, 류마티스 관절염, 실험적 자가면역 관절염, 중증 근무력증, 갑상선염, 실험적 형태의 포도막망막염, 하시모토 갑상선염, 원발성 점액수종, 갑상선중독증, 치명적 빈혈, 자가면역 위축성 위염, 애디슨병, 조기폐경, 남성불임, 소아 당뇨병, 굿패스처 증후군, 심상성 천포창, 유천포창, 교감성 안염, 수정체성 포도막염, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 백혈구감소증, 원발성 담즙성 간경변, 활성 만성 간염 Hbs-ve, 원인불명의 간경변, 궤양성 대장염, 쇼그렌 증후군, 경피증, 베게너 육아종증, 다발성 근염, 피부근염, 원반형 LE, 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 및 결합 조직 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 자가면역 질환은 SLE이다.

[0032] 또한, 본원에는 SLE를 치료하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 RNA, DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 함유하는 면역복합체를 분해하기 위하여 유효량의 뉴클레아제-함유 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체 및 본원에 설명된 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다. 다른 양태에서, 상기 조성물은 서열번호 62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84, 86, 92, 94, 96, 또는 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 양태, 및 이점이 이후 설명 및 첨부한 도면을 참조하여 더 잘 이해될 것이다.

도 1은 혼성체 뉴클레아제 분자의 상이한 구체예들을 만들기 위한 프로토타입(prototype) 구조를 도시한다.

도 2는 단일 정맥내 주사 후 마우스 혈청으로부터 회수된 RSLV-124의 농도를 도시한다.

도 3은 시간에 따른 상대적 형광 단위(RFU)로 측정된 마우스 혈청으로부터 회수된 RLSV-124에 대한 RNase 효소 활성 분석의 결과를 도시한다.

도 4는 분자의 RNase 효소 활성으로부터 외삽된 마우스 혈청 중 RSLV-124의 농도를 도시한다.

도 5는 정상 B6 마우스와 비교된 두 RNase 트랜스제닉(Tg) 마우스의 혈청의 단일 방사성 효소 확산(SRED) 분석을 도시한다.

도 6은 ELISA에 의해서 측정된 Tg 및 이중 Tg(DTg)에서 RNaseA의 농도를 도시한다. 각 점은 개별 마우스에서 측정된 농도이다.

도 7은 TLR7.1 Tg 대 TLR7.1xRNaseA DTg 마우스의 생존율을 도시한다.

도 8은 Tg 대 Dtg 마우스의 비장에서 IgG의 정량적 PCR을 도시한다.

도 9는 RSLV 125-129 구성물(서열번호 208-217)로부터 COS 형질감염 상청액에 대한 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 10은 RSLV 형질감염된 COS 상청액으로부터 단백질 A 정제된 단백질의 알리퀴트들을 비교한 SRED 분석을 도시한다.

도 11a-c는 RSLV 융합 플라스미드로 형질감염된 COS7 상청액으로부터 단백질 A 정제된 단백질에 대해 수행된 DNase 뉴클레아제 활성 분석의 결과를 도시한다.

도 12는 각 단백질에 대해 시간의 함수로서 나타낸 RFU(상대적 형광 단위)를 도시한다.

도 13은 시험된 상이한 분자들의 라인웨어-버크 플롯을 도시한다.

도 14는 야생형 또는 돌연변이형 Fc 도메인을 지닌 RNaseIg 분자들에 대해 융합 단백질의 농도의 함수로서 나타낸 죽은 세포의 퍼센트를 그래프로 표시한 세포독성 데이터를 도시한다.

도 15는 72시간 후 THP-1 염색된 세포의 히스토그램 오버레이를 도시한다.

도 16은 SLE 환자 면역 복합체에 의해서 유도된 인터페론-α 생성을 억제하는 RSLV-132의 능력을 도시한다.

도 17은 RNA-유도된 인터페론-α 생성을 억제하는 RSLV-132의 생체내 능력을 도시한다.

도 18은 야생형 RNase 및 RSLV-124와 비교하여 4℃에서 최대 8주 동안 저장된 RSLV-132의 두 생산 로트에 대한 RNase 효소 활성 분석을 도시한다.

도 19는 시간에 따라 RFU로 측정된 RNase A에 대한 RSLV-133, RSLV-123 및 RSLV-124의 RNase 효소 활성 분석을 도시한다.

도 20은 시간에 따라 RFU로 측정된 DNase 1에 대한 RSLV-133 및 RSLV-123의 DNase 효소 활성 분석을 도시한다.

도 21은 RSLV-123 및 야생형 DNase 1에 대한 DNA를 절단하는 RSLV-133의 능력을 비교한 겔 내 절단 실험의 결과를 도시한다.

도 22는 평균 형광 강도를 측정하는 FACS 분석에 의해서 RSLV-124 및 RSLV-132와 Fc 수용체 보유 THP1 세포의 결합을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 전신성 홍반성 루푸스(SLE)는 자기 뉴클레오프로테인에 대한 높은 역가의 자기항체의 존재를 특징으로 하는 멀티시스템 자가면역 질환이다. SLE에서는 죽인 세포 및 죽어가는 세포의 결함 있는 청소나 진행이 주로 리보- 및 데옥시-리보뉴클레오프로테인(뉴클레오프로테인으로 약기)의 축적을 통해서 질환을 초래한다는 강력한 증거가 있다. 뉴클레오프로테인은 세 가지 메커니즘을 통해서 손상을 야기하는데, i) 염증성 시토카인을 생성하는 선천 면역계의 활성화; ii) 순환하는 면역 복합체를 생성하는 항원으로서의 작용; 및 iii) 신장과 같은 국소 부위에서 제자리 복합체 형성을 발생시키는 항원으로서의 작용이다. 본 발명은 적어도 부분적으로 세포외 핵산의 절단이 생체내에서 치료적 효과를 가진다는 발견에 기초한다.

[0035] 따라서, 본 발명은 세포외 RNA 및 DNA 함유 복합체를 분해하기 위하여 유효량의 뉴클레아제 활성을 투여함으로써 SLE와 같은 세포자멸성 세포 및 세포 파편의 결함 있는 청소나 진행을 특징으로 하는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 치료는 SLE에서의 중요한 시토카인이며, 질환 활성 및 신장염과 강하게 상호관련되는 타입 I 인터페론(IFN)의 생성을 저해할 수 있다.

[0036] 한 구체예에서, 바람직하게는 혼성체 뉴클레아제 분자의 형태로, DNase 또는 RNase 활성인 뉴클레아제 활성을 투여함으로써 대상이 치료된다. 한 양태에서, 뉴클레아제 활성은 제1 뉴클레아제 도메인이다. 다른 양태에서, 뉴클레아제 도메인은 해당 분자가 감소된 세포독성을 갖도록 변형된 Fc 도메인에 연결된다. 한 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 제2 뉴클레아제 도메인을 포함한다.

[0037] 다른 양태에서, 뉴클레아제-함유 조성물의 유효량을 대상에 투여하는 SLE를 치료하는 방법이 제공된다. 한 양태에서, 치료는 RNA, DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 함유하는 면역 복합체의 분해를 가져온다. 다른 양태에서, 치료는 대상에서 인터페론-α와 같은 타입 I 인터페론의 저해를 가져온다. 한 양태에서, 대상을 치료하는 방법은

서열번호 62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84, 86, 92, 94, 96, 또는 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 조성물은 서열번호 96 또는 98에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자이다.

[0038] 청구항 및 명세서에 사용된 용어들은 달리 특정되지 않는다면 하기 제시된 대로 정의된다. 모 출원인 임시 특허 출원에서 사용된 용어와 직접 상충하는 경우, 본 명세서에서 사용된 용어가 우선한다.

[0039] "아미노산"은 자연 발생 아미노산 및 합성 아미노산은 물론, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체(analogs) 및 아미노산 의태체(mimetics)를 말한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해서 암호화된 것들, 및 이후 변형된 아미노산들, 예를 들어 히드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 가진 화합물을 말하며, 즉 α 탄소가 수소, 카르복실기, 아미노기 및 R 기에 결합된 구조들, 예를 들어 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄이다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 보유한다. 아미노산 의태체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 말한다.

[0040] 아미노산은 본원에서 이들의 공통적으로 알려진 3문자 기호나, 또는 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에 의해서 권장되는 1문자 기호에 의해서 언급될 수 있다. 뉴클레오티드도 마찬가지로 이들의 공통적으로 용인된 1문자 코드에 의해서 언급될 수 있다.

[0041] "아미노산 치환"은 정해진 아미노산 서열(출발 폴리펩티드의 아미노산 서열)에서 적어도 하나의 기존 아미노산 잔기의 제2의 상이한 "치환" 아미노산 잔기로의 치환을 말한다. "아미노산 삽입"은 정해진 아미노산 서열에 적어도 하나의 추가 아미노산의 통합을 말한다. 삽입은 일반적으로 하나 또는 두 아미노산 잔기의 삽입으로 구성될 것이지만, 더 큰 "펩티드 삽입", 예를 들어 약 3 내지 약 5 또는 심지어 최대 약 10, 15 또는 20개의 아미노산 잔기의 삽입도 이루어질 수 있다. 삽입된 잔기(들)은 상기 개시된 대로 자연 발생한 것 또는 비-자연 발생한 것일 수 있다. "아미노산 결실"은 정해진 아미노산 서열로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기의 제거를 말한다.

[0042] "폴리펩티드, "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 교환하여 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공적인 화학 의태체인 아미노산 중합체는 물론, 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0043] "핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이들의 중합체를 말한다. 특별히 제한되지 않는다면, 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖고, 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 알려진 유사체들을 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 나타내지 않는다면, 특정한 핵산 서열은 그것의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보성 서열은 물론 분명히 지적된 서열도 무조건 포괄한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼성-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 발생시킴으로써 달성될 수 있다(Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985); 및 Cassol *et al.*, 1992; Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). 아르기닌 및 류신의 경우, 두 번째 염기에서 일어나는 변형도 보존성일 수 있다. 용어 핵산은 유전자, cDNA, 및 유전자에 의해서 암호화되는 mRNA와 상호 교환하여 사용된다.

[0044] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드로 이루어질 수 있으며, 이들은 미변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥일 수 있는, 또는 더 전형적으로 이중-가닥 또는 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 혼성체 분자로 이루어질 수 있다. 이에 더하여, 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA를 포함하거나, 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 삼중-가닥 영역으로 이루어질 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 염기 또는 안정성이나 다른 이유 때문에 변형된 DNA 또는 RNA 골격을 함유할 수 있다. "변형된" 염기는, 예를 들어 트리틸화된 염기 및 이노신과 같은 특이한 염기를 포함한다. 다양한 변형이 DNA 및 RNA에 대해 이루어질 수 있으며, 이로써 "폴리뉴클레오티드"는 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사적으로 변형된 형태를 포괄한다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "혼성체 뉴클레아제 분자"는 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인 및 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 혼성체 뉴클레아제 분자는 또한 융합 단백질(들) 및 융합 유전자(들)라고도 언급된다. 예를 들어, 한 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase 및/또는 RNase와 같은 뉴클레아제 도메인에 연결된 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다른 예로서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 RNase 뉴클레아제 도메인, 링커 도메인, 및 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 혼성체 뉴클레아제 분자의 예들은 서열번호 62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84, 86, 92, 94, 96, 및 98을 포함한다. 다른 예들은 하기 더 상세히 설명된다. 한 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 추가의 변형을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 기능적 부분(예를 들어, PEG, 약물 또는 표지)을 추가하도록 변형될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용된 "혼성체 이중 특이적 뉴클레아제 분자" 또는 "바이뉴클레아제 분자"는 2 이상의 뉴클레아제 도메인, 예를 들어 DNase 도메인과 RNase 도메인을 가진 혼성체 뉴클레아제 분자를 말한다.

[0047] 특정 양태에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드 링커와 같은 하나 이상의 "링커 도메인"을 이용할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "링커 도메인"은 선형 서열에서 둘 이상의 도메인을 연결하는 서열을 말한다. 본원에서 사용된 용어 "폴리펩티드 링커"는 둘 이상의 도메인을 폴리펩티드 사슬의 선형 아미노산 서열에서 둘 이상의 도메인을 연결하는 펩티드 또는 폴리펩티드 서열(예를 들어, 합성 펩티드 또는 폴리펩티드 서열)을 말한다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 뉴클레아제 도메인과 Fc 도메인을 연결하기 위해서 사용될 수 있다. 바람직하게, 이러한 폴리펩티드 링커는 폴리펩티드 분자에 유연성을 제공할 수 있다. 특정 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 하나 이상의 Fc 도메인 및/또는 하나 이상의 뉴클레아제 도메인을 연결하기 위해서(예를 들어, 유전자 융합하기 위해서) 사용된다. 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나보다 많은 링커 도메인 또는 펩티드 링커를 포함할 수 있다.

[0048] 본원에서 사용된 용어 "gly-ser 폴리펩티드 링커"는 글리신과 세린 잔기로 구성된 펩티드를 말한다. 예시적인 gly/ser 폴리펩티드 링커는 아미노산 서열 Ser (Gly4Ser)n를 포함한다. 한 구체예에서, n=1이다. 한 구체예에서, n=2이다. 다른 구체예에서, n=3, 즉 Ser(Gly_4Ser)3이다. 다른 구체예에서, n=4, 즉 Ser(Gly_4Ser)4이다. 다른 구체예에서, n=5이다. 또 다른 구체예에서, n=6이다. 다른 구체예에서, n=7이다. 또 다른 구체예에서, n=8이다. 다른 구체예에서, n=9이다. 또 다른 구체예에서, n=10이다. 다른 예시적인 gly/ser 폴리펩티드 링커는 아미노산 서열 Ser(Gly_4Ser)n를 포함한다. 한 구체예에서, n=1이다. 한 구체예에서, n=2이다. 바람직한 구체예에서, n=3이다. 다른 구체예에서, n=4이다. 다른 구체예에서, n=5이다. 또 다른 구체예에서, n=6이다.

[0049] 본원에서 사용된 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 상호 교환하여 사용된다. 이들 용어는 둘 이상의 요소 또는 성분 또는 도메인이 화학적 컨쥬게이션 또는 재조합 수단을 포함하는 무슨 수단에 의해서 함께 이어진 것을 말한다. 화학적 컨쥬게이션 방법(예를 들어, 이종이관능성 가교결합제)은 본 분야에 주지되어 있다.

[0050] 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역"은 그것의 두 중쇄의 각각의 Fc 도메인(또는 Fc 부분(Fc moeities))에 의해서 형성된 자생 면역글로불린의 부분으로 정의된다.

[0051] 본원에서 사용된 용어 "Fc 도메인"은 Fv 도메인을 포함하지 않는 단일 면역글로불린(Ig) 중쇄의 일부를 말한다. 따라서, Fc 도메인은 또한 "Ig" 또는 "IgG"라고도 언급될 수 있다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 파파인 절단 부위의 바로 상류에 있는 힌지 영역에서 시작하여 항체의 C-말단에서 끝난다. 따라서, 완전한 Fc 도메인은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다. 특정 구체예에서, Fc 도메인은 힌지(예를 들어, 상부, 중간, 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인 또는 이들의 변이체, 일부, 또는 단편 중 적어도 하나를 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 완전한 Fc 도메인(즉, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인)을 포함한다. 한 구체예에서, Fc 도메인은 CH3 도메인(또는 그것의 일부)에 융합된 힌지 도메인(또는 그것의 일부)을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 CH3 도메인(또는 그것의 일부)에 융합된 CH2 도메인(또는 그것의 일부)을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 CH3 도메인 또는 그것의 일부로 구성된다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 힌지 도메인(또는 그것의 일부)과 CH3 도메인(또는 그것의 일부)으로 구성된다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 CH2 도메인(또는 그것의 일부)과 CH3 도메인으로 구성된다. 다른 구체예에서, Fc 도메인은 힌지 도메인(또는 그것의 일부)과 CH2 도메인(또는 그것의 일부)으로 구성된다. 한 구체예에서, Fc 도메인은 CH2 도메인의 적어도 일부를 결여한다(예를 들어, CH2 도메인의 전부 또는 일부). 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 도메인은 FcRn 결합을 위해 필요하다고 본 분야에 알려진 Fc 분자의 일부를 적어도 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 Fc 도메인은 FcγR 결합을 위해 필요하다고 본 분야에 알려진 Fc 분자의 일부를 적어도 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 도메인은 단백질 A 결합을 위해 필요하다고 본 분

야에 알려진 Fc 분자의 일부를 적어도 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 Fc 도메인은 단백질 G 결합을 위해 필요하다고 본 분야에 알려진 Fc 분자의 일부를 적어도 포함한다. 본원에서 Fc 도메인은 일반적으로 면역글로불린 중쇄의 Fc 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 이것은, 제한은 아니지만 전체 CH1, 힌지, CH2, 및/또는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드는 물론, 예를 들어 힌지, CH2 및 CH3 도메인만을 포함하는 이러한 펩티드의 단편을 포함한다. Fc 도메인은 임의의 종들 및/또는 임의의 아형의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있으며, 제한은 아니지만 사람 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM 항체를 포함한다. Fc 도메인은 자생 Fc 및 Fc 변이체 분자를 포괄한다. Fc 변이체 및 자생 Fc와 마찬가지로, 용어 Fc 도메인은 전체 항체로부터 절단되거나, 또는 다른 수단에 의해서 생성된 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다. Fc 도메인에 대한 아미노산 잔기 번호의 정렬은 Kabat의 정의에 따른다. 예를 들어, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections), 5th edition, Bethesda, MD:NIH vol. 1:647-723 (1991); Kabat et al., "Introduction" *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept of Health and human Services, NIH, 5th edition, Bethesda, MD vol. 1:xiii-xcvi (1991); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol*. 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989)를 참조하며, 이들은 각각 모든 목적을 위해서 본원에 참고자료로 포함된다.

[0052] 본원에 제시된 대로, 어떤 Fc 도메인이든 자연 발생 면역글로불린 분자의 자생 Fc 도메인으로부터 아미노산 서열에 변화가 있도록 변형될 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 특정 예시적인 구체예에서, Fc 도메인은 이펙터 기능(예를 들어, FcγR 결합)을 보유한다.

[0053] 본 발명의 폴리펩티드의 Fc 도메인은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 Fc 도메인은 IgG1 분자로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예에서, Fc 도메인은 IgG1 분자로부터 일부가, IgG3 분자로부터 일부가 유래된 키메라 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예에서, Fc 도메인은 IgG1 분자로부터 일부가, IgG4 분자로부터 일부가 유래된 키메라 힌지를 포함할 수 있다.

[0054] 지정된 폴리펩티드나 단백질"로부터 유래된" 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 폴리펩티드의 기원을 말한다. 바람직하게, 특정 서열로부터 유래된 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 해당 서열 또는 그 일부와 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 일부는 적어도 10-20 아미노산, 바람직하게 적어도 20-30 아미노산, 더 바람직하게 적어도 30-50 아미노산으로 구성되거나, 또는 해당 서열에 그것이 기원을 갖는다는 것을 당업자가 확인할 수 있는 만큼으로 구성된다.

[0055] 다른 펩티드로부터 유래된 폴리펩티드는 출발 폴리펩티드에 대해 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 다른 아미노산 잔기로 치환된, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기 삽입 또는 결실을 가진 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다.

[0056] 폴리펩티드는 자연 발생한 것이 아닌 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 변이체는 반드시 출발 혼성체 뉴클레아제 분자와 100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 가진다. 바람직한 구체예에서, 변이체는, 예를 들어 변이체 서열의 길이에 걸쳐, 출발 폴리펩티드의 아미노산 서열과 약 75% 내지 100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 더 바람직하게 약 80% 내지 100% 미만, 더 바람직하게 약 85% 내지 100% 미만, 더 바람직하게 약 90% 내지 100% 미만(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 그리고 가장 바람직하게 약 95% 내지 100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 가질 것이다.

[0057] 한 구체예에서, 출발 폴리펩티드 서열과 그로부터 유래된 서열 간에는 하나의 아미노산 차이가 있다. 이 서열과 관련하여 동일성 또는 유사성은 출발 아미노산 잔기와 동일한(즉, 동일한 잔기) 후보 서열의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 본원에서 정의되며, 필요하다면 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성할 수 있다.

[0058] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 표 1로부터 선택된 아미노산 서열 및 그것의 기능적 활성 변이체로 구성되거나, 필수적으로 구성되거나, 또는 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드는 표 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드는 표 1에 제시된 연속(contiguous) 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 연속 아미노산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드는 표 1에 제시된 아미노산 서열의 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 또는 500(또는 이들 숫자들 내의 임의의 정수) 연속 아미노산을 갖는 아미노산 서열을

포함한다.

[0059] 한 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다. 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 클로닝, 유전자 요법, 단백질 발현 및 정제, 돌연변이 도입, 필요한 숙주에서 DNA 백신화, 예를 들어 수동적 면역화를 위한 항체 생성, PCR 프라이머 및 프로브 생성, siRNA 설계 및 생성(예를 들어, Dharmacon siDesign 웹사이트 참조) 등을 포함하는 많은 용도에 유용할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 표 1로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 구성되거나, 또는 필수적으로 구성된다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드 서열은 표 1에 제시된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드 서열은 표 1에 제시된 연속 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 연속 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드 서열은 표 1에 제시된 뉴클레오티드 서열의 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 또는 500(또는 이들 숫자들 내의 임의의 정수) 연속 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0060] 본 발명의 바람직한 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 면역글로불린 서열로부터 유래된 서열(예를 들어, 적어도 하나의 Fc 도메인)을 포함한다. 그러나, 서열은 다른 포유류 종들로부터 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 영장류 Fc 도메인 또는 뉴클레아제 도메인이 대상 서열에 포함될 수 있다. 또는 달리, 하나 이상의 뮤린 아미노산이 폴리펩티드에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 서열은 면역원성이 아니며 및/또는 감소된 면역원성을 가진다.

[0061] 또한, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 이들이 유래되었던 자연 발생 또는 자생 서열로부터 자생 서열의 바람직한 활성을 보유하면서 서열에 변화가 있도록 변경될 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에 보존성 치환 또는 변화를 초래하는 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 면역글로불린(예를 들어, Fc 도메인)으로부터 유래된 혼성체 뉴클레아제 분자의 비-천연 변이체를 암호화하는 분리된 핵산 분자는, 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 암호화된 단백질에 도입되도록 해당 면역글로불린의 뉴클레오티드 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 도입함으로써 생성될 수 있다. 돌연변이는 부위 지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 표준 기술에 의해서 도입될 수 있다.

[0062] 본 발명의 펩티드 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나 이상의 아미노산 잔기에, 예를 들어 필수 또는 비-필수 아미노산 잔기에 보존성 아미노산 치환을 포함할 수 있다. "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리들은 본 분야에 정의되어 있으며, 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 결합 폴리펩티드에서 비-필수 아미노산 잔기는 바람직하게 동일한 측쇄 패밀리의 다른 아미노산 잔기로 치환된다. 다른 구체예에서, 아미노산의 스트링이 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 상이한 구조적으로 유사한 스트링으로 치환될 수 있다. 또는 달리, 다른 구체예에서, 돌연변이가, 예를 들어 포화 돌연변이에 의해서 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위 도입될 수 있으며, 결과의 돌연변이형이 본 발명의 결합 폴리펩티드에 통합되어 원하는 표적과 결합하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0063] 용어 "개선하는"은 예방, 중증도 또는 진행 감소, 차도 또는 치유를 포함하는, 질환 상태, 예를 들어 자가면역 질환 상태(예를 들어, SLE)의 치료에서 치료적으로 유익한 결과를 말한다.

[0064] 용어 "제자리"는 살아 있는 유기체로부터 분리되어 성장중인, 예를 들어 조직 배양물에서 성장중인 살아 있는 세포에서 발생하는 과정들을 말한다.

[0065] 용어 "생체내"는 살아 있는 유기체에서 발생하는 과정들을 말한다.

[0066] 본원에서 사용된 용어 "포유류" 또는 "대상" 또는 "환자"는 사람과 사람이 아닌 것을 모두 포함하며, 제한은 아니지만 사람, 비-사람 영장류, 개과, 고양이과, 뮤린, 소과, 및 돼지과를 포함한다.

[0067] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "동일성" 퍼센트는 하기 설명된 서열 비교 알고리즘 중 하나(예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자가 이용할 수 있는 다른 알고리즘)를 사용하여, 또는 육안검사에

의해서 측정된바, 최대 대응되도록 비교 및 정렬했을 때 명시된 퍼센트의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 동일한 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 말한다. 용도에 따라서, "동일성" 퍼센트는 비교되는 서열의 어떤 영역에 걸쳐, 예를 들어 기능 도메인에 걸쳐 존재할 수 있거나, 또는 달리 비교되는 두 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0068] 서열 비교를 위해서, 전형적으로 하나의 서열이 기준 서열로서 작용하며, 이것과 시험 서열이 비교된다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 서열 및 기준 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요하다면 서열 좌표가 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 변수들이 지정된다. 다음에, 서열 비교 알고리즘이 지정된 프로그램 변수에 기초하여 기준 서열에 대해 시험 서열(들)의 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0069] 서열 비교를 위한 서열들의 최적 정렬이, 예를 들어 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)의 국소 상동성 알고리즘, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)의 유사성 탐색 방법, 이들 알고리즘의 컴퓨터를 이용한 실행(GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA; Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 또는 육안검사(일반적으로 Ausubel et al., 이하 동일, 참조)에 의해서 수행될 수 있다.

[0070] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 결정하는데 적합한 알고리즘의 한 가지 예는 BLAST 알고리즘인데, 이것은 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)에 설명된다. BLAST 분석의 수행을 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information 웹사이트를 통해서 공공연히 이용할 수 있다.

[0071] 용어 "충분한 양"은 원하는 효과를 야기하기에 충분한 양, 예를 들어 세포에서 단백질 응집을 조정하기에 충분한 양을 의미한다.

[0072] 용어 "치료적 유효량"은 질환의 증상을 개선하는데 효과적인 양이다. 치료적 유효량은 예방이 요법으로 고려될 수 있으므로 예방적 유효량일 수도 있다.

[0073] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되었을 때 단수형 "어떤" 및 "그"는 문맥상 분명히 다른 의미를 나타내지 않는다면 복수를 언급하는 것을 포함한다는 것이 주지되어야 한다.

[0075] 조성물

[0076] 혼성체 뉴클레아제 분자

[0077] 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 도메인에 작동 가능하게 연결된 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 도메인에 연결된 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 뉴클레아제 단백질이다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 뉴클레아제 폴리뉴클레오티드이다.

[0078] 일부 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 링커 도메인을 통해 Fc 도메인에 연결된다. 일부 구체예에서, 링커 도메인은 링커 펩티드이다. 일부 구체예에서, 링커 도메인은 링커 뉴클레오티드이다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 리더 분자, 예를 들어 리더 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 리더 분자는 뉴클레아제 도메인의 N-말단에 위치된 리더 펩티드이다. 구체예들에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 해당 분자의 N-말단에 리더 펩티드를 포함하며, 상기 리더 펩티드는 혼성체 뉴클레아제 분자로부터 나중에 절단된다. 재조합 단백질에 융합된 리더 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 생성하는 방법은 본 분야에 잘 주지되어 있다. 구체예들에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 어느 것이든 그것의 N-말단에 리더가 융합된 상태에서 또는 리더 없이 발현될 수 있다. 융합된 리더 펩티드의 절단 후에 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 단백질 서열은 당업자에 의해서 예측 및/또는 추론될 수 있다. VK3 리더 펩티드(VK3LP)를 더 포함하고, 상기 리더 펩티드가 혼성체 뉴클레아제 분자의 N-말단에 융합된 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 예는 서열번호 92(RSLV-132) 및 94(RSLV-133)에 제시된다. 상응하는 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 91 및 93에 제시된다. 구체예들에서, VK3 리더의 절단 후, 이들 혼성체 뉴클레아제 분자는 각각 서열번호 96(RSLV-132) 및 98(RSLV-133)에 제시된 서열을 가진다. 상응하는 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 95 및 97에 제시된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 그것의 N-말단에 융합된 리더 펩티드 없이 발현되고, 결과의 혼성체 뉴클레아제 분자는 N-말단 메티오닌을 가진다.

[0079] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 중단 코돈을 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 중단 코돈은 Fc 도메인의 C-말단에 있을 것이다.

[0080] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 제2 뉴클레아제 도메인을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 제2 링커 도메인을 통해 Fc 도메인에 연결된다. 일부 구체예에서, 제2 링커 도메인은 Fc 도메인의 C-말단에 있을 것이다. 도 1은 혼성체 뉴클레오티드 분자의 적어도 하나의 구체예를 도시한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 표 1에 도시된 서열을 포함한다.

[0081] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 세포외 면역 복합체에 특이적으로 결합하는 Fc 도메인에 부착된 RNase 분자 또는 DNase 분자 또는 다중-효소 분자(예를 들어, RNase와 DNase의 모두, 또는 기질에 대해 상이한 특이성을 가진 두 RNA 또는 DNA 뉴클레아제)이다. 일부 구체예에서, Fc 도메인은 Fcγ 수용체와 효과적으로 결합하지 않는다. 한 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 C1q와 효과적으로 결합하지 않는다. 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 IgG1으로부터 프레임 내 Fc 도메인을 포함한다. 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 힌지, CH2 및/또는 CH3 도메인에 돌연변이를 더 포함한다. 다른 양태에서, 돌연변이는 P238S, P331S 또는 N297S이고, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 이러한 양태에서, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 있는 돌연변이는 SCC 또는 SSS일 수 있다. 다른 양태에서, 분자는 SCC 힌지를 함유하지만, 사람 IgG1 Fc CH2 및 CH3 도메인에 대해서 야생형이고, Fc 수용체에 효과적으로 결합하여 이들이 결합되는 세포의 식작용 구획 내로 혼성체 뉴클레오티드 분자의 흡수를 촉진한다. 다른 양태에서, 분자는 단일 및/또는 다중-가닥 RNA 기질에 대해 활성을 가진다.

[0082] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 힌지, CH2, 및/또는 CH3 도메인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S를 포함하고, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이 또는 하나의 힌지 시스테인에 SCC로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SCC 또는 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 및 SCC 또는 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개의 힌지 시스테인 중 하나에 SCC로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 SCC 또는 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 59, 60, 71-76, 또는 87-90 중 어느 것에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84, 86, 92, 94, 96, 또는 98 중 어느 것에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인, 또는 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 61, 77, 또는 91에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 62, 78, 92, 또는 96에 도시된다.

[0083] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인 또는 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)4$ 링커 도메인을 통해서 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 63, 또는 79에 도시된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 64, 또는 80에 도시된다.

[0084] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 사람 RNase1 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)4$ 링커 도메인을 통해 연결된 사람 DNase1 G105R A114F 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 사람 RNase1 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)4$ 링커 도메인을 통해 연결된 사람 DNase1 G105R A114F 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체

뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 65, 또는 81에 도시된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 66, 또는 82에 도시된다.

[0085] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)4$ 링커 도메인을 통해 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 $(Gly_4Ser)4$ 링커 도메인을 통해 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 67, 또는 83에 도시된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 68, 또는 84에 도시된다.

[0086] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SCC, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 사람 DNase1 G105R A114F 도메인에 NLG 링커 도메인을 통해서 연결된 SSS, P238S, 및 P331S를 포함하는 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 야생형 사람 RNase1 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 69, 85, 또는 93에 도시된다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 70, 86, 94, 또는 98에 도시된다.

[0087] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자의 활성은 시험관 내 및/또는 생체 내 검출 가능하다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 세포, 악성 세포, 또는 암 세포에 결합하여 그것의 생물학적 활성을 방해한다.

[0088] 다른 양태에서, RNA에 표적화된 scFv와 같은 결합 특이성을 가진 다른 효소 또는 항체, 또는 제1 도메인과 동일한 또는 상이한 특이성을 지닌 제2 뉴클레아제 도메인에 부착된 다관능성 RNase 분자가 제공된다.

[0089] 다른 양태에서, DNA에 표적화된 scFv와 같은 결합 특이성을 가진 다른 효소 또는 항체, 또는 제1 도메인과 동일한 또는 상이한 특이성을 지닌 제2 뉴클레아제 도메인에 부착된 다관능성 DNase 분자가 제공된다.

[0090] 다른 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 필요한 포유류에 치료적 유효량으로 Fc 영역에 부착된 혼성체 뉴클레아제 분자를 투여함으로써 포유류에서 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는데 적합하며, 질환이 예방되거나 치료된다. 다른 양태에서, 질환 또는 장애는 자가면역 질환 또는 암이다. 일부 이러한 양태에서, 자가면역 질환은 인슐린-의존성 당뇨병, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌척수염, 류마티스 관절염, 실험적 자가면역 관절염, 중증 근무력증, 갑상선염, 실험적 형태의 포도막망막염, 하시모토 갑상선염, 원발성 점액수종, 갑상선중독증, 치명적 빈혈, 자가면역 위축성 위염, 애디슨병, 조기폐경, 남성불임, 소아 당뇨병, 굿패스처 증후군, 심상성 천포창, 유천포창, 교감성 안염, 수정체성 포도막염, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 백혈구감소증, 원발성 담즙성 간경변, 활성 만성 간염 Hbs-ve, 원인불명의 간경변, 궤양성 대장염, 쇼그렌 증후군, 경피증, 베게너 육아종증, 다발성 근염, 피부근염, 원반형 LE, 전신성 홍반성 루푸스 또는 결합 조직 질환이다.

[0091] 일부 구체예에서, RNase 혼성체 뉴클레아제 분자의 RNase 효소 활성의 표적은 주로 세포외 표적으로서, 예를 들어 항-RNP 자기항체와의 면역 복합체에 함유된 RNA 및 세포자멸을 겪은 세포의 표면에서 발현된 RNA로 구성된다. 일부 구체예에서, RNase 혼성체 뉴클레아제 분자는 식작용 소포의 산성 환경에서 활성이다. 일부 구체예에서, RNase 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 해당 분자가 FcR과 결합하여 면역 복합체에 의해서 사용된 진입 경로를 통해 식작용 구획으로 진입하도록 하기 위하여 야생형(wt) Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, wt Fc 도메인을 포함하는 RNase 혼성체 뉴클레아제 분자는 세포외 환경과 식작용 환경(여기서 TLR7이 발현될 수 있다) 모두에서 활성이도록 개조된다. 일부 양태에서, 이것은 wt Fc 도메인을 포함하는 RNase 혼성체 뉴클레아제 분자가 이미 포획된 면역 복합체를 통해 또는 바이러스 감염 후 TLR7을 활성화하는 RNA에 의해서 TLR7 신호화를 중단시킬 수 있도록 한다. 일부 구체예에서, RNase 혼성체 뉴클레아제 분자의 wt RNase는 RNase 세포질 저해제에 의한 저해에 대해 내성이 아니다. 일부 구체예에서, RNase 혼성체 뉴클레아제 분자의 wt RNase는 세포의 세포질에서 활성이 아니다.

[0092] 일부 구체예에서, wt Fc 도메인을 포함하는 혼성체 뉴클레아제 분자는 자가면역 질환, 예를 들어 SLE의 요법을 위해 사용된다.

[0093] 일부 구체예에서, Fc 수용체(FcR)와 결합하는 Fc 도메인은, 예를 들어 글리코실화 변경 및/또는 아미노산 서열 변화를 통해서 증가된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 FcR 결합을 증가시키는 하나 이상의 Fc 변경을 가진다.

[0094] Fc 도메인에 부착된 혼성체 뉴클레아제 분자를 구성하기 위한 대안의 방식도 고려된다. 일부 구체예에서, FcR 결합을 보유하고 활성 뉴클레아제 도메인을 갖는 Ig-RNase 분자 또는 Ig-DNase 분자 또는 RNase-Ig 분자 또는 RNase-Ig 분자를 구성하기 위하여 도메인 배향이 변경될 수 있다.

[0095] 일부 구체예에서, DNase 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 해당 분자가 FcR 결합 후에 내포작용을 거치도록 할 수 있는 wt Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, DNase 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 가용성 형태든 또는 불용성 복합체로서 부착되든 DNA를 함유하는 세포외 면역 복합체에 대해 활성일 수 있다.

[0096] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제분자는 DNase와 RNase를 모두 포함한다. 일부 구체예에서, 이들 혼성체 뉴클레아제 분자는 이들이, 예를 들어 RNA, DNA, 또는 RNA와 DNA의 조합을 함유하는 면역 복합체를 절단할 수 있기 때문에 SLE의 요법을 개선할 수 있고, 이들이 wt Fc 도메인을 더 포함할 때는 이들은 세포외와 TLR7 및 TLR9가 위치될 수 있는 식작용 구획에서 모두 활성이다.

[0097] 일부 구체예에서, 링커 도메인은 링커의 길이를 연속 5 아미노산까지 변경하는 (gly4ser) 3, 4 또는 5 변이체를 포함한다. 다른 구체예에서, 링커 도메인은 대략 18 아미노산 길이이며, N-연결된 글리코실화 부위를 포함하는데, 이것은 생체내 프로테아제 절단에 민감할 수 있다. 일부 구체예에서, N-연결된 글리코실화 부위는 링커 도메인에서 혼성체 뉴클레아제 분자가 절단되는 것을 보호할 수 있다. 일부 구체예에서, N-연결된 글리코실화 부위는 링커 도메인에 의해서 분리된 독립적 기능 도메인의 접힘을 분리하는 것을 보조할 수 있다.

[0098] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 및/또는 야생형 사람 IgG1 Fc 도메인을 모두 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 COS 일시 형질감염체와 CHO 안정한 형질감염체 모두로부터 발현될 수 있다. 일부 구체예에서, CD80/86 결합 및 RNase 활성은 혼성체 뉴클레아제 분자에서 보존된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase1L3-Ig-링커-RNase 구성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase1-Ig-링커-RNase 구성물 또는 RNase-Ig-링커-DNase 구성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 효소 도메인과 혼성체 뉴클레아제 분자의 나머지 도메인 사이의 융합 접합부가 최적화된다.

[0099] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase-Ig 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 혼성체 DNase-RNase 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다.

[0100] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 TREX1을 포함한다. 일부 구체예에서, TREX1 혼성체 뉴클레아제 분자는 크로마틴을 절단할 수 있다. 일부 구체예에서, TREX1 혼성체 뉴클레아제 분자는 세포에 의해서 발현된다. 일부 구체예에서, 발현된 혼성체 뉴클레아제 분자는 뮤린 TREX-1 및 뮤린(wt 또는 돌연변이형) Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, TREX1과 IgG 힌지 사이에 20-25 아미노산(aa) 링커 도메인이 DNase 활성을 허용하기 위하여 요구될 수 있다. 일부 구체예에서, 15 아미노산 링커 도메인을 지닌 혼성체 뉴클레아제 분자는 활성이 아니다. 일부 구체예에서, 20 및 25 아미노산 링커 도메인(더하기 제한 부위를 통합하기 위한 2 이상의 아미노산)의 사용은 크로마틴 절단에 의해서 측정된바 기능 활성을 가져온다. 일부 구체예에서, 대략 72 아미노산의 소수성 영역이 링커 도메인을 통한 Fc 도메인과의 융합 전에 TREX-1의 COOH 단부로부터 제거될 수 있다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자의 20 아미노산 링커 도메인 버전은 대조군 및/또는 다른 혼성체 뉴클레아제 분자와 비교하여 높은 발현 수준을 나타낸다. 일부 구체예에서, 정량적 방식으로 혼성체 뉴클레아제 분자와 대조군의 효소 활성을 비교하기 위하여 동력학적 효소 분석이 사용된다.

[0101] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자의 발현을 개선하기 위하여 TREX1 효소의 트렁케이션을 위해 선택된 융합 접합부의 추가의 최적화가 사용될 수 있다.

[0102] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 20 및/또는 25 아미노산 링커 도메인을 가진 사람 TREX1-링커-Ig Fc 도메인 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 링커 도메인(들)은 혼성체 뉴클레아제 분자 구성물에 통합을 위하여 부착된 하나 이상의 제한 부위를 지닌 (gly4ser)4 또는 (gly4ser)5의 변이체이다. 일부 구체예에서, TREX1 효소 활성에 유용한 헤드-테일 이량화 때문에 유연한 긴 링커 도메인이 적절한 접힘을 촉진하기 위하여 사용될 수 있다.

[0103] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 TREX1-텐덤 혼성체 뉴클레아제 분자이다. 일부 구체예에서, TREX1의 헤드-테일 접힘을 촉진하는 대안적인 방법은 두 TREX1 도메인을 텐덤으로 통합하고, 이어서 링커 도메인과 Ig Fc 도메인을 통합한 TREX1-TREX1-Ig 혼성체 뉴클레아제 분자를 생성하는 것이다. 일부 구체예에서, 헤드-테일 방식에서 TREX1 카세트의 배치는 면역효소의 어느 한쪽 팔에서 헤드-테일 접힘을 위해 보정될 수 있고, 분자의 각 팔에 단일 TREX1 기능 도메인을 도입할 수 있다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자의 각 면역효소는 단일 IgG Fc 도메인에 부착된 2개의 기능 TREX1 효소를 가진다.

[0104] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 TREX1-링커1-Ig-링커2-RNase를 포함한다.

[0105] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 RNase-Ig-링커-TREX1를 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자에 통합을 위하여 각 효소의 아미노 및 카르복실 융합 모두를 위한 카세트가 유래되며, 이 경우 효소 구조가 역전된다. 일부 구체예에서, RNase 효소는 혼성체 뉴클레아제 분자에서의 위치와 무관하게 비슷한 기능 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 특정 구조가 혼성체 뉴클레아제 분자 성분의 개선된 발현 및/또는 기능을 나타내는지를 시험하기 위하여 대안적인 혼성체 뉴클레아제 분자들이 설계될 수 있다.

[0106] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 IL3-Ig를 포함한다. 일부 구체예에서, 1L3 DNase는 뮤린 서열로부터 구성되고 발현된다. 일부 구체예에서, 이 효소는 활성이다. 일부 구체예에서, 뮤린 IL3 DNase-Ig-RNase 혼성체 뉴클레아제가 구성되고 발현된다. 일부 구체예에서, 이 분자는 사람 1L3-Ig, 사람 1L3-Ig-RNase 및/또는 사람 RNase-Ig-1L3을 포함한다.

[0107] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase1-Ig를 포함한다. 일부 구체예에서, 액틴에 대해 감소된 민감성을 나타내는 자연 발생 변이체 대립형질 A114F가 DNase1-Ig 혼성체 뉴클레아제 분자에 포함된다. 일부 구체예에서, 이 돌연변이는 사람 DNase1의 더욱 안정한 유도체를 생성하기 위해서 혼성체 뉴클레아제 분자에 도입된다. 일부 구체예에서, 20 또는 25 아미노산 링커 도메인을 함유하는 DNase1-링커-Ig가 제조된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 RNase-Ig-링커-DNase1이며, 여기서 DNase1 도메인은 Ig Fc 도메인의 COOH 측에 위치된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 DNase1을 통합하여 제조되며, DNase1-링커-Ig-linker2-RNase, 및/또는 RNase-Ig-링커-DNase1를 포함한다.

[0108] 본 발명의 다른 양태는 하나 이상의 혼성체 뉴클레오티드 분자로 장애, 질환, 및 상태를 치료 또는 예방하기 위한 유전자 요법 방법을 사용하는 것이다. 유전자 요법 방법은 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들의 발현을 달성하기 위한 동물에 혼성체 뉴클레아제 분자 핵산(DNA, RNA 및 안티센스 DNA 또는 RNA) 서열의 도입에 관한 것이다. 이 방법은 표적 조직에 의한 폴리펩티드의 발현에 필요한 임의의 다른 유전자 요소 및 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드의 도입을 포함할 수 있다.

[0109] 유전자 요법 적용에서, 치료상 유효한 유전자 산물의 생체내 합성을 달성하기 위하여 혼성체 뉴클레아제 분자 유전자가 세포에 도입된다. "유전자 요법"은 단일 치료에 의해서 지속 효과가 달성되는 종래의 유전자 요법, 및 치료상 유효한 DNA 또는 mRNA의 1회 또는 반복 투여를 수반하는 유전자 치료제의 투여를 모두 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 이들의 흡수를 증진시키기 위하여, 예를 들어 하전되지 않은 기들에 의해서 이들의 음으로 하전된 포스포디에스테르 기를 치환함으로써 변형될 수 있다.

[0111] Fc 도메인

[0112] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 항원에 결합하는 가변 영역을 함유하지 않는다. 구체예들에서, Fc 도메인은 가변 영역을 함유하지 않는다. 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자를 생성하는데 유용한 Fc 도메인은 많은 상이한 출처로부터 얻어질 수 있다. 바람직한 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인은 사람 면역글로불린으로부터 유래된다. 그러나, Fc 도메인은, 예를 들어 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 기니피그) 또는 비-사람 영장류(예를 들어, 침팬지, 마카크) 종들을 포함하는 다른 포유류 종들의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다는 것이 이해된다. 또한, 혼성체 뉴클레아제 분자 Fc 도메인 또는 그것의 일부는 IgM, IgG, IgD, IgA, 및 IgE를 포함하는 임의의 면역글로불린 부류, 및 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 임의의 면역글로불린 이소타입(isotype)으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 사람 이소타입 IgG1이 사용된다.

[0113] 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 힌지, CH2, 및/또는 CH3 도메인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 돌연변이 및 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S를 포함하고, 3개 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S 및/또는 3개 힌지 시스테인에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S 및/또는 힌지 시스테인에 SCC로의 돌연변이 또는 3개 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 3

개 힌지 시스테인 중 적어도 하나에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 SCC 또는 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P331S 및 SCC 또는 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개 힌지 시스테인 중 하나에 SCC로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 SCC를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 3개 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 SSS를 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 59, 71, 73, 75, 87, 또는 89에 도시된다. 일부 양태에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 60, 72, 74, 76, 88, 또는 90에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 61, 63, 65, 67, 69, 77, 79, 81, 83, 85, 91, 93, 95, 또는 97에 도시된 대로이다. 일부 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호 62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84,86, 92, 94, 96, 또는 98에 도시된 대로이다.

[0114] 다양한 Fc 도메인 유전자 서열(예를 들어, 사람 불변 영역 유전자 서열)이 공공연히 접근가능한 기탁물의 형태로 이용할 수 있다. 특정 이펙터 기능을 갖는(또는 특정 이펙터 기능을 결여하는), 또는 면역원성을 감소시키는 특정 변형을 갖는 Fc 도메인 서열을 포함하는 불변 영역 도메인이 선택될 수 있다. 항체 및 항체-암호화 유전자의 많은 서열이 공개되어 있으며, 적합한 Fc 도메인 서열(예를 들어, 힌지, CH2, 및/또는 CH3 서열, 또는 그것의 일부)이 본 분야에 인정된 기술을 사용하여 이들 서열로부터 유래될 수 있다. 다음에, 전술한 방법 중 어느 것을 사용하여 얻어진 유전자 재료는 본 발명의 폴리펩티드를 얻기 위해서 변경되거나 합성될 수 있다. 또한, 본 발명의 범위는 불변 영역 DNA 서열의 대립형질, 변이체 및 돌연변이를 포괄한다는 것이 인정될 것이다.

[0115] Fc 도메인 서열은, 예를 들어 관심의 도메인을 증폭하도록 선택된 프라이머 및 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 클로닝될 수 있다. 항체로부터 Fc 도메인 서열을 클로닝하기 위해서 mRNA가 하이브리도마, 비장 또는 림프 세포로부터 분리되고, DNA에 역 전사되고, 항체 유전자가 PCR에 의해서 증폭될 수 있다. PCR 증폭 방법은 미국특허 No. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188; 및 예를 들어 "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, Calif.(1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270)에 상세히 설명된다. PCR은 공통 불변 영역 프라이머에 의해서, 또는 공개된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열에 기초한 더 특이적인 프라이머에 의해서 개시될 수 있다. 상기 논의된 대로, PCR은 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 클론을 분리하기 위해서 사용될 수 있다. 이 경우, 라이브러리가 공통 프라이머 또는 더 큰 상동성 프로브, 예를 들어 마우스 불변 영역 프로브에 의해서 스크리닝될 수 있다. 항체 유전자의 증폭에 적합한 많은 프라이머 세트가 본 분야에 주지되어 있다(예를 들어, 정제된 항체의 N-말단 서열에 기초한 5' 프라이머(Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); cDNA 단부의 급속 증폭(Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); 항체 리더 서열(Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250)). 항체 서열의 클로닝은 본원에 참고자료로 포함되는 1995년 1월 25일 제출된 Newman et al., 미국특허 5,658,570에 더 설명된다.

[0116] 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나 이상의 Fc 도메인을 포함할 수 있다(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상의 Fc 도메인). 한 구체예에서, Fc 도메인은 상이한 종류일 수 있다. 한 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자에 존재하는 적어도 하나의 Fc 도메인은 힌지 도메인 또는 그것의 일부를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 그것의 일부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 CH3 도메인 또는 그것의 일부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 CH4 도메인 또는 그것의 일부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 힌지 도메인 또는 그것의 일부와 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 그것의 일부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다(예를 들어, 힌지-CH2 배향으로). 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 그것의 일부와 적어도 하나의 CH3 도메인 또는 그것의 일부를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다(예를 들어, CH2-CH3 배향으로). 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 힌지 도메인 또는 그것의 일부, 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 그것의 일부, 및 적어도 하나의 CH3 도메인 또는 그것의 일부를, 예를 들어 힌지-CH2-CH3, 힌지-CH3-CH2, 또는 CH2-CH3-힌지 배향으로 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메

인을 포함한다.

[0117] 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 적어도 하나의 완전한 Fc 영역을 포함한다(예를 들어, 힌지, CH2, 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 도메인이며, 이들은 동일한 항체로부터 유래될 필요는 없다). 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 적어도 두개의 완전한 Fc 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 완전한 Fc 도메인은 사람 IgG 면역글로불린 중쇄(예를 들어, 사람 IgG1)로부터 유래된다.

[0118] 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 완전한 CH3 도메인을 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 완전한 CH2 도메인을 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 CH3 도메인, 및 힌지 영역 및 CH2 도메인 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 힌지 및 CH3 도메인을 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 바람직한 구체예에서, Fc 도메인은 사람 IgG 면역글로불린 중쇄(예를 들어, 사람 IgG1)로부터 유래된다.

[0119] 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인을 구성하는 불변 영역 도메인 또는 그것의 일부는 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 IgG1 분자로부터 유래된 CH2 도메인 또는 그것의 일부 및 IgG3 분자로부터 유래된 CH3 영역 또는 그것의 일부를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 IgG1 분자로부터 일부가, IgG3 분자로부터 일부가 유래된 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 본원에 제시된 대로, Fc 도메인은 자연 발생 항체 분자의 아미노산 서열에 변화가 있도록 변경될 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다.

[0120] 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나 이상의 트렁케이트된 Fc 도메인을 포함하며, 이것은 그렇지만 Fc 영역에 Fc 수용체(FcR) 결합 성질을 부여하기에 충분하다. 따라서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인은 FcRn 결합 부분을 포함하거나 구성될 수 있다. FcRn 결합 부분은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 이소타입의 중쇄로부터 유래될 수 있다. 한 구체예에서, 사람 이소타입 IgG1의 항체로부터의 FcRn 결합 부분이 사용된다. 다른 구체예에서, 사람 이소타입 IgG4의 항체로부터의 FcRn 결합 부분이 사용된다.

[0121] 한 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 완전한 Fc 영역의 하나 이상의 불변 영역 도메인을 결여하며, 즉 이들은 부분적으로 또는 완전히 결실된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 전체 CH2 도메인을 결여할 것이다(△CH2 구성물). 당업자는 이러한 구성물이 항체의 이화작용 속도에 대한 CH2 도메인의 조절성으로 인하여 바람직할 수 있다는 것을 인정할 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 IgG1 사람 불변 영역 도메인을 암호화하는 벡터(예를 들어, IDEC Pharmaceuticals로부터 이용가능한, 샌디에고)로부터 유래된 CH2 도메인-결실된 Fc 영역을 포함한다(예를 들어, WO 02/060955A2 및 WO02/096948A2 참조). 이 예시적인 벡터는 CH2 도메인을 결실하고, 도메인-결실된 IgG1 불변 영역을 발현하는 합성 벡터를 제공하도록 조작된다. 이들 예시적인 구성물은 바람직하게 각각의 Fc 도메인의 힌지 영역에 결합 CH3 도메인이 직접 융합하도록 조작된다.

[0122] 다른 구성물에서, 하나 이상의 구성성분 Fc 도메인 사이에 펩티드 스페이서를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 펩티드 스페이서는 힌지 영역과 CH2 도메인 사이에 및/또는 CH2와 CH3 도메인 사이에 위치될 수 있다. 예를 들어, CH2 도메인이 결실되고, 나머지 CH3 도메인(합성 또는 비합성)이 1-20, 1-10, 또는 1-5 아미노산 펩티드 스페이서와 함께 힌지 영역에 이어진 양립성 구성물이 발현될 수 있다. 이러한 펩티드 스페이서는, 예를 들어 불변 영역 도메인의 조절 요소가 자유로우며 접근가능한 상태로 있는 것이나, 또는 힌지 영역이 유연한 상태로 있는 것을 보장하기 위해서 첨가될 수 있다. 바람직하게, 본 발명과 양립하는 어떤 링커 펩티드든 상대적으로 비-면역원성이며, Fc의 적절한 접힘을 방해하지 않을 것이다.

[0123] Fc 아미노산에 대한 변화

[0124] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자에 사용된 Fc 도메인은, 예를 들어 아미노산 돌연변이(예를 들어, 부가, 결실 또는 치환)에 의해서 변경되거나 변형된다. 본원에 사용된 용어 "Fc 도메인 변이체"는 Fc 도메인이 유래된 야생형 Fc와 비교하여 아미노산 치환과 같은 적어도 하나의 아미노산 변형을 가진 Fc 도메인을 말한다. 예를 들어, Fc 도메인이 사람 IgG1 항체로부터 유래되는 경우, 변이체는 사람 IgG1 Fc 영역의 상응하

는 위치에 있는 야생형 아미노산과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 돌연변이(예를 들어, 치환)를 포함한다.

[0125] Fc 변이체의 아미노산 치환(들)은 항체에서 해당 잔기가 Fc 영역에 주어진 부분 번호에 상응하는 것으로 언급되는 Fc 도메인 내의 위치에 위치될 수 있다.

[0126] 한 구체예에서, Fc 변이체는 힌지 도메인 또는 그것의 일부에 위치된 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 변이체는 CH2 도메인 또는 그것의 일부에 위치된 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 변이체는 CH3 도메인 또는 그것의 일부에 위치된 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, Fc 변이체는 CH4 도메인 또는 그것의 일부에 위치된 아미노산 위치에 치환을 포함한다.

[0127] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 하나보다 많은 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함한다. 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게, 아미노산 치환은 적어도 1 아미노산 위치 또는 그 이상, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 아미노산 위치 또는 그 이상의 간격만큼 서로 공간적으로 떨어져 위치된다. 더 바람직하게, 조작된 아미노산은 적어도 5, 10, 15, 20, 또는 25 아미노산 위치 또는 그 이상의 간격만큼 서로 공간적으로 떨어져 위치된다.

[0128] 특정 구체예에서, Fc 변이체는 상기 야생형 Fc 도메인을 포함하는 Fc 도메인에 의해서 부여되는 적어도 하나의 이펙터 기능에 개선을 부여한다(예를 들어, Fc 수용체(FcγRI, FcγRII, 또는 FcγRIII) 또는 보체 단백질(예를 들어, C1q)에 결합하거나, 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC), 포식작용, 또는 보체 의존성 세포독성(CDCC)을 촉발하는 Fc 도메인의 능력의 개선). 다른 구체예에서, Fc 변이체는 조작된 시스테인 잔기를 제공한다.

[0129] 일부 양태에서, Fc 도메인은 아미노산 234-238 영역에 변화를 포함하며, 이것은 CH2 도메인의 처음에 서열 LLGGP를 포함한다. 일부 양태에서, Fc 변이체는 Fc 매개 이펙터 기능, 특히 ADCC를 변경하고, 및/또는 Fc 수용체에 대한 결합 결합활성을 감소시킨다. 일부 양태에서, K322 또는 P311과 같은 위치에 있는 CH2-CH3 접합부에 더 가까운 서열 변화는 보체 매개 세포독성을 제거하고 및/또는 FcR 결합에 대한 결합활성을 변경할 수 있다. 일부 양태에서, Fc 도메인은 잔기 P238 및 P331에 변화를 포함하며, 예를 들어 이들 위치에 있는 야생형 프롤린이 세린으로 변화한다. 일부 양태에서, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에서 이들 잔기에서 CCC, SCC, SSC, SCS, 또는 SSS를 암호화하기 위한 힌지 영역의 변경은, 예를 들어 접힌 단백질을 불안정하게 할 수 있는 홀 시스테인의 제거에 의해서 FcR 결합 및 분자 동종성에도 또한 영향을 미칠 수 있다.

[0130] 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 이펙터 기능 및/또는 FcR 결합에 개선을 부여한다고 주지된 본 분야에서 인정된 Fc 변이체를 이용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 국제 PCT 공개 WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/ 074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/ 074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/ 077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 및 WO06/ 085967A2; 미국 특허출원 공개 No. US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/ 0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US 2007/0286859 및 US20080057056; 또는 미국특허 No. 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; 7,083,784; 및 7,317,091에 개시된 아미노산 위치 중 하나 이상에 변화(예를 들어, 치환)를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 본원에 참고자료로 포함된다. 한 구체예에서, 특정한 변화(예를 들어, 본 분야에 개시된 하나 이상의 아미노산의 특정한 치환)가 개시된 아미노산 위치 중 하나 이상에서 이루어질 수 있다. 다른 구체예에서, 개시된 아미노산 위치 중 하나 이상에서 상이한 변화가 이루어질 수 있다(예를 들어, 본 분야에 개시된 하나 이상의 아미노산 위치의 상이한 치환).

[0131] Fc 감마 수용체 및 Fc 감마 수용체 아형에 대한 결합을 감소시키기 위한 Fc 도메인의 다른 아미노산 돌연변이가 고려된다. 예를 들어, Fc 영역의 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 322, 324, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 356, 360, 373, 376, 378, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439에 있는 돌연변이는 그 전체가 본원에 참고자료로 포함되는 2004년 5월 18일 발행된 미국특허 No. 6,737,056에 설명된 대로 결합을 변경시킬 수 있다. 이 특허는 IgG3에서 Pro331이 Ser로 변화되면 돌연변이되지 않은 IgG3와 비교하여 친화력이 6배 낮아졌다는 것을 보고했는데, 이는 Fc 감마 RI 결합에 Pro331의 관련을 시사한다. 이에 더하여, 위치 234, 235, 236, 및 237,

297, 318, 320 및 322에 있는 아미노산 변형은 그 전체가 참고자료로 본원에 포함되는 1997년 4월 29일 발행된 미국특허 제5,624,821호에서 수용체 결합 친화성을 잠재적으로 변경시키는 것으로 개시된다.

[0132] 사용이 고려되는 추가 돌연변이는, 예를 들어 그 전체가 본원에 참고자료로 포함되는 2006년 10월 19일 공개된 미국 특허출원 공개 No. 2006/0235208에 설명된 것들을 포함한다. 이 공보는 Fc 감마 수용체에 대해 감소된 결합, 감소된 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 또는 감소된 보체 의존성 세포독성을 나타내는 Fc 변이체들을 설명하며, 이들은 Fc 영역에 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하는데, 이것은 232G, 234G, 234H, 235D, 235G, 235H, 236I, 236N, 236P, 236R, 237K, 237L, 237N, 237P, 238K, 239R, 265G, 267R, 269R, 270H, 297S, 299A, 299I, 299V, 325A, 325L, 327R, 328R, 329K, 330I, 330L, 330N, 330P, 330R, 및 331L(넘버링은 EU 색인에 따른다)뿐만 아니라 이중 돌연변이형 236R/237K, 236R/325L, 236R/328R, 237K/325L, 237K/328R, 325L/328R, 235G/236R, 267R/269R, 234G/235G, 236R/237K/325L, 236R/325L/328R, 235G/236R/237K, 및 237K/325L/328R를 포함한다. 이 공보에서 설명된 대로 사용이 고려되는 다른 돌연변이는 227G, 234D, 234E, 234G, 234I, 234Y, 235D, 235I, 235S, 236S, 239D, 246H, 255Y, 258H, 260H, 2641, 267D, 267E, 268D, 268E, 272H, 272I, 272R, 281D, 282G, 283H, 284E, 293R, 295E, 304T, 324G, 324I, 327D, 327A, 328A, 328D, 328E, 328F, 328I, 328M, 328N, 328Q, 328T, 328V, 328Y, 330I, 330L, 330Y, 332D, 332E, 335D, 위치 235와 236 사이에 G의 삽입, 위치 235와 236 사이에 A의 삽입, 위치 235와 236 사이에 S의 삽입, 위치 235와 236 사이에 T의 삽입, 위치 235와 236 사이에 N의 삽입, 위치 235와 236 사이에 D의 삽입, 위치 235와 236 사이에 V의 삽입, 위치 235와 236 사이에 L의 삽입, 위치 235와 236 사이에 G의 삽입, 위치 235와 236 사이에 A의 삽입, 위치 235와 236 사이에 S의 삽입, 위치 235와 236 사이에 T의 삽입, 위치 235와 236 사이에 N의 삽입, 위치 235와 236 사이에 D의 삽입, 위치 235와 236 사이에 V의 삽입, 위치 235와 236 사이에 L의 삽입, 위치 297와 298 사이에 G의 삽입, 위치 297와 298 사이에 A의 삽입, 위치 297와 298 사이에 S의 삽입, 위치 297와 298 사이에 D의 삽입, 위치 326과 327 사이에 G의 삽입, 위치 326과 327 사이에 A의 삽입, 위치 326과 327 사이에 T의 삽입, 위치 326과 327 사이에 D의 삽입, 및 위치 326과 327 사이에 E의 삽입을 포함한다(넘버링은 EU 색인에 따른다). 이들에 더하여, 미국 특허출원 공개 No. 2006/0235208에 설명된 돌연변이는 227G/332E, 234D/332E, 234E/332E, 234Y/332E, 234I/332E, 234G/332E, 235I/332E, 235S/332E, 235D/332E, 235E/332E, 236S/332E, 236A/332E, 236S/332D, 236A/332D, 239D/268E, 246H/332E, 255Y/332E, 258H/332E, 260H/332E, 264I/332E, 267E/332E, 267D/332E, 268D/332D, 268E/332D, 268E/332E, 268D/332E, 268E/330Y, 268D/330Y, 272R/332E, 272H/332E, 283H/332E, 284E/332E, 293R/332E, 295E/332E, 304T/332E, 324I/332E, 324G/332E, 324I/332D, 324G/332D, 327D/332E, 328A/332E, 328T/332E, 328V/332E, 328I/332E, 328F/332E, 328Y/332E, 328M/332E, 328D/332E, 328E/332E, 328N/332E, 328Q/332E, 328A/332D, 328T/332D, 328V/332D, 328I/332D, 328F/332D, 328Y/332D, 328M/332D, 328D/332D, 328E/332D, 328N/332D, 328Q/332D, 330L/332E, 330Y/332E, 330I/332E, 332D/330Y, 335D/332E, 239D/332E, 239D/332E/330Y, 239D/332E/330L, 239D/332E/330I, 239D/332E/268E, 239D/332E/268D, 239D/332E/327D, 239D/332E/284E, 239D/268E/330Y, 239D/332E/268E/330Y, 239D/332E/327A, 239D/332E/268E/327A, 239D/332E/330Y/327A, 332E/330Y/268E/327A, 239D/332E/268E/330Y/327A, 삽입물 G>297-298/332E, 삽입물 A>297-298/332E, 삽입물 S>297-298/332E, 삽입물 D>297-298/332E, 삽입물 G>326-327/332E, 삽입물 A>326-327/332E, 삽입물 T>326-327/332E, 삽입물 D>326-327/332E, 삽입물 E>326-327/332E, 삽입물 G>235-236/332E, 삽입물 A>235-236/332E, 삽입물 S>235-236/332E, 삽입물 T>235-236/332E, 삽입물 N>235-236/332E, 삽입물 D>235-236/332E, 삽입물 V>235-236/332E, 삽입물 L>235-236/332E, 삽입물 G>235-236/332D, 삽입물 A>235-236/332D, 삽입물 S>235-236/332D, 삽입물 T>235-236/332D, 삽입물 N>235-236/332D, 삽입물 D>235-236/332D, 삽입물 V>235-236/332D, 및 삽입물 L>235-236/332D(넘버링은 EU 색인에 따른다)를 포함하며 사용이 고려된다. 돌연변이형 L234A/L235A은, 예를 들어 그 전체가 본원에 참고자료로 포함되는 2003년 6월 12일 공개된 미국 특허출원 공개 No. 2003/0108548에 설명된다. 구체예들에서, 원하는 변형은 개별적으로 또는 조합으로 포함된다.

[0133] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 도메인에 대해 항체의 항원-독립적 이펙터 기능, 특히 항체의 순환 반감기를 변경하는 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 혼성체 뉴클레아제 분자는 이러한 치환을 결여한 혼성체 뉴클레아제 분자와 비교하여 FcRn에 대해 증가된 또는 감소된 결합을 나타내고, 따라서 각기 혈청에서 증가된 또는 감소된 반감기를 가진다. FcRn에 대해 개선된 친화성을 가진 Fc 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 기대되며, 이러한 분자는 투여된 폴리펩티드의 긴 반감기가 바람직한 경우에, 예를 들어 만성 질환이나 장애를 치료하기 위한 경우에 포유류의 치료 방법에서 유용한 용도를 가진다. 반대로, 감소된 FcRn 결합 친화성을 가진 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 가질 것으로 예상되고, 이러한 분자는 또한, 예를 들어 단축된 순환 시간이 유익할 수 있는 경우에, 예를 들어 생체내 진단 영상시 또는 출발 폴리펩티드가 연장된 기

간 동안 순환계에 존재할 때 독성 부작용을 갖는 경우에 포유류에 투여하기에 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화성을 지닌 Fc 변이체는 태반을 가로지를 가능성이 낮으며, 따라서 임신한 여성의 질환이나 장애의 치료에 또한 유용하다. 이에 더하여, 감소된 FcRn 결합 친화성이 바람직할 수 있는 다른 용도는 뇌, 신장 및/또는 간 국소화가 바람직한 용도를 포함한다. 한 전형적인 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 혈관구조로부터 신장 사구체의 상피를 가로지른 감소된 수송을 나타낸다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 뇌로부터 혈액 뇌 장벽(BBB)을 가로질러 혈관 공간으로 감소된 수송을 나타낸다. 한 구체예에서, FcRn 결합이 변경된 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 도메인의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 가진 적어도 하나의 Fc 도메인(예를 들어, 하나 또는 두 Fc 도메인)을 포함한다. FcRn 결합 활성을 변경하는 예시적인 아미노산 치환은 본원에 참고자료로 포함되는 국제 PCT 공개 No. WO05/047327에 개시된다.

[0134] 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는, 예를 들어 야생형 Fc 영역과 비교하여 폴리펩티드의 항원-의존성 이펙터 기능, 특히 ADCC 또는 보체 활성화를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함한다. 예시적인 구체예에서, 상기 혼성체 뉴클레아제 분자는 Fc 감마 수용체(예를 들어, CD16)에 대해 변경된 결합을 나타낸다. 이러한 혼성체 뉴클레아제 분자는 야생형 폴리펩티드와 비교하여 FcR 감마에 대해 증가된 또는 감소된 결합을 나타내며, 따라서 각각 증진된 또는 감소된 이펙터 기능을 매개한다. FcγR에 대한 친화성이 개선된 Fc 변이체는 이펙터 기능을 증진시킬 것으로 기대되며, 이러한 분자는 표적 분자 파괴가 바람직한 경우에 포유류를 치료하는 방법에서 유용한 용도를 가진다. 반대로, FcγR 결합 친화성이 감소된 Fc 변이체는 이펙터 기능을 감소시킬 것으로 예상되고, 이러한 분자는, 예를 들어 정상 세포가 표적 분자를 발현할 수 있는 경우나, 또는 폴리펩티드의 장기 투여가 원치않는 면역계 활성화를 가져올 수 있는 경우에, 표적 분자 파괴가 바람직하지 않은 상태의 치료에 유용하다. 한 구체예에서, Fc를 포함하는 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드와 비교하여 옵소닌화, 포식작용, 보체 의존성 세포독성, 항원 의존성 세포성 세포독성(ADCC), 또는 이펙터 세포 조정으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변경된 항원 의존성 이펙터 기능을 나타낸다.

[0135] 한 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 활성화 FcγR(예를 들어, FcγI, FcγIIa, 또는 FcγRIIIa)에 대해 변경된 결합을 나타낸다. 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 억제성 FcγR(예를 들어, FcγRIIb)에 대해 변경된 결합 친화성을 나타낸다. FcR 또는 보체 결합 활성을 변경하는 예시적인 아미노산 치환은 본원에 참고자료로 포함되는 국제 PCT 공개 No. WO05/063815에 개시된다.

[0136] 또한, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 혼성체 뉴클레아제 분자의 글리코실화를 변경하는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인은 감소된 글리코실화를 초래하는 돌연변이를 가진 Fc 도메인을 포함할 수 있거나(예를 들어, N- 또는 O-연결된 글리코실화), 또는 야생형 Fc 도메인의 변경된 글리코 형태를 포함할 수 있다(예를 들어, 저 푸코오스 또는 푸코오스 미함유 글리칸). 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 글리코실화 모티프 근처에 또는 내부에 아미노산 치환을 가지며, 예를 들어 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 함유하는 N-결합된 글리코실화 모티프를 가진다. 글리코실화를 감소시키거나 변경하는 예시적인 아미노산 치환은 본원에 참고자료로 포함되는 국제 PCT 공개 No. WO05/018572 및 미국 특허공개 No. 2007/0111281에 개시된다.

[0137] 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 용매-노출된 표면에 위치된 조작된 시스테인 잔기 또는 그 유사체를 가진 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 바람직하게, 조작된 시스테인 잔기 또는 그 유사체는 Fc에 의해서 부여되는 이펙터 기능을 방해하지 않는다. 더 바람직하게, 이 변경은 Fc 수용체(예를 들어, FcγI, FcγIIa, 또는 FcγRIIIa) 또는 보체 단백질(예를 들어, C1q)과 결합하거나, 또는 면역 이펙터 기능(예를 들어, 항체 의존성 세포독성(ADCC), 포식작용, 또는 보체 의존성 세포독성(CDCC))을 촉발하는 Fc의 능력을 방해하지 않는다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 제2 시스테인 잔기와의 이황화 결합이 실질적으로 없는 적어도 하나의 조작된 유리 시스테인 잔기 또는 그 유사체를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 이어서, 상기 조작된 시스테인 잔기 또는 그 유사체 중 어느 것이 본 분야에 인정된 기술을 사용하여 기능 도메인에 콘쥬게이트될 수 있다(예를 들어, 티올-반응성 이종 이가 링커에 의한 콘쥬게이트).

[0138] 한 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 본원에 설명된 Fc 도메인으로부터 독립적으로 선택된 둘 이상의 구성 Fc 도메인을 가진 유전자 융합된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, Fc 도메인들은 동일하다. 다른 구체예에서, Fc 도메인 중 적어도 둘은 상이하다. 예를 들어, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인은 동일한 수의 아미노산 잔기를 포함할 수 있거나, 또는 이들은 하나 이상의 아미노산 잔기만큼 길이가 상이할 수 있다(예를 들어, 약 5 아미노산 잔기(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5 아미노산 잔기), 약 10 잔기, 약 15 잔기, 약 20 잔기, 약 30 잔기, 약 40 잔기, 또는 약 50 잔기까지). 또 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 Fc 도메인은 하나 이상의 아미노산 위치에서 서열이 다를 수 있다. 예를 들어,

Fc 도메인 중 적어도 둘은 약 5 아미노산 위치(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5 아미노산 위치), 약 10 위치, 약 15 위치, 약 20 위치, 약 30 위치, 약 40 위치, 또는 약 50 위치에서 상이할 수 있다.

[0140] 링커 도메인

[0141] 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 링커 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 복수의 링커 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 링커 도메인은 폴리펩티드 링커이다. 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자를 형성하기 위하여 하나 이상의 Fc 도메인과 하나 이상의 뉴클레아제 도메인을 융합하는 폴리펩티드 링커를 사용하는 것이 바람직하다.

[0142] 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 합성 링커이다. 폴리펩티드 링커와 관련하여 본원에서 사용된 용어 "합성"은 원래 자연적으로 연결되지 않는 서열(이것은 자연 발생한 것일 수도 있고 아닐 수도 있다)(예를 들어, Fc 도메인 서열)에 선형 아미노산 서열로 연결된 아미노산 서열(이것은 자연 발생한 것일 수도 있고 아닐 수도 있다)을 포함하는 펩티드(또는 폴리펩티드)를 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 자연 발생 폴리펩티드의 변형된 형태(예를 들어, 부가, 치환 또는 결실과 같은 돌연변이를 포함하는)거나, 또는 제1 아미노산 서열(이것은 자연 발생한 것일 수도 있고 아닐 수도 있다)을 포함하는 비-자연 발생 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 링커는, 예를 들어 기능 Fc 도메인의 적절한 접힘 및 형성이 보장되도록 Fc 도메인이 병치되는 것을 보장하기 위해서 사용될 수 있다. 바람직하게, 본 발명과 양립하는 폴리펩티드 링커는 상대적으로 비-면역성이며, 결합 단백질의 단량체 서브유닛들의 어떤 비-공유 결합도 저해하지 않을 것이다.

[0143] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 단일 폴리펩티드 사슬에서 임의의 둘 이상의 도메인을 프레임 내 연결하기 위한 폴리펩티드 링커를 사용한다. 한 구체예에서, 둘 이상의 도메인은 본원에 논의된 Fc 도메인 또는 뉴클레아제 도메인 중 어느 것으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 동일한 Fc 도메인을 융합하기 위하여 사용될 수 있으며, 이로써 동종체 Fc 영역이 형성된다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 상이한 Fc 도메인(예를 들어, 야생형 Fc 도메인 및 Fc 도메인 변이체)을 융합하기 위하여 사용될 수 있으며, 이로써 이종체 Fc 영역이 형성된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 제1 Fc 도메인(예를 들어, 힌지 도메인 또는 그것의 일부, CH2 도메인 또는 그것의 일부, 완전 CH3 도메인 또는 그것의 일부, FcRn 결합 부분, FcγR 결합 부분, 보체 결합 부분, 또는 그것의 일부)의 C-말단과 제2 Fc 도메인(예를 들어, 완전 Fc 도메인)의 N-말단을 유전자 융합하기 위해서 사용될 수 있다.

[0144] 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 Fc 도메인의 일부를 포함한다. 예를 들어, 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 항체의 면역글로불린 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 항체의 CH2 도메인을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 항체의 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 면역글로불린(예를 들어, 사람 면역글로불린)의 다른 부분도 역시 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 링커는 CH1 도메인 또는 그것의 일부, CL 도메인 또는 그것의 일부, VH 도메인 또는 그것의 일부, 또는 VL 도메인 또는 그것의 일부를 포함할 수 있다. 상기 부분들은, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 항체를 포함하는 임의의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다.

[0145] 예시적인 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 면역글로불린 힌지 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 상부 힌지 도메인을 포함한다(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 상부 힌지 도메인). 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 중간 힌지 도메인을 포함한다(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중간 힌지 도메인). 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 하부 힌지 도메인을 포함한다(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하부 힌지 도메인).

[0146] 다른 구체예에서, 동일한 또는 상이한 항체 이소타입으로부터 유래된 힌지 요소들을 조합한 폴리펩티드 링커가 구성될 수 있다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1 힌지 영역의 적어도 일부와 IgG2 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1 힌지 영역의 적어도 일부와 IgG3 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1 힌지 영역의 적어도 일부와 IgG4 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG2 힌지 영역의 적어도 일부와 IgG3 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG2 힌지 영역의 적어도 일부와 IgG4 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1 힌지 영역의 적어도 일부, IgG2 힌지 영역의 적어도 일부, 및 IgG4 힌지 영역의 적어도 일부를 포함하는 키메라 힌지를 포함한다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG1 상부 및 중간 힌지와 단일 IgG3 중간 힌지 반복 모티프를 포함할 수

있다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IgG4 상부 힌지, IgG1 중간 힌지 및 IgG2 하부 힌지를 포함할 수 있다.

[0147] 다른 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 gly-ser 링커를 포함하거나 구성된다. 본원에서 사용된 용어 "gly-ser" 링커는 글리신과 세린 잔기로 구성된 펩티드를 말한다. 예시적인 gly/ser 링커는 식 $(Gly_4Ser)n$의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 n은 양의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5)이다. 바람직한 gly/ser 링커는 $(Gly_4Ser)4$이다. 다른 바람직한 gly/ser 링커는 $(Gly_4Ser)3$이다. 다른 바람직한 gly/ser 링커는 $(Gly_4Ser)5$이다. 특정 구체예에서, gly-ser 링커는 폴리펩티드 링커(예를 들어, 본원에 설명된 폴리펩티드 링커 서열 중 어느 것)의 두개의 다른 서열 사이에 삽입될 수 있다. 다른 구체예에서, gly/ser 링커는 폴리펩티드 링커(예를 들어, 본원에 설명된 폴리펩티드 링커 서열 중 어느 것)의 다른 서열의 한 단부 또는 양 단부에 부착된다. 또 다른 구체예에서, 둘 이상의 gly-ser 링커가 폴리펩티드 링커에 일렬로 도입된다. 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 상부 힌지 영역의 적어도 일부(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 분자로부터 유래), 중간 힌지 영역의 적어도 일부(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 분자로부터 유래) 및 일련의 gly/ser 아미노산 잔기(예를 들어, $(Gly_4Ser)n$과 같은 gly/ser 링커)를 포함한다.

[0148] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 비-자연 발생 면역글로불린 힌지 영역 도메인, 예를 들어 힌지 영역 도메인을 포함하는 폴리펩티드에서 자연적으로 발견되지 않는 힌지 영역 도메인 및/또는 자연 발생 면역글로불린 힌지 영역 도메인과 아미노산 서열이 상이하도록 변경된 힌지 영역 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 돌연변이는 본 발명의 폴리펩티드 링커를 제조할 수 있는 힌지 영역 도메인으로 제조될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 시스테인의 자연 발생 개수를 포함하지 않는 힌지 도메인을 포함하며, 즉 상기 폴리펩티드 링커는 자연 발생 힌지 분자보다 더 적은 시스테인이나 더 많은 수의 시스테인을 포함한다.

[0149] 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 생물학적으로 관련 있는 펩티드 서열 또는 그것의 서열 일부를 포함한다. 예를 들어, 생물학적으로 관련 있는 펩티드 서열은, 제한은 아니지만 항-거부 또는 항-염증 펩티드로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 상기 항-거부 또는 항-염증 펩티드는 시토카인 저해 펩티드, 세포 유착 저해 펩티드, 트롬빈 저해 펩티드, 및 혈소판 저해 펩티드로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드 링커는 IL-1 저해 또는 길항 펩티드 서열, 에리트로포이에틴(EPO)-의태 펩티드 서열, 트롬보포이에틴(TPO)-의태 펩티드 서열, G-CSF 의태 펩티드 서열, TNF-길항 펩티드 서열, 인테그린-결합 펩티드 서열, 셀렉틴 길항 펩티드 서열, 항-병원성 펩티드 서열, 혈관활성 장 펩티드(VIP) 의태 펩티드 서열, 칼모듈린 길항 펩티드 서열, 비만 세포 길항제, SH3 길항 펩티드 서열, 유로키나아제 수용체(UKR) 길항 펩티드 서열, 소마토스타틴 또는 코르티스타틴 의태 펩티드 서열, 및 대식세포 및/또는 T 세포 저해 펩티드 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 펩티드 서열을 포함한다. 폴리펩티드 링커로서 사용될 수 있는 것 중 어느 하나인 예시적인 펩티드 서열은 본원에 참고자료로 포함되는 미국특허 No. 6,660,843에 개시된다.

[0150] 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 폴리펩티드 링커에 도입되도록 폴리펩티드 링커를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 도입함으로써 이들 예시적인 폴리펩티드 링커의 변이체 형태가 생성될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 표준 기술에 의해서 돌연변이가 도입될 수 있다.

[0151] 본 발명의 폴리펩티드 링커는 적어도 하나의 아미노산 길이이며, 다양한 길이를 가질 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 1 내지 약 50 아미노산 길이이다. 본 맥락에서 사용되었을 때 용어 "약"은 +/- 2의 아미노산 잔기를 나타낸다. 링커 길이는 양의 정수여야 하므로 약 1 내지 약 50 아미노산 길이의 길이는 1 내지 48-52 아미노산 길이의 길이를 의미한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 10-20 아미노산 길이이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 15 내지 약 50 아미노산 길이이다.

[0152] 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 20 내지 약 45 아미노산 길이이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 15 내지 약 25 아미노산 길이이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 링커는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0153] 폴리펩티드 링커는 본 분야에 주지된 기술을 사용하여 폴리펩티드 서열에 도입될 수 있다. 변형은 DNA 서열 분석에 의해서 확인될 수 있다. 플라스미드 DNA는 생성된 폴리펩티드의 안정한 생산을 위해 숙주 세포를 형질전환하는데 사용될 수 있다.

[0155] 뉴클레아제 도메인

[0156] 특정 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 전형적으로 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인 및 적어도 하나의 연결된 Fc 도메인을 포함한다. 특정 양태에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 복수의 뉴클레아제 도메인을 포함한다.

[0157] 일부 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 DNase의 실질적으로 전부 또는 적어도 효소 활성 단편이다. 일부 구체예에서, DNase는 타입 I 분비된 DNase, 바람직하게 DNase 1과 같은 사람 DNase이다. 예시적인 DNase 1 도메인은 서열번호 48-53 및 102에 제시된다. 예시적인 사람 DNase 1은 UniProtKB 엔트리 P24855(서열번호 49 및 102)에 설명된다. 일부 구체예에서, DNase는 DNase 1 및/또는 DNase 1-유사(DNaseL) 효소, 1-3이다. 예시적인 사람 DNase 1-유사 효소, 1-3은 UniProtKB 엔트리 Q13609(서열번호 57 및 103)에 설명된다. 일부 구체예에서, DNase는 TREX1 (세 프라임 수선 엑소뉴클레아제 1)이다. 예시적인 사람 TREX1은 UniProtKB 엔트리 Q9NSU2(서열번호 104)에 설명된다. 바람직하게, 사람 TREX1은 세포내 핵 표적화 서열을 결여하는 C-말단 트렁케이트 사람 TREX1, 예를 들어 서열번호 105에 제시된 72 C-말단 아미노산을 결여하는 사람 TREX1이다.

[0158] 일부 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 RNase의 실질적으로 전부 또는 적어도 효소 활성인 단편이다. 일부 구체예에서, RNase는 RNase A 수퍼패밀리의 세포외 또는 분비성 RNase, 예를 들어 RNase A, 바람직하게 사람 췌장 RNase이다. 예시적인 사람 RNase는 UniProtKB 엔트리 P07998(서열번호 58 및 101)에 설명된다.

[0159] 한 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, 화학적 콘쥬게이트 또는 유전자 융합(예를 들어, 직접적으로 또는 폴리펩티드 링커를 통해서)). 다른 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 C-말단에 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, 화학적 콘쥬게이트 또는 유전자 융합(예를 들어, 직접적으로 또는 폴리펩티드 링커를 통해서)). 다른 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 아미노산 측쇄를 통해서 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, 화학적 콘쥬게이트 또는 유전자 융합(예를 들어, 직접적으로 또는 폴리펩티드 링커를 통해서)). 특정 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 사람 면역글로불린 힌지 도메인 또는 그것의 일부를 통해서 Fc 도메인에 융합된다.

[0160] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 둘 이상의 뉴클레아제 도메인 및 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다. 예를 들어, 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 N-말단 및 C-말단 모두에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 다른 예시적인 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 Fc 도메인의 탠덤 어레이를 형성하기 위해서 일렬로 함께 연결된 다수의 Fc 도메인(예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 Fc 도메인)의 N- 및 C-말단 단부 모두에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0161] 다른 구체예에서, 둘 이상의 뉴클레아제 도메인은 서로 일렬로 연결되며(예를 들어, 폴리펩티드 링커를 통해서), 뉴클레아제 도메인의 탠덤 어레이는 Fc 도메인 또는 Fc 도메인의 탠덤 어레이의 C-말단이나 N-말단 중 어느 하나에 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, 화학적 콘쥬게이트 또는 유전자 융합(예를 들어, 직접적으로 또는 폴리펩티드 링커를 통해서)). 다른 구체예에서, 뉴클레아제 도메인의 탠덤 어레이는 Fc 도메인 또는 Fc 도메인의 탠덤 어레이 C-말단과 N-말단 모두에 작동 가능하게 연결된다.

[0162] 다른 구체예에서, 하나 이상의 뉴클레아제 도메인이 두 Fc 도메인 사이에 삽입될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 뉴클레아제 도메인은 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자의 폴리펩티드 링커의 전부 또는 일부를 형성할 수 있다.

[0163] 본 발명의 바람직한 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인(예를 들어, RNase 또는 DNase), 적어도 하나의 링커 도메인, 및 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함한다.

[0164] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 생물학적 효과를 매개하는 표적 분자에 특이적인 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인을 가진다. 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자와 표적 분자(예를 들어, DNA 또는 RNA)의 결합은, 예를 들어 세포, 조직으로부터, 또는 순환계로부터 표적 분자의 감소 또는 제거를 가져온다.

[0165] 특정 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 둘 이상의 뉴클레아제 도메인을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 동일하며, 예를 들어 RNase와 RNase, 또는 TREX1와 TREX1이다. 다른 구체예에서, 뉴클레아제 도메인은 상이하며, 예를 들어 DNase와 RNase이다.

[0166] 다른 구체예에서, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 둘 이상의 폴리펩티드를 갖는 결합 단백질을 형성하기 위해서 다른 폴리펩티드와 함께 조립될 수 있으며("다량체"), 여기서 다량체의 적어도 하나의 폴리펩티드는 본

발명의 혼성체 뉴클레아제 분자이다. 예시적인 다량체 형태는 이량체, 삼량체, 사량체 및 육량체의 변경된 결합 단백질 등이다. 한 구체예에서, 다량체의 폴리펩티드들은 동일하다(즉, 동종 변경된 결합 단백질, 예를 들어 동종이량체, 동종사량체). 다른 구체예에서, 다량체의 폴리펩티드들은 상이하다(예를 들어, 이종체).

[0168] 혼성체 뉴클레아제 분자의 제조 방법

[0169] 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 크게 재조합 DNA 기술을 사용하여 형질전환된 숙주 세포에서 제조될 수 있다. 이를 위해서, 펩티드를 코딩하는 재조합 DNA 분자가 제조된다. 이러한 DNA 분자를 제조하는 방법은 본 분야에 잘 주지되어 있다. 예를 들어, 펩티드를 코딩하는 서열이 적합한 제한 효소를 사용하여 DNA로부터 절제될 수 있다. 또는 달리, DNA 분자는 포스포라미데이트 방법과 같은 화학 합성 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 또한, 이들 기술의 조합이 사용될 수 있다.

[0170] 또한, 본 발명은 적절한 숙주에서 펩티드를 발현할 수 있는 벡터를 포함한다. 벡터는 적절한 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 펩티드를 코딩하는 DNA 분자를 포함한다. DNA 분자가 벡터에 삽입되기 전이나 후에 이 작동 가능한 연결을 행하는 방법은 잘 주지되어 있다. 발현 제어 서열은 프로모터, 액티베이터, 인핸서, 오퍼레이터, 리보솜 뉴클레아제 도메인, 출발 신호, 중단 신호, 캡 신호, 폴리아데닐화 신호, 및 전사 또는 번역의 제어와 관련된 다른 신호를 포함한다.

[0171] DNA 분자를 갖는 결과의 벡터는 적절한 숙주를 형질전환시키기 위하여 사용된다. 이 형질전환은 본 분야에 잘 주지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0172] 다수의 이용가능한 잘 주지된 숙주 세포 중 어느 것도 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 특정 숙주의 선택은 본 분야에서 인정된 많은 요인에 의존한다. 이들은, 예를 들어 선택된 발현 벡터와의 양립성, DNA 분자에 의해서 암호화된 펩티드의 독성, 형질전환율, 펩티드 회수 용이성, 발현 특성, 생체안전성 및 비용을 포함한다. 모든 숙주가 특정 DNA 서열의 발현에 동등하게 효과적일 수 없다는 것을 이해하면 이들 요인들이 균형을 이루어야 한다. 이들 일반적 지침 내에서 유용한 미생물 숙주는 박테리아(예를 들어, *E. coli* sp.), 효모(예를 들어, *Saccharomyces* sp.) 및 다른 진균, 곤충, 식물, 배양물 중의 포유류(사람을 포함한다) 세포, 또는 본 분야에 주지된 다른 숙주를 포함한다.

[0173] 다음에, 형질전환된 숙주는 배양되고 정제된다. 숙주 세포는 종래의 발효 조건에서 배양될 수 있으며, 이로써 원하는 화합물이 발현된다. 이러한 발효 조건은 본 분야에 잘 주지되어 있다. 마지막으로, 본 분야에 잘 주지된 방법에 의해서 펩티드가 배양물로부터 정제된다.

[0174] 화합물은 또한 합성 방법에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들어, 고체상 합성 기술이 사용될 수 있다. 적합한 기술이 본 분야에 잘 주지되어 있으며, Merrifield (1973), Chemistry polypeptides, pp. 335-61(Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al.(1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; U.S. Pat. No. 3,941,763; Finn et al. (1976), The Proteins(3rd ed.) 2:105-253; 및 Erickson et al. (1976), The Proteins(3rd ed.) 2:257-527에 설명된 것들을 포함한다. 고체상 합성은 그것이 작은 펩티드를 제조하는 가장 비용 효과적인 방법이기 때문에 개별 펩티드를 제조하는 바람직한 기술이다. 유도체화된 펩티드를 함유하거나, 또는 비-펩티드 기를 함유하는 화합물이 잘 주지된 유기화학 기술에 의해서 합성될 수 있다.

[0175] 분자 발현/합성의 다른 방법도 일반적으로 당업자에게 주지되어 있다.

[0177] 제약 조성물 및 치료적 사용 방법

[0178] 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 단독 투여된다. 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 다른 치료제의 투여 전에 투여된다. 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 다른 치료제의 투여와 동시에 투여된다. 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 다른 치료제의 투여에 이어서 투여된다. 다른 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 적어도 하나의 다른 치료제의 투여 전에 투여된다. 당업자에게 인정되는 대로, 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 다른 조제/화합물과 조합된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자 및 다른 조제는 동시에 투여된다. 일부 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자 및 다른 조제는 동시에 투여되지 않고, 혼성체 뉴클레아제 분자는 조제가 투여되기 전이나 후에 투여된다. 일부 구체예에서, 대상은 동일한 예방 기간, 장애 발생, 및/또는 치료 기간 동안 혼성체 뉴클레오티드 분자와 나머지 조제를 모두 받는다.

[0179] 본 발명의 제약 조성물은 조합 요법으로, 즉 다른 조제와 조합되어 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 조합 요

법은 적어도 하나의 다른 조제와 조합된 뉴클레아제 분자를 포함한다. 조제는, 제한은 아니지만 시험관내 합성 제조된 화학 조성물, 항체, 항원 결합 영역, 및 이들의 조합 및 콘쥬게이트를 포함한다. 특정 구체예에서, 조제는 작용제, 길항제, 알로스테릭 조정제, 또는 독소로 작용할 수 있다.

[0180] 특정 구체예에서, 본 발명은 제약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 용해제, 유화제, 보존제 및/또는 보조제와 함께 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0181] 특정 구체예에서, 본 발명은 제약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 용해제, 유화제, 보존제 및/또는 보조제와 함께 혼성체 뉴클레아제 분자 및 치료적 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0182] 특정 구체예에서, 허용되는 제제 물질은 바람직하게 사용된 투약량 및 농도에서 수용자에게 비독성이다. 일부 구체예에서, 제제 물질(들)은 피하(s.c.) 및/또는 정맥내(I.V.) 투여를 위한 것이다. 특정 구체예에서, 제약 조성물은, 예를 들어 조성물의 pH, 삼투농도, 점도, 투명도, 색, 등장성, 냄새, 멸균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡착 또는 투과를 변형하거나, 유지하거나 또는 보존하기 위한 제제 물질을 함유할 수 있다. 특정 구체예에서, 적합한 제제 물질은, 제한은 아니지만 아미노산(글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신 등); 항균제; 항산화제(아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨 등); 버퍼(붕산염, 중탄산염, 트리스-HCl, 시트르산염, 인산염 또는 다른 유기산 등); 벌크화제(만니톨 또는 글리신 등); 킬레이트화제(에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA) 등); 복합체화제(카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린 등); 충전제; 단당류; 이당류; 및 다른 탄수화물(글루코오스, 만노오스 또는 덱스트린 등); 단백질(혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린 등); 착색, 향미 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(폴리비닐피롤리돈 등); 저분자량 폴리펩티드; 염-형성 카운터이온(나트륨 등); 보존제(염화 벤잘코늄, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소 등); 용매(글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 등); 당 알코올(만니톨 또는 소르비톨 등); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(플루로닉스, PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 예를 들어 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 틸록사팔 등); 안정성 증진제(수크로오스 또는 소르비톨 등); 장성 증진제(알칼리 금속 할로겐화물, 바람직하게 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨, 소르비톨 등); 송달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 제약 보조제를 포함한다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)). 일부 구체예에서, 제제는 PBS; 20mM NaOAC, pH 5.2, 50mM NaCl; 및/또는 10mM NAOAC, pH 5.2, 9% 수크로오스를 포함한다.

[0183] 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 치료 분자는 본 분야에 주지된 반감기 연장 비히클에 연결된다. 이러한 비히클은, 제한은 아니지만 폴리에틸렌 글리콜, 글리코겐(예를 들어, 혼성체 뉴클레아제 분자의 글리코실화), 및 덱스트란을 포함한다. 이러한 비히클은, 예를 들어 미국 출원 No. 09/428,082이며 현재 미국특허 No. 6,660,843인 공개된 PCT 출원 WO 99/25044에 설명되며, 이것은 모든 목적을 위해서 본원에 참고자료로 포함된다.

[0184] 특정 구체예에서, 최적 제약 조성물은, 예를 들어 의도된 투여 경로, 송달 형성 및 원하는 투약량에 의존하여 당업자에 의해서 결정될 것이다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences(상동)를 참조한다. 특정 구체예에서, 이러한 조성물은 본 발명의 항체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 클리어런스 속도에 영향을 미칠 수 있다.

[0185] 특정 구체예에서, 제약 조성물의 일차 비히클 또는 담체는 원래 수성이거나 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 적합한 비히클 또는 담체는 주사용 물, 생리 식염수 용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있으며, 아마도 비경구 투여를 위한 조성물에 공통되는 다른 물질로 보충될 것이다. 일부 구체예에서, 식염수는 등장성 포스페이트-완충 식염수를 포함한다. 특정 구체예에서, 중성 완충된 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합될 식염수가 추가로 예시되는 비히클이다. 특정 구체예에서, 제약 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 트리스 버퍼, 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 버퍼를 포함하며, 이들은 소르비톨 또는 적합한 치환체를 더 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 조성물은 원하는 정도의 순도를 가진 선택된 조성물을 선택적 제제 조제(Remington's Pharmaceutical Sciences, 상동)와 동결건조 케이크 또는 수성 용액의 형태로 혼합함으로써 보관용으로 제조될 수 있다. 또한, 특정 구체예에서, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 조성물은 수크로오스와 같은 적절한 부형제를 사용하여 동결건조물로서 조제될 수 있다.

[0186] 특정 구체예에서, 제약 조성물은 비경구 송달을 위해 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 조성물은 흡입 또는

경구 투여와 같은 소화관을 통한 송달을 위해 선택될 수 있다. 이러한 제약학적으로 허용되는 조성물의 제조는 당업자의 능력 범위 내이다.

[0187] 특정 구체예에서, 제제 성분들은 투여 부위에 대해 허용되는 농도로 존재한다. 특정 구체예에서, 버퍼는 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 생리학적 pH나 약간 낮은 pH로 조성물을 유지하도록 사용된다.

[0188] 특정 구체예에서, 비경구 투여가 고려될 때, 치료 조성물은 제약학적으로 허용되는 비히클 중에 추가 치료제를 가지거나 갖지 않고 원하는 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 발열원이 없는 비경구 허용되는 수성 용액의 형태일 수 있다. 특정 구체예에서, 비경구 주사를 위한 비히클은 멸균된 증류수이며, 여기에 혼성체 뉴클레아제 분자가 적어도 하나의 추가 치료제와 함께 또는 없이 적절이 보존되는 멸균 등장 용액으로 조제된다. 특정 구체예에서, 조제물은 주사가능한 마이크로스피어, 생분해성 입자, 중합체 화합물(예를 들어, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜과 같은 조제와 함께 원하는 분자의 제제를 포함할 수 있으며, 이들은 해당 산물의 제어 방출 또는 지속 방출을 위해 제공될 수 있고, 이후 데포(depot) 주사를 통해서 송달될 수 있다. 특정 구체예에서, 히알루론산이 또한 사용될 수 있으며, 순환계에서 지속적인 지속기간을 촉진하는 효과를 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 원하는 분자를 도입하기 위하여 이식가능한 약물 송달 장치가 사용될 수 있다.

[0189] 특정 구체예에서, 제약 조성물은 흡입용으로 조제될 수 있다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자는 흡입을 위한 건조 분말로 조제될 수 있다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 흡입 용액은 에어로졸 송달을 위한 추진제와 함께 조제될 수 있다. 특정 구체예에서, 용액이 분무될 수 있다. 폐 투여가 PCT 출원 No. PCT/US94/001875에 더 설명되며, 이것은 화학적으로 변형된 단백질의 폐 송달을 설명한다.

[0190] 특정 구체예에서, 제제는 경구 투여될 수 있다는 것이 고려된다. 특정 구체예에서, 이 방식으로 투여되는 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레오티드 분자는 정제 및 캡슐과 같은 고체 제형의 화합에 관례적으로 사용되는 담체들과 함께 또는 없이 조제될 수 있다. 특정 구체예에서, 캡슐은 생체이용률이 최대화되고, 예비-전신 분해가 최소화되었을 때 위장관의 그 지점에서 제제의 활성 부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 추가 조제가 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 어떤 추가의 치료제의 흡수를 촉진하기 위하여 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 희석제, 향미제, 저융점 왁스, 식물성 오일, 윤활제, 현탁제, 정제붕해제 및 결합제가 또한 사용될 수 있다.

[0191] 특정 구체예에서, 제약 조성물은 정제의 제조에 적합한 비독성 부형제와의 혼합물로서, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않고, 혼성체 뉴클레아제 분자의 유효량을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 멸균수에, 또는 다른 적절한 비히클에 정제를 용해함으로써 용액이 단위 용량 형태로 제조될 수 있다. 특정 구체예에서, 적합한 부형제는, 제한은 아니지만 불활성 희석제, 예를 들어 탄산칼슘, 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨, 락토오스, 또는 인산칼슘; 또는 결합제, 예를 들어 녹말, 젤라틴, 또는 아카시아; 또는 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 또는 탈크를 포함한다.

[0192] 지속 또는 제어 송달 제제로서, 적어도 하나의 추가 치료제(들)를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 제제를 포함하는 추가의 제약 조성물들이 당업자에게 자명할 것이다. 특정 구체예에서, 리포솜 캐리어, 생분해성 미세입자 또는 다공성 비드 및 데포 주사와 같은 다양한 다른 지속 송달 또는 제어 송달 수단을 조제하기 위한 기술도 당업자에게 주지되어 있다. 예를 들어, 제약 조성물의 송달을 위한 다공성 중합체 미세입자의 제어 방출을 설명하는 PCT 출원 No. PCT/US93/00829를 참조한다. 특정 구체예에서, 지속 방출 제조물은 형상화된 물품 형태의, 예를 들어 필름이나 마이크로캡슐 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리락티드(미국특허 No. 3,773,919 및 EP 058,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) 및 Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), 에틸렌비닐아세테이트(Langer et al., 상동) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산(EP 133,988)을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 지속 방출 조성물은 또한 리포솜을 포함할 수 있으며, 이것은 본 분야에 주지된 몇 가지 방법 중 어느 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 및 EP 143,949를 참조한다.

[0193] 생체내 투여를 위해 사용될 수 있는 제약 조성물은 전형적으로 멸균된다. 특정 구체예에서, 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해서 달성될 수 있다. 특정 구체예에서, 조성물이 동결건조되는 경우, 이 방법을 사용한 멸균은 동결건조 및 복원 이전에 또는 이후에 수행될 수 있다. 특정 구체예에서, 비경구 투여를 위한 조성물은 동결건조된 형태나, 또는 용액으로 보관될 수 있다. 특정 구체예에서, 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 접근

입구를 가진 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥 용액 백 또는 바이알에 넣어진다.

[0194] 특정 구체예에서, 제약 조성물이 조제되었으면, 그것은 용액, 현탁액, 젤, 에멀젼, 고체, 또는 탈수 또는 동결건조 분말로서 멸균 바이알에 보관될 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 제제는 바로 사용가능한 형태 또는 투여 전에 복원되는 형태(예를 들어, 동결건조)로 보관될 수 있다.

[0195] 특정 구체예에서, 단일 용량 투여 유닛을 생성하기 위하여 키트가 제공된다. 특정 구체예에서, 키트는 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제제를 갖는 제2 용기를 함유할 수 있다. 특정 구체예에서, 단일 및 다수 챔버 사전-충전 주사기(예를 들어, 액체 주사기 및 리오시린지(lyosyringe)를 함유하는 키트가 포함된다.

[0196] 특정 구체예에서, 치료적으로 이용되는, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 제약 조성물의 유효량은, 예를 들어 치료 맥락 및 목적에 의존할 것이다. 따라서, 당업자는 치료를 위한 적절한 투약량 수준이, 특정 구체예에 따르면, 송달되는 분자, 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자가 사용되는 처방, 투여 경로 및 규모(체중, 체표면 또는 장기 크기) 및/또는 환자의 상태(연령 및 일반적 건강상태)에 일부 의존하여 변한다는 것을 인정할 것이다. 특정 구체예에서, 임상의사는 최적의 치료 효과를 얻기 위하여 투약량을 적정하고 투여 경로를 변형할 수 있다. 특정 구체예에서, 전형적인 투약량은 상기 언급된 요인에 따라서 약 0.1 μg/kg 내지 최대 약 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 투약량은 0.1 μg/kg에서 최대 약 100 mg/kg; 또는 1 μg/kg에서 최대 약 100 mg/kg; 또는 5 μg/kg에서 최대 약 100 mg/kg의 범위일 수 있다.

[0197] 특정 구체예에서, 투약 빈도는 사용된 제제에서 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 어떤 추가 치료제의 약동학 변수를 고려하여 결정된다. 특정 구체예에서, 임상의사는 원하는 효과를 달성하는 투약량에 도달될 때까지 조성물을 투여할 것이다. 특정 구체예에서, 조성물은 따라서 단일 용량, 또는 시간에 따라 둘 이상의 용량(이것은 원하는 분자를 동일한 양으로 함유할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다), 또는 이식 장치나 카테테르를 통한 연속 주입으로 투여될 수 있다. 또한, 적절한 투약량의 개정이 당업자에 의해서 상례적으로 이루어지며, 당업자에 의해서 상례적으로 수행되는 일들의 영역이다. 특정 구체예에서, 적절한 투약량은 적절한 용량 반응 데이터의 사용을 통해서 확인될 수 있다.

[0198] 특정 구체예에서, 제약 조성물의 투여 경로는 주지된 방법을 따르며, 예를 들어 경구; 정맥내, 복강내, 뇌내(실질내), 뇌실내, 근육내, 피하, 안내, 동맥내, 문맥내, 또는 병소내 경로에 의한 주사; 지속 방출 시스템; 또는 이식 장치에 의해서 투여된다. 특정 구체예에서, 조성물은 볼루스 주사에 의해서, 또는 주입에 의해 연속적으로, 또는 이식 장치에 의해서 투여될 수 있다.

[0199] 특정 구체예에서, 조성물은 원하는 분자가 흡수되거나 캡슐화된 막, 스펀지 또는 다른 적절한 재료의 이식을 통해서 국소 투여될 수 있다. 특정 구체예에서,이식 장치가 사용되는 경우, 상기 장치가 어떤 적합한 조직이나 장기에 이식될 수 있으며, 원하는 분자의 송달은 확산, 시간 지정 방출 볼루스, 또는 연속 투여를 통해서 이루어질 수 있다.

[0200] 특정 구체예에서, 생체외 방식으로 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 제약 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 예에서, 환자로부터 제거된 세포, 조직 및/또는 장기는 적어도 하나의 추가 치료제를 가지거나 갖지 않은 혼성체 뉴클레아제 분자를 포함하는 제약 조성물에 노출되고, 이후 해당 세포, 조직 및/또는 장기가 환자에게 다시 이식된다.

[0201] 특정 구체예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자 및/또는 어떤 추가 치료제는 본원에 설명된 것들과 같은 방법을 사용하여 폴리펩티드를 발현하고 분비하도록 유전자 조작된 특정 세포를 이식함으로써 송달될 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 세포는 동물 또는 사람 세포일 수 있으며, 자가 조직, 이종 기원 또는 이종 조직일 수 있다. 특정 구체예에서, 세포는 불멸화될 수 있다. 특정 구체예에서, 면역학적 반응의 변화를 감소시키기 위하여 세포는 주변 조직의 침윤을 피하기 위해서 캡슐화될 수 있다. 특정 구체예에서, 캡슐화 재료는 전형적으로 단백질 산물(들)의 방출은 허용하지만 환자의 면역계나 주변 조직으로부터의 다른 해로운 인자에 의한 세포의 파괴는 방지하는 생체적합성, 반투과성 중합체 엔클로저 또는 막이다.

[0202] 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 자가면역 장애 또는 비정상 면역반응의 치료에 특히 효과적이다. 이와 관련하여, 본 발명의 혼성체 뉴클레아제 분자는 외부 및 자기 항원에 대한 원치않는 면역반응을 제어, 억제, 조정, 치료 또는 제거하기 위해서 사용될 수 있다는 것이 인정될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는, 제한은 아니지만 인슐린-의존성 당뇨병, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌척수염, 류마티스 관절

염, 실험적 자가면역 관절염, 중증 근무력증, 갑상선염, 실험적 형태의 포도막망막염, 하시모토 갑상선염, 원발성 점액수종, 갑상선중독증, 치명적 빈혈, 자가면역 위축성 위염, 애디슨병, 조기폐경, 남성불임, 소아 당뇨병, 굿패스쳐 증후군, 심상성 천포창, 유천포창, 교감성 안염, 수정체성 포도막염, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 백혈구감소증, 원발성 담즙성 간경변, 활성 만성 간염 Hbs-ve, 원인불명의 간경변, 궤양성 대장염, 쇼그렌 증후군, 경피증, 베게너 육아종증, 다발성 근염, 피부근염, 원반형 LE, 전신성 홍반성 루푸스 또는 결합 조직 질환을 포함하는 면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0204] 키트

[0205] 키트는 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제 분자 및 사용 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제 분자, 하나 이상의 대조군 및 다양한 버퍼, 시약, 효소 및 본 분야에 잘 주지된 다른 표준 성분들을 적합한 용기에 포함할 수 있다.

[0206] 용기는 적어도 하나의 바이알, 웰, 시험관, 플라스크, 작은 병, 시린지 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있으며, 그 안에 혼성체 뉴클레아제 분자가 넣어질 수 있고, 일부 예에서는 알리쿼트가 적합하다. 추가 성분이 제공되는 경우, 키트는 추가 용기를 함유할 수 있고, 그 안에 추가 성분이 넣어질 수 있다. 또한, 키트는 상업적 판매를 위해 단단히 밀봉한 상태로 혼성체 뉴클레아제 분자를 담기 위한 수단 및 어떤 다른 시약 용기를 포함할 수 있다. 이러한 용기는 사출 성형 또는 블로 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있으며, 그 안에 원하는 바이알들이 보유된다. 용기 및/또는 키트는 사용 설명서 및/또는 경고와 함께 라벨을 포함할 수 있다.

[0208] 실시예

[0209] 본 발명을 수행하기 위한 구체적인 구체예들의 예들이 하기 제시된다. 이 실시예들은 예시를 위한 목적으로만 제공되며, 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하지 않는다. 사용된 숫자들(예를 들어, 양, 온도 등)과 관련하여 정확성을 확보하기 위해 노력했지만, 물론 일부 실험 오차 및 편차는 허용되어야 할 것이다.

[0210] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는다면 본 분야의 기술 범위 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약학의 종래의 방법을 이용한다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명된다. 예를 들어, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry*(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd Ed., 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Phar. Sciences*, 18th Edition(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.*(Plenum Press) Vols A and B(1992)를 참조한다.

[0212] 실시예 1: 혼성체 뉴클레아제 분자를 생성하기 위한 일반적 접근법

[0213] 셔틀링 및 도메인 교환을 위한 양립성 제한 효소 부위를 지닌 모듈형 카세트로서 원하는 구조와 단일 효소 또는 다중-효소 구조의 기능적 활성을 통합한 혼성체 뉴클레아제 분자를 설계했다. 혼성체 뉴클레아제 분자의 상이한 구체예들의 도식적 구조가 도 1에 예시된다. 대표적인 혼성체 뉴클레아제 분자의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 표 1에 도시된다.

[0214] QIAgen RNAeasy 키트(캘리포니아 발렌시아) 및 QIAshredder 키트를 사용하여 사람 췌장 RNA(Ambion) 또는 정상 사람 말초혈 림프구(대략 5x10e6)의 사람 PBMC RNA로부터 사람 cDNA를 분리하여 세포 용해액을 균질화했다(Qiagen, 캘리포니아 발렌시아). 사람 PBMC를 D-PBS 중에 1:1로 희석된 헤파린화된 사람 혈액으로부터 분리하고, LSM 림프구 분리 배지(MP Biomedicals, 캘리포니아 어빈) 위에 Ficoll 구배 층을 형성했다.

[0215] 마우스 비장 RNA를 대략 5x10e6 비장세포로부터 QIAgen RNAeasy 키트(캘리포니아 발렌시아)를 사용하여 분리했다. 배양 배지로부터 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, 5x10e6 세포를 사용하여 RNA를 제조했다. 키트에 수반된 제조자의 설명서를 따라서 QIAGEN RNAeasy 키트(캘리포니아 발렌시아), 총 RNA 분리 키트 및 QIAGEN QIAshredder을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리했다. 총 RNA의 1 내지 2 마이크로그램(1-2㎍)을 주형으로 사용하여 역 전사에 의해 cDNA를 제조했다. RNA, 300ng 랜덤 프라이머 및 500ng Oligo dT(12-18), 1㎕ 25mM dNTP를 조합하고, 효소 첨가 전 5분간 80℃에서 변성시켰다. 5배의 제2 가닥 버퍼 및 효소와 함께 제공된 0.1M DTT의 존재하에 RNA와 프라이머 혼합물에 Superscript III 역 전사효소(Invitrogen, Life Technologies)를 25㎕의 총 부피로 첨가했다. 역 전사 반응을 1시간 동안 50℃에서 진행시켰다.

[0216] 10-100ng의 cDNA를 관심의 대상인 뉴클레아제 유전자에 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 증폭 반응에 사용했다

(RNaseA, RNase1, DNase1, Trex1, DNase1L3 등). 초기 클로닝 반응을 위해, 관심의 유전자를 암호화하는 전장 cDNA 또는 트렁케이션 산물을 분리하도록 프라이머를 설계했다. 전장 또는 단축된 PCR 단편을 아가로오스 겔 전기영동에 의해서 분리하고, Qiagen QIAquick 칼럼을 사용하여 정제하여 뉴클레오티드, 프라이머 및 원치않는 증폭 산물을 제거했다. 정제된 단편을 pCR2.1 TOPO 클로닝 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 클로닝하고, TOP10 컴페턴트 박테리아에 형질변형했다. 분리된 콜로니들을 50ug/mL 카베니실린을 함유하는 루리아 브로스 배지에 선별해 넣고, 하룻밤 성장시켜 플라스미드를 분리했다. EcoRI(NEB, 메사츄세츠 입스위치) 제한 효소 절단 및 절단된 단편의 아가로오스 겔 전기영동에 의해서 정확한 크기의 삽입물에 대해 TOPO 클론을 스크리닝했다. 양성 클론의 DNA 서열 분석을 ABI Ready Reaction Mix v 3.1을 가지고 수행하고, ABI 3730 XL DNA 시퀀서를 사용하여 분석했다. 정확한 클론이 얻어졌으면, 추가의 서열 변형을 설계하고, PCR 반응을 수행하여 원하는 대립형질이나 발현 카세트를 생성했다. 유전자의 특정 위치에 돌연변이의 도입을 위한 중복 프라이머를 사용한 PCR 돌연변이유발에 의해서 트렁케이션 산물 및 대립형질을 생성했다. 내부 중복 프라이머를 사용한 중복 PCR에 의해서 링커를 합성하고, PCR 라운드를 계속하여 각 말단에 추가 서열을 부착했다. 몇 개의 상호교환 카세트의 스트링으로서 혼성체 뉴클레아제 분자를 조립했다. 바람직한 구체예의 분자는 고정된 리더 펩티드, 뉴클레아제 카세트, 선택된 몇 개의 상이한 폴리펩티드 링커를 암호화하는 선택적 카세트, CH3 도메인의 카르복실 단부에 중단 코돈이나 링커를 지닌 -Ig Fc 도메인 카세트, 및 resolvICase 타입 분자를 위한 제2 링커 카세트와 그에 따른 제2 뉴클레아제 카세트를 함유한다. 도 1은 이들 혼성체 뉴클레아제 분자의 카세트 타입 구조 및 각 위치에 삽입되는 가능한 서열의 예들을 예시한다. 혼성체 뉴클레아제 분자가 조립되었으면, 이들을 메토트렉세이트를 지닌 DHFR에 대한 선택을 사용하여 이들을 COS7 또는 다른 세포에서의 일시적 발현 및 CHO DG44 세포에서의 안정한 발현에 적합한 포유류 발현 플라스미드 pDG로 전달했다.

[0217] 혼성체 뉴클레아제 분자의 일시적 발현

[0218] COS-7 세포를 혼성체 뉴클레아제 분자 유전자 삽입물을 함유하는 발현 벡터 pDG로 일시적 형질감염시켰다. 형질감염 하루 전에 세포를 4mL DMEM(ThermoFisher/ Mediatech cell gro) + 10% FBS 조직 배양 배지 중에서 60mm 접시 당 4x10e5 세포로 파종했다. DMEM 기본 배지에 4.5g/L 글루코오스, 나트륨 피루베이트, L-글루타민 4mM, 및 비-필수 아미노산을 보충했다. 태아 소 혈청(Hyclone, ThermoFisher Scientific, 유타 로간)를 10% 최종 부피로 배지에 첨가했다. 세포를 37℃ 5% CO2에서 하룻밤 인큐베이션했고, 형질감염 당일에는 약 40-80% 합류되었다. 제조자의 설명서에 따라서 Qiagen(캘리포니아 발렌시아)의 QIAprep 미니프렙 키트를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조하고, 50uL EB 버퍼로 용출시켰다. Nanodrop 1000(Thermo Fisher Scientific, 델라웨어 윌밍턴) 분광광도계를 사용하여 DNA 농도를 측정했다. 플라스미드 DNA를 제조자의 설명서에 따라서 Polyfect(Qiagen, 캘리포니아 발렌시아) 형질감염 시약을 사용하여 형질감염시켰는데, 60mm 접시 당 2.5ug 플라스미드 DNA와 150uL 혈청 무함유 DMEM 형질감염 칵테일 중의 15uL Polyfect 시약을 사용했다. 복합체 형성 후, 반응물을 혈청 및 모든 보충물을 함유하는 1mL 세포 성장 배지로 희석하고, 3mL 신선한 DMEM 완전 배양 배지를 함유하는 플레이트에 적가했다. 일시적 형질감염물을 48-72시간 동안 인큐베이션한 후, 더 분석하기 위해 배양 상청액을 수거했다.

[0219] 관심의 대상인 혼성체 뉴클레아제 분자를 발현하는 안정한 CHO DG44 형질감염체의 생성

[0220] CMV 프로모터의 제어하에 뉴클레아제-Ig cDNA를 함유하는 선택가능한, 증폭가능한 플라스미드인 pDG를 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에 전기천공함으로써 혼성체 뉴클레아제 분자의 안정한 생성을 달성했다. pDG 벡터는 약화된 프로모터를 가진 DHFR 선택가능한 마커를 암호화하는 pcDNA3의 변형된 버전으로서 플라스미드에 대해 선택 압력을 증가시킬 수 있다. Qiagen 맥시프렙 키트를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조하고, 정제된 플라스미드를 페놀 추출 및 에탄올 침전 전에 유일한 AscI 부위에서 선형화했다. 연어 정자 DNA(Sigma-Aldrich, 미주리 세인트루이스)를 캐리어 DNA로서 첨가하고, 플라스미드와 캐리어 DNA를 각각 100㎍씩 사용하여 전기천공에 의해서 10^7 CHO DG44 세포를 형질감염시켰다. 이후 "Excell 302 완전" 배지라고 하는 글루타민(4mM), 피루베이트, 재조합 인슐린, 페니실린-스트렙토마이신 및 2x DMEM 비필수 아미노산(모두 Life Technologies로부터 구입, 메릴랜드 게티즈버그)을 함유하는 Excell 302 배지(JRH Biosciences) 중에서 세포들을 로그 상까지 성장시켰다. 형질감염되지 않은 세포를 위한 배지는 또한 HT(하이포크산틴과 티미딘의 100x 용액으로부터 희석)(Invitrogen/Life Technologies)를 함유했다. 선택하의 형질감염을 위한 배지는 선택제로서 메토트렉세이트(Sigma-Aldrich)를 50nM에서 1㎛M까지의 범위에서 다양한 수준으로 함유했다. 전기천공은 280 볼트, 950 마이크로패럿에서 수행했다. 형질감염된 세포를 비-선택성 배지에서 하룻밤 방치하여 회복시킨 후, 125 세포/웰에서 2000 세포/웰까지 범위의 다양한 연속 희석물을 바닥이 평평한 96 웰 플레이트(Costar)에 선택적 평판했다. 세포 클로닝을 위한 배양 배지는 50nM 메토트렉세이트를 함유하는 Excell 302 완전 배지였다. 클론성 결과가

충분했다면, 마스터 웰로부터 배양 상청액의 연속 희석물을 -IgG 샌드위치 ELISA를 사용하여 혼성체 뉴클레아제 분자의 발현에 대해 스크리닝했다. 간단히 말해서, NUNC 이뮬론 II 플레이트를 PBS 중에서 7.5㎍/mL F(ab'2) 염소 항-마우스 IgG(KPL Labs, 메릴랜드 게티즈버그) 또는 2ug/mL 염소 항-사람이나 항-마우스 IgG(Jackson Immunoresearch, 펜실베니아 웨스트 그로브)로 4℃에서 하룻밤 코팅했다. 플레이트를 PBS/2-3% BSA에서 차단하고, 배양 상청액의 연속 희석물을 실온에서 2-3시간 동안 인큐베이션했다. 플레이트를 PBS/0.05% Tween 20으로 3번 세척하고, 함께 혼합된 호스래디쉬 퍼옥시다제 콘쥬게이트된 F(ab'2) 염소 항-마우스 IgG2a(Southern Biotechnologies)와 염소 항-마우스 IgG(KPL)와 함께, PBS/1.0% BSA 중에서 각각 1:3500로, 또는 1:2500으로 호스래디쉬 퍼옥시다제 콘쥬게이트된 F(ab'2) 염소 항-사람 IgG1(Jackson Immunoresearch, 펜실베니아 웨스트 그로브) 중에서 1-2시간 동안 실온에서 인큐베이션했다. 플레이트를 PBS/0.05% Tween 20으로 4번 세척하고, SureBlue Reserve TMB 기판(KPL Labs, 메릴랜드 게티즈버그)으로 결합을 검출했다. 동등 부피의 1N HCl을 가해서 반응을 중단시키고, 플레이트를 Spectramax Pro 플레이트 리더(Microdevices, 캘리포니아 서니베일)에서 450nM에서 판독했다. 혼성체 뉴클레아제 분자의 최대 생성을 나타낸 클론들을 T25와 T75 플라스크에서 차례로 확장시켜서 융합 단백질의 냉동 및 규모 있는 생산을 위한 충분한 수의 세포를 제공했다. 생성 수준은 메토트렉세이트를 함유하는 배양 배지에서 점진적 증폭에 의해서 4개의 최상 클론의 배양물에서 더 증가되었다. 세포의 각 연속 계대에서 Excell 302 완전 배지는 메토트렉세이트의 증가된 농도를 함유했으며, 이로써 DHFR 플라스미드를 증폭한 세포만이 생존할 수 있었다.

[0221] 혼성체 뉴클레아제 분자를 발현하는 CHO 세포로부터 상청액을 수집하고, 0.2㎛ PES 고속 필터(Nalgene, 뉴욕 로체스터)를 통해 여과하고, 단백질 A-아가로오스(IPA 300 가교된 아가로오스) 칼럼(Repligen, 매사추세츠 니드햄)을 통과시켰다. 칼럼을 칼럼 세척 버퍼(90mM 트리스-베이스, 150mM NaCl, 0.05% 나트륨 아지드, pH 8.7)로 세척하고, 결합된 단백질을 0.1M 시트레이트 버퍼, pH 3.0을 사용하여 용출시켰다. 분획들을 수집하고, 단백질 농도를 Nanodrop(델라웨어 윌밍턴) 마이크로샘플 분광광도계를 사용하여 280nM에서 결정하고, 블랭크는 0.1M 시트레이트 버퍼, pH 3.0을 사용하여 결정했다. 혼성체 뉴클레아제 분자를 함유하는 분획들을 모으고, 센트리콘 농축장치를 사용하여 PBS 중에서 연속 회전시켜 버퍼 교환을 수행한 후, 0.2㎛ 필터 장치를 통해 여과하여 내독소 오염의 가능성을 감소시켰다.

[0223] 실시예 2: RNase-Ig 융합 유전자의 구성

[0224] MTA 없이 우리 실험실로 클론을 보내준 EST 라이브러리(Dr. C.Raine, Albert Einstein School of Medicine, 뉴욕 브론스)로부터 뮤린 RNase 1을 전장 cDNA로서 증폭시켰다. 사용된 서열 특이적 5' 및 3' 프라이머는 공개된 서열로부터 얻었다. 클론의 서열은 서열 분석에 의해서 검증되었다. Genebank 기탁 번호는 NCBI geneID 19752이다. 사람 췌장 총 RNA(Ambion/Applied Biosystems, 텍사스 오스틴)으로부터 유래된 랜덤 프라임 및 올리고 dT 프라임 cDNA로부터 전장 사람 RNase 1을 분리했다.

[0225] 전장 클론이 분리되었으면, 마우스 IgG2a 또는 사람 IgG1(서열번호 40) Fc 도메인을 가지고 융합 유전자를 생성하기 위하여 프라이머를 설계했다. Fc 테일의 아미노 말단에서 융합되는 5' 서열을 위해 두 상이한 프라이머를 설계했는데, 첫 번째는 마우스(또는 사람) RNase로부터의 자생 리더 펩티드를 통합하고, 두 번째는 예상된 신호 펩티드 절단 부위에서 RNase의 아미노 말단에 AgeI 부위를 부착시키며, 이로써 RNase와 사람 VKIII 리더 펩티드가 융합된다. 우리는 다른 발현 연구를 위해서 이것을 이미 클로닝하여 사용했었다. 뮤린 RNase에 대해 제1 프라이머의 서열은 다음과 같다:

[0226] mribNL5'

[0227] 30mer(RNase 5', 자생(native) 리더 및 HindIII+Kozak 함유)

[0228] gTT AAg CTT gCC ACC ATg ggT CTg gAg AAg TCC CTC ATT CTg-3'(서열번호 1)

[0229] 제2 프라이머는 예상된 리더 펩티드 절단 부위에서 또는 근처에서, RNase의 5' 단부에서 기존 리더 서열과 성숙 서열 사이에 유전자 융합 접합부를 생성한다.

[0230] 27mer(RNase 5' 성숙 서열(리더 없음, AgeI 부위 함유)

[0231] 5'-gAT ACC ACC ggT Agg gAA TCT gCA gCA CAg AAg TTT CAg-3'(서열번호 2)

[0232] RNase의 카르복시 단부 및 Fc 테일의 아미노 말단에서 뮤린 IgG2a와의 융합을 위한 3' 프라이머의 서열은 다음과 같다:

[0233] mrib3NH2

[0234] 28mer(mIgG2a와의 융합을 위한 XhoI 부위를 가진 RNase 3' 단부).

[0235] 5'-ggC TCg AgC ACA gTA gCA TCA AAg tGG ACT ggT ACg TAg g-3'(서열번호 3)

[0236] -Ig-RNase 융합 유전자를 생성하기 위하여 둘 이상의 올리고를 설계했으며, 여기서 -Ig 테일은 RNase 효소 도메인에 대한 아미노 말단이다.

[0237] mrib5X

[0238] 36mer RNase 5' 단부, Fc 도메인의 카르복시 단부와의 융합을 위한 링커 aa 및 XbaI 함유.

[0239] 5'-AAA TCT AgA CCT CAA CCA ggT Agg gAA TCT gCA gCA CAg AAg TTT CAg-3'(서열번호 4)

[0240] mrib3X

[0241] 31mer RNase 3' 단부, Fc 도메인의 카르복시 단부와의 융합을 위한 두 중단 코돈 및 XbaI 부위 함유.

[0242] 5'-TCT AgA CTA TCA CAC AgT AgC ATC AAA gTg gAC Tgg TAC gTA g-3'(서열번호 5)

[0244] 실시예 3: 사람 및 마우스 -Fc 도메인의 분리 및 코딩 서열에 돌연변이의 도입

[0245] 마우스 및 사람 -Fc 도메인(서열번호40)의 분리를 위해서 마우스 또는 사람 조직으로부터 다음과 같이 RNA를 유도했다. RPMI 배양 배지에서 마우스 비장으로부터 단일 세포 현탁액을 생성했다. 또는 달리, 림프구 분리 배지(LSM) Organon Teknika(노스캐롤라이나 더럼)를 사용하여 신선한 전혈로부터 사람 PBMC를 분리하고, 제조자의 지시에 따라서 버피코트를 수거하고, 세포를 PBS에서 3번 세척한 다음 사용했다. 배양 배지를 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, $2x10^7$ 세포를 사용하여 RNA를 제조했다. 키트에 수반된 제조자의 설명서에 따라서 QIAGEN RNAeasy 키트(캘리포니아 발렌시아) 총 RNA 분리 키트 및 QIAGEN QIAshredder 칼럼을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리했다. 총 RNA 1μg(4μg)을 주형으로 사용하여 역 전사에 의해서 cDNA를 제조했다. RNA, 300ng 랜덤 프라이머, 500ng Oligo dT(12-18), 및 1μL 25mM dNTP를 조합하고, 5분간 80℃에서 변성시킨 다음 효소를 첨가했다. 제2 가닥 버퍼 및 효소와 함께 제공된 0.1M DTT의 존재하에 총 부피 25μL로 Superscript III 역 전사효소(Invitrogen, Life Technologies)를 RNA와 프라이머 혼합물에 첨가했다. 역 전사 반응을 50℃에서 1시간 동안 진행시켰다. 제조자의 지시에 따라서 cDNA를 QIAquick(QIAGEN) PCR 정제 칼럼을 사용하여 정제하고, 40μL EB 버퍼로 용출시킨 다음 PCR 반응에 사용했다.

[0246] 주형으로서 상기 설명된 cDNA를 사용하여 PCR 증폭에 의해서 야생형 마우스 및 사람 -Fc 도메인을 분리했다. 야생형 서열의 초기 증폭에는 다음의 프라이머가 사용되었고, 힌지 도메인에 원하는 돌연변이 변화가 통합되었다:

[0247] mahIgG1CH2M: 47 mer

[0248] 5'-tgtccaccgtgtccagcacctgaactcctgggtggatcgtcagtcttcc-3'(서열번호 6)

[0249] hIgG1-5scc: 49 mer

[0250] 5'-agatctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgt-3'(서열번호 7)

[0251] mahIgG1S: 51 mer

[0252] 5'-tctagattatcatttacccggagacagagagaggctcttctgcgtgtagtg-3'(서열번호 8)

[0253] muIgG2aCH2: 58mer

[0254] 5'-cctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggatcatccgtcttcatcttcc-3'(서열번호 9)

[0255] mIgG2a-5scc: 47mer

[0256] 5'-gaagatctcgagcccagaggtcccacaatcaagccctctcctcca-3'(서열번호 10)

[0257] mIgG2a3S: 48mer

[0258] 5'-gtttctagattatcatttacccggagtccgagagaagctcttagtcgt-3'(서열번호 11)

[0259] C1000 열 사이클러(BioRad, 캘리포니아 허큘레스)나 에펜드로프 열 사이클러(ThermoFisher Scientific, 텍사스

휴스턴)를 사용하여 PCR 반응을 수행했다. 반응은 95℃ 2분 초기 변성 단계, 이후 94℃ 30초 변성, 50℃ 30초 아닐링 및 72℃ 1분 연장 단계 34 사이클, 이후 최종 72℃에서 마지막 4분 연장을 포함했다. 야생형 테일이 분리되었으면, 단편을 pCR2.1 벡터에 TOPO 클로닝하고, 제조자의 설명서에 따라서 QIAGEN 스핀 플라스미드 미니프렙 키트를 사용하여 DNA를 제조하고, 제조자의 설명서에 따라서 ABI Dye Terminator v3.1 서열화 반응을 사용하여 클론들을 서열화했다.

[0260] 정확한 클론으로부터의 DNA를 중복 연장 PCR에서 주형으로 사용하여 마우스 IgG2a 또는 사람 -IgG1의 코딩 서열에 원하는 위치에 돌연변이를 도입했다. 50μL 반응 부피에 주형(1μL)으로서 전장 야생형 클론, 최대 -Fc 도메인의 PCR 각 부분까지 각 방향으로부터 원하는 돌연변이 부위를 포함하는 50pmol 5' 및 3' 프라이머 및 PCR 고 충실성 Supermix(Invitrogen, 캘리포니아 칼스배드)를 사용하고 짧은 증폭 사이클을 사용하여 PCR 반응을 설정했다. 중복 PCR 돌연변이유발의 예로서, 사람 -IgG1에 P331S 돌연변이를 도입하기 위해서 사용된 프라이머 조합은 다음과 같았다.

[0261] 주형으로서 전장 야생형 클론을 사용하여 5' 하위단편을 증폭하며, 5' 프라이머는 hIgG1-5scc: 5'-agatctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgt-3'(서열번호 12), 3' 프라이머는 P331AS: 5'-gttttctcgatggaggctgggagggctttgttggagacc-3'(서열번호 13)였다. 주형으로서 전장 야생형 클론을 사용하여 3' 하위단편을 증폭하며, 5' 프라이머는 P331S: 5'-aaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaacaatctcc-3'(서열번호14), 3' 프라이머는 mahIgG1S: 5'-tctagattatcatttacccggagacagagagaggctcttctgcgtgtagtg-3'(서열번호15)였다.

[0262] 하위단편이 증폭되고 아가로오스 겔 전기영동에 의해서 분리되었으면, 이들을 QIAquick 겔 정제 칼럼에 의해서 정제하고, 제조자의 설명서에 따라서 30μL EB 버퍼로 용출시켰다. 다음에, 새 반응들에서 중복 주형으로서 이 2개 하위단편을 사용하여 2회의 PCR을 수행했다. 사이클러를 일시 정지시키고, 5'(hIgG1-5scc, 상기 참조) 및 3'(mahIgG1S, 상기 참조) 외측 프라이머를 반응물에 가했다(각 50pmol). 다음에, 상기 야생형 분자에 대해 설명된 조건에서 34 사이클 동안 PCR 증폭을 수행했다. 겔 전기영동에 의해서 전장 단편을 분리하고, 서열 분석을 위해서 pCR2.1 벡터에 TOPO 클로닝했다. 다음에, 본원에 설명된 상이한 혼성체 뉴클레아제 분자의 생성을 위해서 정확한 서열을 지닌 클론으로부터의 단편을 발현 벡터에 하위 클로닝했다.

[0264] 실시예 4: 마우스 혈청에서 RSLV-124 단백질 및 RNase 효소 활성의 정량

[0265] RSLV-124 구성물(서열번호106)의 생체내 마우스 안정성 분석

[0266] 시간 0(zero)에서 RSLV-124를 4마리 마우스(C220, C221, C222, C223)에 1회 주사로 정맥내 주사했다. 주사 후 다양한 시간에 혈액 샘플을 수집해서 RSLV-124 단백질(야생형 사람 IgG1 Fc 도메인에 연결된 사람 야생형 RNase(서열번호 106)) 및 RNase 효소 활성의 존재에 대해 분석했다. 마우스 혈청에서 RSLV-124 화합물을 검출하기 위하여 ELISA를 전개시켜 마우스 혈청으로부터 사람 Fc를 포착하고, 이어서 RNase를 검출했다. 4마리 마우스의 혈액 샘플에 대해 ELISA를 수행했을 때, RSLV-124 단백질의 존재가 38μg/ml 내지 55μg/ml 사이에서 150ug의 단일 정맥내 주사 5분 후에 검출되었다(도 2). 주사 후 제1일에 RSLV-124의 농도는 8μg/ml 내지 12μg/ml 사이로 급격히 저하되었다. 약물의 혈액 농도는 7일을 지나서는 분석 지속기간 동안 비교적 안정하게 유지되었고, 약물 혈중 수준은 약 5μg/ml였다. ELISA에 의해서 RSLV-124 단백질을 측정하는데 사용된 동일한 혈액 샘플을 사용하여 약물의 RNase 효소 활성을 정량했다. Ambion의 RNaseAlert QC 시스템(Cat # AM1966)을 사용하여 어떤 변형을 가진 마우스 혈액 샘플에서 RSLV-124 단백질의 효소 동력학을 측정했다. 사람 항-Fc 단클론 항체를 사용하여 마우스 혈청으로부터 약물 화합물을 RNaseAlert 분석 플레이트 위에 포착하고, Ambion 키트 설명서에 따라서 형광을 측정하여 정량했다. RSLV-124 분자의 상대적 형광 단위(RFU)의 분석은 주사 5분 후에 80,000-140,000RFU를 나타냈다(도 3). RFU는 단백질 농도와 평행하게 급격히 감소했으며, 7일을 지나서는 18,000-40,000RFU에서 비교적 안정하게 유지되었다. RNaseAlert QC 시스템을 사용하여 기지량의 단백질을 사용하여 표준 곡선을 그리고, 이 표준 곡선으로부터 혈액 샘플 중 RSLV-124의 RFU를 사용하여 RSLV-124의 단백질 농도를 외삽했다. 이 분석으로부터 RNase 효소 활성 분석을 사용하여 계산된바 7일 실험 동안 마우스 혈액에 존재하는 단백질 농도는 ELISA를 사용하여 측정되었던 값과 매우 유사했음이 증명되었다(도 4). 이들 실험으로부터 RSLV-124 화합물은 7일 동안 마우스 순환계에서 생체내 안정하며, 그것의 효소 활성을 보유한다는 결론이 내려졌고, 마우스 순환계에서 7일 동안 효소 활성이 거의 100% 보유되므로 이는 상기 화합물이 마우스에서 생체내 분해에 민감하지 않다는 것을 시사한다. Fc 융합 단백질은 대체로 순환계에서 분해에 민감하므로, 이 발견은 귀중한 약물로서 RNase-Fc 융합 단백질의 사용을 더욱 확고히 한다.

[0267] 실시예 5: TLR7.1xRNaseA 이중 트랜스제닉 마우스의 표현형

[0268] RNaseA를 과발현하는 마우스(RNase Tg)를 만들었다. 이 뉴클레아제는 RNase Tg 마우스에서 높은 수준으로 발현된다. 우리는 혈청에서 RNase를 정량하기 위하여 단일 방사성 확산(SRED) 방법(도 5)과 훨씬 더 정량적인 ELISA를 모두 개발했다(도 6). 두 분석은 모두 RNase Tg에서 RNase 활성의 유의한 증가를 나타낸다. 야생형 B6 마우스와 비교하여 도 6에서 RNase 수준의 정량은 RNase Tg에서 RNase가 대략 10배 증가했음 나타냈다. 우리는 RNaseA Tg를 TLR7.1 Tg 마우스와 교배시켜 이중 Tg(DTg)를 만들었다. TLR7.1 마우스는 8-16개의 TLR7 카피를 가지며, 매우 공격적이고 빠른 진행성 루푸스-유사 질환이 발생하고, 3개월령에 죽기 시작하여 중간 생존기간은 6개월이다. 예비 분석에서 우리는 3개월령의 DTg 및 한배새끼 대조군에서 채혈하여 DTg 마우스가 개선의 징후를 나타냈다는 것을 알아보았다. 도 5에 나타낸 대로, DTg 마우스는 혈청 중에 매우 높은 수준의 RNase를 나타냈다(우리의 표준에 기초하여 >13 U/mL RNase와 등가이고, 특이적 활성은 993 U/mg이다). 또한, 도 6에 도시된 대로 Tg 및 DTg 마우스에서 RNaseA 농도를 ELISA 분석에 의해서 측정했다. RNase A Tg 및 TLR7.1XRNaseA Dtg 마우스는 1-2 ng/mL의 RNase A 혈청 농도를 가진다.

[0269] RNase A ELISA를 위한 상세한 방법

[0270] 1. 코팅 플레이트, 항-RNaseA Abcam Ab(ab6610) 사용: 2.5-10 ug/ml O/N, 4C 단위

[0271] 2. 세척 플레이트, 0.05% Tween/1XPBS로 3회

[0272] 3. 적어도 1시간 동안 PBS에서 1% BSA로 차단

[0273] 4. 세척 플레이트, 0.05% Tween/1XPBS로 3회

[0274] 5. 샘플 로딩, 1:50 비율로 샘플 희석

[0275] 6. 2시간 동안 Rm Temp에서 인큐베이션

[0276] 7. 세척 플레이트, 0.05% Tween/1XPBS로 3회

[0277] 8. 1:4500 희석 비율로 바이오틴 표지 항 RNase Ab 희석물 제조(2.2ug/mL), 1시간 동안 RT에서 방치(Rockland 200-4688: 10mg/ml).

[0278] 9. 세척 플레이트 3회

[0279] 10. 1:2500 비율로 StrepAV HRP(Biolegend 405210) 희석, 호일로 덮고 25-30분간 RT에서 방치

[0280] 11. 6회 세척, 세척 사이에는 적어도 30초간 웰에 액체를 넣어 둔다

[0281] 12. BD OptEIA 기질 A+B 1:1 첨가, 색이 변할 때까지 최대 5-10분 기다린다, 상부 웰 표준은 1.0이 넘지 않도록 한다, 80uL을 가한다(CatNos: 51-2606KC; 시약 A, 51-2607KC; 시약 B)

[0282] 13. 1M 황산 40uL을 가하여 반응을 중단시킨다

[0283] 제품/시약 정보:

[0284] RNaseA Ab: ab6610(90mg/ml)

[0285] ELISA 버퍼: PBS 중 1% BSA

[0286] ELISA 세척 버퍼: 0.05% Tween/1XPBS

[0287] 항 RNaseA 바이오틴 콘쥬게이트된 Ab: Rockland: 200-4688(10mg/ml)

[0288] Strep AV HRP: Biolegend 405210

[0289] BD OptEIA 시약 A 및 B: 51-2606KC 및 51-2607KC

[0291] 실시예 6: TLR7.1 트랜스제닉 마우스 혈통에 대한 생존 곡선

[0292] DTg와 TLR7.1 한배새끼(littermate) 대조군 사이에는 생존기간에 매우 상당한 차이가 있었다. 도 7에 도시된 대로, 제10개월에 TLR7.1 마우스는 61%가 죽은 반면 DTg 마우스는 31%가 죽었다. 이 데이터는 RNaseA의 과발현이 강한 치료 효과를 발휘했음을 나타낸다. TLR7.1 마우스가 일찍 죽은 이유는 전체적으로 분명하지는 않지만, 중증 빈혈, 혈소판감소증 및 사구체신염이 일부 역할을 했을 것이다. 적혈구 및 혈소판 수가 DTg 마우스에서 RNaseA 발현에 의해 확실히 영향을 받았는지를 결정하기 위해서 우리는 혈액 계수를 수행했지만 TLR7.1과 DTg 마우스 사이에 차이는 발견되지 않았다. 반대로, DTg 마우스에서는 신장 조직병리학에 유의한 개선이 있었다.

우리는 DTg 마우스에서 IgG 및 C3의 감소된 부착을 관찰했다. 사구체간질의 염증을 반영하는 PAS 염색도 TLR7.1 한배새끼 대조군과 비교하여 DTg 마우스에서 감소했다. 항-MAC-2(갈렉틴 3) 항체(Lyoda et al. Nephrol Dial Transplat 22: 3451, 2007)를 사용하여 신장의 대식세포 침윤을 비교했을 때, DTg 마우스의 사구체에는 mac-2 양성 세포가 매우 더 적었다. 각 그룹마다 5마리 마우스에서 마우스 당 20개 사구체를 계수한 결과는 단일 트랜스제닉 대 DTg에 대해 각각 3.8+/-1.1 및 1.4+/-0.2의 평균+/-SE였으며, p=0.05였다. 이에 더하여, 우리는 사구체 다발 크기를 정량하고, DTg 마우스에서 사구체 다발 크기의 유의한 감소를 관찰했다(단일 트랜스제닉 대 DTg에서 각각 179+/-41 대 128+/-16.8um2, p=0.037). 요약하면, TLR7.1XRNaseA DTg 마우스는 이들의 단일 Tg TLR7.1 한배새끼보다 더 오래 생존하며, 신장의 염증 및 손상도 적었다. 이 발견은 이 마우스 모델에서 RNA 면역 복합체를 제거한 것이 전체적인 사망률을 유의하게 개선했고, 이 루푸스-유사 병증과 관련된 신장 손상 및 전체적인 염증을 감소시켰다는 것을 나타낸다.

[0294] 실시예 7: TLR Tg 마우스의 비장에서 IRG의 분석

[0295] TLR7.1 Tg 및 TLR7.1 X RNaseA DTg 마우스의 비장에서 인터페론 반응 유전자(IRG)의 분석은 IRF7 유전자(인터페론 조절 인자 7(UniProtKB P70434))의 발현이 DTg 마우스에서 상당히 저하되었음을 나타냈다(p=0.03). MX1(인터페론-유도 GTP-결합 단백질 Mx1(UniProtKB P09922)) 및 VIG1(라디칼 S-아데노실 메티오닌 도메인 함유 단백질 2(UniProtKB Q8CBB9))을 포함하는 일부 다른 IRG도 Tg 마우스와 비교하여 DTg 마우스에서 저하되었지만, 차이는 유의하지 않았다(도 8). 정량적 PCR은 다음과 같이 수행했다: 총 RNA를 RNeasy 미니 키트(Qiagen, 미국 캘리포니아 발렌시아)를 사용하여 마우스 비장으로부터 분리하고, Turbo DNA-프리(Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 포스터시티)를 사용하여 DNase 처리하고, 랜덤 프라이머를 사용하여 RNA-to-cDNA 키트(Applied Biosystems)로 제1 가닥 cDNA를 생성했다. NanoDrop(Thermo Scientific, 미국 매사추세츠 윌삼)으로 측정된 분리된 RNA에 대해 260/280은 1.7 및 2.0 사이였다. cDNA를 1ng/uL 총 RNA의 당량으로 희석하고, 반응당 8uL를 사용했다. 기준 유전자(18s) 및 관심의 유전자(GOI)에 대한 프라이머를 합성하고(IDT, 미국 아이오와 코랄빌), 분자 등급 물을 사용하여 qPCR을 위한 적절한 농도로 희석했다. 프라이머의 BLAST 결과는 기준 유전자나 GOI에만 특이적 서열 상동성을 나타낸다. 반응(20uL)을 ABI Fast 7500 시스템에서 주형과 프라이머의 1:1 믹스를 SensiMix SYBR 저-ROX 마스터 믹스(Bioline, 영국 런던)에 대해 사용하여 중복 수행했다. 각 GOI에 대해 변화 배수를 결정하기 위해 베이스라인으로서 연령 일치된 야생형 B6 마우스를 사용하여 2^{-ddCT} 방법으로 상대적 정량을 계산했다. 반응 해리 곡선은 각 유전자에 대해 단일 용융 피크를 나타낸다. 표준 곡선은 각 유전자에 대해 유사한 증폭 효능을 나타냈으며, 해당 주형 농도는 프라이머 세트 각각에 대해 선형 역학 범위 내에 있었다.

[0297] 실시예 8: DNase1-Ig 단일 및 이중 효소 혼성체 뉴클레아제 분자의 구성 및 발현

[0298] 사람 DNase1 또는 DNase1 유사 분자의 자연 발생 대립형질이 보고되었다. 이 A114F 돌연변이는 사람 DNAse1 유사 효소의 천연 변이체에서 발생하며, 이 서열 변화를 함유하는 효소에 액틴 내성을 가져온다는 것이 이미 보고되었다. Pan, CQ, Dodge TH, Baker DL, Prince WE, Sinicropi DV, and Lazarus RA. J Biol Chem 273: 18374-18381 (1998); Zhen A, Parmelee D, Hyaw H, Coleman TA, Su K, Zhang J, Gentz R, Ruben S, Rosen C, and Li Y. Biochem 및 Biophys Res Comm 231: 499-504 (1997); 및 Rodriguez AM, Rodin D, Nomura H, Morton CC, Weremowicz S, and Schneider MC. Genomics 42:507-513 (1997)를 참조하며, 이들은 모두 본원에 참고자료로 포함된다.

[0299] 유사하게, 일부 또는 전체 집단에서 다형성이고, 자가면역과 관련된 사람 DNAse 1을 암호화하는 유전자에서 단일 뉴클레오티드 다형성으로서 G105R 돌연변이가 최근 보고되었다(Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Lida R, Tsubota E, Soejima M, Koda Y, Dato H, Panduro A. Int J Biochem Cell Biol 42(7):1216-1225 (2010)를 참조하며, 이것은 본원에 참고자료로 포함된다). 이 위치에 있는 대립형질 변이체는 야생형에 비해서 높은 활성을 숨긴 DNase 1 동형을 가져왔다. 다른 자연 발생 다형성 돌연변이(R21S)도 높은 활성을 부여한다고 보고되었다(Yasuda(상동) 참조).

[0300] SLE 환자는 상당히 감소된 DNase1 활성 수준을 갖는 것으로 보고되었다(Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Bujan-Rivas S, Sellas-Fernandez A, Vilardell-Tarres M. Lupus 18(5):418-423 (2009) 참조, 본원에 참고자료로 포함된다).

[0301] 이와 같이, 자연 발생 효소 변이체는 이들 동형이 사람 집단에서 발생하므로 환자에 투여되었을 때 면역원성이 적을 수 있다. 우리는 A114F와 유사한 대립형질의 액틴 내성 성질과 G105R과 유사한 대립형질의 증가된 효소 활성의 조합이 시험관내 및 생체내에서 개선된 임상 활성을 나타낼 수 있는 사람 DNase1의 신규 대립형질 변이

체를 생성할 것이라고 추론했다. 우리가 아는 한, 두 자연 발생 변이체 G105R과 A114F의 조합으로부터 생성된 DNase1의 이 새로운 돌연변이형 형태는 우리가 최초로 보고한 것이다.

[0302] 사람 DNase 1을 사람 췌장 RNA(Ambion)으로부터 다음의 프라이머 세트를 사용하여 랜덤 프라임 cDNA 및 PCR에 의해서 이전에 설명된 대로 분리했다:

[0303] 5'hDNase1-age: GTT ACC GGT CTG AAG ATC GCA GCC TTC AAC ATC CAG(서열번호 16)

[0304] 5'hDNase1-bx: GTT CTC GAG ATC TTT CAG CAT CAC CTC CAC TGG ATA GTG(서열번호 17)

[0305] 또는 달리, 3' DNase 카세트를 다음의 프라이머 쌍을 사용하여 PCR에 의해서 증폭시켰다.

[0306] 3'hDNase1-RV: GTT GAT ATC CTG AAG ATC GCA GCC TTC AAC ATC CAG(서열번호 18)

[0307] 3'hDNase1-stop: GTT TCT AGA TTA TCA CTT CAG CAT CAC CTC CAC TGG ATA GTG(서열번호 19)

[0308] 백금 PCR 수퍼믹스를 사용하고, 50uL의 총 부피 중에 50pmol 각 프라이머, 2uL cDNA를 사용하여 이전에 설명된 대로 PCR 반응을 수행했다. 증폭 프로파일은 35사이클 동안 94℃ 30초; 55℃ 30초; 68℃ 90초였다.

[0309] PCR에 의해 야생형 유전자가 증폭되었으면, 단편들을 겔전기영동하고, 850bp 단편을 QIAquick 칼럼 정제에 의해서 정제했다. 다른 구성물에 대해서 설명된 대로 제조자의 설명서에 따라서 TOPO 클로닝에 의해서 형질전환된 pCR2.1에 단편들을 클로닝했다. 서열이 검증되었으면, PCR 프라이머를 사용하여 특이적 활성을 개선하고 액틴의 저해 활성에 대한 내성을 개선한다고 보고된 DNase1에 대해 자연 발생 대립형질을 함유하는 하위단편을 생성했다. 이들 하위단편은 중복 서열을 함유했으며, 이는 원하는 대립형질 변형을 함유하는 완전한 DNase1 서브클론의 증폭을 가능하게 한다. COS7 세포를 Polyfect(Qiagen, 캘리포니아 발렌시아) 형질감염 시약을 사용하여 60mm 접시에서 일시적으로 형질감염시켰다. 플라스미드 DNA를 제조자의 설명서에 따라서 Qiagen QIAprep 미니프렙 키트를 사용하여 제조했다. 플라스미드를 50uL EB 버퍼에서 용출시켰다. Nanodrop 및 각 형질감염 반응에 사용된 2.5ug 플라스미드 DNA와 등가의 알리쿼트를 사용하여 DNA 농도를 측정했다. 각 DNaseIg (또는 RNase-Ig-DNase) 발현 카세트를 pcDNA3.1의 유도체인 포유류 발현 벡터 pDG에 삽입했다. 형질감염된 세포를 37℃, 5% CO2에서 72시간 동안 인큐베이션한 후, 추가의 분석을 위해 배양 상청액을 수거했다. 배양 상청액을 수거하고, 잔류 세포를 용액으로부터 원심분리하고, 액체를 새 튜브로 옮겼다. COS-7 세포를 사람 DNase1 야생형 또는 야생형 사람 IgG1 Fc 도메인에 융합된 자연 발생 DNase 1 돌연변이형 대립형질(G105R 및/또는 A114F)을 함유하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 이 힌지-CH2-CH3 카세트는 이 도메인에서 항체의 경쇄에 존재하는 쌍을 이루는 파트너의 부재로 인하여 홀로 있는 첫 번째 시스테인을 제거하기 위하여 힌지 영역에 단일 C->S 돌연변이를 함유한다. 또한, 더 복잡한 다중-뉴클레아제 융합 단백질도 COS 세포 일시 형질감염체로부터 발현되었다.

[0311] <u>실시예 9: 사람-Ig 테일의 분리, 코딩 서열에 돌연변이의 도입, 및 돌연변이형 뉴클레아제 분자의 구성</u>

[0312] 돌연변이형 사람 -Ig Fc 도메인의 분리를 위해서 림프구 분리 배지(LSM) Organon Teknika(노스캐롤라이나 더럼)을 사용하여 신선한 전혈로부터 분리된 사람 PBMC로부터 RNA를 유도하고, 제조자의 지시에 따라서 버피 코트를 수거하고, 사용 전에 세포를 PBS에서 3번 세척했다. 배양 배지로부터 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, $2x10^7$ 세포를 사용하여 RNA를 제조했다. QIAGEN RNAeasy 키트(캘리포니아 발렌시아), 총 RNA 분리 키트 및 QIAGEN QIAshredder 칼럼을 사용하여 키트에 첨부된 제조자의 설명서에 따라서 세포로부터 RNA를 분리했다. 총 RNA 1μg(4μg)을 주형으로 사용하여 역 전사에 의해서 cDNA를 제조했다. RNA, 300ng 랜덤 프라이머, 및 500ng Oligo dT(12-18), 및 1μL 25mM dNTP를 조합하고, 효소를 첨가하기 전에 80℃에서 5분간 변성시켰다. 제2 가닥 버퍼 및 효소와 함께 제공된 0.1M DTT의 존재하에 25μL의 총 부피로 RNA와 프라이머 혼합물에 Superscript III 역 전사효소(Invitrogen, Life Technologies)를 가했다. 역 전사 반응을 50℃에서 1시간 동안 진행시켰다. 제조자의 지시에 따라서 cDNA를 QIAquick(QIAGEN) PCR 정제 칼럼을 사용하여 정제하고, 40μL EB 버퍼로 용출시킨 다음 PCR 반응에 사용했다.

[0313] 주형으로서 상기 설명된 cDNA를 사용하여 PCR 증폭에 의해서 야생형 사람 -Ig Fc 도메인을 분리했다. 돌연변이형 -Ig 단편을 주형으로서 원하는 돌연변이 및 야생형 카세트를 함유하는 적절한 PCR 프라이머를 사용하여 PCR 지정 돌연변이유발에 의해서 분리했다. PCR 반응은 C1000 열 사이클러(BioRad, 캘리포니아 허큘레스)를 사용하여 수행했다. 반응은 95℃ 2분 초기 변성 단계, 이후 94℃ 30초 변성, 55℃ 30초 아닐링 및 72℃ 1분 연장 단계 34 사이클, 이후 최종 72℃에서 마지막 4분 연장을 포함했다. 전장 돌연변이형 테일이 분리되었으면, 단편을 pCR2.1 벡터에 TOPO 클로닝하고, 제조자의 설명서에 따라서 QIAGEN 스핀 플라스미드 미니프렙 키트를 사용하

여 DNA를 제조하고, 제조자의 설명서에 따라서 ABI Dye Terminator v3.1 서열화 반응을 사용하여 클론들을 서열화했다.

[0314] 돌연변이된 올리고뉴클레오티드와 함께 중복 연장 PCR을 사용하여 PCR 돌연변이유발에 의해서 재조합 분자들을 생성했다.

[0315] 다음의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 이들 분자를 유도했다.

[0316] CS-P238S 5-1: TCT CCA CCG AGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGA GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC C(58mer)(서열번호 20)

[0317] SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC T(58 mer)(서열번호 21)

[0318] P331S-S: GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC A(46mer)(서열번호 22)

[0319] P331S-AS: TGG AGA TGG TTT TCT CGA TGG GGG CTG GGA GGG CTT TGT TGG AGA CC(47mer)(서열번호 23)

[0320] hIgG1-3'WTnogt: TCT AGA TTA TCA TTT TCC CGG AGA GAG AGA GAG GCT CTT CTG CGT GTA GTG(51mer)(서열번호 24)

[0321] 순차적 PCR 반응에서 두 중복 5' 올리고를 사용하여 PCR 돌연변이유발에 의해서 P238S 돌연변이 및 SCC에 대한 SSS 치환을 도입했다. 첫 번째 PCR 반응은 다음의 5' 프라이머를 포함했으며, 이것은 P238S 돌연변이를 그것의 서열에 통합한다: CS-P238S 5-1: TCT CCA CCG AGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGA GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC C(58mer)(서열번호 25)

[0322] 두 번째 PCR 반응은 다음의 5' 프라이머를 포함했으며, 이것은 첫 번째 프라이머와 중복되고, P238 돌연변이형에 돌연변이된 힌지 잔기에 부가된다: SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC T(58 mer)(서열번호 26)

[0323] 정확한 클론으로부터의 DNA를 중복 연장 PCR에서 주형으로 사용하여 사람 -IgG1의 코딩 서열에서 원하는 내부 위치에 돌연변이를 도입했다. PCR 반응은 주형으로서 전장 클론(1 마이크로리터), 각 방향으로부터 원하는 돌연변이 부위까지 포함해서 -Ig 테일의 PCR 각 부분에 50pmol 5' 및 3' 프라이머, 및 PCR 고 충실성 Supermix(Invitrogen, 캘리포니아 칼스배드)를 50 마이크로리터 반응 부피 중에 사용하고, 짧은 증폭 사이클을 사용하여 설정했다. 중복 PCR 돌연변이유발의 예로서, 이미 P238S가 도입된 사람 -IgG1에 P331S 돌연변이를 도입하기 위해서 사용된 프라이머 조합은 다음과 같다:

[0324] 5' 하위단편이 주형으로서 전장 야생형 클론을 사용하여 증폭되었고, 5' 프라이머는 SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC T(58 mer), 3' 프라이머는 P331S-AS: TGG AGA TGG TTT TCT CGA TGG GGG CTG GGA GGG CTT TGT TGG AGA CC(47mer)였다(서열번호 27).

[0325] 3' 하위단편이 주형으로서 전장 야생형 클론을 사용하여 증폭되었고, 5' 프라이머는 P331S-S: GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC A(46mer), 3' 프라이머는 hIgG1-3'WTnogt: TCT AGA TTA TCA TTT TCC CGG AGA GAG AGA GAG GCT CTT CTG CGT GTA GTG(51mer)였다(서열번호 28).

[0326] 하위단편이 증폭되고 아가로오스 겔 전기영동에 의해서 분리되었으면, 이들을 QIAquick 겔 정제 칼럼에 의해서 정제하고, 제조자의 설명서에 따라서 30㎕ EB 버퍼로 용출시켰다. 다음에, 새 반응들에서 중복 주형으로서 이 2개 하위단편을 사용하여 2회의 PCR을 수행했다. 사이클러를 일시 정지시키고, 5' 및 3' 외측 프라이머를 반응물에 가했다(각 50pmol). 다음에, 상기 야생형 분자에 대해 설명된 조건에서 34 사이클 동안 PCR 증폭을 수행했다. 겔 전기영동에 의해서 전장 단편을 분리하고, 서열 분석을 위해서 pCR2.1 벡터에 POTO 클로닝했다. 다음에, 본원에 설명된 상이한 뉴클레아제 분자들의 생성을 위해서 정확한 서열을 지닌 클론으로부터의 단편을 발현 벡터에 하위 클로닝했다.

[0327] 다중-특이적 뉴클레아제 분자에 대해서, 카세트의 나머지 부분에 대한 융합을 촉진하기 위하여 PCR 반응을 Fc 도메인의 3' 단부에 대해 STOP 코돈을 제거하고, NLG 링커 및 EcoRV 제한 부위를 분자에 부가한 대체 프라이머를 사용하여 수행했다. 프라이머 서열은 하기 기재된다: 5' GAT ATC CTG CAC GCT AGG GCT GCT CAC ATT 3'(서열번호 29)

[0328] 두 도메인을 분리하는 링커를 사용하거나 없이 돌연변이된 사람 -Ig 테일을 야생형 RNase 도메인에 융합함으로

써 RSLV 돌연변이형 뉴클레아제를 구성했다. RSLV125 및 RSLV126은 사람 RNase를 돌연변이형 힌지 및 IgG1 Fc 도메인과 융합시킨다. RSLV125는 링커를 함유하지 않지만, RSLV126은 뉴클레아제 도메인과 힌지 영역 사이에 삽입된 (BglII-XhoI) 단편으로서 (gly4ser)4 링커를 함유한다. RSLV-125는 사람 IgG1 힌지의 SSS(CCC나 야생형 말고) 버전에 직접 융합된 야생형 RNase 카세트 및 P238S, P331S 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인을 통합한다(서열번호 61-62).

[0329] RSLV 126은 (gly4ser)4 링커 도메인에 융합된 야생형 RNase 카세트를 통합하고, 이어서 SSS 돌연변이형 힌지, 및 P238S-P331S 이중 돌연변이형 Fc 도메인을 통합한다(서열번호 63-64).

[0330] RSLV-127은 (gly4ser)4 링커 도메인에 융합된 아미노 말단 사람 DNase(G105R /A114F)를 통합하고, 이어서 SSS 돌연변이형 힌지 및 NLG 링커 도메인에 융합된 P238S-P331S 이중 돌연변이형 Fc 도메인을 통합하고, 이어서 C 말단 야생형 RNase 도메인을 통합한 다중 뉴클레아제 융합 구성물이다(서열번호 65-66).

[0331] RSLV-128은 (gly4ser)4 링커 도메인에 융합된 아미노 말단 야생형 사람 DNase 도메인을 통합하고, 이어서 SSS 돌연변이형 힌지 및 NLG 링커 도메인에 융합된 P238S-P331S 이중 돌연변이형 Fc 도메인을 통합하고, 이어서 C 말단 돌연변이형 DNase(G105R/A114F) 도메인을 통합한 다중 뉴클레아제 융합 구성물이다(서열번호 67-68).

[0332] RSLV-129는 SSS 돌연변이형 힌지에 융합된 아미노 말단 야생형 사람 RNase 도메인 및 NLG 링커 도메인에 융합된 P238S-P331S 이중 돌연변이형 Fc 도메인을 통합하고, 이어서 C 말단 돌연변이형 DNase(G105R/A114F) 도메인을 통합한 다중 뉴클레아제 융합 구성물이다(서열번호 69-70).

[0333] RSLV-132는 사람 IgG1 힌지의 SCC 버전에 직접 융합된 야생형 RNase 카세트, 및 P238S, P331S 돌연변이형 사람 IgG1 Fc 도메인을 통합한다(서열번호 91-92 및 95-96).

[0334] RSLV-133은 SSS 돌연변이형 힌지에 융합된 아미노 말단 야생형 사람 RNase 도메인 및 NLG 링커 도메인에 융합된 P238S-P331S 이중 돌연변이형 Fc 도메인을 통합하고, 이어서 C 말단 돌연변이형 DNase(G105R/A114F) 도메인을 통합한 다중 특이적 융합 구성물이다(서열번호 93-94 및 97-98).

[0335] SCC 힌지를 가진 RSLV-125-RSLV-129의 추가 버전들이 RSLV-125-2(서열번호 77-78), RSLV-126-2(서열번호 79-80), RSLV-127-2(서열번호 81-82), RSLV-128-2(서열번호 83-84), 및 RSLV-129-2(서열번호 85-86)로서 표 1에 제시된다.

[0337] 실시예 10: COS7 형질감염체로부터 발현된 RSLV 125-129 융합 단백질에 대한 웨스턴 블롯

[0338] 도 9는 RSLV 125-129 구성물들의 COS 형질감염 상청액에 대한 웨스턴 블롯을 도시한다. RSLV 125, 126, 127, 128, 또는 129를 함유하는 발현 플라스미드를 Polyfect 형질감염 시약을 사용하여 COS7 세포에 형질감염시키고, 48시간 후 상청액을 수거했다. RSLV 125 및 126에 함유된 단일 뉴클레아제 분자에 더하여, RSLV 127, 128 및 129에 의해서 암호화된, 더 복잡한 다중-뉴클레아제 융합 단백질을 또한 COS 세포 일시 형질감염체로부터 발현시켰다. 일시 형질감염체로부터의 상청액에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. 도 9에 도시된 분자는 사람 SSS IgG1 힌지에 융합된 사람 RNase1, 및 IgG1 P238S-P331S Fc 도메인을 함유하거나, 또는 사람 IgG1의 SSS 힌지-(P238S-331S) CH2-CH3 Fc 도메인에 융합되고, 이어서 프로테아제 절단으로부터 링커 도메인을 보호하기 위하여 N-연결된 글리코실화 부위를 함유하는 신규 링커에 융합된 사람 RNase1(야생형), 및 분자의 카르복시 말단에 사람 DNase1의 돌연변이형 대립형질 G105R-A114F 형태를 포함한다. 이에 더하여, RSLV 127은 아미노 말단 위에서 사람 DNase1 돌연변이형 및 돌연변이형 -Ig 테일의 카르복시 말단에 RNase1 WT를 암호화한다. COS 상청액을 72시간 후 수거하고, 0.5mL 샘플을 100uL 단백질 A-아가로오스 비드와 함께 4℃에서 하룻밤 면역침전시켰다. 단백질 A 비드를 원심분리하고, PBS에서 2번 세척한 후, SDS-PAGE 로딩 버퍼로서 NuPAGE 겔을 위한 환원 또는 비-환원 LDS 샘플 버퍼(Invitrogen, 캘리포니아 칼스배드)에 재현탁했다. 샘플을 제조자의 설명서에 따라서 가열하고, 단백질 A 비드를 펠릿이 되도록 원심분리하고, 샘플 버퍼를 5-12% NuPAGE 구배 겔 위에 로딩했다. 샘플을 1.5-2시간 동안 150볼트에서 전기영동하고, 1시간 동안 30mAmp에서 니트로셀룰로오스 막에 대해 겔을 블롯팅했다. TBS/5% 탈지유에서 하룻밤 웨스턴 블롯을 차단했다. 블롯을 1:2500 HRP(호스래디쉬 퍼옥시다아제) 콘쥬게이트된 염소 항-사람 IgG(Fc 특이적, Jackson Immunoresearch)와 함께 실온에서 1.5시간 동안 인큐베이션하고, PBS/0.5% Tween20에서 5번 이상 세척하고, ECL 시약을 사용하여 블롯을 전개시켰다. 결과는 뉴클레아제 Fc 융합 단백질의 구성이 성공적이었으며, 단백질들이 COS 세포로부터 쉽게 발현된다는 것을 증명한다. 또한, 이들 뉴클레아제 Fc 융합 단백질에 대해 환원 및 비-환원 프로파일을 분석한 결과, DNA 구성물들이 적절한 분자량의 단백질을 암호화한다는 것이 확인된다. 비-환원 SDS-PAGE 상의 패턴은 단백질들의 이황화 결합 성질이 구성물의 예상된 거동과 일치한다는 것을 확인해 준다.

[0340] 실시예 11: COS7 형질감염체로부터 친화성 정제된 단백질의 SRED 분석

[0341] 도 10은 실시예 10의 RSLV 형질감염된 COS 상청액으로부터 단백질 A 정제된 단백질의 알리쿼트들을 비교한 SRED 분석을 도시한다. 2% 아가로오스 겔을 증류수를 사용해서 제조했다. 폴리-IC(Sigma)를 3mg/mL로 증류수에 용해했다. 겔 플레이트를 다음과 같이 제조했다: 1.5mL 반응 버퍼(0.2M 트리스-HCl pH 7.0, 40mM EDTA 및 0.1mg/mL 에티듐 브롬화물), 1mL 폴리-IC 및 0.5mL 물을 튜브에 넣고 50℃에서 5분간 유지했다. 아가로오스 3mL(50℃에서 유지된)를 튜브에 가했다. 혼합물을 즉시 유리판 위에 부었다. 샘플링 웰들을 겔에 펀칭했다. 각 대조군, 혈청 샘플, 또는 친화성 정제된 RSLV 단백질을 2μL씩 웰에 로딩하고, 겔을 가습 챔버에서 4시간 동안 37℃에서 인큐베이션했다. 다음에, 겔을 30분간 얼음 위에서 버퍼(20mM 아세트산 나트륨 pH 5.2, 20mg/mL 에티듐 브롬화물) 중에서 인큐베이션하고, UV 아래에서 판독했다. 에티듐 브롬화물 필터가 장착된 코닥 디지털 카메라 DC290 시스템을 사용하여 UV 트랜스루미네이터 위에서 겔을 사진 촬영하고, 코닥 분자 이미징 소프트웨어를 사용하여 분석했다. RNase 효소 활성 분석의 결과는 구성물들이 전부 촉매 활성 RNase 부분을 함유한다는 것을 시사한다.

[0343] 실시예 12: RSLV 뉴클레아제 분자의 겔 내 DNase 활성

[0344] 도 11은 실시예 10에서 RSLV 융합 플라스미드로 형질감염된 COS7 상청액으로부터 단백질 A 정제된 단백질에 대해 수행된 DNase 뉴클레아제 활성 분석의 결과를 도시한다. 도 11은 5개의 패널(11a, 11b, 11c)을 도시하는데, 각 겔 패널은 감소하는 양의 나타낸 융합 단백질과 1μg 플라스미드 DNA를 사용한 절단 패턴을 보여준다. 각 단백질은 500ng에서 4ng의 효소를 가진 뉴클레아제 무함유 물로 2배씩 연속 희석되었다. 각 샘플에 1ug PDG 플라스미드 DNA를 가하고, 37℃에서 30분간 인큐베이션했다. 각 샘플의 반을 1.2% TAE 아가로오스 겔을 사용하여 100 볼트에서 30분간 아가로오스겔 전기영동했다. 도 11c는 상업적으로 이용가능한 DNase 1(Biolabs, Inc.)을 사용한 겔 내 DNase 효소 활성 분석의 결과를 도시한다. 가장 먼 오른쪽 레인은 효소 없이 DNA만을 가진 음성 대조군이고, 그것의 왼쪽에 있는 레인은 다른 음성 대조군인데, 이것은 RNase 활성은 갖지만 DNase 활성은 갖지 않는 RNase-Ig 분자이며, 플라스미드 DNA는 온전한 상태를 유지하고, 두 경우 모두 절단되지 않을 것으로 예상된다. 결과는 상업적으로 이용가능한 DNase1 효소가 매우 활성이며, 시험된 농도 대부분에서 DNA를 모두 절단한다는 것을 증명한다. 도 11a 및 11b의 결과는 네 상이한 뉴클레아제 Fc 융합 구성물의 DNase 활성을 도시한다. 도 11a의 위 패널은 플라스미드 DNA를 절단하는 DNase-Ig 융합 단백질의 능력을 나타내며, 겔로부터 분명한바, 이 효소는 시험된 모든 농도에서 DNA를 전부 절단하는데, 상업적으로 이용가능한 DNase 1과 같은 활성이거나, 또는 더욱 활성이다. 도 11a의 아래쪽 패널에는 Fc(SED ID NO: 65-66)의 아미노 말단에 DNase를 가진 이중-특이적 뉴클레아제 Fc 융합 단백질이 도시되며, 이것 역시 확실한 DNase 효소 활성을 갖지만, 도 11a의 위쪽 패널에 있는 DNase-Ig보다는 약간 적었다. 도 11b의 위 패널은 다른 이중-특이적 뉴클레아제의 DNase 효소 활성을 나타내며, 이 Fc 융합 단백질은 특별히 조작된 NLG 링커(서열번호 67-68)를 통해서 Fc에 연결된 Fc의 C-말단에 DNase를 가진다. 이 데이터에 의해 분명한바, 이 효소도 또한 확실한 DNase 효소 활성을 가지며, 여기서 시험된 나머지 이중-특이적 뉴클레아제들보다 더욱 활성인 것으로 나타난다. 도 11b의 맨 밑의 패널은 RNase 모듈과 Fc(서열번호 69-70)를 연결하는 (G4S)4 링커를 결여한 다른 이중-특이적 뉴클레아제 분자의 DNase 효소 활성을 나타낸다. 이 이중-특이적 뉴클레아제 역시 우수한 DNase 활성을 갖지만, 이 실험에서 보여준 나머지 두 이중-특이적 뉴클레아제 Fc 융합 단백질보다는 다소 적은 것으로 나타난다. 이 데이터는 이중-특이적 뉴클레아제가 모두 우수한 DNase 활성을 가진다는 것을 시사하며, 이것은 이와 관련된 과거의 다른 노력들에서는 예상치 못한 것이다(Dwyer et al. JBC; Vol 271, No. 14; pp 9738-9743). 또한, 구성물에서 DNase의 위치와 DNase와 Fc를 연결하는 링커 길이 및 조성이 이중-특이적 뉴클레아제 Fc 융합 단백질과 관련하여 매우 활성인 DNase 효소를 만드는데 있어서 중요하다.

[0346] 실시예 13: 효소 동력학의 분석

[0347] 도 12-13은 재조합 RNase A(Ambion), RSLV 125, RSLV 126, hRNase WT-SCCH-WThIgG1, 및 hRNaseG88D-SCCH-(P238S/K322S/P331S)hIgG1의 RNase 효소 활성을 비교한 동력학적 형광 효소 활성 분석의 결과를 도시한다. 2가 mRNase-Ig 융합 단백질의 기능적 특성을 더 한정하기 위해 우리는 RNase Alert 기질(Ambion/IDT)를 사용하여 상이한 뉴클레아제 융합 단백질의 효소 동력학을 연구했고, Biotek Synergy2 마이크로플레이트 리더에서 형광을 정량했다. Gen5소프트웨어(Biotek Instruments, Inc., 버몬트 윈누스키)를 사용하여 데이터를 분석했다. 시간의 함수로서 상대적 형광 단위를 10pg/uL에서 시작해서 0.67x씩 0.1pg/uL까지 연속 희석되면서 감소하는 효소 농도를 사용하여 제조자의 설명서에 따라서 37℃에서 인큐베이션되는 45분 실험 과정에서 매분마다 분석했다. 각 샘플은 1X RNase Alert 반응 버퍼 중에 고정된 농도의 RNase Alert 기질(200nM)을 포함했다.

[0348] 도 12는 등몰 농도에서 각 단백질에 대해 시간에 대한 RFU(상대적 형광 단위)를 도시하며, 200nM RNase Alert 기질의 존재하에 시험 단백질은 4.5pg/uL 또는 4.5ng/mL 농도이고, 재조합 RNaseA 대조군은 1.3pg/uL 농도이다.

[0349] 도 13은 상이한 분자들의 라인웨버 버크 플롯을 도시한다. Vmax 및 Km을 추정하기 위해서 RNase Alert 동력학 형광 분석을 105pM 효소를 사용하여 셋팅하고, 기질 농도를 4배씩 200nM에서 50pM까지 감소시켰다. 따라서, 효소 농도는 고정되었고, 기질 농도는 이 실험 시리즈에서 적정되었다. 데이터는 이들 조건에서 상이한 융합 단백질들에 대해 생성된 라인웨버 버크 플롯을 나타낸다. 도 12와 13의 데이터와 함께 생각하면 RNase 부분은 여기서 구성되고 시험된 3개의 RNase Fc 융합 단백질에서 매우 활성임이 증명된다.

[0351] 실시예 14: 사람 THP-1 셀라인에 대한 시험관내 세포독성의 평가

[0352] 도 14-15는 사람 단핵구 셀라인 THP1의 생존에 대한 야생형 또는 돌연변이형(SCC, P238S, P331S를 포함한다)-IgG Fc 도메인을 가진 RNaseIg 융합 단백질의 효과를 분석한 시험관내 연구의 결과를 나타낸다. THP1 세포는 분석을 위해 수거하기 전에 RPMI/10% FBS 중에서 로그 성장이 유지되었다. 세포는 세포독성 분석에 사용하기 전 98%를 초과하는 생육성을 나타냈다. THP1 세포를 1x10e6 c/ml의 세포 밀도로, 또는 웰당 100,000 세포로 96-웰 플레이트에 평판했다. 혼성체 뉴클레아제 단백질을 반응당 5μg/mL에서 시작해서 0.01μg/mL 융합 단백질에서 종료하는 2-배 연속 희석 시리즈를 사용하여 연속된 웰에 가했다. 이 실험에서는, 배양된 THP1 세포에서 세포독성을 유도하는 능력에 대해서 야생형 IgG1 Fc(wtRNasewtIgG)를 가진 RNase-Fc 융합 단백질과 Fc 수용체 결합 및 내재화(mtRNasemgIgG)를 유의하게 감소시킨 돌연변이형 Fc(P238S, P331S)를 가진 RNase-Fc를 비교했다. 세포 수거 및 분석 전에 반응물을 37℃, 5% CO2에서 3일 동안 96-웰 플레이트에서 인큐베이션했다. 3일 후, 1000rpm에서 원심분리하여 세포를 수거하고, PBS/2% FBS에서 세척하고, 제조자의 설명서에 따라서 FITC Annexin V 세포자멸 검출 키트 시약(#556547, Becton Dickinson/Pharmingen)과 함께 인큐베이션했다. 세포를 키트와 함께 공급된 100μL 차가운 결합 버퍼로 세척하고, 아넥신 V-FITC/프로피듐 요오드화물(PI)을 100uL 결합 버퍼 중에서 1:100 비율로 가했다. 샘플을 20분간 얼음 위에서 인큐베이션하고, 이후 400μL의 결합 버퍼를 각 샘플에 더 가했다. FACS Canto(Becton Dickinson)를 사용하여 유세포계수계에서 염색된 샘플을 분석하고, Flowjo 소프트웨어(Treestar, 오리건 애슐랜드)를 사용하여 데이터를 분석했다.

[0353] 도 14는 두 가지 방법, 즉 아넥신 V 결합(위 패널)과 프로피듐 요오드화물 결합(아래 패널)에 의해서 측정된 세포 죽음에 대한 야생형 또는 돌연변이형 Fc 도메인을 가진 RNase Fc 융합 단백질의 효과를 나타내며, 이들은 모두 세포 죽음에 대한 민감한 척도이다. 이 실험은 돌연변이형 Fc(P238S, P331S)를 가진 RNase 융합 단백질의 결합이 THP1 세포의 표면에서 Fc 수용체에 대해 감소된 결합과 그에 따른 해당 단백질의 감소된 내재화를 나타낸다는 것을 증명한다. 이 결과는 RNase-야생형 Fc 융합 단백질과 비교하여 RNase-Fc 돌연변이형에 의한 세포 죽음의 유의한 감소를 보여준다(예를 들어, 1.25μg/ml 단백질에서 대략 3배 감소). 도 15는 야생형 또는 돌연변이형 Fc 도메인을 가진 RNase Fc 융합 구성물의 세포독성을 시험하기 위한 형광-활성화 세포 정렬(FACS) 실험의 결과를 제시한다(각각 RNase-wtIgG 또는 RNase-mtIgG). 데이터는 THP1 세포가 돌연변이형 Fc를 가진 RNase Fc 구성물과 함께 인큐베이션되었을 때 죽은 세포의 수의 유의한 감소를 증명한다(RNase -wtIgG와 비교하여 RNase Fc 돌연변이에 대해 그래프의 오른쪽으로 더 작은 피크 크기). 이들 데이터는 야생형과 비교하여 RNase Fc 돌연변이형에 의한 세포 죽음이 대략 3배 내지 5배 감소한 것을 나타낸다. Fc 수용체 결합을 시험한 이들 및 다른 실험은 Fc 수용체를 지닌 세포의 존재하에 돌연변이된 Fc 영역을 가진 RNase Fc 구성물은 Fc 수용체에 대한 결합이 감소했고, 세포에 의한 내재화가 적었으며, 그 결과 구성물의 RNase 활성으로 인한 세포 죽음이 적어졌다는 것을 분명히 나타낸다. 이러한 구성물은 Fc 수용체 보유 세포에 세포독성인 단백질 치료제를 사용하는 것이 바람직하지 않을 수 있기 때문에 자가면역 질환을 치료하는데 특히 유용하다.

[0355] 실시예 15: 사람 PBMC에 의한 IFN-알파 생성은 시험관내에서 배양물에 RSLV-132 첨가에 의해서 저해된다.

[0356] RSLV132 첨가는 3명의 SLE 환자의 혈청과 괴사 세포 추출물(NCE)을 사용하여 형성된 면역 복합체를 사용하여 자극된 사람 말초혈 단핵 세포로부터 인터페론-α의 유도를 없앴다(도 16). 루푸스 환자의 면역 복합체에 함유된 RNA에 결합하여 분해하는 RSLV-132의 능력을 측정하기 위해서 시험관내 생체분석을 개발했다. 이 실험은 루푸스 환자의 자기항체 및 배양된 사람 세포(U937)의 NCE를 사용하여 면역 복합체의 시험관내 형성을 수반한다. 루푸스 환자 혈청과 NCE의 조합은 인터페론의 매우 효능 있는 유도제인 면역 복합체(IC)의 형성을 가져오는데, 정상 사람 혈청은 인터페론의 생성을 자극하지 못한다. IC를 리포터 세포로서 정상 사람 말초혈 단핵 세포(PBMC)와 함께 인큐베이션한다. 리포터 세포에 의한 인터페론의 생성을 인터페론-α ELISA를 사용하여 측정한다. 리포터 세포는 Ficoll 밀도 구배 원심분리에 의해서 정상 지원자로부터 얻었다. University of Washington Institutional Rreview Board #HSD No. 3971에 따라서 루푸스 환자 또는 건강한 정상 지원자 혈청

을 얻었고, 이 혈청을 1/1000으로 희석하고, 상기와 같이 배양된 U937 세포로부터 유래된 괴사 세포 추출물(NCE)의 10%(v/v)에 가했다. 희석된 루푸스 환자 또는 정상 지원자 혈청을 실온에서 15분간 NCE와 인큐베이션했으며, 결과의 IC를 다양한 용량의 RSLV-132, RSLV-124, 또는 야생형 RNase와 함께 또는 이것 없이 15분간 인큐베이션하고, 이어서 500U/mL 유니버셜 IFN의 존재하에 20시간 동안 정상 PBMC와 함께 인큐베이션한 다음, PBMC 배양물로부터 분비된 IFN의 양을 측정했다. 경증에서 활성까지 범위의 다양한 정도의 질환 활성을 가진 3명의 다른 루푸스 환자로부터 혈청을 얻었다. NCE를 실온에서 15분간 루푸스 환자 혈청 또는 건강한 정상 지원자 혈청과 함께 인큐베이션하고, 이어서 PBMC와 함께 20시간 인큐베이션했다. IFN-α를 ELISA에 의해 정량했으며, IFN-α는 사람 IFN 알파(MMHA11)에 대한 마우스 MAb[PBL Biomedical Laboratories, 제품 # 2112-1]를 사용하여 포착되고, IFN 알파에 대한 토끼 폴리클론 항체[PBL Biomedical Laboratories, 제품 # 31101-1]를 사용하여 검출했으며, 이후 항-토끼 HRP[Jackson Immuno Research, 제품 # 711-035-152]와 TMB 기질을 사용하여 전개시켰다. 일부 경우, PBCM에 NCE를 첨가하기 전에 시험 항목(RSLV-124 또는 RSLV-132)을 0.16, 0.5, 1.6 및 5.0 ug/mL의 농도로 첨가하거나, 또는 RNAse를 NCE에 0.05, 0.16, 0.5 및 1.6 ug/mL(등몰)의 농도로 첨가했다. PBMC로부터 IFN의 생성을 자극하는 루푸스 환자 혈성의 능력은 5.0ug/mL RSLV-124의 첨가에 의해서 대략 50%까지 감소했다. 이 저해는 RNAse의 등몰량의 결과와 대조되었다. huRSLV-132의 동일한 농도의 첨가는 IFN을 저해하는데 있어서 RSLV-124와 동등하거나 또는 더욱 효과적이었으며, huRSLV-132를 5.0ug/mL 첨가했을 때는 IFN 생성이 거의 완전히 없어졌다. NCE와 조합되었을 때 루푸스 환자의 항-RNA/DNA 항체는 신선하게 분리된 PBMC로부터 IFN을 유도하는 효능 있는 유도제이다. 정상 지원자의 혈청은 리포터 세포로부터 IFN 생성을 자극하는 이와 같은 능력을 갖지 않는다. 이 데이터는 루푸스 환자의 혈청 중의 순환하는 자기항체가 아마도 TLR7을 촉발하고 이어서 IFN을 생성하는 면역 복합체를 형성할 수 있다는 것을 시사한다. IFN의 정확한 종류 및 아형은 분석되지 않았다. 이 데이터는 RSLV-132가 그것의 분자 표적과 결합하고, RNA가 루푸스 환자의 IC와 회합되어 그것을 강력하게 분해하며, 이로써 PBMC로부터 IFN의 자극이 방지된다는 것을 시사한다(도 16). RSLV-132는 이 분석에서 RSLV-124보다 더 활성인 것으로 나타난다.

[0358] 실시예 16: RSLV-132는 RNA-유도 인터페론 활성화의 효능 있는 생체내 저해제이다.

[0359] 마우스의 순환계에서 RNA와 결합하여 그것을 분해하는 RSLV-132의 능력을 평가하기 위해서 인터페론 경로의 확실한 활성제인 RNA 의태 폴리이노신:폴리시티딜 산(폴리 I:C)을 사용하여 약동학 모델을 개발했다. 폴리(I:C)는 미스매치된 이중-가닥 RNA이며, 하나의 가닥은 이노신산의 중합체이고, 다른 것은 시티딜산의 중합체이다. 이것은 B 세포, 대식세포 및 수지상 세포의 막에서 발현되는 toll-유사 수용체 3(TLR3)과 상호작용한다고 알려져 있다. 폴리(I:C)는 Invitrogen으로부터 입수 가능하다. 폴리 I:C의 효과는 투여 후 마우스의 비장에서 인터페론 자극된 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 정량될 수 있다. 제0일에 3개월령의 10마리 B6 마우스를 모두 복강내 주사를 통해서 RSLV-132(마우스당 250ug) 또는 대조군으로 정맥내 면역글로불린(IVIG)(Privigen, Behring)(마우스당 250ug)로 치료했다. RSLV-132 또는 IVIG 주사 20시간 후에 폴리(I:C)를 마우스당 200ug씩 마우스에 복강내 주사했다. 2시간 후 동물을 CO2에 노출시켜 죽이고, 비장을 RNAlater(Qiagen)에 수집하고, 인터페론 자극된 유전자(ISG)의 추후 연구를 위해 -80℃에 보관했다. 비장 샘플을 사용하여 pPCR에 의해서 Ifit1(테트라트리코펩티드 반복부 1을 가진 인터페론-유도 단백질(UniProt Q64282)), Irf7(인터페론 조절 인자 7(UniProt P70434)) 및 Mx1 유전자를 포함하는 ISG들의 발현에 대해 연구했다. 이들 실험의 결과는 RSLV-132의 복강내 주사가 순환하는 폴리(I:C)에 결합할 수 있고, RNA 의태체를 효과적으로 분해할 수 있는 RSLV-132의 혈청 농도를 가져오며, 이로써 인터페론 경로 및 모니터된 세 ISG의 자극이 효과적으로 방지된다는 것을 증명한다(도 17).

[0361] 실시예 17: RSLV-132 및 RSLV-133에 대한 효소 동력학의 분석

[0362] RSLV-132 및 RSLV-133를 CHO 세포에서 일시적으로 발현시켜 단백질-A를 사용하여 정제했다. 이들 RNase Fc 융합 단백질의 RNase 활성을 Ambion(Cat # AM1966)의 RNaseAlert QC 키트를 사용하여 정량했다. 다양한 양의 RNase Fc 융합 단백질을 사용했으며, 그 결과를 시간에 따른 상대적 형광 단위(RFU)로서 도 18에 도시한다. 결과는 RSLV-132가 매우 활성인 RNase 효소이며, RSLV-124 및 야생형 RNase와 같은 다른 RNase Fc 단백질에 비해서 증가된 RNase 활성을 가진다는 것을 증명한다. 예를 들어, RSLV-132와 RSLV-124를 등량(400pM) 사용했을 때 RSLV-124에 대해 RSLV-132에서 두 배가 넘는 RFU가 얻어진다(80,000 대 35,000). 또한, 두 생산 로트를 4℃에서 안정성에 대해 시험했다. RSLV-132.1를 이 실험 전에 8주 동안 4℃에서 보관했고, RSLV-132.2는 -80℃에 보관하고 시험 직전에 해동했는데, 이것은 단백질이 최대 2개월 동안 4℃에서 안정하다는 것을 증명한다. 이 약물의 안정성 및 증가된 촉매 활성은 치료 환경에서 증가된 효능을 제공할 수 있다.

[0363] 도 19는 시간에 따른 RFU 단위로 RNase 효소 활성을 나타내며, 이중-특이적 RSLV-133 분자의 RNase 활성의 양과

단일-특이적 RSLV-132 및 야생형 RNase를 비교한다. 도 19에서 증명된 대로, RSLV-133 분자는 단일-특이적 RSLV-124 분자, 또는 이전의 이중-특이적 뉴클레아제 Fc, RSLV-123 또는 야생형 RNase에 비해서 유의하게 증가된 RNase 활성을 가지며, 등량의 단백질에서 2배 이상을 초과하는 RFU를 제공한다. 도 20은 RSLV-123, 이전의 이중특이적 뉴클레아제 구성물 및 야생형 DNase와 비교한 RLSV-133 분자의 DNase 효소 활성 분석 결과를 나타낸다. 이 실험에서는 DNase 효소 활성을 Integrated DNA Technologies의 DNaseAlert 키트를 사용하여 정량했다. DNA 기질의 절단은 형광 방출을 제공했으며, 이것은 Synergy2 멀티-모드 마이크로플레이트 리더(BioTek Instruments, Inc., 버몬트 위누스키)를 사용하여 정량되었다. 도 20은 RSLV-133, RSLV-123 또는 야생형 DNase에 대해 시간에 따른 DNase 효소 활성의 RFU를 도시한다. 이 실험의 결과는 RSLV-133이 야생형 DNase 및 이전의 이중-특이적 뉴클레아제 분자인 RSLV-123에 비해서 증가된 DNase 활성을 가진다는 것을 증명하며, 실험의 선형 범위에서 3배 이상을 초과하는 DNase 활성이 제공된다. 도 21은 겔 내 절단 실험에서 DNA를 절단하는 RSLV-133 분자의 능력을 증명한다. 결과는 RSLV-133이 이 분석에서 야생형 DNase 만큼 효과적으로 DNA를 소화할 수 있다는 것을 보여준다(레인 5와 7 비교). RSLV-133과 야생형 DNase의 상대적 분자량이 주어졌을 때, 이 분석에서는 역시 RSLV-133이 DNA를 절단하는데 더욱 효과적인 것으로 나타난다.

[0365] 실시예 18: RSLV-132는 증가된 Fc 수용체 결합을 증명한다.

[0366] Fc 수용체와 시험관내 결합하는 RNase Fc 융합 단백질의 능력을 시험하기 위해서 RSLV124(야생형 Fc 도메인) 및 RSLV-132(돌연변이형 Fc 도메인; P238S/P331S)를 Fc 보유 사람 골수양 셀라인, THP1과 함께 인큐베이션하고, 이 세포에 대한 특이적 결합을 형광-활성화 세포 정렬(FACS) 분석에 의해서 정량했다. RLSV-124 및 RSLV-132는 Invitrogen(Cat # A20006)의 알렉사 플루오르 염료 AF-647을 사용하여 형광 표지했다. RNase Fc 융합 단백질을 투석하여 미결합된 염료를 제거한 후, 다양한 양의 표지된 단백질을 1시간 동안 THP1 세포와 함께 인큐베이션하고, 세포를 엄격히 세척하여 미결합된 RNase Fc 융합 단백질을 제거하고, 특이적으로 결합된 단백질을 평균 형광 강도를 측정하는 FACS에 의해서 정량했다. 도 22의 결과는 돌연변이형 Fc 도메인을 갖는 RSLV-132 단백질이 야생형 Fc 도메인을 갖는 RSLV-124보다 상당히 더 적은 Fc 수용체 결합을 가진다는 것을 증명하며, Fc 수용체 결합의 4배를 초과하는 감소를 나타낸다. 이 발견은 돌연변이형 Fc 도메인(P238S/P331S)을 가진 RNase Fc 융합 단백질이 세포독성을 유의하게 감소시켰다는 우리의 이전 발견과 일치한다.

[0368] 실시예 19: 혼성체 뉴클레아제 분자 생물학적 활성의 시험관내 평가

[0369] 하나 이상의 혼성체 뉴클레아제 분자를, 예를 들어 상기 실시예들에서 이미 설명된 대로 친화성 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해서 정제한다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드이다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 표 1로부터 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc 도메인에 연결된 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 힌지, CH2, 및/또는 CH3 도메인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S를 포함하고, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SSS를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 59, 60, 61에 도시된다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호에 도시된다. Fc 도메인을 뉴클레아제 도메인에 연결하기 위하여 다양한 링커 도메인(예를 들어, 본원에 설명된 것들)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 또는 그 이상의 아미노산 길이의 링커 도메인이 사용될 수 있다. 분자들이 원하는 뉴클레아제 기능을 지니는지를 검증하기 위하여 정량 분석을 사용하여 특이적 뉴클레아제 활성에 대해 분자를 시험관내 분석한다. 다음에, 일반적으로 RNase 또는 DNase Alert 키트 시약과 같은 기질, 및 시간의 함수로서 판독되는 형광 플레이트 리더 설정을 이용하여 형광 기반 동력학 분석에 의해서 특이적 활성이 결정된다. 또한, 일반적으로 Cape Cod, Inc.(매사추세츠 이스트팔마우스)의 0.06EU/ml 검출 한계의 Pyrotell Limulus Amebocyte Lysate(LAL) 키트와 같은 상업적으로 이용가능한 키트를 사용하여 내독소 오염에 대해서 단백질 용액을 검사한다. 다음에, 다양한 시험관내 분석을 사용하여 생물학적 활성에 대해 분자를 분석한다.

[0370] 하나의 일련의 시험관내 분석은 배양물에서 분자의 부재 또는 존재하에 다양한 자극에 반응하여 사람 PBMC에 의한 시토카인 생성에 대한 분자의 효과를 측정할 것이다. 정상 사람 또는 환자의 PBMC(약 1x10e6 세포)를 분석에 따라서 24, 48 또는 96시간 동안 배양한다. PBMC는 TLR 리간드, 동시자극성 항체, 면역 복합체, 및 정상 또

는 자가면역 혈청과 같은 자극의 존재하에 배양된다. IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IFN-감마, TNF-알파에 대한 Biolegend(캘리포니아 샌디에고)의 항체 쌍 키트와 같은 상업적으로 이용가능한 시약을 사용하여 시토카인 생성에 대한 분자의 효과를 측정한다. 시험관내 배양의 배양 상청액을 24, 48시간 또는 더 이후의 시간 지점에서 수거하여 시토카인 생성에 대한 분자의 효과를 결정한다. 예를 들어, PBL 인터페론 공급원(뉴전지 피스카타웨이)으로부터의 항-사람 IFN-알파 항체 및 표준 곡선 시약을 사용하여 IFN-알파 생산을 측정한다. 유사한 세트의 분석을 사람 림프구 하위집단(분리된 단핵구, B 세포, pDC, T 세포 등)을 사용하여 수행하고, 예를 들어 Miltenyi Biotech(캘리포니아 오붐)으로부터 입수가능한 상업적으로 이용가능한 자기 비드 기반 분리 키트를 사용하여 정제한다.

[0371] 또한, CD5, CD23, CD69, CD80, CD86, 및 CD25와 같은 림프구 활성화 수용체의 발현에 대한 분자의 효과를 자극 후 다양한 시간 지점에서 평가한다. PBMC 또는 분리된 세포 하위집단을 다색 유세포계수계에서 이들 분자가 면역세포 활성화와 관련된 상이한 수용체의 발현에 얼만큼 영향을 미치는지 결정한다.

[0372] 다른 세트의 분석은 상이한 림프구 하위집단의 증식에 대한 이들 분자의 효과를 시험관내 측정할 것이다. 이들 분석은, 예를 들어 자극 전 사람 PBMC의 CFDA-SE 염색(Invitrogen, 캘리포니아 칼스배드)을 이용한다. 5mM의 CFSE를 10e7-10e8 PBMCS 또는 정제된 세포 하위군을 가진 PBS/0.5% BSA에 1:3000 비율로 희석하고, 표지한 반응물을 37℃에서 3-4분간 인큐베이션하고, 이어서 RPMI/10% FBS로 몇 번 세척하여 잔류 CFSE를 제거한다. 다음에, CFSE 표지된 세포를 다양한 자극(TLR 리간드, 동시자극성 항체 등) 및 분자와 함께 공-배양 반응물에서 4일 동안 인큐베이션하고, 이후 염료-콘쥬게이트된 세포 하위집단 특이적 항체를 사용하여 유세포계수계에 의해서 세포 증식에 대해 분석한다.

[0373] 다른 분석은 하나 이상의 분자의 세포독성을 측정할 것이다. 이 분석은 아넥신 5 염색(예를 들어, 아넥신 5-FITC)을 사용하여 독성을 측정한다. 관심의 세포(예를 들어, 단핵구 또는 단핵구 셀라인)를 관심의 혼성체 뉴클레아제 분자(예를 들어, 돌연변이형 Fc 도메인을 가진 혼성체 뉴클레아제 분자) 또는 하나 이상의 대조군과 접촉시킨다. 접촉 후 다양한 시간 지점에서 세포를 배양물로부터 분리하여 아넥신 5로 염색한다. 다음에, 예를 들어 유세포계수계 또는 형광현미경을 사용하여 세포자멸성 세포나 죽은 세포의 수를 계수한다. 관심의 혼성체 뉴클레아제 분자와 접촉된 세포는 양성 대조군과 비교하여 아넥신 5에 대해 양성 염색된 세포의 수가 적게 나타난다.

[0374] 또한, 정상 샘플 및 환자 PBMC 샘플을 사용하여 단핵구가 DC 및 대식세포로 시험관내 성숙하는 것에 대한 이들 분자의 효능을 평가한다.

[0375] 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제 분자로 치료된 세포의 분석 결과와 대조군 제제로 치료된 세포의 분석 결과를 비교함으로써 혼성체 뉴클레아제 분자의 효능을 증명한다. 치료후, 상기 기술된 다양한 마커들(예를 들어, 사이토카인들, 세포-표면 수용체들, 프롤리퍼레이션)의 수준은 일반적으로 치료 이전에 존재하던 마커들 수준 또는 대조군에서 측정된 수준들에 비하여 효과적인 분자로 치료된 군에서 향상된다.

[0377] 실시예 20: 필요한 포유류에게 혼성체 뉴클레아제 분자의 투여

[0378] 본 연구에서는 포유류(예를 들어, 마우스, 래트, 설치류, 사람, 기니피그)가 연구된다. 표 1로부터의 하나 이상의 서열을 포함하는 하나 이상의 혼성체 뉴클레아제 분자 또는 대조군을 포유류에 투여한다(예를 들어, 정맥내). 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 폴리펩티드이다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 표 1로부터의 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc 도메인에 연결된 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 돌연변이형 Fc 도메인을 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 힌지, CH2 및/또는 CH3 도메인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S를 포함하고, 3개의 힌지 시스테인 중 하나 이상에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및/또는 P331S, 및/또는 3개의 힌지 시스테인에 SSS로의 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 3개의 힌지 시스테인에 돌연변이를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이 Fc 도메인은 P238S 및 P331S 및 SSS를 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이형 Fc 도메인은 서열번호 59, 60, 61에 도시된다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 서열번호에 도시된다. Fc 도메인과 뉴클레아제 도메인을 연결하기 위하여 다양한 링커 도메인(예를 들어, 본원에 설명된 것들)이 사용될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 또는 그 이상의 아미노산 길이의 링커 도메인이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 혼성체 뉴클레아제 분자는 제약학적으로 허용되

는 담체로 조제된다. 일부 예에서, 분자는 상기 제약 조성물 부문에 설명된 대로 조제된다. 혼성체 뉴클레아제 분자는 RNase 및/또는 DNase를 표적으로 한다.

[0379] 유용하다고 생각되면 여러 번의 용량을 사용한다. IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준에 대한 영향이 포유류에서 모니터된다. 상이한 치료 프로토콜 및 투여 경로(예를 들어, 근육내 투여 등)에 대해 유사한 연구를 수행한다. 혼성체 뉴클레아제 분자의 효능은 본원에 개시된 혼성체 뉴클레아제 분자로 치료된 포유류에서 IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준을 대조군 제제로 치료된 포유류와 비교함으로써 증명된다.

[0380] 한 예에서, 치료가 필요한 사람 대상이 선택되거나 확인된다. 이 대상은, 예를 들어 SLE의 원인이나 증상을 감소시킬 필요가 있을 수 있다. 대상의 확인은 임상 환경에서 일어날 수 있거나, 또는 예를 들어 자기 시험 키트를 자용함으로써 대상의 집에서 일어날 수 있다.

[0381] 시간 0에서 혼성체 뉴클레오티드 분자의 적합한 제1 용량을 대상에 투여한다. 혼성체 뉴클레아제 분자는 상기 설명된 대로 조제된다. 제1 용량 후 시간 기간 후에, 예를 들어 7일, 14일, 및 21일 후에, 예를 들어 IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준을 측정함으로써 대상의 상태를 평가한다. 다른 관련 기준이 또한 측정될 수 있다. 용량의 횟수 및 강도는 대상의 필요에 따라서 조정된다.

[0382] 치료 후에 대상의 IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준은 치료 전의 기존 수준에 비해서, 또는 유사한 상태를 겪지만 치료되지 않은/대조군 대상에서 측정된 수전에 비해서 저하되고 및/또는 개선된다.

[0383] 다른 예에서, 치료가 필요한 설치류 대상이 선택되거나 확인된다. 대상의 확인은 실험실 환경이나 어디서든 일어날 수 있다.

[0384] 시간 0에서 혼성체 뉴클레오티드 분자의 적합한 제1 용량을 대상에 투여한다. 혼성체 뉴클레아제 분자는 상기 설명된 대로 조제된다. 제1 용량 후 시간 기간 후에, 예를 들어 7일, 14일, 및 21일 후에, 예를 들어 IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준을 측정함으로써 대상의 상태를 평가한다. 다른 관련 기준이 또한 측정될 수 있다. 용량의 횟수 및 강도는 대상의 필요에 따라서 조정된다.

[0385] 치료 후에 대상의 IFN-알파 수준, IFN-알파 반응 유전자 수준, 자기항체 역가, 신장 기능 및 병리학, 및/또는 순환하는 면역 복합체 수준은 치료 전의 기존 수준에 비해서, 또는 유사한 상태를 겪지만 치료되지 않은/대조군 대상에서 측정된 수전에 비해서 저하되고 및/또는 개선된다.

[0386] 본 발명은 특히 바람직한 구체예 및 다양한 대안적인 구체예를 참조하여 도시되고 설명되었지만, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 그 안에서 형태 및 세부사항에 있어서 다양한 변화가 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다.

[0387] 본 명세서에서 인용된 모든 참고자료, 발행된 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해서 그 전체가 참고자료로 본원에 포함된다.

(하기 표 1 내지 표 19에서 SEQ ID NO:는 서열번호를 의미한다.)

표 1

SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
30	g4s4lnk	agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtgggag tggtggaggtggttctaccggtctcgag
31	G4S5-1	agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtggctc aggtggtggaggatctggaggaggtgggagtaccggtctcgag
32	G4S5-2	agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtggctc aggtggtggaggatctggaggaggtgggagtctcgag
33	3'hRNaseG88D	gtcgacggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagcgtgcaggatatc ccttccctgggcaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggac tcagacagttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgc cggaatatgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagccc ctggtagatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacggg cagggcaactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctg acaaacgactccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagaga cacatcattgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgct tctgtggaggactctacctaataatctaga
34	hDNase1-3'-G105R;A114F	gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaagtgataatctaga
35	hDNase1-3'-WT	gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccagccattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaatgataatctaga
36	hDNase1-3'A114F	gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc

표 2

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5'-3')
		gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttaga ggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatcc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaagtgataatctaga
37	hDNase1-5'-G105R;A114F	accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaagatctcgag
38	hDNase1-5'-WT	accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccagccattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaagatctcgag
39	hDNase1-5'-A114F	accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttga ggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaagatctcgag
40	hIgG1(SCC)	agatctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagc

표 3

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		acctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaagga caccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca taatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg caaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatga gctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccag cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagac cacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcac cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgca tgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctgtctccgggtaa atgataatctaga
41	hDNase1+VK3 LP	gttaagcttgccaccatggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactc tggctcccagataccaccggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacattt ggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctg agccgctatgacatcgccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgcc gtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactac gtggtcagtgagccactgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtg tacaggcctgaccaggtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgc gagccctgcgggaacgacaccttcaaccgagagccagccattgtcaggttcttc tcccggttcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccg ggggacgcagtagccgagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaa gagaaatggggcttggaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgc agctatgtgagaccctcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccacc ttccagtggctgatccccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgt gcctatgacaggatcgtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttccc gactcggctcttcccttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactg gcccaagccatcagtgaccactatccagtggaggtgatgctgaagtga
42	hDNase1L3	atgtcacgggagctggccccactgctgcttctcctcctctccatccacagcgcc ctggccatgaggatctgctccttcaacgtcaggtcctttggggaaagcaagcag gaagacaagaatgccatggatgtcattgtgaaggtcatcaaacgctgtgacatc atactcgtgatggaaatcaaggacagcaacaacaggatctgccccatactgatg gagaagctgaacagaaattcaaggagaggcataacatacaactatgtgattagc tctcggcttggaagaaacacatataaagaacaatatgcctttctctacaaggaa aagctggtgtctgtgaagaggagttatcactaccatgactatcaggatggagac gcagatgtgttttccagggagcccttgtggtctggttccaatctccccacact gctgtcaaagacttcgtgattatcccccctgcacaccaccccagagacatccgtt aaggagatcgatgagttggttgaggtctacacggacgtgaaacaccgctggaag gcggagaatttcattttcatgggtgacttcaatgccggctgcagctacgtcccc aagaaggcctggaagaacatccgcttgaggactgaccccaggtttgtttggctg atcggggaccaagaggacaccacggtgaagaagagcaccaactgtgcatatgac aggattgtgcttagaggacaagaaatcgtcagttctgttgttcccaagtcaaac agtgtttttgacttccagaaagcttacaagctgactgaagaggaggccctggat gtcagcgaccactttccagttgaatttaaactacagtcttcaagggccttcacc aacagcaaaaaatctgtcactctaaggaagaaaacaaagagcaaacgctcctag
43	human pancreatic ribonuclease	atgggtctggagaagtctcttgtccggctccttctgcttgtcctgatactgctg gtgctgggctgggtccagccttccctgggcaaggaatcccgggccaagaaattc cagcggcagcatatggactcagacagttcccccagcagcagctccacctactgt aaccaaatgatgaggcgccggaatatgacacaggggcggtgcaaaccagtgaac acctttgtgcacgagcccctggtagatgtccagaatgtctgtttccaggaaaag gtcacctgcaagaacgggcagggcaactgctacaagagcaactccagcatgcac atcacagactgccgcctgacaaacggctccaggtaccccaactgtgcataccgg

표 4

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5'-3')
		accagcccgaaggagagacacatcattgtggcctgtgaagggagcccatatgtg ccagtccactttgatgctactgtgtag
44	NLG linker	gtcgacggcgcggccgccagccccgtgaacgtgagcagccccagcgtgcaggat atc
45	g4s4lnk	ggggsggggsggggsggggs
46	G4S5-1	ggggsggggsggggsggggsggggs
47	G4S3	ggggsggggsggggs
48	hDNase1-3'-G105R;A114F	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrndt fnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk*
49	hDNase1-3'-WT	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgndt fnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk*
50	hDNase1-3'A114F	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgndt fnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk*
51	hDNase1-5'-G105R	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrndt fnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
52	hDNase1-5'-WT	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgndt fnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
53	hDNase1-5'-A114F	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgndt fnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
54	hIgG1(SCC)	lepkssdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk
55	hRNase-G88D-3'	kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltndsrypncayrtspkerhiiv acegspyvpvhfdasvedst*
56	human DNase1+VK3LP	metpaqllfllllwlpdttglkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydi alvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdq vsavdsyyyddgcepcgndtfnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwli

표 5

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		pdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk*
57	DNase1L3	msrelapllllllsihsalamricsfnvrsfgeskqedknamdvivkvikrcdiilvmeikdsnnricpilmeklnrnsrrgitynyvissrlgrntykeqyaflykeklvsvkrsyhyhdyqdgdadvfsrepfvvwfqsphtavkdfviiplhttpetsvkeidelvevytdvkhrwkaenfifmgdfnagcsyvpkkawknirlrtdprfvwligdqedttvkkstncaydrivlrgqeivssvvpksnsvfdfqkaykllteeealdvsdhfpvefklqssraftnskksvtlrkktkskrs*
58	human pancreatic ribonuclease (Uniprot P07998)	malekslvrllllvlillvlgwvqpslgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltngsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedst
59	Fc domain with SSS	cccaaatcttctgacaaaactcacacatctccaccgtctccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctgtctccgggtaaa
60	Fc domain with SSS	pkssdkthtsppspapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
61	RSLV125: huVK3LP-wthRNase-SSS-mthIgG1 P238S P331S	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcccgacaccaccggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagacagttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaatatgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggtagatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggcaactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaacggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatcattgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtggaggactctaccctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctct

표 6

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		ccgggaaaatga
62	RSLV125: huVK3LP-wthRNase-SSS-mthIgG1 P238S P331S	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtspp spapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk
63	RSLV126: huVK3LP-WThRNase-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctgga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggtctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactcctgggaggatcgtca gtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctctccgggaaaatga
64	RSLV126: huVK3LP-WThRNase-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstggggsggggsgggg sggggslepkssdkthtsppspapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcv vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvk gfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfs csvmhealhnhytqkslslspgk
65	RSLV127: huVK3LP-hDNase1 105/114-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-RNase	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc

표 7

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaagatctctccggaggaggtggctca ggtggtggaggatctggaggaggtgggagtggtggaggttctaccggtctcgag cccaaatcttctgacaaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaagtcgacgga gctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatgcaggatatcccttccctg ggcaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagacagt tcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaatatg acacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggtagat gtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggcaag tggtacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaacggc tccaggtaccccaactgtgcataccgaaccagcccgaaggagagacacatcatt gtggcctgtgaaggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttgctgtggag gactctacctaa
66	RSLV127: huVK3LP-hDNase1 105/114-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-RNase	metpaqllfllllwlpdttglkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydi alvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdq vsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwli pdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqais dhypvevmlkggggsggggsggggsggggslepkssdkthtsppspapellggs svflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr eeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkvdgassp vnvsspsvqdikesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpv ntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltngsrypncay rtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedst
67	RSLV128: huVK3LP-hRNase WT-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNase 105/114	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctgga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggtctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactcctgggaggatcgtca gtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag

표 8

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctctccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtg aacgtgagcagccccagaatgcaggatatcctgaagatcgcagccttcaacatc cagacatttggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtg cagatcctgagccgctatgacatcgccctggtccaggaggtcagagacagccac ctgactgccgtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacc tatcactacgtggtcagtgagccactgggacggaacagctataaggagcgctac ctgttcgtgtacaggcctgaccaggtgtctgcggtggacagctactactacgat gatggctgcgagccctgcaggaacgacaccttcaaccgagagccattcattgtc aggttcttctcccggttcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcat gcggccccgggggacgcagtagccgagatcgacgctctctatgacgtctacctg gatgtccaagagaaatggggcttggaggacgtcatgttgatgggcgacttcaat gcgggctgcagctatgtgagaccctcccagtggtcatccatccgcctgtggaca agccccaccttccagtggctgatccccgacagcgctgacaccacagctacaccc acgcactgtgcctatgacaggatcgtggttgcagggatgctgctccgaggcgcc gttgttccgactcggctcttccctttaacttccaggctgcctatggcctgagt gaccaactggcccaagccatcagtgaccactatccagtggaggtgatgctgaaa tga
68	RSLV128: huVK3LP-hRNase WT-(g4s)4-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNase 105/114	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstggggsggggsgggg sggggslepkssdkthtsppspapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcv vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvk gfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfs csvmhealhnhytqkslslspgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfge tkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvv seplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsr ftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsy vrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpds alpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
69	RSLV129: huVK3LP-hRNAseWT-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcccgacacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatctccaccg agcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagtcttcctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc

표 9

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5'-3')
		tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctctct ccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatg caggatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaag atgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgac atcgccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctg ctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgag ccactgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgac caggtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcagg aacgacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcaca gaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagta gccgagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggc ttggaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgaga ccctcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctg atccccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacagg atcgtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctctt ccctttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatc agtgaccactatccagtggaggtgatgctgaaatga
70	RSLV129: huVK3LP-hRNAseWT-SSS-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtspp spapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsryd ialvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdav aeidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwl ipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqai sdhypvevmlk
71	Fc domain with P238S-2 (SCC hinge)	cccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcccctatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaa
72	Fc domain with P238S-2 (SCC	lepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk

표 10

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	hinge)	
73	Fc domain with P331S-2	cccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaa
74	Fc domain with P331S-2	lepkssdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk
75	Fc domain with SSS, P238S, and P331S-2	cccaaatcttctgacaaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaa
76	Fc domain with SSS, P238S, and P331S-2	lepkssdkthtsppspapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk
77	RSLV125-2: huVK3LP-wthRNase-SCC-mthIgG1 P238S P331S	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcccgacacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccg tgcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagtcttcctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc

표 11

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5'-3')
		tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctcct ccgggaaaatga
78	RSLV125-2: huVK3LP-wthRNase-SCC-mthIgG1 P238S P331S	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtcknggqncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk
79	RSLV126-2: huVK3LP-WThRNase-(g4s)4-SCC-mthIgG1-P238S-P331S	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctgga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggtctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactcctgggaggatcgtca gtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctccgggaaaatga
80	RSLV126-2: huVK3LP-WThRNase-(g4s)4-SCC-mthIgG1-P238S-P331S	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtcknggqncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstggggsggggsgggg sggggslepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcv vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvk gfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfs csvmhealhnhytqkslslspgk
81	RSLV127-2: huVK3LP-hDNase1 105/114-(g4s)4-SCC-mthIgG1-	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac

표 12

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	P238S-P331S-NLG-RNase	gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctgatc cccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc tttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtggaggtgatgctgaaagatctctccggaggaggtggctca ggtggtggaggatctggaggaggtgggagtggtggaggttctaccggtctcgag cccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaagtcgacgga gctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatgcaggatatcccttccctg ggcaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagacagt tcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaatatg acacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggtagat gtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggcaag tggtacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaacggc tccaggtaccccaactgtgcataccgaaccagcccgaaggagagacacatcatt gtggcctgtgaaggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttgctgtggag gactctacctaa
82	RSLV127-2: huVK3LP-hDNase1 105/114-(g4s)4-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-RNase	metpaqllflllwlpdttglkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydi alvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdq vsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwli pdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqais dhypvevmlkggggsggggsggggsggggslepkssdkthtcppcpapellggs svflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr eeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkvdgassp vnvsspsvqdikesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpv ntfvheplvdvqnvcfqekvtcknggqncyksnssmhitdcrltngsrypncay rtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedst
83	RSLV128-2: huVK3LP-hRNase WT-(g4s)4-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-	atggaaaccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagatacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg

표 13

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	hDNase 105/114	gaggactctacagatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctgga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggtctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactcctgggaggatcgtca gtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctctccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtg aacgtgagcagccccagaatgcaggatatcctgaagatcgcagccttcaacatc cagacatttggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtg cagatcctgagccgctatgacatcgccctggtccaggaggtcagagacagccac ctgactgccgtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacc tatcactacgtggtcagtgagccactgggacggaacagctataaggagcgctac ctgttcgtgtacaggcctgaccaggtgtctgcggtggacagctactactacgat gatggctgcgagccctgcaggaacgacaccttcaaccgagagccattcattgtc aggttcttctcccggttcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcat gcggccccgggggacgcagtagccgagatcgacgctctctatgacgtctacctg gatgtccaagagaaatggggcttggaggacgtcatgttgatgggcgacttcaat gcgggctgcagctatgtgagaccctcccagtggtcatccatccgcctgtggaca agccccaccttccagtggctgatccccgacagcgctgacaccacagctacaccc acgcactgtgcctatgacaggatcgtggttgcagggatgctgctccgaggcgcc gttgttcccgactcggctcttccctttaacttccaggctgcctatggcctgagt gaccaactggcccaagccatcagtgaccactatccagtggaggtgatgctgaaa tga
84	RSLV128-2: huVK3LP-hRNase WT-(g4s)4-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNase 105/114	metpaqllflllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtcknggqncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstggggsggggsgggg sggggslepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcv vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvk gfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfs csvmhealhnhytqkslslspgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfge tkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvv seplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsr ftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsy vrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpds alpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
85	RSLV129-2: huVK3LP-hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcccgacacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttcccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacaggggcggtgcaaaccagtgaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtccactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccg

표 14

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	105/114	tgcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagtcttcctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctcct ccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatg caggatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaag atgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgac atcgccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctg ctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgag ccactgggacggaacagctataaggagcgctacctgttcgtgtacaggcctgac caggtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcagg aacgacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcaca gaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagta gccgagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggc ttggaggacgtcatgttgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgaga ccctcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggctg atccccgacagcgctgacaccacagctacacccacgcactgtgcctatgacagg atcgtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctctt ccctttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatc agtgaccactatccagtggaggtgatgctgaaatga
86	RSLV129-2: huVK3LP-hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsryd ialvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdav aeidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwl ipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqai sdhypvevmlk
87	Fc domain with SCC	cccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgtccagcacctgaactc ctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg

표 15

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		cacaaccactacacgcagaagagcctctctctgtctccgggtaaa
88	Fc domain with SCC	lepkssdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk
89	Fc domain with SCC, P238S, and P331S-2	cccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttctttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctccgggaaaa
90	Fc domain with SCC, P238S, and P331S-2	lepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhe alhnhytqkslslspgk
91	RSLV132: huVK3LP-wthRNase-SCC-mthIgG1 P238S P331S	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcctgacacc accggcaaagagtcccgggccaagaagttccagcggcagcacatggactccgac tccagcccttccagctcctccacctactgcaaccagatgatgcggcggagaaac atgacccagggccggtgcaagcccgtgaacacctttgtgcacgagcccctggtg gacgtgcagaacgtgtgttttcaagagaaagtgacctgcaagaacggccagggc aactgctacaagtccaactcctccatgcacatcaccgactgccggctgaccaac ggctccagataccccaactgcgcctaccggacctcccccaaagaacggcacatc atcgtggcctgcgagggctctccttacgtgcccgtgcacttcgacgcctccgtg gaagattccaccctggaacccaagtcctccgacaagacccacacctgtccccct tgtcctgcccctgaactgctgggcggctcctccgtgttcctgttcccccaaag cccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacatgcgtggtggtg gatgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggggtg gaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctac cgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggaaaagag tacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcccgcctccatcgaaaagaccatc tccaaggccaagggccagccccgggaaccccaggtgtacacactgcccctagc agggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggcttc tacccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaac tacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctcattcttcctgtactcc aagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctcc gtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagc cccggcaaatga
92	RSLV132: huVK3LP-wthRNase-SCC-mthIgG1 P238S P331S	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls

표 16

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		pgk
93	RSLV133: huVK3LP-hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	atggaaacccctgcccagctgctgttcctgctgctgctgtggctgcccgacacc accggcaaagagagccgggccaagaagttccagcggcagcacatggacagcgac agcagccccagcagctccagcacctactgcaaccagatgatgcggcggagaaac atgacccagggccggtgcaagcccgtgaacaccttcgtgcacgagcccctggtg gacgtgcagaacgtgtgttttcaagaaaaagtgacctgcaagaacggccagggc aactgctacaagagcaacagcagcatgcacatcaccgactgccggctgaccaac ggcagcagataccccaactgcgcctaccggaccagccccaaagaacggcacatc atcgtggcctgcgagggcagcccttacgtgcccgtgcactttgacgccagcgtg gaagatagcaccctggaacccaagagcagcgacaagacccacacctgtcccccc tgccctgcccctgagctgctgggcggaagcagcgtgttcctgttcccccaaag cccaaggacaccctgatgatcagccggaccccgaagtgacctgcgtggtggtg gatgtgtcccacgaggaccccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtg gaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctac cgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagag tacaagtgcaaggtctccaacaaggccctgcccgccagcatcgagaaaaccatc agcaaggccaagggccagcctcgcgagccccaggtgtacacactgccccccagc cgggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaaaggcttc taccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaac tacaagaccaccccccctgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagc aagctgaccgtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagc gtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagc cccggcaaggtggacggcgccagctcccctgtgaacgtgtccagccccagcgtg caggacatcctgaagatcgccgccttcaacatccagaccttcggcgagacaaag atgagcaacgccaccctggtgtcctacatcgtgcagatcctgagcagatacgat atcgccctggtgcaagaagtgcgggacagccacctgaccgccgtgggcaagctg ctggacaacctgaaccaggacgccccgacacctaccactacgtggtgtccgag cctctgggccggaacagctacaaagaaagatacctgttcgtgtaccggcccgat caggtgtccgccgtggacagctactactacgacgacggctgcgagccctgccgg aacgacaccttcaaccgcgagcccttcatcgtgcggttcttcagccggttcacc gaagtgcgcgagttcgccatcgtgcccctgcatgctgcccctggcgacgccgtg gccgagatcgatgccctgtacgacgtgtacctggatgtgcaagaaaagtggggc ctggaagatgtgatgctgatgggcgacttcaacgccggctgcagctacgtgcgg cccagccagtggtccagcatcagactgtggacctcccccaccttccagtggctg atccccgacagcgccgataccaccgccacccccacccactgtgcctacgacaga atcgtggtggccggcatgctgctgagaggcgccgtggtgcctgacagcgccctg ccattcaattttcaagccgcctacggcctgagcgatcagctggcccaggccatc agcgaccactaccccgtggaagtgatgctgaagtga
94	RSLV133: huVK3LP-hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsryd ialvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdav aeidalydvyldvqekwgledvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwl ipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqai sdhypvevmlk
95	RSLV132: wthRNase-	aaagagtcccgggccaagaagttccagcggcagcacatggactccgactccagc ccttccagctcctccacctactgcaaccagatgatgcggcggagaaacatgacc

표 17

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	SCC-mthIgG1 P238S P331S	cagggccggtgcaagcccgtgaacacctttgtgcacgagcccctggtggacgtg cagaacgtgtgttttcaagagaaagtgacctgcaagaacggccagggcaactgc tacaagtccaactcctccatgcacatcaccgactgccggctgaccaacggctcc agataccccaactgcgcctaccggacctcccccaaagaacggcacatcatcgtg gcctgcgagggctctccttacgtgcccgtgcacttcgacgcctccgtggaagat tccaccctggaacccaagtcctccgacaagacccacacctgtccccccttgtcct gcccctgaactgctgggcggctcctccgtgttcctgttcccccaaagcccaag gacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacatgcgtggtggtggatgtg tcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggggtggaagtg cacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtg gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggaaaagagtacaag tgcaaggtgtccaacaaggccctgcccgcctccatcgaaaagaccatctccaag gccaagggccagccccgggaaccccaggtgtacacactgccccctagcagggac gagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggcttctacccc tccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaag accacccccccctgtgctggacagcgacggctcattcttcctgtactccaagctg acagtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatg cacgaggctctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggc aaatga
96	RSLV132: wthRNase-SCC-mthIgG1 P238S P331S	kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtcknggncyksnssmhitdcrltngsrypncayrtspkerhiiv acegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrd eltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskl tvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
97	RSLV133: hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	aaagagagccgggccaagaagttccagcggcagcacatggacagcgacagcagc cccagcagctccagcacctactgcaaccagatgatgcggcggagaaacatgacc cagggccggtgcaagcccgtgaacaccttcgtgcacgagcccctggtggacgtg cagaacgtgtgttttcaagaaaaagtgacctgcaagaacggccagggcaactgc tacaagagcaacagcagcatgcacatcaccgactgccggctgaccaacggcagc agataccccaactgcgcctaccggaccagccccaaagaacggcacatcatcgtg gcctgcgagggcagcccttacgtgcccgtgcactttgacgccagcgtggaagat agcaccctggaacccaagagcagcgacaagacccacacctgtccccctgccct gcccctgagctgctgggcggaagcagcgtgttcctgttcccccaaagcccaag gacaccctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtg tcccacgaggaccccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtg cacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtg gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaag tgcaaggtctccaacaaggccctgcccgccagcatcgagaaaaccatcagcaag gccaagggccagcctcgcgagccccaggtgtacacactgcccccagccgggac gagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaaaggcttctacccc agcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaag accacccccccctgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctg accgtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatg cacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggc aaggtggacggcgccagctcccctgtgaacgtgtccagccccagcgtgcaggac atcctgaagatcgccgccttcaacatccagaccttcggcgagacaaagatgagc aacgccaccctggtgtcctacatcgtgcagatcctgagcagatacgatatcgcc ctggtgcaagaagtgcgggacagccacctgaccgccgtgggcaagctgctggac aacctgaaccaggacgcccccgacacctaccactacgtggtgtccgagcctctg ggccggaacagctacaaagaaagatacctgttcgtgtaccggcccgatcaggtg tccgccgtggacagctactactacgacgacggctgcgagccctgccggaacgac

표 18

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
		accttcaaccgcgagcccttcatcgtgcggttcttcagccggttcaccgaagtg cgcgagttcgccatcgtgcccctgcatgctgcccctggcgacgccgtggccgag atcgatgccctgtacgacgtgtacctggatgtgcaagaaaagtggggcctggaa gatgtgatgctgatgggcgacttcaacgccggctgcagctacgtgcggcccagc ccagtggtccagcatcagactgtggacctcccccaccttccagtggctgatcccc gacagcgccgataccaccgccacccccacccactgtgcctacgacagaatcgtg gtggccggcatgctgctgagaggcgccgtggtgcctgacagcgccctgccattc aattttcaagccgcctacggcctgagcgatcagctggcccaggccatcagcgac cactaccccgtggaagtgatgctgaagtga
98	RSLV133: hRNAseWT-SCC-mthIgG1-P238S-P331S-NLG-hDNAse 105/114	kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltngsrypncayrtspkerhiiv acegspyvpvhfdasvedstlepkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvytlppsrd eltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskl tvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkvdgasspvnvsspsvqd ilkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklld nlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrnd tfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgle dvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydriv vagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
99	NLGlnk2	vdgasspvnvsspsvqdi
100	VK3LP leader	metpaqllfllllwlpdttg
101	hRNaseWT (mature) UniProt P07998)	kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrltngsrypncayrtspkerhiiv acegspyvpvhfdasvedst
102	hDNase 1 (mature) UniProt P24855	lkiaafniqtfgetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgklldn lnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgndt fnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvyldvqekwgled vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhypvevmlk
103	hDNase 1L3 (mature) UniProt Q13609	mricsfnvrsfgeskqedknamdvivkvikrcdiilvmeikdsnnricpilmek lnrnsrrgitynyvissrlgrntykeqyaflykeklvsvkrsyhyhdyqdgdad vfsrepfvvwfqsphtavkdfviiplhttpetsvkeidelvevytdvkhrwkae nfifmgdfnagcsyvpkkawknirlrtdprfvwligdqedttvkkstncaydri vlrgqeivssvvpksnsvfdfqkayklteeealdvsdhfpvefklqssraftns kksvtlrkktkskrs
104	hTREX1	mgpgarrqgrivqgrpemcfcppptplpplriltlgthtptpcsspgsaagtyp tmgsqalppgpmqtliffdmeatglpfsqpkvtelcllavhrcalespptsqgp pptvpppprvvdklslcvapgkacspaaseitglstavlaahgrqcfddnlanl llaflrrqpqpwclvahngdrydfpllqaelamlgltsaldgafcvdsitalka lerasspsehgprksyslgsiytrlygqsppdshtaegdvlallsicqwrpqal lrwvdaharpfgtirpmygvtasartkprpsavtttahlattrntspslgesrg tkdlppvkdpgalsreglaplgllailtlavatlyglslatpge
105	hTREX1 (C-terminal 72 aa	mgpgarrqgrivqgrpemcfcppptplpplriltlgthtptpcsspgsaagtyp tmgsqalppgpmqtliffdmeatglpfsqpkvtelcllavhrcalespptsqgp pptvpppprvvdklslcvapgkacspaaseitglstavlaahgrqcfddnlanl

표 19

표 1		
SEQ ID NO:	설명	서열 (뉴클레오티드 서열 5' -3')
	truncated)	llaflrrqpqpwclvahngdrydfpllqaelamlgltsaldgafcvdsitalka lerasspsehgprksyslgsiytrlygqsppdshtaegdvlallsicqwrpqal lrwvdaharpfgtirpmygvtasartk
106	RSLV-124 hVK3LP-hRNase(WT)-hIgG1 WT	metpaqllfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrr nmtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrl tngsrypncayrtspkerhiivacegspyvpvhfdasvedstlepkssdktht cppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpap iektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesn gqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhyt qkslslspgk
107	NLGlnk	vdgasspvnvsspsvqdi

[0388] 삭제

[0389] 삭제

[0390] 삭제

[0391] 삭제

[0392] 삭제

[0393] 삭제

[0394] 삭제

[0395] 삭제

[0396] 삭제

[0397] 삭제

[0398] 삭제

[0399] 삭제

[0400] 삭제

[0401] 삭제

[0402] 삭제

[0403] 삭제

[0404] 삭제

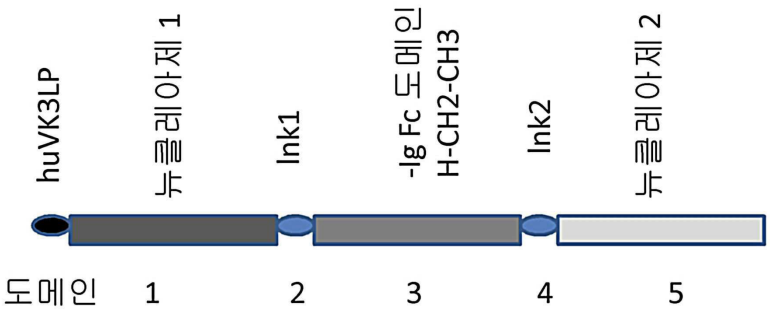
[0405] 삭제

[0406] 삭제

도면

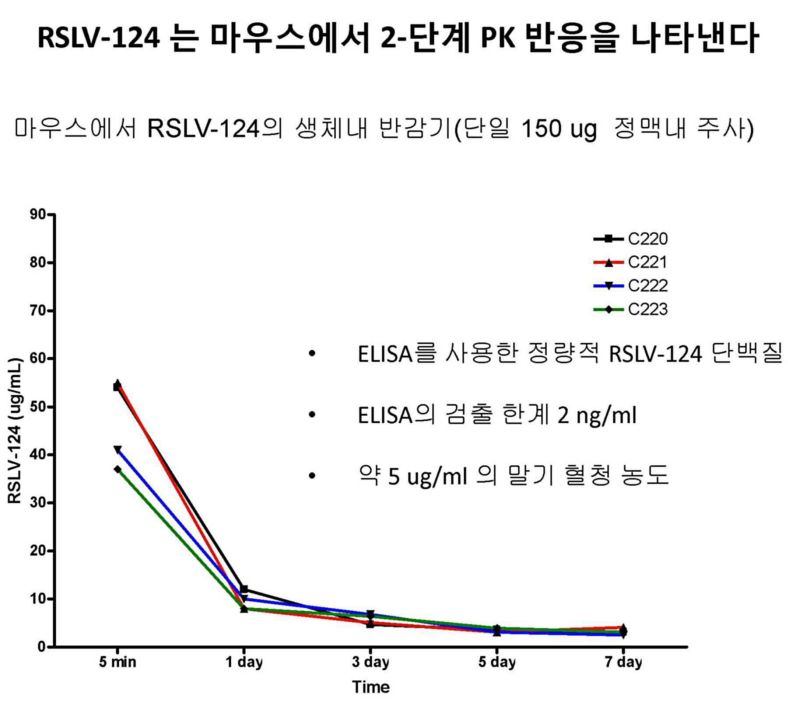
도면1

혼성체 뉴클레아제 **Fc** 융합 단백질을 조작하는 일반적인 접근법을 나타내는 도해

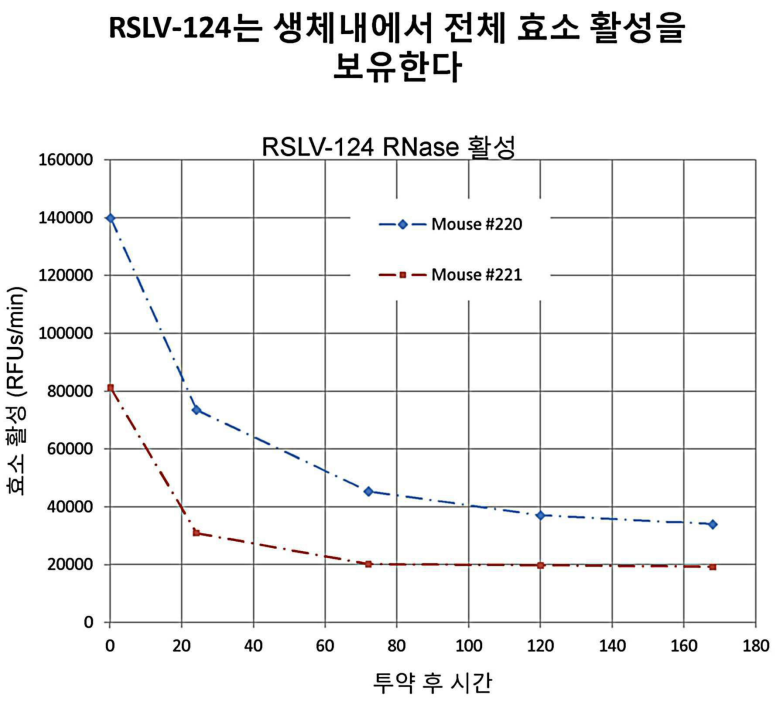


뉴클레아제 1 or 2	lnk 1 or 2	IgGFc
hRNase-WT	(gly4ser)3	SCCH-hIgG1WT
hRNase-G88D	(gly4ser)4	SCCH-hIgG1WT
hDNase1 WT	(gly4ser)5	hIgG1-P238S
hDNAse1-A114F	NLG	hIgG1-N297S
hDNase1-G105R;A114F	없음	hIgG1-P331S
hDNase1-G105R	(gly4ser)n	mIgG2a-WT
hTREX1-72AA		mIgG2c-WT
hDNase1L3		mIgG2A-C WT 또는 MT
hTREX1-lnk-hTREX1		

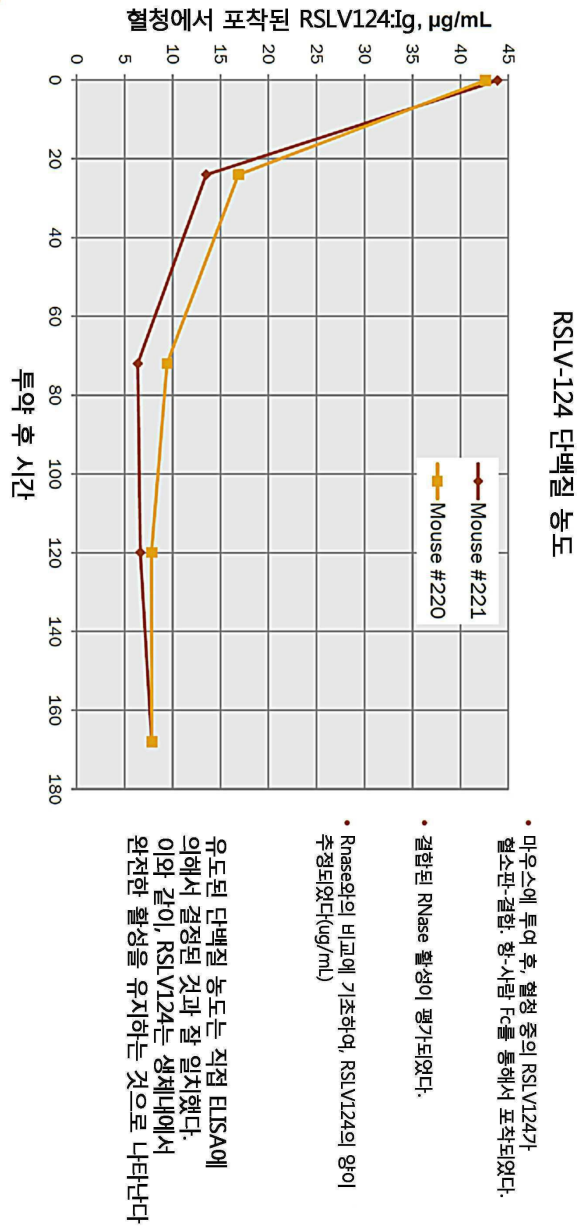
도면2


RSLV-124는 마우스에서 2-단계 PK 반응을 나타낸다
마우스에서 RSLV-124의 생체내 반감기(단일 150 ug 정맥내 주사)
C220
C221
C222
C223
ELISA를 사용한 정량적 RSLV-124 단백질
ELISA의 검출 한계 2 ng/ml
약 5 ug/ml 의 말기 혈청 농도
RSLV-124 (ug/mL)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5 min
1 day
3 day
5 day
7 day
Time

도면3

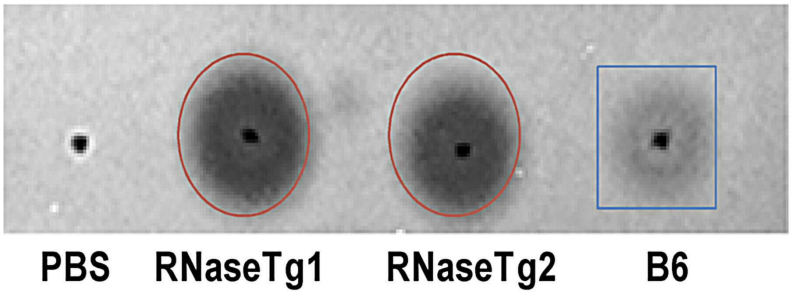

RSLV-124는 생체내에서 전체 효소 활성을 보유한다
RSLV-124 RNase 활성
Mouse #220
Mouse #221
효소 활성 (RFUs/min)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
투약 후 시간

도면4



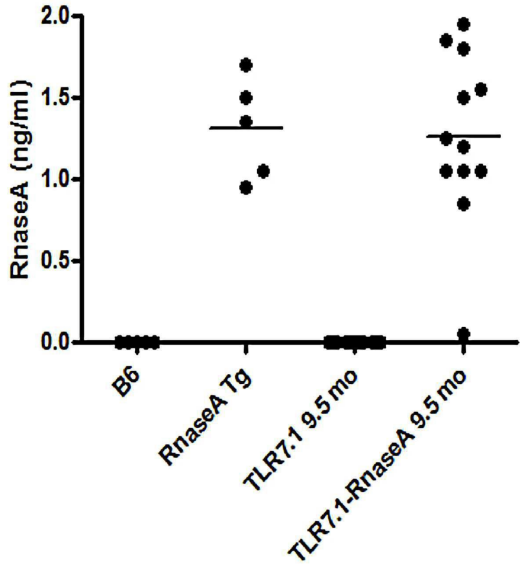
도면5

RNase Tg. 마우스에서 **RNase** 효소 활성의 **SRED** 분석



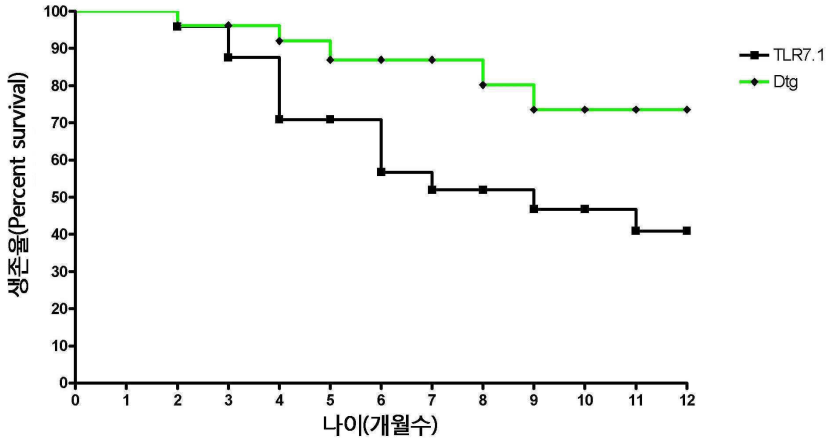
도면6

RNase Tg. 마우스에서 혈청 **RNase** 수준의 **ELISA** 정량



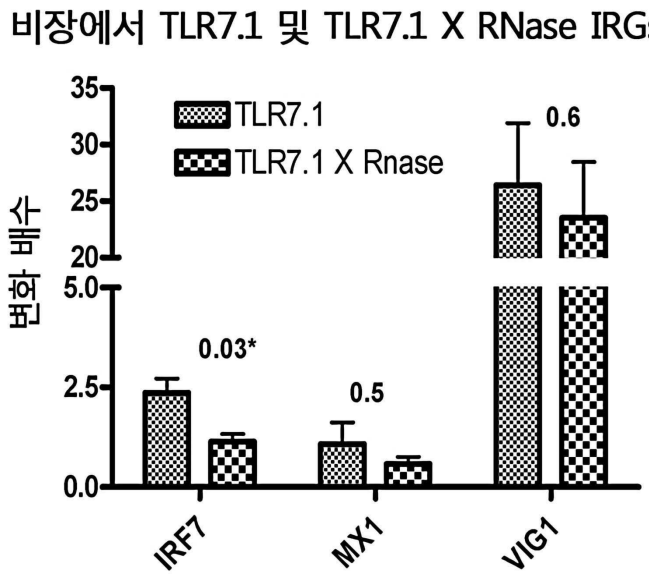
도면7

RNase 발현은 **TLR7** 마우스에서 사망률을 감소시킨다



도면8

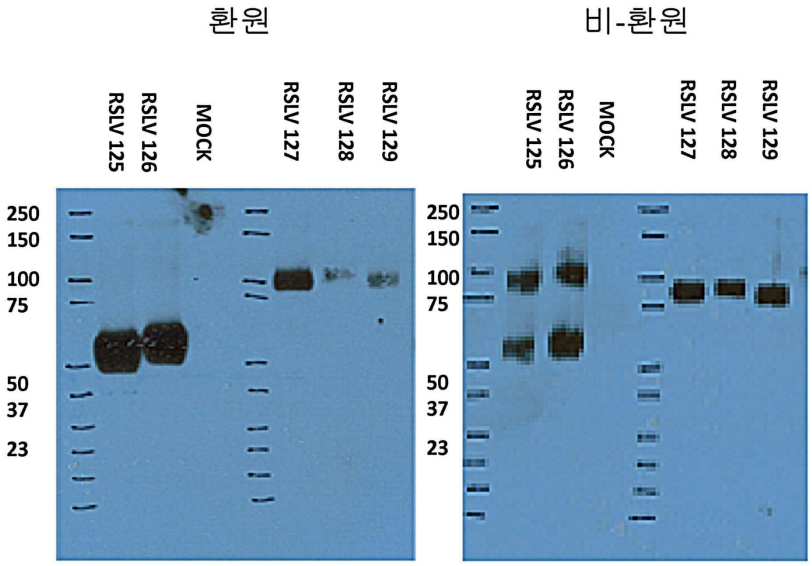
이중 트랜스제닉 마우스에서 인터페론 자극된 유전자(ISG's)의 감소



18s 기준 유전자. 모두 연령 일치된 B6 마우스와 비교
N = 5 마우스/그룹*p<0.05

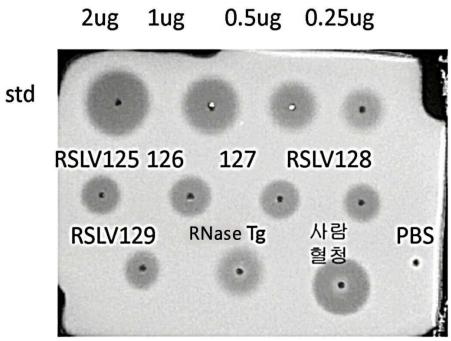
도면9

COS 세포에서 뉴클레아제 Fc 융합 단백질의 일시적 발현



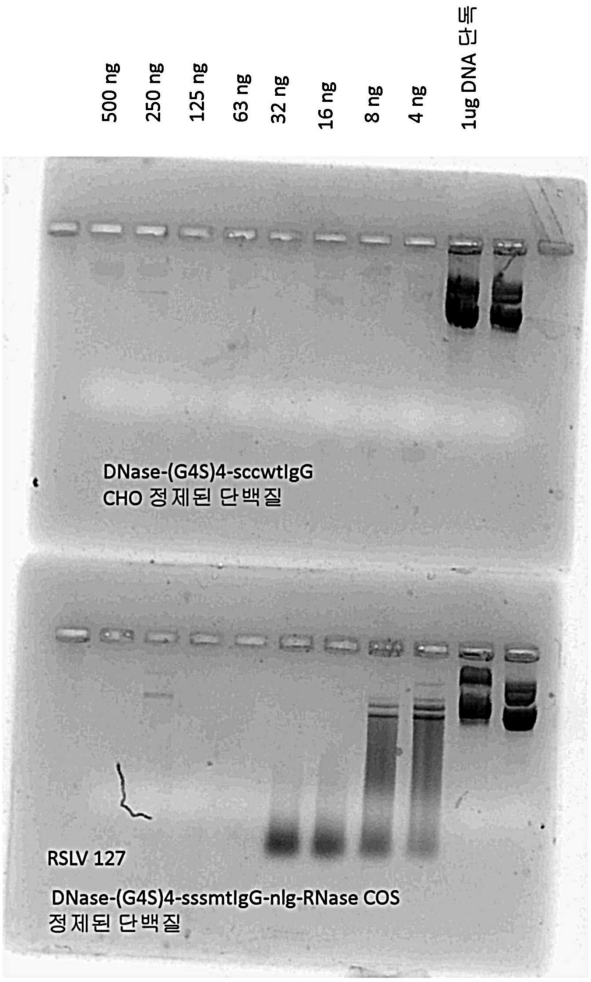
도면10

SRED 분석을 사용한 단백질-A 정제된 뉴클레아제 Fc 융합 단백질의 RNase 효소 활성

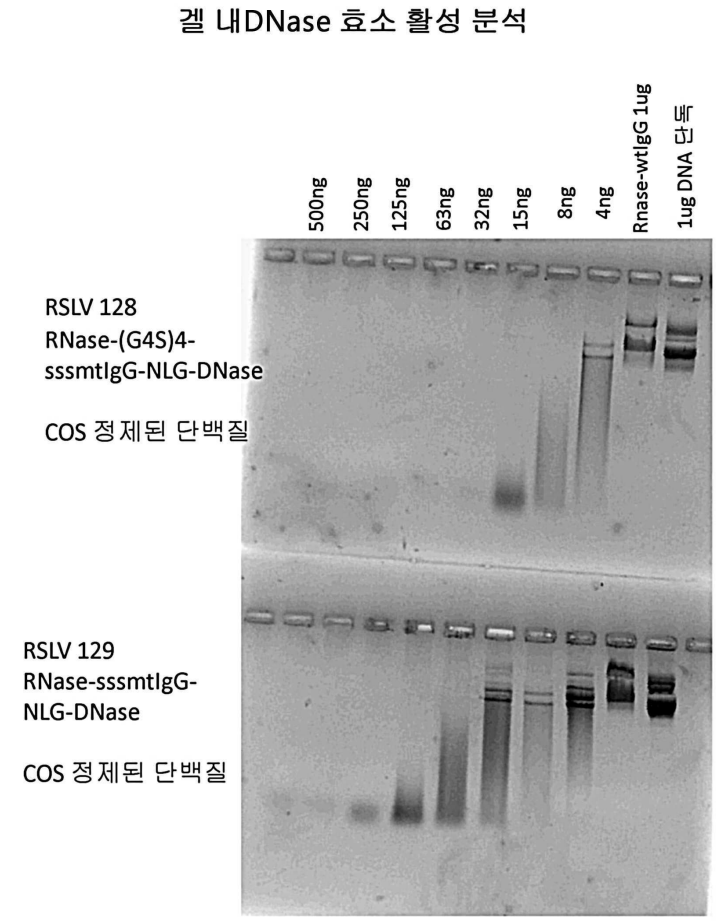


도면11a

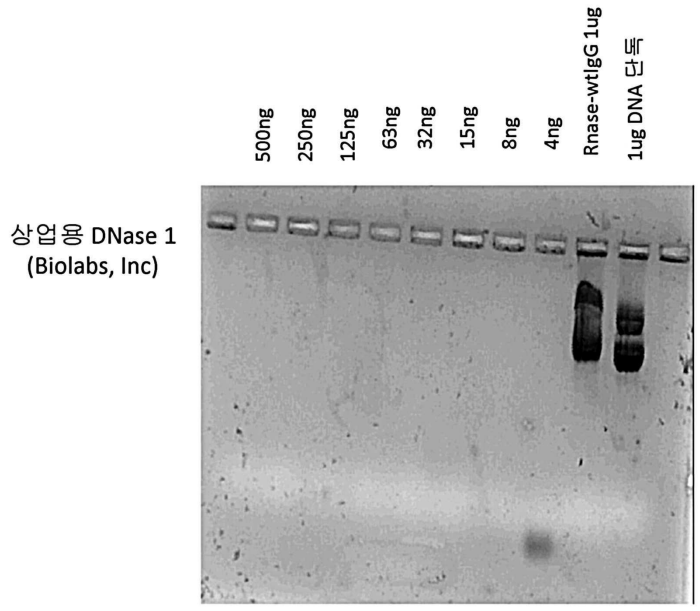
겔 내 DNase 효소 활성 분석



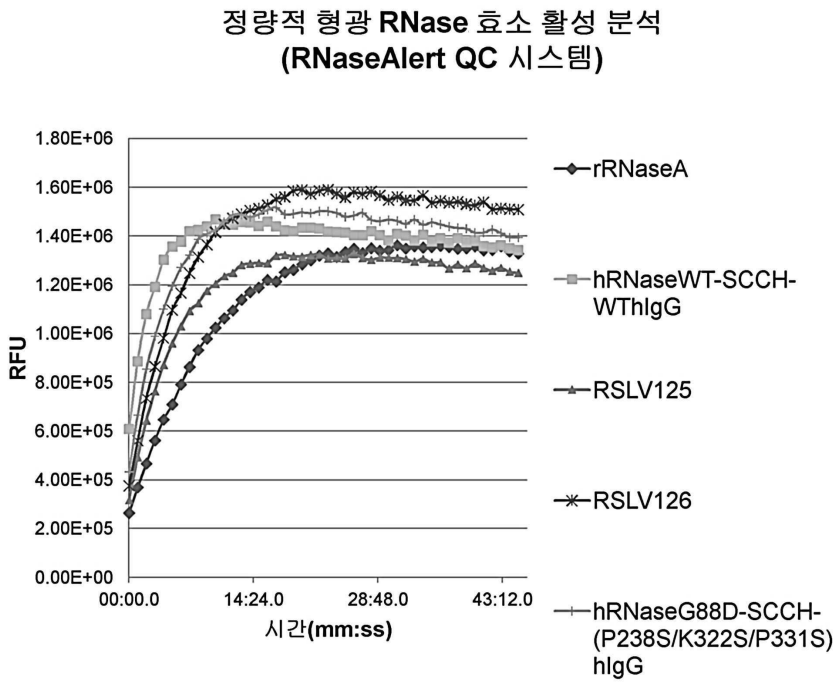
도면11b


겔 내DNase 효소 활성 분석
500ng
250ng
125ng
63ng
32ng
15ng
8ng
4ng
Rnase-wtIgG 1ug
1ug DNA 단독
RSLV 128
RNase-(G4S)4-
sssmtIgG-NLG-DNase
COS 정제된 단백질
RSLV 129
RNase-sssmtIgG-
NLG-DNase
COS 정제된 단백질

도면11c


겔 내 DNase 효소 활성 분석
500ng
250ng
125ng
63ng
32ng
15ng
8ng
4ng
Rnase-wtIgG 1ug
1ug DNA 단독
상업용 DNase 1
(Biolabs, Inc)

도면12

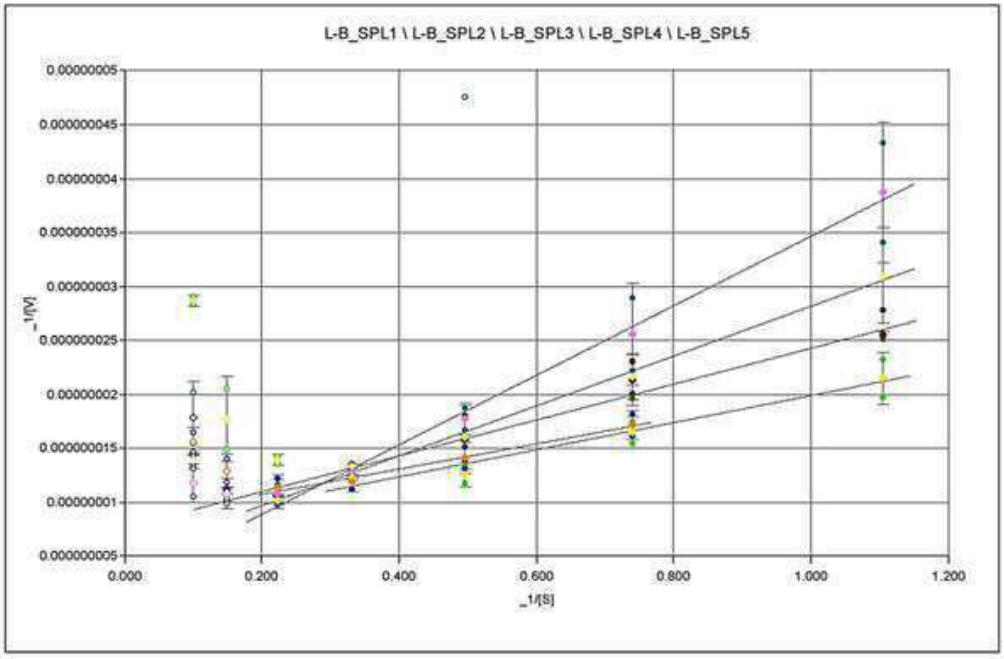

정량적 형광 RNase 효소 활성 분석
(RNaseAlert QC 시스템)
1.80E+06
1.60E+06
1.40E+06
1.20E+06
1.00E+06
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
RFU
00:00.0
14:24.0
28:48.0
43:12.0
시간(mm:ss)
rRNaseA
hRNaseWT-SCCH-WThIgG
RSLV125
RSLV126
hRNaseG88D-SCCH-(P238S/K322S/P331S) hIgG

도면13

RNase Fc 융합 단백질의 RNase 활성의 효소 동력학 분석

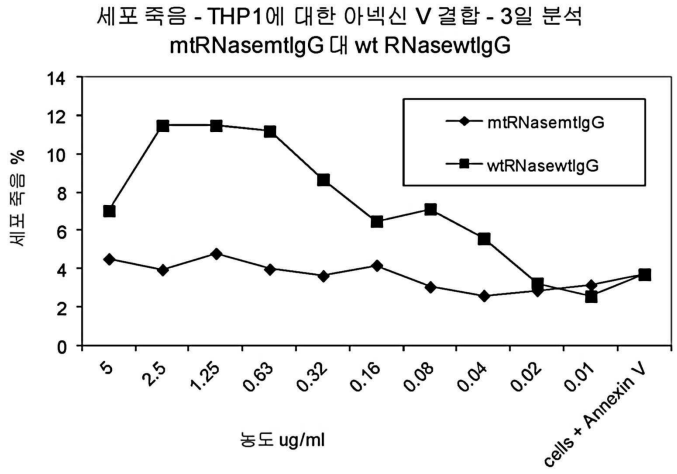
L-B 피팅 결과

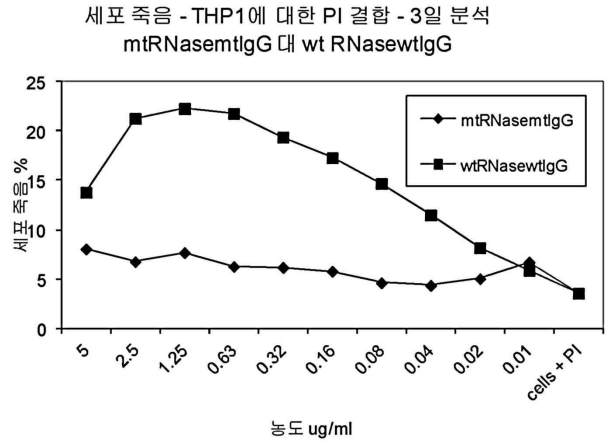
곡선명	웰 ID	곡선식	A	B	R2	Vmax	Km
L-B_SPL1	rRNaseA	Y=A*X+B	1.17E-08	8.41E-09	0.988	1.2E+08	1.3912
L-B_SPL2	hRNaseWT-SCCH-WTIgG	Y=A*X+B	1.26E-08	7.34E-09	0.966	1.4E+08	1.71662
L-B_SPL3	RSLV125	Y=A*X+B	3.22E-08	2.45E-09	0.994	4.1E+08	13.1429
L-B_SPL4	RSLV126	Y=A*X+B	2.31E-08	5.08E-09	0.996	2E+08	4.54724
L-B_SPL5	hRNaseG88D-SCCH-TMIgG	Y=A*X+B	1.66E-08	7.66E-09	0.975	1.3E+08	2.1671



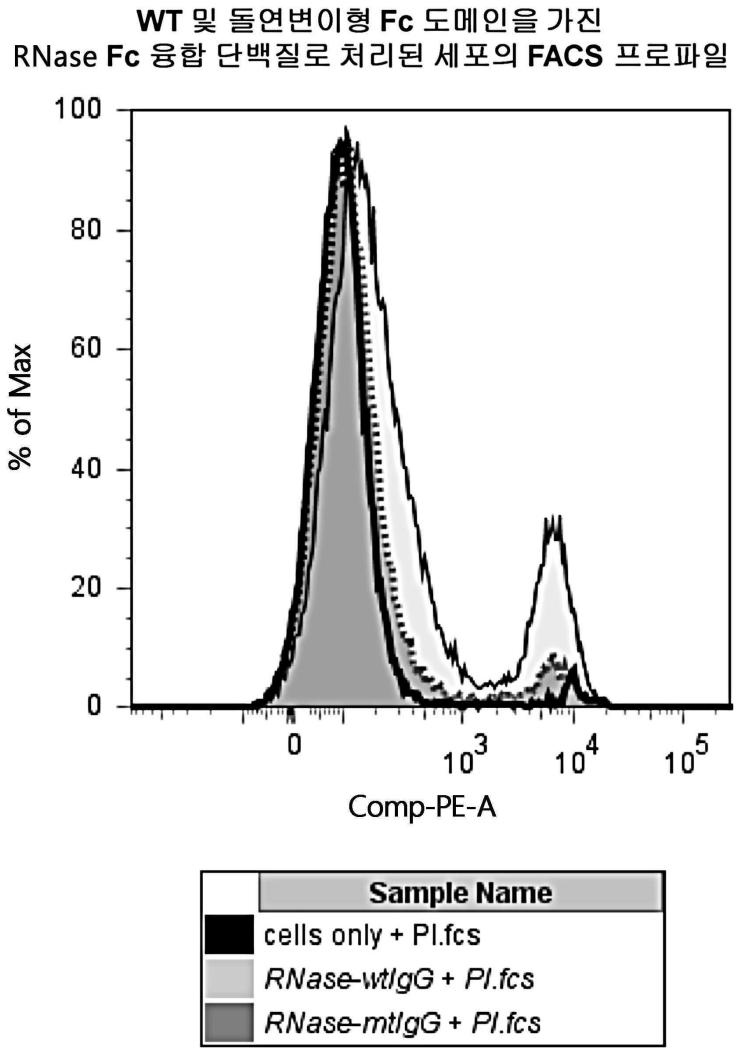
도면14

야생형 및 돌연변이형 Fc 도메인을 가진 RNase Fc 융합 단백질로 처리된 THP1 세포에서 세포독성 분석





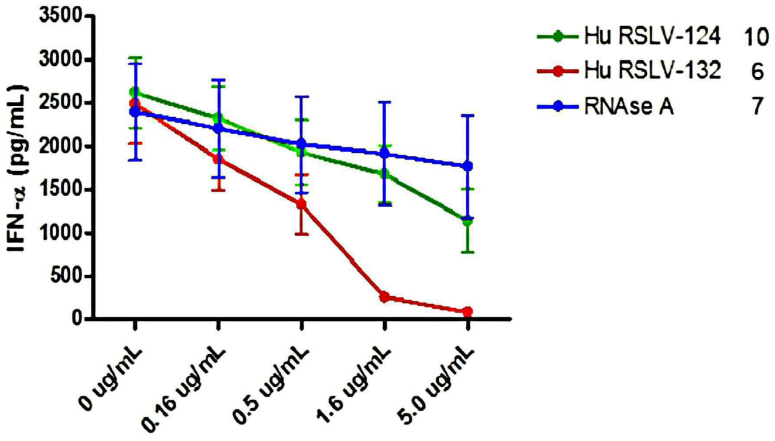
도면15


WT 및 돌연변이형 Fc 도메인을 가진
RNase Fc 융합 단백질로 처리된 세포의 FACS 프로파일
100
80
60
40
20
0
% of Max
0
10^3
10^4
10^5
Comp-PE-A
Sample Name
cells only + PI.fcs
RNase-wtIgG + PI.fcs
RNase-mtIgG + PI.fcs

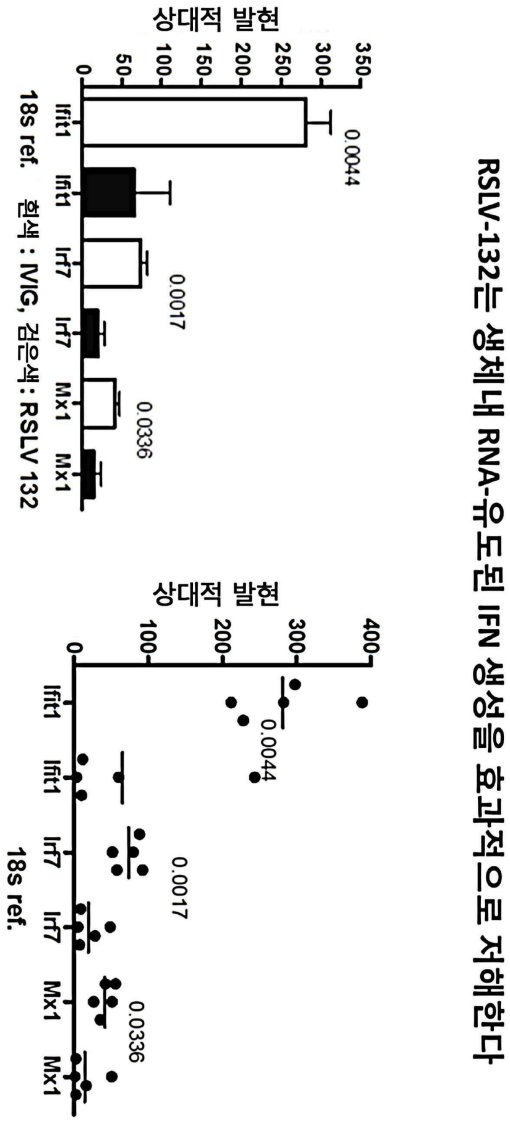
도면16

RSLV-132는 SLE 환자 IC에 의해서 유도되는 IFN 생성을 효능 있게 저해한다

IC IFN-α의 RSLV 저해

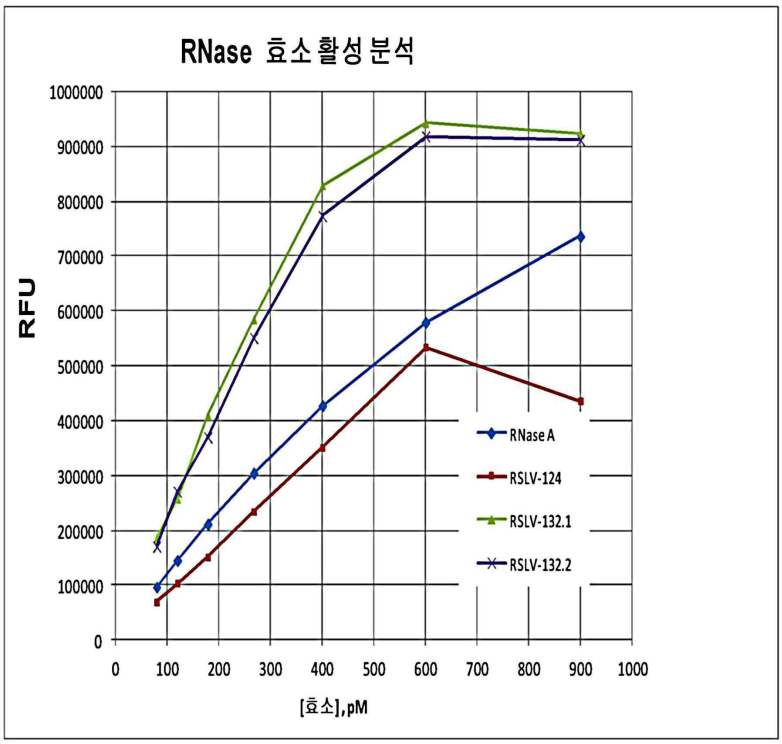


도면17


RSLV-132는 생체내 RNA-유도된 IFN 생성을 효과적으로 저해한다
상대적 발현
0
50
100
150
200
250
300
350
0.0044
0.0017
0.0336
Ifit1
Ifit1
Irf7
Irf7
Mx1
Mx1
18s ref. 흰색 : IVIG, 검은색 : RSLV 132
상대적 발현
0
100
200
300
400
0.0044
0.0017
0.0336
Ifit1
Ifit1
Irf7
Irf7
Mx1
Mx1
18s ref.

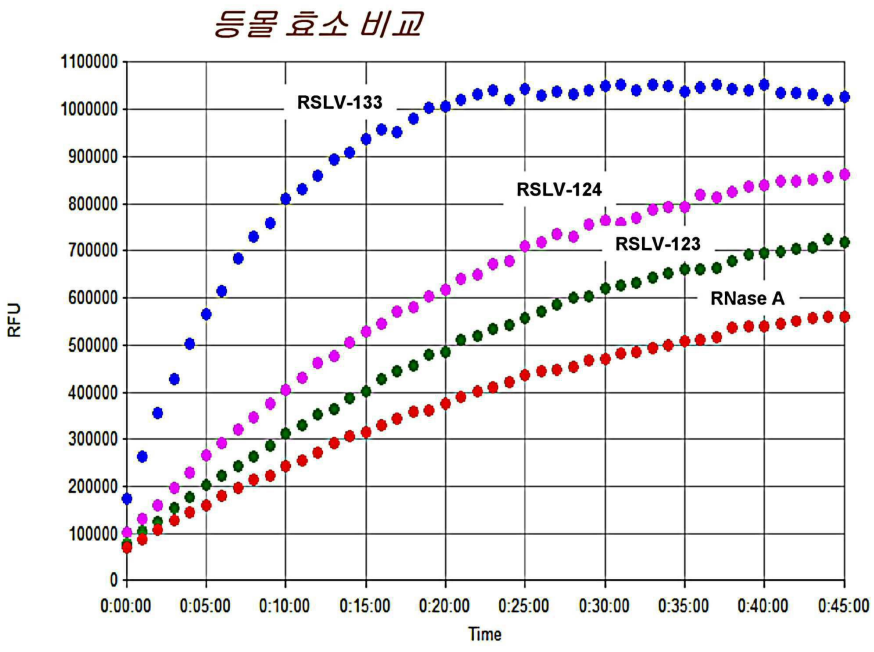
도면18

RSLV-132는 매우 활성인 RNase 이다



도면19

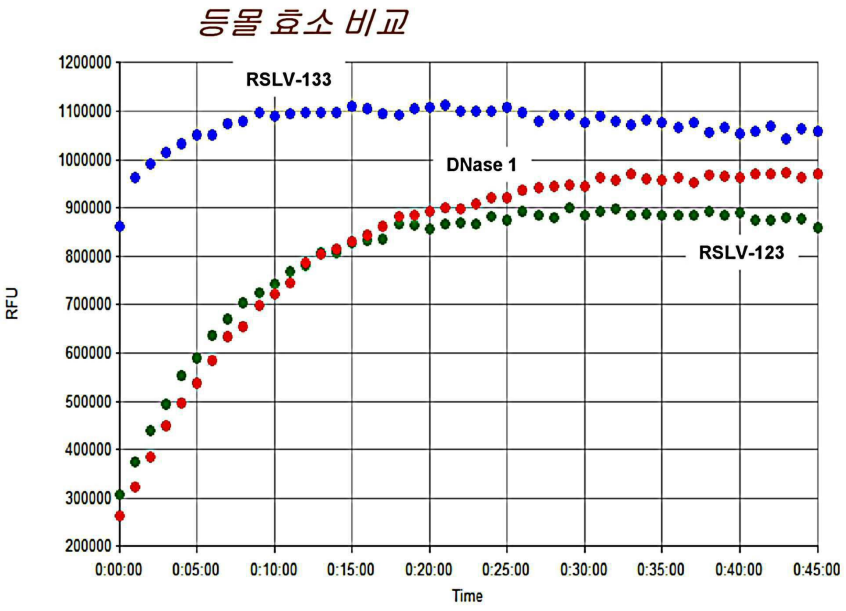
RSLV-133은 매우 활성인 RNase 부분(Moiety)을 나타낸다



형광측정계 분석: Ex_{485nm}, Em_{528nm}

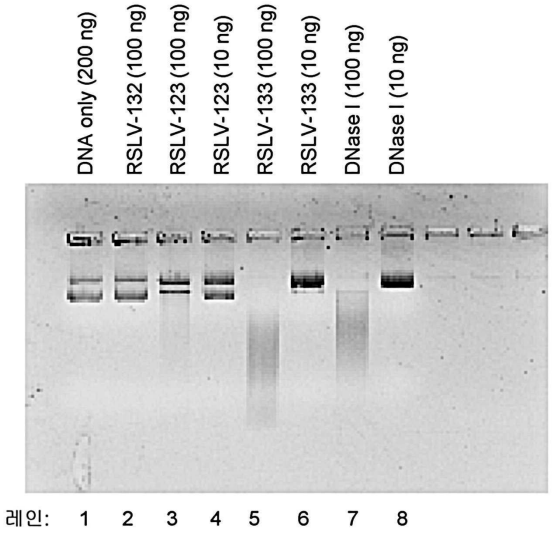
도면20

RSLV-133은 매우 활성인 DNase 부분(Moiety)을 나타낸다



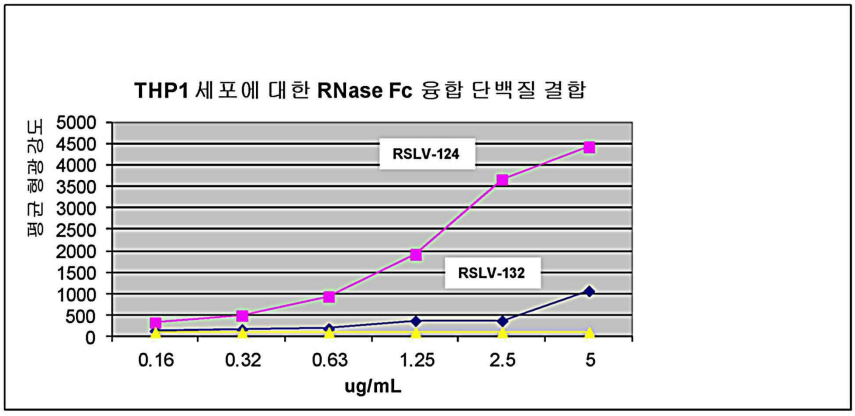
도면21

RSLV-133은 매우 활성인 DNase 부분(Moiety)을 많이 함유한다



도면22

RSLV-132는 감소된 Fc 수용체 결합을 나타낸다



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> LEDBETTER, JEFFREY A.

HAYDEN-LEDBETTER, MARTHA

ELKON, KEITH

SUN, XIZHANG

<120> THERAPEUTIC NUCLEASE COMPOSITIONS AND METHODS

<130> 26776-20832 US

<140> 13/822,215

<141> 2013-03-11

<150> PCT/US2012/035614

<151> 2012-04-27

<150> 61/617,241

<151> 2012-03-29

<150> 61/480,961

<151> 2011-04-29

<160> 126

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 1

gttaagcttg ccaccatggg tctggagaag tccctcattc tg 42

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 2

gataccaccg gtagggaatc tgcagcacag aagtttcag 39

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 3

ggctcgagca cagtagcatc aaagtggact ggtacgtagg 40

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 4

aaatctagac ctcaaccagg tagggaatct gcagcacaga agtttcag 48

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 5

tctagactat cacacagtag catcaaagtg gactggtacg tag 43

<210> 6

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 6

tgtccaccgt gtccagcacc tgaactcctg ggtggatcgt cagtcttcc 49

<210> 7

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 7

agatctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgt 49

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400

> 8

tctagattat catttacccg gagacagaga gaggctcttc tgcgtgtagt g 51

<210> 9

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 9

cctccatgca aatgcccagc acctaacctc ttgggtggat catccgtctt catcttcc 58

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

gaagatctcg agcccagagg tcccacaatc aagccctctc ctcca 45

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

gtttctagat tatcatttac ccggagtccg agagaagctc ttagtcgt 48

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

agatctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgt 49

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 13

gttttctcga tggaggctgg gagggctttg ttggagacc 39

<210> 14

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

aaggtctcca acaaagccct cccagcctcc atcgagaaaa caatctcc 48

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

tctagattat catttacccg gagacagaga gaggctcttc tgcgtgtagt g 51

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

gttaccggtc tgaagatcgc agccttcaac atccag 36

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

gttctcgaga tctttcagca tcacctccac tggatagtg 39

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 18

gttgatatcc tgaagatcgc agccttcaac atccag 36

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 19

gtttctagat tatcacttca gcatcacctc cactggatag tg 42

<210> 20

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 20

tctccaccga gcccagcacc tgaactcctg ggaggatcgt cagtcttcct cttccccc 58

<210> 21

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 21

agatctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct ccaccgagcc cagcacct 58

<210> 22

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 22

gtctccaaca aagccctccc agcctccatc gagaaaacca tctcca 46

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 23

tggagatggt tttctcgatg ggggctggga gggctttgtt ggagacc 47

<210> 24

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 24

tctagattat cattttcccg gagagagaga gaggctcttc tgcgtgtagt g 51

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 25

tctccaccga gcccagcacc tgaactcctg ggaggatcgt cagtcttcct cttccccc 58

<210> 26

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

agatctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct ccaccgagcc cagcacct 58

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 27

tggagatggt tttctcgatg ggggctggga gggctttgtt ggagacc 47

<210> 28

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

tctagattat cattttcccg gagagagaga gaggctcttc tgcgtgtagt g 51

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 29

gatatcctgc acgctagggc tgctcacatt 30

<210> 30

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 30

agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg ggagtggtgg 60

aggtggttct accggtctcg ag 82

<210> 31

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 31

agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg gctcaggtgg 60

tggaggatct ggaggaggtg ggagtaccgg tctcgag 97

<210> 32

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 32

agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg gctcaggtgg 60

tggaggatct ggaggaggtg ggagtctcga g 91

<210> 33

<211

> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gtcgacggag ctagcagccc cgtgaacgtg agcagcccca gcgtgcagga tatcccttcc 60

ctgggcaagg aatcccgggc caagaaattc cagcggcagc atatggactc agacagttcc 120

cccagcagca gctccaccta ctgtaaccaa atgatgaggc gccggaatat gacacagggg 180

cggtgcaaac cagtgaacac ctttgtgcac gagcccctgg tagatgtcca gaatgtctgt 240

ttccaggaaa aggtcacctg caagaacggg cagggcaact gctacaagag caactccagc 300

atgcacatca cagactgccg cctgacaaac gactccaggt accccaactg tgcataccgg 360

accagcccga aggagagaca catcattgtg gcctgtgaag ggagcccata tgtgccagtc 420

cactttgatg cttctgtgga ggactctacc taataatcta ga 462

<210> 34

<211> 798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gatatcctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcag gaacgacacc ttcaaccgag agccattcat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttggagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaagtgat aatctaga 798

<210> 35

<211> 798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gatatcctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcgg gaacgacacc ttcaaccgag agccagccat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttggagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaaatgat aatctaga 798

<210> 36

<211> 798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gatatcctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcgg gaacgacacc ttcaaccgag agccattcat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttagagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaagtgat aatctaga 798

<210> 37

<211> 795

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

accggtctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcag gaacgacacc ttcaaccgag agccattcat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttggagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaaagatc tcgag 795

<210> 38

<211> 795

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

accggtctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcgg gaacgacacc ttcaaccgag agccagccat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttggagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaaagatc tcgag 795

<210> 39

<211> 795

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

accggtctga agatcgcagc cttcaacatc cagacatttg gggagaccaa gatgtccaat 60

gccaccctcg tcagctacat tgtgcagatc ctgagccgct atgacatcgc cctggtccag 120

gaggtcagag acagccacct gactgccgtg gggaagctgc tggacaacct caatcaggat 180

gcaccagaca cctatcacta cgtggtcagt gagccactgg gacggaacag ctataaggag 240

cgctacctgt tcgtgtacag gcctgaccag gtgtctgcgg tggacagcta ctactacgat 300

gatggctgcg agccctgcgg gaacgacacc ttcaaccgag agccattcat tgtcaggttc 360

ttctcccggt tcacagaggt cagggagttt gccattgttc ccctgcatgc ggccccgggg 420

gacgcagtag ccgagatcga cgctctctat gacgtctacc tggatgtcca agagaaatgg 480

ggcttagagg acgtcatgtt gatgggcgac ttcaatgcgg gctgcagcta tgtgagaccc 540

tcccagtggt catccatccg cctgtggaca agccccacct tccagtggct gatccccgac 600

agcgctgaca ccacagctac acccacgcac tgtgcctatg acaggatcgt ggttgcaggg 660

atgctgctcc gaggcgccgt tgttcccgac tcggctcttc cctttaactt ccaggctgcc 720

tatggcctga gtgaccaact ggcccaagcc atcagtgacc actatccagt ggaggtgatg 780

ctgaaagatc tcgag 795

<210> 40

<211> 715

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

agatctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgcc cagcacctga 60

actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat 120

ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 180

caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga 240

ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg 300

gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga 360

gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc 420

atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 480

tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 540

cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga 600

caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 660

caaccactac acgcagaaga gcctctctct gtctccgggt aaatgataat ctaga 715

<210> 41

<211> 858

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gttaagcttg ccaccatgga aaccccagcg cagcttctct tcctcctgct actctggctc 60

ccagatacca ccggtctgaa gatcgcagcc ttcaacatcc agacatttgg ggagaccaag 120

atgtccaatg ccaccctcgt cagctacatt gtgcagatcc tgagccgcta tgacatcgcc 180

ctggtccagg aggtcagaga cagccacctg actgccgtgg ggaagctgct ggacaacctc 240

aatcaggatg caccagacac ctatcactac gtggtcagtg agccactggg acggaacagc 300

tataaggagc gctacctgtt cgtgtacagg cctgaccagg tgtctgcggt ggacagctac 360

tactacgatg atggctgcga gccctgcggg aacgacacct tcaaccgaga gccagccatt 420

gtcaggttct tctcccggtt cacagaggtc agggagtttg ccattgttcc cctgcatgcg 480

gccccggggg acgcagtagc cgagatcgac gctctctatg acgtctacct ggatgtccaa 540

gagaaatggg gcttggagga cgtcatgttg atgggcgact tcaatgcggg ctgcagctat 600

gtgagaccct cccagtggtc atccatccgc ctgtggacaa gccccacctt ccagtggctg 660

atccccgaca gcgctgacac cacagctaca cccacgcact gtgcctatga caggatcgtg 720

gttgcaggga tgctgctccg aggcgccgtt gttcccgact cggctcttcc ctttaacttc 780

caggctgcct atggcctgag tgaccaactg gcccaagcca tcagtgacca ctatccagtg 840

gaggtgatgc tgaagtga 858

<210> 42

<211> 918

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atgtcacggg agctggcccc actgctgctt ctcctcctct ccatccacag cgccctggcc 60

atgaggatct gctccttcaa cgtcaggtcc tttggggaaa gcaagcagga agacaagaat 120

gccatggatg tcattgtgaa ggtcatcaaa cgctgtgaca tcatactcgt gatggaaatc 180

aaggacagca acaacaggat ctgccccata ctgatggaga agctgaacag aaattcaagg 240

agaggcataa catacaacta tgtgattagc tctcggcttg gaagaaacac atataaagaa 300

caatatgcct ttctctacaa ggaaaagctg gtgtctgtga agaggagtta tcactaccat 360

gactatcagg atggagacgc agatgtgttt tccagggagc cctttgtggt ctggttccaa 420

tctccccaca ctgctgtcaa agacttcgtg attatccccc tgcacaccac cccagagaca 480

tccgttaagg agatcgatga gttggttgag gtctacacgg acgtgaaaca ccgctggaag 540

gcggagaatt tcattttcat gggtgacttc aatgccggct gcagctacgt ccccaagaag 600

gcctggaaga acatccgctt gaggactgac cccaggtttg tttggctgat cggggaccaa 660

gaggacacca cggtgaagaa gagcaccaac tgtgcatatg acaggattgt gcttagagga 720

caagaaatcg tcagttctgt tgttcccaag tcaaacagtg tttttgactt ccagaaagct 780

tacaagctga ctgaagagga ggccctggat gtcagcgacc actttccagt tgaatttaaa 840

ctacagtctt caagggcctt caccaacagc aaaaaatctg tcactctaag gaagaaaaca 900

aagagcaaac gctcctag 918

<210> 43

<211> 459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgggtctgg agaagtctct tgtccggctc cttctgcttg tcctgatact gctggtgctg 60

ggctgggtcc agccttccct gggcaaggaa tcccgggcca agaaattcca gcggcagcat 120

atggactcag acagttcccc cagcagcagc tccacctact gtaaccaaat gatgaggcgc 180

cggaatatga cacaggggcg gtgcaaacca gtgaacacct ttgtgcacga gcccctggta 240

gatgtccaga atgtctgttt ccaggaaaag gtcacctgca agaacgggca gggcaactgc 300

tacaagagca actccagcat gcacatcaca gactgccgcc tgacaaacgg ctccaggtac 360

cccaactgtg cataccggac cagcccgaag gagagacaca tcattgtggc ctgtgaaggg 420

agcccatatg tgccagtcca ctttgatgct actgtgtag 459

<210> 44

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 44

gtcgacggcg cggccgccag ccccgtgaac gtgagcagcc ccagcgtgca ggatatc 57

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 48

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe

115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile

130 135 140

Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu

145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val

165 170 175

Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe

180 185 190

Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His

195 200 205

Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255

Val Met Leu Lys

260

<210> 49

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe
115 120 125
Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile
130 135 140
Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu
145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val
165 170 175
Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe
180 185 190
Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His
195 200 205
Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala
210 215 220

Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly
225 230 235 240
Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu
245 250 255
Val Met Leu Lys
260

<210> 50
<211> 260
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met
1 5 10 15
Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr
20 25 30
Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val
35 40 45
Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe

115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile

130 135 140

Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu

145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val

165 170 175

Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe

180 185 190

Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His

195 200 205

Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255

Val Met Leu Lys

260

<210> 51

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met
1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr
20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val
35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His
50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr
65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr
85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu
100 105 110

Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe
115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile
130 135 140

Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu
145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val
165 170 175

Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe
180 185 190

Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His
195 200 205

Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala
210 215 220

Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly
225 230 235 240

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255

Val Met Leu Lys

260

<210> 52

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe

115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile

130 135 140

Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu

145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val

165 170 175

Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe

180 185 190

Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His

195 200 205

Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255

Val Met Leu Lys

260

<210> 53

<

211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe

115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile
130 135 140
Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu
145 150 155 160
Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val
165 170 175
Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe

180 185 190
Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His
195 200 205
Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala
210 215 220
Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly
225 230 235 240
Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255
Val Met Leu Lys
260

<210> 54
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 54
Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 55

<211> 128

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 55

Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg

20 25 30

Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His

35 40 45

Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr
50 55 60

Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His
65 70 75 80
Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Asp Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala
85 90 95
Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
115 120 125

<210> 56
<211> 280
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 56
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly
20 25 30
Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile
35 40 45
Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His

50 55 60
Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro
65 70 75 80
Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr
85 90 95
Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val
100 105 110
Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr

115 120 125

Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu
130 135 140
Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala
145 150 155 160
Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu
165 170 175
Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly

180 185 190
Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr
195 200 205
Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala
210 215 220
Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu
225 230 235 240
Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln

245 250 255
Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His
260 265 270
Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 57
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57

Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly

20 25 30
Glu Ser Lys Gln Glu Asp Lys Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val
35 40 45
Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn

50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser

100 105 110

Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp

115 120 125

Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr

130 135 140

Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr

145 150 155 160

Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys

165 170 175

His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala

180 185 190

Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg

195 200 205

Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr

210 215 220

Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly

225 230 235 240

Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp

245 250 255

Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser

260 265 270

Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr

275 280 285

Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg

290 295 300

Ser

305

<210> 58

<211> 156

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Ala Leu Glu Lys Ser Leu Val Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Val Leu Gly Trp Val Gln Pro Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg
20 25 30

Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr
50 55 60

Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly
85 90 95

Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys
100 105 110

Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser
115 120 125

Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val
130 135 140

Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
145 150 155

<210> 59

<211

> 693

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct ccaccgtctc cagcacctga actcctgggg 60

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct gtctccgggt aaa 693

<210> 60

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 61

<211> 1146

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120
agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180
aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240
gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300
atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360
ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420
gatgcttctg tggaggactc taccctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct 480

ccaccgagcc cagcacctga actcctggga ggatcgtcag tcttcctctt cccccaaaa 540

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 600

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 660

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 720

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 780

gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 840

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 900

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 960

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1020

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1080

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctctct ctctccggga 1140

aaatga 1146

<210> 62

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

```
Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
        115                 120                 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
    130                 135                 140
Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
145                 150                 155                 160
Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
                165                 170                 175
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            180                 185                 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
        195                 200                 205
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    210                 215                 220
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
225                 230                 235                 240
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                245                 250                 255

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            260                 265                 270
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        275                 280                 285
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    290                 295                 300
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
305                 310                 315                 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                325                 330                 335
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            340                 345                 350
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
```

355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375 380

<210>

63

<211> 1221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 63

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc tacagatctc tccggaggag gtggctcagg tggtggagga 480

tctggaggag gtgggagtgg tggaggtggt tctaccggtc tcgagcccaa atcttctgac 540

aaaactcaca catctccacc gagcccagca cctgaactcc tgggaggatc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 960

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tctctctctc cgggaaaatg a 1221

<210> 64

<211> 401

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 64

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140

Glu Asp Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys

275 280 285

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

385 390 395 400

Lys

<210> 65

<211> 2064

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 65

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

ctgaagatcg cagccttcaa catccagaca tttggggaga ccaagatgtc caatgccacc 120

ctcgtcagct acattgtgca gatcctgagc cgctatgaca tcgccctggt ccaggaggtc 180

agagacagcc acctgactgc cgtggggaag ctgctggaca acctcaatca ggatgcacca 240

gacacctatc actacgtggt cagtgagcca ctgggacgga acagctataa ggagcgctac 300

ctgttcgtgt acaggcctga ccaggtgtct gcggtggaca gctactacta cgatgatggc 360

tgcgagccct gcaggaacga caccttcaac cgagagccat tcattgtcag gttcttctcc 420

cggttcacag aggtcaggga gtttgccatt gttcccctgc atgcggcccc gggggacgca 480

gtagccgaga tcgacgctct ctatgacgtc tacctggatg tccaagagaa atggggcttg 540

gaggacgtca tgttgatggg cgacttcaat gcgggctgca gctatgtgag accctcccag 600

tggtcatcca tccgcctgtg gacaagcccc accttccagt ggctgatccc cgacagcgct 660

gacaccacag ctacacccac gcactgtgcc tatgacagga tcgtggttgc agggatgctg 720

ctccgaggcg ccgttgttcc cgactcggct cttcccttta acttccaggc tgcctatggc 780

ctgagtgacc aactggccca agccatcagt gaccactatc cagtggaggt gatgctgaaa 840

gatctctccg gaggaggtgg ctcaggtggt ggaggatctg gaggaggtgg gagtggtgga 900

ggttctaccg gtctcgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgagccca 960

gcacctgaac tcctgggagg atcgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 1020

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1080

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1140

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1200

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1260

tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1320

ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1380

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1440

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1500

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1560

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctctctct ctccgggaaa agtcgacgga 1620

gctagcagcc ccgtgaacgt gagcagcccc agaatgcagg atatcccttc cctgggcaag 1680

gaatcccggg ccaagaaatt ccagcggcag catatggact cagacagttc ccccagcagc 1740
agctccacct actgtaacca aatgatgagg cgccggaata tgacacaggg gcggtgcaaa 1800
ccagtgaaca cctttgtgca cgagcccctg gtagatgtcc agaatgtctg tttccaggaa 1860
aaggtcacct gcaagaacgg gcagggcaag tggtacaaga gcaactccag catgcacatc 1920
acagactgcc gcctgacaaa cggctccagg taccccaact gtgcataccg aaccagcccg 1980
aaggagagac acatcattgt ggcctgtgaa ggagcccata tgtgccagtc cactttgatg 2040
cttgctgtgg aggactctac ctaa 2064

<210> 66
<211> 679
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 66

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly
20 25 30
Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile
35 40 45

Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His
50 55 60
Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro
65 70 75 80
Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr
85 90 95
Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val
100 105 110

Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr
115 120 125

Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu
130 135 140
Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala
145 150 155 160
Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu
165 170 175

Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly
180 185 190
Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr
195 200 205
Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala
210 215 220
Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu
225 230 235 240

Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln
245 250 255
Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His
260 265 270
Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys
290 295 300

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
305 310 315 320
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
325 330 335
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
340 345 350
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
355 360 365

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

370 375 380

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

385 390 395 400

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

405 410 415

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

420 425 430

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

435 440 445

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

450 455 460

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

465 470 475 480

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

485 490 495

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

500 505 510

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

515 520 525

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

530 535 540

Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln

545 550 555 560

Arg Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr

565 570 575

Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys

580 585 590

Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val

595 600 605

Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr

610 615 620

Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly
625 630 635 640

Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His
645 650 655

Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp
660 665 670

Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
675

<210> 67

<211> 2055

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 67

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc tacagatctc tccggaggag gtggctcagg tggtggagga 480

tctggaggag gtgggagtgg tggaggtggt tctaccggtc tcgagcccaa atcttctgac 540

aaaactcaca catctccacc gagcccagca cctgaactcc tgggaggatc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 960

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tctctctctc cgggaaaagt cgacggagct agcagccccg tgaacgtgag cagccccaga 1260

atgcaggata tcctgaagat cgcagccttc aacatccaga catttgggga gaccaagatg 1320

tccaatgcca ccctcgtcag ctacattgtg cagatcctga gccgctatga catcgccctg 1380

gtccaggagg tcagagacag ccacctgact gccgtgggga agctgctgga caacctcaat 1440

caggatgcac cagacaccta tcactacgtg gtcagtgagc cactgggacg gaacagctat 1500

aaggagcgct acctgttcgt gtacaggcct gaccaggtgt ctgcggtgga cagctactac 1560

tacgatgatg gctgcgagcc ctgcaggaac gacaccttca accgagagcc attcattgtc 1620

aggttcttct cccggttcac agaggtcagg gagtttgcca ttgttccct gcatgcggcc 1680

ccgggggacg cagtagccga gatcgacgct ctctatgacg tctacctgga tgtccaagag 1740

aaatggggct tggaggacgt catgttgatg ggcgacttca atgcgggctg cagctatgtg 1800

agaccctccc agtggtcatc catccgcctg tggacaagcc ccaccttcca gtggctgatc 1860

cccgacagcg ctgacaccac agctacaccc acgcactgtg cctatgacag gatcgtggtt 1920

gcagggatgc tgctccgagg cgccgttgtt cccgactcgg ctcttccctt taacttccag 1980

gctgcctatg gcctgagtga ccaactggcc caagccatca gtgaccacta tccagtggag 2040

gtgatgctga aatga 2055

<210> 68

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln

35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60
Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80
Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95
Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr

100 105 110
Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125
Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140
Glu Asp Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys

165 170 175
Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser
180 185 190
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

225 230 235 240
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
275 280 285
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

385 390 395 400

Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val

405 410 415

Gln Asp Ile Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu

420 425 430

Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu

435 440 445

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

450 455 460

Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp

500 505 510

Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe

515 520 525

Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val

530 535 540

Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val

545 550 555 560

Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys

565 570 575

Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys

580 585 590

Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser

595 600 605

Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr

610 615 620

Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu

625 630 635 640

Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala

645 650 655

Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr

660 665 670

Pro Val Glu Val Met Leu Lys

675

<210> 69

<211> 1980

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 69

atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc taccctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct 480

ccaccgagcc cagcacctga actcctggga ggatcgtcag tcttcctctt ccccccaaaa 540

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 600

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 660

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 720

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 780

gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 840

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 900

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 960

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1020

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1080

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctctct ctctccggga 1140

aaagtcgacg gagctagcag ccccgtgaac gtgagcagcc ccagaatgca ggatatcctg 1200

aagatcgcag ccttcaacat ccagacattt ggggagacca agatgtccaa tgccaccctc 1260

gtcagctaca ttgtgcagat cctgagccgc tatgacatcg ccctggtcca ggaggtcaga 1320

gacagccacc tgactgccgt ggggaagctg ctggacaacc tcaatcagga tgcaccagac 1380

acctatcact acgtggtcag tgagccactg ggacggaaca gctataagga gcgctacctg 1440

ttcgtgtaca ggcctgacca ggtgtctgcg gtggacagct actactacga tgatggctgc 1500

gagccctgca ggaacgacac cttcaaccga gagccattca ttgtcaggtt cttctcccgg 1560

ttcacagagg tcagggagtt tgccattgtt cccctgcatg cggccccggg ggacgcagta 1620

gccgagatcg acgctctcta tgacgtctac ctggatgtcc aagagaaatg gggcttggag 1680

gacgtcatgt tgatgggcga cttcaatgcg ggctgcagct atgtgagacc ctcccagtgg 1740

tcatccatcc gcctgtggac aagccccacc ttccagtggc tgatccccga cagcgctgac 1800

accacagcta cacccacgca ctgtgcctat gacaggatcg tggttgcagg gatgctgctc 1860

cgaggcgccg ttgttcccga ctcggctctt ccctttaact tccaggctgc ctatggcctg 1920

agtgaccaac tggcccaagc catcagtgac cactatccag tggaggtgat gctgaaatga 1980

<210> 70

<211> 659

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 70

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
145 150 155 160

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
245 250 255
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
275 280 285
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
305 310 315 320
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
325 330 335
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
340 345 350
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly
370 375 380
Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu
385 390 395 400
Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser
405 410 415
Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp
420 425 430

Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly
435 440 445
Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr
450 455 460
Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu
465 470 475 480

Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr
485 490 495

Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro
500 505 510
Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala
515 520 525
Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp
530 535 540
Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu
545 550 555 560

Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg
565 570 575
Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln
580 585 590
Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys
595 600 605
Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val
610 615 620

Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu
625 630 635 640
Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val
645 650 655
Met Leu Lys

<210> 71
<211> 693
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 71
cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgcc cagcacctga actcctggga 60
ggatcgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccctatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct ctctccggga aaa 693

<210> 72

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 73

<211> 693

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgcc cagcacctga actcctggga 60

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct ctctccggga aaa 693

<210> 74

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 75

<211> 693

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatct ccaccgagcc cagcacctga actcctggga 60

ggatcgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct ctctccggga aaa 693

<210> 76

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110
Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

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

210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230
<210> 77
<211> 1146
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide
<400> 77
atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggt 60
aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc taccctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt 480

ccaccgtgcc cagcacctga actcctggga ggatcgtcag tcttcctctt cccccccaaaa 540

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 600

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 660

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 720

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 780

gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 840

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 900

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 960

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1020

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1080

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctctct ctctccggga 1140

aaatga 1146

<210> 78

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 78

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60
Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95
Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110
Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125
Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
145 150 155 160
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
165 170 175
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
180 185 190
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
210 215 220
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
225 230 235 240
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
245 250 255
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
275 280 285
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

305 310 315 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

325 330 335

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

340 345 350

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375 380

<210> 79

<211> 1221

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 79

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc tacagatctc tccggaggag gtggctcagg tggtggagga 480

tctggaggag gtgggagtgg tggaggtggt tctaccggtc tcgagcccaa atcttctgac 540

aaaactcaca catgtccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggaggatc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 960
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200
tctctctctc cgggaaaatg a 1221

<210> 80
<211> 401
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 80

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30
Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60
Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80
Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95
Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140
Glu Asp Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser
180 185 190
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
275 280 285
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
325 330 335
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

385 390 395 400

Lys

<210> 81

<211> 2064

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 81

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

ctgaagatcg cagccttcaa catccagaca tttggggaga ccaagatgtc caatgccacc 120

ctcgtcagct acattgtgca gatcctgagc cgctatgaca tcgccctggt ccaggaggtc 180

agagacagcc acctgactgc cgtggggaag ctgctggaca acctcaatca ggatgcacca 240

gacacctatc actacgtggt cagtgagcca ctgggacgga acagctataa ggagcgctac 300

ctgttcgtgt acaggcctga ccaggtgtct gcggtggaca gctactacta cgatgatggc 360

tgcgagccct gcaggaacga caccttcaac cgagagccat tcattgtcag gttcttctcc 420

cggttcacag aggtcaggga gtttgccatt gttcccctgc atgcggcccc gggggacgca 480

gtagccgaga tcgacgctct ctatgacgtc tacctggatg tccaagagaa atggggcttg 540

gaggacgtca tgttgatggg cgacttcaat gcgggctgca gctatgtgag accctcccag 600

tggtcatcca tccgcctgtg gacaagcccc accttccagt ggctgatccc cgacagcgct 660

gacaccacag ctacacccac gcactgtgcc tatgacagga tcgtggttgc agggatgctg 720

ctccgaggcg ccgttgttcc cgactcggct cttcccttta acttccaggc tgcctatggc 780

ctgagtgacc aactggccca agccatcagt gaccactatc cagtggaggt gatgctgaaa 840

gatctctccg gaggaggtgg ctcaggtggt ggaggatctg gaggaggtgg gagtggtgga 900

ggttctaccg gtctcgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca 960

gcacctgaac tcctgggagg atcgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 1020

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1080

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1140

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1200

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1260

tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1320

ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1380

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1440

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1500

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1560

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctctctct ctccgggaaa agtcgacgga 1620

gctagcagcc ccgtgaacgt gagcagcccc agaatgcagg atatcccttc cctgggcaag 1680

gaatcccggg ccaagaaatt ccagcggcag catatggact cagacagttc ccccagcagc 1740

agctccacct actgtaacca aatgatgagg cgccggaata tgacacaggg gcggtgcaaa 1800

ccagtgaaca cctttgtgca cgagcccctg gtagatgtcc agaatgtctg tttccaggaa 1860

aaggtcacct gcaagaacgg gcagggcaag tggtacaaga gcaactccag catgcacatc 1920

acagactgcc gcctgacaaa cggctccagg taccccaact gtgcataccg aaccagcccg 1980

aaggagagac acatcattgt ggcctgtgaa ggagcccata tgtgccagtc cactttgatg 2040

cttgctgtgg aggactctac ctaa 2064

<210> 82

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 82

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly
20 25 30

Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile
35 40 45

Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His
50 55 60

Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro

65 70 75 80

Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr

85 90 95

Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val

100 105 110

Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr

115 120 125

Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu

130 135 140

Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala

145 150 155 160

Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu

165 170 175

Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly

180 185 190

Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr

195 200 205

Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala

210 215 220

Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu

225 230 235 240

Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln

245 250 255

Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His

260 265 270

Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys

290 295 300

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

305 310 315 320

Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
325 330 335
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
340 345 350
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
355 360 365
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
370 375 380

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
385 390 395 400
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
405 410 415
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
420 425 430
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
435 440 445

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
450 455 460
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
465 470 475 480
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
485 490 495
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
500 505 510

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
515 520 525
Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser
530 535 540
Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln
545 550 555 560
Arg Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr

565 570 575

Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys
580 585 590
Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val
595 600 605
Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr
610 615 620
Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly
625 630 635 640

Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His
645 650 655
Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp
660 665 670
Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
675

<210> 83
<211> 2055
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 83
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120
agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180
aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240
gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300
atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360
ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420
gatgcttctg tggaggactc tacagatctc tccggaggag gtggctcagg tggtggagga 480

tctggaggag gtgggagtgg tggaggtggt tctaccggtc tcgagcccaa atcttctgac 540

aaaactcaca catgtccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggaggatc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 960

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tctctctctc cgggaaaagt cgacggagct agcagccccg tgaacgtgag cagccccaga 1260

atgcaggata tcctgaagat cgcagccttc aacatccaga catttgggga gaccaagatg 1320

tccaatgcca ccctcgtcag ctacattgtg cagatcctga gccgctatga catcgccctg 1380

gtccaggagg tcagagacag ccacctgact gccgtgggga agctgctgga caacctcaat 1440

caggatgcac cagacaccta tcactacgtg gtcagtgagc cactgggacg gaacagctat 1500

aaggagcgct acctgttcgt gtacaggcct gaccaggtgt ctgcggtgga cagctactac 1560

tacgatgatg gctgcgagcc ctgcaggaac gacaccttca accgagagcc attcattgtc 1620

aggttcttct cccggttcac agaggtcagg gagtttgcca ttgttcccct gcatgcggcc 1680

ccgggggacg cagtagccga gatcgacgct ctctatgacg tctacctgga tgtccaagag 1740

aaatggggct tggaggacgt catgttgatg ggcgacttca atgcgggctg cagctatgtg 1800

agaccctccc agtggtcatc catccgcctg tggacaagcc ccaccttcca gtggctgatc 1860

cccgacagcg ctgacaccac agctacaccc acgcactgtg cctatgacag gatcgtggtt 1920

gcagggatgc tgctccgagg cgccgttgtt cccgactcgg ctcttccctt taacttccag 1980

gctgcctatg gcctgagtga ccaactggcc caagccatca gtgaccacta tccagtggag 2040

gtgatgctga aatga 2055

<210> 84

<211> 679

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 84

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140

Glu Asp Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys

275 280 285

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

385 390 395 400

Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val

405 410 415

Gln Asp Ile Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu

420 425 430

Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu

435 440 445

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

450 455 460

Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp

500 505 510

Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe

515 520 525

Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val

530 535 540

Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val

545 550 555 560

Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys

565 570 575

Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys

580 585 590

Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser

595 600 605

Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr

610 615 620

Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu

625 630 635 640

Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala

645 650 655

Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr

660 665 670

Pro Val Glu Val Met Leu Lys

675

<210> 85

<211> 1980

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 85

atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggt 60

aaggaatccc gggccaagaa attccagcgg cagcatatgg actcagacag ttcccccagc 120

agcagctcca cctactgtaa ccaaatgatg aggcgccgga atatgacaca ggggcggtgc 180

aaaccagtga acacctttgt gcacgagccc ctggtagatg tccagaatgt ctgtttccag 240

gaaaaggtca cctgcaagaa cgggcagggc aactgctaca agagcaactc cagcatgcac 300

atcacagact gccgcctgac aaacggctcc aggtacccca actgtgcata ccggaccagc 360

ccgaaggaga gacacatcat tgtggcctgt gaagggagcc catatgtgcc agtccacttt 420

gatgcttctg tggaggactc taccctcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt 480

ccaccgtgcc cagcacctga actcctggga ggatcgtcag tcttcctctt cccccaaaa 540

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 600

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 660

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 720

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 780

gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 840

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 900

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 960

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1020

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1080

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctctct ctctccggga 1140

aaagtcgacg gagctagcag ccccgtgaac gtgagcagcc ccagaatgca ggatatcctg 1200

aagatcgcag ccttcaacat ccagacattt ggggagacca agatgtccaa tgccaccctc 1260

gtcagctaca ttgtgcagat cctgagccgc tatgacatcg ccctggtcca ggaggtcaga 1320

gacagccacc tgactgccgt ggggaagctg ctggacaacc tcaatcagga tgcaccagac 1380

acctatcact acgtggtcag tgagccactg ggacggaaca gctataagga gcgctacctg 1440

ttcgtgtaca ggcctgacca ggtgtctgcg gtggacagct actactacga tgatggctgc 1500

gagccctgca ggaacgacac cttcaaccga gagccattca ttgtcaggtt cttctcccgg 1560

ttcacagagg tcagggagtt tgccattgtt cccctgcatg cggccccggg ggacgcagta 1620

gccgagatcg acgctctcta tgacgtctac ctggatgtcc aagagaaatg gggcttggag 1680

gacgtcatgt tgatgggcga cttcaatgcg ggctgcagct atgtgagacc ctcccagtgg 1740

tcatccatcc gcctgtggac aagccccacc ttccagtggc tgatccccga cagcgctgac 1800

accacagcta cacccacgca ctgtgcctat gacaggatcg tggttgcagg gatgctgctc 1860

cgaggcgccg ttgttcccga ctcggctctt ccctttaact tccaggctgc ctatggcctg 1920

agtgaccaac tggcccaagc catcagtgac cactatccag tggaggtgat gctgaaatga 1980

<210> 86

<211> 659

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln
35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn
50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln
65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn
85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr
100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val
115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val
130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
145 150 155 160

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
210 215 220

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
225 230 235 240

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
245 250 255

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
275 280 285

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
305 310 315 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
325 330 335

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
340 345 350

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly
370 375 380

Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu
385 390 395 400

Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser
405 410 415

Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp

420 425 430

Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly

435 440 445

Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr

450 455 460

Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu

465 470 475 480

Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr

485 490 495

Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro

500 505 510

Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala

515 520 525

Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp

530 535 540

Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu

545 550 555 560

Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg

565 570 575

Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln

580 585 590

Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys

595 600 605

Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val

645 650 655

Met Leu Lys

<210> 87

<211> 693

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgtc cagcacctga actcctgggg 60

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct gtctccgggt aaa 693

<210> 88

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 89
<211> 693
<212> DNA
<213
> Homo sapiens
<400> 89

cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgt ccaccgtgcc cagcacctga actcctggga 60
ggatcgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc 360

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 420

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 480

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660

acgcagaaga gcctctctct ctctccggga aaa 693

<210> 90

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 91

<211> 1146

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 91

atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcctga caccaccggc 60

aaagagtccc gggccaagaa gttccagcgg cagcacatgg actccgactc cagcccttcc 120

agctcctcca cctactgcaa ccagatgatg cggcggagaa acatgaccca gggccggtgc 180

aagcccgtga acacctttgt gcacgagccc ctggtggacg tgcagaacgt gtgttttcaa 240

gagaaagtga cctgcaagaa cggccagggc aactgctaca agtccaactc ctccatgcac 300

atcaccgact gccggctgac caacggctcc agatacccca actgcgccta ccggacctcc 360

cccaaagaac ggcacatcat cgtggcctgc gagggctctc cttacgtgcc cgtgcacttc 420

gacgcctccg tggaagattc caccctggaa cccaagtcct ccgacaagac ccacacctgt 480

ccccttgtc ctgcccctga actgctgggc ggctcctccg tgttcctgtt cccccaaag 540

cccaaggaca ccctgatgat ctcccggacc cccgaagtga catgcgtggt ggtggatgtg 600

tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat tggtacgtgg acggggtgga agtgcacaac 660

gccaagacca agcccagaga ggaacagtac aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg 720

accgtgctgc accaggattg gctgaacgga aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag 780

gccctgcccg cctccatcga aaagaccatc tccaaggcca agggccagcc ccgggaaccc 840

caggtgtaca cactgccccc tagcagggac gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc 900

tgcctcgtga agggcttcta cccctccgat atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag 960

cctgagaaca actacaagac cacccccct gtgctggaca gcgacggctc attcttcctg 1020

tactccaagc tgacagtgga caagtcccgg tggcagcagg gcaacgtgtt ctcctgctcc 1080

gtgatgcacg aggctctgca caaccactac acccagaagt ccctgtccct gagccccggc 1140

aaatga 1146

<210> 92

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 92

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His

20 25 30

Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln

35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn

50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln

65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn

85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr

100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val

115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val

130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

305 310 315 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

325 330 335

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

340 345 350

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375 380

<210> 93

<211> 1980

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 93

atggaaaccc ctgcccagct gctgttcctg ctgctgctgt ggctgcccga caccaccggc 60

aaagagagcc gggccaagaa gttccagcgg cagcacatgg acagcgacag cagccccagc 120

agctccagca cctactgcaa ccagatgatg cggcggagaa acatgaccca gggccggtgc 180

aagcccgtga acaccttcgt gcacgagccc ctggtggacg tgcagaacgt gtgttttcaa 240

gaaaaagtga cctgcaagaa cggccagggc aactgctaca agagcaacag cagcatgcac 300

atcaccgact gccggctgac caacggcagc agatacccca actgcgccta ccggaccagc 360

cccaaagaac ggcacatcat cgtggcctgc gagggcagcc cttacgtgcc cgtgcacttt 420

gacgccagcg tggaagatag caccctggaa cccaagagca gcgacaagac ccacacctgt 480

ccccccctgcc ctgcccctga gctgctgggc ggaagcagcg tgttcctgtt ccccccaaag 540

cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg 600

tcccacgagg accccgaagt gaagttcaat tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac 660

gccaagacca agcccagaga ggaacagtac aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg 720

accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag 780

gccctgcccg ccagcatcga gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc tcgcgagccc 840

caggtgtaca cactgccccc cagccgggac gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc 900

tgcctggtga aaggcttcta ccccagcgat atcgccgtgg aatgggagag caacggccag 960

cccgagaaca actacaagac cacccccccct gtgctggact ccgacggctc attcttcctg 1020

tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1080

gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaagt ccctgagcct gagccccggc 1140

aaggtggacg gcgccagctc ccctgtgaac gtgtccagcc ccagcgtgca ggacatcctg 1200

aagatcgccg ccttcaacat ccagaccttc ggcgagacaa agatgagcaa cgccaccctg 1260

gtgtcctaca tcgtgcagat cctgagcaga tacgatatcg ccctggtgca agaagtgcgg 1320

gacagccacc tgaccgccgt gggcaagctg ctggacaacc tgaaccagga cgcccccgac 1380

acctaccact acgtggtgtc cgagcctctg ggccggaaca gctacaaaga aagatacctg 1440

ttcgtgtacc ggcccgatca ggtgtccgcc gtggacagct actactacga cgacggctgc 1500

gagccctgcc ggaacgacac cttcaaccgc gagcccttca tcgtgcggtt cttcagccgg 1560

ttcaccgaag tgcgcgagtt cgccatcgtg cccctgcatg ctgcccctgg cgacgccgtg 1620

gccgagatcg atgccctgta cgacgtgtac ctggatgtgc aagaaaagtg gggcctggaa 1680
gatgtgatgc tgatgggcga cttcaacgcc ggctgcagct acgtgcggcc cagccagtgg 1740
tccagcatca gactgtggac ctccccccacc ttccagtggc tgatccccga cagcgccgat 1800
accaccgcca cccccaccca ctgtgcctac gacagaatcg tggtggccgg catgctgctg 1860
agaggcgccg tggtgcctga cagcgccctg ccattcaatt ttcaagccgc ctacggcctg 1920
agcgatcagc tggcccaggc catcagcgac cactaccccg tggaagtgat gctgaagtga 1980

<210> 94
<211> 659
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 94

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

130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

305 310 315 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

325 330 335

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

340 345 350

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly

370 375 380

Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu
385 390 395 400
Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser
405 410 415
Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp
420 425 430
Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly

435 440 445
Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr
450 455 460
Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu
465 470 475 480
Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr
485 490 495
Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro

500 505 510
Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala
515 520 525
Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp
530 535 540
Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu
545 550 555 560
Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg

565 570 575
Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln
580 585 590
Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys
595 600 605
Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val
610 615 620
Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu

625 630 635 640

Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val

645 650 655

Met Leu Lys

<210> 95

<211> 1086

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

aaagagtccc gggccaagaa gttccagcgg cagcacatgg actccgactc cagcccttcc 60

agctcctcca cctactgcaa ccagatgatg cggcggagaa acatgaccca gggccggtgc 120

aagcccgtga acacctttgt gcacgagccc ctggtggacg tgcagaacgt gtgttttcaa 180

gagaaagtga cctgcaagaa cggccagggc aactgctaca agtccaactc ctccatgcac 240

atcaccgact gccggctgac caacggctcc agatacccca actgcgccta ccggacctcc 300

cccaaagaac ggcacatcat cgtggcctgc gagggctctc cttacgtgcc cgtgcacttc 360

gacgcctccg tggaagattc caccctggaa cccaagtcct ccgacaagac ccacacctgt 420

ccccccttgtc ctgcccctga actgctgggc ggctcctccg tgttcctgtt ccccccaaag 480

cccaaggaca ccctgatgat ctcccggacc cccgaagtga catgcgtggt ggtggatgtg 540

tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat tggtacgtgg acggggtgga agtgcacaac 600

gccaagacca agcccagaga ggaacagtac aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg 660

accgtgctgc accaggattg gctgaacgga aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag 720

gccctgcccg cctccatcga aaagaccatc tccaaggcca agggccagcc ccgggaaccc 780

caggtgtaca cactgccccc tagcagggac gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc 840

tgcctcgtga agggcttcta cccctccgat atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag 900

cctgagaaca actacaagac cacccccccct gtgctggaca gcgacggctc attcttcctg 960

tactccaagc tgacagtgga caagtcccgg tggcagcagg gcaacgtgtt ctcctgctcc 1020

gtgatgcacg aggctctgca caaccactac acccagaagt ccctgtccct gagccccggc 1080

aaatga 1086

<210> 96

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 96

Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg
20 25 30

Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His
35 40 45

Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr
50 55 60

Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His
65 70 75 80

Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly
100 105 110

Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
115 120 125

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
130 135 140

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
165 170 175

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
180 185 190

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

195 200 205

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
210 215 220
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
225 230 235 240
Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
245 250 255
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
260 265 270

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
275 280 285
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
290 295 300
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
305 310 315 320
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
325 330 335

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
340 345 350
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 97
<211> 1920
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<400> 97
aaagagagcc gggccaagaa gttccagcgg cagcacatgg acagcgacag cagccccagc 60
agctccagca cctactgcaa ccagatgatg cggcggagaa acatgaccca gggccggtgc 120

aagcccgtga acaccttcgt gcacgagccc ctggtggacg tgcagaacgt gtgttttcaa 180

gaaaaagtga cctgcaagaa cggccagggc aactgctaca agagcaacag cagcatgcac 240

atcaccgact gccggctgac caacggcagc agatacccca actgcgccta ccggaccagc 300

cccaaagaac ggcacatcat cgtggcctgc gagggcagcc cttacgtgcc cgtgcacttt 360

gacgccagcg tggaagatag caccctggaa cccaagagca gcgacaagac ccacacctgt 420

ccccccctgcc ctgcccctga gctgctgggc ggaagcagcg tgttcctgtt ccccccaaag 480

cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg 540

tcccacgagg accccgaagt gaagttcaat tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac 600

gccaagacca agcccagaga ggaacagtac aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg 660

accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag 720

gccctgcccg ccagcatcga gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc tcgcgagccc 780

caggtgtaca cactgccccc cagccgggac gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc 840

tgcctggtga aaggcttcta ccccagcgat atcgccgtgg aatgggagag caacggccag 900

cccgagaaca actacaagac cacccccccc gtgctggact ccgacggctc attcttcctg 960

tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1020

gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaagt ccctgagcct gagccccggc 1080

aaggtggacg gcgccagctc ccctgtgaac gtgtccagcc ccagcgtgca ggacatcctg 1140

aagatcgccg ccttcaacat ccagaccttc ggcgagacaa agatgagcaa cgccaccctg 1200

gtgtcctaca tcgtgcagat cctgagcaga tacgatatcg ccctggtgca agaagtgcgg 1260

gacagccacc tgaccgccgt gggcaagctg ctggacaacc tgaaccagga cgcccccgac 1320

acctaccact acgtggtgtc cgagcctctg ggccggaaca gctacaaaga aagatacctg 1380

ttcgtgtacc ggcccgatca ggtgtccgcc gtggacagct actactacga cgacggctgc 1440

gagccctgcc ggaacgacac cttcaaccgc gagcccttca tcgtgcggtt cttcagccgg 1500

ttcaccgaag tgcgcgagtt cgccatcgtg cccctgcatg ctgcccctgg cgacgccgtg 1560

gccgagatcg atgccctgta cgacgtgtac ctggatgtgc aagaaaagtg gggcctggaa 1620

gatgtgatgc tgatgggcga cttcaacgcc ggctgcagct acgtgcggcc cagccagtgg 1680

tccagcatca gactgtggac ctccccccacc ttccagtggc tgatccccga cagcgccgat 1740

accaccgcca cccccaccca ctgtgcctac gacagaatcg tggtggccgg catgctgctg 1800

agaggcgccg tggtgcctga cagcgccctg ccattcaatt ttcaagccgc ctacggcctg 1860

agcgatcagc tggcccaggc catcagcgac cactaccccg tggaagtgat gctgaagtga 1920

<210> 98

<211> 639

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 98

Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg
20 25 30

Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His
35 40 45

Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr
50 55 60

Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His
65 70 75 80

Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly
100 105 110

Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr
115 120 125

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
130 135 140

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
165 170 175

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
180 185 190

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
195 200 205

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

210 215 220

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
225 230 235 240
Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
245 250 255
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
260 265 270
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
275 280 285

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
290 295 300
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
305 310 315 320
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
325 330 335
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
340 345 350

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro
355 360 365
Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu Lys Ile Ala Ala
370 375 380
Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu
385 390 395 400
Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val
405 410 415

Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp
420 425 430
Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu
435 440 445
Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg
450 455 460

Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys
465 470 475 480

Glu Pro Cys Arg Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg
485 490 495
Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu
500 505 510
His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp
515 520 525
Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu
530 535 540

Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp
545 550 555 560
Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro
565 570 575
Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg
580 585 590
Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser
595 600 605

Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu
610 615 620
Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
625 630 635
<210> 99
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 99
Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 101

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg
20 25 30

Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His
35 40 45

Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr
50 55 60

Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His
65 70 75 80

Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly
100 105 110

Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Thr

115 120 125

<210> 102

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys Met

1 5 10 15

Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val

35 40 45

Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His

50 55 60

Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr

65 70 75 80

Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr

85 90 95

Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu

100 105 110

Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe

115 120 125

Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile

130 135 140

Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu

145 150 155 160

Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val

165 170 175

Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe

180 185 190

Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His

195 200 205

Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu

245 250 255

Val Met Leu Lys

260

<210> 103

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly Glu Ser Lys Gln

1 5 10 15

Glu Asp Lys Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val Ile Lys Arg Cys

20 25 30

Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn Asn Arg Ile Cys

35 40 45

Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg Arg Gly Ile Thr

50 55 60

Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn Thr Tyr Lys Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp Val Phe Ser Arg

100 105 110

Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr Ala Val Lys Asp

115 120 125

Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr Ser Val Lys Glu

130 135 140

Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys His Arg Trp Lys
145 150 155 160
Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr
165 170 175
Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg Thr Asp Pro Arg

180 185 190
Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr Val Lys Lys Ser
195 200 205
Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly Gln Glu Ile Val
210 215 220
Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp Phe Gln Lys Ala
225 230 235 240
Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser Asp His Phe Pro

245 250 255
Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr Asn Ser Lys Lys
260 265 270
Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg Ser
275 280 285

<210> 104
<211> 369
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 104
Met Gly Pro Gly Ala Arg Arg Gln Gly Arg Ile Val Gln Gly Arg Pro
1 5 10 15
Glu Met Cys Phe Cys Pro Pro Pro Thr Pro Leu Pro Pro Leu Arg Ile

20 25 30
Leu Thr Leu Gly Thr His Thr Pro Thr Pro Cys Ser Ser Pro Gly Ser
35 40 45
Ala Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Met Gly Ser Gln Ala Leu Pro Pro Gly
50 55 60
Pro Met Gln Thr Leu Ile Phe Phe Asp Met Glu Ala Thr Gly Leu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Pro Pro Pro Arg Val Val Asp Lys Leu Ser Leu Cys Val Ala Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Leu Ala Ala His Gly Arg Gln Cys Phe Asp Asp Asn Leu Ala

145 150 155 160

Asn Leu Leu Leu Ala Phe Leu Arg Arg Gln Pro Gln Pro Trp Cys Leu

165 170 175

Val Ala His Asn Gly Asp Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Leu Gln Ala Glu

180 185 190

Leu Ala Met Leu Gly Leu Thr Ser Ala Leu Asp Gly Ala Phe Cys Val

195 200 205

Asp Ser Ile Thr Ala Leu Lys Ala Leu Glu Arg Ala Ser Ser Pro Ser

210 215 220

Glu His Gly Pro Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gly Ser Ile Tyr Thr Arg

225 230 235 240

Leu Tyr Gly Gln Ser Pro Pro Asp Ser His Thr Ala Glu Gly Asp Val

245 250 255

Leu Ala Leu Leu Ser Ile Cys Gln Trp Arg Pro Gln Ala Leu Leu Arg

260 265 270

Trp Val Asp Ala His Ala Arg Pro Phe Gly Thr Ile Arg Pro Met Tyr

275 280 285

Gly Val Thr Ala Ser Ala Arg Thr Lys Pro Arg Pro Ser Ala Val Thr

290 295 300

Thr Thr Ala His Leu Ala Thr Thr Arg Asn Thr Ser Pro Ser Leu Gly

305 310 315 320

Glu Ser Arg Gly Thr Lys Asp Leu Pro Pro Val Lys Asp Pro Gly Ala
325 330 335
Leu Ser Arg Glu Gly Leu Leu Ala Pro Leu Gly Leu Leu Ala Ile Leu

340 345 350
Thr Leu Ala Val Ala Thr Leu Tyr Gly Leu Ser Leu Ala Thr Pro Gly
355 360 365
Glu

<210> 105
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105
Met Gly Pro Gly Ala Arg Arg Gln Gly Arg Ile Val Gln Gly Arg Pro
1 5 10 15
Glu Met Cys Phe Cys Pro Pro Pro Thr Pro Leu Pro Pro Leu Arg Ile
20 25 30

Leu Thr Leu Gly Thr His Thr Pro Thr Pro Cys Ser Ser Pro Gly Ser
35 40 45
Ala Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Met Gly Ser Gln Ala Leu Pro Pro Gly
50 55 60
Pro Met Gln Thr Leu Ile Phe Phe Asp Met Glu Ala Thr Gly Leu Pro
65 70 75 80
Phe Ser Gln Pro Lys Val Thr Glu Leu Cys Leu Leu Ala Val His Arg
85 90 95

Cys Ala Leu Glu Ser Pro Pro Thr Ser Gln Gly Pro Pro Pro Thr Val
100 105 110
Pro Pro Pro Pro Arg Val Val Asp Lys Leu Ser Leu Cys Val Ala Pro
115 120 125
Gly Lys Ala Cys Ser Pro Ala Ala Ser Glu Ile Thr Gly Leu Ser Thr
130 135 140
Ala Val Leu Ala Ala His Gly Arg Gln Cys Phe Asp Asp Asn Leu Ala

145 150 155 160

Asn Leu Leu Leu Ala Phe Leu Arg Arg Gln Pro Gln Pro Trp Cys Leu
165 170 175
Val Ala His Asn Gly Asp Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Leu Gln Ala Glu
180 185 190
Leu Ala Met Leu Gly Leu Thr Ser Ala Leu Asp Gly Ala Phe Cys Val
195 200 205
Asp Ser Ile Thr Ala Leu Lys Ala Leu Glu Arg Ala Ser Ser Pro Ser
210 215 220

Glu His Gly Pro Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gly Ser Ile Tyr Thr Arg
225 230 235 240
Leu Tyr Gly Gln Ser Pro Pro Asp Ser His Thr Ala Glu Gly Asp Val
245 250 255
Leu Ala Leu Leu Ser Ile Cys Gln Trp Arg Pro Gln Ala Leu Leu Arg
260 265 270
Trp Val Asp Ala His Ala Arg Pro Phe Gly Thr Ile Arg Pro Met Tyr
275 280 285

Gly Val Thr Ala Ser Ala Arg Thr Lys
290 295

<210> 106
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 106

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His
20 25 30
Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln

35 40 45

Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn

50 55 60

Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln

65 70 75 80

Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn

85 90 95

Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr

100 105 110

Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val

115 120 125

Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val

130 135 140

Glu Asp Ser Thr Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

195 200 205

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

290 295 300

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

305 310 315 320

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

325 330 335

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

340 345 350

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

355 360 365

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375 380

<210> 107

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 107

Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln

1 5 10 15

Asp Ile

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 108

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 109

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> This sequence may encompass 0-5 "Gly-Gly-Gly-Gly-Ser"

repeating units wherein some positions may be absent

<400> 109

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 110

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 111

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(50)

<223> This sequence may encompass 1-10 "Gly-Gly-Gly-Gly-Ser"

repeating units wherein some positions may be absent

<400> 111

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser

50

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 112

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 113

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 114

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 115

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 115

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 116

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 116

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 117

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 117

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 118

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 118

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 119

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 119

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser

35

<210> 120

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 120

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 121

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 121

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 122

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 122

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

35 40 45

Gly Gly Ser

50

<210> 123

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> This sequence may encompass 3-5 "Gly-Gly-Gly-Gly-Ser" repeating units wherein some positions may be absent

<400> 123

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 124

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> This sequence may encompass 1-5 "Gly-Gly-Gly-Gly-Ser" repeating units wherein some positions may be absent

<400> 124

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 125

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 126

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222

> (1)..(18)

<223> This sequence may encompass 12-18 nucleotides wherein some

positions may be absent

<400> 126

ttttttttt tttttttt 18