



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월22일
 (11) 등록번호 10-1175687
 (24) 등록일자 2012년08월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/61 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7014530
- (22) 출원일자(국제) 2004년02월05일
 심사청구일자 2008년12월02일
- (85) 번역문제출일자 2005년08월05일
- (65) 공개번호 10-2005-0103288
- (43) 공개일자 2005년10월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2004/000117
- (87) 국제공개번호 WO 2004/069871
 국제공개일자 2004년08월19일
- (30) 우선권주장
 2003900481 2003년02월05일 오스트레일리아(AU)

(56) 선행기술조사문헌

WO2002024219 A1

WO2000055206 A1

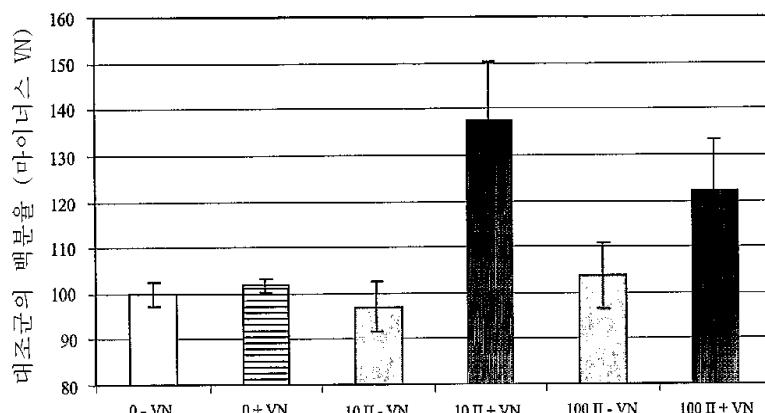
전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 성장인자 복합체 및 세포 이동 및 성장의 조절

(57) 요약

본 발명은 IGF-I, IGF-II, VEGF 또는 PDGF와 같은 성장인자, 또는 성장인자 수용체 둘 모두에 결합하고 활성화 시킬 수 있는 적어도 그의 도메인들, 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 인테그린 수용체 결합 도메인을 포함하는 분리된 단백질 복합체를 제공한다. 이를 단백질 복합체는 올리고-단백질의 형태 또는 성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴 서열이 링커 서열에 의하여 연결되어 있는 단일의 합성 단백질의 형태일 수 있다. 특정한 형태에 있어서, 비트로넥틴 또는 피브로넥틴 서열은 헤파린 결합 도메인 및/또는 폴리음이온 도메인을 포함하지 않는다. 또한, 본 발명은 상처 치료, 조직 공학, 피부 치환 및 피부 재생과 같은 화장용 및 치료적 처리 및 상피 세포 이동이 필요한 화상의 치료에 용도를 가질 수 있는 세포 이동 및/또는 증식을 촉진 또는 유도하기 위한 이를 단백질 복합체의 용도를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 암 세포 전이, 특히 유방암과 관련한 암 세포 전이를 억제하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

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

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

- (i) 인슐린-유사 성장인자 I (IGF-I) 또는 인슐린-유사 성장인자 II (IGF-II);
- (ii) IGF-I의 경우, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 및 IGFBP6으로 이루어진 군으로부터 선택된 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질 (IGFBP); 및
- (iii) 서열번호 2의 45 내지 47번 잔기로 이루어진 RGD 아미노산 서열 및 서열번호 2의 53 내지 64번 잔기로 이루어진 폴리음이온 영역을 포함하고, 상기 IGF-II 또는 상기 IGFBP에 결합하는 비트로넥틴 (VN)의 인테그린 결합 도메인을 포함하는, 비공유적으로 결합된 (non-covalently associated) 분리된 단백질 복합체.

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

제64항에 있어서, 상기 IGFBP는 IGFBP3 및 IGFBP5로부터 선택되는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

제64항에 있어서, 상기 인테그린 결합 도메인은 α_v 인테그린 결합 도메인인 분리된 단백질 복합체.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 인테그린 결합 도메인은 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 결합 도메인 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 결합 도메인인 분리된 단백질 복합체.

청구항 80

(i) 성장인자; 및

(ii) RGD 아미노산 서열을 포함하는 인테그린 결합 도메인을 포함하는 비트로넥틴 (VN)의 생물학적으로 활성인 단편으로서, 상기 비트로넥틴 (VN)의 인테그린 결합 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열로부터 선택된 연속 아미노산 서열이고 서열번호 2의 1번 내지 52번 잔기를 포함하는 것인 단편;의 아미노산 서열을 포함하는 합성 키메라 단백질 형태인 분리된 단백질 복합체.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 인테그린 결합 도메인은 α_v 인테그린 결합 도메인인 분리된 단백질 복합체.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 인테그린 결합 도메인은 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 결합 도메인 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린 결합 도메인인 분리된 단백질 복합체.

청구항 83

삭제

청구항 84

제80항에 있어서, 상기 성장인자는 IGF-I 또는 IGF-II인 분리된 단백질 복합체.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 성장인자는 IGF-I인 분리된 단백질 복합체.

청구항 86

제85항에 있어서,

(i) IGF-I; 및

(ii) RGD 아미노산 서열을 포함하는 인테그린 결합 도메인을 포함하는 비트로넥틴 (VN)의 생물학적으로 활성인 단편으로서, 상기 비트로넥틴 (VN)의 인테그린 결합 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열로부터 선택된 연속 아미노산 서열이고 서열번호 2의 1번 내지 52번 잔기를 포함하는 것인 단편;의 아미노산 서열로 이루어진 분리된 단백질 복합체.

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

제80항에 있어서, (ii)의 생물학적으로 활성인 단편의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 성숙한 비트로넥틴의 1 내지 130번 아미노산 잔기를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

제85항에 있어서, IGF-I의 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 IGF-I의 4 내지 70번 아미노산 잔기를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 97

제85항에 있어서, IGF-I의 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 IGF-I의 1 내지 70번 아미노산 잔기를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 98

제80항에 있어서, 상기 성장인자와 상기 생물학적으로 활성인 단편 사이에 하나 이상의 링커 서열을 더 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 링커 서열은 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 100

제98항에 있어서, 상기 링커 서열은

(i) Gly₄ Ser (서열번호: 4) ;

(ii) Gly₄ Ser₃ (서열번호: 5) ;

(iii) (Gly₄ Ser)₃ (서열번호: 6);

(iv) Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열번호: 7); 및

(v) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열번호: 8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 101

제64항에 있어서, 상기 VN은 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체로서, 상기 돌연변이는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 (i) T50A; (ii) T57A; (iii) T50E; 및 (iv) T57E로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 102

삭제

청구항 103

제85항에 있어서, 서열번호 11, 12 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 104

제80항의 상기 분리된 단백질 복합체를 코딩하는 분리된 핵산.

청구항 105

벡터 중에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 제104항의 상기 분리된 핵산을 포함하는 유전적 구조체.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 분리된 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 발현 구조체인 유전적 구조체.

청구항 107

제106항의 상기 유전적 구조체를 포함하는 숙주 세포.

청구항 108

제64항 또는 제80항의 상기 분리된 단백질 복합체 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 상처, 화상 또는 궤양을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 109

제64항 또는 제80항의 상기 분리된 단백질 복합체가 함침되어 있거나, 코팅되어 있거나 또는 포함되어 있는 외과적 임플란트, 스캐폴드 또는 보형물 (prosthesis).

청구항 110

제64항 또는 제80항의 상기 분리된 단백질 복합체를 포함하는 상처 또는 화상 드레싱을 위한 조성물.

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

제64항 또는 제80항의 상기 분리된 단백질 복합체를 이용하여 세포에 의하여 발현된 성장인자 수용체 및 인테그린 수용체 모두에 결합시켜 인 비트로에서 상기 세포의 이동 또는 증식 또는 세포의 이동 및 증식을 유도, 증진 또는 촉진하는 단계를 포함하는, 세포 이동 또는 증식 또는 세포 이동 및 증식을 촉진하는 방법.

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 아고니스트 또는 길항제인 분자를 설계, 확인 또는 생산하는 데에 제64항 또는 제80항의 상기 분리된 단백질 복합체를 사용하는 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, IGF-II 및 비트로넥틴 또는 IGF-I, IGFBP 및 비트로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 아고니스트를 생산하는 데에 사용하는 것인 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, IGF-II 및 비트로넥틴 또는 IGF-I, IGFBP 및 비트로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 길항제를 생산하는 데에 사용하는 것인 방법.

청구항 124

제80항에 있어서, (ii)의 생물학적으로 활성인 단편의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 성숙한 비트로넥틴의 1 내지 347번 아미노산 잔기를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 125

제86항에 있어서, 상기 IGF-I과 상기 생물학적으로 활성인 단편 사이에 하나 이상의 링커 서열을 더 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 링커 서열은 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 분리된 단백질 복합체.

청구항 127

제125항에 있어서, 상기 링커 서열은

(i) Gly₄ Ser (서열번호: 4) ;

(ii) Gly₄ Ser₃ (서열번호: 5) ;

(iii) (Gly₄ Ser)₃ (서열번호: 6);

(iv) Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열번호: 7); 및

(v) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열번호: 8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 분리된 단백질 복합체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 타입 1 인슐린-유사 성장인자 수용체와 같은 성장인자 수용체, 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴에 대한 인테그린 수용체 모두에 결합할 수 있고 활성화시킬 수 있는 각 도메인들을 갖는 단백질 복합체에 관한 것이다. 특정한 구체예에서, 본 발명은 인슐린-유사 성장인자-I, 인슐린-유사 성장인자-II, 혈소판-유래 성장인자 또는 혈관 내피-유래 성장인자 수용체-결합 도메인 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 인테그린 수용체-결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 세포 이동을 촉진하는 단백질 복합체 및 세포 이동 및/또는 증식을 촉진 또는 유도하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이들 조성물 및 방법은 상처 치료, 조직 공학, 피부 치환 및 피부 재생과 같은 화장용 및 치료적 및 상피 세포 이동이 필요한 화상의 치료에 용도를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 특히 유방암과 관련된, 암 세포 전이의 방지 또는 억제와 관련된 본 발명에 의하여 제공되는 치료를 제공한다. 본 발명의 키메라 단백질은 또한 인슐린-유사 성장인자, 비트로넥틴 및 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질을 포함하는 단백질 복합체의 생물학적 작용의 아고니스트 및 길항제의 생산에 유용할 수 있다.

배경 기술

[0002] 인슐린-유사 성장인자 (IGF)인 IGF-I 및 IGF-II는 증식증 (hyperplasia), DNA 합성, 분화, 세포 주기 진행 및 세포자가사 (apoptosis)의 저해를 포함한 넓은 범위의 세포성 과정에 관여하는 분열촉진 웹티드 성장인자이다 (Keiss et al., 1994, Hormone Research 41: 66; Wood & Yee, 2000, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia 5: 1; Jones & Clemmons, 1995, Endocrine Rev. 16: 3). 이들 효과는 티로신-키나제 세포 표면 수용체인 타입 1 IGF 수용체 (IGF-IR)에 대한 결합을 통하여 매개된다. 상기 IGF는 또한, 유리 IGF에 결합하여 IGF의 반감기, 특이성 및 활성을 조절하는 것이 일차적 역할인 IGFBP라고 하는 특이적인 결합 단백질의 패밀리에 의하여 엄격하게 조절된다 (Clemmons, 1998, Mol. Cell. Endocrinol. 140: 19).

[0003] 국제 공개 WO 02/24219에 개시된 바와 같이, IGF-I는 특정한 IGFBP의 존재하에서 VN에 결합할 수 있으나, 비트로넥틴 (VN)은 IGF-II에 직접적으로 결합한다는 것이 최근 밝혀졌다 (Upton et al., 1999, Endocrinology 140: 2928-31). ECM 조직화 및 점착 분자인 VN이 IGF-II의 그의 생물학적으로 관련된 수용체인 IGF-IR에 대한 친화성과 비슷한 친화성으로 IGF-II와 결합한다는 발견 내용은 (Upton et al., 1999, supra), 상기 ECM 내에서 IGF 작용과 VN 사이의 특이적인 물리적 연결이 있다는 것을 나타내는 것이다. 더욱이, VN에 결합된 IGF-II는 인 비트로에서 인간 각질세포에서 상승적 기능적 반응을 촉진할 수 있다 (국제공개 WO 02/24219).

[0004] VN은 혈액과 ECM에 아주 풍부한 당단백질이다. 주로 간에서 합성되나 다른 많은 세포 타입에 의하여 발현된 VN은 폐쇄된 콘포메이션 (conformation)으로 혈액 중에서 순환하고 개방 또는 확장된 콘포메이션으로 상기 ECM에 침적된다 (Schvartz et al., 1999, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 31: 531-44). 두 콘포메이션 모두 IGF-II에 결합하는 것으로 여겨지며 (Upton et al., 1999, supra; 국제공개 WO 02/24219; McMurtry et al., 1996, Endocrinology 137: 149-60) 또한 콜라겐 (Morris et al., 1994, Journal of Biological Chemistry 269: 23845-52), 글리코스아미노글리칸 (Francois et al., 1999, Journal of Biological Chemistry 274: 37611-19), 많은 다른 ECM 단백질 및 아주 다양한 인테그린 특히, α_v 인테그린을 포함한 복수의 다른 리간드에 결합한다. 실제로 비트로넥틴의 주요 역할은 RGD 결합 모티프를 통하여 이들 세포 표면 인테그린 수용체에 점착성 링크를 제공하는 ECM 조직화 분자로서이다. 상기 VN 수용체 (α_v 인테그린)는 성장 및 침입에 필요한 액틴 세포골격 재배열을 조절하고, 그에 따라 VN 결합은 세포 부착 및 운동을 조정하는 것으로 밝혀졌다 (DePasquale, 1998, Histochemistry and Cell Biology 110: 485-94; Huang, 2000, Oncogene 19: 1915-23).

[0005] 그러나, 세포 이동 및/또는 증식과 같은 생물학적 반응을 촉진하는 관점에서, 단백질 복합체에 존재하는 IGF 및 VN의 각각의 상대적 기여는 밝혀지지 않고 있으며, IGF/IGFBP 및 VN 사이의 단백질-단백질 상호작용의 부위도 밝혀지지 않았다.

발명의 상세한 설명

[0006] 본 발명자들은 IGF-II 및 VN 또는 IGF-I 및 IGFBP 및 VN을 포함하는 단백질 복합체가 IGF-I 수용체 (IGF-IR) 및 VN-결합 인테그린 수용체에 결합하여 이들을 상승적으로 동시에 활성화시켜 세포 이동 및/또는 증식을 촉진한다는 것을 발견하였다.

[0007] 또한, VN의 폴리음이온 도메인이 IGF 또는 IGFBP의 제안된 결합 부위로서 확인되었다.

[0008] 그러므로, 본 발명은 성장인자의 수용체-결합 도메인 및 인테그린 수용체에 결합할 수 있는 비트로넥틴 또는 피

브로넥틴의 도메인을 포함하는 분리된 단백질 복합체에 넓게 관련되는 것으로, 상기 분리된 단백질 복합체는 상기 성장인자 및 인테그린 수용체를 동시 활성화시킬 수 있고 그에 따라 생물학적 반응을 유도할 수 있다.

- [0009] 제1 양상에 있어서, 본 발명은 (i) 성장인자, 또는 동족 (cognate) 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 도메인; 및
 - (ii) 비트로넥틴 (VN) 또는 피브로넥틴 (FN), 또는 적어도 VN 또는 FN의 인테그린 결합 도메인을 포함하는, 분리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0011] 제2 양상에 있어서, 본 발명은 (i) 성장인자, 또는 동족 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 도메인; 및
 - (ii) 비트로넥틴 (VN) 또는 피브로넥틴 (FN), 또는 적어도 VN 또는 FN의 인테그린 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함하는, 합성 키메라 단백질의 형태인 분리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0013] 바람직하게는, 상기한 양상에 따르면, 상기 성장인자는 IGF-I 또는 IGF-II이다.
- [0014] 더욱 바람직하게는, 상기 성장인자는 IGF-I이다.
- [0015] 구체예에서 상기 성장인자가 IGF-I인 경우, 적합하게는 상기 적어도 IGF-I의 도메인은 IGF-I의 24번 잔기를 포함한다.
- [0016] 구체예에서 상기 성장인자가 IGF-II인 경우, 적합하게는 상기 적어도 IGF-II의 도메인은 IGF-II의 27번 잔기를 포함한다.
- [0017] 다른 구체예에서, 상기 성장인자는 VEGF 또는 PDGF이다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_v 인테그린이다.
- [0019] 더욱 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린이다.
- [0020] 본 발명의 이 양상은 또한 그의 범위 내에 상기 (i) 및 (ii)에 해당하는 아미노산 서열의 아미노산 결실, 부가, 치환 및/또는 돌연변이를 포함한다.
- [0021] 제3 양상에 있어서, 본 발명은 제2 양상의 상기 분리된 단백질 복합체를 코딩하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0022] 제4 양상에 있어서, 본 발명은 발현 벡터 중에서 하나 이상의 조절서열에 작동가능하게 연결되어 있는 상기 제3 양상의 상기 분리된 핵산을 포함하는 유전적 구조체를 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 유전적 구조체는 발현 벡터이다.
- [0024] 제5 양상에 있어서, 본 발명은 상기 제4 양상의 상기 유전적 구조체를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0025] 제6 양상에 있어서, 본 발명은 상기 제1 양상의 상기 분리된 단백질 복합체 또는 상기 제2 양상의 상기 합성 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 이 양상은 또한 세포가 상기 합성 단백질을 발현하는, 상기 제5 양상의 상기 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.
- [0027] 제7 양상에 있어서, 본 발명은 상기 제2 양상의 상기 합성 단백질에 대하여 특이적인 항체를 제공한다.
- [0028] 제8 양상에 있어서, 본 발명은 합성 단백질을 이용하여 성장인자 수용체 및 인테그린 수용체 둘 모두에 결합시키는 단계를 포함하는 세포 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0029] 바람직하게는, 상기 성장인자 수용체는 IGF-IR이다.
- [0030] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_v 인테그린이다.
- [0031] 더욱 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린이다.
- [0032] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 이 양상은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 상처 치유를 촉진하기 위하여 상피 세포 이동 및/또는 증식을 촉진 또는 유도하는 것과 관련된다.
- [0033] 바람직하게는, 상기 합성 단백질은 본 발명의 상기 제1 양상에 따른 바와 같다.

- [0034] 제9 양상에 있어서, 본 발명은 성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴을 포함하는 복합체에 의하여 성장인자 수용체 및 인테그린 수용체 둘 모두에의 결합을 방지, 저해 또는 감소시키는 단계를 포함하는, 세포 이동 및/또는 증식을 방지하는 방법을 제공한다.
- [0035] 바람직하게는, 상기 성장인자 수용체는 IGF-IR이다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_v 인테그린이다.
- [0037] 더욱 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린이다.
- [0038] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 이 양상은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 전이성 암 세포 이동 및/또는 증식을 방지 또는 저해하는 것과 관련된다.
- [0039] 본 발명의 이 양상에 의하여 고려되는 특별한 예는 유방암 전이의 방지 또는 저해이다.
- [0040] 상기 제8 및 제9 양상의 방법은 치료의 예방적 및 치료적 방법을 포함할 수 있는 것으로 또한 이해되어야 한다.
- [0041] 제10 양상에 있어서, 본 발명은 (i) 성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 아고니스트; 또는 (ii) 성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 길항제인 분자를 생산하기 위한 상기 제1 양상의 상기 분리된 단백질 복합체 또는 제2 양상의 상기 합성 단백질의 용도를 제공한다.
- [0042] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 (i) IGF-II : VN 또는 IGF-I : IGFBP : VN 단백질 복합체의 아고니스트; 또는 (ii) IGF-II : VN 또는 IGF-I : IGFBP : VN 단백질 복합체의 길항제인 분자를 생산하기 위한 상기 제1 양상의 상기 합성 단백질의 용도를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 이 양상에 따라 생산된 길항제 및/또는 아고니스트는 상처 치유, 조직 공학, 피부 재생 및/또는 암세포 전이 또는 흉터발생 및 건선과 같은 피부의 과증식 질환의 방지에 특정한 효능을 가질 수 있다.
- [0044] 제11 양상에 있어서, 본 발명은 제1 또는 제2 양상의 상기 분리된 단백질 복합체를 포함하는 생물물질을 제공한다.
- [0045] 특정한 구체예에서, 상기 생물물질은 본 발명의 분리된 단백질 복합체가 적합하게는 함침되어 있거나, 코팅되어 있거나 또는 그렇지 않으면 포함되어 있는 외과적 임플란트, 보형물, 스캐폴더, 상처 또는 화상 드레싱일 수 있다.
- [0046] 본 발명은 IGF-II 및 VN 또는 IGF-I 및 IGFBP 및 VN을 포함하는 단백질 복합체가 반응성 세포에 의하여 발현된 IGF-IR 수용체 및 VN-결합 인테그린 수용체에 결합하여 세포 이동에 대하여 생물학적 영향을 미친다는 것을 발견한 것으로부터 근거하였다. 더욱 구체적으로, 이 이중 결합 과정은 본 발명자들에 의하여 각질세포 모델과 유방암 세포 모델 모두에서 밝혀진 바와 같이, 세포 이동 및/또는 증식을 상승적으로 자극한다.
- [0047] 더욱이, 놀랍게도 IGF-II 및 IGFBP와 상호작용하거나 결합하는 것으로 보이는 VN의 도메인이 성숙한 VN의 아미노산 53-64에 해당하는 폴리음이온 영역이라는 것이 발견되었다.
- [0048] 이 발견에 따라 본 발명자들은 VN의 인테그린 결합 도메인과 조합으로 상기 IGF-IR에 결합할 수 있는 IGF-I 또는 IGF-II의 적어도 최소 도메인 또는 영역을 포함하는 분리된 단백질 복합체를 제공할 수 있게 되었다. 특히, 이를 도메인을 포함하는 단일, 연속 단백질 (contiguous protein)이 생산될 수 있다.
- [0049] 복수 단백질을 포함하든 또는 단일 합성 단백질의 형태이든 그러한 단백질 복합체는 상기 IGF-IR 및 상기 VN-결합 인테그린 수용체에 조화롭게 결합하거나 동시에 리간드 결합하여 세포 이동 및/또는 증식 및 상처 치유를 위한 유용한 약제일 것으로 예상된다. 비슷하게, 상기 IGF-IR 및 상기 VN-결합 인테그린 수용체의 동시에 리간드 결합 (co-ligation)의 방지는 암 세포 전이를 방지하는데 사용될 수 있다는 것이 본 발명자들에 의하여 제안되었다.
- [0050] 또한, 이 발견은 PDGF 및 VEGF와 같은, 그러나 이를 예에 한정되는 것은 아닌 다른 성장인자 및 피브로넥틴 (FN)과 같은 인테그린-결합 단백질을 포함하는 단백질 복합체에 확장될 수 있다는 것이 제안되었다.
- [0051] 본 명세서 전체에 있어서, 달리 언급이 없으면, "포함하다 (comprise)", "포함하다 (comprises)" 및 "포함하는 (comprising)"이라는 용어는 배타적이라기 보다는 내포적 (inclusively)으로 사용되어, 언급된 인테자 (integer) 또는 인테자의 군은 하나 이상의 다른 언급되지 않은 인테자 또는 인테자 군을 포함할 수 있다.

- [0052] 성장인자 수용체-결합 도메인 및 인테그린 결합 도메인의 특정한 문맥에 있어서, 그러한 도메인은 소망의 다른 추가적인 아미노산과 함께, 상기 도메인의 아미노산 서열을 포함할 것이다.
- [0053] 그러한 도메인은 10개 이하, 바람직하게는 5개 이하 또는 더욱 바람직하게는 4개, 3개, 2개 또는 하나 이하의 추가적 아미노산과 함께, 상기 도메인의 아미노산 서열로 "필수적으로 구성 (consist essentially of)"될 수 있다는 것은 또한 이해될 수 있을 것이다.
- [0054] 또한, 그러한 도메인은 임의의 추가의 아미노산 없이, 상기 도메인의 아미노산 서열로 "구성 (consist of)"될 수 있다는 것도 이해될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 목적을 위하여, "분리된 (isolated)"이란 천연 상태로부터 제거되었거나 그렇지 않으면 인간 조작의 대상이 된 것을 의미한다. 분리된 물질은 천연 상태에서 통상적으로 함께 수반되는 성분이 실질적으로 또는 필수적으로 없는 것이거나, 천연 상태에서 통상적으로 함께 수반되는 성분과 함께 인공 상태로 되도록 조작된 것일 수 있다. 분리된 물질은 천연, 화학 합성 또는 재조합 형태일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "합성 (synthetic)"이란 천연적으로 존재하지 않고 인간의 기술적 개입에 의하여 제조된 것을 의미한다. 합성 단백질 및 핵산의 문맥에서, 이는 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 재조합, 화학 합성 또는 조합 기술에 의하여 생산된 분자를 포함하는 의미이다.
- [0057] "단백질(protein)"이란 아미노산 중합체를 의미한다. 상기 아미노산은 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 천연 또는 비천연, D- 또는 L-아미노산일 수 있다. "단백질 (protein)"이라는 용어는 또한 당업계에 통상적으로 사용되는 바와 같은, "당단백질 (glycoprotein)", "리포단백질 (lipoprotein)" 등의 용어를 포함한다.
- [0058] "펩티드 (peptide)"란 50 개 아미노산 미만을 갖는 단백질이다.
- [0059] "폴리펩티드 (polypeptide)"는 50 이상의 아미노산을 갖는 단백질이다.
- [0060] 상기한 바와 같이, 본 발명은 일 특정한 구체예에서,
- [0061] (i) 성장인자 또는 동족 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 도메인; 및 (ii) 적어도 비트로 네틴 또는 피브로네틴의 인테그린 결합 도메인을 포함하는 분리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "성장인자 (growth factor)"란 인 비트로 및/또는 인 비보에서 세포 성장, 분화, 생존 및/또는 이동을 조절할 수 있는 생물학적 활성 단백질이다.
- [0063] 바람직하게는, 상기 성장인자는 IGF-I, IGF-II, VEGF 및 PDGF로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0064] 더욱 바람직하게는, 상기 성장인자는 IGF-I 및 IGF-II로부터 선택된다.
- [0065] 그러나, 본 발명은 또한 상피세포 성장인자 (EGF; Heldin et al., 1981, Science 4 1122-1123), 섬유아세포 성장인자 (FGF; Nurcombe et al., 2000, J. Biol. Chem. 275 30009-30018), 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF; Taraboletti et al., 1997, Cell Growth. Differ. 8 471-479), 오스테오폰틴 (Nam et al., 2000, Endocrinol. 141 1100), 트롬보스폰딘-1 (Nam et al., 2000, supra), 테나신-C (Arai et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 6099), PAI-1 (Nam et al., 1997, Endocrinol. 138 2972), 플라스미노겐 (Campbell et al., 1998, Am. J. Physiol. 275 E321), 피브리노겐 (Campbell et al., 1999, J. Biol. Chem. 274 30215), 피브린 (Campbell et al., 1999, supra) 또는 트란스페린 (Weinzimer et al., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 1806)과 같은 세포 성장, 분화, 생존 및/또는 이동을 조절하는 다른 생물학적 활성 단백질도 포함한다.
- [0066] 본 발명의 분리된 단백질 복합체는 성장인자 또는 동족 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 도메인을 포함한다.
- [0067] 이 문맥에 있어서, "도메인 (domain)"이란 동족 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 그 부분 또는 영역을 의미한다. 일반적으로, 배타적이지는 않을지라도, 상기 동족 성장인자 수용체는 세포에 의하여 발현되고, 상기 적어도 성장인자의 도메인에 의한 상기 동족 성장인자 수용체와의 결합 또는 라이게이션은 세포 성장, 분화 및/또는 이동과 같은 세포 반응을 유도한다.
- [0068] 특정한 IGF-I에 관하여, 상기 도메인은 적합하게는 루신 잔기가 아닌 아미노산 잔기 24번을 포함한다.
- [0069] 일반적으로, 상기 잔기는 티로신이다.
- [0070] 특정한 IGF-II에 관하여, 상기 도메인은 적합하게는 루신 잔기가 아닌 아미노산 잔기 27번을 포함한다.

- [0071] 일반적으로, 상기 잔기는 티로신이다.
- [0072] 특정한 IGF-I에 관하여, 일 구체예에서, 상기 도메인은 IGF-I의 1 내지 70 번 잔기로 구성된다.
- [0073] 다른 구체예에서, 상기 도메인은 IGF-I의 4 내지 70 번 잔기로 구성된다.
- [0074] 본 발명의 분리된 단백질 복합체의 다른 성분은 적어도 비트로넥틴 또는 피브로넥틴의 인테그린 결합 도메인이다.
- [0075] 이는 α_v 인테그린에 결합할 수 있는 VN 또는 FN의 임의의 도메인을 포함한다.
- [0076] 더욱 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 또는 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린이다.
- [0077] 이하 보다 상세하게 설명하는 바와 같이, 본 발명자들은 VN (및 유사하게 FN)의 HBD가 분리된 단백질 복합체의 완전한 생물학적 활성을 위하여 필요하지 않다는 것을 보인다.
- [0078] 상기의 내용으로부터 본 발명의 분리된 단백질 복합체는 비공유적으로 연관된 올리고-단백질 복합체, (가역 또는 비가역적으로) 공유적으로 가교된 올리고-단백질 복합체의 형태 또는 합성, 키메라 단백질의 형태일 수 있다는 것은 용이하게 이해할 수 있다.
- [0079] 따라서, 특정한 양상에서, 본 발명은 (i) 성장인자, 또는 동족 성장인자 수용체에 결합할 수 있는 적어도 성장인자의 도메인; 및 (ii) 비트로넥틴(VN) 또는 피브로넥틴 (FN), 또는 적어도 VN 또는 FN의 인테그린 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함하는, 합성 키메라 단백질의 형태로 분리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0080] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "키메라 단백질 (chimeric protein)"은 VN 또는 FN의 인테그린-수용체 결합 도메인 및 성장인자 또는 적어도 성장인자의 수용체-결합 도메인으로부터 유래된 아미노산의 연속 서열을 포함한다.
- [0081] 비록 임의의 특정한 이론에 구속되고자 하는 의도는 아니나, 합성 키메라 단백질은 상기 성장인자에 대한 동족 수용체 및 VN 또는 FN에 대한 인테그린 수용체를 동시 연결 (co-ligate) 및 동시 활성화시켜 세포 이동을 자극, 유도, 증가 또는 촉진시킬 수 있는 것으로 제안된다.
- [0082] 본 발명에 따른 키메라 단백질의 장점은 화학 합성 또는 재조합 수단에 의하여 용이하게 생산되고, 비공유 올리고-단백질 복합체에 필요한 단백질-단백질 상호작용을 유지하는 것에 의존하지 않기 때문에, 인 비보에서 더 안정할 것으로 예상된다는 것이다.
- [0083] 이런 관점에서, 비록 IGF-I의 수용체 결합 도메인을 포함하는 분리된 단백질 복합체는 또한 IGFBP를 포함할지도, 상기한 작용 기작에 따르면, IGFBP는 바람직하게는 IGF-I/VN 합성 키메라에 존재하지 않는 것이 제안된다.
- [0084] 또한 VN에 관하여, 이하 기술하는 바와 같이, 본 발명자들은 IGF-II 또는 IGF-I/IGFBP 복합체와의 상호작용에 필요한 것은 VN (및 유사하게 FN)의 상기 폴리음이온 영역일 가능성성이 아주 높다는 것을 보인다.
- [0085] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 상기 폴리음이온 영역은 성숙한 VN 서열 (서열번호: 2)의 53-64 잔기이다.
- [0086] 상기한 관점에서, 본 발명은 VN 또는 FN의 상기 HBD 및/또는 상기 폴리음이온 영역을 포함하지 않는 합성 키메라 단백질의 구체예를 포함한다.
- [0087] 상기 HBD 및/또는 상기 폴리음이온 영역을 포함하지 않는 VN 단백질 및 그의 아미노산 서열에 관하여, 이들은 54kD 닦 난황 VN (HBD 결여)과 같은 천연 단백질일 수 있고 또는 VN 단백질 또는 아미노산 서열의 결실, 돌연변이 또는 절단 (truncation)에 의하여 조작되어 상기 HBD 및/또는 상기 폴리음이온 영역이 없거나 적어도 실질적으로 비기능적으로 되어 있는 것일 수 있다.
- [0088] 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 이 목적을 위하여 단백질 절단적 소화 및 부위 특이적 돌연변이 법과 같은 기법이 사용될 수 있다.
- [0089] 특정한 구체예에서, 상기 적어도 VN의 인테그린 결합 도메인은 하기의 것으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진다:
- [0090] (i) VN의 1 내지 459번 아미노산 잔기;
- [0091] (ii) VN의 1 내지 379번 아미노산 잔기;

- [0092] (iii) VN의 1 내지 130번 아미노산 잔기; 및
- [0093] (iv) VN의 1 내지 52번 아미노산 잔기.
- [0094] 또한 포함될 수 있는 추가의 아미노산 서열은 하기의 것으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열이다:
- [0095] (v) VN의 65 내지 459번 아미노산 잔기;
- [0096] (vi) VN의 347 내지 459번 아미노산 잔기; 및
- [0097] (vii) VN의 347 내지 379번 아미노산 잔기.
- [0098] 상기한 서열은 조합으로, 예를 들면, VN의 1 내지 130번 아미노산 잔기 및 VN의 347 내지 459번 아미노산 잔기 또는 VN의 1 내지 52번 아미노산 잔기 및 VN의 65 내지 459번 아미노산 잔기로 사용될 수 있다.
- [0099] 특히, IGF-I과 VN을 포함하는 키메라 단백질의 비한정적 예는, 도 14a, b, c 및 d에 개시되어 있다.
- [0100] 또한, VEGF 및 VN 또는 PDGF 및 VN을 포함하는 키메라 단백질의 비한정적 예는, 도 15에 개시되어 있다.
- [0101] 바람직하게는, 키메라 단백질은 성장인자 서열과 VN 또는 FN 아미노산 서열 사이에 연속하여 위치하는 "링커 서열 (linker sequence)"을 더 포함한다.
- [0102] 일 구체예에서, 상기 링커 서열은 하나 이상의 글리신 잔기 및 하나 이상의 세린 잔기를 포함한다. 링커 서열의 특정한 예는 Gly₄ Ser (서열번호: 4); Gly₄ Ser₃ (서열번호: 5) 및 (Gly₄ Ser)₃ (서열번호: 6)로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0103] 다른 구체예에서, 상기 링커 서열은 하기 서열에 따른 것과 같은, 플라스민 절단 인지 부위를 포함한다.
- [0104] Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열번호: 7)
- [0105] 또다른 구체예에서, 상기 링커 서열은 하기 서열에 따른 것과 같은, 콜라제나제-3 절단 인지 부위를 포함한다.
- [0106] Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열번호: 8)
- [0107] 본 발명은 또한 본 발명의 상기 합성 키메라 단백질의 생물학적으로 활성인 단편의 용도 및/또는 본 명세서에 예시된 특정한 성장인자 수용체-결합 도메인 및 인테그린 결합 도메인의 생물학적으로 활성인 단편의 용도에 확장된다.
- [0108] 일 구체예에서, 상기 "생물학적으로 활성인 단편 (biologically-active fragment)"은 그것이 유래된 단백질의 생물학적 활성의 10% 이상, 바람직하게는 25%이상, 더욱 바람직하게는 50% 더더욱 바람직하게는 75, 80, 85, 90 또는 95%이상을 갖는다.
- [0109] 또다른 구체예에서, 상기 "생물학적으로 활성인 단편 (biologically-active fragment)"은 그것이 유래된 단백질의 연속적인 아미노산 서열의 10% 이상, 바람직하게는 25%이상, 더욱 바람직하게는 50% 더더욱 바람직하게는 75, 80, 85, 90 또는 95% 이상을 갖는다.
- [0110] 예를 들면, HBD 및/또는 폴리음이온 도메인이 결여되어 있는, VN의 생물학적으로 활성인 단편의 특이적인 예는 도 14a, b, c 및 d에 개시되어 있다.
- [0111] 또한, 본 발명의 변이 단백질 복합체도 또한 본 발명에 포함된다.
- [0112] 일반적으로, 및 단백질과 관련하여, "변이체 (variant)" 단백질은 다른 아미노산으로 치환된 하나 이상의 아미노산을 갖는다. 단백질 활성의 성질을 변화시키지 않으면서 일부 아미노산이 넓게 비슷한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 변화될 수 있다는 것은 당업계에 잘 이해되고 있다 (보존적 치환).
- [0113] 성장인자, 성장인자의 수용체-결합 도메인, VN 또는 FN의 인테그린 결합 도메인, IGFBP와 같은 기준 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 합성 키메라 단백질에 존재하는 하나 이상의 대응되는 잔기가 본 발명의 상기 분리된 단백질 복합체의 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않으면서, 변형되거나 제거되거나, 또는 추가적으로 부가될 수 있을 것이다.
- [0114] 본 발명에 의하여 고려되는 성숙한 VN (서열번호: 2)의 특이적인 돌연변이에는 (i) T50A ; (ii) T57A; (iii) T50E ; (iv) T57E; (v) S378E; (vi) S378A; 및 (v) S362E가 포함된다.
- [0115] 일 구체예에서, 단백질 변이체는 기준 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는

90%, 95%, 98% 또는 99%이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0116] 바람직하게는, 서열 동일성은 기준 서열의 60% 이상에 걸쳐서, 더욱 바람직하게는 75% 이상에 걸쳐서, 더욱 바람직하게는 90% 이상 또는 더욱 바람직하게는 95%, 98% 이상 또는 실질적으로 전장에 걸쳐서 측정된다.

[0117] 백분율 서열 동일성을 결정하기 위하여, 아미노산 및/또는 뉴클레오티드 서열의 최적 정렬은 알고리듬의 컴퓨터화된 적용 (본 명세서에 참조에 의하여 포함되어지는, Intelligenetics의 Geneworks 프로그램; GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, 미국) 또는 선택된 임의의 다양한 방법에 의하여 생성된 검사 및 최선 정렬 (예를 들면, 비교 창에 가장 높은 백분율 상동성을 나타내는 것)에 의하여 수행될 수 있다. 또한, 예를 들면, 본 명세서에 참조에 의하여 포함되어지는 Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389에 의하여 개시된 바와 같은 BLAST 패밀리의 프로그램을 참조할 수도 있다.

[0118] 또 다른 예에서, "서열 동일성 (sequence identity)"은 DNASIS 컴퓨터 프로그램 (원도우용 2.5판, Hitachi Software engineering Co., Ltd.로부터 구입 가능, South San Francisco, California, 미국)에 의하여 계산된 "매치 백분율 (match percentage)"을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.

[0119] 서열 분석에 관한 상세한 논의는 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999)의 유니트 19.3에서 찾아 볼 수 있다.

[0120] 본 발명은 또한 성장인자의 수용체-결합 도메인, VN 또는 FN의 인테그린 결합 도메인 또는 그를 포함하는 분리된 단백질 복합체의 유도체를 포함한다.

[0121] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 본 발명의 "유도체 (derivative)" 단백질은 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같은, 예를 들면 다른 화학적 모이어티의 첨가, 접합 또는 복합체화에 의하여 또는 번역후 변형 기법에 의하여 변화되었다.

[0122] 아미노산의 "부가 (additions)"는 다른 폴리펩티드 또는 단백질과 상기 폴리펩티드 또는 그의 변이체의 융합을 포함한다. 상기 다른 단백질은 예를 들면, 상기 단백질의 정제를 도울 수 있다. 예를 들면, 이들은 폴리히스티딘 태그, 말토즈 결합 단백질, 녹색 형광 단백질 (GFP), 단백질 A 또는 글루타치온 S-트랜스퍼라제(GST)를 포함한다.

[0123] 본 발명에 의하여 고려되는 다른 유도체에는 측쇄에 대한 변형, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 합성 중 비천연 아미노산 및/또는 그들의 유도체의 삽입, 및 가교제의 사용 및 본 발명의 폴리펩티드, 단편 및 변이체 상에 콘포메이션 제약을 가하는 다른 방법이 포함된다. 본 발명에 의하여 고려된 측쇄 변형의 예에는 아세트산 무수물에 의한 아실화와 같은 아미노 기의 변형; 숙신산 무수물 및 테트라하이드로프탈산 무수물로 아미노 기의 아실화; 메틸아세트이미데이트로 아미디네이션; 시아네이트로 아미노 기의 카바모일화; 피리독살-5-포스페이트로 라이신의 피리독실화한 후 NaBH₄로 환원; 알데히드와 반응후 NaBH₄로 환원시키는 환원적 알킬화; 및 2,4,6-트리니트로벤젠 술폰산 (TNBS)으로 아미노 기의 트리니트로벤질화가 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0124] 상기 카르복실 기는 0-아실이소우레아 형성을 통하여 카르보디이미드 활성화된 후 예를 들면, 대응되는 아미드로 추후의 유도체화에 의하여 변형될 수 있다.

[0125] 아르기닌 잔기의 구아니딘 기는 2,3-부탄디온, 폐닐글리옥살 및 글리옥살과 같은 시약과의 혜테로환 축합 산물의 형성에 의하여 변형될 수 있다.

[0126] 셀프히드릴 기는 퍼포름산 산화에 의하여 시스티산 (cysteic acid)의 형성; 4-클로로메큐리페닐술폰산, 4-클로로메큐리벤조에이트; 2-클로로메큐리-4-나트로페놀, 폐닐메큐리 클로라이드 및 다른 수은화합물 (mercurials)을 사용한 수은 유도체의 형성; 다른 티올 화합물로 혼합 디설파이드의 형성; 말레이미드 (maleimide), 말레산 무수물 또는 다른 치환된 말레이미드와의 반응; 요도아세트산 또는 요도아세트아미드로 카르복시메틸화; 및 알칼리 pH에서 시아네이트로 카바모일화와 같은 방법에 의하여 변형될 수 있다.

[0127] 트립토판 잔기는 예를 들면, 2-히드록시-5-나트로벤질 브로마이드 또는 술포닐 할라이드로 인돌 고리의 알킬화 또는 N-브로모숙신이미드로 산화에 의하여 변형될 수 있다.

[0128] 티로신 잔기는 테트라니트로메탄으로 질산화하여 3-나트로티로신 유도체를 형성하는 것에 의하여 변형될 수 있다.

[0129] 히스티딘 잔기의 이미다졸 고리는 디에틸피로카르보네이트로 카르브에톡실화 또는 요오도아세트산 유도체로 알

킬화에 의하여 변형될 수 있다.

- [0130] 펩티드 합성 중 비천연 아미노산 및 유도체를 첨가하는 예는 4-아미노 부티르산, 6-아미노헥사노익산, 4-아미노-3-히드록시-5-페닐펜타노익산, 4-아미노-3-히드록시-6-메틸헵타노익산, t-부틸글리신, 노르루신, 노르발린, 페닐글리신, 오르니틴, 사코신, 2-티에닐 알라닌 및/또는 아미노산의 D-이소머를 사용하는 것이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0131] 단백질의 화학적 유도체화에 적합한 방법의 예는 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et.al., John Wiley & Sons NY (1995-2001)의 15장에 제공되어 있다.
- [0132] (단편, 변이체, 유도체 및 호몰로그를 포함한) 분리된 단백질 복합체, 및 그의 개별 단백질 성분은 당업자에게 알려진 적합한 방법에 의하여 제조될 수 있다.
- [0133] 일 구체예에서, 본 발명의 단백질은 화학 합성에 의하여 생산된다. 화학 합성 기법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 적합한 방법론의 예를 위하여 숙련자가 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et.al., John Wiley & Sons NY (1995-2001)의 제18장을 참조할 수 있다.
- [0134] 다른 구체예에서, 단백질은 재조합 단백질로서 제조될 수 있다.
- [0135] 재조합 단백질의 생산은 당업계에 잘 알려져 있으며, 숙련자는 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는 Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 16절 및 17절; 및 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), 특히 10 및 16 장; 및 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어지는, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), 특히 1, 5 및 6장에 개시된 예에 대한 것과 같은 표준 프로토콜을 참조할 수 있다.
- [0136] 일 구체예에서, 재조합 단백질은 하기 단계를 포함하는 방법에 의하여 생산된다:
- [0137] (i) 발현 벡터 중에 하나 이상의 조절 뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 구조체를 제조하는 단계;
- [0138] (ii) 상기 발현 구조체로 숙주 세포를 트란스펙션 또는 형질전환하는 단계; 및
- [0139] (iii) 상기 숙주 세포에서 상기 재조합 단백질을 발현하는 단계.
- [0140] "발현 벡터 (expression vector)"란 플라스미드와 같은 자가 복제 염색체와 벡터, 또는 숙주 게놈에 삽입되는 벡터일 수 있다.
- [0141] "작동가능하게 연결된 (operably linked)" 또는 "작동가능하게 연결된 (operably connected)"이란 상기 조절 뉴클레오티드 서열이 본 발명의 재조합 핵산에 상대적으로 위치되어 있어 상기 핵산의 전사 또는 상기 핵산에 의하여 코딩된 단백질의 번역을 개시, 조절(regulate) 또는 그렇지 않으면 조절 (control)한다.
- [0142] 조절 뉴클레오티드 서열은 발현을 위하여 사용되는 숙주 세포에 일반적으로 적합할 것이다. 많은 형태의 적합한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 다양한 숙주 세포에 대하여 당업계에 알려져 있다.
- [0143] 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종결 서열, 번역 개시 및 종결 서열, 스플라이스 도너/수용체 서열 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0144] (CMV, RSV, 아데노바이러스, SV40 및 인간 신장 인자 프로모터와 같은) 구성적 프로모터 및 (tet-억제성 프로모터 및 IPTG-, 메탈로티오닌- 또는 엑디손-유도성 프로모터와 같은) 유도성/억제성 프로모터는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 발명에 의하여 고려된다. 또한, 프로모터는 하나 이상의 프로모터의 요소를 조합한 혼성 프로모터일 수 있다는 것은 이해될 것이다.
- [0145] 상기 발현 구조체는 또한 (일반적으로 상기 발현 벡터에 의하여 제공되는) 융합 파트너를 포함하고 있어 본 발명의 재조합 단백질은 상기 융합 파트너와 융합 폴리펩티드로서 발현될 수 있다. 융합 파트너의 주요한 장점은 상기 융합 단백질의 확인 및/또는 정체를 돋는다는 것이다.
- [0146] 융합 파트너의 잘 알려진 예에는 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용한 글루타치온-S-트란스퍼라제 (GST), 인간 IgG의 Fc 부분, 말토즈 결합 단백질 (MBP) 및 헥사 히스티딘 (HIS₆)이 포함되나,

이들 예에 한정되는 것은 아니다. 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질 정제의 목적에 대하여, 친화성 크로마토그래피를 위한 관련 매질 (matrices)은 각각 글루타치온-, 아밀로즈 및 니켈- 또는 코발트-접합된 레진이다. 많은 그러한 매질은 (HIS₆) 융합 파트너와 함께 유용한 QIAexpress™ system (Qiagen) 및 Pharmacia GST 정제 시스템과 같은, "키트" 형태로 이용가능하다.

- [0147] 일부 경우에 있어서, 상기 융합 파트너는 또한 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 것과 같은 프로테아제 절단 부위를 가지고 있어 상기 관련된 프로테아제가 부분적으로 본 발명의 융합 단백질 소화시키고, 그로부터 본 발명의 상기 재조합 폴리펩ти드를 방출하도록 한다. 다음으로, 상기 방출된 단백질은 추후의 크로마토그래피 분리에 의하여 상기 융합 파트너로부터 분리될 수 있다.
- [0148] 본 발명에 따른 융합 파트너는 또한 특이적인 항체가 이용가능한 보통은 짧은 웨비드 서열인, "에피토프 태그"를 그 범위 내에 포함한다. 특이적인 단일클론 항체가 용이하게 이용가능한 에피토프 태그의 잘 알려진 예에는 c-myc, 헤마글루터닌 및 FLAG 태그가 포함된다.
- [0149] 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 대장균 (예를 들면, DH5a), 효모 세포, 배클로바이러스 발현 시스템으로 이용된 SF9 세포, CHO 세포, COS, CV-1, NIH 3T3 및 293 세포와 같은 원핵 또는 진핵 세포일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0150] 발현 구조체는 또한 형질전환된 세포에 선발제에 대한 저항성을 부여하는 하나 이상의 선발 마커 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 형질전환된 박테리아의 선발을 위한 목적으로 유용한 선발 마커에는 bla, kanR 및 tetR 가 포함되고, 형질전환된 진핵 세포는 히그로마이신, G418 및 퓨로마이신과 같은 마커에 의하여 선발될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0151] 유전적 물질을 숙주 세포에 도입하는 것에 관하여, 상기 "형질전환하는 (transforming)" 및 "트란스펙션하는 (transfecting)"이란 용어는 일반적으로 유전적 물질을 숙주 세포 내로 도입하는 것을 기술하기 위하여 사용된다. 외래 유전적 물질을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 많은 잘 알려진 방법이 있으며, 여기에는 칼슘 포스페이트 침전, 전기천공, 리포펙타민, 리포펙틴 및 다른 친유성 제제에 의한 전달, 칼슘 포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 트란스펙션, 미세입자 충돌법, 미세주입 및 프로토플라스트 융합이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0152] **분리된 핵산**
- [0153] 본 발명은 변이체 및 그의 호몰로그를 포함하는, 합성 키메라 단백질을 코딩하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 "핵산 (nucleic acid)"이란 용어는 cDNA 및 게놈 DNA 및 DNA-RNA 혼성체를 포함한 단일- 또는 이중가닥 mRNA, RNA, cRNA, RNAi 및 DNA를 나타낸다.
- [0155] "폴리뉴클레오티드"란 80개 이상의 연속 뉴클레오티드를 갖는 핵산이고, "올리고뉴클레오티드"는 80 개 미만의 연속 뉴클레오티드를 가진 것이다.
- [0156] "프로브 (probe)"는 예를 들면, 노던 또는 서던 블로팅에서 상보성 서열을 검출할 목적을 위하여 적합하게는 표지된, 단일 또는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0157] "프라이머 (primer)"는 상보성 핵산 "주형"에 어닐링될 수 있고 Taq 폴리미라제, RNA-의존성 DNA 폴리미라제 또는 시퀴나제 (Sequenase)와 같은 DNA 폴리미라제의 작용에 의하여 주형-의존적 방식으로 확장되는, 보통 단일가닥 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는, 15-50개의 연속 뉴클레오티드를 가진 올리고뉴클레오티드이다.
- [0158] 본 발명의 합성 핵산은 당업계에 잘 알려진 바와 같은, 화학 합성 접근법 또는 핵산 서열 증폭 기법을 이용하는 재조합 방법, 또는 그의 조합에 의하여 생산될 수 있다.
- [0159] 화학적으로 합성된 프라이머 및 올리고뉴클레오티드, 합성기 및 본 발명에 따라 유용한 관련 기술은 대부분의 실험실에서 일반적으로 이용가능하거나 상업적 구입원으로부터 구매가능하다.
- [0160] 적합한 핵산 증폭 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면, Ausubel et al. 상계서의 15장에 기재된 바와 같은 폴리미라제 연쇄 반응 (PCR) 및 리가제 연쇄 반응 (LCR); 예를 들면, 미국특허 제5,422,252호에 개시된 바와 같은 가닥 치환 증폭 (SDA); 예를 들면, Liu et al., 1996, J.Am.Chem.Soc. 118 1587, 국제출원 WO 92/01813 및 국제출원 WO 97/19193에 기재된 바와 같은 롤링 서클 복제법 (RCR); 예를 들면, Sooknananet al., 1994., Biotechniques 17 1077에 기재된 바와 같은 핵산 서열-기초 증폭법 (NASBA); 및 예를 들면, Tyagi et

al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 5395에 기재된 바와 같은 Q- β 레플리카제 증폭법이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0161] 바람직한 핵산 서열 증폭법은 PCR이다.

[0162] 본 명세서에 사용된 "증폭 산물 (amplification product)"란 핵산 증폭 방법에 의하여 생성된 핵산 산물을 의미한다.

[0163] 본 발명의 핵산을 생산 및 발현함에 있어서, 코돈 서열 축퇴의 장점을 이용하여 본 명세서에 예시된 상기 핵산은 코딩되는 아미노산 서열을 변화시키지 않고 용이하게 변형될 수 있다는 것은 또한 이해될 것이다.

[0164] 특정한 구체예에서, 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 핵산은 재조합 발현을 위하여 사용될 숙주 세포의 선호되는 "코돈 용도 (codon usage)"에 따라 최적화될 수 있다. 이렇게 함으로써, 선호되는 코돈 용도가 단백질 발현에 영향을 미치는 경우, 특정한 개체, 또는 그의 세포에서 최적 발현을 위하여 핵산을 효과적으로 "재단 (tailor)"할 수 있다.

[0165] 그러므로, 본 발명은 본 명세서에 예시된 핵산에 상동적인 합성 핵산을 포함한다.

[0166] 일 구체예에서, 핵산 호몰로그는 본 명세서에 개시된 합성 키메라 단백질 구조체 중의 임의의 하나를 코딩하는 핵산과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 95% 이상 서열 동일성을 갖는다.

[0167] 바람직하게는, 서열 동일성은 본 발명의 상기 코딩 핵산의 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱더 바람직하게는 90%, 95% 이상 또는 유리하게는 실질적으로 전장에 걸쳐서 측정된다.

[0168] 또 다른 구체예에서, 핵산 호몰로그는 높은 염격성 조건 하에서 본 명세서에 기재된 상기 합성 키메라 단백질 구조체 중의 임의의 하나를 코딩하는 핵산에 혼성화한다.

[0169] "혼성화한다 및 혼성화 (Hybridize and Hybridization)"란 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열 짹을 지어 DNA-DNA, RNA-RNA 또는 DNA-RNA 이중가닥체 (duplex)를 생성하는 것을 나타내기 위하여 본 명세서에 사용된다. 혼성화된 서열은 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 상보성 퓨린과 피리미딘 사이의 염기-쌍 짹기를 통하여 생성된다.

[0170] 이와 관련하여, 변형된 퓨린 (예를 들면, 이노신, 메틸이노신 및 메틸아데노신) 및 변형된 피리미딘 (티오우리딘 및 메틸시토신)도 또한 염기 쌍 짹기에 참여할 수 있다는 것은 이해될 것이다.

[0171] 본 명세서에 사용된 "엄격성 (Stringency)"이란 혼성화 동안 온도 및 이온 강도 조건, 및 특정한 유기 용매 및/ 또는 계면활성제의 존재 또는 부존재를 나타낸다. 상기 염격성이 높으면, 혼성화하는 뉴클레오티드 서열 사이의 상보성의 필요한 수준은 더 높을 것이다.

[0172] "엄격한 조건 (Stringent conditions)"은 높은 빈도의 상보성 염기를 가진 핵산만이 혼성화하는 조건을 나타낸다.

[0173] 높은 염격성 조건에 대한 본 명세서의 기준에는 하기의 조건이 포함된다:

[0174] (i) 42°C 혼성화에 대하여 적어도 약 31% v/v 내지 적어도 약 50% v/v 포름아미드 및 적어도 약 0.01 M 내지 적어도 약 0.15 M 염, 및 42°C 세척에 대하여 적어도 약 0.01 M 내지 적어도 약 0.15 M 염;

[0175] (ii) 65°C보다 높은 온도에서 혼성화에 대하여 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS, 및 65°C보다 높은 온도에서 약 1 시간 동안의 세척에 대하여 (a) 0.1xSSC, 0.1% SDS; 또는 (b) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 1% SDS; 및

[0176] (iii) 68°C 이상의 온도에서 약 20 분 동안의 세척에 대하여 0.2 x SSC, 0.1% SDS.

[0177] 일반적으로, 세척은 T_m = 69.3 + 0.41 (G + C)%-12°C에서 수행된다. 일반적으로, 이중가닥체 DNA의 T_m은 미스매치된 염기 수의 매 1% 증가에 따라 약 1°C 감소한다.

[0178] 상기한 바에 불구하고, 엄격한 조건은 Ausubel et al., 상계서, 2.9 및 2.10 장, 및 특히 2.9.1 페이지 내지 2.9.20 페이지에 기재된 바와 같이, 당업계에 잘 알려져 있다.

[0179] 항체

- [0180] 본 발명은 또한 그의 키메라 단백질, 또는 단편, 변이체 및/또는 유도체를 포함한, 본 발명의 합성 키메라 단백질에 대한 항체를 포함한다. 본 발명의 항체는 단일클론 또는 다클론 항체일 수 있다.
- [0181] 항체 생산, 정제 및 용도에 적용할 수 있는 잘 알려진 프로토콜은 예를 들면, 둘 다 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는 Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994)의 2장 및 Harlow, E. L, Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988에서 발견할 수 있을 것이다.
- [0182] 일반적으로, 본 발명의 항체는 본 발명의 폴리펩티드, 단편, 변이체 또는 유도체에 결합하거나 접합체화된다. 예를 들면, 상기 항체는 폴리클로날 항체를 포함할 수 있다. 그러한 항체는 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드, 단편, 변이체 또는 유도체를 생쥐 또는 토끼를 포함할 수 있는 생산 종에 주사하여, 폴리클론 항혈청을 얻음으로써 제조될 수 있다.
- [0183] 폴리클론 항체를 생산하는 방법은 당업자계에 잘 알려져 있다. 사용될 수 있는 예시적인 프로토콜은 예를 들면, Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 상계서 및 Harlow & Lane, 1988, 상계서에 기재되어 있다.
- [0184] 생산 종에서 얻어진 폴리클론 항혈청 대신에, 단일클론 항체가 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드, 단편, 변이체 또는 유도체로 접종된 생산 종으로부터 유래된 췌장 또는 다른 항체 생산 세포를 불멸화시킴으로써 예를 들면, 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는 Kohler & Milstein, 1975, Nature 256,495의 기사에 기재되어 있거나, 또는 보다 최근의 그의 변형 방법, 예를 들면, Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 상계서에 기재되어 있는 표준 방법을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0185] 본 발명은 또한 상기한 바와 같은 다클론 또는 단일클론 항체의 Fc 또는 Fab 단편을 포함하는 항체를 그 범위내에 포함한다.
- [0186] 또한, 상기 항체는 본 발명의 단일쇄 Fv 항체 (scFv) 및 BIXP 단백질을 포함할 수 있다. 그러한 scFv는 예를 들면, 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는, 미국특허 제5,091,513호, 유럽특허 제239,400호 또는 Winter & Milstein, 1991, Nature 349 293의 기사에 각각 기재되어 있는 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0187] 표지가 상기 항체 또는 항체 단편과 연관되어 있을 수 있다.
- [0188] 상기 표지는 크로모젠 (chromogen), 촉매, 효소, 플로오로포어, 화학발광 분자, 유로피움 (Eu^{34})와 같은 란타나이드, 방사성 동위원소 및 직접 가시 표지를 포함한 군으로부터 선택될 수 있다. 직접 가시 표지의 경우, 콜로이드성 금속 또는 비금속 입자, 염료 입자, 효소 또는 기질, 유기 중합체, 라텍스 입자, 리포좀, 또는 신호 생산 물질 등을 포함한 다른 소포가 사용될 수 있다.
- [0189] 표지로서 유용한 많은 수의 효소가 모두 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는, 미국특허 제4,366,241호, 제4,843,000호, 및 제4,849,338호의 명세서에 기재되어 있다. 본 발명에 유용한 효소 표지에는 알칼리 포스파타제, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 루시퍼라제, β -갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 리소자임, 말레이트 디히드로제나제 등이 포함된다. 상기 효소 표지는 용액 중에서 단독 또는 제2 효소와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0190] 예를 들면, 상기 플루오로포어는 플루오레신 이소티오시아네이트 (FITC), 오레곤 그린, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트 (TRITL), 알로피코시아닌 (APC) 및 R-피코에리쓰린 (RPE)일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0191] 약학 조성물
- [0192] 본 발명은 또한 그의 변이체 및 유도체를 포함한, 본 발명의 분리된 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0193] 그러한 분리된 단백질 복합체는 인 비트로에서 형성된 복수-단백질 복합체 또는 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한 임의의 형태일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0194] 본 발명의 약학 조성물은 세포 이동, 조직 재생 및 상처 치유를 촉진 (promote) 또는 촉진 (facilitate)하는데 사용될 수 있다.
- [0195] 또한, 약학 조성물은 2차 부위로의 종양 세포 이동을 방지 또는 저해함으로써 종양 전이를 방지하기 위하여 투여될 수 있다.
- [0196] 본 발명의 조성물은 필요에 따라 치료적 또는 예방적 처치에 사용될 수 있다. 예를 들면, 약학 조성물은 피부

복구, 상처 치유, 화상 치료 및 다른 피부과적 처치를 위하여 치료적 또는 화장 (cosmetic) 제조물의 형태로 적용될 수 있다.

[0197] 이런 관점에서, 약학 조성물은 상기 약학 조성물이 적합하게 함침되어 있거나, 코팅되어 있거나 포함되어 있는 생물물질, 생물중합체, 히드록시아파타이트 또는 그의 유도체와 같은 무기 물질, 외과적 임플란트, 보형물, 상처 또는 화상 드레싱, 콤프레스 (compress), 밴디지 등과 연합하여 또는 그의 화합물로서 투여될 수 있다.

[0198] 적합하게는, 상기 약학 조성물은 적합한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0199] 바람직하게는, 상기 적합한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는 포유동물, 더욱 바람직하게는, 인간에 투여하기에 적합하다.

[0200] "적합한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제 (pharmaceutically-acceptable carrier, diluent or excipient)"란 전신적 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 필러, 희석제 또는 페막형성 물질을 의미한다. 특정한 투여 경로에 따라, 당업계에 잘 알려져 있는 다양한 담체가 사용될 수 있다. 이들 담체는 당, 전분, 셀룰로즈 및 그의 유도체, 맥아, 젤라틴, 탈크, 칼슘 설페이트, 식물유, 합성 유, 폴리올, 알긴산, 포스페이트 버퍼 용액, 유화제, 등장염 및 히드로클로라이드, 브로마이드 및 설페이트를 포함한 무기산염과 같은 염, 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산 및 무발열원 물을 포함한 군으로부터 선택될 수 있다.

[0201] 적합한 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 기술하고 있는 유용한 참조 문헌은, 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991)이다.

[0202] 본 발명의 상기 조성물을 환자에게 제공하기 위하여 임의의 안전한 투여 경로가 이용될 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장, 비경구, 설하, 부칼, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하, 흡입, 안내, 복막내, 뇌심실내, 경피 등이 사용될 수 있다.

[0203] 투여 형태 (dosage form)에는 정제, 분산액, 혼탁액, 주사액, 용액, 시럽, 트로키, 캡슐, 좌제, 에어로졸, 경피 패치 등이 포함된다.

[0204] 이들 투여 형태는 또한 이 목적을 위하여 특이적으로 고안된 제어된 방출 장치 또는 추가적으로 이 방식으로 작용하도록 변형된 임플란트의 다른 형태를 주입 또는 이식하는 것을 포함할 수 있다. 상기 치료 제제의 제어된 방출은 예를 들면, 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알콜, 폴리락트 및 폴리글리콜산 및 히드록시프로필메틸 셀룰로즈와 같은 특정한 셀룰로즈 유도체를 포함한 소수성 중합체로, 상기 치료 제제를 코팅함으로써 수행될 수 있다. 더욱이, 상기 제어된 방출은 다른 중합체 매질, 리포좀 매질, 리포좀 및/또는 마이크로구를 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0205] 상기 조성물은 상기 투여 제제와 양립가능한 방식으로, 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 환자에게 투여된 용량은 적합한 기간에 걸쳐서 환자에게서 유리한 반응을 미치기에 충분한 양이다. 투여될 제제의 상기 양은 나이, 성별, 체중 및 그의 일반적 건강 조건을 포함한 치료될 개체, 투여실시자의 판단에 의존할 인자에 따라 다를 수 있다.

[0206] 상처 치유를 위한 약학 조성물에 관하여, 특정한 참고문헌은 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 지는, 미국특허 제5,936,064호 및 국제특허 제W099/62536호이다.

[0207] 본 발명의 약학 조성물은 백시니아와 같은 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터, 및 유전자 치료에 유용한 바이러스 벡터를 또한 포함할 수 있다. 후자에는 Braun-Falco et al., 1999, Gene Ther. 6 432에 기재된 바와 같은 아데노바이러스 및 아데노바이러스-연관된 바이러스 (AAV) 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터 유래된 벡터가 포함된다. 내분비 유전자 치료에 유용한 바이러스 벡터의 일반적 개관은 Stone et al., 2000, J. Endocrinol. 164 103에 제공되어 있다.

[0208] 본 발명은 또한 미국특허 제5,958,764호에 개시된 바와 같은, 유전자 발현을 상피 세포로 표적화하는 특이적인 발현 벡터, 및 미국특허 제5,962,427호에 기재된 바와 같은, 인 비보 상처 치유를 위한 특이적인 발현 벡터를 또한 이용할 수 있다.

[0209] 치료적 용도

[0210] 본 발명은 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 분리된 단백질 복합체를 이용한 치료 방법을 제공한다. 이

들 방법은 특히 포유동물, 더욱 구체적으로는 인간의 치료적 및/또는 예방적 치료를 특히 목적으로 한다.

[0211] 그러나, 본 발명에 따른 치료적 용도는 가축 및 반려 동물, 말과 같은 퍼포먼스 동물, 낙타 및 그레이하운드, 실험동물 및 이종이식을 위한 세포, 기관 및 조직의 원으로서 사용되는 동물과 같은 포유동물에도 적용될 수 있다.

[0212] 본 발명은 또한 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한 분리된 단백질 복합체가 피부 품질 또는 피부 모양을 개선 또는 증진하기 위하여 투여되는 화장용 처리 방법이 포함된다.

[0213] 그러한 치치는 이상적 피부 세포 증식에 의하여 유발되는 건선 및 비대형 흉터생성과 같은 피부 질환의 예방 또는 개선을 포함할 수 있다.

[0214] 또한, 2차 위치로의 종양 세포 이동을 차단함으로써 종양 전이가 방지되거나 저해되는 치료방법도 포함된다. 또한, 세포 증식을 차단하여 암을 치료하는 방법도 또한 포함된다.

[0215] 특정한 구체예에서, 치료적 및/또는 예방적 치료는 상기 분리된 단백질 복합체가 적합하게는 함침되어 있거나, 코팅되어 있거나 포함되어 있는 생물물질, 생물중합체, 플루오로히드록시아파타이트 또는 그의 유도체와 같은 무기 물질, 외과적 임플란트, 보형물, 상처 또는 화상 드레싱, 콤프레스 (compress), 밴디지 등과 연합하여 또는 그의 성분으로서, 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 분리된 단백질 복합체를 사용할 수 있다.

[0216] 그러한 방법은 상기한 바와 같이 정의된 약학 조성물의 투여를 포함하고, 미국특허 제6,090,790호에 기재된 바와 같은, 특이적 조직 부위로의 미세바늘 주사, 미국특허 제6,054,122호에 기재된 바와 같은, 상처, 화상 또는 궤양에 적용된 국소적 크림, 로션 또는 밀봉 드레싱 또는 국제공개 WO99/47070에 기재된 바와 같은, 상기 조성물을 방출하는 임플란트에 의하여 투여될 수 있다.

[0217] 미국특허 제5,929,040호 및 미국특허 제5,962,427호에 기재된 바와 같은 방법에 따르는 것과 같은, 유전자 치료가 이러한 관점에서 또한 적용가능하다.

[0218] 유전적으로 조작된 원하는 성장인자 발현 (Supp et al., 2000, J. Invest. Dermatol. 114 5)과 같은, 피부 치환체를 제조하기 위한 목적을 위하여 피부 세포가 유전적으로 변형될 수 있는 방법이 또한 존재한다. 이 분야의 리뷰의 예는 Bevan et al., Biotechnol. Gent. Eng. Rev. 16 231에 제공되어 있다.

[0219] 국제공개 WO99/11789에 기재된 바와 같은, 트랜스페션 또는 형질전환된 세포로 이식 받는 자를 "접종 (seeding)"하는 것이 또한 포함된다.

[0220] 이를 방법은 세포 이동을 자극하여 상처 및 화상 치료, 궤양과 같은 피부 상흔의 복구, 자가 피부의 인 비트로 배양과 같은 방법에 의한 조직 치환 및 이식, 신장 및 폐와 같은 내부 기관의 재상피화 및 손상된 신경조직의 복구를 촉진 또는 진행시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0221] 피부 치환 치료법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들면, Kehe et al., 1999, Arch. Dermatol. Res. 291 600에 기재된 바와 같은, 공동 배양된 상피/각질세포 주의 사용 또는 일차 (주로 자가) 상피, 진피 및/또는 각질세포의 인 비트로 배양을 사용하는 것을 이용할 수 있다. 이를 방법은 또한 조작된 생물물질 및 합성 중합체 "스캐폴더"를 사용할 수 있다.

[0222] 상기 분야의 일반적 리뷰의 예는 Terskikh & Vasiliev, 1999, Int. Rev. Cytol. 188 41 and Eaglestein & Falanga, 1998, Cutis 62 1에 제공되어 있다.

[0223] 더욱 구체적으로, 머리얼굴 (craniofacial) 외과수술에 유용한 치환체 경구 점막의 생산은 Izumi et al., 2000, J. Dent. Res. 79 798에 기재되어 있다. 태아 각질세포 및 진피 섬유아세포는 Fauza et al., J. Pediatr. Surg. 33 357에 기재된 바와 같이, 피부 상흔을 치료하기 위한 이식용 피부를 생산하기 위하여 인 비트로에서 확장될 수 있으며, 히알루론산-유래된 생물물질 상에서 인 비트로 배양된 진피 및 상피 피부 요소로부터 얻어진 피부 치환체는 화상의 치료에 잠재적으로 유용한 것으로 밝혀졌다 (Zacchi et al., 1998, J. Biomed. Mater. Res. 40 187).

[0224] 상처 및 화상으로의 피부 세포의 전달을 위한 제제인 마이크로구와 같은 (LaFrance & Armstrong, 1999, Tissue Eng. 5 153), 중합체 스캐폴더가 예를 들면, Sheridan et al., 2000, J. Control Release 14 91 and Fauza et al., 1998, 상계서에 기재된 바와 같은 치환 피부 조작을 촉진하기 위한 목적을 위하여 또한 고려된다.

[0225] 아고니스트 및 길항제의 생산

- [0226] 본 발명은 IGF-II : VN 또는 IGF-I : IGFBP : VN 복합체와 같은 성장인자 및 비트로넥틴 또는 피브로넥틴을 포함하는 복합체의 아고니스트 또는 길항제를 확인, 탐색, 설계 또는 생산하기 위한 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한 분리된 단백질 복합체의 용도를 포함한다. 그러한 제제는 "모사체 (mimetic)"일 수 있다. "모사체"란 단백질 또는 웹티드의 특정한 기능적 영역을 닮도록 설계된 분자로서, 그 범위 내에 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, "아고니스트 (agonist)", "유사체 (analogue)" 및 "길항제 (antagonist)"란 용어를 포함하는 의미를 나타내기 위하여 본 명세서에 사용된다.
- [0227] 일 구체예에서, IGF-II : VN 또는 IGF-I : IGFBP : VN 복합체에 의한 IGF-IR 및 VN 수용체의 결합을 흉내내는 아고니스트가 생산된다. 그러한 분자는 상처 치유, 피부 재생 등에 필요한 세포 이동의 자극자로서 유용성을 가진다.
- [0228] 또 다른 구체예에서, IGF : VN 또는 IGF : IGFBP : VN 복합체에 의한 IGF-IR 및 VN 수용체의 결합을 방지 또는 저해하는 길항제가 생산된다.
- [0229] 그러한 분자는 세포 이동 및/또는 세포 증식의 저해자로서 유용성을 가지고 있을 수 있고 그에 따라 유용한 항종양 제제 및 또한 이상적 세포 증식으로부터 유발되는 건선 및 비대형 흉터생성과 같은 피부 질환의 치료에 유용한 제제를 구성할 수 있다.
- [0230] 상기한 모사체, 아고니스트, 길항제 및 유사체는 소망의 생물학적 활성 및 반감기를 가진 웹티드, 폴리웹티드 또는 다른 유기 분자, 바람직하게는 소 유기 분자일 수 있다.
- [0231] 컴퓨터 지원된 구조 데이터베이스 검색이 모사체를 확인하기 위한 과정으로써 점점 많이 이용되고 있다. 원리상 모사체를 확인하는데 적합할 수 있는, 데이터베이스 검색 방법은 각각 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어지는, 국제공개 WO 94/18232 (HIV 항원 모사체에 관한 것임), 미국특허 제5,752,019호 및 국제공개 WO 97/41526 (EPO 모사체에 관한 것임)에서 발견할 수 있다.
- [0232] 다른 방법에는 분자적 상호작용을 확인하는 다양한 생물리학적 기법이 포함된다. 이들은 후보 분자가 예를 들면, IGF-IGFBP-VN 복합체의 형성에 영향을 미치는지에 따라 후보 물질의 탐색이 가능하도록 한다. 경쟁적 방사성리간드 결합 분석법 (관련 방법에 대하여 Upton et al., 1999, 상께서 참조), 분석적 초원심분리, 마이크로 칼로리메트리, 표면플라즈몬 공명 및 광학적 바이오센서-기초 방법과 같은 잠재적으로 유용한 기법에 적용 가능한 방법이 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어지는, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, 1997)의 20장에 제공되어 있다.
- [0233] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있고 실시될 수 있도록 하기 위하여, 숙련자는 하기의 비한정적 실시예를 참조할 수 있다.

실시예

- [0249] 실시예 1
- [0250] 재료 및 방법
- [0251] 세포 배양
- [0252] MCF-7 (ATCC# HTB-22) 인간 유방암 세포주를 10% FCS를 포함하는 DMEM/Hams' F12 (DMEM/F12) 배지 (1: 1) (Life Technologies, Mulgrave, VIC, 호주) 중에 성장시켰다. 배지를 매일 교환하여 주고 세포를 0.25% 트립신 /0.5mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 용액 (Oxoid, Hampshire, 영국)을 사용하여 80% 컨플루언시까지 계대 배양하였다.
- [0253] HaCAT 인간 피부 각질세포 주는 Norbert Fusenig 교수 (German Cancer Research Center(DKFZ) Im Neuenheimer Feld, Heidelberg)로부터 얻었다. HaCAT 세포주를 10% FCS를 포함하는 DMEM 배지 (Life Technologies)에서 성장시켰다. 배지는 매일 교환하여 주고, 세포를 0.25% 트립신/0.5mM EDTA 용액 (Oxoid)을 사용하여 80% 컨플루언시까지 계대 배양하였다.
- [0254] VN 및 IGFBP에 IGF의 예비결합
- [0255] 세포 기능을 조사하는 대부분의 인 비트로 분석법은 외래 인자를 용액 중에 첨가하고, 따라서 상기 세포는 상기 분석에 걸쳐서 상기 물질을 포함하는 용액 중에 잠겨있다. 이것은 세포가 인 비보에서 마주치는 환경이 아니다. 오히려, 조직 중의 세포는 호르몬 및 다른 인자가 위치하고 있는, 세포에 의하여 합성된 ECM에 의하여 지지되고

둘러 쌓여 있다. 성장인자가 ECM 분자에 결합하는 것을 특이적으로 해결하는 (address) 이 연구에서, 인 비보 환경을 더 정확하게 반영하기 위한 시도로 VN, IGF 및 IGFBP를 24-웰 플레이트 중의 조직 배양 플라스틱에 및 $12.0\mu\text{m}$ pore Costar TranswellsTM (Costar, New York, NY, 미국)의 하부 챔버 및 막 표면에 미리 결합시키는 전략을 사용하였다.

[0256] 300-1000 ng VN (Promega, Annandale, NSW, 호주)을 포함하는 DMEM 또는 DMEM/F12 배지 $300\mu\text{l}$ 를 24-웰 조직 배양 디쉬 또는 TranswellTM의 하부 챔버에 첨가하고, 37°C 에서 2 시간 동안 배양하였다. 결합하지 않은 VN을 포함하는 배지를 제거하고, 상기 웰을 0.5% 우혈청 알부민 (RIA-급) (BSA) (Sigma Aldrich)을 포함하는 1mL Hepes 결합 베퍼 (HBB)로 세척하였다. 다음으로, 1.0% BSA를 포함하는 $300\mu\text{l}$ HBB를 웰에 첨가하고 37°C 에서 30 분 동안 배양하여 상기 조직 배양 디쉬 중의 비특이적 결합 부위를 차단하였다. 다음으로, 상기 웰을 0.5% BSA를 포함하는 1 mL HBB로 다시 세척하였다. 다음으로, 0.5% BSA 및 IGF-II 또는 IGF-I + IGFBP (GroPep, Adelaide, SA, 호주)를 포함하는 $300\mu\text{l}$ HBB를 첨가하고, 상기 플레이트를 2 시간 동안 다시 배양하였다. 결합하지 않은 IGF 및 IGFBP를 포함하는 상기 용액을 제거하고, 상기 웰을 HBB로 세척하고, 층류 후드에서 공기 건조하였다.

[0257] 이동 분석

[0258] 이동 분석은 본질적으로 Leavesley et al., 1993, Journal of Cell Biology 121: 163-70에 기재된 바에 따라 수행되었다. 4 시간 동안 무혈청 배지에서의 배양에 의하여 혈청 결핍된 (starved) 50,000 세포를 $12.0\mu\text{m}$ pore Costar TranswellTM (12 웰 플레이트 포맷)의 상부 챔버에 접종하였다. 37°C 5% CO_2 에서 5 시간 동안 배양된 후 상기 다공성 막의 하부 표면으로 이동된 세포를 고정한 다음 0.1 mM 보레이트 베퍼 (pH 9) 중의 크리스탈 비올렛으로 염색하였다. 부착된 세포의 수는 10% 아세트산 중에서 크리스탈 비올렛을 추출하고 분광법을 통하여 이를 추출물의 흡광도를 결정함으로써 측정하였다.

[0259] 통계적 분석

[0260] 음성 대조군 (-VN, -IGF, -IGFBP)의 백분율로서 모든 데이터를 1차 표현함으로써 데이터를 분석하였다. 다음으로, 반응은 2 테일을 가진 호모세다스틱 스튜던트 t-테스트 (two tailed homoscedastic Student t-test)를 이용하여 VN 단독 대조군 및 IGF 단독 대조군에 대한 유의성을 시험하였다. 0.05 미만의 P 값은 유의하게 다른 반응을 나타낸다.

[0261] 결과

[0262] 이동

[0263] 세포 이동은 상처 치유에 있어서 중심 과정이고, VN 및 IGF 둘 다 세포 이동의 매개에 있어서 확립된 역할을 한다. HaCAT 각질세포 기능을 변화시키는 VN에 결합된 IGF-II의 능력을 잘라내기 위하여, TranswellsTM를 통하여 세포 이동을 측정하였다.

[0264] 도 1은 VN의 존재하에서, 특히 낮은 농도에서 TranswellsTM을 통한 증가된 IGF-II 유도된 HaCAT 인간 각질세포의 이동이 있다는 것을 보여준다. 각 바는 각 처리가 2개로 시험된, 3 배수 실험으로부터 얻어진 데이터를 나타낸다.

[0265] 유방암 세포주 MCF-7의 이동도 또한 시험하였다. $12.0\mu\text{m}$ TranswellsTM의 하부 웰에 $1\mu\text{g}$ VN이 미리 결합된 경우, 상기 하부 챔버에서 5배의 증가된 이동이 관찰되었다. VN 부존재하에서 상기 웰에 1-100ng의 IGF-II를 "미리 결합"시키는 것은 이동을 2배 증가하도록 자극하였다.

[0266] 그러나, 1-100ng의 IGF-II가 상기 하부 챔버 중에 $1\mu\text{g}$ VN에 미리 결합되는 경우, 8배 내지 10배의 증가된 이동이 관찰되었다 (도 2). 이들 반응들은 IGF-II 단독 및 VN 단독의 영향에 비하여 유의하게 높았다 ($p < 0.01$).

[0267] [L^{27}]-IGF-II는 IGF 매개된 이동이 신호전달되는 것으로 여겨지는 IGF-IR에 결합하지 않는 IGF-II 유사체이다. 따라서, VN에 미리 결합된 [L^{27}]-IGF-II가 TranswellsTM을 통하여 MCF-7 세포 이동을 자극하는 능력을 조사하는 분석을 수행하였다. 이들에 의하여 VN-[L^{27}]-IGF-II 복합체는 VN 단독으로 얻어진 수준 이상으로 MCF-7 이동을 증진시키지 않았으며 이동의 수준은 VN에 결합된 IGF-II에 반응하여 관찰된 것보다 유의하게 낮다 ($p < 0.01$)

것이 밝혀졌다 (도 3). 이들 결과는 VN에 결합된 IGF-II로부터 야기되는 증진된 이동은 IGF-II의 IGF-IR과의 상호작용과 관련된다는 것을 나타낸다.

[0268] IGFBP는 세포에 IGF 노출의 중심 조절자이다. IGFBP가 본 발명에서 관찰된 VN:IGF-II 복합체에 대한 상기 이동 반응에 관련되어 있는지를 결정하기 위하여, IGFBP에 잘 결합하지 않으나 IGF-IR에 대한 친화성을 여전히 보유하고 있는 IGF-II 유사체를 이용하여 MCF-7 세포에서 이동 분석을 수행하였다. 이 IGF-II 유사체, des(1-6)-IGF-II를 사용한 분석에 의하여 천연 IGF-II에 비하여 이동 반응의 차이가 없는 것으로 밝혀졌으며, 이는 IGF-II: VN 복합체가 독립적으로 IGFBP와 작용하여 세포 이동을 증진시키는 것을 암시한다 (도 4).

[0269] 도 5에서, 상기 데이터는 α_v 인테그린-차단 항체가 VN 및 IGF-II 복합체에 반응한 MCF-7 세포 이동을 실질적으로 감소시킨다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 VN에 대한 α_v 인테그린 수용체의 라이케이션 및 활성화가 IGF-II : VN 복합체에 반응한 죄적 세포 이동에 필수적인 것처럼 보인다는 것을 나타낸다.

[0270] 도 6을 참조하면, IGF-IR에 잘 결합하지 않는 IGF-I 유사체 L^{24} -IGF-I을 MCF-7 세포 이동 분석법으로 조사하였다. 상기 데이터는 다음 사항을 증명한다:

[0271] (1) L^{24} -IGF-I 및 IGF-I은 VN의 존재, IGFBP-5의 부존재하에서 동일한 효과를 갖는다; 및

[0272] (2) IGFBP-5의 존재는 IGF-I 및 VN가 존재하는 경우에는 세포 이동을 증진시키나, L^{24} -IGF-I 및 VN가 존재하는 경우에는 그렇지 않다.

[0273] 상기 데이터는 IGF-IR의 활성화가 IGF-I : IGFBP : VN 복합체에 대한 반응으로 관찰된 세포 이동에 필요하다는 것, 또한 VN에 대한 인테그린 수용체의 공동라이케이션이 필요하다는 것을 암시한다.

[0274] 이 연구의 결과에 의하여, IGF-II : VN 및 IGF-I : IGFBP : VN 복합체가 세포 이동을 유의하게 자극한다는 것이 처음으로 밝혀졌다. 요약하면, 이들 데이터는 VN : IGF 복합체가 상처 치유에 기능적으로 관련되어 있고, 유방암 발생 및 진행에 실제로 중요한 인자일 수 있다는 것을 나타낸다. 더욱이, 상기 증가된 이동은 IGF-IR 및 VN-결합 인테그린 수용체 둘다의 활성화와 관련된다. 실제로, VN : IGF 복합체가 유방암 세포의 이동 및 그에 따라 전이를 촉진한다면, VN : IGF 복합체 형성 또는 성장인자 및 인테그린 수용체의 공동 활성화를 저해하는 것을 지향하는 약물은 아주 효과적인 치료제인 것으로 증명될 것이다.

[0275] 실시예 2

[0276] 재료 및 방법

[0277] 난황 비트로넥틴의 정제

[0278] 난황 비트로넥틴 (VN)을 Nagano et al., 1992, The Journal of Biological Chemistry 267: 24863-24870에 기재된 방법의 변형을 사용하여 정제하였다. 이 과정에 사용된 모든 용액은 pH 7.4이었다. 닦의 알로부터 얻어진 계란 난황 (Farmland, Coles-Myer, Toowong, QLD, 호주)을 동량의 2mM 페닐메탄술포닐 플루오라이드 (PMSF)를 포함하는 찬 PBS (0.16M NaCl, 10 mM 소듐 포스페이트) 중에 혼탁하고, 18,000g로 4 °C에서 20 분 동안 원심분리하였다. 상기 상등액 (난황 혈장)을 5 mM 2-β-мер캅토에탄올을 포함하는 1mM 소듐 포스페이트에 대하여 4 °C에서 밤새 투석하고 20,000g로 4 °C에서 20 분 동안 원심분리하였다. 상단 고체층 (저밀도 리포프로틴 (LDL) 분획)을 회수하고 15ml PBS 중에 재현탁하였다.

[0279] LDL 분획으로부터 난황 VN을 3개의 크로마토그래피 기법을 이용하여 정제하였다: 젤-여과, Sepharose CL-6B (Amersham Biosciences, Uppsala, 스웨덴); 히드록시아파타이트 HTP (Bio-Rad, Richmond, CA, 미국); 및 이온교환, Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences).

[0280] 상기 Sepharose CL-6B 칼럼 (10 ml 베드 부피, 칼럼 크기 : 2.5 cm 내경 (ID)x 30 cm)은 (i) 2M NaCl 함유 PE-버퍼 (5mM EDTA, 10mM 소듐 포스페이트) 및 (ii) 0.13M NaCl을 갖는 PE 버퍼를 사용하여 2 단계로 평형화되었다. 50ml의 LDL 분획을 PE 버퍼로 1:1 희석하고 상기 Sepharose CL-6B 칼럼에 적용하여, 결합하지 않은 분획을 수집한 다음, 0.5 M NaCl를 포함하는 10 mM 소듐 포스페이트로 예비 평형화된 히드록시아파타이트 매질에 뱃치 방식으로 적용하였다. 상기 히드록시아파타이트를 평형화 버퍼로 세척한 다음, 20 ml의 10 mM 소듐 포스페이트로 세척하였다.

[0281] 다음으로, 상기 매질을 칼럼 (1.5 cm ID x 8cm) 중에 충진하고, 단백질을 200 mM 소듐 포스페이트로 용출하여

10 x 5 ml 분획을 수집하였다. 상기 용출된 분획을 프리캐스트 폴리아크릴아미드 4-20% 구배 겔 (Gradipore, Frenchs Forest, NSW, 호주), SDS-PAGE (Laemmli, 1970) 및 쿠마시 블리리언트 블루 (G-250, BioRad) 염색을 이용하여 yVN의 존재에 대하여 분석하였다. Bio-Rad 저 범위 마커를 상기 단백질의 분자량을 결정하기 위하여 사용하였다.

[0282] 예상된 yVN (54 kDa)의 분자량에 해당하는 분획을 풀링하고, 10 mM 소듐 포스페이트에 대하여 4°C에서 밤새 투석한 다음, 10 mM 소듐 포스페이트으로 미리 평형화된 Q Sepharose Fast Flow matrix (5 ml 베드 부피, 칼럼 크기 : 1 cm ID x 10 cm)에 적용하였다. 상기 칼럼을 10 mM 소듐 포스페이트 중의 0.15 M NaCl로 세척하고, 상기 yVN을 10 mM 소듐 포스페이트 중의 0.25 M NaCl로 용출하였다. 분획들을 상기한 바와 같은 분자량에 대하여 다시 조사하였다.

[0283] IGF : VN 복합체의 제조

[0284] IGF : VN 복합체를 이미 공개된 (Kricker et al., 2003, supra.) 바와 같이 96 웰 플레이트 및 상기 Transwells™에 미리 결합시켰다.

[0285] 결과

[0286] 도 8은 전장 (75 kDa) 혈청 VN (a)과 절단된 (54 kDa) 난황 VN (b) 사이의 유사성을 나타낸다. 주의해야 할 주요한 유사성은 이들 단백질 모두 RGD 세포 부착 부위 및 폴리음이온 영역 (상기 제안된 IGF 결합 부위)을 가지고 있다는 것이다. 주의해야 할 주요한 차이는 상기 난황 VN은 혼파린 결합 도메인이 결여되어 있다는 것이다.

[0287] 도 9는 상기 용출 분획에 존재하는 우세한 단백질 (레인 E)은 난황 VN (54 kDa)의 예상되는 크기라는 것을 나타낸다. 이 단백질이 이하의 분석에 사용되었다는 것은 또한 중요하며 주의하여야 한다.

[0288] 도 10은 IGFBP-3의 존재하에서 방사성표지된 IGF-I에 결합하는 VN의 능력을 입증하는 것이다. 그러므로, 이 도면은 54 kD 난황 VN이 전장 난황 VN과 동일한 수준으로 IGF-I/IGFBP-3에 결합하는 능력을 가진다는 것을 보이는 것이다. 이는 IGF 결합 부위가 (난황 VN (54 kDa)에는 결여되어 있는) 상기 혼파린 결합 도메인에 위치해 있지 않고 상기 제안된 IGF 결합 부위로 폴리음이온 부위를 강화한다는 것을 암시한다.

[0289] 도 11은 IGF-I/IGFBP-3과 복합체화 되는 경우 VN (혈청 또는 난황)이 무처리, IGF-I/IGFBP-3 및 VN 단독 대조군 보다 높게 세포 증식 (MMT 기법에 의하여, 미토콘드리아 디히드로제나제 활성을 검사함으로써 측정됨)을 증진시키는 능력을 보여준다. 이는 또한 상기 절단된 (54 kDa) 난황 VN이 IGF-I/IGFBP-3과 복합체화 되는 경우 상기 전장 VN과 동일한 수준으로 세포 증식을 자극할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0290] 도 12는 IGF-I/IGFBP-3과 복합체로 존재하는 경우 VN이 무처리, IGF-I/IGFBP-3 및 VN 단독 대조군 보다 높게 세포 이동 (Transwells™ 이동 분석을 통하여)을 증진시킬 수 있는 능력을 입증한다. 그러므로 상기 절단된 (54 kDa) 난황 VN이 IGF-I/IGFBP-3과 복합체화 되는 경우 전장 VN과 동일한 정도로 세포 증식을 자극할 수 있다는 도 4에 대한 결론과 동일한 결론이 이 도면으로부터 도출될 수 있다. 요약하면, 이들 도면은 절단된 (54 kDa) 난황 VN이 IGF-I/IGFBP-3과 복합체로 되어 있는 경우 전장 (75 kDa) VN에 대하여 관찰된 비슷한 수준으로 세포 이동 및 증식 둘 모두를 자극할 수 있다는 것을 암시한다.

[0291] 실시예 3

[0292] 본 실시예에서는 VN : IGF-I 키메라 단백질의 형태로 본 발명의 합성 키메라 단백질의 제안된 예를 제공한다.

[0293] 상기 제안된 합성 키메라 단백질은 도 14a, b, c 및 d에 다양하게 개시되어 있으며, 아미노산 잔기 변형 또는 변형 없는 형태, 임의의 전장 또는 절단된 형태가 포함된다. 또한, 본 발명자들은 다양한 웨티드 링커 또는 링커 없이 VN 및 IGF-I를 융합하는 것을 제안한다.

[0294] 더욱이, 본 발명자들은 그의 특정한 구체예가 도 15에 개시된 VN 및 VEGF 및 PDGF와 같은 성장인자를 포함하는 키메라 단백질을 고려한다.

[0295] 본 명세서에 사용되고 도 13에 나타낸 성숙한 VN (서열번호: 2) 및 IGF-I (서열번호: 3)의 완전한 웨티드 서열은 NCBI (각각 accession# NP~0000629 및 1BQT)로부터 얻었다. VN에 대하여 주어진 잔기 숫자의 주석은 성숙한 단백질의 것이고 신호 웨티드는 제외되어 있다.

[0296] 비트로넥틴 도메인 구조 및 비트로넥틴 리간드 결합 부위에 관하여, 이들은 도 7과 8에 각각 기술되어 있다.

[0297] VN의 전장 및 절단된 형태

[0298] 세포 이동을 조절할 수 있는 합성 키메라 단백질의 일 예는 전장 성숙한 VN 및 IGF-I 단백질을 포함한다.

[0299] A) VN(1... 459) : IGF-I(1... 70)

[0300] 세포 이동을 조절할 수 있는 또다른 예는 380 내지 459 잔기 (C-말단 80 아미노산)가 결여되어 있는 성숙한 VN 단백질을 포함한다.

[0301] B) VN(1... 379) : IGF-I(1... 70)

[0302] 혈청 중의 단량체는 두 가지 형태로 존재한다: 단일쇄 75 kDa 폴리펩티드 또는 10 kDa 작은 단편에 디설파이드 결합에 의하여 연결된 65 kDa 큰 단편으로 구성되는 VN의 내재적으로 절단된 2가지 사슬 형태. 최근 연구에 의하면 이들 형태 사이에 기능적 차이는 없다는 것이 밝혀졌으며, 이는 VN 상의 C-말단 80 아미노산은 기능적 차이를 부여하지 않는다는 것을 암시한다 (Gibson and Peterson, 2001, *Biochim Biophys Acta* 1545: 289-304). 이는 돼지 VN이 기능적 활성을 보유하면서 이 C-말단 영역을 상실하였다는 발견에 의하여 지지된다 (Yoneda et al., 1996, *J Biochem (Tokyo)* 120: 954- 60). 따라서, 본 발명자들은 여전히 VN의 모든 기능적 특성을 부여하는 C-말단 80 아미노산 절단된 VN을 포함하는 더욱 간결한 (compact) 키메라 분자를 제안한다.

[0303] 또다른 키메라는 IGF-I에 연결된 VN의 소마토메딘 B 도메인만을 포함한다. 이 영역은 플라스미노겐 활성자-1 (PAI-1), 유로키나제 플라스미노겐 활성자 수용체 (uPAR) 및 인테그린 결합 부위를 포함한다 (Schvartz et al., 1999, *Int J Biochem Cell Biol* 31: 539-44).

[0304] 이 키메라는 콜라겐 및 글리코스아미노글리칸과 같은 ECM 중의 성분과 상호작용하지 않을 것이다. 이는 VN 상의 53 내지 459 잔기의 결실 (연결 영역, 중앙 베타-프로펠러 도메인 및 헤파린 결합 도메인)을 포함한다.

[0305] C) VN(1... 52) : IGF-I(1... 70)

[0306] VN의 상기 연결 영역은 ECM 성분 콜라겐 뿐만 아니라 트롬빈-안티트롬빈 복합체에 결합하는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨져 왔다. 여기서 제안된 상기 키메라는 VN 상의 131 내지 459 잔기 (중앙 베타-프로펠러 도메인 및 헤파린 결합 도메인)의 결실에 의하여 생성된 상기 연결 영역 뿐만 아니라 VN의 소마토메딘 B 도메인을 포함한다.

[0307] D) VN (1... 130): IGF-I(1... 70)

[0308] 추가의 예에서, VN 상의 상기 중앙 도메인은 가장 크나, 기능의 관점에서 가장 덜 잘 특성화된 상기 단백질의 도메인이다. 그러나, 이 도메인에서 관찰된 상기 베타-프로펠러 구조가 VN의 다양체의 원인일 수 있는 것으로 여겨지고 있다 (Xu et al., 2001, *Proteins* 44: 312-20).

[0309] 본 발명자들은 이 도메인을 결실시켜 VN의 상기 소마토메딘 B 도메인, 폴리음이온 연결 영역 및 폴리양이온 헤파린 결합 도메인 (HBD) 내에 상기 리간드 결합 영역을 보유하나, 자가 연합할 수 없는 더 작은 키메라를 만들 것을 제안한다. 이것은 VN 상의 131 내지 346 잔기 (중앙 베타-프로펠러 도메인)의 결실과 관련된다.

[0310] E) VN(1... 130, 347-459) : IGF-I(1... 70)

[0311] 또다른 키메라는 그의 세포외부 리간드에 결합할 수 있는 것으로 믿어지는 VN의 가장 간결한 형태로 구성된다. 상기 단백질은 VN의 중앙 도메인 및 상기 C-말단 80 아미노산이 제거되었다. 이는 VN 상의 131 내지 346 잔기 및 380 내지 459 잔기 (각각, 중앙 베타-프로펠러 도메인 및 C-말단 80 아미노산)의 결실을 필요로 한다.

[0312] F) VN(1... 130, 347-379) : IGF-I(1... 70)

[0313] 키메라의 추가의 예는 상기 헤파린-결합 도메인이 없는 C-말단 절단된 VN을 포함한다. 따라서, 상기 단백질은 VN의 상기 소마토메딘 B 도메인, 연결 영역 및 중앙 베타-프로펠러 도메인을 포함한다. VN에 대하여 추정되는 2차 헤파린 결합 부위가 VN의 상기 중앙 베타-프로펠러 도메인 내에 있는 제안되었으나, Gibson 등 (Gibson et al., 1999, *J Biol Chem* 274: 6432-42)은 이것들은 기능적이지 않고 상기 헤파린 결합 도메인이 전체 글리코스아미노글리칸 결합 활성의 원인인 것은 아니라는 것을 입증하였다. 따라서, 상기 키메라는 헤파린 및 헤파란 셀페이트와는 결합하지 않을 것이다. 이 키메라는 VN 상의 347 내지 459 잔기 (헤파린 결합 도메인)의 결실을 갖는

다.

[0314] G) VN (1...346) : IGF-I(1...70)

[0315] VN 및 IGF-I 상의 잔기 변형

[0316] VN은 카제인 키나제 II(CK2)에 의하여 T⁵⁰ 및 T⁵⁷ 잔기에 인산화되어 세포 흡착 및 퍼짐 (spreading)을 촉진할 수 있다. CK2-인산화 및 CK2-비인산화된 VN의 유사체 모두 (각각, VN 돌연변이체 (T50E, T57E) 및 (T50A, T57A)에 의하여 모사됨)가 $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$ 인테그린에 결합하여 ERK 신호전달 경로를 활성화시킬 수 있으나, VN의 CK2-인산화된 유사체만이 상기 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 활성화된 포스파티딜이노시톨 3 키나제 (PI3-키나제) 경로에 특이적으로 결합한다 (Seger et al., 1998, J Biol Chem 273: 24805-13; Seger et al., 2001, J Biol Chem 276: 16998-7006).

[0317] 아마도 세포 흡착 및 퍼짐을 증가시키는 것은 이 PI3-K 경로 활성화 때문이다. 그러므로, 본 발명자들은 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린에 결합한 후 상기 PI3-K 경로의 활성화를 촉진 또는 저해하는 돌연변이를 갖는 키메라를 제안한다. 따라서, VN 상에 T50A 및 T57A 치환을 갖는 키메라 분자는 상기 K2-비인산화 VN과 유사할 것이며, ERK 경로 (H)를 통한 신호 전달에 한정될 것이나, VN 상의 T50E 및 T57E 치환을 갖는 합성 구조체는 상기 CK2-인산화된 VN을 흡내낼 것이며 변화된 세포내 신호전달 (I)을 유도할 ERK 및 PI3-K 경로 둘 다를 활성화시킬 수 있을 것이다.

[0318] H) VN(T50A, T57A) : IGF-I

[0319] I) VN(T50E, T57E) : IGF-I

[0320] VN 상의 S³⁷⁸ 잔기에는 cAMP-의존적 단백질 키나제 (PKA) 인산화 부위가 있다. 이 부위의 인산화가 PAI-1의 VN에 대한 결합을 감소시키고 따라서 상기 유로키나제 시스템에서 VN 역할을 조절한다는 것 (Schvartz et al., 2002, Arch Biochem Biophys 397: 246-52)을 PKA-인산화 및 PKA-비인산화된 VN 유사체 (각각 VN 돌연변이체 S378E 및 S378A에 의하여 모사됨)로 입증하였다.

[0321] 그러므로, 본 발명자들은 키메라 (J)에 의한 PAI-I 결합을 저해하기 위하여 VN 상의 상기 S378E 돌연변이 및 키메라 단백질 (K) 내에 PAI-I 결합 및 안정화를 촉진하기 위한 VN 상에 상기 S378A 돌연변이를 모두 포함하는 키메라들을 제안한다. 더욱이, PAI-1이 VN에 결합하는 것은 인테그린-매개된 세포 이동 (Kjoller et al., 1997, Exp Cell Res 232:420-9) 및 VN 상의 uPAR- 및 인테그린-매개된 세포 부착 (Deng et al., 2001, J Cell Physiol 189 23-33)을 저해하는 것으로 밝혀졌기 때문에, S378A 돌연변이는 세포 이동을 증진시킬 수 있다. 흥미롭게도, 이를 발견은 플라스미노겐 활성화의 저해자로의 PAI-1의 기능과는 독립적으로 관찰되었다.

[0322] J) VN (S378E) : IGF-I

[0323] K) VN (S378A) : IGF-I

[0324] Gechman and Shaltiel, 1997, Eur J Biochem 243 493-501은 단백질 키나제 C (PKC)가 S³⁶² 잔기에서 VN을 인산화할 수 있다는 것을 밝혔다. 이 인산화는 VN의 헤파린 결합 도메인 내에서 일어나는 VN의 플라스민 절단을 감쇄시킨다. 따라서 이 부위에서의 플라스민 절단은 이 영역 내에 결합하는 그의 리간드에 대한 VN의 친환성을 조절하고, VN의 반감기를 또한 조절한다. 그러므로, 본 발명자들은 상기 인산화된 세린을 흡내내기 위하여, 결과적으로 플라스민에 의한 키메라의 절단을 저해하기 위하여 S362E 치환을 도입할 것을 제안한다.

[0325] L) VN (S362E) : IGF-I

[0326] IGFBP는 높은 친화성으로 IGF-I에 결합하기 위하여 IGF-I 상의 N-말단 3개 잔기를 필요로 한다는 것이 밝혀져 있다 (Tomas et al., 1991, J Endocrinol 128: 97-105).

[0327] 그러므로, N-말단 서열을 통하여 VN에 연결된 IGF-I은 IGFBP에 결합할 수 있을 것 같지 않다. 그럼에도 불구하고, 본 발명자들은 IGFBP가 IGF-I에 결합할 수 있는 모든 가능성을 제거하기 위하여, 그 결과 상기 VN : IGF-I 키메라 단백질의 생물학적 활성을 저해하기 위하여, N-말단 절단된 IGF-I을 포함하는 VN : IGF-I 키메라를 더 제안한다. 이 구조체는 IGF-I 상의 1 내지 3 잔기 (IGFBP 결합 영역)의 결실을 갖는다.

[0328] M) VN : IGF-I (4... 70)

[0329] VN의 폴리음이온 영역이 IGF-II 및 IGFBP에 결합하는데 원인이 있는 것으로 제안된 바 있다. 그러므로, 본 발명

자들은 VN으로부터 상기 폴리음이온 도메인이 제거된 또 다른 VN : IGF-I 키메라를 제안한다. 그러므로, 이 키메라는 IGF-II 또는 IGFBP에 결합할 수 없다.

[0330] N) VN(1... 52, 65... 459) : IGF-I(1... 70)

[0331] IGF-I에 VN 융합하기

[0332] 본 발명자들은 웨티드 링커 서열의 삽입 또는 삽입 없이 발현 전에 VN 및 IGF-I cDNA가 함께 융합될 수 있다는 것을 제안한다. 단백질을 성공적으로 융합시키기 위하여, 보통은 글리신 및 세린의 조합 및/또는 트로빈, 콜라제나제 또는 플라스민에 대한 것과 같은 프로테아제 절단 부위로 구성되는 다양한 링커 서열이 사용된 바 있다.

[0333] 링커 서열의 비한정적인 예는 다음과 같다:

[0334] (i) Gly₄ Ser (서열번호: 4);

[0335] (ii) Gly₄ Ser₃ (서열번호: 5);

[0336] (iii) (Gly₄ Ser)₃. (서열번호: 6);

[0337] (iv) Leu lie Lys Met Lys Pro (서열번호: 7); 및

[0338] (v) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열번호: 8).

[0339] VN의 다른 웨티드 성장인자에의 융합

[0340] 상기 세포외부 기질 단백질 VN과 상기 성장인자 IGF-I의 융합 외에, 본 발명자들은 VN과 다른 웨티드 성장인자와의 융합을 제안한다. 특히, 본 발명자들은 하기 단백질의 개발을 제안한다 (도 16).

[0341] A) VN : PDGF α (1... 210) (NCBI accession# P04085)

[0342] B) VN : VEGF(1... 102) (NCBI accession # 2VPFE)

[0343] 본 발명자들은 각 세포 표면 수용체는 인테그린, 특히 VN 수용체인 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린과 상호작용한다는 것을 제안한다. 특히, PDGF 수용체는 PDGF로 자극된 후에 상기 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린과 공동 면역침전한다는 것이 밝혀져 있다 (Schneller et al., EMBO J 16 : 5600-7).

[0344] 또한, VEGF 수용체 타입 2는 그의 성장인자로 자극된 후에 상기 VN 수용체와 공동 면역침전한다는 것이 입증되었다 (Soldi et al., EMBO J 18: 882-92).

[0345] 이들 성장인자들에 대한 상기 수용체가 상기 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린과 상호작용한다는 발견은, 이들 세포 표면 수용체의 상기 세포내 신호전달 경로를 조절/강화시키는데 있어서 이 상호작용이 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다. 그러므로, 상기한 키메라 단백질에 의하여 시작된 이들 수용체의 공동 활성화 및 연합 (association)은 치료적 적용에 관련하여 심오한 생물학적 반응을 유도할 수도 있다.

[0346] 본 명세서 전반에 걸쳐서 목적은 본 발명을 임의의 한 구체예 또는 특이적인 특징들의 집합에 한정함이 없이 본 발명의 바람직한 구체예를 기술하는 것이다. 그러므로, 본 발명의 개시의 관점에서, 본 발명의 범위로부터 벗어남이 없이 예시된 특정한 구체예에 다양한 변형 및 변화가 가하여질 수 있다는 것은 당업자에 의하여 이해될 것이다.

[0347] 본 명세서에 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리듬, 특히 및 과학 문헌은 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어 진다.

도면의 간단한 설명

[0234] 도 1은 VN에 미리 결합된 IGF-II (검은색 바), 또는 VN 없이 디쉬에 "결합 된(bound)" IGF-II (회색 바)로 코팅된 하부 챔버에 반응하여, 12 μ m 포어 Transwells™의 상부 챔버에 접종된 HaCAT 인간 피부 각질세포의 하부 표면으로의 이동을 나타내는 도면이다. 각 바는 배양 5시간 후 처리가 3개의 웰에서 분석된 3배수 중복 실험으로부터 얻어진 상기 하부 막 상에서의 세포의 평균 수를 나타낸다.

[0235] 도 2는 VN에 미리 결합된 IGF-II (줄무늬 바), 또는 VN 없이 디쉬에 "결합"된 IGF-II (흰색 바)로 코팅된 하부

챔버에 반응하여, 12 μm 포어 TranswellsTM의 상부 챔버에 접종된 MCF-7 인간 유방암 세포의 하부 표면으로의 이동을 나타내는 도면이다. 각 바는 배양 5 시간 후 처리가 3개의 웰에서 분석된 3배수 중복 실험으로부터 얻어진 상기 하부 막 상에서의 세포의 평균 수를 나타낸다. VN 단독만의 효과에 비하여 상기 복합체의 효과가 유의하게 다른 데이터 점은 별표로 표시하였다.

[0236] 도 3은 12 μm 포어 TranswellsTM의 상부 챔버에 접종된 MCF-7 인간 유방암 세포의 VN, VN에 결합된 천연 IGF-II (줄무늬 바) 또는 VN에 결합된 L²⁷-IGF-II (검은색 바)로 코팅된 하부 챔버로의 이동을 나타내는 도면이다. 각 데이터는 VN 없이 동일한 양의 IGF-II를 포함하는 VN 없는 대조군 (흰색 바)과 쌍을 이루고 있다. 각 바는 배양 5 시간 후 처리가 3개의 웰에서 분석된 2배수 중복 실험으로부터 얻어진 상기 하부 막 상에서의 세포의 평균 수를 나타낸다.

[0237] 도 4는 12 μm 포어 TranswellsTM의 상부 챔버에 접종된 MCF-7 인간 유방암 세포의 VN 단독, VN에 결합된 천연 IGF-II (줄무늬 바) 또는 VN에 결합된 Des(1-6)IGF-II (검은색 바)로 미리 결합된 하부 챔버로의 이동을 나타내는 도면이다. 각 데이터는 VN 없이 동일한 양의 IGF-II를 포함하는 VN 없는 대조군 (흰색 바)과 쌍을 이루고 있다. 각 바는 배양 5 시간 후 처리가 3개의 웰에서 분석된 2배수 중복 실험으로부터 얻어진 상기 하부 막 상에서의 세포의 평균 수를 나타낸다.

[0238] 도 5는 α_v 기능 차단 Ab인 mAb2021Z의 존재하에서 IGF-II에 반응하여 TranswellsTM을 통한 MCF-7 인간 유방암 세포의 이동을 나타내는 도면이다. α_v 기능 차단 Ab로 처리된 MCF-7를 VN+/-IGF-II로 코팅된 TranswellsTM 상에 접종하고 5 시간 동안 상기 다공성 막을 통하여 이동하도록 하였다. 다음으로, 상기 막을 가로지른 세포의 수를 고정된 세포로부터 염색 (stain)을 추출하고 광학 밀도를 판독하여 결정하였다. 다음으로, 처리는 Ab의 존재 또는 부존재하에서의 VN 단독에 대하여 이동하는 세포의 백분율로 나타내었다. 데이터는 단일 실험의 4배수 처리로부터 취합되었다. 바, SEM, 별표는 상기 AB로 처리되지 않거나 Ab 처리된 세포의 처리 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($P<0.1$).

[0239] 도 6은 12 μm 포어 TranswellsTM의 상부 챔버에 접종된 MCF-7 인간 유방암 세포의 VN (흰색 바); VN + IGFBP-5 (회색 바); 천연 IGF-I + VN (엷은 굵은 바), 또는 천연 IGF-I + IGFBP-5 + VN (어두운 굵은 바); L²⁴-IGF-I + VN (좌측 줄무늬 바) 또는 L²⁴-IGF-I + IGFBP-5 + VN (우측 줄무늬 바)로 코팅된 하부 챔버로의 이동을 나타내는 도면이다. 각 바는 배양 5 시간 후 처리가 3개의 웰에서 분석된 2배수 중복 실험으로부터 얻어진 상기 하부 막 상에서의 세포의 평균 수를 나타낸다.

[0240] 도 7은 잔기 변형 부위, 리간드 결합 부위 및 프로테아제 인지 부위 뿐만 아니라 비트로넥틴 내의 다양한 도메인에 대한 잔기 기준 (residue reference)를 포함한, 비트로넥틴 (서열번호: 1)의 아미노산 서열을 나타내는 것이다.

[0241] 도 8은 리간드 결합 부위를 보이는 (a) 전장 VN (75 kDa)과 (b) 난황 VN (54 kDa)의 구조적 관계를 나타내는 도면이다. 포유동물과 조류 혈청 VN은 동일한 도메인 구조를 가지나, 그 아미노산 서열에 있어서 차이가 있다. 난황 VN (54 kDa)은 이들 단백질의 절단된 형태 (truncated form)이다. 사용된 약자는 다음과 같다: Som B, 소마토메딘 B; 연결 (Connecting), 연결 도메인; 헤모펩신, 헤모펩신-유사 반복; HBD, 헤파린 결합 도메인; PAI-1, 플라스미노겐 활성자 저해자-1; uPAR, 유로키나제 플라스미노겐 활성자 수용체; TAT, 트롬빈-안티트롬빈 III 복합체; uPA, 유로키나제 플라스미노겐 활성자 ;----, 폴리음이온 영역 (염기성 영역); + + +, 폴리양이온 영역 (산성 영역). //

[0242] 도 9는 닦 알의 난황으로부터 54 kDa 난황 VN을 정제한 결과를 나타내는 도면이다. Q-Sepharose 매질에 로딩된 단백질 시료 (레인 L) 및 용출된 정제된 산물 (레인 E)의 SDS-PAGE 분석. 레인 M은 문자량 마커를 나타낸다 (BioRad 낮은 범위 마커) (BioRad, Richmond, CA, USA). 상기 단백질을 분석하기 위하여 프리-캐스트 폴리아크릴아미드 4-20% 구배 겔 (Gradipore, Frenchs Forest, NSW, 호주)을 사용하였다.

[0243] 도 10은 [¹²⁵I]-IGF-I/IGFBP-3가 정제된 VN에 결합하는 능력을 검사하는 고체 플레이트 결합 분석의 결과를 나타내는 도면이다. 상기 고체 플레이트 결합 분석은 Kicker, et al., 2003 Endocrinology 144 2807-2815에 개시된 바에 따랐다. 간단하게 설명하면, 정제된 VN을 Immulon 96 웰 플레이트에 4°C에서 밤새 미리 코팅하였다. 다음

으로, 방사성표지된 IGF-I/IGFBP-3 복합체를 첨가하고 상기 VN에 밤새 동안 결합하도록 한 다음 결합하지 않은 물질은 제거하였다. 상기 웰에 결합된 VN에 결합하는 [¹²⁵I]-IGF-I/IGFBP-3은 γ -카운터 (n=18)로 결정하였다. 인간 VN: 인간 혈청으로부터 정제된 VN; 난황 VN 75: 정제된 75 kDa 난황 VN; 난황 VN 54: 정제된 54 kDa 난황 VN.

[0244] 도 11은 세포 성장 분석 (MTT) (48 hr): IGF: VN 복합체에 반응한 HaCAT 세포의 성장을 분석한 결과를 나타내는 도면이다. 상기 IGF: VN 복합체를 HaCAT로 접종된 웰에 미리 코팅하고 48 시간 동안 성장하도록 하였다. 이 시간 후 MTT 법을 사용하여 대사 활성에 의하여 세포 성장을 조사하였다 (Denizot & Lang, 1986 The Journal of Immunological Methods 89 271-277)(n=3). 인간 VN: 인간 혈청으로부터 정제된 VN; 난황 VN 75: 정제된 75 kDa 난황 VN; 난황 VN 54: 정제된 54 kDa 난황 VN; IGF-I/BP3: 인슐린-유사 성장인자-I 및 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질 3.

[0245] 도 12는 Transwell™ 이동 분석 (5 hr): IGF: VN 복합체에 반응하여 HaCAT 이동을 분석한 결과를 나타내는 도면이다. HaCAT 세포를 IGF-I: IGFBP-3: VN 복합체로 코팅된 Transwell™에 접종하고 Kricker, et al., 2003, supra에 개시된 바와 같이 5시간 동안 이동하도록 하였다. 이동된 세포를 크리스탈 비올렛으로 염색하고 595 nm에서 광학적 밀도를 판독하였다. 각 처리는 2배수 (n=2)로 완성하였다. 인간 VN : 인간 혈청으로부터 정제된 VN; 난황 VN 75: 정제된 75 kDa 난황 VN; 난황 VN 54: 정제된 54 kDa 난황 VN; IGF-I/BP3: 인슐린-유사 성장인자-I 및 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질 3.

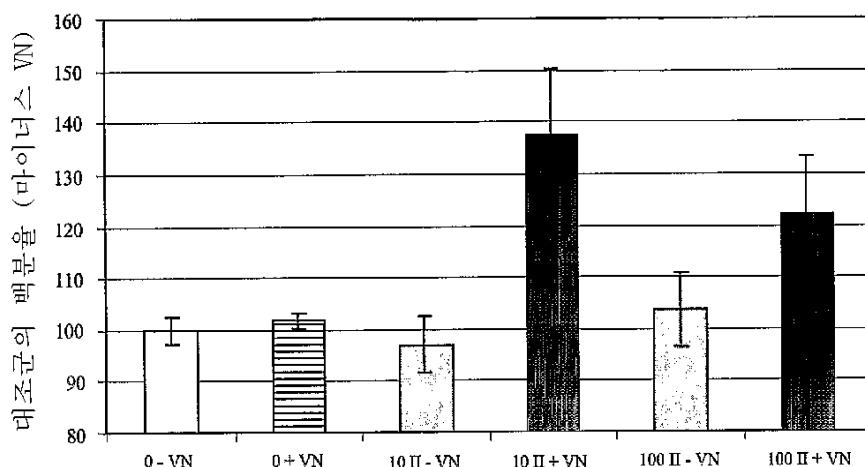
[0246] 도 13은 (A) 성숙한 비트로넥틴 단백질 (서열번호: 2), (B) IGF-I (서열번호: 3) 및 (C) 바람직한 링커 서열 (서열번호: 4-8)의 아미노산 서열을 나타내는 도면이다.

[0247] 도 14a,b,c 및 d는 IGF-I 및 VN-함유 키메라 단백질 (서열번호: 9-22)의 구체예의 아미노산 서열을 나타낸다 ((A) 내지 (N)).

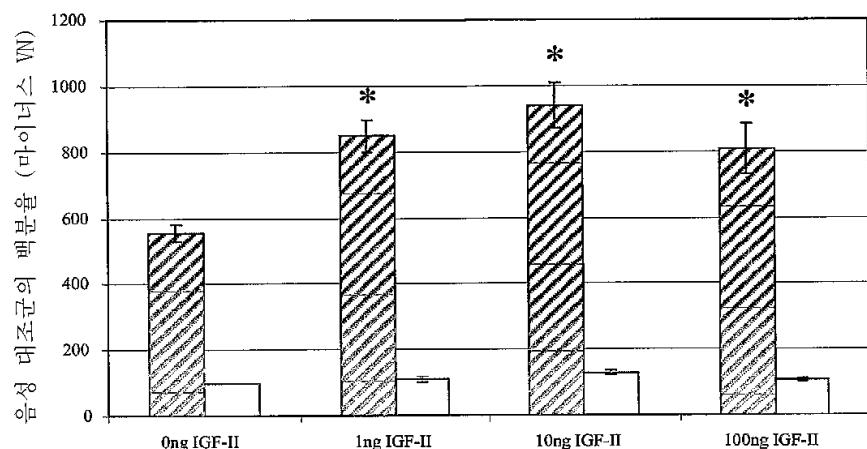
[0248] 도 15는 (A) PDGF 및 VN 함유 키메라-단백질 (서열번호: 23) 및 (B) VEGF 및 VN-함유 키메라 단백질 (서열번호: 24)의 구체예의 아미노산 서열을 나타내는 도면이다.

도면1

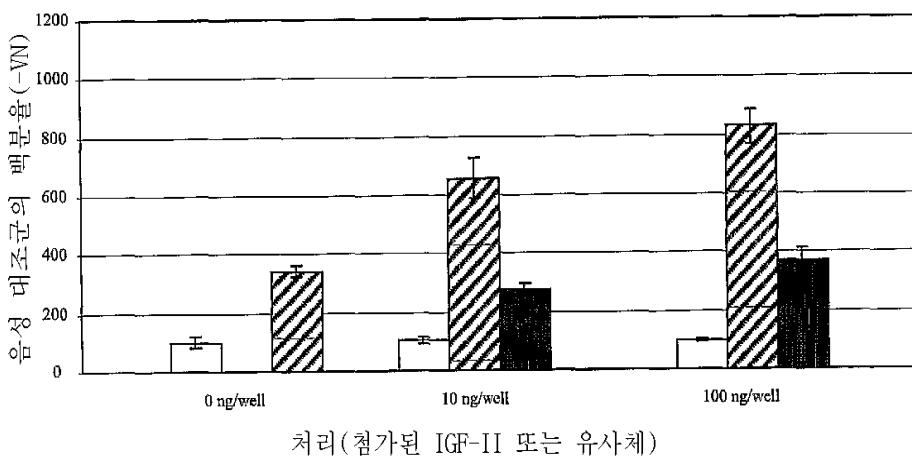
도면1



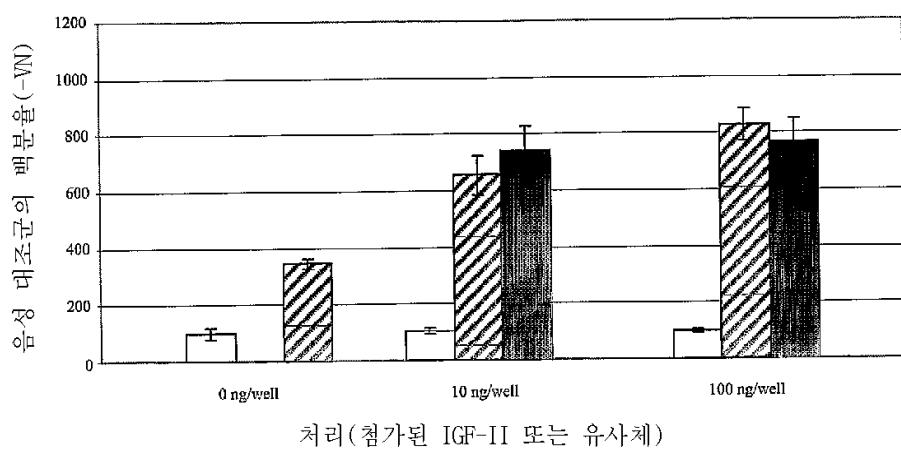
도면2



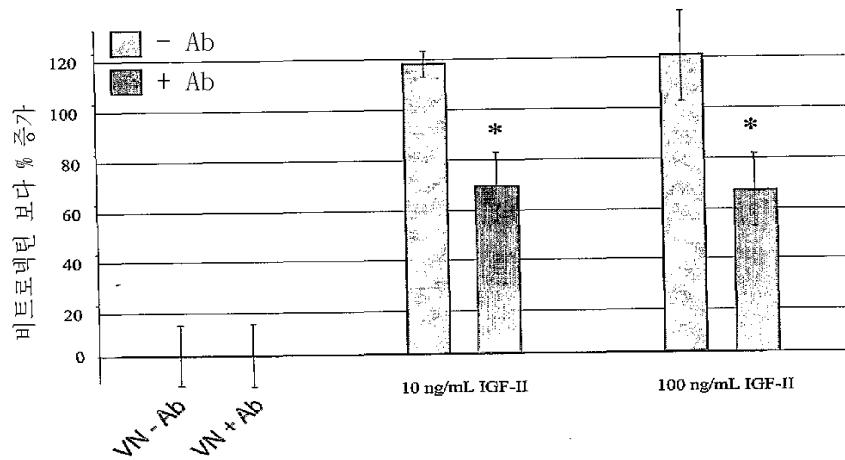
도면3



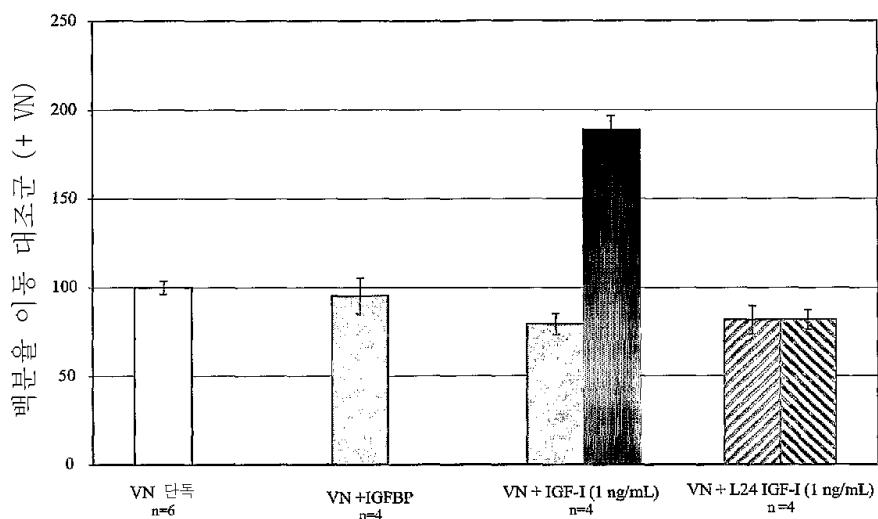
도면4



도면5



도면6



도면7

전장 비트로넥틴의 아미노산 서열 (신호 펩티드 포함)

```

1 maplrplil allawvalad gesckgrcte gfnvdkkcqc delcsyyqsc ctdytaeckp
61 qvtrgdvftm pedeytvyyd geeknnatvh eqvggpalts dlqaqskgnp egtpvlkpee
121 eapapevgas kpegidarpe tlhpgrpqpp aeeelcsgkp fdaftdlkng slfafrggqyc
181 yeldekarvp gypklirdvw giegpidaaf trincqgkty lfkgsgqywrf edgvldpdyp
241 rnisdgfdgl pdnvdaalal pahsysgrer vyffkgkqyw eyqfqhqpsq eecegsslsaa
301 vfehfammqr dswedifell fwgrtsagtr qpqfisrdwh gvpqgqvdaam agriyisqma
361 prpslakkqr frhrnrkgyr sqrghsrgin qnsrrpsram wlsfssees nlgannyddy
421 rmdwlvpatic epiqsvffffs gdkyyrvnlr trrvdtvdpp yprsiqywi gcpapghl

```

도메인 구조	잔기	잔기
--------	----	----

신호 펩티드	1-19	
소마토메딘 B 도메인	1-44	20-63
RGD 모티프	45-47	64-66
폴리음이온 (산성) 영역	53-64	72-83
헤모페신-유사 반복(x2)	131-459	150-478
-중앙 4-블레이드 프로펠러 도메인	131-342	150-361
-C-말단 헤파린 결합 도메인	347-459	366-478
폴리양이온 (염기성) 영역	348-379	367-396

잔기 변형 부위	잔기	잔기
----------	----	----

cAMP-의존성 PK 인산화 부위	378	397
설페이트화 티로신 잔기(x2)	56, 59	75, 78
PKC 인산화 부위	362	381
카제인 키나제 인산화 부위(x2)	50, 57	69, 76

프로테아제 의자 부위	잔기	잔기
-------------	----	----

내재적 절단 부위 (미확인 프로테아제)	379-380	398-399
트롬빈 절단 부위	305-306	324-325
트롬빈 절단 부위	370-371	389-390
엘라스탁제 절단 부위	330-331	349-350
엘라스탁제 절단 부위	383-384	402-403
플라스민 절단 부위	361-362	380-381

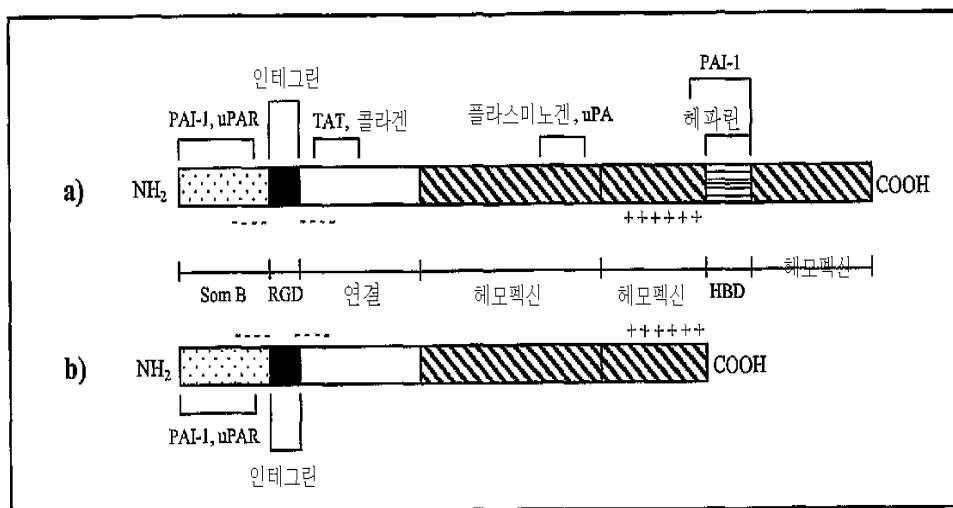
기질 결합 부위	잔기	잔기
----------	----	----

PAI-1	12-30	
PAI-1	348-370	
uPAR		SomB region
인테그린		45-47
콜라겐	폴리양이온 영역	
콜라겐	폴리음이온 영역	
트롬빈 안티트롬빈 III 복합체	폴리음이온 영역	
플라스미노겐	332-348	
글리코스아미노글리칸	348-361	

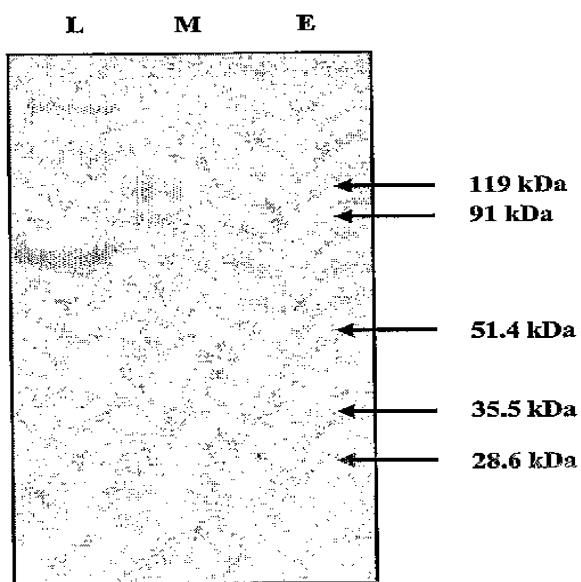
* 성숙한 단백질 상의 위치에 따라 번호매겨진 잔기

* (신호 펩티드를 가진) 프로-단백질 상의 위치에 따라 번호매겨진 잔기

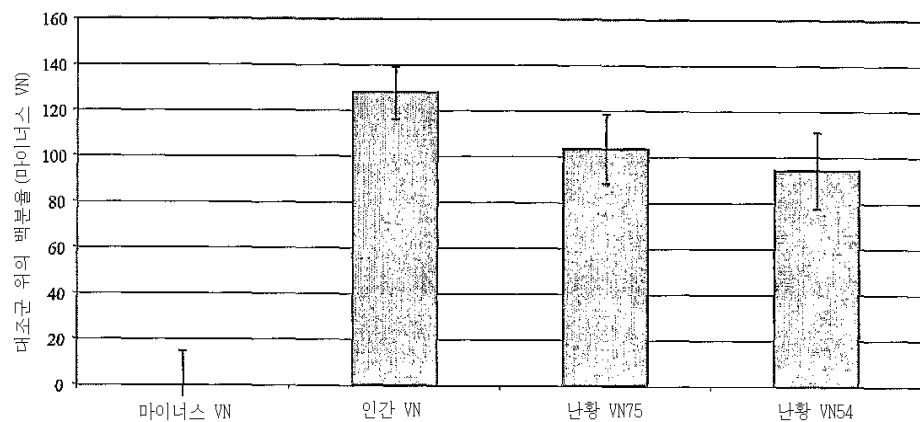
도면8



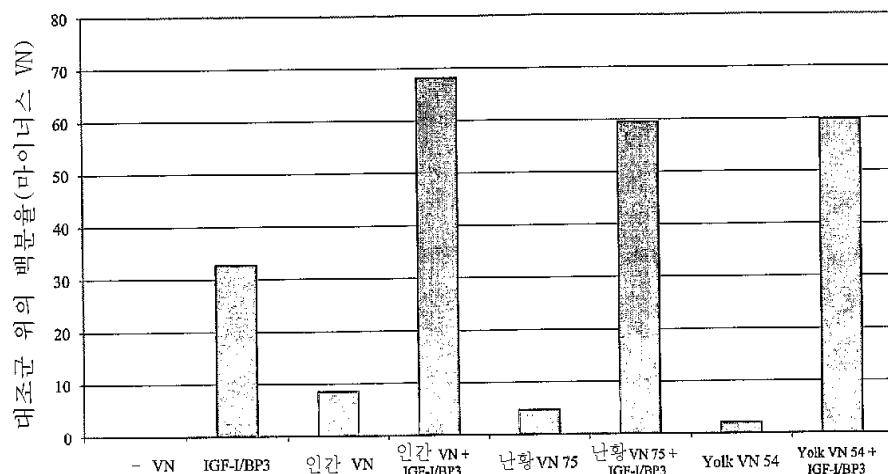
도면9



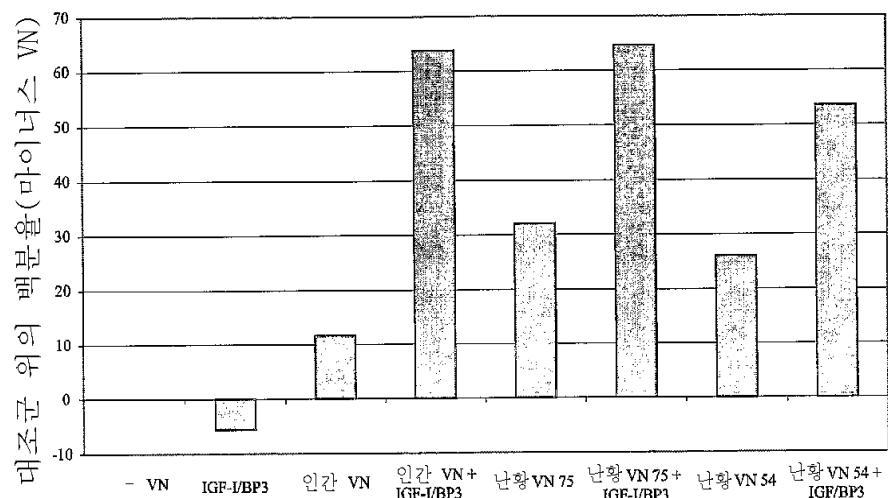
도면10



도면11



도면12



도면13**A) VN AA 서열**

dgesckgrct egfnrvdkkccq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpson sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsp
etlhpggrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgire rvyffkgkqy weyfghqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfwgrrtsagt rqpqfisrdw hgvpqgvdaa magriyisgm aprpslakq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprisiaqyw lgcpapghl

B) IGF-I AA 서열

gpetlcgael vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssrrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy
caplkpaks

C) 링커 서열

- 1) Gly₄ Ser
- 2) Gly₄ Ser₃
- 3) (Gly₄ Ser)₃
- 4) Leu Ile Lys Met Lys Pro 풀라스민 절단 인지 부위
Ref: FASEB (2001) 15: 1300-2
- 5) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys 콜라케나제-3 절단 인지 부위
Ref: Biomacromolecules (2003) 4: 1214-23

도면14a**A) VN (1...459) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeaapapevga skpegidsrp
etlhpggrpqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgieggpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwrtsgt rqpqfisrdw hgvpqgvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yxmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnrl rtrrvdtvdp pyprsiqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa
```

B) VN (1...379) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeaapapevga skpegidsrp
etlhpggrpqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgieggpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwrtsgt rqpqfisrdw hgvpqgvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsr -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcdg rgfyfnkptg
ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa
```

C) VN (1...52) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mp
-- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr
scdlrrlemy caplkaksa
```

D) VN (1...130) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeaapapevga skpegidsrp
etlhpggrpqp -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq
tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa
```

E) VN (1...130, 347...459) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeaapapevga skpegidsrp
etlhpggrpqp ammqrdswed ifellfwgrt sagtrqpkfi srdwhgvpgg vdaamagriy
isgmaprpsl akkqrfrhrn rkgyrsqrgh srgrnqnsrr psratwlsf sseesnlgan
nyddyrmdwl vpatcepiqs vffffsgdkyy rvnirrrvd tvdppyprsi aqywlgcrap
ghl -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq
tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa
```

도면14b**F) VN (1...130, 347..379) IGF-I (1...70)**

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpe
etlhpgrpqp ammqrdswe ifellfwgrt sagtrqfqfi -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvvcg d rgyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa

G) VN (1...346) IGF-I (1...70)

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpe
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiengpidaa ftrinccgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpsla -- LINK --
gpetlcgael vdalqfvvcg d rgyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa

H) VN (T50A, T57A) IGF-I (1...70)

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpe
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiengpidaa ftrinccgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat ceipi
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiagw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvvcg d rgyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa

I) VN (T50E, T57E) IGF-I (1...70)

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpe
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiengpidaa ftrinccgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat ceipi
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiagw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvvcg d rgyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa

도 14(계속)

도면14c

J) VN (S378E) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekarv pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwgrtsagt rcpqfisrdw hgvgpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpkasa
```

K) VN (S378A) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekarv pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwgrtsagt rcpqfisrdw hgvgpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpkasa
```

L) VN (S362E) IGF-I (1...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekarv pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwgrtsagt rcpqfisrdw hgvgpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcdg rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpkasa
```

M) VN (1...459) IGF-I (4...70)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknnatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrpqp paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekarv pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqps qeecegssls avfehfammq rdswedifel
lfgwgrtsagt rcpqfisrdw hgvgpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgn nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- tlcgaelvda
lqfvcdrgf yfnkptgyg ssrapqtgi vdeccfrscd irrlemycap lkpaksa
```

도 14(계속)

도면14d**N) VN (1...52, 65...459) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpknnatvhe
qvggpsonltsd lqaqskgnpe qtpvlpkpeee apapevgask pegidsrp 1hpgrpqppa
eeelcsgkpf daftdlkn 1fafrgqcy eldekaevrpg ypkliardv 1egpidaaf
rincqgktyl fkgsqywrfe dgvlpdypn nisdgfdgip dndalaalp ahsysgrerv
yifkgkqywe yqfqhqpse ecegsslsav fehfammqr swedifellf wgrtsagtrq
pqfisrdwhg vpggydaama grijisgmap rpslakkqrh rhrnrkgyrs qrghsrgnq
nsrrpsratw 1slfsseesn lgannyddyr mdwlvpate piqsvfffsg dkyyrvnlrt
rrvdtdvdpv prsiagywlq cpapghl -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcd
rgfyfnkptg ygssssrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkaksa
```

도 14(계속)

도면15**A) VN (1...459) PDGF (1...210)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggpsonltsd sdlqaqskgn peqtpvlpkpe eeapapevgas kpegid
et1hpgrpqpa paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekaevr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgktyl ylfkgsqywr fedgvldpy prnisdgfdg ipdnvdaala
1pahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqpse qeacegssls avfehfammq rdswedifel
1fwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaaa magriyisgm aprpslakkqrfrhrnrkgy
rsqrghsrgnq nsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpate ceqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiagywlq lgcpapghl -- LINK --
(PDGF Accession # P04085)
```

B) VN (1...459) VEGF (1...102)

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytv
dgeeknnatv heqvggpsonltsd sdlqaqskgn peqtpvlpkpe eeapapevgas kpegid
et1hpgrpqpa paeeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrgqy cyeldekaevr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincqgktyl ylfkgsqywr fedgvldpy prnisdgfdg ipdnvdaala
1pahsysgre rvyffkgkqy weyqfqhqpse qeacegssls avfehfammq rdswedifel
1fwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaaa magriyisgm aprpslakkqrfrhrnrkgy
rsqrghsrgnq nsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpate ceqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiagywlq lgcpapghl -- LINK -- ggnhhevkvf
mdvyqrsych pietlvdifq eyndeieyif kpscavlmrc ggcndegle cvpteesnit
mcmimrikphq gqhigemsfl qhnkcecrpk kd
```

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> QUEENSLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

<120> GROWTH FACTOR COMPLEXES AND MODULATION OF CELL MIGRATION AND GROWTH

<130> 11375KR2

<150> AU2003900481

<151> 2003-02-05

<150> PCT/AU2004/000117

<151> 2004-02-05

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Leu Arg Pro Leu Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Trp Val
1 5 10 15

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

Asn Val Asp Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln
35 40 45

Ser Cys Cys Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg
50 55 60

Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp
65 70 75 80

Gly Glu Glu Lys Asn Asn Ala Thr Val His Glu Gln Val Gly Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Thr Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln
 100 105 110

Thr Pro Val Leu Lys Pro Glu Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly
 115 120 125

Ala Ser Lys Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro
 130 135 140

Gly Arg Pro Gln Pro Pro Ala Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg
 165 170 175

Gly Gln Tyr Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr
 180 185 190

Pro Lys Leu Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala
 195 200 205

Ala Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly
 210 215 220

Ser Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro
 225 230 235 240

Arg Asn Ile Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala
 245 250 255

Ala Leu Ala Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr
 260 265 270

Phe Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro
 275 280 285

Ser Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His

290	295	300
Phe Ala Met Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu		
305	310	315
320		
Phe Trp Gly Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser		
325	330	335
Arg Asp Trp His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly		
340	345	350
Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys		
355	360	365
Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly		
370	375	380
His Ser Arg Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Met		
385	390	395
400		
Trp Leu Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn		
405	410	415
Tyr Asp Asp Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro		
420	425	430
Ile Gln Ser Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn		
435	440	445
Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser		
450	455	460
Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu		
465	470	475
<210> 2		
<211> 459		

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Gln	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Asn	Val	Asp
1				5					10					15	

Lys	Lys	Cys	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Cys	Cys
					20			25				30			

Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Val
						35		40			45				

Phe	Thr	Met	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Val	Tyr	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu
					50			55			60				

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

Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val
						85		90			95				

Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Ala	Ser	Lys
						100		105			110				

Pro	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Pro
115						120				125					

Gln	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Ala
130							135				140				

Phe	Thr	Asp	Leu	Lys	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Phe	Arg	Gly	Gln	Tyr
145					150				155			160			

Cys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Leu
						165		170			175				

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile
 210 215 220

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

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys
 245 250 255

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met
 275 280 285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly
 290 295 300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp
 305 310 315 320

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr
 325 330 335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe
 340 345 350

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 370 375 380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu
 450 455

<210> 3
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
 20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
 35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
 50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic linker

<400> 6

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic linker with protease cleavage site

<400> 7

Leu Ile Lys Met Lys Pro
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic linker with protease cleavage site

<400> 8

Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys
1 5

<210> 9
<211> 529
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chimeric sequence

<220>
<221> Linker
<222> (459)..(460)

<400> 9

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
 20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
 85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile
 210 215 220

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

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys
 245 250 255

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met
 275 280 285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly
 290 295 300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp
 305 310 315 320

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr
 325 330 335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe
 340 345 350

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 370 375 380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 465 470 475 480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg
 485 490 495

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 500 505 510

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala

<210> 10
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic chimera

<220>

<221> Linker

<222> (379)..(380)

<400> 10

Asp	Gln	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Asn	Val	Asp
1															
															15

Lys	Lys	Cys	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Cys	Cys
															30
20															

Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Val
															45
35															

Phe	Thr	Met	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Val	Tyr	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu
															60
50															

Lys	Asn	Asn	Ala	Thr	Val	His	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Thr
															80
65															

Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val
															95
85															

Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Ala	Ser	Lys
															110
100															

Pro	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Pro
															125
115															

Gln	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Ala
															140
130															

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Leu
165					170									175	

Ile	Arg	Asp	Val	Trp	Gly	Ile	Glu	Gly	Pro	Ile	Asp	Ala	Ala	Phe	Thr
180						185								190	

Arg	Ile	Asn	Cys	Gln	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Gly	Ser	Gln	Tyr
195					200								205		

Trp	Arg	Phe	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Asp	Pro	Asp	Tyr	Pro	Arg	Asn	Ile
210				215									220		

Ser	Asp	Gly	Phe	Asp	Gly	Ile	Pro	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala
225					230									240	

Leu	Pro	Ala	His	Ser	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Arg	Val	Tyr	Phe	Phe	Lys
245						250									255

Gly	Lys	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Gln	Phe	Gln	His	Gln	Pro	Ser	Gln	Glu
260					265									270	

Glu	Cys	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Glu	His	Phe	Ala	Met
275					280										285

Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Trp	Glu	Asp	Ile	Phe	Glu	Leu	Leu	Phe	Trp	Gly
290					295									300	

Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Arg	Gln	Pro	Gln	Phe	Ile	Ser	Arg	Asp	Trp
305					310									320	

His	Gly	Val	Pro	Gly	Gln	Val	Asp	Ala	Ala	Met	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr
325						330									335

Ile	Ser	Gly	Met	Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe
340					345									350	

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Gly Pro Glu Thr Leu
 370 375 380

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 385 390 395 400

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg
 405 410 415

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 420 425 430

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 435 440 445

Ala

<210> 11
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (52)..(53)

<400> 11

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

1 5 10 15

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
35 40 45

Phe Thr Met Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp
 50 55 60

Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro
65 70 75 80

Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val
85 90 95

Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr
 100 105 110

Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
115 120

<210> 12
<211> 200
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic chimera

<220>
<221> Linker
<222> (130)..(131)

<400> 12

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
 20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
 85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu
 130 135 140

Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly
 145 150 155 160

Tyr Gly Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu
 165 170 175

Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala
 180 185 190

Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
195 200

<210> 13
<211> 373
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic chimera

<220>
<221> Linker
<222> (303)..(304)

<400> 13

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Ala Met Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu
 130 135 140

Leu Phe Trp Gly Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile
 145 150 155 160

Ser Arg Asp Trp His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala
 165 170 175

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys
 180 185 190

Lys Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg
 195 200 205

Gly His Ser Arg Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala
 210 215 220

Thr Trp Leu Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Asp Asp Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu
 245 250 255

Pro Ile Gln Ser Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val
 260 265 270

Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg
 275 280 285

Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly
 290 295 300

Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325 330 335

Ser	Ser	Arg	Arg
Arg	Ala	Pro	Gln
Ala	Pro	Gln	Thr
			Gly
			Ile
			Val
			Asp
			Glu
			Cys
			Cys
			Phe

340 345 350

Arg	Ser	Cys	Asp
Leu	Arg	Arg	Leu
Glu	Leu	Glu	Met
			Tyr
			Cys
			Ala
			Pro
			Leu
			Lys

355 360 365

Pro	Ala	Lys	Ser
Ala			Ala

370

<210> 14
<211> 230
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic chimera

<220>
<221> Linker
<222> (160)..(161)

<400> 14

Asp	Gln	Glu	Ser
Cys	Lys	Gly	Arg
		Cys	Cys
		Thr	Thr
		Glu	Gly
			Asn
			Val
			Asp

1 5 10 15

Lys	Lys	Cys	Gln
Cys	Cys	Asp	Glu
		Leu	Cys
		Ser	Ser
		Tyr	Tyr
		Gln	Ser
			Cys
			Cys

20 25 30

Thr	Asp	Tyr	Thr
Ala	Glu	Cys	Lys
		Pro	Gln
			Val
			Thr
			Arg
			Gly
			Asp
			Val

35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu

50	55	60
Lys Asn Asn Ala Thr Val His Glu Gln Val Gly Gly Pro Ser Leu Thr		
65	70	75
80		
Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val		
85	90	95
Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys		
100	105	110
Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro		
115	120	125
Gln Pro Ala Met Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu		
130	135	140
Leu Phe Trp Gly Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile		
145	150	155
160		
Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe		
165	170	175
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly		
180	185	190
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys		
195	200	205
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu		
210	215	220
Lys Pro Ala Lys Ser Ala		
225	230	
<210> 15		
<211> 417		

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic chimera

<220>

<221> Linker

<222> (347)..(348)

<400> 15

Asp	Gln	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Asn	Val	Asp
1															
														15	

Lys	Lys	Cys	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Cys	Cys
														30	
20															

Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Val
														45	
35															

Phe	Thr	Met	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Val	Tyr	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu
														60	
50															

Lys	Asn	Asn	Ala	Thr	Val	His	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Thr
														80	
65															

Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val
														95	
85															

Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Ala	Ser	Lys
														110	
100															

Pro	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Pro
														125	
115															

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala

130	135	140
Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr		
145	150	155
Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu		
165	170	175
Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr		
180	185	190
Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr		
195	200	205
Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile		
210	215	220
Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala Leu Ala		
225	230	235
Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys		
245	250	255
Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu		
260	265	270
Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met		
275	280	285
Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly		
290	295	300
Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp		
305	310	315
His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr		
325	330	335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Gly Pro Glu Thr Leu
 340 345 350

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 355 360 365

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg
 370 375 380

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 385 390 395 400

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 405 410 415

Ala

<210> 16

<211> 529

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic chimera

<220>

<221> Linker

<222> (459)..(460)

<400> 16

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys

20	25	30
----	----	----

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Ala Met Pro Glu Asp Glu Tyr Ala Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
 85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile

210	215	220	
Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala Leu Ala			
225	230	235	240
Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys			
245	250	255	
Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu			
260	265	270	
Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met			
275	280	285	
Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly			
290	295	300	
Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp			
305	310	315	320
His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr			
325	330	335	
Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe			
340	345	350	
Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg			
355	360	365	
Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser			
370	375	380	
Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp			
385	390	395	400
Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser			
405	410	415	

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 465 470 475 480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Arg Arg
 485 490 495

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 500 505 510

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala

<210> 17
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (459)..(460)

<400> 17

Asp	Gln	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Asn	Val	Asp
1				5					10					15	

Lys	Lys	Cys	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Cys	Cys
					20			25				30			

Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Val
					35			40			45				

Phe	Glu	Met	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Glu	Val	Tyr	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu
					50			55			60				

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

Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val
					85			90			95				

Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Ala	Ser	Lys
					100			105			110				

Pro	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Pro
115					120				125						

Gln	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Ala
130				135					140					

Phe	Thr	Asp	Leu	Lys	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Phe	Arg	Gly	Gln	Tyr
145					150				155			160			

Cys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Leu
					165			170			175				

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr

180	185	190
-----	-----	-----

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr	195	200	205
---	-----	-----	-----

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile	210	215	220
---	-----	-----	-----

Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala Leu Ala	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys	245	250	255
---	-----	-----	-----

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu	260	265	270
---	-----	-----	-----

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met	275	280	285
---	-----	-----	-----

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly	290	295	300
---	-----	-----	-----

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp	305	310	315	320
---	-----	-----	-----	-----

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr	325	330	335
---	-----	-----	-----

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe	340	345	350
---	-----	-----	-----

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg	355	360	365
---	-----	-----	-----

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser

370

375

380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 465 470 475 480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Arg Arg
 485 490 495

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 500 505 510

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala

<210> 18
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic chimera

<220>

<221> Linker

<222> (459)..(460)

<400> 18

Asp	Gln	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Asn	Val	Asp
1															
														15	

Lys	Lys	Cys	Gln	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Cys	Cys
														30	

Thr	Asp	Tyr	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Arg	Gly	Asp	Val
														45	

Phe	Thr	Met	Pro	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Val	Tyr	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu
														60	

Lys	Asn	Asn	Ala	Thr	Val	His	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Thr
														80	

Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asn	Pro	Glu	Gln	Thr	Pro	Val
														95	

Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Ala	Ser	Lys
														110	

Pro	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Pro
														125	

Gln	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Ala
														140	

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	Leu
165					170									175	

Ile	Arg	Asp	Val	Trp	Gly	Ile	Glu	Gly	Pro	Ile	Asp	Ala	Ala	Phe	Thr
180						185								190	

Arg	Ile	Asn	Cys	Gln	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Gly	Ser	Gln	Tyr
195					200								205		

Trp	Arg	Phe	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Asp	Pro	Asp	Tyr	Pro	Arg	Asn	Ile
210				215								220			

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

Leu	Pro	Ala	His	Ser	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Arg	Val	Tyr	Phe	Phe	Lys
245						250							255		

Gly	Lys	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Gln	Phe	Gln	His	Gln	Pro	Ser	Gln	Glu
260					265							270			

Glu	Cys	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Glu	His	Phe	Ala	Met
275					280								285		

Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Trp	Glu	Asp	Ile	Phe	Glu	Leu	Leu	Phe	Trp	Gly
290					295								300		

Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Arg	Gln	Pro	Gln	Phe	Ile	Ser	Arg	Asp	Trp
305					310						315			320	

His	Gly	Val	Pro	Gly	Gln	Val	Asp	Ala	Ala	Met	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr
325						330						335			

Ile	Ser	Gly	Met	Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe
340					345							350			

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Glu Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 370 375 380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 465 470 475 480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg
 485 490 495

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
 500 505 510

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala

<210> 19
<211> 529
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic chimera

<220>
<221> Linker
<222> (459)..(460)

<400> 19

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro

115

120

125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile
 210 215 220

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

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys
 245 250 255

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met
 275 280 285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly
 290 295 300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr			
325	330	335	

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe			
340	345	350	

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg			
355	360	365	

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ala Arg Ala Thr Trp Leu Ser			
370	375	380	

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp			
385	390	395	400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser			
405	410	415	

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr			
420	425	430	

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln			
435	440	445	

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu			
450	455	460	

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg			
465	470	475	480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg			
485	490	495	

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp			
500	505	510	

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
 515 520 525

Ala

<210> 20
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (459)..(460)

<400> 20

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
 20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

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

85

90

95

Leu Lys Pro Glu Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile
 210 215 220

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

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys
 245 250 255

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met

275

280

285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly
 290 295 300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp
 305 310 315 320

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr
 325 330 335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe
 340 345 350

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Glu Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 370 375 380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Pro Glu Thr Leu
 450 455 460

Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg

465 470 475 480

Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg
485 490 495

Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
500 505 510

Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser
515 520 525

Ala

<210> 21
<211> 526
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic chimera

<220>
<221> Linker
<222> (459)..(460)

<400> 21

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu

50	55	60
Lys Asn Asn Ala Thr Val His Glu Gln Val Gly Gly Pro Ser Leu Thr		
65	70	75
Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val		
85	90	95
Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys		
100	105	110
Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro		
115	120	125
Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala		
130	135	140
Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr		
145	150	155
160		
Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu		
165	170	175
Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr		
180	185	190
Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr		
195	200	205
Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile		
210	215	220
Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala Leu Ala		
225	230	235
240		
Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys		

245	250	255
-----	-----	-----

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu		
260	265	270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met		
275	280	285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly		
290	295	300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp		
305	310	315

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr		
325	330	335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe		
340	345	350

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg		
355	360	365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser		
370	375	380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp		
385	390	395

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser		
405	410	415

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr		
420	425	430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln

435

440

445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Thr Leu Cys Gly Ala
 450 455 460

Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr
 465 470 475 480

Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln
 485 490 495

Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg
 500 505 510

Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
 515 520 525

<210> 22
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (447)..(448)

<400> 22

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
 20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val

35

40

45

Phe Thr Met Pro Lys Asn Asn Ala Thr Val His Glu Gln Val Gly Gly
 50 55 60

Pro Ser Leu Thr Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu
 65 70 75 80

Gln Thr Pro Val Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val
 85 90 95

Gly Ala Ser Lys Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His
 100 105 110

Pro Gly Arg Pro Gln Pro Pro Ala Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys
 115 120 125

Pro Phe Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe
 130 135 140

Arg Gly Gln Tyr Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly
 145 150 155 160

Tyr Pro Lys Leu Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp
 165 170 175

Ala Ala Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys
 180 185 190

Gly Ser Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr
 195 200 205

Pro Arg Asn Ile Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp
 210 215 220

Ala Ala Leu Ala Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Tyr	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Gln	Phe	Gln	His	Gln
			245			250								255	

Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Cys	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Glu
								260		265			270		

His	Phe	Ala	Met	Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Trp	Glu	Asp	Ile	Phe	Glu	Leu
								275		280			285		

Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Thr	Arg	Gln	Pro	Gln	Phe	Ile
								290		295			300		

Ser	Arg	Asp	Trp	His	Gly	Val	Pro	Gly	Gln	Val	Asp	Ala	Ala	Met	Ala
								305		310			315		320

Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Met	Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Ala	Lys
								325		330			335		

Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	His	Arg	Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg
								340		345			350		

Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg	Asn	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala
								355		360			365		

Thr	Trp	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ala	Asn
								370		375			380		

Asn	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Arg	Met	Asp	Trp	Leu	Val	Pro	Ala	Thr	Cys	Glu
								385		390			395		400

Pro	Ile	Gln	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Val	
								405		410			415		

Asn	Leu	Arg	Thr	Arg	Arg	Val	Asp	Thr	Val	Asp	Pro	Pro	Tyr	Pro	Arg
								420		425			430		

Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly
 435 440 445

Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val
 450 455 460

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
 465 470 475 480

Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe
 485 490 495

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
 500 505 510

Pro Ala Lys Ser Ala
 515

<210> 23
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (459)..(460)

<400> 23

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys

20	25	30
----	----	----

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
 85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile

210	215	220	
Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala Leu Ala			
225	230	235	240
Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys			
245	250	255	
Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu			
260	265	270	
Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met			
275	280	285	
Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly			
290	295	300	
Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp			
305	310	315	320
His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr			
325	330	335	
Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe			
340	345	350	
Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg			
355	360	365	
Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser			
370	375	380	
Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp			
385	390	395	400
Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser			
405	410	415	

Val Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Met Arg Thr Leu Ala
 450 455 460

Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu
 465 470 475 480

Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln
 485 490 495

Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val
 500 505 510

Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His
 515 520 525

Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys
 530 535 540

Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val
 545 550 555 560

Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe
 565 570 575

Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys
 580 585 590

Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser
 595 600 605

Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys
 610 615 620

Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr
 625 630 635 640

Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Gly Arg Pro Arg
 645 650 655

Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr
 660 665 670

<210> 24
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic chimera

<220>
 <221> Linker
 <222> (459)..(460)

<400> 24

Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe Asn Val Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln Ser Cys Cys
 20 25 30

Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val
 35 40 45

Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp Gly Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Asp Leu Gln Ala Gln Ser Lys Gly Asn Pro Glu Gln Thr Pro Val
 85 90 95

Leu Lys Pro Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly Ala Ser Lys
 100 105 110

Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro Gly Arg Pro
 115 120 125

Gln Pro Pro Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe Asp Ala
 130 135 140

Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly Gln Tyr
 145 150 155 160

Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro Lys Leu
 165 170 175

Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala Phe Thr
 180 185 190

Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser Gln Tyr
 195 200 205

Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro Arg Asn Ile
 210 215 220

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

Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe Phe Lys
 245 250 255

Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe Ala Met
 275 280 285

Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu Phe Trp Gly
 290 295 300

Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser Arg Asp Trp
 305 310 315 320

His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg Ile Tyr
 325 330 335

Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe
 340 345 350

Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg
 355 360 365

Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 370 375 380

Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn Tyr Asp Asp
 385 390 395 400

Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro Ile Gln Ser
 405 410 415

Val Phe Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Arg Thr
 420 425 430

Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser Ile Ala Gln
 435 440 445

Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu Gly Gln Asn His His
450 455 460

Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro
465 470 475 480

Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu
485 490 495

Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys
500 505 510

Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile
515 520 525

Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly
530 535 540

Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
545 550 555 560

Asp