



등록특허 10-2035357



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월23일
(11) 등록번호 10-2035357
(24) 등록일자 2019년10월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 1/16* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7021394
- (22) 출원일자(국제) 2012년01월19일
심사청구일자 2017년01월19일
- (85) 번역문제출일자 2013년08월13일
- (65) 공개번호 10-2014-0030134
- (43) 공개일자 2014년03월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/021829
- (87) 국제공개번호 WO 2012/150973
국제공개일자 2012년11월08일
- (30) 우선권주장
61/434,405 2011년01월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2008124768 A1*
US20100136015 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 정영선

(54) 발명의 명칭 철 항상성을 조절하기 위한 조성물 및 이의 사용 방법

(57) 요 약

본 발명은 혈모주밸린-IgG Fc 도메인 융합 단백질, 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웹티드 모방체, 및 철 항상성을 조절하고 철 항상성과 관련된 질환을 치료하기 위한 이를 융합 단백질의 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

현지

```

Fc-율령 N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H O D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
Hulg1 I E P K S C D K P H T C P I C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
VEGF-trap I D K T H T C P P Q P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
오염시약 E P K S D K T H T S P P Q P A P E L L G G S S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
아밀리스트 I W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H O D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
Fc-율령 I S K A K G Q P R E P Q V V T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K A T P
Hulg1 I S K A K G Q P R E P Q V V T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K T T P
VEGF-trap I S K A K G Q P R E P Q V V T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K T T P
오염시약 I S K A K G Q P R E P Q V V T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K T T P
아밀리스트 I S K A K G Q P R E P Q V V T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K T T P

Fc-율령 P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:3
Hulg1 P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:3
VEGF-trap P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:5
오염시약 P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:5
아밀리스트 P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:7

```

(72) 발명자

멘델, 트레이시

미국, 매사추세츠 02114, 보스턴, 3 플로어, 7 불
핀치 플레이스

기어링, 패트릭

미국, 워싱턴 98103, 노스 시애틀, 7217 팔라틴 에
버뉴

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 9의 서열을 포함하는 융합 단백질로서, 호모이량체를 형성하는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 융합 단백질이, 크기 배제 크로마토그래피로 측정된 바와 같이, 적어도 98% 순수한 것인, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 융합 단백질이 글리코실화된 것인, 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 글리코실화 패턴이 포유동물 글리코실화 패턴인 것인, 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 아스파라긴 83, 아스파라긴 178 및/또는 아스파라긴 337이 글리코실화된 것인, 융합 단백질.

청구항 6

제4항에 있어서, 글리코실화 패턴이 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주로부터 유래하는 것인, 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 융합 단백질의 N-말단 아미노산이 글루타민인 것인, 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 융합 단백질의 N-말단 아미노산의 N-말단이 QCKILRCNAE(서열번호 10)인 것인, 융합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 서열번호 9의 단편이 서열번호 9의 N-말단 150개 아미노산을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 융합 단백질이 실질적으로 피로겐을 함유하지 않는 것인, 융합 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서, 융합 단백질의 혈청 반감기가 적어도 10시간인 것인, 융합 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서, 융합 단백질이 적어도 10^{-7} M의 K_D 로 골 형성 단백질-6(BMP-6)에 결합하고, BMP-6 신호전달을 억제하는 것인, 융합 단백질.

청구항 13

제1항에 있어서, 융합 단백질이, 투여되는 경우, 대상체에서 헤모글로빈 및/또는 헤마토크릿을 증가시키는 것인, 융합 단백질.

청구항 14

제1항에 있어서, 융합 단백질이, 빈혈 대상체에게 1개월 이상 동안 투여되는 경우, 빈혈 대상체에서 혜모글로빈 및/또는 혜마토크릿을 적어도 정상 수준까지 증가시키는 것인, 융합 단백질.

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서, 호모이량체가 Fc 헌지 영역에서 형성되는 것인, 융합 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 호모이량체가 디설파이드 결합에 의해 Fc 헌지 영역에서 시스테인들 사이에 형성되는 것인, 융합 단백질.

청구항 18

제1항의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 핵산 분자가 서열번호 11의 서열과 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 20

제19항의 핵산 서열을 포함하는 포유동물 세포.

청구항 21

제20항에 있어서, 세포가 CHO 세포인 것인 포유동물 세포.

청구항 22

제1항 내지 제8항, 제10항 내지 제14항, 제16항, 및 제17항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질의 치료학적 유효 량을 포함하는, 철 항상성 질환을 치료 또는 개선하기 위한 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

제1항 내지 제8항, 제10항 내지 제14항, 제16항, 및 제17항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질의 치료학적 유효
량을 포함하는, 암 질환을 치료하기 위한 조성물.

청구항 42

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 2011년 1월 19일자로 출원되고, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 가출원 제61/434,405호로부터
우선권을 주장한다.

- [0003] 본 발명은 일반적으로 특히 빈혈 관리에 관하여 철 항상성 질환의 치료, 예방 및 개선에 관한 것이다. 본 발명은 보다 구체적으로 혈모주밸린-면역글로불린 Fc 도메인 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웹티드 모방체(mimetics), 및 인간에게서 혈청 철, 혈청 혈모글로빈 및/또는 혈마토크립 수준을 변경하기 위해 이를 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0004] 철은 거의 모든 유기체의 성장 및 생존에 요구되는 필수 요소이다. 적혈구(RBC)는 폐로부터 산소를 신체의 정상적인 활동에 필요한 에너지를 공급하기 위해 반응하는 신체의 근육 및 기관 모두에 운반하는 적(赤) 철-풍부 단백질인 혈모글로빈(Hb)을 함유한다. 이들이 함유하는 적혈구의 수 또는 혈모글로빈의 양이 정상치 이하로 떨어질 경우, 신체는 보다 적은 산소를 수용하고, 적절히 기능하는 데 필요한 것보다 더 적은 에너지를 생성한다. 이 상태는 일반적으로 빈혈이라고 지칭된다. 유아 및 어린이 사이에서 빈혈의 일반적인 원인은 철분 결핍이다. 미국 어린이의 20% 및 개발도상국 어린이의 80%는 18세까지의 몇몇 시점에서 빈혈성으로 될 것이다[참조: Martin, P. L., et al. The Anemias, Principles and Practices of Pediatrics, 1657 (2d ed., Lippincott 1994)].

- [0005] 포유동물에서, 철 균형은 주로 식이 철분의 십이지장 흡수 수준에서 조절된다. 인간에서, 유전성 색소침착증(HH)은 혈장 및 특히 췌장, 간 및 피부를 포함하는 다수 기관에서 철분 과부하를 유도하고 철 침전물에 기인하여 이들 기관 및 조직을 손상시키는 식이 철분의 과흡수에 의해 유발되는 일반적인 상염색체 퇴행성 유전 질환이다.

- [0006] 청소년 색소침착증은 주요 철 조절 호르몬 헵시딘(HAMP) 및 혈모주밸린(HFE2)을 코딩하는 유전자의 돌연변이에 의해 유발되는 철분 과부하 질환이다[참조: Roetto, A., et al. 2003. Nut. Genet. 33:21-22; Papanikolaou, G., et al. 2004. Nut. Genet. 36:77-82.]. 혈모주밸린은 골 혈성 단백질(BMP) 공동-수용체이고, 혈모주밸린 매개 BMP 신호는 헵시딘 발현 및 철분 대사를 조절한다는 것이 밝혀졌다[참조: Babitt, J.L., et al. 2006. Nat. Genet. 38:531-539; Babitt, J.L., et al. 2007. J Clin Invest. 117: 1933-1939.]. 그러나, 생체내에서 헵시딘의 내인성 BMP 조절제(들)는 공지되지 않았다.

- [0007] 혈모주밸린(또한, RGMc로서 공지됨)은 50-60% 아미노산 동일성을 공유하는, RGMa 및 DRAGON(RGMb)을 포함하는 단백질의 반발 유도 분자 부류의 일원이다[참조: Samad, T.A., et al. 2004. J. Neurosci. 24:2027-2036.].

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 헵시딘 발현 및 철분 대사를 조절하기 위한 비용 효과적이고 효율적인 방법이 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 혈모주밸린("HJV")-면역글로불린 Fc 도메인 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 철 항상성 질환을 치료하기 위한 이들 단백질의 사용 방법을 제공한다. HJV는 포유동물 HJV일 수 있다. 보다 구체적으로, HJV는 마우스 또는 인간 HJV일 수 있다.

- [0010] 본 발명은 서열번호 9의 서열과 95% 동일한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웹티드 모방체를 포함하는 조성물을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웹티드 모방체는 크기 배제 크로마토그래피로 측정된 바와 같이 적어도 98% 순수하다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웹티드 모방체는 글리코실화되어 있다. 특정한 실시양태에서, 서열번호 1 및 서열번호 9의 아스파라긴 83, 아스파라긴 178 및 아스파라긴 337은 N-글리코실화 부위이다. 이 실시양태의 한 국면에서, 글리코실화 패턴은 포유동물 글리코실화 패턴이다. 구체적으로, 글리코실화 패턴은 쳐이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주로부터 유래한다.

- [0011] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웹티드 모방체의 N-말단 아미노

산은 글루타민이다. 이 실시양태의 하나의 국면에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체의 N-말단은 QCKILRCNAE(서열번호 10)이다. 또 다른 실시양태에서, N-말단 단편은 서열번호 1 또는 9의 최초 150개 아미노산으로부터의 임의의 단편일 수 있다.

[0012] 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은 실질적으로 피로겐을 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체의 혈청 반감기는 적어도 10시간이다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체는 K_D 가 적어도 10^{-7} M인 골 형성 단백질-6("BMP-6")에 결합하고, BMP-6 신호전달을 억제한다. 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은, 투여될 경우, 대상체의 혈마토크릿을 증가시킨다. 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은, 빈혈 대상체에게 1개월 이상 동안 투여될 경우, 빈혈 대상체에서 혈마토크릿을 적어도 정상 수준까지 증가시킨다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체는 호모이량체를 형성한다. 이 실시양태의 한 국면에서, 호모이량체는 Fc 헌지 영역에서 형성된다. 보다 구체적으로, 호모이량체는 서열번호 9에서 시스테인 373, 380 및/또는 383 사이의 화학적 상호작용을 통해 형성된다. 구체적으로, 화학적 상호작용은 디설파이드 결합이다.

[0014] 본 발명은 또한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 핵산 분자는 서열번호 11의 서열과 95% 동일한 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0016] 본 발명은 또한 치료학적 유효량의 상기한 조성물을 대상체에게 투여하고, 이에 의해 철 항상성 질환을 치료하고 빈혈을 개선시킴으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 생성되는 빈혈과 함께 철 항상성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체는 N-말단 폴리웨티드 및 C-말단 폴리웨티드를 포함하고, 상기 N-말단 폴리웨티드는 서열번호 1의 서열과 95% 동일한 서열을 포함하고, 상기 C-말단 웨티드는 서열번호 3, 4, 5, 6 및 7로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열과 95% 동일한 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체는, 크기 배제 크로마토그래피로 측정하여, 적어도 98% 순수하다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체는 글리코실화되어 있다. 이 실시양태의 한 국면에서, 글리코실화 패턴은 포유동물 글리코실화 패턴이다. 구체적으로, 글리코실화 패턴은 채이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주로부터 유래한다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체의 N-말단 아미노산은 글루타민이다. 이 실시양태의 하나의 국면에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체의 N-말단은 QCKILRCNAE(서열번호 10)이다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은 실질적으로 피로겐을 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체의 혈청 반감기는 적어도 10시간이다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨티드 모방체는 K_D 가 적어도 10^{-7} M인 골 형성 단백질-6("BMP-6")에 결합하고, BMP-6 신호전달을 억제한다. 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은, 투여될 경우, 대상체의 혈마토크릿을 증가시킨다. 또 다른 실시양태에서, 본 조성물은, 빈혈 대상체에게 1개월 이상 동안 투여될 경우, 빈혈 대상체에서 혈마토크릿을 적어도 정상 수준까지 증가시킨다.

[0021] 본 발명은 또한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 11을 포함한다.

[0022] 본 발명은 또한 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본 세포는 CHO 세포이다.

[0023] 본 발명은 또한 치료학적 유효량의 상기한 조성물을 대상체에게 투여하고, 이에 의해 철 항상성 질환을 치료하고/하거나 빈혈을 개선시킴으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 철 항상성 질환을 치료하고/하거나 빈혈을 개선

시키는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 치료학적 유효량의 상기한 조성물을 대상체에게 투여하고, 이에 의해 암을 치료함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 서열번호 3 내지 7의 아미노산 서열의 정렬을 도시한다.

도 2는 HJV.Fc 이량체의 개략도를 도시한다.

도 3은 대조군 랫트와 비교하여 20mg/kg의 HJV.Fc 투여된 빈혈 랫트의 혈청 혼모글로빈 수준을 나타내는 선 그래프이다.

도 4는 대조군 랫트와 비교하여 2 또는 20mg/kg의 HJV.Fc 투여된 빈혈 랫트의 혈청 혼모글로빈 수준을 나타내는 선 그래프이다.

도 5는 대조군 랫트와 비교하여 20mg/kg의 HJV.Fc 투여된 빈혈 랫트의 혈마토크릿 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

도 6은 대조군 랫트와 비교하여 20mg/kg의 HJV.Fc 투여된 빈혈 랫트의 혈청 철을 나타내는 막대 그래프이다.

도 7a는 비아코어(Biacore) 결합 분석으로부터의 데이터를 사용하는 BMP6에 대한 HJV.His (호모이량체) 친화도를 나타내는 그래프이다.

도 7b는 비아코어 결합 분석으로부터의 데이터를 사용하는 BMP6에 대한 HJV.Fc (호모이량체) 친화도를 나타내는 그래프이다.

도 8은 HJV.Fc가 세포계 생체억제 분석에서 BMP6 활성을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.

도 9는 HPLC 분석에 의해 호모이량체성 HJV.Fc의 >95% 순도 단량체의 제조를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 상세한 설명

[0027] 본 발명자들은 빈혈을 치료하기 위한 신규 치료 조성물을 발견했다. 이들 조성물은 혼모주밸린("HJV") 및 IgG Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체이다. 본 발명은 IgG Fc 영역에 융합된 HJV의 아미노산 서열의 적어도 일부를 포함하는 웨티드를 포함하는 융합 단백질 또는 이의 유도체를 제공한다. 특정한 실시양태에서, 융합 단백질의 HJV 부분은 융합 단백질의 N-말단 부분이고, 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 C-말단 부분이다. 기타 실시양태에서, 융합 단백질의 HJV 부분은 융합 단백질의 C-말단 부분이고, 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 N-말단 부분이다.

[0028] 특정한 실시양태에서, 융합 단백질의 N-말단 및 C-말단 부분은 링커와 결합된다. 특정한 실시양태에서, 링커는 1 내지 50개 아미노산 길이의 폴리웨티드이다. 보다 특정한 실시양태에서, 링커는 2 내지 25개 아미노산 길이이다. 보다 특정한 실시양태에서, 링커는 3 내지 15개 아미노산 길이이다. 보다 특정한 실시양태에서, 링커는 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 아미노산 길이이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 링커는 5개 아미노산 길이이다. 특정한 실시양태에서, 링커는 글리신 및 프롤린 잔기가 풍부할 수 있고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단일 서열 또는 트레오닌/세린 및 글리신(예: TG)의 반복 서열을 함유할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 돌연변이는 링커(존재하는 경우) 및/또는 Fc 단백질에서 이루어져 단백질의 반감기를 변경시킬 수 있다.

[0029] 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체의 투여는 혈시딘 발현을 감소시킨다. 본원에서 기술된 조성물은 철 대사 질환을 치료하고 혈청 혼모글로빈 및 혈마토크릿을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0030] HJV 부분

[0031] 본원에서 기재된 융합 단백질의 인간 혼모주밸린("HJV") 부분은 철의 이동을 증가시키고/시키거나 철 대사 질환

과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료하거나 완화시킬 수 있는 HJV의 가용성 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분은 서열번호 1의 부분과 적어도 75%(예: 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일하다.

[0032] HJV의 아미노산 서열은 하기 표 1에 제시된다:

[표 1]

표 1 N-말단 신호 서열 또는 C-말단 GPI 도메인 부재하에 인간 HJV 의

아미노산 서열(364 개 아미노산; 서열번호 1)

10	20	30	40	50	60
QCKILRCNAE	YVSSTLSLRG	GGSSGALRGG	GGGGRGGGVG	SGGLCRALRS	YALCTRRTAR
70	80	90	100	110	120
TCRGDLAFHS	AVHGIEDLMI	QHNCSRQGPT	APPPIRGPAL	PGAGSGLPAP	DPCDYEGRFS
130	140	150	160	170	180
RLHGRPPGFL	HCASFDPHV	RSFHHHFHTC	RVQGAWPPLD	NDFLFVQATS	SPMALGANAT
190	200	210	220	230	240
ATRKLTIIIFK	NMQECIDQKV	YQAEVDNLPV	AFEDGSINGG	DRPGGSSLSSI	QTANPGNHVE
250	260	270	280	290	300
IQAAYIGTTI	IIRQTAGQLS	FSIKVAEDVA	MAFSAEQDLQ	LCVGGCPPSQ	RLSRSERNRR
310	320	330	340	350	360
GAITIDTARR	LCKEGLPVED	AYFHSCVFDV	LISGDPNFTV	AAQAALEDAR	AFLPDLEKLH
364					
LFPS					

[0034]

특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 융합 단백질의 HJV 부분은 수용액에 용해되고, 철을 이동시키고/시키거나 철 대사 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료하거나 완화시킬 수 있는 서열번호 1의 임의의 단편이다. 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분을 구성하는 서열번호 1의 단편은 서열번호 1의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 또는 360개 아미노산의 단편을 포함한다. 이러한 단편들은 서열번호 1의 임의 범위의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 특정한 실시양태에서, 단편은 서열번호 1의 아미노산 1 내지 150 중 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150개 아미노산을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분은 서열번호 1의 단편과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 1의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 또는 360개 아미노산을 포함한다.

[0036]

본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분을 구성하는 서열번호 1의 단편은 서열번호 1의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 또는 360개 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분은 서열번호 1의 단편과 80, 85, 90, 95, 97, 98, 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 1의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350 또는 360개 연속 아미노산을 포함한다.

[0037]

특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 1과 75% 초과의 동일성을 갖는다. 기타 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 1과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖는다. 특별한 특정의 실시양태에서, 서열번호 1과 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분의 차이는 하기 기재된 바와 같이 보존적 아미노산 변화이다.

[0038] IgG Fc 부분

본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분과 융합될 경우, 철을 이동시키고/시키거나 철 대사 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료하거나 완화시킬 수 있는 면역글로불린 또는 이의 유도체의 Fc 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은, 대상체에게 투여될 경우, 융합 단백질을 안정화시킨다. 특정한 실시양태에서, IgG Fc 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 웨티드 모방체의 부착은 혈청 단백질의 혈청 반감기를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 60, 72, 84 또는 96시간보다 크게 한다. 본 발명의 융합 단백질과 상용성인 몇몇 서열이 존재한다.

특정한 실시양태에서, IgG Fc 도메인은 CH2 및 CH3 도메인 및 헌지 영역을 포함한다. 기타 실시양태에서, IgG Fc는 또한 CH1 영역의 적어도 일부를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 융합 단백질의 HJV 부분은 헌지 영역에 직접 결합된다. 기타 실시양태에서, Fc 도메인은 융합 단백질의 HJV 부분에 결합된 이의 CH1 도메인으로부터 헌지 영역에 서열 N-말단을 함유한다. 기타 실시양태에서, 링커는 헌지 영역에, 또는 Fc 도메인 상의 CH1 도메인에 결합된다. 보다 특별한 실시양태에서, 헌지 영역은 컨센서스 서열 X₁-P-X₂-X₃(서열번호 2)(여기서, X₁은 시스테인 또는 세린이고, X₂는 류신 또는 프롤린이고, X₃은 시스테인 또는 세린이다)을 갖는 4개 아미노산을 포함한다. 순수한 면역글로불린의 헌지 영역은 효과적인 항원-항체 결합을 위한 충분한 유연성을 단백질에 제공한다. 본 발명의 특정한 실시양태에서, 헌지 영역은, 특히 융합 단백질이 이량체 형태로 존재할 경우, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분에 포함되어 이의 가요성을 유지시킨다.

특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 서열번호 3의 부분과 적어도 75%(예: 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일하다.

[0042] [표 2]

표 2. IgG Fc 영역 유도체의 아미노산 서열(232 개 아미노산; 서열번호 3)

10	20	30	40	50	60
DPKSCDKPHT	CPLCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
70	80	90	100	110	120
NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
130	140	150	160	170	180
ISKAKGQPREG	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKATP
190	200	210	220	230	232
PVLDSDGSSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK

[0043]

특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분과 융합될 경우, 수용액에 용해되고 철을 이동시키고/시키거나 철 대사 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료하거나 완화시킬 수 있는 서열번호 3의 임의의 단편이다. 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분을 구성하는 서열번호 3의 단편은 서열번호 3의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 아미노산의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 서열번호 3의 단편과 80, 85, 90, 95, 97, 98, 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 3의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 아미노산을 포함한다.

본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분을 구성하는 서열번호 3의 단편은 서열번호 3의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 서열번호 3의 단편과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 3의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,

80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 연속 아미노산을 포함한다.

[0046] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 3과 75% 초과의 동일성을 갖는다. 기타 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 3과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖는다. 특별한 특정의 실시양태에서, 서열번호 3과 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분 사이의 차이는 하기 기재된 바와 같이 보존적 아미노산 변화이다.

[0047] 이의 유도체의 기타 서열 또는 단편은 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분으로서 사용하기에 적합하다. IgG Fc 유도체(서열번호 3), 인간 IgG1 Fc(서열번호 4), 리제너론(Regeneron)에 의해 개발된 VEGFR-Fc 융합으로부터의 Fc 영역(서열번호 5), 브리스톨 마이어스 스퀴브(Bristol Myers Squibb)에 의해 개발된 CTLA4-Fc 융합으로부터의 Fc 영역(ORENCIATM 또는 아바타셉트)(서열번호 6), 리제너론에 의해 개발된 IL1R-Fc 융합으로부터의 Fc 영역(ARCALYSTTM 또는 릴로나셉트)(서열번호 7) 및 후미라(HUMIRA[®])로부터의 Fc 영역(아달루미닙)의 정렬.

[0048] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은, 본 발명의 융합 단백질의 HJV 부분과 융합될 경우, 수용액에 용해되고, 철을 이동시키고/시키거나 철 대사 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료하거나 완화시킬 수 있는 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 임의의 단편이다. 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분을 구성하는 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 단편은 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 아미노산의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 서열번호 3의 단편과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 아미노산을 포함한다.

[0049] 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분을 구성하는 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 단편은 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 서열번호 3과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖고, 여기서 단편은 서열번호 4, 5, 6 또는 7의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 또는 230개 연속 아미노산을 포함한다.

[0050] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 4, 5, 6 또는 7과 75% 초과의 동일성을 갖는다. 기타 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분은 전체 길이 또는 단편이고, 서열번호 4, 5, 6 또는 7과 80, 85, 90, 95, 97, 98 또는 99% 초과의 동일성을 갖는다. 특별한 특정의 실시양태에서, 서열번호 4, 5, 6 또는 7과 본 발명의 융합 단백질의 IgG Fc 부분의 차이는 하기 기재된 바와 같이 보존적 아미노산 변화이다.

0051] 링커

[0052] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질은 융합 단백질의 HJV 부분과 IgG Fc 부분을 연결하는 링커를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 링커는 웨პ티드이다. 대안의 실시양태에서, 웨პ티드는 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 및 50개 아미노산 길이일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 링커를 구성하는 아미노산은 각 위치에서 글리신 또는 세린이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 링커는 서열 GGGGG(서열번호 8)을 갖는다.

[0053] 특정한 실시양태에서, 링커는 글리신 및 프롤린 잔기가 풍부할 수 있고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단일 서열 또는 트레오닌/세린 및 글리신(예: TG)의 반복 서열을 함유할 수 있다.

[0054] 특정한 실시양태에서, 돌연변이는 링커(존재하는 경우) 및/또는 Fc 단백질에서 이루어져 단백질의 반감기를 변경시킬 수 있다.

[0055] 이량체화

[0056] 특정한 실시양태에서, 융합 단백질은 두 개의 동일한 폴리웨პ티드 서브유닛을 포함하는 이량체 형태로 존재한다.

도 2에 개략적으로 도시된 실시양태에서, N-말단으로부터 C-말단으로 각 폴리펩티드 서브유닛은 하기 제시된 서열번호 9의 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0057] [표 3]

표 3. 본 발명의 HJV.Fc 융합 단백질의 아미노산 서열 (596개 아미노산; 서열번호 9)					
10	20	30	40	50	60
QCKILRCNAE	YVSSTLSLRG	GGSSGALRGG	GGGGRRGGVG	SGGLCRALRS	YALCTRRTAR
70	80	90	100	110	120
TCRGDLAFHS	AVHGIEDLMI	QHNCSRQGPT	APPPIRGPAL	PGAGSGLPAP	DPCDYEGRFS
130	140	150	160	170	180
RLHGRPPGFL	HCASFQDPHV	RSFHHHFHTC	RVQGAWPLLD	NDFLFVQATS	SPMALGANAT
190	200	210	220	230	240
ATRKLTIIIFK	NMQECIDQKV	YQAEVDNLPV	AFEDGSINGG	DRPGGSSLISI	QTANPGNHVE
250	260	270	280	290	300
IQAAYIGTTI	IIRQTAGQLS	FSIKVAEDVA	MAFSAEQDLQ	LCVGGCPPSQ	RLSRSENRNR
310	320	330	340	350	360
GAITIDTARR	LCKEGLPVED	AYFHSCVFDV	LISGDPNFTV	AAQAALEDAR	AFLPDLEKLH
370	380	390	400	410	420
LFPSPDKSCD	KPHTCPLCPA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP
430	440	450	460	470	480
EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP
490	500	510	520	530	540
IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY
550	560	570	580	590	596
KATPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK

[0058]

[0059] 두 폴리펩티드 서브유닛은 각 힌지 영역 사이의 디설파이드 결합에 의해 함께 결합하여 이량체 구조를 형성한다. 호모이량체는 Fc 힌지 영역에서 형성될 수 있다. 보다 구체적으로, 호모이량체는 서열번호 9에서 시스테인 373, 380 및/또는 383 사이의 화학적 상호작용을 통해 형성될 수 있다.

[0060]

서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 발현시키는데 사용된 벡터의 핵산 서열은 하기 제시된다.

[0061]

[卷 4]

표 4. 서열번호 9를 코딩하는 벡터의 핵산 서열(서열번호 11)

[0062]

tagtccttc ggtcctccga tcgttgcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat	1920
ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcc tccgtaaat gctttctgt	1980
gactggtag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc	2040
ttgcccggcg tcaataccggg ataataccgc gcccacatgc agaaactttaa aagtgtctat	2100
cattggaaaa cgttcttcgg ggcggaaaact ctcaaggatc ttaccgttgt tgagatccag	2160
ttcgatgtaa cccactcgcg cacccaaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt	2220
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggaaataa gggcgacacg	2280
gaaatgttga atactcatac tcttccttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	2340
ttgtctcatg agcggataca tattttagaa aataaaacaaa taggggttcc	2400
gcccacatcc ccccgaaaag tgcccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt	2460
aacctataaa aataggcgta taacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgtacgg	2520
tgaaaacccctc tgacacatgc agctccggga gacggtcaca gcttgctgt aagcgatgc	2580
cgggagcaga caagccccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggccgggtgtc ggggtggct	2640
taactatcg gcatcagagc agattgtact gagagcgcac catatgcgtt gtgaatattacc	2700
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcatt cagggccat tcgcccatttca ggctgcgcaa	2760
ctgttggaa gggcgatcg tgccggccctc ttgcgttattt ccgcagctgg cgaaaggggg	2820
atgtgtcgca aggcgattaa gttgggttac gccagggttt tcccaagtac gacgttgtaa	2880
aacgacggcc agtgccaagc tagccggccgc cacgagtcta gctagagttt acgttgcagc	2940
tcggaacccc tatacattga atcaatattt gcaatttagcc atatttagtca ttgggttat	3000
agcataaatac aatattggct attggccattt gcatacggtt tatctatatac ataataatgt	3060
catttatattt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactatgtt	3120
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattatgt tcataccca tataatgggt tccgcgttac	3180
ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accggccaaac gaccccccggc cattgacgtc	3240
aataatgacg tatgttccca tagtaacggc aataggactt ttccatttgcgtt gtcacatgg	3300
ggagtatttta cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc	3360
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gccccctgg cattatgccc agtacatgac	3420
cttacgggac ttccctactt ggcaatgttacat ctacgttattt gtcacatgcgtt ttaccatgtt	3480
gatgcgggtt tggcgttaca ccaatggcg tggatagccg tttgactcac ggggatttcc	3540
aagtctccac cccatttgcgtt ctaatgggag tttgttttgg cacccaaatc aacgggactt	3600
tccaaaatgt cgttaataacc cccggccgtt gacgcaatggc ggcggtaggc gtgtacgg	3660
ggagggtctat ataaggcagag ctgcgtttagt gaaccgtcgtt atcggggatc cgatatccac	3720
catggggag ccaggccagt ccccttagtcc caggcccttcc catggcagtc ccccaactct	3780
aagcaactctc actctcttgc tgctctctgt tggacatgtt cattctcaat gcaagatctt	3840
ccgctgcaat gctgagttacg tattgtccac tctgacccctt agagggtggg gttcatcagg	3900
agcaacttgcg ggaggaggag gaggaggccg ggggtgggggtt gtcggctctg gcccggct	3960
tcgagccctc cgctccatgt cgctctgcac tcggcgaccc gcccgcaccc gcccgggg	4020
cctcgccctt cattccggcg tacatggcat cgaagacctg atgatccagc acaactgctc	4080
ccggccaggcc cctacagcccc ctccccccggcc cccggggccccc gcccctccag gcccgggtc	4140
cggcctccct gccccggacc cttgtacta tgaaggccgg tttccggc tgcgttgtcg	4200
tccccgggg ttcttgcattt ggcgttccctt cggggacccc catgtgcgtca gcttccacca	4260

[0063]

tcactttcac acatgcgcgtg tccaaaggagc ttggccctcta ctggataatg acttccctttt	4320
tgtccaagcc accagctccc ccatggcggtt gggggccaaac gctaccgcgc cccggaagct	4380
caccatcata tttaagaaca tgcaggaatg cattgatca gagggtgtate aggctgagggt	4440
ggataatctt cctgtagcc ttgaagatgg ttctatcaat ggaggtgtacc gacctgggggg	4500
atccagtttg tcgattcaaa ctgctaaccct tggaaaccat gtggagatcc aagctgccta	4560
catggcaca actataataca tgcggcagac agctggggcag ctcttcattt ccataaaggc	4620
agcagaggat gtggccatgg ctttctcagc tgaacaggac ctgcagctct gtgttgggggg	4680
gtgcccctcca agtcagcgcac ttcttcgatc agagcgcata ctgcggggag ctataaccat	4740
tgatactgcc agacggctgt gcaaggaaagg gttccagtg gaagatgtctt acttccatcc	4800
ctgtgtctttt gatgttttaa ttcttgggtga tcccaactttt accgtggcag ctcaaggcaga	4860
actggaggat gccccgagctt tcttgcacca ctttagagaag ctgcatctctt tccccctcagg	4920
tgggggttgtt ggtgtatccca atcttgcata ctttttttttcc acatgccccat tggcccgagc	4980
acctgaactc ctggggggggac ctgcgtgtttt ctttttttttcc ctttttttttcc aggcacccct	5040
catgtatcc cggacccctg aggttcacatg ctttttttttcc gacgtggcc gacgtggcc accaaagaccc	5100
ttaggtcaag ttcaactgtt acgtggacgg ctttttttttcc cataatgcgc accaaagaccc	5160
gcggggaggag ctttttttttcc gacgttttttcc gtttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5220
ggactggctg aatggcaagg agtacaaatgtt ctttttttttcc aaaaaagccct ttttttttttcc	5280
catcgagaaa accatctccca aagccaaagg gtttttttttcc gtttttttttcc ttttttttttcc	5340
gcggccatcc cggatggacgc ttttttttttcc ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5400
cttttatccca agcggacatcc ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5460
caaggccacgg ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5520
cgtggacaag agcggatggc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5580
tcttgcacaaac ctttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc ttttttttttcc	5638

[0064]

서열번호 11의 핵산 14 내지 250은 SV40 폴리아데노신을 형성한다. 핵산 643 내지 1297은 복제 기원을 형성한다. 핵산 1438 내지 2413은 β -락카타마제를 코딩한다. 핵산 2932 내지 3706은 CMV 프로모터를 형성한다. 핵산 3722 내지 3826은 HJV 리더를 코딩한다. 핵산 3827 내지 4918은 사람 HJV를 코딩한다. 핵산 4919 내지 4933은 글리신 스페이서를 코딩한다. 핵산 4934 내지 5629는 IgG Fc를 코딩한다. 서열번호 11은 도면에서 개략적으로 도시된다.

[0066]

특정 실시양태에 따르면, 본 발명의 융합 단백질은 이량체를 형성해야 한다. 특정한 실시양태에서, 융합 단백질은 이량체를 형성하지만, 4량체, 6량체, 8량체 등과 같은 보다 고차수 응집물을 형성하지 않는다. 이러한 고차수 응집물은 융합 단백질의 용해도 및 이의 치료 효과에 영향을 미칠 수 있다.

[0067]

정의

[0068]

달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수 표현은 복수를 포함해야 하고, 복수 표현은 단수를 포함해야 한다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용된 명명법 및 이들 기술은 본 분야에 잘 알려지고 통상적으로 사용되는 것들이다. 표준 기술은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성 및 조직 배양 및 형질전환(예: 전기천공, 리포펙션)을 위해 사용된다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업자의 지침에 따라서 또는 본 기술분야에서 통상 달성된 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 실시는, 반대로 구체적으로 기재되지 않는 한, 본 기술분야의 기술 내의 바이러스학, 면역학, 미생물학, 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 방법을 사용하고, 이중 다수는 예시 목적으로 하기에 기재된다. 이러한 기술은 문헌에서 완전히 설명된다[참조: Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)].

[0069]

본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학적 및 약제학적 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 이의 실험 실 절차 및 기술은 본 기술분야에 잘 알려지고 통상 사용되는 것들이다. 표준 기술은 화학적 합성, 화학적 분석, 약제학적 제제, 제형 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 사용된다.

- [0070] 다음 정의가 본 명세서를 이해하는데 유용하다:
- [0071] 감염을 치료할 목적이 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 포함하는 임의의 포유동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0072] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 재발방지 수단 둘 다를 지칭하고, 목적은 표적화된 병리학적 상태 또는 질환을 예방하거나 늦추는(경감시키는) 것이다. 치료를 필요로 하는 것들은 이미 질환을 가질 뿐만 아니라 질환을 갖기 쉬운 것들 또는 질환이 예방되어야 할 것들을 포함한다. 대상체 또는 포유동물은 본 발명의 방법에 따라 항체의 치료량을 수용한 후, 환자가 다음 중의 하나 이상에서 관찰가능하고/하거나 측정가능한 감소 또는 부재를 나타낼 경우에 감염을 성공적으로 "치료했다": 감염 세포 수의 감소 또는 감염 세포의 부재; 감염된 총 세포 비율의 감소; 및 특정 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감; 감소된 질병률 및 사망률, 및 삶 문제의 품질 개선. 질환에서 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 친숙한 통상적인 절차로 용이하게 측정가능하다.
- [0073] 용어 "치료학적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 질병을 "치료하기에" 효과적인 조성물의 양을 지칭한다. "치료하는"의 선행 정의를 참조한다.
- [0074] "만성" 투여는 연장된 기간 동안 초기 치료학적 효과(활성)를 유지시키기 위해, 급성 방식과 대조적인 연속 방식으로 제제(들)를 투여함을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단 없이 연속적으로 수행되지 않고 오히려 특성상 주기적인 치료이다.
- [0075] 본원에 사용된 "담체"는 사용된 용량 및 농도에서 이에 노출된 세포 또는 포유동물에 무독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 흔히, 생리학적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예는 완충제, 예를 들면, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기 산; 아스코르브산을 포함하는 산화방지제; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐파롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 퀼레이트화제, 예를 들면, EDTA; 당 알콜, 예를 들면, 만니톨 또는 슬비톨; 염형성 카운터이온(counterion), 예를 들면, 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, TWEEN™ 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 및 PLURONICS™을 포함한다.
- [0076] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 일본쇄 또는 이본쇄 RNA, DNA, PNA, 또는 혼합 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 서열, 게놈외 및 플라스미드 서열, 및 폴리펩티드를 발현시키거나 발현시키도록 적응될 수 있는 보다 작은 조작된 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다.
- [0077] "분리된 핵산"은 실질적으로 기타 게놈 DNA 서열 뿐만 아니라 단백질 또는 복합체, 예를 들면, 자연적으로 천연 서열을 동반하는 리보솜 및 폴리미라제로부터 분리된 핵산이다. 본 용어는 이의 천연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하고, 재조합 또는 클로닝 DNA 분리물 및 화학적으로 합성된 동족체 또는 이종 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 동족체를 포함한다. 실질적으로 순수한 핵산은 핵산의 분리된 형태를 포함한다. 물론, 이는 원래 분리된 핵산을 지칭하고, 나중에 인간의 손으로 분리된 핵산에 부가된 유전자 또는 서열을 제외하지 않는다.
- [0078] 용어 "폴리펩티드"는 이의 통상적인 의미, 즉 아미노산의 서열로서 사용된다. 폴리펩티드는 생성물의 특정 길이로 제한되지 않는다. 펩티드, 올리고펩티드 및 단백질은 폴리펩티드의 정의 내에 포함되고, 이러한 용어는, 구체적으로 달리 기재되지 않는 한, 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들면, 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등 뿐만 아니라 자연 발생적이고 비자연 발생적이기도 한 본 기술분야에 공지된 기타 변형을 지칭하지 않거나 배제하지 않는다. 폴리펩티드는 전체 단백질, 또는 이의 서브서열일 수 있다. 본 명세서의 문맥상 목적하는 특별한 폴리펩티드는 CDR을 포함하고 항원 또는 인플루엔자 A-감염 세포를 결합할 수 있는 아미노산 서열이다.
- [0079] "분리된 폴리펩티드"는 이의 자연 환경의 성분으로부터 동정되고, 분리되고/되거나 회수된 것이다. 바람직한 실시양태에서, 분리된 폴리펩티드는 (1) 로리법(Lowry method)으로 측정된 바와 같이 95중량% 초과의 폴리펩티드로, 가장 바람직하게는 99중량% 이상으로, (2) 회전 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 코마시에 블루(Coomassie blue) 또는, 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균일성으로 정제시킬 수 있다. 분리된 폴리

펩티드는 재조합 세포 내에서 동일반응계 폴리펩티드를 포함하는데, 이는 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 분리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정체 단계로 제조된다.

[0080] "천연 서열" 폴리뉴클레오티드는 자연으로부터 유도된 폴리뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 것이다. "천연 서열" 폴리펩티드는 자연으로부터(예: 임의의 종으로부터) 유래된 폴리펩티드(예: 항체)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이다. 이러한 천연 서열 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 자연으로부터 분리될 수 있거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0081] 폴리뉴클레오티드 "변이체"는, 용어가 본원에서 사용될 때, 통상적으로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입으로 본원에서 구체적으로 기재된 폴리뉴클레오티드로부터 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 이러한 변이체는 자연 발생적일 수 있거나, 합성적으로, 예를 들면, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키고, 본원에서 기재된 코딩 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가하고/하거나 본 기술분야에 익히 공지된 다수의 기술 중의 임의의 기술을 사용하여 생성될 수 있다.

[0082] 폴리펩티드 "변이체"는, 용어가 본원에 사용될 때, 통상적으로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입으로 본원에서 구체적으로 기재된 폴리펩티드로부터 상이한 폴리펩티드이다. 이러한 변이체는 자연 발생적일 수 있거나, 합성적으로, 예를 들면, 본 발명의 하나 이상의 상기 폴리펩티드 서열을 변형시키고, 본원에서 기재된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가하고/하거나 본 기술분야에 익히 공지된 다수의 기술 중의 임의의 기술을 사용하여 생성될 수 있다.

[0083] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 변형이 이루어질 수 있고, 바람직한 특성을 갖는 변이체 또는 유도체 폴리펩티드를 코딩하는 작용성 분자를 수득한다. 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시켜 본 발명의 폴리펩티드의 등가의 또는 심지어 향상된 변이체 또는 부분을 생성하는 것이 바람직할 경우, 본 기술분야의 숙련가는 통상적으로 코딩 DNA 서열의 코돈 중의 하나 이상을 변화시킨다.

[0084] 예를 들면, 특정 아미노산은 기타 폴리펩티드(예: 항원) 또는 세포를 결합시키는 이의 능력의 상당한 손실 없이 단백질 구조에서 기타 아미노산을 치환할 수 있다. 그것이 본 단백질의 생물학적 작용성 활성을 규정하는 단백질의 결합 성능 및 특성이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환이 단백질 서열 및, 물론 이의 주요 DNA 코딩 서열에서 수행될 수 있고, 그럼에도 불구하고 유사 특성을 갖는 단백질을 수득할 수 있다. 각종 변화가 기재된 조성물의 펩티드 서열, 또는 이들의 생물학적 유용성 또는 활성을 상당한 손실 없이 상기 펩티드를 코딩하는 상응하는 DNA 서열에서 수행될 수 있다.

[0085] 많은 경우에, 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 함유한다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산을 치환하여 펩티드 화학 기술분야의 숙련자가 폴리펩티드의 2차 구조 및 실질적으로 변화되지 않는 폴리펩티드의 수치요법 특성을 기대할 수 있도록 하는 것이다.

[0086] 특정 아미노산이 유사한 수치요법 지수 또는 점수를 갖는 기타 아미노산으로 치환될 수 있고 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 제공할 수 있고, 즉 생물학적 작용성 등가 단백질을 수득할 수 있다는 것이 본 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 변화를 제공하는데 있어서, 수치요법 지수가 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ± 1 이내인 것들이 특히 바람직하고, ± 0.5 이내인 것들이 훨씬 더 특히 바람직하다. 유사한 아미노산의 치환은 친수성에 기초하여 효과적으로 수행될 수 있다는 것이 또한 본 기술분야에서 이해된다. 미국 특히 제 4,554,101호는 인접하는 아미노산의 친수성에 의해 통제되는 단백질의 최대 국소 평균 친수성이 단백질의 생물학적 특성과 관련이 있다고 기재한다.

[0087] 상기 서술한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환의 상대적인 유사성, 예를 들면, 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 상기한 특성 중의 하나 이상을 고려하는 예시적인 치환은 본 기술분야의 기술자에게 익히 공지되어 있고, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.

[0088] 아미노산 치환은 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양쪽성 특성에서의 유사성에 기초하여 추가로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고, 양으로 하전된 아미노산은 리신 및 아르기닌을 포함하고, 유사한 친수성 값을 갖는 하전되지 않은 극성 헤드 그룹을 갖는 아미노산은 류신, 이소류신 및 발린, 글리신 및 알라닌, 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적 변화를 나타낼 수 있는 아미노산의 기타 그룹은 (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg,

his; 및 (5) phe, tyr, trp, his를 포함한다. 변이체는 또한, 또는 대안적으로 비보존적 변화를 함유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 5개 아미노산 또는 보다 소수의 치환, 결실 또는 부가로 천연 서열과 상이하다. 변이체는 또한 (또는 대안적으로), 예를 들면, 폴리펩티드의 면역원성, 2차 구조 및 수치요법 특성에 최소 영향을 갖는 아미노산의 결실 또는 부가로 변형될 수 있다.

[0089] 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 신호(또는 리더) 서열을 포함할 수 있고, 이는 단백질의 전이를 해독과 동시에 또는 해독 후에 유도한다. 또한, 폴리펩티드는 본 폴리펩티드(예: poly-His)의 합성, 정제 또는 동정을 용이하게 하기 위해 또는 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 향상시키기 위해 링커 또는 기타 서열과 접합될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 영역과 접합될 수 있다.

[0090] 비교용의 최적 서열 정렬은, 디펠트 파라미터를 사용하여, 생물정보 소프트웨어(DNASTAR, Inc., Madison, WI)의 레이저진(lasergene) 세트에서 메그얼라인(Megalign) 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 이 프로그램은 하기 참조문헌에 기재된 몇몇 정렬 도식을 구현한다: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

[0091] 또는, 비교용의 최적 서열 정렬은 문헌[참조: Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482]의 국소 동일성 알고리즘, 문헌[참조: Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 동일성 알고리즘, 문헌[참조: Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444]의 유사성 방법에 대한 검색, 이를 알고리즘의 컴퓨터 실행(GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 또는 검사에 의해 수행할 수 있다.

[0092] 서열 동일성 및 서열 유사성 비율을 측정하는데 적합한 알고리즘의 한 가지 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 문헌[참조: Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기재되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은, 예를 들면, 본원에 기재된 파라미터와 함께 사용되어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 대한 서열 동일성 비율을 결정할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 생물기술 정보에 대한 국립 센터(the National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용가능하다.

[0093] "상동성"은, 필요한 경우, 최대 상동성 비율을 달성하기 위해 서열 정렬 및 캡 도입 후에 비-변이체 서열과 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열 중의 잔기 비율을 지칭한다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 변이체는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 상동성을 갖는다.

[0094] "벡터"는 셔틀 및 발현 벡터를 포함한다. 전형적으로, 플라스미드 작제물은 또한 박테리아에서 각각 플라스미드의 복제 및 선별을 위한 복제 기원(예: CoIE1 복제 기원) 및 선별 마커(예: 앰피실린 또는 테트라사이클린 내성)를 포함할 것이다. "발현 벡터"는 박테리아 또는 진핵 세포에서 본 발명의 항체 단편을 포함하는 항체의 발현을 위해 필수 조절 서열 또는 조절 요소를 함유하는 벡터를 지칭한다. 적합한 벡터는 하기에 기재되어 있다.

[0095] 용어 "변이체"는, 단백질 또는 웨პ티드의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입체가 존재하고 단백질 또는 웨პ티드의 자연 발생 대립인자 변이체 또는 대체 스플라이싱 변이체를 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "변이체"는 웨პ티드 서열 중의 하나 이상의 아미노산을 유사 또는 동일한 아미노산(들) 또는 상이한 아미노산(들)으로 치환하는 것을 포함한다. 바람직한 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 알라닌 치환을 포함한다. 다른 바람직한 치환은 단백질의 전체 전하, 극성 또는 소수성에 대해 거의 또는 전혀 효과가 없는 보존적 치환을 포함한다. 보존적 치환은 상기 기재되어 있다.

[0096] 기타 변이체는 덜 보존적 아미노산 치환으로 구성될 수 있고, 예를 들면, 선별 잔기는 (a) 예를 들면, 시트(sheet) 또는 나선형 구조로서 치환 부위에서 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소

수성 또는 (c) 측쇄의 벌크에 대한 이들의 효과가 더욱 현저히 상이하다. 기능에 대해 보다 현저한 효과를 가질 것으로 일반적으로 예상되는 치환은 (a) 글리신 및/또는 프롤린이 또 다른 아미노산으로 치환되거나 결실 또는 삽입되고; (b) 친수성 잔기, 예를 들면, 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예를 들면, 류실, 이소류실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐로 (또는 이들에 의해) 치환되고; (c) 시스테인 잔기가 임의의 다른 잔기로 (또는 이들에 의해) 치환되고; (d) 양성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면, 리실, 아르기닐 또는 히스티딜이 음성 전하를 갖는 잔기, 예를 들면, 글루타밀 또는 아스파르틸로 (또는 이들에 의해) 치환되고; 또는 (e) 벌크 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌이 이러한 측쇄를 갖지 않는 것, 예를 들면, 글리신으로 (또는 이들에 의해) 치환되는 것들이다. 다른 변이체는 신규한 글리코실화 및/또는 포스포릴화 부위(들)를 생성하도록 설계된 것들, 또는 기존의 글리코실화 및/또는 포스포릴화 부위(들)를 결실하도록 설계된 것들을 포함한다. 변이체는 글리코실화 부위, 단백질분해 절단 부위 및/또는 시스테인 잔기에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 변이체는 또한 링커 웨პ티드 상의 단백질 또는 웨პ티드 아미노산 서열 전후에 추가의 아미노산 잔기를 갖는 단백질 및 웨პ티드를 포함한다. 용어 "변이체"는 또한, 아미노산 서열의 3' 또는 5' 말단 또는 이를 둘 다를 플랭킹하는 적어도 하나 및 25개 이하(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개)의 추가 아미노산과 함께 본 발명의 단백질/웨პ티드의 아미노산 서열을 갖는 폴리웨პ티드를 포함한다.

[0097]

용어 "변이체"는 또한, 2개 폴리웨პ티드의 아미노산 위치에서 유사성을 비교하기 위해 통상 사용되는 표준 방법으로 측정할 때, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 적어도 60 내지 99% 동일한 단백질(예: 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 또는 100%)을 지칭한다. 2개 단백질 사이의 유사성 또는 동일성 정도는 공지된 방법으로 용이하게 계산할 수 있다. 동일성을 측정하는 바람직한 방법은 시험된 서열 사이의 최대 매칭을 제공하도록 설계된다. 동일성 및 유사성을 측정하는 방법은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램으로 분류된다. 변이체는, 비교 단백질 또는 웨პ티드와 비교하여, 통상 하나 이상(예: 2, 3, 4, 5 등)의 아미노산 치환체, 결실체 및/또는 삽입체를 가질 것이다.

[0098]

본원에 기재된 "성숙" 형태의 융합 단백질은 자연 발생 폴리웨პ티드 또는 전구체 형태 또는 프로단백질의 생성물이다. 자연 발생 폴리웨პ티드, 전구체 또는 프로단백질은, 비제한적으로 예를 들면, 상응한 유전자에 의해 코딩된 전장 유전자 생성물을 포함한다. 또는, 이는 본원에 기재된 개방 판독 프레임에 의해 코딩된 폴리웨პ티드, 전구체 또는 프로단백질로서 정의될 수도 있다. 생성물 "성숙" 형태는, 비제학적으로 예를 들면, 유전자 생성물이 발생하는 세포(예: 숙주 세포) 내에서 발생할 수 있는 하나 이상의 자연 발생 처리 단계의 결과로서 발생한다. "성숙" 형태의 폴리웨პ티드 또는 단백질을 유도하는 이러한 처리 단계의 예는 ORF의 개시 코돈에 의해 코딩된 N 말단 메티오닌 잔기의 절단, 또는 신호 웨პ티드 또는 리더 서열의 단백질분해 절단을 포함한다. 추가로, 본원에 사용된 바와 같이, "성숙" 형태의 폴리웨პ티드 또는 단백질은 단백질분해 절단의 경우 이외의 해독후 변형 단계로부터 발생할 수도 있다. 이러한 추가의 처리는, 비제한적으로 예를 들면, 글리코실화, 미리스틸화 또는 포스포릴화를 포함한다. 일반적으로, 성숙 폴리웨პ티드 또는 단백질은 이를 처리 중의 단지 하나의 작동 또는 이들의 임의의 조합의 작동으로부터 발생할 수 있다.

[0099]

용어 "유도체"는 화학적으로 변형된 단백질 또는 폴리웨პ티드를 지칭하고, 이는 처리 및 기타 해독후 변형 등의 자연 처리에 의해, 또한 화학적 변형 기술, 예를 들면, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자, 당, 포스페이트 및/또는 기타 이러한 분자의 부가에 의해 화학적으로 변형된 것이며, 여기서 당해 분자 또는 분자들은 야생형 단백질에 자연적으로 부착되지 않는다. 유도체는 염을 포함한다. 이러한 화학적 변형은 기본 문헌 및 보다 상세한 논문 뿐만 아니라 다수의 연구 문헌에 잘 기재되어 있고, 이들은 당해 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 동일한 유형의 변형은 소정 단백질 또는 폴리웨პ티드 중의 몇몇 부위에서 동일하거나 상이한 정도로 존재할 수 있음이 인식될 것이다. 또한, 소정 단백질 또는 폴리웨პ티드는 다수 형태의 변형을 함유할 수 있다. 변형은, 웨პ티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함하여 단백질 또는 폴리웨პ티드에서 어디든지 발생할 수 있다. 변형은, 예를 들면, 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 결합, 헬 잔기의 공유 결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 포스포티딜이노시톨의 공유 결합, 가교-결합, 폐환, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교-결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질분해 처리, 포스포릴화, 프레닐화, 라세미화, 글리코실화, 지질 결합, 설페이트화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화, 셀레노일화, 설페이트화, 단백질에 대한 아미노산의 전사-RNA 매개된 부가, 예를 들면, 아르기닐화 및 우비퀴틴화를 포함한다.

[0100]

용어 "유도체"는, 분지화와 함께 또는 분지화 없이, 당해 단백질 또는 폴리웨პ티드를 분지화 또는 사이클릭 상태

로 되게 하는 화학적 변형을 포함한다. 사이클릭, 분지화 및 분지화 환상 단백질 또는 폴리펩티드는 해독후 자연 처리로부터 발생할 수 있고, 또한 완전히 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 유도체의 예는 (i) 아미노 말단 또는 또 다른 유리 아미노 그룹의 N-아실 유도체(여기서, 아실 그룹은 알카노일 그룹(예: 아세틸, 헥사노일, 옥타노일), 아로일 그룹(예: 벤조일) 또는 차단 그룹, 예를 들면, F-moc(플루오레닐메틸-O--CO--); (ii) 카복시 말단 또는 또 다른 유리 카복시 또는 하이드록실 그룹의 에스테르; (iii) 암모니아 또는 적합한 아민과의 반응에 의해 생성된 카복시 말단 또는 또 다른 유리 카복실 그룹의 아미드; (iv) 포스포릴화 유도체; (v) 항체 또는 다른 생물학적 리간드에 접합된 유도체 및 기타 유형의 유도체를 포함한다.

[0101]

용어 "유도체"는, 분지화와 함께 또는 분지화 없이, 당해 단백질 또는 폴리펩티드를 분지화 또는 사이클릭 상태로 되게 하는 화학적 변형을 포함한다. 사이클릭, 분지화 및 분지화 환상 단백질 또는 폴리펩티드는 해독후 자연 처리로부터 발생할 수 있고, 또한 완전히 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 문자내 디설파이드 결합을 함유하는 사이클릭 유도체는, 아미노 및 카복시 말단과 같이 폐환을 위해 선택된 위치에서 적합한 S-보호된 시스테인 또는 호모시스테인 잔기를 도입함으로써, 통상의 고체 상 합성에 의해 제조될 수 있다. 쇠 어셈블리의 완성 후, 폐환은 (1) S-S 결합을 형성하기 위해, 상응하는 2개의 유리 SH-관능기의 후속적 지지체상 산화와 함께 S-보호 그룹의 선택적 제거, 이어서 지지체로부터 생성물의 통상의 제거 및 적절한 정제 공정에 의해; 또는 (2) 완전한 측쇄 탈보호와 함께 지지체로부터 펩티드의 제거, 이어서 고도 희석 수용액에서 유리 SH-관능기의 산화에 의해 수행할 수 있다.

[0102]

문자내 아미드 결합을 함유하는 사이클릭 유도체는, 폐환을 위해 선택된 위치에서 적합한 아미노 및 카복실 측쇄 보호된 아미노산 유도체를 도입함으로써, 통상의 고체 상 합성에 의해 제조할 수 있다. 문자내 --S-- 알킬 결합을 함유하는 사이클릭 유도체는, 폐환을 위해 선택된 위치에서 적합한 아미노 보호된 측쇄 및 적합한 S-보호된 시스테인 또는 호모시스테인 잔기와 함께 아미노산 잔기를 도입함으로써 통상의 고체 상에 의해 제조할 수 있다.

[0103]

컨센서스 서열의 하나 이상의 아미노산을 동일한 유형의 D-아미노산으로 계획적 치환(예: L-리신 대신에 D-리신)은 보다 안정한 펩티드를 생성하기 위해 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩티드 유도체 또는 펩티드 모방체는 모든 L, 모든 D 또는 혼합된 D, L 펩티드일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 당해 펩티드는 모든 D-아미노산으로 구성된다. N-말단 또는 C-말단 D-아미노산의 존재는, 펩티다제가 기질로서 D-아미노산을 사용할 수 없기 때문에, 펩티드의 생체내 안정성을 증가시킨다.

[0104]

펩티드의 서브서열에서 자연 아미노산 대신에 비자연 아미노산의 치환은 또한 단백질분해에 대한 내성을 제공할 수 있다. 이러한 치환은, 예를 들면, N-말단 상에서 작용하는 엑소펩티다제에 의한 단백질분해에 대해 내성을 제공할 수 있다. 이러한 치환은 기재되어 있고, 이를 치환은 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는다. 비-자연 발생 아미노산의 예는 α, α-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산, C-α-메틸 아미노산 및 β-메틸 아미노산을 포함한다. 본 발명에 유용한 아미노산 동족체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, β-알라닌, 노르발린, 노르류신, 4-아미노부티르산, 오리틴, 하이드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 시스테인산, 사이클로헥실알라닌, 2-아미노이소부티르산, 6-아미노헥산산, t-부틸글리신, 폐닐글리신, o-포스포세린, N-아세틸 세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘 및 기타 비통상적 아미노산을 포함할 수 있다. 추가로, 비자연 아미노산을 사용한 펩티드의 합성은 일상적이고 당해 기술분야에 공지되어 있다.

[0105]

펩티드의 N-말단 또는 C-말단 잔기 상에서 작용하는 펩티다제에 대한 내성을 제공하는 다른 한 가지 효과적인 방법은 펩티드 말단에서 화학적 그룹을 부가하여 변형된 펩티드가 더이상 펩티다제에 대한 기질이 아니도록 하는 것이다. 이러한 한 가지 화학적 변형은 어느 하나 또는 양 말단에서 펩티드의 글리코실화이다. 특정한 화학적 변형, 특히 N-말단 글리코실화는 인간 혈청에서 펩티드의 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 혈청 안정성을 증강시키는 다른 화학적 변형은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 탄소수 1 내지 20의 저급 알킬, 예를 들면, 아세틸 그룹으로 이루어진 N-말단 알킬 그룹의 부가 및/또는 C-말단 아미드 또는 치환된 아미드 그룹의 부가를 포함한다. 특히, 본 발명은 N-말단 아세틸 그룹 및/또는 C-말단 아미드 그룹을 포함하는 펩티드로 이루어진 변형된 펩티드를 포함한다.

[0106]

용어 "펩티드 모방체" 또는 "모방체"는, 펩티드 또는 단백질의 생물학적 활성을 의태하지만 화학적 성질이 더 이상 펩티드성이 아닌, 즉 어떠한 펩티드 결합(즉, 아미노산 사이의 아미드 결합)을 더 이상 함유하지 않는 생물학적 활성 화합물을 지칭한다. 여기서, 용어 펩티드 모방체는 유사-펩티드, 세미-펩티드 및 펩토이드 등과 같이 성질상 더 이상 완전히 펩티드성이 아닌 분자를 포함하도록 광범위한 의미로 사용된다. 이러한 광범위한 의미에서 펩티드 모방체의 예(여기서, 펩티드 부분은 펩티드 결합을 결여하는 구조로 대체된다)는 하기에 기재되

어 있다. 완전히 또는 부분적으로 비-펩티드이든지, 당해 실시양태에 따르는 펩티드 모방체는, 펩티드 모방체가 기본으로 하는 펩티드에서 활성 그룹의 3차원 배열을 밀접하게 닮은 반응성 화학 잔기의 공간 배열을 제공한다. 이러한 유사한 활성-부위 기하(geometry)의 결과로서, 펩티드 모방체는 당해 펩티드의 생물학적 활성과 유사한 생물학적 시스템에 대한 효과를 갖는다.

[0107] 펩티드 모방체는 L-아미노산을 함유하는 펩티드에 대하여 역 서열로 정렬된 D-아미노산을 함유하는 역-D 펩티드를 포함한다. 예를 들면, L-아미노산 펩티드의 C-말단 잔기는 D-아미노산 펩티드에 대한 N-말단 등으로 된다. 역 D-펩티드는 바람직하게는 L-아미노산 펩티드와 동일한 3차 구조 및 따라서 동일한 활성을 보유하지만, 바람직하게는 시험관내 및 생체내에서 효소적 분해에 더욱 안정하고, 따라서 본래 펩티드보다 더욱 큰 치료 효능을 가질 수 있다[참조: Brady and Dodson, Nature 368:692-693, 1994; and Jameson and McDonnel, Nature 368:744-746, 1994]. 펩티드 모방체는 또한 모 펩티드에 대하여 역 서열로 정렬된 L-아미노산을 함유하는 역-L 펩티드를 포함한다. 모 펩티드의 C-말단 잔기는 역-L 펩티드에 대한 N-말단 등으로 된다.

[0108] 당해 실시양태의 펩티드 모방체는 바람직하게는 3차원 형상 및 생물학적 활성에 있어서 본원에 기재된 펩티드와 실질적으로 유사하다. 펩티드 모방체를 생성하기 위해 당해 기술분야에 공지된 펩티드를 구조적으로 변형시키는 방법의 예는, 특히 N-말단에서 부작용 활성 없이 단백질분해 퇴화에 대한 향상된 안정성을 유도할 수 있는 D-아미노산 잔기 구조를 유도하는 골격 키랄 중심의 역위를 포함한다. 두번째 방법은 안정성을 위한 사이클릭 구조, 예를 들면, N 내지 C 쇄간 이미드 및 락탐의 변경이다. 이들의 예는, 이의 전체 내용이 본원에서 참조로 도입되는 미국 특허 제4,457,489호에 기재된 것들과 같은 구조적으로 제한된 티모펜틴 유사 화합물에서 제공된다. 세번째 방법은 단백질분해에 대해 내성을 제공하는 슈도펩티드 결합으로 펩티드 중의 펩티드 결합을 치환하는 것이다.

[0109] 펩티드 모방체는 모방체의 한쪽 또는 양 말단에 보호 그룹을 포함할 수 있고, 하나 이상의 펩티드 결합의 비-펩티드 결합으로의 치환은 펩티드 자체보다 단백질분해 절단에 대해 덜 감수성이다. 예를 들면, 하나 이상의 펩티드 결합은 또 다른 형태의 공유 결합(예: 탄소-탄소 결합 또는 아실 결합)으로 대체될 수 있다. 펩티드 모방체는 또한 아미노-말단 또는 카복실 말단 차단 그룹, 예를 들면, t-부틸옥시카보닐, 아세틸, 알킬, 석시닐, 메톡시석시닐, 부제릴, 아디필, 아젤라일, 단실, 벤질옥시카보닐, 플루오레닐메톡시카보닐, 메톡시아젤라일, 메톡시아디필, 메톡시수베릴 및 2,4-디니트로페닐을 도입할 수 있고, 이에 의해 모방체를 단백질분해에 대해 덜 감수성으로 되게 한다. 비-펩티드 결합 및 카복실- 또는 아미노-말단 차단 그룹은 단독으로 또는 조합하여 사용되어, 모방체를 상응하는 펩티드보다 단백질분해에 대해 덜 감수성으로 되게 할 수 있다. 추가로, 정상 L-임체이성체 대신에 D-아미노산의 치환은, 예를 들면, 분자의 반감기를 증가시키도록 작용할 수 있다. 따라서, 펩티드 모방체는 하나 이상의 하기 변형을 갖는 펩티드를 포함한다: 하나 이상의 펩티딜[--C(O)NR--] 결합(결합들)이 비-펩티딜 결합, 예를 들면, --CH₂- 카바메이트 결합[--CH₂--OC(O)NR--]로 대체되어 있는 펩티드; 포스포네이트 결합; --CH₂-설폰아미드[--CH₂--S(O)₂ NR--] 결합; 우레아[--NHC(O)NH--] 결합; --CH₂-2급 아민 결합; 또는 알킬화 펩티딜 결합[--C(O)NR⁶--(여기서, R⁶은 저급 알킬이다)]; N-말단이 --NRR¹ 그룹으로, --NRC(O)R 그룹으로, --NRC(O)OR 그룹으로, --NRS(O)₂R 그룹으로, --NHC(O)NHR 그룹으로(여기서, R 및 R¹은 수소 또는 저급 알킬이고, 단, R 및 R¹은 둘 다 수소가 아니다.), 석신이미드 그룹으로, 벤질옥시카보닐-NH--(CBZ-CH--) 그룹으로, 또는 저급 알킬, 저급 알콕시, 클로로 및 브로모로 이루어진 그룹으로부터 선택된 페닐 환상에 1 내지 3개의 치환체를 갖는 벤질옥시카보닐-NE-- 그룹으로 유도체화되어 있는 펩티드; 또는 C 말단이 --C(O)R²(여기서, R²는 저급 알콕시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.) 및 --NR³R⁴(여기서, R³ 및 R⁴는 수소 및 저급 알킬로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.)로 유도체화되어 있는 펩티드.

[0110] 바람직한 모방체는 --CR₂OC(O)NR-- 결합; 포스포네이트 결합; --CH₂S(O)₂NR-- 결합; --CH₂NR-- 결합 및 --C(O)NR⁶-- 결합, 및 --NHC(O)NH-- 결합(여기서, R은 수소 또는 저급 알킬이고, R⁶은 저급 알킬이다.)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 결합에 의해 치환된 펩티드의 0 내지 모든 --C(O)NH-- 결합을 갖고, 여기서 당해 모방체의 N-말단은 --NRR¹ 그룹; --NRC(O)R 그룹; --NRC(O)OR 그룹; NRS(O)₂R 그룹; --NHC(O)NHR 그룹; 석신이미드 그룹; 벤질옥시카보닐-NH-- 그룹; 및 저급 알킬, 저급 알콕시, 클로로 및 브로모로 이루어진 그룹으로부터 선택된 페닐 환상에 1 내지 3개의 치환체를 갖는 벤질옥시카보닐-NH-- 그룹(여기서, R 및 R¹은 수소 및 저급 알킬로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 또한 당해 모방체의 C-

말단은 화학식 $--\text{C}(\text{O})\text{R}^2$ [여기서, R^2 는 하이드록시, 저급 알콕시 및 $--\text{NR}^3\text{R}^4$ (여기서, R^3 및 R^4 는 수소 및 저급 알킬로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고, $--\text{NR}^3\text{R}^4$ 그룹의 질소 원자는 사이클릭 펩티드 및 이의 생리학적으로 허용되는 염을 형성하도록 임의로 펩티드의 N-말단의 아민 그룹일 수 있다.)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.]을 갖는다.

[0111] 용어 "단편" 또는 "서브서열"은, 단백질 또는 펩티드의 아미노산 서열의 연속 서브서열로 이루어져 있고, 자연 발생 생체내 프로테아제 활성으로부터 발생하는 스플라이싱 변이체 및 단편 등의 자연 발생 단편을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 단편은 아미노 말단, 카복시 말단 및/또는 내부적(자연 스플라이싱에 의한 것과 같이)으로 절단될 수 있다. 이러한 단편은 아미노 말단 메티오닌의 존재 또는 부재하에 제조될 수 있다. 용어 "단편"은, 동일하든지 또는 상이하든지, 직접 또는 링커를 통해 함께 결합된 연속 아미노산 서열을 공통으로 갖는 동일한 단백질 또는 펩티드로부터의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 본 발명의 아미노산 서열과 동일한 적어도 3개의 연속 아미노산을 포함할 수 있다.

[0112] 문구 "약제학적으로 허용되는" 또는 "치료학적으로 허용되는"은, 인간에게 투여되는 경우, 생리학적으로 허용될 수 있고 위궤양, 현기증 등과 같은 알러지 등의 부적절한 반응을 통상 생성하지 않는 분자 속성을 지칭한다. 바람직하게는, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는"은 동물 및 보다 특히는 인간에게 사용하기 위해 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 U.S. 약전 또는 기타 일반적으로 인지되는 약전(예: Remington's Pharmaceutical Sciences)에 수록된 것을 의미한다.

[0113] 특히 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 관련하여 사용되는 경우, 단어 "a" 또는 "an"의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, 또한 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 그 이상"의 의미와 일치한다.

[0114] 본 명세서 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 소정 값이 당해 값을 측정하는데 사용되는 장치 또는 방법에 대해 예의 표준 편차를 포함하는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0115] 철 대사 질환

[0116] 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 또는 펩티드 모방체를 사용하여 치료 및/또는 예방될 수 있는 상태는 철 대사의 변동과 관련된 임의의 질환, 장애 또는 증상을 포함한다. 철 대사의 변동은 하나 이상의 철 흡착, 철 흡수, 철 수송, 철 저장, 철 처리, 철 이동 또는 철 이용의 장애와 관련될 수 있다. 일반적으로, 철 대사의 변동은 철 과부하, 철 부적절배치 또는 철 결핍을 일으킨다.

[0117] 철 과부하와 관련된 상태는 1차 및 2차 철 과부하 질환, 증상 또는 장애를 포함하고, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 유전성 색소침착증, 만발성 피부 포르피린증, 유전성 구상적혈구증, 적색소성 빈혈, 초적혈구조혈성 빈혈(CDAI), 안면성기 형성장애(FGHD), 아르스코그 증후군(Aarskog syndrome), 무트랜스페린혈증, 철아구성 빈혈(SA), 피리독신 반응성 철아구성 빈혈 및 이상혈색소증, 예를 들면, 지중해빈혈 및 겸상적혈구를 포함한다. 몇몇 연구는 철 대사 질환(예: 지중해빈혈 및 색소침착증) 사이의 관련성, 및 다수의 질환 상태, 예를 들면, 유형 II(비-인슐린 의존성) 진성당뇨병 및 아테롬성 동맥경화증을 제안했다[참조: A. J. Matthews et al., J. Surg. Res., 1997, 73: 3540; T. P. Tuomainen et al., Diabetes Care, 1997, 20: 426-428].

[0118] 철 결핍 및/또는 철 부적절배치와 관련된 질환은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 만성 질환 빈혈, 염증 빈혈, 철 결핍 빈혈, 기능성 철 결핍 및 소구성 빈혈을 포함한다. 용어 "만성 질환 빈혈" 또는 "염증 빈혈"은, 예를 들면, 광범위한 감염, 염증, 종양 질환 등의 결과로서 발달하는 임의의 빈혈을 지칭한다. 발달하는 빈혈은 종종 단축된 적혈구 세포 수명 및 마크로파지에서 철의 분획화를 특징으로 하고, 이는 새로운 적혈구를 제조하는데 이용가능한 철의 양을 감소시킨다. 만성 질환 빈혈 또는 염증 빈혈과 관련된 상태는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 만성 신장 질환, 말기 신장 질환, 종양 질환, 만성 박테리아 심장내막염, 골수염, 류마티즘 열 및 궤양성 결장염을 포함한다. 추가의 상태는 감염, 염증 및 종양과 관련된 기타 질환 및 질병을 포함하고, 예를 들면, 염증성 감염(예: 폐 농양, 결핵 등), 염증성 비감염성 질병(예: 류마티스성 관절염, 전신 홍반성 낭창, 크론병, 간염, 염증성 장 질환 등) 및 다양한 암, 종양 및 악성종양(예: 암종, 육종, 림프종 등)을 포함한다. 철 결핍 빈혈은 임신, 월경, 유아 및 소아, 상해에 기인하는 혈액 감소 등의 상태로부터 발생할 수 있다.

[0119] 또한, 철 대사는 심혈관 질환(예: 울혈성 심부전), 알츠하이머병, 파킨슨씨병 및 특정 유형의 결장직장암을 포함하는 다수의 기타 질환 상태에서 중요한 역할을 하는 것으로 제안되어 왔다[참조: P. Tuomainen et al., Circulation, 1997, 97: 1461-1466; J. M. McCord, Circulation, 1991, 83: 1112-1114; J. L. Sullivan, J.

Clin. Epidemiol., 1996, 49: 1345-1352; M. A. Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1997, 94: 9866-9868; P. Riederer et al., J. Neurochem., 1989, 512: 515-520; P. Knekt et al., Int. J. Cancer, 1994, 56: 379-382].

[0120] 암

[0121] 800명 초과 여성의 유방암에서 유전자 발현 프로파일은 감소된 폐로포르틴 유전자 발현이 기타 유방암 위험 인자와 독립적인 전이-유리 및 질환-특이적 생존률에서의 현저한 감소와 관련되는 것을 나타내는 것으로 밝혀졌다 [참조: Pinnix et al. Science Translational Medicine 2(43):1-10 (August 2010)]. 높은 폐로포르틴 및 낮은 헵시딘 유전자 발현은 10년 생존률이 90%를 초과하는 유방암 환자의 극히 양호한 코호트를 증명했다. 따라서, HJV.Fc를 투여하여 BMP 신호전달 및 따라서 헵시딘 유전자 발현을 저하시키고 암 환자(이로써 한정되는 것은 아니지만, 유방암 환자 포함)에서 폐로포르틴 수준을 상승시키는 것은 전이-유리 및 질환-특이적 생존률의 현저한 감소를 달성해야 한다.

[0122] 약제학적 조성물

[0123] 본 발명은 철 항상성 질환의 치료, 예방 및 완화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체는 철 항상성과 관련된 상태 또는 질환의 치료에 유용하다.

[0124] 따라서, 본 발명의 방법은, 치료학적 유효량의 하나 이상의 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체를 이를 필요로 하거나 이를 필요로 하는 위험에 있는 대상체에게 투여하거나, 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하여, 철을 이동시키고 혈청 혜모글로빈 및/또는 혈마토크립 수준을 증가시킴을 포함한다. 한 가지 실시양태에서, 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체 및 적합한 약제학적 담체를 포함하는 유효량의 치료학적 조성물은 대상체에게 투여되어, 철을 이동시키고 혈청 혜모글로빈 및/또는 혈마토크립 수준을 증가시킴으로써 철 항상성과 관련된 증상을 예방 또는 완화시키거나 이와 관련된 질병, 질환 또는 상태를 치료한다. 한 가지 실시양태에서, 대상체는 동물이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 및 바람직하게는 인간이다.

[0125] 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체는 철의 이동 및 혈청 혜모글로빈 및/또는 혈마토크립 수준의 증가가 유리할 수 있는 임의의 질환 상태 또는 질병에서 증상의 치료, 예방 또는 완화에 사용된다.

[0126] 본 발명의 범위 내의 조성물은 활성제(예: 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체)를 목적하는 치료 효과를 달성하고 부작용을 회피하는데 효과적인 양으로 함유해야 한다. 활성제의 약제학적으로 허용되는 제제 및 염은 본 발명의 범위 내에 포함되고, 당해 기술분야에 공지되어 있다. 폴리웨티드 길항제 등의 투여를 위해, 투여된 양은 부작용을 회피하도록 선택되어야 한다. 특정 질환, 질병 또는 상태의 치료에 효과적인 치료학적 또는 약제학적 조성물의 양은 질환의 성질 및 중증도, 표적 작용 부위, 환자의 체중, 환자가 따라가는 특정 식이, 사용되는 공동 투약, 투여 경로 및 당해 기술분야의 숙련가에 의해 인지될 수 있는 기타 인자에 의존할 것이다. 용량은 질환 정도 및 환자마다의 상이한 파라미터 등의 통상의 인자에 따라 주치의에 의해 적용될 것이다. 통상적으로, 0.001 내지 100 mg/kg이 1주 2회 대상체에게 투여된다. 바람직하게는, 10 내지 30 mg/kg이 1주 2회 대상체에게 투여된다. 한 가지 특정한 실시양태에서, 20 mg/kg이 1주 2회 대상체에게 투여된다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 용량 반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다. 예를 들면, 랫 연구로부터 생성된 데이터에 기반하여 인간에 대한 유효 mg/kg 용량을 수득하기 위해, 랫에서의 유효 mg/kg 용량은 6으로 나눈다.

[0127] 다양한 전달 시스템은 공지되어 있고, 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체, 또는 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체를 함유하는 약제학적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은, 정맥내 또는 근육내, 뇌실내 또는 척추강내 주사(중추신경계 투여를 위해), 경구, 국소, 피하, 결막하, 또는 비내, 피내, 설하, 질내, 직장 또는 경막 경로를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0128] 당해 기술분야에 공지된 다른 전달 시스템, 예를 들면, 수용액, 미립자 중의 캡슐화 또는 마이크로캡슐이 본 발

명의 약제학적 조성물의 전달에 사용될 수 있다.

[0129] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 조절된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 가지 실시양태에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있고, 또 다른 실시양태에서, 펌프가 사용될 수 있다.

[0130] 상술한 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물은, 약제학적으로 허용되는 담체와 조합된, 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체, 단편 및 웨티드 모방체를 포함한다. 용어 담체는 희석제, 애주번트 및/또는 부형제, 예를 들면, 충전제, 결합제, 봉해제, 윤활제, 실리카 유동 조절제, 안정화제, 또는 웨티드, 웨티드 유도체 또는 웨티드 모방체가 함께 투여되는 비히클을 지칭한다. 이러한 약제학적 담체는 멜균 액체(예를 들면, 물), 및 무기유, 식물유(예: 땅콩유, 대두유, 참깨씨유 및 캐놀라유), 동물유 또는 합성 기원 오일을 포함하는 오일을 포함한다. 염수 용액 뿐만 아니라 수성 글리세롤 및 넥스트로스 용액이 본 발명의 약제학적 조성물의 액체 담체로서 또한 사용될 수 있다. 물론, 담체의 선택은 웨티드, 웨티드 유도체 또는 웨티드 모방체의 성질, 이의 용해도 및 기타 생리학적 특성 뿐만 아니라 표적 전달 및 전달 부위에 의존한다. 적합한 약제학적 담체의 예는 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro, 2003, 21st edition, Mack Publishing Company]에 기재되어 있다.

[0131] 본 발명의 약제학적 제제에 도입될 수 있는 추가의 약제학적으로 적합한 물질은 흡수 강화제, pH 조절제 및 완충제, 오스몰농도 조절제, 보존제, 안정화제, 산화방지제, 계면활성제, 중점제, 연화제, 분산제, 향미제, 착색제 및 습윤제를 포함한다.

[0132] 적합한 약제학적 부형제의 예는 물, 글루코즈, 슈크로즈, 락토즈, 글리콜, 에탄올, 글리세롤 모노스테아레이트, 젤라틴, 라이스, 전분, 밀가루, 백악, 나트륨 스테아레이트, 맥아, 염화나트륨 등을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 용액, 캡슐제, 정제, 크림제, 젤제, 산제, 지속 방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 당해 조성물은 통상의 결합제 및 담체(예: 트리글리세라이드)와 함께 좌제로서 제형화될 수 있다[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro, 2003, 21.sup.th edition, Mack Publishing Company]. 이러한 조성물은 대상체에게 적절한 투여 형태를 제공하기 위해 적합한 양의 담체와 함께 치료학적 유효량의 치료학적 조성물을 함유한다. 당해 제형은 투여 방식 및 표적 작용 부위(예: 특정 기관 또는 세포 유형)에 적합하도록 설계된다.

[0133] 본 발명의 약제학적 조성물은 중성 또는 염 형태로서 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 유리 아미노 그룹으로 형성되는 것들 및 유리 카복실 그룹과 반응하는 것들을 포함한다. 약제 산업에서 통상 사용되는 무독성 알칼리 금속, 알칼리토 금속 및 암모늄 염은 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 바륨, 암모늄 및 프로타민 아연 염을 포함하고, 이들은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 제조된다. 당해 용어는 또한, 본 발명의 화합물을 적합한 유기 또는 무기 산과 반응시킴으로써 일반적으로 제조되는 무독성 산 부가 염을 포함한다. 대표적인 염은 브롬화수소, 염화수소, 벨레이트, 옥살레이트, 올레레이트, 라우레이트, 보레이트, 벤조레이트, 셀페이트, 비셀페이트, 아세테이트, 포스페이트, 티솔레이트, 시트레이트, 말레이트, 푸마레이트, 타르트레이트, 석시네이트, 납실레이트 염 등을 포함한다.

[0134] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 충전제 또는 결합제의 예는 아카시아, 알긴산, 인산칼슘(이염기성), 카복시메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈 나트륨, 하이드록시에틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈, 텍스트린, 텍스트레이트, 슈크로즈, 타일로즈, 예비젤라틴화 전분, 황산칼슘, 아밀로즈, 글리신, 벤토나이트, 말토즈, 솔비톨, 에틸셀룰로즈, 인산수소이나트륨, 인산이나트륨, 이나트륨 피로설파이트, 폴리비닐 알콜, 젤라틴, 글루코즈, 구아 검, 액체 글루코즈, 압축가능한 당, 규산알루미늄마그네슘, 말토텍스트린, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리메타크릴레이트, 포비돈, 나트륨 알기네이트, 트라가칸트, 미정질 셀룰로즈, 전분 및 제인을 포함한다. 또 다른 가장 바람직한 충전제 또는 결합제는 미정질 셀룰로즈로 이루어진다.

[0135] 사용될 수 있는 봉해제의 예는 알긴산, 카복시메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈 나트륨, 하이드록시프로필셀룰로즈(저 치환됨), 미정질 셀룰로즈, 분말화 셀룰로즈, 콜로이드성 이산화규소, 나트륨 크로스카멜로즈, 크로스포비돈, 메틸셀룰로즈, 폴라크릴린 칼륨, 포비돈, 나트륨 알기네이트, 나트륨 전분 글리콜레이트, 전분, 이나트륨 디설파이트, 이나트륨 에다타밀, 이나트륨 에데테이트, 이나트륨 에틸렌디아민테트라아세테이트(EDTA) 가교 결합된 폴리비닐피롤리딘, 예비젤라틴화 전분, 카복시메틸 전분, 나트륨 카복시메틸 전분 및 미정질 셀룰로즈를 포함한다.

[0136] 윤활제의 예는 칼슘 스테아레이트, 캐놀라 오일, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 수소화 식물유(유형 I), 산화마그네슘, 마그네슘 스테아레이트, 무기유, 폴록사며, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 셀페이트, 나트륨 스테

아레이트 푸마레이트, 스테아르산, 탈크, 아연 스테아레이트, 글리세릴 베하페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 봉산, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 아세테이트, 나트륨 벤조에이트/나트륨 아세테이트(조합) 및 DL 류신을 포함한다.

[0137] 실리카 유동 조절제의 예는 콜로이드성 이산화규소, 규산알루미늄마그네슘 및 구아 검을 포함한다. 또 다른 가장 바람직한 실리카 유동 조절제는 이산화규소로 이루어진다.

[0138] 안정화제의 예는 아카시아, 알부민, 폴리비닐 알콜, 알긴산, 벤토나이트, 인산이칼슘, 카복시메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈, 콜로이드성 이산화규소, 사이클로텍스트린, 글리세릴 모노스테아레이트, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈, 마그네슘 트리실리케이트, 규산알루미늄마그네슘, 프로필렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 알기네이트, 나트륨 알기네이트, 카나우바 왁스, 크산탄 검, 전분, 스테아레이트(들), 스테아르산, 스테아르산 모노글리세라이드 및 스테아릴 알콜을 포함한다.

[0139] 본 발명은 또한, 이들이 대상체에 투여되면 더욱 안정화되도록(즉, 투여되면, 비변형된 형태와 비교하여, 보다 긴 반감기 또는 보다 긴 기간의 효과를 갖는다) 웨პ티드 또는 웨პ티드 유도체의 변형물을 제공한다. 이러한 변형물은 본 발명이 관련되는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다(예: 폴리에틸렌 글리콜 유도체화, PEGylation로도 알려짐, 미세캡슐화 등).

[0140]

스크리닝 방법

[0142] 본 발명은 포유동물 대상체에서 혈청 철, 혈청 혜모글로빈 및/또는 혜마토크릿을 변경하는 화합물(예: HJV-IgG 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웨პ티드 모방체)을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에 따라, 포유동물 대상체에서 철 및 혈청 혜모글로빈 및/또는 혜마토크릿을 이동(예: 증가 또는 감소됨)시키는 화합물을 스크리닝하는 방법이 제공된다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공하고, 여기서 화합물은 BMP-6에 특이적으로 결합하는 이들의 능력에 대해 스크리닝된다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 적어도 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 또는 10^{-12} 의 KD를 갖는 BMP-6에 결합하는 이들의 능력에 대해 스크리닝된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공하고, 여기서 화합물은 BMP-6 신호전달을 억제하는 이들의 능력에 대해 스크리닝된다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 BMP-6 신호전달을 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 99 또는 100%까지 억제시키는 이들의 능력에 대해 스크리닝된다.

[0144] 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포

[0145] 본 발명의 또 다른 국면은 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웨პ티드 모방체를 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 결합되어 있는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 한 가지 유형의 벡터는 "플라스미드"이고, 이는 추가의 DNA 세그먼트가 결찰될 수 있는 선형 또는 환상 이본체 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈 내로 결찰될 수 있다. 특정한 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들면, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피좀 포유동물 벡터). 기타 벡터(예: 비에피좀 포유동물 벡터)는 숙주 세포로의 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합되고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결되어 있는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 "발현 벡터"로서 본원에서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 발현 벡터의 사용은 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에, 상호교대로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 작용을 사용하는 바이러스 벡터(예: 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 결합 바이러스) 등과 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것으로 의도된다.

[0146] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함하고, 이는 재조합 발현 벡터가 발현에 사용되는 숙주 세포를 기준으로 하여 선택된, 즉 발현되는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 것을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동적으로 연결된"은 목

적하는 뉴클레오티드 서열이 당해 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 방식(예를 들면, 시험관내 전사/해독 시스템 또는 백터가 숙주 세포 내로 도입되는 경우에 숙주 세포에서)으로 조절 서열에 연결되어 있음을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 조절 요소(예: 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 서열은, 예를 들면, 문헌[참조: Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기재되어 있다. 조절 서열은 다수 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구조적 발현을 유도하는 것들 및 특정 숙주 세포(예: 조직 특이적 조절 서열)에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하는 것들을 포함한다. 발현 백터의 설계는 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 목적하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있음이 당해 기술분야의 숙련가에게 인지될 것이다. 본 발명의 발현 백터는 숙주 세포에 도입되어, 본원에 기재된 핵산에 의해 코딩된, 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웹티드 모방체를 생성할 수 있다.

[0147]

본 발명의 재조합 발현 백터는 원핵 또는 진핵 세포에서 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웹티드 모방체의 발현을 위해 설계될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웹티드 모방체는 이. 콜라이(*E.coli*) 등의 박테리아 세포, 곤충 세포(바콜로바이러스 발현 백터 사용), 효모 세포 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 추가로 문헌[참조: Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기재되어 있다. 또는, 재조합 발현 백터는, 예를 들면, T7 프로모터 조절 서열 및 T7 폴리미라제를 사용하여 시험관 내에서 전사 및 해독될 수 있다.

[0148]

원핵세포에서 단백질의 발현은 대부분 종종, 융합 또는 비융합 단백질의 발현을 유도하는 구조적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 백터로 이. 콜라이에서 수행된다. 융합 백터는 다수의 아미노산을 본원에서 코딩된 단백질, 통상적으로 재조합 단백질의 아미노 말단에 부가한다. 이러한 융합 백터는 통상적으로 3가지 목적으로 사용된다: (1) 재조합 단백질의 발현을 증가시키기 위해; (2) 재조합 단백질의 용해도를 증가시키기 위해 및 (3) 친화성 정제에서 리간드로서 작용함으로서 재조합 단백질의 정제를 보조하기 위해. 종종, 융합 발현 백터에서, 단백질분해 절단 부위는 융합 잔기와 재조합 단백질의 접합부에 도입되어, 융합 단백질로부터 재조합 단백질의 분리 및 이어서 융합 단백질의 정제를 가능하게 한다. 이러한 효소 및 이들의 동족 인자 서열은 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나제를 포함한다. 전형적인 융합 발현 백터는 각각 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST), 말토즈 E 결합 단백질 또는 단백질 A를 표적 재조합 단백질과 융합시키는 pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40), pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.) 및 pRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)을 포함한다.

[0149]

적합한 유도성 비융합 이. 콜라이 발현 백터의 예는 pTrc(Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315) 및 pET 11d(Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60:89)을 포함한다.

[0150]

이. 콜라이에서 재조합 단백질 발현을 최대화시키는 한 가지 전략은 재조합 단백질을 단백질분해적으로 절단하는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 당해 단백질을 발현시키는 것이다[참조: Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128]. 또 다른 전략은, 각 아미노산에 대한 개개 코돈이 이. 콜라이에서 우선적으로 사용된 것들로 되도록, 발현 백터 내로 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경하는 것이다[참조: Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:211:1-7, 10-13, 19-34, 45-53, 58-85, 111-113, 120, 130, 132-134 and 13518]. 본 발명의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기술에 의해 수행될 수 있다.

[0151]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물에 사용된 발현 백터는 효모 발현 백터이다. 효모 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서 발현시키기 위한 백터의 예는 pYEPSec1(Baldari, et al., (1987) EMBO J 6:229-234), pMFA(Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88(Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) 및 picZ(InVitrogen Corp, San Diego, Calif.)을 포함한다.

[0152]

또는, 본 발명의 조성물은 바콜로바이러스 발현 백터를 사용하여 곤충 세포에서 발현시킬 수 있다. 배양된 곤충 세포(예: SF9 세포)에서 단백질의 발현에 이용가능한 바콜로바이러스 백터는 pAc 시리즈(Smith et al. (1983) Mol Cell Biol 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈(Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39)를 포함한다.

[0153]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 포유동물 발현 백터를 사용하여 포유동물 세포에서 발현된다. 포유동물 발현 백터의 예는 pCDM8(Seed (1987) Nature 329:840) 및 pMT2PC(Kaufman et al. (1987) EMBO J 6: 187

195)를 포함한다. 포유동물 세포에서 사용되는 경우, 발현 벡터의 조절 기능은 종종 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들면, 통상 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 시미안 바이러스 40으로부터 유도된다. 원핵 및 진핵 세포 둘 다에 적합한 기타 발현 시스템은 문헌[참조: Chapters 16 and 17 of Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]을 참조한다.

[0154] 또 다른 실시양태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 특정 세포 유형에서 핵산의 발현을 우선적으로 유도할 수 있다(예를 들면, 조직 특이적 조절 요소는 핵산의 발현에 사용된다). 조직 특이적 조절 요소는 당해 기술분야에 공지되어 있다. 적합한 조직 특이적 프로모터의 비제한적 예는 알부민 프로모터(간 특이적; Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1:268 277), 림프구 특이적 프로모터(Calame and Eaton (1988) Adv Immunol 43:235 275), 특히 T 세포 수용체의 프로모터(Winoto and Baltimore (1989) EMBO J 8:729 733) 및 면역글로불린(Banerji et al. (1983) Cell 33:729 740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741 748), 뉴런 특이적 프로모터(예: 뉴로필라멘트 프로모터; Byrne and Ruddle (1989) PNAS 86:5473 5477), 췌장 특이적 프로모터(Edlund et al. (1985) Science 230:912 916) 및 유선 특이적 프로모터(예: 우유 유청; U.S. Pat. No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166)를 포함한다. 발달상 조절된 프로모터, 예를 들면, 쥐 hox 프로모터(Kessel and Gruss (1990) Science 249:374 379) 및 α -페토단백질 프로모터(Campes and Tilghman (1989) Genes Dev 3:537 546)가 또한 포함된다.

[0155] 본 발명은 추가로 안티센스 배향으로 발현 벡터에 클로닝된 본 발명의 DNA 문자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 즉, DNA 문자는, 본 발명의 융합 단백질 mRNA에 안티센스인 RNA 문자의 발현(DNA 문자의 전사에 의해)을 허용하는 방식으로 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 다양한 세포 유형, 예를 들면, 바이러스 프로모터 및/또는 인핸서에서 안티센스 RNA 문자의 연속 발현을 유도하는, 안티센스 배향으로 클로닝된 핵산에 작동적으로 연결된 조절 서열이 선택될 수 있거나, 안티센스 RNA의 구조적, 조직 특이적 또는 세포 유형 특이적 발현을 유도하는 조절 서열이 선택될 수 있다. 안티센스 발현 벡터는 재조합 플라스미드, 파지미드 또는 약독화 바이러스 형태로 존재할 수 있고, 여기서 안티센스 핵산은 고효능 조절 영역의 조절하에 생성되며, 이의 능력은 당해 벡터가 도입된 세포 유형에 의해 결정될 수 있다. 안티센스 유전자를 사용한 유전자 발현의 조절에 대한 언급은 문헌[참조: Weintraub et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews: Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986]을 참조한다.

[0156] 본 발명의 또 다른 국면은 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에 관한 것이다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 상호교대로 사용된다. 이러한 용어는 특정 대상체 세포를 지칭할 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭하는 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경의 영향에 기인하여 특정한 변형이 후대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은, 사실, 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 당해 용어의 범위에 포함된다.

[0157] 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 웨პ터드 모방체는 이. 콜라이 등의 박테리아 세포, 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포(예: 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 COS 세포)에서 발현시킬 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질 또는 이로부터 유도된 변이체, 유도체 또는 웨პ터드 모방체는 CHO 세포에서 발현된다.

[0158] 벡터 DNA는 통상의 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵 또는 진핵 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은, 인산칼슘 도는 염화칼슘 공침전, DEAE 데스트란 매개된 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 포함하여, 숙주 세포 내로 외래 핵산(예: DNA)을 도입하기 위한 당해 기술분야에서 인지된 다양한 기술을 지칭하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 적합한 방법은 문헌[참조: Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)] 및 기타 실험 매뉴얼에서 발견할 수 있다.

[0159] 포유동물 세포의 안정한 형질감염을 위해, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라, 소분획의 세포만이 외래 DNA를 이들의 계놈 내로 통합시킬 수 있음이 공지되어 있다. 이들 통합체를 동정 및 선별하기 위해, 선별가능한 마커(예: 항생제에 대해 내성)를 코딩하는 유전자가 목적하는 유전자와 함께 숙주 세포 내로 일반적으로 도입된다. 다양한 선별가능한 마커는 G418, 하이그로마이신 및 메토트렉세이트 등과 같은 약물에 내성을 제공하는 것들을 포함한다. 선별가능한 마커를 코딩하는 핵산은 본 발명의 조성물을 코딩하는 것과 동일한 벡터 상에서 숙

주 세포 내로 도입될 수 있거나, 상이한 벡터 사이에 도입될 수 있다. 도입된 핵산으로 안정하게 형질감염된 세포는 약물 선별에 의해 동정할 수 있다(예: 선별가능한 마커 유전자가 도입된 세포는 생존할 것이며, 다른 세포는 사멸할 것이다).

[0160] 본 발명의 숙주 세포, 예를 들면, 배양물 중의 원핵 또는 진핵 숙주 세포는 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 펩티드 모방체를 생성(즉, 발현)하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명의 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질 및 이로부터 유도된 변이체, 유도체 및 펩티드 모방체를 생성하는 방법을 제공한다. 한 가지 실시양태에서, 당해 방법은 본 발명의 숙주 세포(본 발명의 조성물을 코딩하는 재조합 발현 벡터가 도입되어 있음)를 본 발명의 조성물이 생성되는 배양 배지에서 배양함을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 당해 방법은 본 발명의 조성물을 배지 또는 숙주 세포로부터 분리함을 추가로 포함한다.

[0161] 추가의 상세 없이도, 당해 기술분야의 기술자들은, 전술한 기재를 이용하여, 본 발명의 이의 최대 범위로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 설명하기 위한 것이고, 어떠한 방식으로도 본 발명의 나머지를 한정하는 것은 아니다.

[0162] 실시예

[0163] 실시예 1. 혈모주밸린-Fc 융합 단백질로 처리한 빈혈성 랫트에서 혈마토크릿의 증가

[0164] 랫트는 1회분의 람노즈를 15 mg/kg으로 주사했다. 28일 후, 관절 팽윤, 빈혈 및 현저한 백혈구증가가 발생한 랫트를 3개 그룹 중의 하나로 무작위 할당했다. 그룹 1에서, 랫트는 4주 동안 1주 2회 2 mg/kg으로 HJV.Fc(서열번호 9)의 정맥내 주사로 처리했다. 그룹 2에서, 랫트는 4주 동안 1주 2회 20 mg/kg으로 HJV.Fc의 정백내 주사로 처리했다. 그룹 3은 무처리했다.

[0165] 매주 혈마토크릿 및 혈모글로빈 혈청 농도를 측정했다. 4주 말기에서 배뇨말기 출혈에서, 혈마토크릿, 혈모글로빈, 혈청 철, 비장 폐리틴 및 간 햅시딘 RNA를 측정했다.

[0166] 도 3, 5 및 6에 제시된 바와 같이, 고용량의 HJV.Fc를 투여한 빈혈성 랫트는, HJV.Fc를 투여하지 않은 빈혈성 랫트보다 현저히 높은 혈청 혈마토크릿 및 혈청 혈모글로빈을 가졌다. HJV.Fc를 투여한 빈혈성 랫트는 4주 처리의 말기에서 비-빈혈성 랫트와 유사한 혈청 혈마토크릿 및 혈모글로빈을 가졌다. 저용량 HJV.Fc로부터의 데이터를 고용량 데이터에 부가하는 경우, HJV.Fc를 투여한 랫트는 HJV.Fc를 투여하지 않은 빈혈성 랫트보다 현저히 높은 혈청 혈마토크릿 및 혈청 혈모글로빈을 가졌다(도 4). 또한, HJV.Fc를 투여한 빈혈성 랫트는 4주 처리의 말기에서 비-빈혈성 랫트와 유사한 혈청 혈마토크릿 및 혈모글로빈을 가졌다.

[0167] 실시예 2. 단량체성 HJV.His는 BMP-6에 대해 낮은 친화도를 갖는다.

[0168] 도 7a는 아민 결합 방법(Halbrooks 2007)에 의해 CM5 센서 칩 상에 고정된 인간 BMP6에 결합하는 HIS-태그를 갖는 가용성 인간 혈모주밸린의 결합을 나타낸다. 1부위 일가 적합 모델을 사용하여, 대략 33 nM의 Kd가 수득된다. 도 7b는, 가용성 HJV.Fc 단백질이 고정된 인간 BMP6에 결합할 수 있고, 2부위 이가 적합 모델(HJV.Fc의 디설파이드 결합된 이량체성 성질을 설명하기 위해)이 단량체성 HJV.His 단백질과 비교하여 훨씬 높은 친화도인 13 pM의 예비 Kd를 제공함을 나타낸다. 따라서, 도 7a에 제시된 바와 같이, 단량체성 HJV.His는 BMP6에 대해 낮은 친화도를 갖는다. 도 7b에서, 호모이량체성 HJV.Fc는 BMP6에 대해 현저히 높은 결합 친화도를 갖는다.

[0169] 실시예 3. HJV.Fc는 용량 의존적 방식으로 BMP6 활성을 억제시킬 수 있다.

[0170] 도 8에 제시된 바와 같이, 세포-기반 생물억제 루시퍼라제 분석을 사용하면, HJV.Fc는 용량 의존적 방식으로 BMP6 활성을 억제시킬 수 있다. 간암-유도된 HepG2 세포에서 햅시딘 프로모터 루시퍼라제 분석은 상기한 바와 같이 수행했다(Babitt 2007). HJV.Fc 억제 분석을 위해, 햅시딘 프로모터 루시퍼라제 리포터(세포주 C33)로 안정하게 형질감염시킨 HepG2 세포는 6시간 동안 혈청 고갈시킨 다음, 16시간 동안 단독으로 또는 0.5, 5 또는 10 µg/ml의 HJV.Fc와 함께 100 ng/ml BMP-6 리간드로 배양했다. "BRX3" 및 "A6"는 HJV.Fc 단백질의 2가지 상이한 롯트이다. 더욱이, 도 9에 제시된 바와 같이, HJV.Fc는 HPLC 분석에 의해 입증된 바와 같이 호모이량체성 단백질의 실질적으로 순수한 제제로 제조될 수 있다. 이러한 분석 방법은 100 mM 인산나트륨, 200 mM 염화나트륨

(pH 6.0)의 작동 완충액으로 BioSep S3000 크로마토그래피 컬럼(Phenomenex) 상으로 HJV.Fc의 샘플의 주사를 수반했다. 유속은 1 ml/분이었고, 검출은 280 nm의 파장에서 수행되었다.

[0171] 본 명세서에서 인용된 모든 공보 및 특허출원은 각각의 공보 또는 특허출원이 구체적 및 개별적으로 참조로서 도입되는 것을 나타내는 것처럼 본원에서 참조로서 도입된다.

[0172] 전술한 기재는 명확한 이해를 목적으로 예시 및 실시예에 의거하여 약간 상세하게 기재되었지만, 이에 대한 특정한 변경 및 변형이 첨부된 특허청구범위의 정신 또는 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 본 명세서의 교시에 비추어 당해 기술분야의 기술자에게 자명할 것이다.

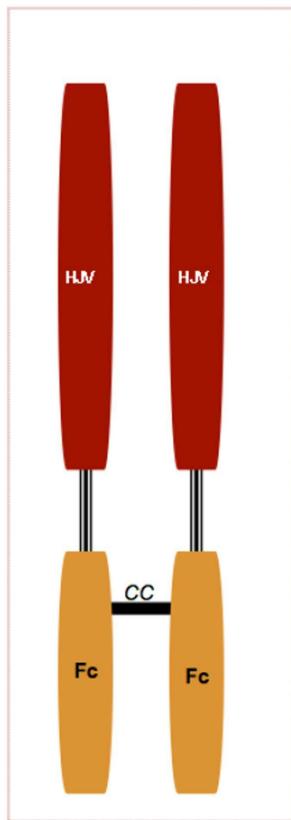
도면

도면1

한지

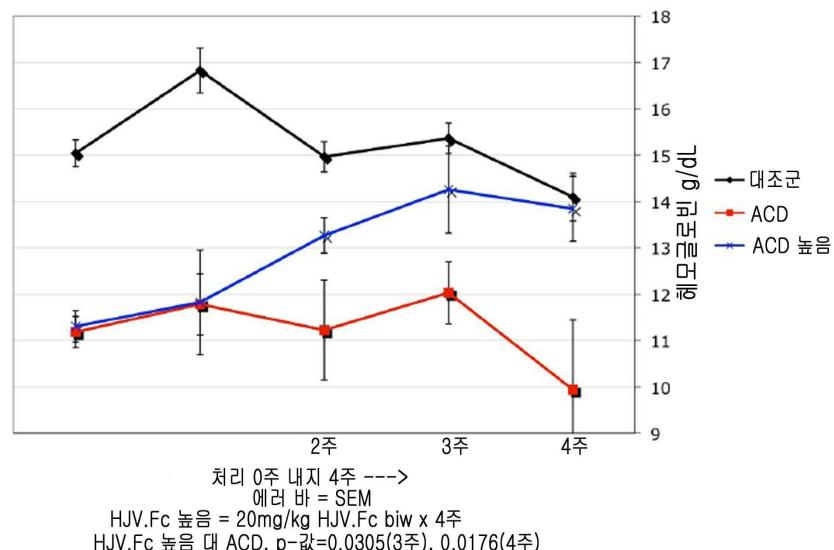
Fc-융합	D P K S C D K P H T C P L C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
HulgG1	E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
VEGF-trap	- - - - D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
오렌시아	E P K S S D K T H T S P P S C P A P E L L G G S S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
아칼리스트	- - - - D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
Fc-융합	N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
HulgG1	N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
VEGF-trap	N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
오렌시아	N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
아칼리스트	N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
Fc-융합	I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K A T P
HulgG1	I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
VEGF-trap	I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
오렌시아	I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
아칼리스트	I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
Fc-융합	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:3
HulgG1	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:4
VEGF-trap	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:5
오렌시아	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:6
아칼리스트	P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO:7

도면2



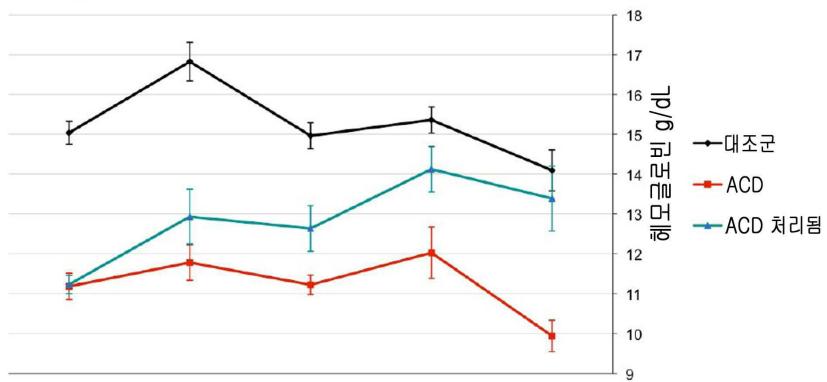
도면3

ACD의 고용량 HJV.Fc 처리된 랫트 PG-APS 모델에서 혈액글로빈



도면4

ACD의 HJV.Fc 처리된 랫트 PG-APS 모델에서 해모글로빈



처리 0주 내지 4주 --->

에러 바 = SEM

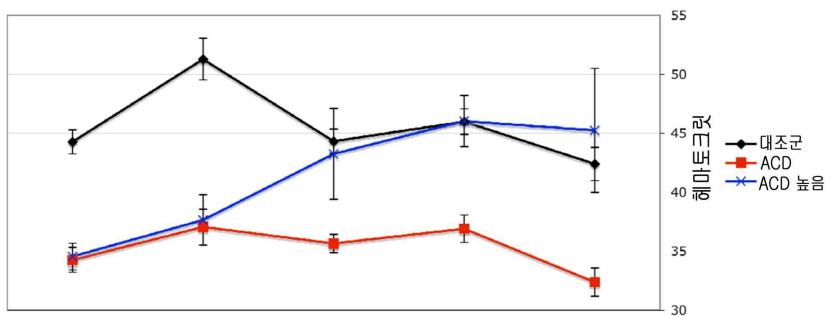
고용량 및 저용량 HJV.Fc 처리 (2mg/kg 및 20mg/kg 둘 다) HJV.Fc biw x 4주

HJV.Fc 처리됨 대 ACD, p-값=0.0273(3주)

p-값=0.0054(4주)

도면5

ACD의 HJV.Fc 처리된 랫트 PG-APS 모델에서 해마토크립



처리 0주 내지 4주 --->

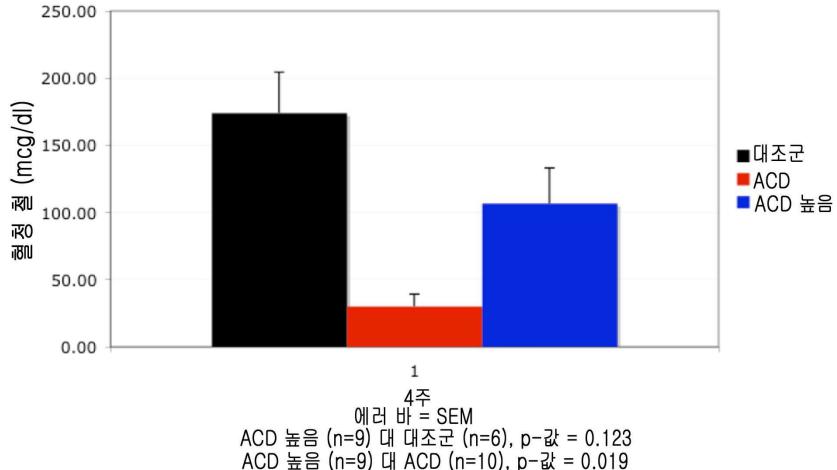
에러 바 = SEM

높음 = 20mg/kg HJV.Fc bid x 4주

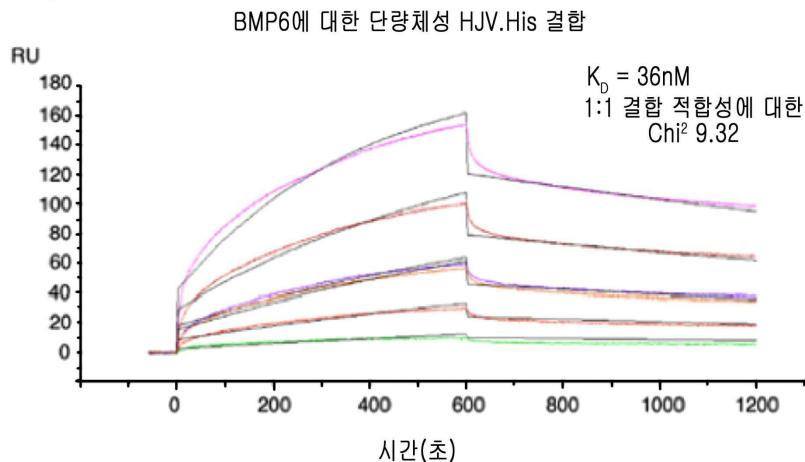
ACD 높음 대 ACD, p-값=0.0012(3주), 0.0229(4주)

도면6

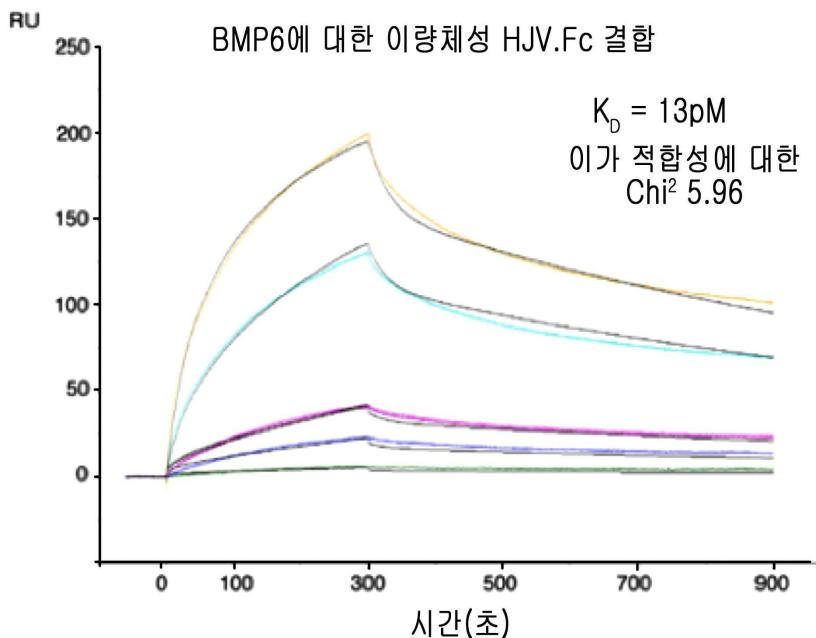
빈혈의 HJV.Fc 처리된 랫트 PG-APS 모델에서 혈청 철



도면7a

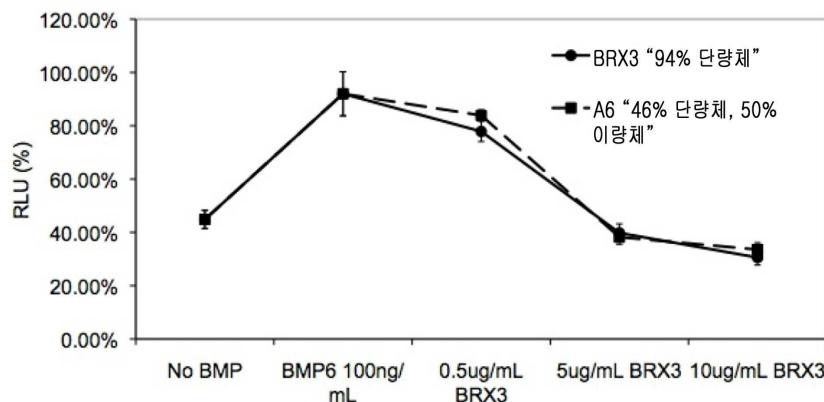


도면7b

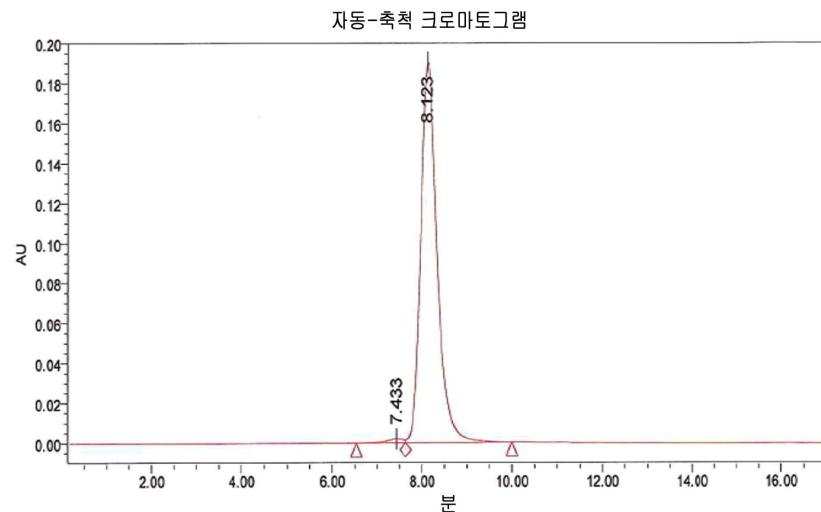


도면8

BRX3 및 A6은 C33 HepG2/Hepluc 세포 3.31.10에 대해
동일한 생물억제 활성을 갖는다.



도면9



서 열 목 록

- <110> Ferrumax Pharmaceuticals, Inc.
The General Hospital Corporation
- <120> COMPOSITIONS FOR REGULATING IRON HOMEOSTASIS AND METHODS OF USING
SAME
- <130> IPA130722
- <150> US 61/434,405
- <151> 2011-01-19
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 364
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gln Cys Lys Ile Leu Arg Cys Asn Ala Glu Tyr Val Ser Ser Thr Leu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Gly Gly Ser Ser Gly Ala Leu Arg Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Arg Gly Gly Val Gly Ser Gly Gly Leu Cys Arg Ala Leu

35 40 45

Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly

50 55 60

Asp Leu Ala Phe His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ile
 65 70 75 80
 Gln His Asn Cys Ser Arg Gln Gly Pro Thr Ala Pro Pro Pro Pro Arg
 85 90 95

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

 165 170 175
 Ala Asn Ala Thr Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Met
 180 185 190
 Gln Glu Cys Ile Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Val Asp Asn Leu
 195 200 205
 Pro Val Ala Phe Glu Asp Gly Ser Ile Asn Gly Gly Asp Arg Pro Gly
 210 215 220
 Gly Ser Ser Leu Ser Ile Gln Thr Ala Asn Pro Gly Asn His Val Glu
 225 230 235 240

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

305 310 315 320

Ala Tyr Phe His Ser Cys Val Phe Asp Val Leu Ile Ser Gly Asp Pro

 325 330 335

Asn Phe Thr Val Ala Ala Gln Ala Ala Leu Glu Asp Ala Arg Ala Phe

 340 345 350

Leu Pro Asp Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Pro Ser

 355 360

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge region.

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa is Cys or Ser.

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> Xaa is Leu or Pro.

<220><221> VARIANT

<222> (4)

<223> Xaa is Cys or Ser.

<400> 2

Xaa Pro Xaa Xaa

1

<210> 3

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG Fc derivative.

<400> 3

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Pro His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20	25	30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
35	40	45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
50	55	60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
65	70	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
85	90	95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
100	105	110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
145	150	155
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
165	170	175
Lys Ala Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
180	185	190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
195	200	205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
210	215	220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210>	4	
<211>	232	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 95

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

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

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

130 135 140

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 5

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region from VEGF-R Fc fusion.

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly
225
<210> 6
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region from CTLA4 Fc fusion.
<400> 6

Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala
1															
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
	20														
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
	35														
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	50														
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
	65														
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
	85														
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
	100														
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
	115														
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
	130														
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
	145														
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
	165														
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
	180														
	185														
	190														

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 7

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region from IL-1R Fc fusion.

<400> 7

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

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

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

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker.

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 9

<211> 596

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HJV.Fc fusion.

<400> 9

Gln Cys Lys Ile Leu Arg Cys Asn Ala Glu Tyr Val Ser Ser Thr Leu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Gly Gly Ser Ser Gly Ala Leu Arg Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Arg Gly Gly Val Gly Ser Gly Gly Leu Cys Arg Ala Leu

35 40 45

Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly

50 55 60

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

 Cys Asp Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Arg Leu His Gly Arg Pro Pro Gly
 115 120 125
 Phe Leu His Cys Ala Ser Phe Gly Asp Pro His Val Arg Ser Phe His
 130 135 140
 His His Phe His Thr Cys Arg Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Leu Asp
 145 150 155 160
 Asn Asp Phe Leu Phe Val Gln Ala Thr Ser Ser Pro Met Ala Leu Gly
 165 170 175
 Ala Asn Ala Thr Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Met

 180 185 190
 Gln Glu Cys Ile Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Val Asp Asn Leu
 195 200 205
 Pro Val Ala Phe Glu Asp Gly Ser Ile Asn Gly Gly Asp Arg Pro Gly
 210 215 220
 Gly Ser Ser Leu Ser Ile Gln Thr Ala Asn Pro Gly Asn His Val Glu
 225 230 235 240
 Ile Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg Gln Thr Ala
 245 250 255

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

Ala Tyr Phe His Ser Cys Val Phe Asp Val Leu Ile Ser Gly Asp Pro

325 330 335

Asn Phe Thr Val Ala Ala Gln Ala Ala Leu Glu Asp Ala Arg Ala Phe

340 345 350

Leu Pro Asp Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Pro Ser Asp Pro Lys Ser

355 360 365

Cys Asp Lys Pro His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Ser Pro Gly Lys

595

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminus of fusion protein.

<400> 10

Gln Cys Lys Ile Leu Arg Cys Asn Ala Glu

1 5 10

<210> 11

<211> 5638

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Encodes HJV.Fc fusion.

<400> 11

ttctagagaa tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa	60
tgcagtgaaa aaaaatgcattt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcatttta tttgttaacca	120
ttataagctg caataaaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggttc	180
agggggaggt gtgggaggtt ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtatggctg	240

attatgatca atcgatgtcg accaattcgt aatcatgtca tagctgttgc ctgtgtgaaa	300
ttgttatccg ctacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	360
gggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgcatttcca	420
gtcggaaac ctgtcggtcc agctgcatttta atgaatcgcc caacgcgcgg ggagaggcgg	480
tttgcgtatt gggcgctttt ccgcatttccgc gctcaactgac tcgctgcgtcgct cggcgttgc	540
gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggccgtataa cggttatcca cagaatcagg	600
ggataacgca gggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaaa	660

ggccgcgttg ctggcggtttt tccataggct ccggccccct gacgagcatc acaaaaatcg	720
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttcccc	780

tggaagctcc ctctgcgtc ctccgttcc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc	840
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttc tcatagctca cgctgttaggt atctcagtcc	900
ggtgttaggtc gtgcgtcca agctggctg tgagcacgaa ccccccgttc agcccgaccg	960
ctgcgcctta tccgtaact atcgcttiga gtccaaaccg gtiaagacacg acttatgcc	1020
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	1080
gttcttgaag tggggccta actacggcta cactagaaga acagtatttgcgtc	1140
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac	1200
caccgctggt agcggtggtt ttttgggg caagcagcag attacgcgc gaaaaaaaagg	1260
atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtggc acgaaaaactc	1320
acgttaaggg atttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttacccataga tcctttaaa	1380
ttaaaaatga agtttaaat caatctaaag tatatatgag taaaacttggt ctgacagtta	1440
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctattcggtt catccatagt	1500
tgccgtactc cccgtcggt agataactac gatacggag ggcttaccat ctggccccag	1560
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	1620
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc	1680
tattaaattgt tgccggaaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgccaaacgt	1740
tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtc acgctcgctg tttggatgg ctccattcag	1800
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgca aaaaagcggt	1860
tagctcccttc ggtccctccga tcgttgcag aagtaagtgc gccgcagtgt tatcactcat	1920
gttatggca gcactgcata attctttac tgtcatgcca tccgtaagat gctttctgt	1980
gactggtag tactcaacca agtcattctg agaatagttt atgcggcgac cgagttgctc	2040
ttgccccggc tcaatacggg ataataccgc gcccacatgc agaactttaa aagtgcctat	2100
cattggaaaa cgttcttcgg ggcaaaaact ctcaaggatc ttaccgtgt tgagatccag	2160
ttcgatgtaa cccactcgcg caccaactg atttcagca tctttactt tcaccagcgt	2220
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgaaaa aaggaaataa gggcgacacg	2280
gaaatgttga atactcatac tttcccttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	2340
ttgtctcatg agcgatatac tatttgaatg tatttagaaa aataaacaat taggggttcc	2400
gcccacattt ccccgaaaag tgccacactga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt	2460
aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc cttcgcttc ggcgtttcg gtgtatgcgg	2520
tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gttgtctgt aagcgatgc	2580
cgggagcaga caagcccgta agggcgctc agcggtgtt ggcgggtgtc gggcgtggct	2640

taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagcgac catatcggt gtgaaatacc	2700
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcca	2760
ctgttggaa gggcgatcg tgccggcctc ttgcgtatcg cggcagctgg cgaaaggggg	2820
atgtgctgca aggcgattaa gttggtaac gccagggtt tcccgatcac gacgttgaa	2880
aacgacggcc agtgcgaagc tagcgccgc cacgagtcta gctagagtgac gaattcgagc	2940
tccgaacccc tatacattga atcaatattg gcaatttagcc atattagtca ttggttat	3000
agcataaattc aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatac ataatatgt	3060
catttatatt ggctcatgtc caaatgacc gccatgtga cattgattat tgactatgtt	3120
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattatgt tcatagccca tataatgggt tccgcgttac	3180
ataacttacg gtaaatggcc cgccctggctg accgcacaac gaccccgcc cattgacgtc	3240
aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aataggact ttccatgtac gtcaatgggt	3300
ggagtatata cggttaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaaatgtcc	3360
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac	3420
cttacggac tttctactt ggcagtacat ctacgtatcg tcatcgctt ttaccatgtt	3480
gatgcggttt tggcagtaca ccaatggcg tggatagcggtttgactcac ggggatttcc	3540
aagtctccac cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt	3600
tccaaaatgt cgtataacc ccgccccgtt gacgcaatg ggccgttaggc gtgtacggtg	3660
ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgggatc cgatatccac	3720
catgggggag ccaggccagt cccctagtcc caggcttcc catggcagtc ccccaactct	3780
aagcactctc actctcctgc tgctccttg tggacatgtc cattctcaat gcaagatcct	3840
ccgctgcaat gctgagtacg tatcgatccac tctgagccctt agaggtgggg gttcatcagg	3900
agcacttcga ggaggaggag gaggaggccg gggtggaggg gtggctctg gcccctctg	3960
tcgagccctc cgctctatcg cgtctgcac tcggcgacc gcccgcacct gcccgggaa	4020
cctcgcccttc catcgccgg tacatggcat cgaagacgtt atgatccage acaactgtc	4080
ccgcccaggcc cctacagccc ctccccggcc ccggggcccc gcccggccag gcccgggctc	4140
cgccctccct gccccggacc cttgtgacta tgaaggccgg tttccggc tgcatggctg	4200
tccccgggg ttcttgcatcg cggccctt cggggacccc catgtgcga gcttccacca	4260
tcactttcac acatgccgtg tccaaggagc ttggccctta ctggataatg acttccttt	4320
tgtccaagcc accagctccc ccatggcggtt gggggccaaac gctaccgcca cccggaagct	4380

caccatcata tttaagaaca tgcaggaatg cattgatcag aaggtgtatc aggctgaggt	4440
ggataaatctt cctgttagcct ttgaagatgg ttcttatcaat ggaggtgacc gacctgggg	4500
atccagtttgcgattcaaa ctgctaaccc tgggaaccat gtggagatcc aagctgccta	4560
cattggcaca actataatca tcggcagac agctggcag ctctccctt ccatcaaggt	4620
agcagaggat gtggccatgg ctttcgcagc tgaacaggac ctgcagctc gtgttgggg	4680
gtgccctcca agtcagcgac tctctcgatc agagcgcaat cgtcgaggag ctataaccat	4740
tgatactgcc agacggctgt gcaaggaagg gcttccatgt gaagatgctt acttccattc	4800
ctgtgtcttt gatgtttaa ttcttgta tcccaacttt accgtggcag ctcaggcagc	4860
actggaggat gcccgagcct tcctgccaga cttagagaag ctgcacatct tcccctcagg	4920
tggtggttgtt ggtgatccca aatcttgcata caaacctcac acatgcccac tgtgcccagc	4980
acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctttcccc caaaaaccca aggacaccct	5040
catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggttgt gacgtgagcc acgaagaccc	5100
tgaggtaag ttcaacttgtt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc	5160
gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggcagc gtctcaccc tcctgcacca	5220
ggactggctg aatggcaagg agtacaagtgc caaggtctcc aacaaagccc tcccgcccc	5280
catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct	5340
ccccccatcc cggtatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgaccctgcc tagtcaaagg	5400
cttctatccc agcgacatcg ccgtggatgtt ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta	5460
caaggccacg cctccgtgc tggactccga cggctcccttc ttcccttaca gcaagctcac	5520
cgtggacaag agcaggtggc agcagggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc	5580
tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gagctgat	5638