



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월02일

(11) 등록번호 10-1557167

(24) 등록일자 2015년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7022413

(22) 출원일자(국제) 2008년03월27일

심사청구일자 2013년03월27일

(85) 번역문제출일자 2009년10월26일

(65) 공개번호 10-2010-0015944

(43) 공개일자 2010년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/058531

(87) 국제공개번호 WO 2008/119058

국제공개일자 2008년10월02일

(30) 우선권주장

60/908,231 2007년03월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

J Biol chem, 1998, Vol. 273, No. 48,
pp32182-32186

WO2002051993 A1

US20050089932 A1

Current Biology. 1998, Vol. 8, pages
1141-1150.

(73) 특허권자

인트렉손 코포레이션

미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 슈트 1400,
1750 크래프트 드라이브

(72) 발명자

바친스키, 데이비드

미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 13400 쿠퍼
크로프트 드라이브 아파트. 씨

칼슨, 조나단

미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 아파트.
4204, 215 에스. 크놀우드 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

허용록

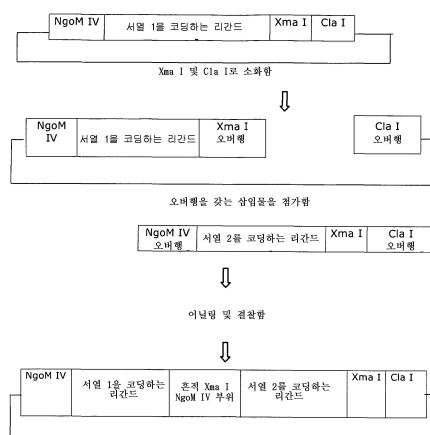
전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 MEK 리간드 및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드

(57) 요약

본 발명은 키나아제 리간드 및 폴리리간드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 MEK 활성을 조절하는 리간드, 호모 폴리리간드(homopolyligands) 및 혼테로폴리리간드(heteropolyligands)에 관한 것이다. 상기 리간드 및 폴리리간드는 연구 도구로서 또는 치료제로서 활용된다. 본 발명은 상기 리간드, 호모폴리리간드 및 혼테로폴리리간드의 세포 위치 신호, 애피토프 태그 및/또는 리포터로의 연결을 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 리간드 및 폴리리간드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

대 표 도 - 도11

(72) 발명자

앳젤, 에이미

미국, 미네소타 55407, 미니애폴리스, 3116 12 에
비뉴 사우쓰

리드, 토마스

미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 2905 애쉬론
드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 5, 서열번호: 9, 서열번호: 13, 서열번호: 17, 서열번호 21, 서열번호: 25, 서열번호: 29 및 서열번호: 33으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩티드.

청구항 2

서열번호: 43 내지 서열번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드들로부터 선택된 모노머를 포함하는 단리된 키메릭 폴리펩티드로서, Xaa는 세린, 티로신, 트레오닌, 알라닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 시스테인, 글루타메이트, 글루타민, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 프롤린, 아르기닌, 발린 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산인 것을 특징으로 하는 단리된 키메릭 폴리펩티드.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

Xaa로 지정된 하나 이상의 아미노산은 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산인 것을 특징으로 하는 단리된 키메릭 폴리펩티드.

청구항 4

a) 서열번호: 38의 아미노산 잔기들 199 내지 210에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 38의 아미노산 잔기 202 또는 204에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

b) 서열번호: 38의 아미노산 잔기들 198 내지 217에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 38의 아미노산 잔기 202 또는 204에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

c) 서열번호: 38의 아미노산 잔기들 187 내지 211에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 38의 아미노산 잔기 202 또는 204에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

d) 서열번호: 38의 아미노산 잔기들 191 내지 211에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 38의 아미노산 잔기 202 또는 204에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

e) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 170 내지 194에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

f) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 174 내지 198에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

g) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 176 내지 197에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

h) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 179 내지 193에 대응되는 아미노산 잔기들을 포함하는 웨პ티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산 잔기로 돌연변이된 웨პ티드;

로부터 선택되는 웨პ티드 중 하나 이상의 복사물을 포함하는 것을 특징으로 하는 MEK의 폴리웨პ티드 억제자.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 세포이하의 국소화 신호(subcellular localization signal), 리포터 또는 애피토프 태그에 연결된 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩티드.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 폴리펩티드를 인코딩하는 것을 특징으로 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제 10 항에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 12

제 11 항의 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 숙주 세포.

청구항 13

제 11 항의 벡터를 숙주 세포 안으로 트랜스펙션시키는 단계; 및

폴리펩티드의 하나 이상의 복사물을 생성하기에 적합한 조건하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계
를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포에서의 MEK를 억제하는 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 제1 제한 엔도뉴클레아제에 의하여 절단될 수 있는 서열에 의하여 하나의 말단 상에서 플랭킹되며(flanked), 상기 폴리뉴클레오티드는 제2 제한 엔도뉴클레아제에 의하여 절단될 수 있는 서열에 의하여 다른 말단 상에서 플랭킹되며, 상기 제1 및 제2 제한 엔도뉴클레아제들은 양립가능하지 않은 부착 말단들 (noncompatible cohesive ends)을 생성하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 NgoM IV 제한 엔도뉴클리아제 부위에 의하여 하나의 말단 상에서 플랭킹되며, 상기 폴리뉴클레오티드는 Xma I 제한 엔도뉴클리아제 부위 및 Cla I 제한 엔도뉴클리아제 부위에 의하여 다른 말단 상에서 플랭킹되는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 발명자는 David R. Bachinsky, Jonathan Carson, Amy Atzel, Thomas D. Reed이다.

[0002] 본 발명은 포유류 키나아제 리간드, 기질 및 조절인자(modulator)에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 폴리펩티드, 폴리펩티드 조성물, 및 MEK의 리간드, 기질 및/또는 조절인자인 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 MEK 활성을 조절하는 호모폴리리간드(homopolyligands) 또는 혼테로 폴리리간드(heteropolyligands)인 폴리리간드(polyligand)에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 세포이하의 영역(subcellular region)에 위치된(localized) 리간드 및 폴리리간드에 관한 것이다.

[0003] 본 출원은 미국 출원번호 제10/724,532호(현재 미국 특허 제7,071,295호), 제10/682,764호(US2004/0185556, PCT/US2004/013517, WO2005/040336), 제11/233,246호 및 US20040572011P(WO2005116231)에 관련된 대상을 갖는다. 이러한 특허 및 출원 각각은 본원에서 참고로 인용된다.

배경 기술

[0004] 키나아제는 분자에 포스페이트(phosphate)의 첨가를 촉진하는 효소이다. 키나아제에 의한 포스페이트의 첨가를 인산화라고 한다. 키나아제 기질이 단백질 분자인 경우, 혼히 인산화되는 아미노산은 세린, 트레오닌 및 티로

신이다. 포스파타아제(phosphatase)는 분자로부터 포스페이트를 제거하는 효소이다. 포스페이트를 제거하는 것을 탈인산화라고 한다. 키나아제 및 포스파타아제는 세포 신호 및 세포 조절 메커니즘을 전달하고, 약하게 하거나, 조절하기 위해 세포 내에서 서로 경쟁한다. 키나아제 및 포스파타아제는 오버랩(overlap)되고 독특한 친연 기질 둘 모두를 갖는다. 키나아제, 포스파타아제 및 이들의 친연 기질에 의해 조절되는 세포 신호 및 조절 메커니즘은 연구 도구 설계 및 약물 설계의 목표이다.

[0005] MAP/ERK 키나아제 1, MEK1, PRKM1, MAPKK1, MAP2K1, MKK1은 MEK1으로 알려진 동일한 효소이다. MAP/ERK 키나아제 2, MEK2, PRKM2, MAPKK2, MAP2K2, MKK2는 MEK2로 알려진 동일한 효소이다. MEK1 및 MEK2는 단백질 또는 웨티드 기질에서 세린, 트레오닌 및 티로신 잔기를 인산화시킬 수 있다. 현재까지, MEK 동형(isoform)의 세포 기질로 확인된 것은 거의 없다. 개개의 기질 또는 리간드가 확인되고 연구된 반면에, MEK 동형 활성을 조절하는 폴리리간드로서 서로 연결된(linked) 혼합 리간드는 본 발명 이전에는 예시된 바가 없다.

[0006] 칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나아제를 조절하고 심근소포체(cardiac sarco(endo)plasmic reticulum)에 위치되는 폴리웨티드 리간드를 설계하고 합성하는 것은 문헌[Ji 등(J Biol Chem (2003) 278:25063-71)]에 개시되었다. Ji 등은, 포스포람반(phospholamban)으로부터 유래된 근소포체(sarcoplasmic reticulum) 위치 신호를 폴리웨티드 리간드와 융합함으로써, 칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나아제 억제 폴리웨티드 리간드를 근소포체로 위치시키는 발현 구조체를 생성하여 이를 달성하였다. 또한, 미국 특허 제7,071,295를 참조한다.

발명의 상세한 설명

[0007] 서열번호: 1 내지 서열번호: 36은 예시적인 폴리리간드 및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0008] 구체적으로, 서열번호: 1의 MEK 폴리리간드는 서열번호: 2, 서열번호: 3 및 서열번호: 4에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 3 및 서열번호: 4는 모듈 클로닝법(modular cloning methods)에 적용할 수 있는 다른 플랭킹(flanking) 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 1은 A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드의 일 실시예이고, A는 서열번호: 41, B는 서열번호: 42, C는 서열번호: 49 그리고 D는 서열번호: 43이며, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이며, S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서(spacer)이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3는 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 또한, A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4D에 일반적으로 도시되어 있는 헤테로폴리리간드라 한다.

[0009] 서열번호: 5는 X-S1-X-S2-Y-S3-Z 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, X는 서열번호: 44, Y는 서열번호: 42, Z는 서열번호: 43이며, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이며, 그리고 S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 서열번호: 5의 MEK 폴리리간드는 서열번호: 6, 서열번호: 7 및 서열번호: 8에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 7 및 서열번호: 8은 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. X-S1-X-S2-Y-S3-Z 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4E에 일반적으로 도시되어 있는 헤테로폴리리간드라고도 한다.

[0010] 서열번호: 9는 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 11 및 서열번호: 12는 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위들을 포함한다. 서열번호: 1은 A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, A는 서열번호: 41, B는 서열번호: 42, C는 서열번호: 49 및 D는 서열번호: 43이며, Xaa는 세린, 트레오닌 또는 티로신이며, S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3는 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 또한, A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4D에 일반적으로 도시되어 있는 헤�테로폴리리간드라고도 불린다.

[0011] 서열번호: 13은 X-S1-X-S2-Y-S3-Z 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, X는 서열번호: 44, Y는 서열번호: 42, Z는 서열번호: 43이며, Xaa는 세린, 트레오닌 또는 10 티로신이며, 그리고 S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 서열번호: 13의 MEK 폴리리간드는 서열번호: 14, 서열번호: 15 및 서열번호: 16에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 15 및 16은 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 또한, X-S1-X-S2-Y-S3-Z 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4E에 일반적으로 도시되어 있는 헤�테로폴리리간드라고도 한다.

[0012] 서열번호: 17은 서열번호: 18, 서열번호: 19 및 서열번호: 20에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡-

터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 19 및 서열번호: 20은 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 17은 A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, A는 서열번호: 51, B는 서열번호: 43, C는 서열번호: 42 및 D는 서열번호: 44이며, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이며, S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3는 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 또한, A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4D에 일반적으로 도시되어 있는 헤테로폴리리간드라고도 한다.

[0013] 서열번호: 21은 서열번호: 22, 서열번호: 23 및 서열번호: 24에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 23 및 서열번호: 24는 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 21은 A-S1-A-S2-A 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, A는 서열번호: 45이며, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이며, S1은 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이며, S2는 아미노산 서열 PAGGA의 스페이서이며, 그리고 S3는 아미노산 서열 PGAAG의 스페이서이다. 또한, A-S1-A-S2-A 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 2D에 일반적으로 도시되어 있는 호모폴리리간드라고도 한다.

[0014] 서열번호: 25는 서열번호: 26, 서열번호: 27 및 서열번호: 28에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 27 및 서열번호: 28은 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 25는 모노머릭(monomeric) 리간드의 일 실시예로서, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이다.

[0015] 서열번호: 29는 서열번호: 30, 서열번호: 31 및 서열번호: 32에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 31 및 서열번호: 32는 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 29는 모노머릭 리간드의 일 실시예로서, Xaa는 알라닌이다.

[0016] 서열번호: 33은 서열번호: 34, 서열번호: 35 및 서열번호: 36에 의하여 인코딩되며, 코돈은 포유류 발현 및 벡터 삽입을 위해 최적화되었고, 서열번호: 35 및 서열번호: 36은 모듈 클로닝법에 적용할 수 있는 다른 플랭킹 제한 부위를 포함한다. 서열번호: 33은 A-S4-B-S5-A-S4-B 구조인 폴리리간드의 일 실시예로서, A는 서열번호: 48, B는 서열번호: 50이며, Xaa는 알라닌이며, S4는 아미노산 서열 RRPAAA의 스페이서이며, 그리고 S5는 아미노산 서열 PGGG의 스페이서이다. 또한, A-S4B-S5-A-S4-B 구조인 폴리리간드는 본원에서 도 4C에 일반적으로 도시되어 있는 헤�테로폴리리간드라고도 불린다.

[0017] 서열번호: 37 내지 서열번호: 40은 전장(full length) MEK 단백질 기질 또는 억제자이다. MEK는 자가인산화(autophosphorylation)를 거치기 때문에, MEK는 기질로 포함된다. 이러한 서열은 하기와 같은 공중의 데이터베이스 등록 번호(public database accession numbers)를 갖는다: NP_002746, NP_002737, XP_055766, NP_002736, NP_001744. 이러한 등록 번호로 표시되는 각각의 서열은 본원에서 참고로 인용된다. 서열번호: 37 내지 서열번호: 40에서, MEK에 의하여 인산화가능한 아미노산(들)의 위치는 Xaa로 표시된다. 야생형(wild-type) 단백질에서, Xaa는 세린, 트레오닌 또는 티로신이다. 본 발명의 리간드에서, Xaa는 임의의 아미노산이다.

[0018] 서열번호: 41 내지 서열번호: 48은 서열번호: 37 내지 서열번호: 39의 부분 서열이고, 이는 키나아제 활성 부위 차단제(blocker) 웨პ티드 리간드 서열을 포함하는 서열의 예를 나타내고, 천연 폴리웨პ티드에서 MEK 인산화가능 세린, 티로신 또는 트레오닌의 위치는 Xaa로 지정되어 있다.

[0019] 서열번호: 49 내지 서열번호: 51은 웨პ티드 키나아제 억제자의 예를 나타내는 서열번호: 38 또는 서열번호: 40의 부분 서열이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 51은 모노머릭 폴리웨პ티드 리간드 서열의 예를 나타낸다.

[0020] Xaa를 포함하는 아미노산 서열은 폴리웨პ티드를 포함하고, Xaa는 임의의 아미노산이다.

[0021] 본 발명은 MEK에 대한 폴리웨პ티드 리간드 및 폴리리간드에 관한 것이다. 본 발명의 일 양태는, 절단(truncation)에 의하여 그리고/또는 아미노산 치환에 의하여, 하나 이상의 천연 기질 또는 억제자를 변형하여 MEK(이하에서, MEK라는 용어는 MEK1 및/또는 MEK2라 함) 30개의 활성의 신규한 모듈 억제자를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 양태는 MEK 억제자, 리간드 또는 폴리리간드를 세포이하의(subcellular) 국소화 신호에 연결하여 세포이하의 국소화 하는 것이다. MEK 리간드 및 폴리리간드의 다양한 실시예는 서열번호: 1 내지 서열번호: 51로 나타내어진다. 더 구체적으로, 본 발명은 서열번호: 41 내지 서열번호: 51 중 임의의 하나 이상을 포함하는 리간드, 호모폴리리간드 및 헤�테로폴리리간드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호: 37 내지 서열번호: 40 또는 이들의 임의의 부분 중 하나 이상의 부분 서열을 포함하는 리간드 및 폴리리간드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호: 41 내지 서열번호: 51 또는 이들의 임의의 부분 중 하나 이상을 포함하는 폴리리간드에 관한 것이다.

리리간트와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 서열 동일성을 갖는 폴리리간트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호: 37 내지 서열번호: 40 중 하나 이상의 부분 서열을 포함하는 폴리리간트와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 서열 동일성을 갖는 폴리리간트에 관한 것이다.

[0022] 호모폴리간트 또는 헤테로폴리리간트일 수 있는 폴리리간트는 둘 이상의 모노머릭 폴리펩티드 리간트로 구성되는 키메릭(chimeric) 리간트이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 키메릭이라는 용어는 2개의 다른 폴리펩티드로부터 또는 동일한 폴리펩티드의 다른 영역으로부터 나온 아미노산 서열을 포함하는 인공적인 혼성(hybrid) 또는 융합 폴리펩티드를 말한다. 모노머릭 리간트의 일 예는 서열번호: 43으로 표시되는 폴리펩티드이고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 43은 야생형 전장 서열번호: 39의 선택된 부분 서열이고, 야생형 서열에서 Xaa에 대응하는 아미노산은 MEK에 의해 인산화가능한 세린, 티로신 또는 트레오닌인이다. 호모폴리간트의 일 예는 서열번호: 43의 다이머(dimer) 또는 멀티머(multimer)를 포함하는 폴리펩티드이고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 헤테로폴리리간트의 일 예는 서열번호: 51과 서열번호: 41 내지 서열번호: 50 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드이고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 51을 호모폴리머릭 리간트 또는 헤테로폴리머릭 리간트로 조합하는 방법에는 수많은 방법들이 있다. 또한, 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 다른 부분 서열과 이를 각각을 조합하고, 서열번호: 41 내지 서열번호: 51과 조합하여 폴리머릭 리간트를 만드는 방법에는 수많은 방법들이 있다.

[0023] 본 발명의 폴리리간트는 모노머(monomers)의 앞, 뒤 또는 사이에 스페이서 아미노산을 선택적으로 포함한다. 서열번호: 1은 A-S1-B-S2-C-S3-D 구조인 폴리리간트의 일 실시예로서, A는 서열번호: 41, B는 서열번호: 42, C는 서열번호: 49, 그리고 D는 서열번호: 43이며, Xaa는 알라닌 또는 페닐알라닌이며, 그리고 S1, S2 및 S3는 스페이서이다. 본 발명은 상기 또는 하기에 주어진 실시예들에 한정되지 않고 호모폴리간트 및 헤테로폴리리간트의 모든 조합을 포함하려는 의도이다. 본 설명에서, "리간트(들)"이라는 용어의 사용은 모노머릭 리간트, 폴리머릭 리간트, 호모폴리머릭 리간트 및/또는 헤테로폴리머릭 리간트를 포함한다.

[0024] 모노머릭 리간트는 유형에 따라 분류될 수 있다. 모노머릭 리간트의 일 유형은 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드의 적어도 일 부분이 MEK에 의하여 기질 또는 가성기질(pseudosubstrate)(활성 부위 차단제)로 인식될 수 있는 폴리펩티드이다. 인식가능한 폴리펩티드의 부분은 인식 모티프(motif)라는 용어로 쓰인다. 본 발명에서, 인식 모티프는 천연이거나 합성일 수 있다. 인식 모티프의 예는 당해 기술분야에서 잘 공지되어 있으며, 자연 발생적인 MEK 기질 및 가성기질 모티프(인식 모티프를 포함하는 서열번호: 41 내지 서열번호: 48 및 서열번호: 37 내지 서열번호: 39의 부분 서열)를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 모노머릭 리간트의 다른 유형은 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드의 적어도 일 부분은 MEK 활성 부위 이외의 위치에서 MEK와 결합하고 MEK를 억제할 수 있다.

[0025] 폴리머릭 리간트는 키메라(chimera)를 생성하기 위해 서로 연결된 둘 이상의 모노머릭 리간트를 포함한다.

[0026] 호모폴리머릭 리간트는 폴리머릭 리간트로서, 각각의 모노머릭 리간트는, 인산화가능한 잔기가 하나 이상의 모노머릭 리간트에서 치환되거나 변형될 수 있다는 것을 제외하고는 아미노산 서열에서 동일하다.

[0027] 헤테로폴리머릭 리간트는 폴리머릭 리간트로서, 모노머릭 리간트의 일부는 동일한 아미노산 서열을 갖지 않는다.

[0028] 본 발명의 리간트는 에피토프 태그, 리포터 및/또는 세포의 위치 신호를 제공하는 다른 문자 또는 아미노산에 선택적으로 연결된다. 상기 세포의 위치 신호는 세포의 영역에 상기 리간트를 표적화한다. 상기 에피토프 태그 및/또는 리포터 및/또는 위치 신호는 동일한 문자일 수 있다. 또한, 상기 에피토프 태그 및/또는 리포터 및/또는 위치 신호는 상이한 문자일 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 리간트, 호모폴리간트 및 헤테로폴리리간트를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 핵산은 에피토프 태그, 리포터 및/또는 세포의 위치 신호와 같은 다른 특징들을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하는 다른 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 연결된다. 폴리뉴클레오티드는 제한 엔도뉴클레아제(endonuclease) 부위 및 제한 엔도뉴클레아제 활성에 필요한 다른 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의하여 선택적으로 플랭킹된다. 플랭킹 서열은 벡터 내에서 독특한 클로닝 부위를 선택적으로 제공하며 이후 클로닝의 방향성(directionality)을 선택적으로 제공한다. 또한, 본 발명의 핵산은 벡터 폴리뉴클레오티드로 선택적으로 통합된다. 본 발명의 리간트, 폴리리간트 및 폴리뉴클레오티드는 연구 도구 및/또는 치료제로서 유용성을 갖는다.

실시 예

[0044]

본 발명은 MEK 조절인자인 리간드 및 폴리리간드에 관한 것이다. 본 발명의 일 양태는, 절단에 의하여 그리고/ 또는 아미노산 치환에 의하여 하나 이상의 천연 기질 또는 억제자를 변형함으로써, MEK 활성의 신규한 모노머릭 모듈 억제자 및 키메릭 모듈 억제자를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 양태는 MEK 억제자, 리간드 또는 폴리리간드를 세포이하의 국소화 신호에 연결시켜 세포이하의 국소화 하는 것이다. 리간드 및 폴리리간드의 다양한 실시예는 서열번호: 1 내지 서열번호: 51에 나타내어진다. 폴리리간드는 둘 이상의 모노머릭 폴리펩티드 리간드를 포함하는 키메릭 리간드이다. 모노머릭 리간드의 일 예는 서열번호: 42로 표시되는 폴리펩티드이고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 42는 모체의(parental) 전장 서열번호: 37의 선택된 부분 서열로서, 상기 모체의 서열에서 Xaa에 대응하는 아미노산은 MEK에 의하여 인산화가능한 세린, 티로신 또는 트레오닌이다. 모노머릭 리간드의 다른 예는 서열번호: 49로 표시되는 폴리펩티드이다. 모노머릭 리간드의 다른 예는 서열번호: 46으로 표시되는 폴리펩티드이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 51의 각각은 모노머릭 형태에 있는 개개의 폴리펩티드를 나타내고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 54는 서열번호: 37 내지 서열 번호: 40의 부분 서열의 선택된 예들이지만, 인식 모티프 또는 결합 연계 모티프(binding association motif)를 포함하는 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 다른 부분 서열은 모노머릭 리간드로서 활용될 수도 있다. 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 모노머릭 리간드 부분 서열은 다른 아미노산에 의하여 대체되는 MEK 인산화가능 아미노산을 가질 수 있다. 또한, 모노머릭 리간드 및 폴리리간드는 서열번호: 41 내지 서열번호: 51 중 하나 이상에서 아미노산 서열을 포함하는 리간드와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다. 또한, 모노머릭 리간드 및 폴리머릭리간드는 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 부분 서열과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0045]

호모폴리리간드의 일 예는 서열번호: 50의 다이머 또는 멀티머를 포함하는 폴리펩티드이다. 호모폴리리간드의 다른 예는 서열번호: 51의 다이머 또는 멀티머를 포함하는 폴리펩티드이다. 헤테로폴리리간드의 일 예는 서열 번호: 41과 서열번호: 42 내지 서열번호: 51 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드이고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 51을 호모폴리머릭 리간드 또는 헤테로폴리머릭 리간드로 조합하는 방법에는 수많은 방법들이 있다. 또한, 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 다른 부분 서열과 이들의 각각 및 서열번호: 41 내지 서열번호: 51을 조합하여, 폴리머릭 리간드를 만드는 방법에는 수많은 방법들이 있다. 폴리리간드는 서열번호: 41 내지 서열번호: 51 중 임의의 둘 이상을 포함할 수 있고, Xaa는 임의의 아미노산이다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 51은 서열번호: 37 내지 서열번호: 40의 부분 서열의 선택된 예들이지만, 야생형 또는 돌연변이된 다른 부분 서열이 폴리리간드를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 당해 발명은 이에 한정되지 않고 호모폴리리간드 및 헤테로폴리리간드의 가능한 모든 조합들에 관한 것이다.

[0046]

서열번호: 41 내지 서열번호: 48은 MEK에 의하여 인산화가능한 적어도 하나의 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 단백질을 나타내며, 그 위치들은 Xaa로 표시된다. MEK가 자가인산화하기 때문에, MEK 자체는 기질로서 포함된다. 서열번호: 41 내지 서열번호: 48은 서열번호: 37 내지 서열번호: 39의 부분 서열이고, MEK 인산화가능한 잔기의 위치는 Xaa로 표시된다. 일반적으로, 자연상태에서 Xaa는 세린, 티로신 또는 트레오닌을 나타낸다. 당해 발명의 일 실시예에서, Xaa는 임의의 아미노산일 수 있다. Xaa가 세린, 티로신 또는 트레오닌인 리간드는 폴리리간드의 일부로 사용될 수 있지만, 일 실시예에서, 적어도 하나의 인산화가능한 세린, 티로신 또는 트레오닌은 다른 아미노산(예를 들어, 알라닌, 아스파르테이트(aspartate), 아스파라긴(asparagine), 시스테인(cysteine), 글루타메이트(glutamate), 글루타민(glutamine), 페닐알라닌, 글리신(glycine), 히스티딘(histidine), 이소류신(isoleucine), 류신(leucine), 라이신(lysine), 메티오닌(methionine), 프롤린(proline), 아르기닌(arginine), 발린(valine)) 또는 트립토판(tryptophan)을 포함하는 자연발생적인 아미노산 중 하나임)으로 대체된다. 또한, Xaa는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산일 수 있다. 다른 실시예에서, MEK 인산화가능한 잔기(들)은 알라닌으로 대체된다. 다른 실시예에서, MEK 인산화가능한 잔기(들)은 페닐알라닌으로 대체된다. 본 발명의 리간드 및 폴리리간드는 MEK의 내생적인(endogenous) 효과를 조절하도록 설계되어 있다.

[0047]

일반적으로, 천연 MEK 기질에 기반한 리간드 모노머는 MEK 기질에서 추정적인 MEK 인산화 인식 모티프를 확인함으로써 구축된다. 때때로, 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산에 상기 인산화가능한 잔기를 변형하는 것은 바람직하다. 다른 모노머는 MEK 인식 모티프뿐만 아니라 MEK 인식 모티프의 어느 하나의 면상에 인접하고 연속된 아미노산을 포함한다. 그러므로, 모노머릭 리간드는 상기 모노머가 MEK 인식 모티프를 포함하면 임의의 길이일 수 있다. 예를 들어, 상기 모노머는 MEK 인식 모티프 및 상기 인식 모티프에 인접한 적어도 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
내지 100개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0048] 예를 들어, 일 실시예에서, 본 발명은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 웨티드의 적어도 하나의 복사물(copy)을 포함하는 MEK의 폴리웨티드 억제자를 포함한다:

[0049] a) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 165 내지 203에 대응되는 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드와 적어도 80% 동일한 웨티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 및/또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산인 웨티드;

[0050] b) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 169 내지 200에 대응되는 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드와 적어도 80% 동일한 웨티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 및/또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산인 웨티드;

[0051] c) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 174 내지 196에 대응되는 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드와 적어도 80% 동일한 웨티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 및/또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산인 웨티드; 및

[0052] d) 서열번호: 39의 아미노산 잔기들 179 내지 194에 대응되는 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드와 적어도 80% 동일한 웨티드로서, 서열번호: 39의 아미노산 잔기 185 및/또는 187에 대응되는 아미노산 잔기가 세린, 티로신 또는 트레오닌 이외의 아미노산인 웨티드.

[0053] 본원에서 사용된 바와 같이, "대응한다" 및 "대응되는"이라는 용어들은, 이들이 서열 정렬에 관련된 바와 같이, 예컨대 ERK1(서열번호: 38)과 같이 기준 단백질(reference protein) 내에서 열거된 위치 및 상기 기준 단백질 상의 위치와 정렬하는 그러한 위치를 의미하는 것이다. 따라서, 대상 웨티드의 25개 아미노산 서열이 예컨대, 서열번호: 38과 같은 기준 웨티드의 아미노산 서열과 정렬되는 경우, 상기 대상 웨티드 서열에 있어서, 상기 기준 웨티드 서열의 특정한 열거된 위치에 "대응되는" 아미노산은 상기 기준 웨티드 서열의 위치와 정렬하지만, 상기 기준 서열의 정확한 수치적 위치에 있을 필요는 없는 아미노산이다. 서열들 사이에서 대응되는 아미노산을 결정하는 서열을 정렬하는 방법은 하기에서 설명되어 있다.

[0054] 본 발명의 다른 실시예는 서열번호: 37 내지 서열번호: 39로 확인된 기질들과 같이, MEK에 대한 임의의 추정 또는 실제 기질에 기반한 모노머(상술한 바와 같음)를 포함한다. 또한, 상기 기질이 하나 이상의 인식 모티프를 갖는다면, 하나 이상의 모노머가 그 가운데에서 확인될 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 실시예는 리간드 웨티드의 하나 이상의 복사물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자이다.

[0056] 본 발명의 다른 실시예는 단리된 폴리웨티드 호모폴리리간드로서, 상기 호모폴리리간드는 MEK 활성을 조절한다.

[0057] 본 발명의 다른 실시예는 단리된 폴리웨티드 혼테로폴리리간드로서, 상기 혼테로폴리리간드는 MEK 활성을 조절한다.

[0058] 본 발명의 다른 실시예는 핵산 분자로서, 폴리뉴클레오티드 서열 15는 하나 이상의 웨티드 리간드의 하나 이상의 복사물들을 인코딩한다.

[0059] 본 발명의 다른 실시예는 핵산 분자로서, 폴리뉴클레오티드 서열은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 복수개의 웨티드복사물을 인코딩한다.

[0060] 본 발명의 다른 실시예는 리간드 또는 폴리리간드의 하나 이상의 복사물을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터이다.

[0061] 본 발명의 다른 실시예는 리간드 또는 폴리리간드의 하나 이상의 복사물을 인코딩하는 25개 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포(host cell)이다.

[0062] 본 발명의 다른 실시예는, 리간드 또는 폴리리간드의 하나 이상의 복사물을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 숙주 세포로 트랜스펙션시키는(transfect) 단계 및 상기 리간드 또는 폴리리간드의 하나 이상의 복사물을 생산하는데 적합한 조건하에서 상기 트랜스펙션된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포에서 MEK를 억제하는 방법이다.

[0063] 또한, 본 발명은 기준 억제자와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 변형된 억제자

에 관한 것이다. "변형된 억제자"는, 억제자 단백질 또는 폴리펩티드의 1차 구조(아미노산 서열)에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의하여 생성될 수 있는 웨프티드를 의미하는데 사용된다. "변형된 인식 모티프"는 상기 모티프의 1차 구조(아미노산 서열)에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환에 의하여 변형된 자연발생적인 MEK 인식 모티프이다. 예를 들어, 변형된 MEK 인식 모티프는 인산화 가능한 아미노산이 인산화 가능하지 않은(non-phosphorylatable) 아미노산으로 변형되는 모티프일 수 있다. "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"라는 용어들은 본원에서 서로 혼용되어 사용된다. 기준 억제자는 야생형 단백질이거나 그의 부분 일 필요는 없다. 따라서, 기준 억제자는 단백질 또는 웨프티드로서, 그 서열이 야생형 단백질 상에서 이전에 변형된 단백질 또는 웨프티드일 수 있다. 기준 억제자는 특정한 유기체로부터 유래한 야생형 단백질이거나 그렇지 않을 수 있다.

[0064] 예를 들어, 기준 아미노산 서열과 적어도 약 95% "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열이 기준 웨프티드를 인코딩하는 기준 아미노산 서열의 각 100개의 아미노산 당 최대 약 5개의 변형(modifications)을 포함할 수 있다는 것을 제외하고는, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열이 상기 기준 서열과 동일하다는 것을 의미한다는 것으로 이해하여야 한다. 달리 말하면, 기준 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 웨프티드를 얻기 위하여, 상기 기준 서열의 아미노산 서열의 최대 약 5%까지는 결실되거나 다른 아미노산으로 치환될 수 있거나, 상기 기준 서열에 있는 전체 아미노산 중 최대 약 5%까지의 아미노산이 상기 기준 서열로 삽입될 수 있다. 상기 기준 서열의 이러한 변형은, 상기 기준 서열에 있는 아미노산들 사이에 개별적으로 또는 상기 기준 서열 내에서 하나 이상의 연속적인 군들에 산재되어 있는, 기준 아미노산 서열의 N-말단에서 또는 C-말단에서거나, 또는 그러한 말단 위치들 사이의 어딘가에서 발생할 수 있다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, "동일성"은 기준 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 비교하여 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열이 동일하다는 것을 나타내는 척도이다. 일반적으로, 상기 서열은 가장 최대의 순서 매치(order match)를 얻을 수 있도록 정렬된다. "동일성" 그 자체는 기술-인식된(art-recognized) 의미를 갖고, 공개된 기술을 이용하여 계산될 수 있다(예컨대, 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988)]; 문헌[Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993)]; 문헌[Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994)]; 문헌[von Heijne, G., Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press (1987)]; 및 문헌[Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York (1991)]을 참조함). 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열들 사이에 동일성을 측정하는 방법은 여러 방법들이 있지만, "동일성"이라는 용어는 당업자에게 공지되어 있다(문헌[Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)]). 2개의 서열들 사이의 동일성 또는 유사성을 측정하는데 흔히 채용되는 방법은 문헌[Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994)] 및 문헌[Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)]에 개시된 방법을 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 또한, 컴퓨터 프로그램은 동일성 및 유사성을 계산하는 방법 및 알고리즘을 포함할 수 있다. 2개의 서열들 사이에서의 동일성 및 유사성을 측정하는 컴퓨터 프로그램 방법의 예는 GCG 프로그램 패키지(문헌[Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(i):387 (1984)]), BLASTP, ExPASy, BLASTIN, FASTA (문헌[Atschul, S. F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990)]) 및 FASTDB를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다. 동일성 및 유사성을 측정하는 방법의 예는 참고로 인용된 문헌[Michaels, G. and Garian, R., Current Protocols in Protein Science, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc. (2000)]에서 논의된다. 본 발명의 일 실시예에서, 둘 이상의 폴리펩티드들 사이에서의 동일성을 측정하는데 사용된 알고리즘은 BLASTP이다.

[0066] 본 발명의 다른 실시예에서, 둘 이상의 폴리펩티드들 사이에서의 동일성을 측정하는데 사용된 알고리즘은 Brutlag 등의 알고리즘(문헌[Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)], 참고로 인용됨)에 기반한 FASTDB이다. FASTDB 서열 정렬에서, 검색을 원하는 서열(query sequence) 및 대상 서열(subject sequence)은 아미노산 서열이다. 서열 정렬의 결과는 퍼센트로 표현되는 동일성이다. 퍼센트 동일성을 계산하기 위해 아미노산 서열의 FASTDB에서 사용될 수 있는 매개변수는 매트릭스(Matrix)=PAM, k-튜플(k-tuple)=2, 미스매치 폐널티(Mismatch Penalty)=1, 결합 폐널티(Joining Penalty)=20, 무작위화 그룹 길이(Randomization Group Length)=0, 컷오프 스코어(Cutoff Score)=1, 갭 폐널티(Gap Penalty)=5, 갭 크기 폐널티(Gap Size Penalty) 0.05, 윈도우 크기(Window Size)=500 또는 길이가 더 짧은 대상 아미노 서열의 길이를 포함하지만, 여기에 한정되지는 않는다.

[0067] 만약 대상 서열이 내부 부가 또는 결실이 아닌 N-말단 또는 C-말단의 부가 또는 결실로 인하여 검색을 원하는 서열보다 더 짧거나 더 길다면, 상기 FASTDB 프로그램은 퍼센트 동일성을 계산하는 경우, 상기 대상 서열의 N-

말단 및 C-말단의 절단 또는 부가를 설명하지 않기 때문에 수동으로 보정을 할 수 있다. 겹색을 원하는 서열과 비교하여 양쪽 끝이 절단된 대상 서열에 대하여, 퍼센트 동일성은 기준 서열에 매치/정렬되지 않은 N-말단 및 C-말단인 겹색을 원하는 서열의 아미노산의 숫자를 계산함으로써, 겹색을 원하는 서열의 전체 아미노산의 퍼센트로 보정된다. 상기 FASTDB 서열 정렬의 결과는 매치/정렬을 측정한다. 이후에, 정렬 퍼센티지는 상기에서 언급된 매개변수를 이용하는 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 퍼센트 동일성으로부터 차감되어 최종적인 퍼센트 동일성 스코어에 이르게 된다. 이렇게 보정된 스코어는 퍼센티지 동일성뿐만 아니라 정렬이 각각에 대하여 어떻게 "대응되는지"를 결정할 목적으로 사용될 수 있다. 기준 서열 또는 대상 서열의 N-말단 또는 C-말단을 넘어서는 각각의 겹색을 원하는(대상) 서열 또는 기준 서열의 잔기는, 퍼센트 동일성 스코어를 수동으로 조정할 목적을 위한 것으로 간주될 수 있다. 즉, 비교 서열의 N-말단 또는 C-말단과 매치/정렬되지 않는 잔기는 퍼센트 동일성 스코어 또는 정렬 넘버링(numbering)을 수동으로 조정하는 경우에 계산될 수 있다.

[0068] 예를 들어, 90개의 아미노산 잔기의 대상 서열은 퍼센트 동일성을 측정하기 위하여 100개의 잔기의 기준 서열과 정렬된다. 결실은 대상 서열의 N-말단에서 발생하므로, FASTDB 정렬은 N-말단에서 최초 10개의 잔기의 매치/정렬을 나타내지 않는다. 쌍을 이루지 않은 10개의 잔기는 상기 서열의 10%(N-말단 및 C-말단에서 매치되지 않은 잔기의 수/겹색을 원하는 서열에서 잔기의 총수)를 나타내므로, FASTDB 프로그램에서 계산된 퍼센트 동일성 스코어로부터 10%가 차감된다. 만약 나머지 90개의 잔기들이 완벽히 매치된다면, 최종 퍼센트 동일성은 90%가 될 것이다. 다른 실시예에서, 90개의 잔기의 대상 서열은 100개의 잔기의 기준 서열과 비교된다. 이때, 결실은 내부 결실이므로 겹색을 원하는 서열과 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 N-말단 또는 C-말단에서의 잔기는 존재하지 않는다.

[0069] 이 같은 경우, FASTDB로 계산된 퍼센트 동일성은 수동으로 보정되지 않는다.

[0070] 본 발명의 폴리리간드는 모노머의 앞, 뒤 또는 그 사이에 스페이서 아미노산을 선택적으로 포함한다. 상기 스페이서의 길이 및 조성은 변할 수 있다. 스페이서의 일 예는 글리신, 알라닌, 폴리글리신 또는 폴리알라닌이다. 서열번호: 1에서의 모노머들 사이에 사용된 스페이서의 구체적인 예는 5개의 아미노산 스페이서인 PGAAG 및 PAGGA이다. 서열번호: 1의 경우, 프롤린-함유 스페이서는 2차 구조를 파악시키는 의도이다. 스페이서 아미노산은 임의의 아미노산일 수 있으며, 이러한 알라닌, 글리신 및 프롤린-함유 예들에 한정되지 않는다. 당해 발명은 스페이서가 존재하거나 존재하지 않는 호모폴리리간드 및 헤테로폴리리간드의 모든 조합들에 관한 것이며, 상기 또는 하기에 주어진 예들에 한정되지 않는다.

[0071] 본 발명의 리간드 및 폴리리간드는 에피토프 태그, 리포터를 제공하거나, 그리고/또는 상기 리간드를 세포의 한 영역으로 위치시키는 다른 문자 또는 아미노산에 선택적으로 연결된다(도 5a 내지 5g, 도 6a 내지 6g, 도 7a 내지 7g 및 도 8a 내지 8g 참조).

[0072] 에피토프 태그의 제한이 없는 예들은 FLAGTM, HA(헤마글루티닌), c-Myc 및 His6이다. 리포터의 제한이 없는 예들은 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 갈락토시다아제, 페옥시다아제(peroxidase), 루시페라아제(luciferase) 및 형광 단백질(fluorescent proteins)이다. 세포 위치의 제한이 없는 예들은 근소포체, 소포체(endoplasmic reticulum), 미토콘드리아, 골지체(golgi apparatus), 핵, 원형질막(plasma membrane), 첨단막(apical membrane) 및 측저막(basolateral membrane)이다. 상기 에피토프, 리포터 및 위치 신호는 예로서 주어지며 이에 한정되지 않는다. 상기 에피토프 태그, 리포터 및/또는 위치 신호는 동일한 문자일 수 있다. 또한, 상기 에피토프 태그, 리포터 및/또는 위치 신호는 다른 문자일 수 있다.

[0073] 리간드 및 폴리리간드와 이들로 연결된 선택적인 아미노산은 당해 기술분야에서 공지된 기술을 이용하여 화학적으로 또는 재조합으로 합성될 수 있다. 화학적 합성 기술은 자동화된 웨비드 합성기를 사용하여 종종 수행되는 웨비드 합성을 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다. 또한, 웨비드는 당해 기술분야에서 공지된 자동화되지 않은 웨비드 합성법을 이용하여 합성될 수 있다. 재조합 기술은 리간드-인코딩 핵산의 밸런 베터로의 삽입을 포함하고, 핵산 밸런 생성물이 세포 인자 및 공정을 이용하여 합성된다.

[0074] 세포의 위치 신호, 에피토프 태그 또는 리포터를 리간드 또는 폴리리간드에 연결하는 것은 상기 리간드로의 공유 연결 또는 효소 연결을 포함할 수 있다. 상기 위치 신호가 지질 또는 탄수화물과 같은 폴리펩티드 이외의 물질을 포함하는 경우, 문자를 연결하는 화학 반응이 이용될 수 있다.

[0075] 또한, 비-표준(non-standard) 아미노산 및 지질, 탄수화물, 포스페이트 또는 다른 문자로 변형된 아미노산은 웨비드 합성에 대한 전구체로서 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 리간드는 위치 신호가 있거나 위치 신호가 없는 치료적 유용성을 갖는다. 그러나, 위치 신호에 연결

된 리간드는 세포이하의 도구 또는 치료제로서의 유용성을 갖는다. 예를 들어, 도 7a 내지 7g에 일반적으로 도시되어 있는 25개의 리간드들은 세포이하의 도구 또는 치료제로서의 유용성을 갖는 리간드를 나타낸다. 또한, MEK 리간드-함유 유전자 구조체는 유전자 요법을 통해 전달된다. 도 10b 및 10c는 생체내에서 폴리펩티드 발현을 전달하고 제어하는 유전자 요법 벡터의 실시예를 설명한다. 도 10b 및 10c의 유전자 구조체에 연결된 폴리뉴클레오티드 서열은 도입 유전자(transgene)의 바이러스 계놈 및/또는 숙주 계놈으로의 통합을 촉진하는 계놈 통합 도메인을 포함한다.

[0077] 도 10a는 MEK 리간드 유전자 구조체를 포함하는 벡터를 도시하며, 상기 리간드 유전자 구조체는 유전자 도입된 동물(transgenic animal)을 생성하는데 유용한 단위체로서 상기 벡터로부터 방출될 수 있다. 예를 들어, 상기 리간드 유전자 구조체 또는 도입 유전자는 제한 엔도뉴클레아제 소화(digestion)에 의하여 벡터 골격(vector backbone)으로부터 방출된다. 이후에, 상기 방출된 도입 유전자는 생쥐 수정란의 전핵(pronuclei)으로 주입된다; 또는 상기 도입 유전자는 배아 줄기 세포를 유전자 도입시키는데 사용된다. 또한, 도 10a의 리간드 유전자 구조체를 포함하는 벡터는 상기 도입 유전자의 일시적인 트랜스펙션에 유용하며, 상기 도입 유전자의 프로모터 및 코돈은 숙주 유기체를 위하여 최적화되어 있다. 또한, 도 10a의 리간드 유전자 구조체를 포함하는 벡터는 소규모 또는 대규모 생산에 적합한 발효가능한 유기체에서 폴리펩티드의 재조합 발현에 유용하며, 상기 도입 유전자의 프로모터 및 코돈은 발효 숙주 유기체를 위하여 최적화되어 있다.

[0078] 도 10d는 안정한 세포주를 생성하는데 유용한 MEK 리간드 유전자 구조체를 포함하는 벡터를 도시한다.

[0079] 또한, 본 발명은 리간드, 호모폴리리간드 및 헤테로폴리리간드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 에피토프, 리포터 및/또는 위치 신호를 인코딩하는 다른 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 연결된다. 또한, 본 발명의 핵산은 벡터 폴리뉴클레오티드로 선택적으로 통합된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 제한 엔도뉴클레아제 활성에 필요한 다른 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의하여 선택적으로 플랭킹된다. 상기 플랭킹 서열은 벡터 내에서 클로닝 부위를 선택적으로 제공한다. 제한 부위는 대부분의 상업적으로 구입 가능한 클로닝 벡터에서 흔히 사용되는 부위들 중 임의의 것을 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다. 그러한 부위의 예들은 BamHI, ClalI, EcoRI, EcoRV, SpeI, AfIII, NdeI, NheI, XbaI, XhoI, SphI, NaeI, SexAI, HindIII, HpaI 및 PstI 제한 엔도뉴클레아제에 의하여 인식되는 부위이다. 또한, 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease)를 포함하는 다른 제한 효소에 의해 절단되는 부위(site for cleavage)는 이러한 목적을 위하여 사용된다. 또한, 폴리뉴클레오티드 플랭킹 서열은 부분 서열 클로닝의 방향성을 선택적으로 제공한다. 이중-가닥의(double-stranded) DNA가 클로닝 벡터와 대응되는 상보성 부위로 방향에 맞춰 클로닝될 수 있도록, 5' 및 3' 제한 엔도뉴클레아제 부위가 서로 다른 것이 바람직하다.

[0080] 다르게는, 위치 신호, 에피토프 또는 리포터가 존재하거나 존재하지 않는 리간드 및 폴리리간드는 재조합 기술로 합성된다. 폴리뉴클레오티드 발현 구조체가 원하는 구성요소를 함유하도록 만들어지고 발현 벡터로 삽입된다. 이후에, 상기 발현 벡터는 세포로 트랜스펙션되며 폴리펩티드 생성물이 발현되고 단리된다. 재조합 DNA 기술에 따라 만들어진 리간드는 연구 도구 및/또는 치료제로서 유용성을 갖는다.

[0081] 하기의 사항은 리간드 및 폴리리간드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 생성되는 방식의 일 예이다. 상기 리간드를 인코딩하는 상보적인 올리고뉴클레오티드 및 플랭킹 서열이 합성되고 어닐링(annealing)된다. 상기 결과로 생성된 이중-가닥의 DNA 분자는 당해 기술분야에서 공지된 기술을 이용하여 클로닝 벡터로 삽입된다. 상기 리간드 및 폴리리간드가 단백질 생성물로 번역되는 도입 유전자 구조체 내에서 서열에 인접하여 프레임 내에 위치되는 경우에, 이들은 세포 또는 유전자 도입된 동물에서 발현시에 융합 단백질의 일부를 형성한다.

[0082] 본 발명의 다른 실시예는 원하는 세포 또는 유기체에서 도입 유전자 발현의 선택적 제어에 관한 것이다. 재조합 유전자의 프로모터 부분은 항시발현성 프로모터(constitutive promoter), 비-항시발현성 프로모터(non-constitutive promoter), 조직특이적 프로모터(항시발현성 또는 비-항시발현성) 또는 선택적으로 제어된 프로모터일 수 있다. 다른 선택적으로 제어된 프로모터는 다른 메커니즘에 의해 제어된다. 예를 들어, RheoSwitch[®]은 New England Biolabs로부터 구입할 수 있는 유도성 프로모터 시스템이다.

[0083] 또한, 온도 민감성 프로모터를 사용하여 유전자 발현을 증감시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예는 그 발현이 유도성 프로모터에 의하여 제어되는 리간드 또는 폴리리간드 유전자 구조체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 유도성 프로모터는 테트라사이클린 제어를 할 수 있다(tetracycline controllable).

[0084] 폴리리간드는 자연에서는 모듈성이다. 당해 발명의 일 양태는 개시된 폴리리간드의 조합 모듈성(combinatorial

modularity)이다. 본 발명의 다른 양태는 이러한 모듈성 폴리리간드를 용이하게 그리고 통상적으로 제조하는 방법이다. 이런 점에서, 본 발명의 일 실시예는 유전자 발현 구성요소의 모듈성 부분의 서열 클로닝의 방법을 포함한다. 리간드, 호모폴리리간드, 헤테로폴리리간드 및 선택적인 아미노산 발현 구성요소가 재조합으로 합성되는 경우, 각각의 클론가능한 구성요소를 모듈로 간주할 수 있다. 클로닝의 속도 및 용이성을 위하여, 부착 말단(cohesive end)에서 양립가능하고 삽입하고 순차로 클론하기가 용이한 모듈성 구성요소를 제조하는 것이 바람직하다. 이는 제한 엔도뉴클리아제 부위 인식 및 절단의 친연 특성을 이용하여 수행된다. 본 발명의 일 양태는 상기 모듈의 일 말단에서 제한 효소 소화를 위하여 1회 활용되며 다른 말단에서 제한 효소 소화를 위하여 원하는 횟수만큼 활용되는 모듈 플랭킹 서열을 포함한다. 달리 말하면, 상기 모듈의 일 말단에서 제한 부위가 모듈성 구성요소를 순차적으로 클로닝하는 데에 영향을 주기 위하여 활용되고 과괴된다. 코딩 영역 모듈을 플랭킹하는 제한 부위의 일 예는 제한 효소 *NgoM IV* 및 *Cla I*; 또는 *Xma I* 및 *Cla I*에 의하여 인식되는 서열이다. 제1의 원형 DNA를 *NgoM IV* 및 *Cla I*로 절단하여 5' *NgoM IV* 오버행(overhang) 및 3' *Cla I* 오버행을 갖는 선형 DNA의 생성; 및 제2의 원형 DNA를 *Xma I* 및 *Cla I*로 절단하여 5' *Cla I* 오버행 및 3' *Xma I* 오버행을 갖는 선형 DNA의 생성으로 인하여 양립가능한 부착 말단을 갖는 제1의 및 제2의 DNA 절편들을 발생시킨다. 이러한 제1의 및 제2의 DNA 절편들이 함께 혼합, 어닐링 및 결찰(ligate)되어 제3의 원형 DNA 절편을 형성하는 경우에, 상기 제1의 DNA에 존재하는 *NgoM IV* 부위 및 상기 제2의 DNA에 존재하는 *Xma I* 부위는 상기 제3의 원형 DNA에서 과괴된다. DNA의 이러한 흔적 영역(vestigial region)은 추가적인 *Xma I* 또는 *NgoM IV*에 의한 소화(digestion)로부터 보호되지만, 상기 제3의 원형 DNA에 남아있는 플랭킹 서열은 손상되지 않은 5' *NgoM IV* 및 3' *Cla I* 부위를 여전히 포함한다. 이러한 공정은 수차례 반복되어 방향성이 있고 순차적인 모듈성 클로닝 이벤트(event)를 달성할 수 있다. *NgoM IV*, *Xma I* 및 *Cla I* 엔도뉴클레아제에 의해 인식되는 제한 부위는 플랭킹 서열로 사용되는 경우 순차적인 클로닝을 허용하는 부위의 소정의 군을 나타낸다.

[0085] 코딩 영역 모듈을 방향성 있게 순차적으로 결합시키는 다른 방법은 원형 DNA뿐만 아니라 선형 DNA를 사용한다. 예를 들어, 상술한 순차적인 클로닝 공정과 같이, 코딩 영역 모듈을 플랭킹하는 제한 부위는 제한 효소 *NgoM IV* 및 *Cla I*; 또는 *Xma I* 및 *Cla I*에 의하여 인식되는 서열이다. 제1의 원형 DNA는 *NgoM IV* 및 *Cla I*으로 절단되어 5' *NgoM IV* 오버행 및 3' *Cla I* 오버행을 갖는 선형 DNA를 생성한다. 제2의 선형 이중-가닥의 DNA는 PCR 증폭 또는 상보적인 올리고뉴클레오티드를 합성하고 어닐링하여 생성된다. 상기 제2의 선형 DNA는 선형화된 제1의 DNA를 갖는 양립가능한 부착 말단인 5' *Cla I* 오버행 및 3' *Xma I* 오버행을 갖는다. 이러한 제1의 및 제2의 DNA 절편들이 함께 혼합, 어닐링 및 결찰되어 제3의 원형 DNA 절편을 형성하는 경우에, 상기 제1의 DNA에 존재하는 *NgoM IV* 부위 및 상기 제2의 DNA에 존재하는 *Xma I* 부위는 상기 제3의 원형 DNA에서 과괴된다. 상기 제3의 원형 DNA에 남아있는 플랭킹 서열은 손상되지 않은 5' *NgoM IV* 및 3' *Cla I* 부위를 여전히 포함한다. 이러한 공정은 수차례 반복되어 방향성이 있고, 순차적인 모듈성 클로닝 이벤트를 달성할 수 있다. *NgoM IV*, *Xma I* 및 *Cla I* 엔도뉴클레아제에 의해 인식된 제한 부위는 플랭킹 서열로 사용되는 경우 순차적인 클로닝을 허용하는 부위의 소정의 군을 나타낸다. 이 공정은 도 11에 도시되어 있다.

[0086] 당업자는 다른 제한 부위 군들이 본원에서 설명된 바와 같이 순차적이고, 방향성이 있는 클로닝을 이를 수 있음을 인식한다. 제한 엔도뉴클레아제 선택을 위한 바람직한 기준은, 양립가능한 부착 말단을 생성하나 그 부위들이 서로 결찰할 때에 과괴되는 한 쌍의 엔도뉴클레아제를 선택하는 것이다. 다른 기준은 상기 최초의 두 가지 엔도뉴클레아제 부위 중 어느 하나와 양립가능한 부착 말단을 생성하지 않는 제3의 엔도뉴클레아제 부위를 선택하는 것이다. 그러한 기준이 순차적이고, 방향성이 있는 클로닝을 위한 시스템으로 활용되는 경우에, 리간드, 폴리리간드, 및 다른 코딩 영역 또는 발현 구성요소는 원하는 대로 조합될 수 있다. 동일하고 순차적인 공정이 에피토프, 리포터 및/또는 위치 신호에 대하여 활용될 수 있다.

[0087] 폴리리간드 및 MEK 활성을 조절하는 폴리리간드의 제조 방법이 개시된다. 치료제는 위치 신호를 갖거나 갖지 않는 경제된 리간드 또는 폴리리간드를 세포로 전달하는 것을 포함한다. 다르게는, 위치 신호를 갖거나 갖지 않는 리간드 또는 폴리리간드가 아데노바이러스(adenovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 아데노-연관된 바이러스(adeno-associated virus) 또는 세포에서 단백질 생성물을 발현시키는 다른 바이러스의 구조체를 통하여 전달된다.

[0088] 실시예 1

[0089] 헤테로폴리리간드, 소포체 세포의 위치 신호 및 His6 애피토프를 포함하는 폴리펩티드가 합성된다. 그러한 폴리펩티드의 예들은 도 8a, 8b, 8d, 8e 및 8f에 일반적으로 나타내어 진다. 상기 폴리펩티드는 자동화된 웹티드 합성기 상에서 합성되거나 재조합으로 발현되고 경제된다. 경제된 폴리펩티드는 매질에서 용해되며 세포에 첨가된다. 상기 폴리펩티드는 상기 세포에 의하여 흡수되며 소포체로 전송된다. 항-His6 항체를 사용한 면역조

직화학적 염색에 의하여 검증된다.

[0090] 실시예 2

도입 유전자는 서열번호: 49, 서열번호: 48, 서열번호: 41을 포함하는 융합 단백질의 발현을 지시하도록 거대세포바이러스(CMV) 프로모터를 사용하여 구축되며, Xaa는 알라닌(폴리리간드), 녹색 형광 단백질(리포터) 및 원형 절막 위치 신호(위치 신호)이다. 그러한 도입 유전자는 도 9c에 일반적으로 나타내어 진다. 상기 도입 유전자는 일시적인 발현을 위해 세포로 트랜스펙션된다. 발현 및 위치의 검증은 공초점 현미경법(confocal microscopy)에 의한 녹색 형광 단백질의 영상화로 수행된다.

[0092] 실시예 3

도입 유전자의 구조체를 구축하여, 조직특이적 프로모터에 의하여 추진된 발현을 갖는 단백질 생성물을 생성한다. 상기 도입 유전자는 3가지 도메인을 인코딩하도록 처리된(engineered) 합성의 유전자 발현 단위체를 포함한다. 이러한 3가지 도메인의 각각은 용액에서 어닐링되며, 결찰되고, 벡터로 삽입되는 한 쌍의 상보적 폴리뉴클레오티드로 합성된다. 아미노-말단에서 시작하여, 상기 발현 단위체의 3가지 도메인은 MEK 리간드, FLAG™에피토프 및 핵 위치 신호를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다. 상기 MEK 리간드는 상술한 바와 같이 모노머릭 리간드, 호모폴리머릭 리간드 또는 헤테로폴리머릭 리간드이다. FLAG™에피토프를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 상기 MEK 리간드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 하류(downstream)에 위치된다. 최종적으로, 상기 위치 신호를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 상기 FLAG™에피토프를 인코딩하는 서열의 하류에 위치된다. 이후, 상기 조합된 유전자 발현 단위체는 도 10a에 도시된 바와 같이 발현 벡터로 서브클로닝되며 세포들을 일시적으로 트랜스펙션시키는데 사용된다. 검증은 항-FLAG™ 항체를 사용한 면역조직화학적 염색에 의하여 수행된다.

[0094] 실시예 4

세포이하로 위치된 MEK 폴리리간드에 의한 MEK 세포 기능의 조절이 예시되어 있다. 폴리리간드 융합 단백질, 에피토프 및 소포체 위치 신호를 인코딩하는 핵산을 함유하는 도입 유전자의 구조체가 제조된다. 발현 단위체는 서열번호: 25(폴리리간드), c-Myc 에피토프(에피토프) 및 핵 위치 신호(위치 신호)를 인코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다. 이후에, 이러한 발현 단위체는 EFLalpha 프로모터 및 SV40 폴리아데닐화 신호 사이의 벡터로 서브클로닝된다. 그런 다음, 완성된 도입 유전자 함유 발현 벡터는 세포들을 트랜스펙션시키는데 사용된다. MEK 활성의 억제는 제어에 대항하는 내생적인 기질들의 인산화를 측정하거나 그리고/또는 표현형들을 관찰함으로써 증명된다.

[0095] 실시예 5

리간드 기능 및 위치는 핵으로 표적된 리간드 융합 단백질을 발현하는 생쥐들을 만드는데 사용되는 도입 유전자의 구조체를 제조함으로써 생체내(*in vivo*)에서 증명된다. 상기 도입 유전자의 구조체는 도 10b에 일반적으로 도시되어 있다. 발현 단위체는 서열번호: 33의 테트라머(tetramer), 헤마글루티닌 에피토프(hemagglutinin epitope) 및 핵 위치 신호를 인코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 발현 벡터는, 유도성 프로모터를 포함하는 뉴클레오티드 서열과 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 뉴클레오티드 서열 사이의 벡터로 서브클로닝된다. 그런 다음, 완성된 도입 유전자는 수정된 생쥐 난모세포들의 전핵으로 주입된다. 이로 인해 생성된 새끼들은 PCR에 의한 도입 유전자의 존재 여부에 대하여 스크리닝(screening)된다. 유전자 도입 파운더(transgenic founder) 생쥐들은 야생형 생쥐들과 함께 사육된다. 적어도 제3 세대의 이형접합성 유전자 도입된 동물들(heterozygous transgenic animals)이 하기의 시험들을 위하여 대조군의 역할을 하는 유전자가 도입되지 않은 한배 새끼들(littermates)과 함께 사용된다.

[0096] 시험 1: 복사물의 개수를 측정하기 위해 서던 블로팅(Southern blotting) 분석을 수행한다. 서던 블로팅은 도입 유전자의 절편으로부터 생성된 방사능-표지된 탐침(radio-labeled probe)으로 혼성화된다. 상기 탐침은 유전자 도입된 생쥐들로부터 나온 DNA를 포함하는 벤드들(bands)을 검출하지만, 유전자가 도입되지 않은 생쥐들로부터 나온 DNA를 포함하는 벤드들을 검출하지는 않는다. 상기 유전자 도입된 생쥐 벤드들의 세기를 측정하고 상기 유전자 도입된 플라스미드 대조군 벤드들과 비교하여 복사물의 개수를 추정한다. 이는 실시예 5의 생쥐들이 그 자신의 계놈들에 도입 유전자를 품고 있음을 증명하는 것이다.

[0097] 시험 2: 웨스턴 블로팅 분석을 위해 조직 균질액(tissue homogenate)을 제조한다. 본 시험은, 헤마글루티닌 에피토프가 유전자가 도입되지 않은 균질액에서가 아니라 유전자가 도입된 균질액에서 검출되기 때문에 도입 유전자가

유전자 도입된 생쥐들의 조직에서 발현된다는 것을 증명한다.

[0100] 시험 3: 기능은 표현형 관찰 또는 발현 유도 후의 대조군들에 대한 분석에 의하여 평가된다.

[0101] 이러한 실시예들은 치료적 또는 실험적 목적을 위하여 세포가 위치된 영역에 리간드의 전달을 증명하는 것이다. 정제된 폴리펩티드 리간드는 경구 또는 비경구 투여용, 국소 투여용으로 또는 정제, 캡슐 또는 액체 형태, 비강 또는 흡입 에어로졸, 피하, 근육내, 복강내 또는 다른 주사; 정맥내 점적주입; 또는 임의의 다른 투여 경로로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 리간드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 세포에서 유전자 생성물을 전달하고 발현하도록 설계된 벡터로의 통합을 가능하게 한다. 그러한 벡터는 플라스미드, 코스미드(cosmids), 인공 염색체 및 변형된 바이러스를 포함한다. 진핵 세포로의 전달은 체내 또는 체외에서 수행될 수 있다. 체외 전달 방법은 의도된 수용주의 세포들 또는 기증자 세포들(donor cells)을 분리하고 상기 세포들로 벡터를 전달한 후에, 상기 세포들로 상기 수용주를 치료하는 것을 포함한다.

[0102] 실시예 6

[0103] 융합 단백질들을 베타-갈락토시다아제로 융합된 본 발명의 리간드들로 구축하였다.

[0104] 도 12는 서열번호: 33의 폴리리간드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 12의 벡터에서, 서열번호: 33의 리간드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0105] 도 13은 서열번호: 1의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 2의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 13의 벡터에서, 서열번호: 2의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0106] 도 14는 서열번호: 5의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 6의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 14의 벡터에서, 서열번호: 6의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0107] 도 15는 서열번호: 9의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 10의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 15의 벡터에서, 서열번호: 10의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0108] 도 16은 서열번호: 13의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 14의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 16의 벡터에서, 서열번호: 14의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0109] 도 17은 서열번호: 17의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 18의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 17의 벡터에서, 서열번호: 18의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0110] 도 18은 서열번호: 21의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 22의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 18의 벡터에서, 서열번호: 22의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0111] 도 19는 서열번호: 25의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 26을 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 19의 벡터에서, 서열번호: 26의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0112] 도 20은 서열번호: 25의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 26을 포함하는 다른 벡터를 나타낸다. 도 20의 벡터에서, 서열번호: 26의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0113] 도 21은 서열번호: 29의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 30을 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 21의 벡터에서, 서열번호: 30의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 융합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0114] 도 22는 서열번호: 29의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 30을 포함하는 다른 벡터를 나타낸다. 도 22의 벡터에서, 서열번호: 30의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 융합

단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0115] 도 23은 서열번호: 33의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 34를 포함하는 벡터를 나타낸다. 도 23의 벡터에서, 서열번호: 34의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 용합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0116] 도 24는 서열번호: 33의 리간드를 인코딩하는 서열번호: 34를 포함하는 다른 벡터를 나타낸다. 도 24의 벡터에서, 서열번호: 34의 폴리뉴클레오티드는 베타-갈락토시다아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결되어 리간드 용합 단백질 코딩 서열을 생성한다.

[0117] 도 12 내지 24의 벡터들은 포유류 세포주 HT1080으로 트랜스펙션되었다. 또한, MEK 기질 ERK를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터도 HT1080 세포들에서 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션은 Fugene6 시약-Roche(바젤, 스위스) 사로부터 구입-을 제조 사양에 따라 사용하여 수행되었다. 간단히 말해서, 세포들이 10%의 FBS를 보충한 2 ml의 DMEM에 웰(well) 당 300,000의 밀도로 6-웰 플레이트에 살포되었다. 24시간 이후, 각각의 웰 당 트랜스펙션 복합체들은 1 ug의 플라스미드 DNA를 3 ul의 Fugene6과 혼합하여 제조하였으며, 상기 무 혈청(serum free) DMEM에 용해된 100 ul의 DNA/지질 복합체가 되었다. 복합체를 적절하게 형성하도록 30분간 배양한 후에, 100 ul의 혼합물을 2 ml의 배지에서 성장하는 세포들의 각각의 웰에 첨가하였다. 세포들을 상기 DNA/지질 복합체들에 24시간 동안 노출시켰으며, 이후 RNA 및 단백질 분석을 위해 용해시켰다.

[0118] 도 25는 도 12 내지 도 18 및 도 20, 22 및 24의 벡터들에 의하여 인코딩된 리간드 용합 단백질에 대한 용해질의 단백질 분석 결과를 도시한다. 리간드 용합 단백질은 Roche사로부터 구입한 베타-갈락토시다아제 ELISA 키트(#11539426001)를 키트 프로토콜에 따라 사용하여 정량화시켰다. 수치들은 1개 복제품(replicate)의 수치를 나타내는 VVN-40647을 제외하고는 2개 복제품들의 평균을 나타낸다.

[0119] 리간드 용합 단백질을 포함하는 용해질을 하기의 프로토콜을 이용하여 MEK1 단백질 또는 MEK2 단백질과의 결합의 검출을 위한 단백질 도트-블롯 결합 검사에서 검사하였다:

[0120] 1. 니트로셀룰로스 막을 TBS에 5분 동안 적시고;

[0121] 2. 사진에 적셔진 니트로셀룰로스 막을 도트-블롯 장치로 옮기고, 진공을 가하여 나사들을 조여 장치를 밀봉하고;

[0122] 3. 각각의 웰에 100 μ l의 TBS를 첨가하여 니트로셀룰로스를 다시 수화시키고, 얇게 진공을 가하지만, 상기 웰들을 완전히 건조시키지 않으며;

[0123] 4. 상기 도트-블롯 장치의 유량 밸브/진공 챔버가 공기 중에 개방되어 있음을 확인하고 웰 당 50 ng의 표적 단백질이 최종 검사량이 되도록 MEK1 또는 MEK2 표적 단백질 중 어느 하나의 0.5 ng/ μ l 용액 100 μ l로 웰들을 채우고;

[0124] 5. 남아있는 액체를 진공 여과에 의한 막을 통해 뽑아내기 전에 실온에서 40분 동안 중력류(gravity flow)에 의하여 표적 단백질이 상기 막을 여과하도록 하고;

[0125] 6. 실온에서 1시간 동안 5% 탈지 건조 우유의 300 μ l를 TBS에 첨가하여 웰들을 차단하고;

[0126] 7. 각각의 웰로부터 5% 차단 용액을 조심스럽게 빨아들이고;

[0127] 8. 100 μ l의 TBS를 첨가하여 각각의 웰을 1회 세척하고, 진공 여과에 의하여 상기 막을 통해 상기 TBS를 뽑아내고;

[0128] 9. 웰 당 10 ng의 억제자가 최종 검사량이 되도록하기 위해, MEK1 단백질을 포함하는 하나의 웰 및 MEK2 단백질을 포함하는 하나의 웰에 상기 MEK 억제자 용해질들 각각의 0.1 ng/ μ l 용액의 100 μ l를 첨가하고, 남아있는 용해질을 진공 여과에 의한 상기 막을 통해 뽑아내기 전에 실온에서 40분 동안 MEK 1/2 표적 단백질로 억제자 용해질을 배양하고;

[0129] 10. TBS에 1% SDS의 100 μ l를 첨가하여 각각의 웰을 세척하고, 진공 여과에 의한 상기 막을 통해 TBS에서 상기 1%의 SDS를 뽑아내고, 이 세척 단계를 2회 더 반복하여 세척을 총 3회 실시하고;

[0130] 11. 진공을 가하고 (상기 장치로부터 제거한 후에 막이 재정렬될 수 있도록) 펜 또는 연필로 상기 막을 표기하고;

- [0131] 12. 진공을 끄고 상기 장치로부터 상기 막을 제거하고;
- [0132] 13. 막을 페트리 접시(또는 그와 동등한 용기)에 넣고 살며시 교반하면서 TBS에 있는 1%의 SDS로 세척하고(TBS에 있는 1%의 SDS를 충분히 첨가하여 막 전체를 덮도록 함), 이 세척 단계를 4회 더 반복하여 세척을 총 5회 실시하며;
- [0133] 14. (단계 13에 기술된 바와 같이) TBS에서 막을 1회 세척하여 상기 막으로부터 여분의 SDS 세제를 제거하고;
- [0134] 15. 막을 단계 2에 기술된 도트-블롯 장치로 되돌려 놓고;
- [0135] 16. 100 μl 의 베타-Glo 베타-갈락토시다아제 기질을 각각의 웰에 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양하고;
- [0136] 17. 베타-Glo 기질을 상기 막을 통해 진공 여과시키고, 상기 장치로부터 상기 막을 제거하고 화학발광 검출을 위해 설치된 FluorChem 영상기에서 15분 동안 상기 막을 노출시킴.
- [0137] 본 검사에 사용된 요소들은 다음과 같다:
- [0138] 1. 도트-블롯 장치(Bio-Rad 또는 그 동등품);
- [0139] 2. 트리스(Tris)(Sigma, #252859 또는 그 동등품);
- [0140] 3. SDS(ICN #811034 또는 그 동등품);
- [0141] 4. NaCl(EMD #7647-14-5 또는 그 동등품);
- [0142] 5. 베타-Glo 검사 키트(Promega #E4740);
- [0143] 6. Mek1(세포 신호전달(Cell Signaling) #M02-10G-10 또는 그 동등품);
- [0144] 7. Mek2(세포 신호전달 #M03-10G-10 또는 그 동등품);
- [0145] 8. FluorChem 영상기(Alpha Innotech 또는 그 동등품).
- [0146] 그런 다음, 하기의 프로토콜을 이용하여 영상 데이터가 정량화되었다:
- [0147] 1. 응용 소프트웨어 ImageJ에서 도트 블롯 영상을 열고;
- [0148] 2. 직사각형 선택 도구를 사용하여 첫번째 줄을 개략적으로 그리고;
- [0149] 3. 스페셜 메뉴에 있는 첫째 줄 표기(Mark First Lane)를 선택하고;
- [0150] 4. (그 내부를 클릭하고 드래그하여) 상기 직사각형 선택을 이동시켜 (다음줄 표기)(Mark Next Lane)를 사용하여 다른 줄들 각각을 연속으로 개략적으로 그리고;
- [0151] 5. 플롯 레인들(Plot Lanes)을 사용하여 레인 프로파일(lane profile)을 플롯하고;
- [0152] 6. 줄 그리기 도구를 사용하여 기준 선들을 그리고 선들을 드롭하여(drop lines) 상기에 도시된 바와 같이 각각의 피크가 폐쇄 영역을 정의하도록 하고;
- [0153] 7. 판독펜(wand) 도구로 피크 각각을 연속으로 클릭하여 피크 면적들을 측정하고;
- [0154] 8. 그런 다음, 피크 측정(도트 세기 값)을 하여 얻은 데이터 파일을 마이크로소프트 엑셀 파일로 저장하고 정규화하여 그래프로 그릴 수 있음.
- [0155] 도 26은, 일부 융합 단백질들이 MEK1 및/또는 MEK2에 대항하는 결합 활성을 나타낸다는 것을 보여주는, 단백질 도트 블롯 결합 검사의 영상 분석의 결과를 나타낸다.
- [0156] MEK활성을 조절하는 리간드 및 폴리리간드와 이러한 리간드를 제조하고 사용하는 방법들이 개시된다. 상기 리간드 및 폴리리간드는 화학적으로 또는 재조합으로 합성되며, 연구 도구로서 또는 치료제로서 활용된다. 본 발명은 세포이하 치료제를 위해 상기 리간드 및 폴리리간드를 세포의 위치 신호로 연결시키는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1a 내지 1c는 스페이서가 없는 호모폴리머릭(homopolymeric) 리간드의 예를 도시한다.
- [0031] 도 2a 내지 2c는 스페이서가 있는 호모폴리머릭 리간드의 예를 도시한다.

- [0032] 도 3a 내지 3e는 스페이서가 없는 혼합형 폴리머릭(heteropolymeric) 리간드의 예를 도시한다.
- [0033] 도 4a 내지 4f는 스페이서가 있는 혼합형 폴리머릭 리간드의 예를 도시한다.
- [0034] 도 5a 내지 5g는 선택적인 에피토프 태그(epitope tag)에 연결된 리간드 및 폴리머릭 리간드의 예들을 도시한다.
- [0035] 도 6a 내지 6g는 선택적인 리포터(reporter)에 연결된 리간드 및 폴리머릭 리간드의 예를 도시한다.
- [0036] 도 7a 내지 7g는 선택적인 위치 신호에 연결된 리간드 및 폴리머릭 리간드의 예를 도시한다.
- [0037] 도 8a 내지 8g는 선택적인 위치 신호 및 선택적인 에피토프 태그에 연결된 리간드 및 폴리머릭 리간드의 예를 도시한다.
- [0038] 도 9a 내지 9g는 리간드 및 폴리리간드가 선택적인 위치 신호, 선택적인 에피토프 태그 및 선택적인 리포터에 연결되어 있는 유전자 구조체의 예를 도시한다.
- [0039] 도 10a 내지 10d는 리간드 유전자 구조체를 포함하는 벡터의 예를 도시한다.
- [0040] 도 11은 폴리리간드를 조합하여 합성하는 데에 유용한 순차적인 클로닝 공정(sequential cloning process)의 예를 도시한다.
- [0041] 도 12 내지 24는 본 발명의 리간드-베타-갈락토시다아제(ligand-beta-galactosidase) 융합 단백질에 대한 유전자 구조체를 포함하는 벡터의 다이어그램(diagram)을 도시한다.
- [0042] 도 25는 트랜스펙션(transfection)된 HT-1080 세포의 용해질에서 리간드-베타-갈락토시다아제 융합 단백질의 평균 단백질 농도를 나타낸다.
- [0043] 도 26은 MEK1 및 MEK2 단백질 표적에 대항하는 리간드-베타-갈락토시다아제 융합 단백질의 단백질 도트 블롯(dot blot) 결합 검사를 영상 분석한 결과를 도시한다.

도면

도면1a

리간드 X	리간드 X
-------	-------

도면1b

리간드 X	리간드 X	리간드 X
-------	-------	-------

도면1c

리간드 X				
-------	-------	-------	-------	-------

도면2a

리간드 X	스페이서	리간드 X
-------	------	-------

도면2b

리간드 A	스페이서	리간드 A	스페이서	리간드 A
-------	------	-------	------	-------

도면2c

리간드 X	리간드 X	스페이서	리간드 X	스페이서	리간드 X
-------	-------	------	-------	------	-------

도면3a

리간드 X	리간드 Y
-------	-------

도면3b

리간드 X	리간드 Y	리간드 Z
-------	-------	-------

도면3c

리간드 X	리간드 Y	리간드 X	리간드 Z	리간드 A
-------	-------	-------	-------	-------

도면3d

리간드 A	리간드 B	리간드 C	리간드 D
-------	-------	-------	-------

도면3e

리간드 A	리간드 A	리간드 B	리간드 C
-------	-------	-------	-------

도면4a

리간드 B	스페이서	리간드 A
-------	------	-------

도면4b

리간드 Z	스페이서	리간드 Y	스페이서	리간드 X
-------	------	-------	------	-------

도면4c

리간드 A	스페이서	리간드 B	스페이서	리간드 A	스페이서	리간드 B
-------	------	-------	------	-------	------	-------

도면4d

리간드 A	스페이서	리간드 B	스페이서	리간드 C	스페이서	리간드 D
-------	------	-------	------	-------	------	-------

도면4e

리간드 X	스페이서	리간드 X	스페이서	리간드 Y	스페이서	리간드 Z
-------	------	-------	------	-------	------	-------

도면4f

리간드 C	스페이서	리간드 Y	스페이서	리간드 Z	스페이서	리간드 Y
-------	------	-------	------	-------	------	-------

도면5a

리간드 X	리간드 X	에피토프
-------	-------	------

도면5b

에피토프	리간드 X	리간드 Y
------	-------	-------

도면5c

리간드 X	스페이서	리간드 X	에피토프
-------	------	-------	------

도면5d

에피토프	리간드 X	스페이서	리간드 Y
------	-------	------	-------

도면5e

리간드 X	스페이서	리간드 Y	스페이서	리간드 A	리간드 B	에피토프
-------	------	-------	------	-------	-------	------

도면5f

에피토프	리간드 X	스페이서	리간드 Y	리간드 A	리간드 B
------	-------	------	-------	-------	-------

도면5g

리간드 X	에피토프
-------	------

도면6a

리간드 X	리간드 X	리포터
-------	-------	-----

도면6b

리포터	리간드 X	리간드 Y
-----	-------	-------

도면6c

리간드 X	스페이서	리간드 X	리포터
-------	------	-------	-----

도면6d

리포터	리간드 X	스페이서	리간드 Y
-----	-------	------	-------

도면6e

리간드 X	스페이서	리간드 Y	스페이서	리간드 A	리간드 B	리포터
-------	------	-------	------	-------	-------	-----

도면6f

리포터	리간드 X	스페이서	리간드 Y	리간드 A	리간드 B
-----	-------	------	-------	-------	-------

도면6g

리간드 X	리포터
-------	-----

도면7a

리간드 X	리간드 X	위치 신호
-------	-------	-------

도면7b

위치 신호	리간드 X	리간드 Y
-------	-------	-------

도면7c

리간드 X	스페이서	리간드 X	위치 신호
-------	------	-------	-------

도면7d

위치 신호	리간드 X	스페이서	리간드 Y
-------	-------	------	-------

도면7e

리간드 X	스페이서	리간드 Y	리간드 B	위치 신호
-------	------	-------	-------	-------

도면7f

위치 신호	리간드 A	리간드 B	리간드 C	리간드 D
-------	-------	-------	-------	-------

도면7g

위치 신호	리간드 Y
-------	-------

도면8a

리간드 A	리간드 B	리간드 C	리간드 D	에피토프	위치 신호
-------	-------	-------	-------	------	-------

도면8b

위치 신호	리간드 X	리간드 Y	에피토프
-------	-------	-------	------

도면8c

에피토프	리간드 X	스페이서	리간드 X	위치 신호
------	-------	------	-------	-------

도면8d

위치 신호	리간드 X	스페이서	리간드 Y	에피토프
-------	-------	------	-------	------

도면8e

에피토프	리간드 X	리간드 Y	리간드 B	위치 신호
------	-------	-------	-------	-------

도면8f

위치 신호	리간드 Z	스페이서	리간드 Y	리간드 B	에피토프
-------	-------	------	-------	-------	------

도면8g

에피토프	리간드 B	위치 신호
------	-------	-------

도면9a

프로모터	리간드 또는 폴리리간드	에피토프	위치 신호	정지	폴리-A
------	--------------	------	-------	----	------

도면9b

프로모터	선택적인 리포터	선택적인 에피토프	리간드 또는 폴리리간드	선택적인 위치 신호	정지	폴리-A
------	-------------	--------------	-----------------	---------------	----	------

도면9c

프로모터	리간드 또는 풀리리간드	리포터	위치 신호	정지	풀리-A
------	-----------------	-----	-------	----	------

도면9d

프로모터	리간드 또는 풀리리간드	선택적인 에피토프	선택적인 리포터	선택적인 위치 신호	정지	풀리-A
------	-----------------	--------------	-------------	---------------	----	------

도면9e

프로모터	리간드 또는 풀리리간드	위치 신호	정지	풀리-A
------	-----------------	-------	----	------

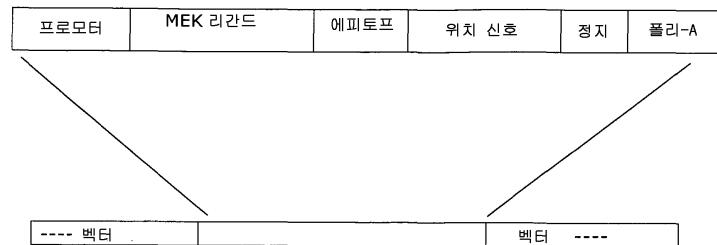
도면9f

프로모터	위치 신호	리간드 또는 풀리리간드	정지	풀리-A
------	-------	-----------------	----	------

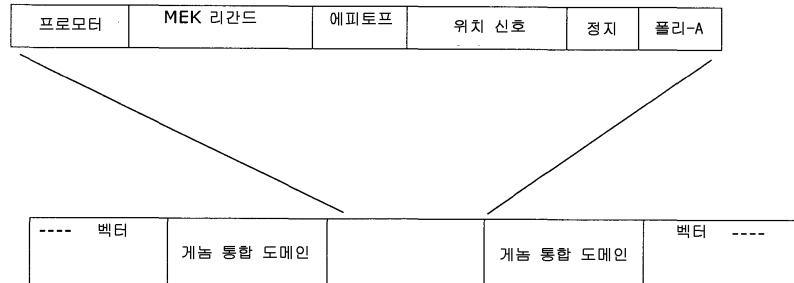
도면9g

프로모터	리간드 또는 풀리리간드	정지	풀리-A
------	-----------------	----	------

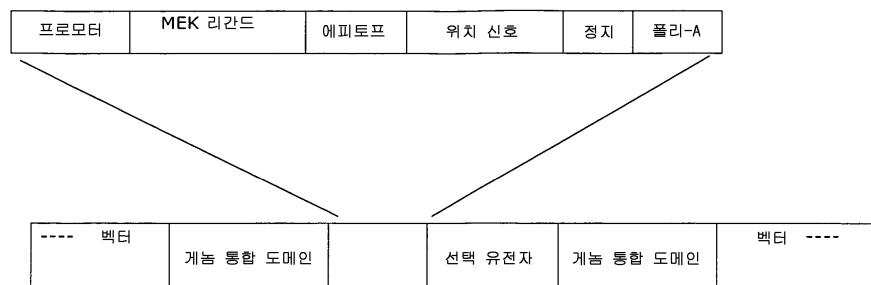
도면10a



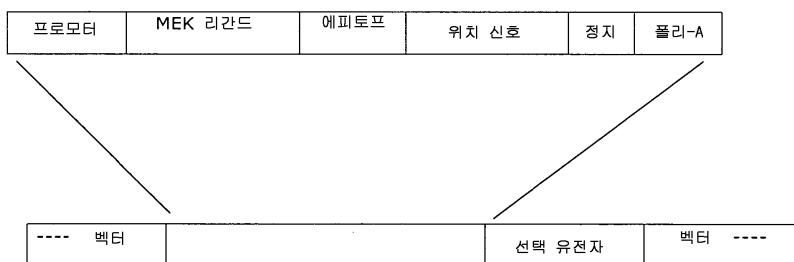
도면10b



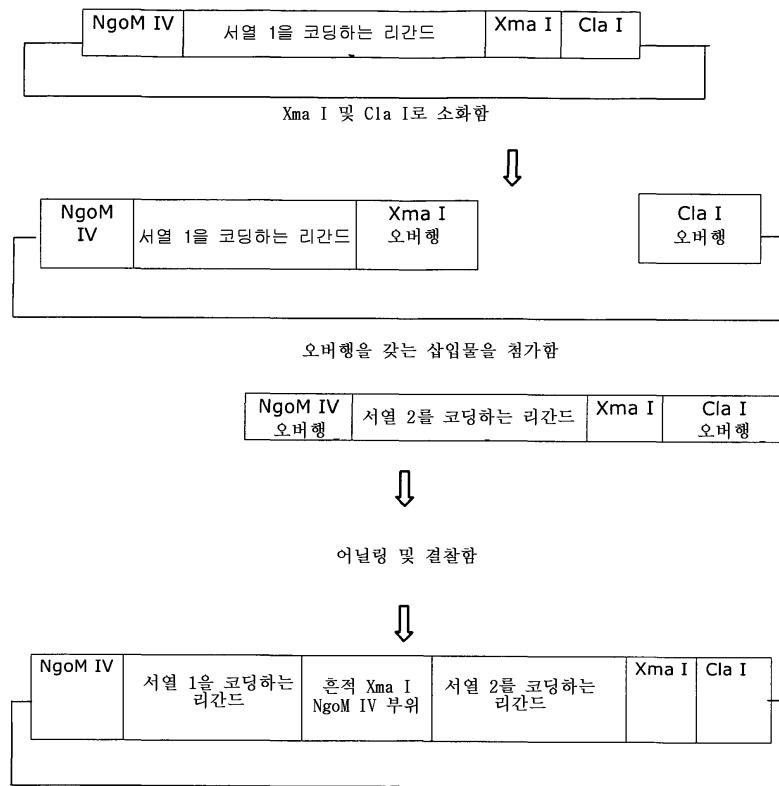
도면10c



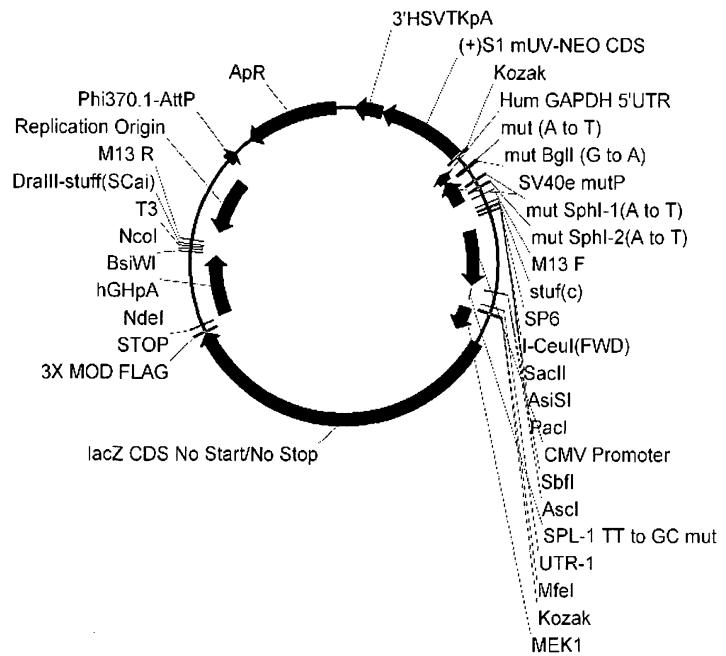
도면10d



도면11

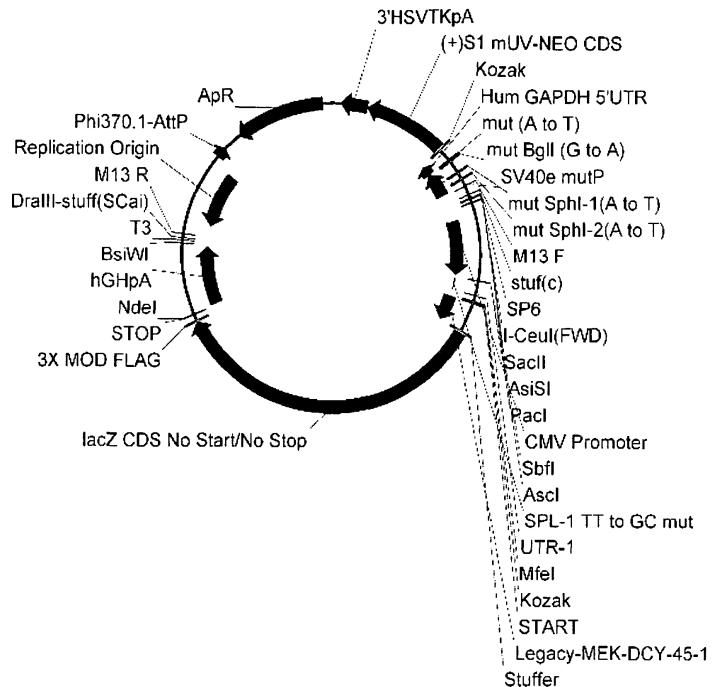


도면12



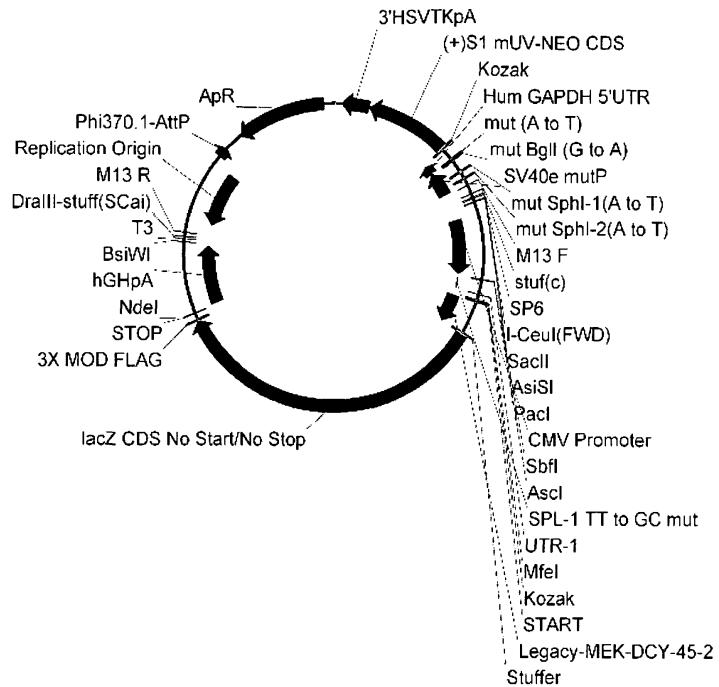
VVN-40637 CMV UTR-1 Kozak MEK1 LacZ hGHpA in VVN-3836

도면13



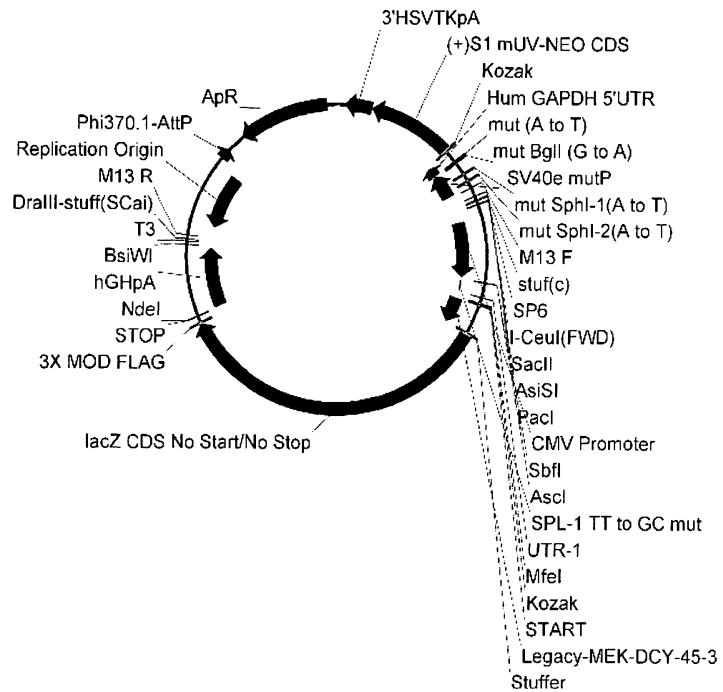
VVN-40639 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-1 LacZ hGHPA in VVN-3836

도면14



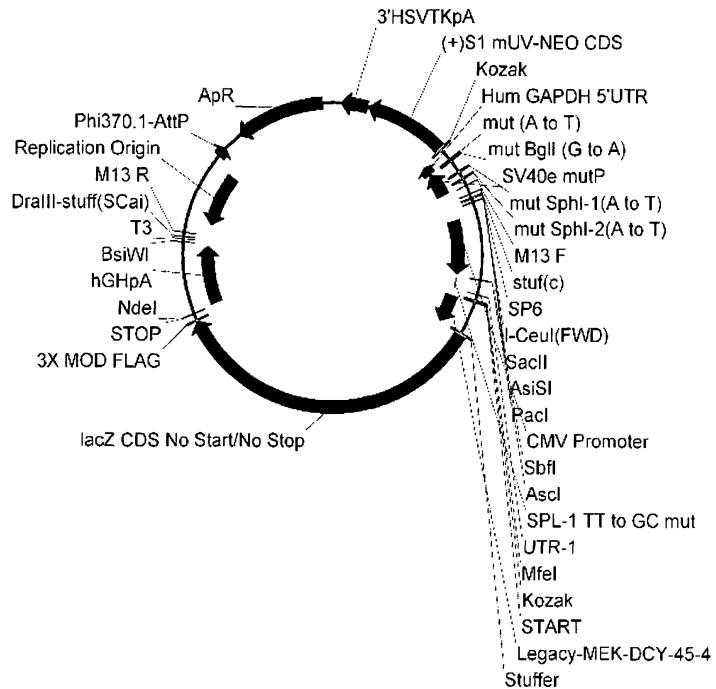
VVN-40641 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-2 LacZ hGhpA in VVN-3836

도면15



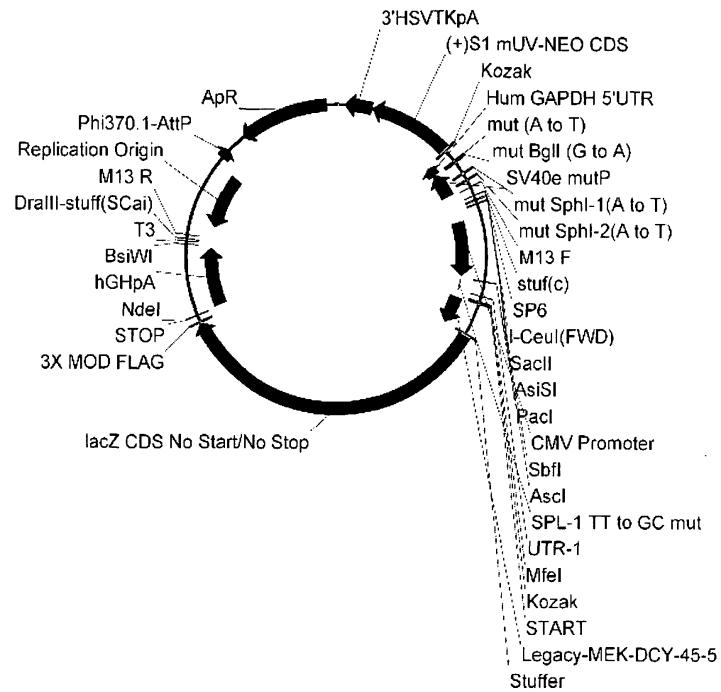
VVN-40643 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-3 LacZ hGHPA in VVN-3836

도면16



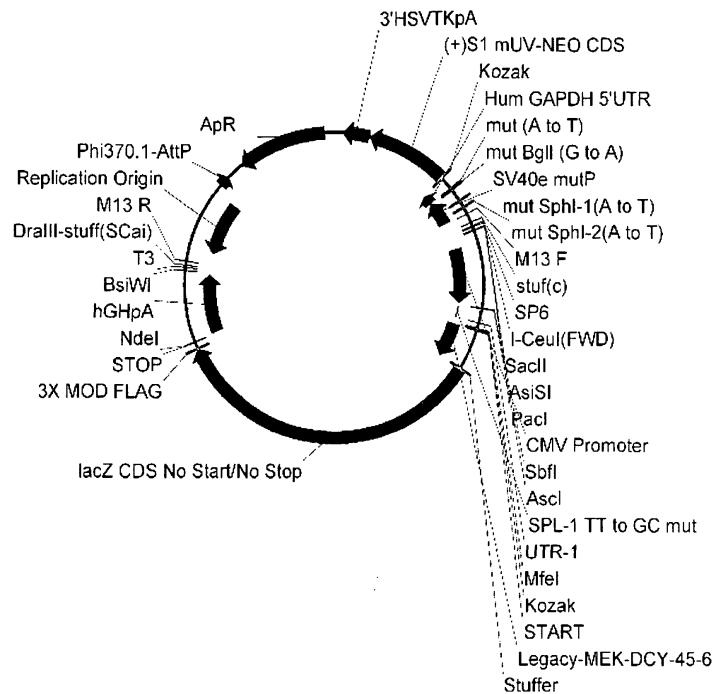
VVN-40645 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-4 LacZ hGhpA in VVN-3836

도면17



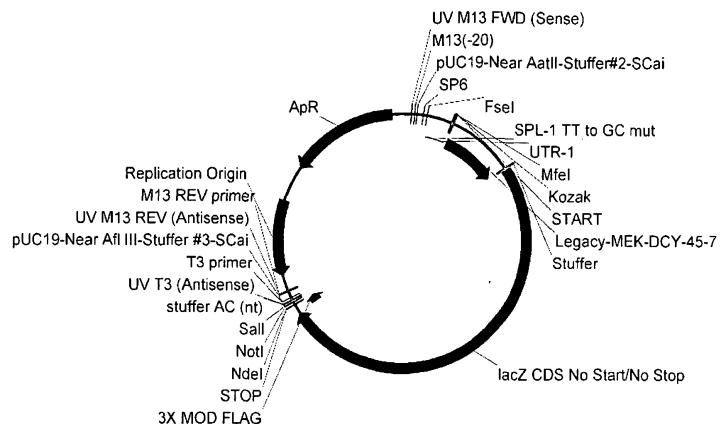
VVN-40647 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-5 LacZ hGHPA in VVN-3836

도면18



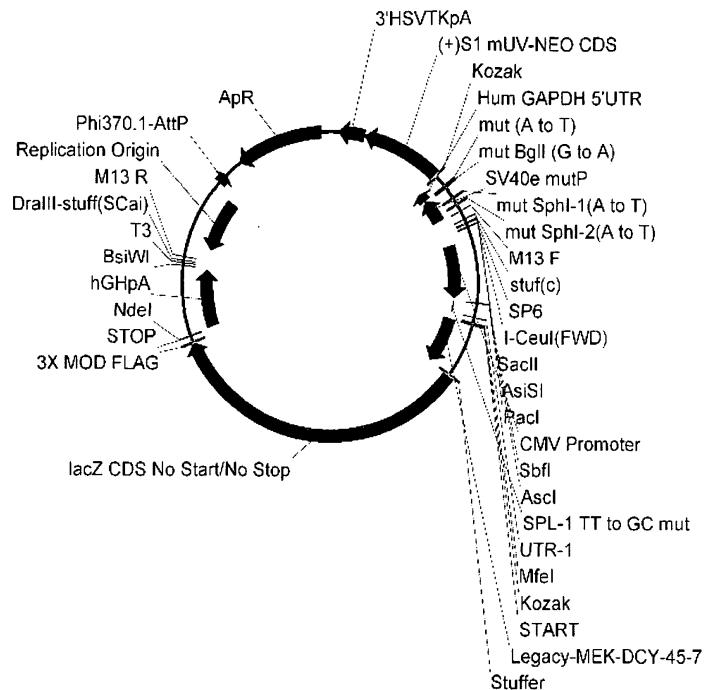
VVN-40649 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-6 LacZ hGhpA in VVN-3836

도면19



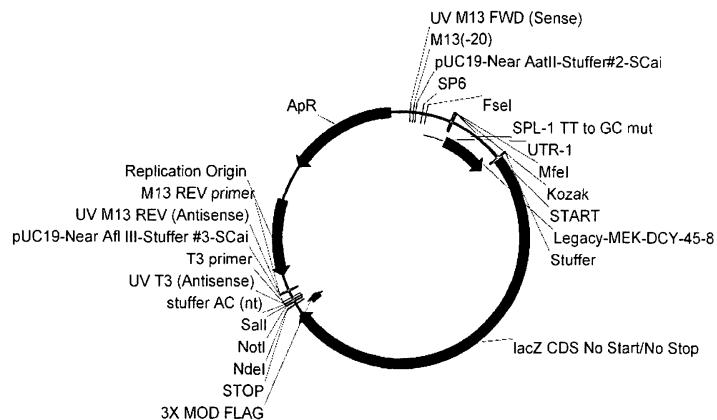
VVN-40650 UTR-1 Legacy-MEK-Dcy-45-7 LacZ in VVN-3688

도면20



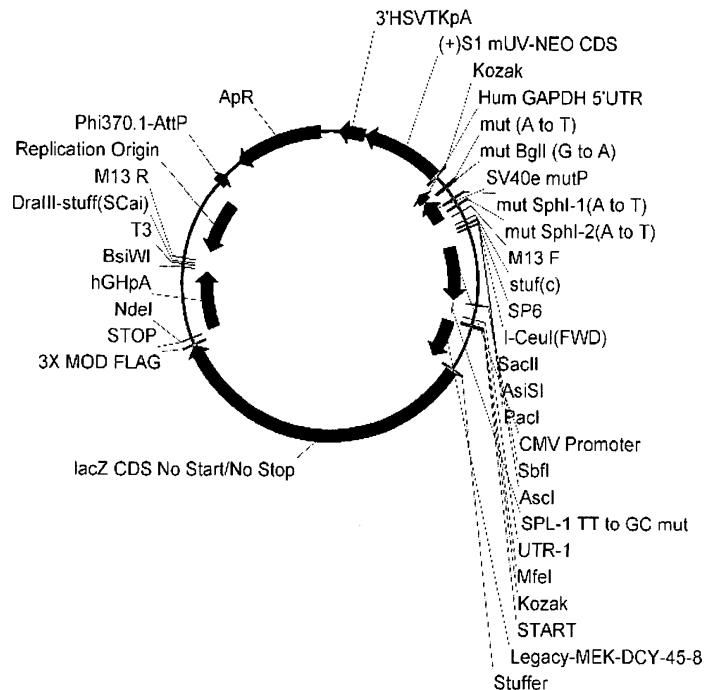
VVN-40651 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-7 LacZ hGHpA in VVN-3836

도면21



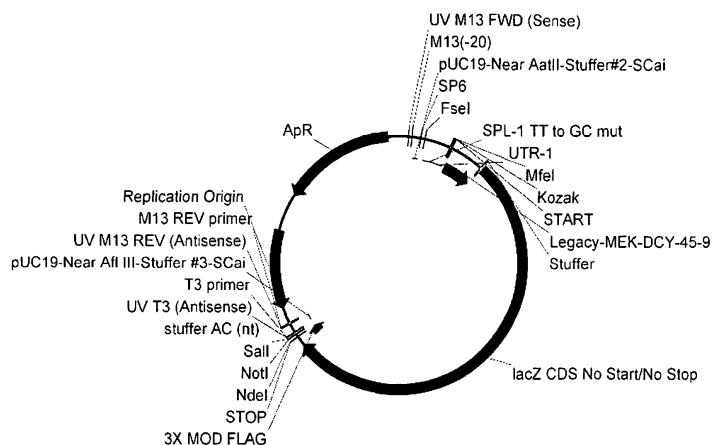
VVN-40652 UTR-1 Legacy-MEK-Dcy-45-8 LacZ in VVN-3688

도면22



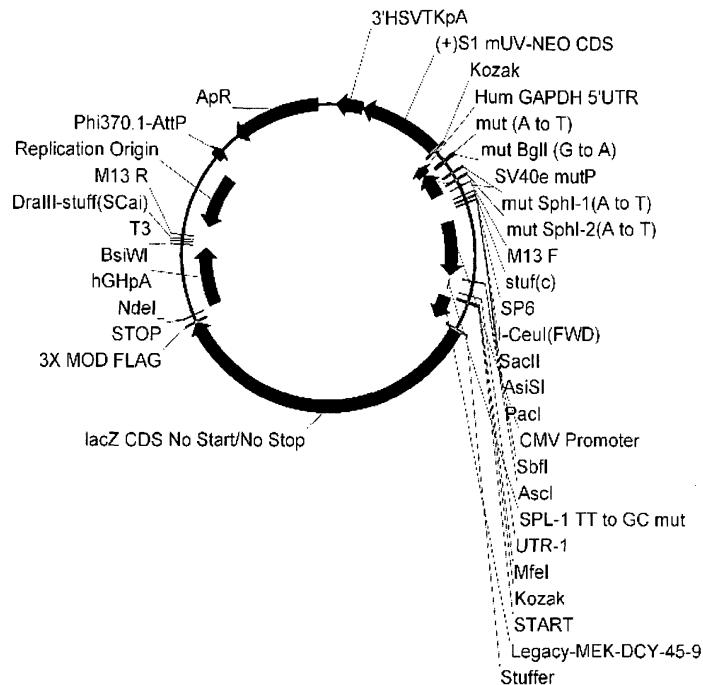
VNV-40653 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-8 LacZ hGHpA in VVN-3836

도면23



VNV-40654 UTR-1 Legacy-MEK-Dcy-45-9 LacZ in VVN-3688

도면24

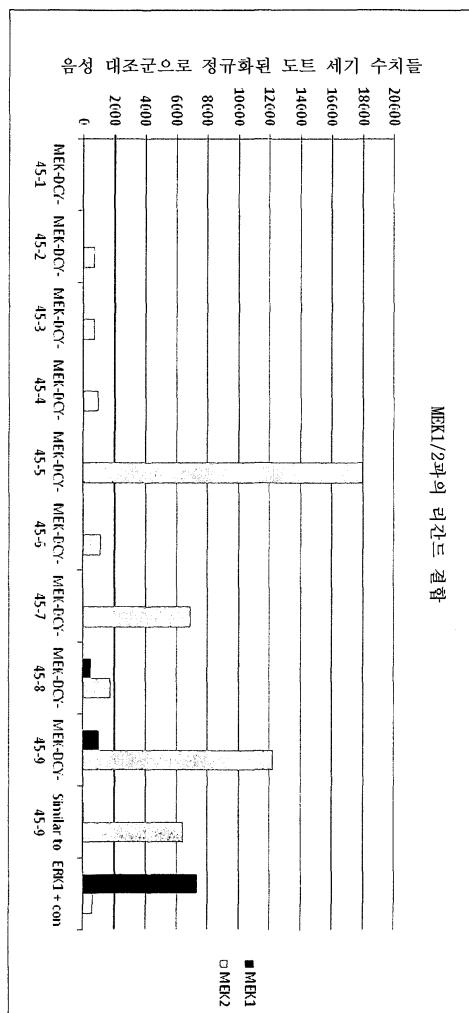


VVN-40655 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-9 LacZ hGHpA in VVN-3836

도면25

트랜스펙션에 사용된 벡터 (벡터 번호#)	벡터 도면 번호	리간드 지정	리간드 서열 번호 :	용해물에서 리간드 용합 단백질의 평균 농도(ng/ml)	표준 편차
VVN-40637	12	45-9과 유사함	33	50.16	6.65
VVN-40639	13	MEK-DCY-45-1	1	8.79	0.39
VVN-40641	14	MEK-DCY-45-2	5	9.80	0.45
VVN-40643	15	MEK-DCY-45-3	9	25.34	0.95
VVN-40645	16	MEK-DCY-45-4	13	5.14	0.16
VVN-40647*	17	MEK-DCY-45-5	17	32.03	N/A
VVN-40649	18	MEK-DCY-45-6	21	28.57	2.29
VVN-40651	20	MEK-DCY-45-7	25	43.10	3.24
VVN-40653	22	MEK-DCY-45-8	29	36.26	3.42
VVN-40655	24	MEK-DCY-45-9	33	183.81	32.29
ERK 양성 대조군	해당사항 없음	ERK1 + con	38	213.10	55.99
* VVN-40647 베이터는 1 개 복제물의 수치를 나타낸다 (다른 복제물은 검출 한계 미만이었다)					

도면26



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bachinsky, David R.
Carson, Jonathan
Atzel, Amy
Reed, Thomas D.

<120> MEK Ligands and Polynucleotides Encoding MEK Ligands

<130> Intrexon
<160> 51
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 91
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic
 <400> 1

Gly Val Ser Gly Gly Leu Ile Asp Ala Met Ala Asn Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15

Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Gly Ala Ala Gly Arg Thr Pro Gly Arg
 20 25 30

Pro Leu Ala Ser Phe Gly Met Asp Ser Arg Pro Ala Gly Gly Ala Tyr
 35 40 45

Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Pro Gly Ala
 50 55 60

Ala Gly Asp His Thr Gly Phe Leu Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp
 65 70 75 80

Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
 85 90

<210> 2
 <211> 273
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> synthetic
 <400> 2
 ggctgtgagcg gcggcctgat cgacgccatg gccaacgcct tcgtggcac caggagctac 60

atgagccccg gcccgcgg aaggacccc ggcaggcccc tggccagctt cggcatggac 120

agcaggccccg cggaggcgc ctactgccag aggaccctga gggagatcca gatctgctg 180

aggccccggcg ccggccggaga ccacaccggc ttccctggccg agttcgtggc caccagatgg 240

tacagggccc ccgagatcat gctgaacacgc aag 273

<210> 3
<211> 307
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 3

gctagcgccg	gcggcgtgag	cggcgccctg	atcgacgcca	tggccaacgc	cttcgtggc	60
accaggagct acatgagccc cggcgccgcc ggaaggaccc ccggcaggcc cctggccagc						120
ttcggcatgg acagcaggcc cgccggaggc gcctactgcc agaggaccct gagggagatc						180
cagatcctgc tgaggcccg cgccgcccga gaccacaccg gcttcctggc cgagttcgtg						240
gccaccagat ggtacagggc ccccgagatc atgctgaaca gcaagcccgg gggaggcgg						300
atcgatt						307
gctagcgcca	ccatggccgg	cggcgtgagc	ggcgccctga	tcgacgccc	ggccaacgcc	60
ttcgtggca ccaggagcta catgagcccc ggcggccggc gaaggacccc cggcaggccc						120
ctggccagct tcggcatgga cagcaggccc gccggaggcg cctactgcc						180
gaggagatcc agatcctgct gaggccggc gccgcccgg accacaccgg ctccctggcc						240
gagttcgtgg ccaccagatg gtacagggcc cccgagatca tgctgaacag caagcccgg						300
ggaggcggaa tcgatt						316

<211> 103
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 5

Thr Gly Phe Leu Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
1 5 10 15

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Pro Gly Ala Ala Gly Thr Gly Phe
20 25 30

Leu Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met
35 40 45

Leu Asn Ser Lys Gly Pro Ala Gly Ala Arg Thr Pro Gly Arg Pro
50 55 60

Leu Ala Ser Phe Gly Met Asp Ser Arg Pro Gly Ala Ala Gly Asp His
65 70 75 80

Thr Gly Phe Leu Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
85 90 95

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
100

<210> 6
<211> 309
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 6
accggcttcc tggcgagtt cgtggccacc agatggtaca gggccccga gatcatgctg 60

aacagcaagg gccccggcgc cgccggaacc ggcttcctgg ccgagttcgt gccaccaga 120

tgg tacaggg cccccgagat catgctgaac agcaagggcc ccggccggagg cgccaggacc 180

ccggcaggc ccctggccag ctgcggcatg gacagcaggc ccggcgccgc cgagaccac 240

accggcttcc tggccgagtt cgtggccacc agatggtaca gggcccccga gatcatgctg 300

aacagcaag 309

<210> 7

<211> 343

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 7

gctagcgccg gcacccggtt cctggccgag ttctggcca ccagatggta cagggccccc 60

gagatcatgc tgaacagcaa gggcccccgc gccgcccggaa ccggcttcct ggccgagttc 120

gtggccacca gatggtacag ggcccccggag atcatgctga acagcaaggg ccccgccgga 180

ggcgccagga ccccccggcag gcccctggcc agcttcggca tggacagcag gcccggcgcc 240

gccggagacc acacccggtt cctggccgag ttctggcca ccagatggta cagggccccc 300

gagatcatgc tgaacagcaa gcccggggga ggcggaatcg att 343

<210> 8

<211> 352

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 8

gctagcgcca ccatggccgg caccggcttc ctggccgagt tcgtggccac cagatggta 60

aggggccccc agatcatgct gaacagcaag ggcccccggc ccggccggaa cggcttcctg 120

gccgagttcg tggccaccag atggtacagg gccccggaga tcgtgtgaa cagcaagggc 180

cccgccggag gcgccaggac cccggcagg cccctggcca gcttcggcat ggacagcagg 240

ccggcgccg cggagacca caccggcttc ctggccgagt tcgtggccac cagatggtac 300

agggcccccg agatcatgct gaacagcaag cccggggag gcggaatcga tt 352

<210> 9

<211> 91

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 9

Gly Val Ser Gly Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val Gly
1 5 10 15

Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Gly Ala Ala Gly Arg Thr Pro Gly Arg
20 25 30

Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser Arg Pro Ala Gly Gly Ala Tyr
35 40 45

Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Pro Gly Ala
50 55 60

Ala Gly Asp His Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp
65 70 75 80

Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
85 90

<210> 10

<211> 273

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 10

ggcgtgagcg gcccgtat cgacagcatg gccaacagct tcgtggcac caggagctac 60
 atgagccccg gcccgcgg aaggacccc ggcaggcccc tgaggacta cggcatggac 120
 agcaggcccg cggaggcgc ctactgccag aggacctga gggagatcca gatcctgctg 180
 aggccggcg ccgcggaga ccacaccgc ttctgaccg agtacgtggc caccagatgg 240
 tacagggccc ccgagatcat gctgaacagc aag 273

<210> 11
 <211> 307
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 11
 gctagcggc gggcgttag cggccgcctg atcgacagca tggcaacag ctctgtggc 60
 accaggagct acatgagccc cggccgcgc ggaaggaccc cggcaggcc cctgagcagc 120

tacggcatgg acagcaggcc cggccggaggc gcctactgcc agaggacctt gaggagatc 180
 cagatcctgc tgaggcccg cggccgcga gaccacccg gtttcctgac cgagtacgt 240
 gccaccagat ggtacaggc ccccgagatc atgctgaaca gcaagcccg gggaggcgg 300
 atcgatt 307

<210> 12
 <211> 316
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 12
 gctagcgcca ccatggccgg cggcgttagc ggcggctga tcgacagcat gccaacagc 60
 ttctgtggca ccaggagcta catgagcccc ggcggccgg gaaggacccc cggcaggccc 120

ctgaggcagct acggcatgga cagcaggccc gccggaggcg cctactgccca gaggaccctg 180
 agggagatcc agatcctgct gaggccggc gcccggag accacaccgg ctccctgacc 240
 gagtacgtgg ccaccagatg gtacaggcc cccgagatca tgctgaacag caagccggg 300
 ggaggcggaa tcgatt 316

<210> 13
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 13

Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
 1 5 10 15

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Pro Gly Ala Ala Gly Thr Gly Phe
 20 25 30

Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met
 35 40 45

Leu Asn Ser Lys Gly Pro Ala Gly Ala Arg Thr Pro Gly Arg Pro
 50 55 60

Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser Arg Pro Gly Ala Ala Gly Asp His
 65 70 75 80

Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
 85 90 95

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
 100

<210> 14
<211> 309
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 14
accggcttcc tgaccgagta cgtggccacc agatggtaca gggcccccga gatcatgctg 60

aacagcaagg gccccggcgc cgccggaacc ggtttcctga ccgagtagtgc ggcaccaga 120

tggcacagg ccccgagat catgctgaac agcaagggcc ccggccggagg cgccaggacc 180

cccgccaggc ccctgagcag ctacggcatg gacagcaggc ccggcgccgc cgagaccac 240

accggcttcc tgaccgagta cgtggccacc agatggtaca gggcccccga gatcatgctg 300

aacagcaag 309

<210> 15
<211> 343
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 15
gcttagcgccg gcacccggtt cctgaccgag tacgtggcca ccagatggta cagggccccc 60

gagatcatgc tgaacagcaa gggcccccgc gcccggaa ccggcttcct gaccgagtac 120

gtggccacca gatggtagacag ggcccccggag atcatgctga acagcaaggg ccccgccgga 180

ggcgccagga ccccccggcag gcccctgagc agctacggca tggacagcag gcccggcgcc 240

gccggagacc acacccggtt cctgaccgag tacgtggcca ccagatggta cagggccccc 300

gagatcatgc tgaacagcaa gcccggggga ggcggaatcg att 343

<210> 16
<211> 352
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 16

gctagcgcaca ccatggccgg caccggcttc ctgaccgagt acgtggccac cagatggta 60

aggggcccccg agatcatgct gaacagcaag ggcccccggcg ccggccggaaac cggttccctg 120

accgagtagc tggccaccag atggtagcagg gccccggaga tcatacgtaa cagcaaggc 180

cccgccggag gcgccaggac cccggcagg cccctgagca gctacggcat ggacagcagg 240

cccgccgcggcc cgaggagacca caccggcttc ctgaccgagt acgtggccac cagatggta 300

aggggcccccg agatcatgct gaacagcaag cccgggggag gcggaatcga tt 352

<210> 17

<211> 100

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 17

Phe	Asp	Gly	Ile	Trp	Lys	Ala	Ser	Phe	Thr	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Lys
1								10							

Tyr	Trp	Phe	Tyr	Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Asp	His	Thr	Gly	Phe	Leu
							20					25			30

Ala	Glu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Trp	Tyr	Arg	Ala	Pro	Glu	Ile	Met	Leu
												35			40

Asn	Ser	Lys	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Pro	Gly	Arg	Pro	Leu	Ala
												50			55

Ser	Phe	Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu
												65			70

Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu
85 90 95

Asn Ser Lys Gly
100

```
<210> 18
<211> 300
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
```

```
<223> synthetic
<400> 18
ttcgacggca tctggaaggc cagcttacc acttcacgg tgaccaagta ctggttctac 60
```

aggcccgagc ccgcccggaga ccacaccggc ttccctggccg agttcgtaggc caccagatgg 120

tacagggccc ccgagatcat gctgaacagc aagcccgccg gaggcgccag gaccggcggc 180

aggccccctgg ccagcttcgg catggacagc aggcccgcgcc cgcccgaaac cggtttctg 240

gccgagttcg tggccaccag atggcacagg gcccccaga tcatgtgaa cagcaaggc 300

```
<210> 19
<211> 334
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
```

```
<223> synthetic
<400> 19
gctagcggc gttcgacgg catctgaaag gccagctca ccacccatc cgtgaccaag 60
```

tactggttct acaggccccgg cgccgcggga gaccacaccg gtttcctggc cgagttcgta 120

gccaccagat ggtacagggc ccccgagatc atgctgaaca gcaaggcccgc cgaggcgcc 180

aggaccccg gcaggcccgt ggccagcttc ggcattggaca gcaggccgg cgccgcggaa 240

accggcttcc tggccgagtt cgtggccacc agatggtaca gggccccga gatcatgctg 300

aacagcaagg gccccggggg aggcggaatc gatt 334

<210> 20

<211> 343

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 20

gctagcgcca ccatggccgg ctgcacggc atctggaagg ccagcttcac caccttcacc 60

gtgaccaagt actggttcta caggcccggc gccgcccggag accacaccgg ctgcgtggcc 120

gagttcgtgg ccaccagatg gtacagggcc cccgagatca tgctgaacag caagcccgcc 180

ggaggcgccca ggaccccccgg caggccccctg gccagcttcg gcatggacag caggccccggc 240

gccgcccggaa ccggcttctt ggccgagttc gtggccacca gatggtagacag ggcccccggag 300

atcatgctga acagcaaggg ccccgaaaaa ggcggaaatcg att 343

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 21

Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	His	Asp	His
1								10							

Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Glu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Trp	Tyr	Arg	Ala	Pro
20								25							

Glu	Ile	Met	Leu	Asn	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	Cys	Asp	Phe
35								40							

Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	His	Asp	His	Thr	Gly	Phe	Leu
50								55							

Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu
65 70 75 80

Asn Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg
85 90 95

Val Ala Asp Pro Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Ala Glu Phe Val
100 105 110

Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
115 120 125

<210> 22
<211> 381
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

```
<223> synthetic  
<400> 22  
atctgcgact tcggcctggc cagggtcgcc gaccccgacc acgaccacac cggtttctg 60
```

gccgagttcg tggccaccag atggcacagg gcccccaga tcatgctgaa cagcaagccc 120

ggcgccgcccgaatctgcga cttcggcctggccagggtcg ccgaccccgaccac 180

accggcttcc tggccgagtt cgtggccacc agatggtaca gggcccccgaaatcatgctg 240

aacagcaaggccgggcggccggatctgcgacttcggccggccagggtcgccgacccc 300

gaccacgacc acaccggctt cctggccgag ttctgtggcca ccagatggta caggggcccccc 360

gagatcatgc tggccggccg 281

<210> 23
<211> 415
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 23

gctagcgcgg gcatctgcga ctgcggctg gccagggtcg ccgaccccgaa ccacgaccac 60

accggcttcc tggccgagtt cgtagccacc agatggtaca gggcccccga gatcatgctg 120

aacagcaagg cggcgccgc cgaaatctgc gacttcggcc tggccagggt cggcggacccc 180

gaccacgacc acaccggctt cctggccgag ttctggcca ccagatggta cagggcccc 240

gagatcatgc tgaacagcaa gcccggcgc gccggaaatct gcgacttcgg cctggccagg 300

gtcgccgacc ccgaccacga ccacaccggc ttccctggcc agttcgtggc caccagatgg 360

tacagggccc ccgagatcat gctgaacagc aagccgggg gaggcgaaat cgatt 415

<210> 24

<211> 424

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 24

gctagcgcgg ccatggccgg catctgcgac ttgcggctgg ccagggtcgcc cgaccccgac 60

cacgaccaca cggcgttctt ggccgagttc gtggccacca gatggtacag gggcccccgg 120

atcatgtga acagcaagcc cggcgccgc ggaatctgcg acttcggctt ggccagggtc 180

gccgaccccg accacgacca cacggcttc ctggccgagt tcgtggccac cagatggta 240

agggcccccg agatcatgtt gaacagcaag cccggcgccg ccggaaatctg cgacttcggc 300

ctggccagggt tcgcccggcc cgaccacgac cacaccggctt tcctggccga gttcgtggcc 360

accagatggt acagggcccc cgagatcatg ctgaacagca agccgggggg aggcgaaatc 420

gatt 424

<210> 25
<211> 174
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 25

His Glu Asn Ile Ile Gly Ile Asn Asp Ile Ile Arg Ala Pro Thr Ile
 20 25 30

Glu Gln Met Lys Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp
 35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys
 50 55 60

Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
65 70 75 80

Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp
100 105 110

Pro Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Ala Glu Phe Val Ala Thr Arg
115 120 125

Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys
 130 135 140

Ser Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser

145	150	155	160	
Asn Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu				
165 170				
<210> 26				
<211> 522				
<212> DNA				
<213> artificial sequence				
<220>				
<223> synthetic				
<400> 26				
tactgccaga ggaccctgag ggagatcaag atcctgctga ggttcaggca cgagaacatc 60				
atcgccatca acgacatcat cagggcccc accatcgagc agatgaagga cgtgtacatc 120				
gtgcaggacc tcatggagac cgacctgtac aagctgctga agaccaggca cctgagcaac 180				
gaccacatct gctacttcct gtaccagatc ctgaggggcc tgaagtacat ccacagcgcc 240				
aacgtgtgc acagggacct gaagcccagc aacccctgc tgaacaccac ctgtgacctg 300				
aagatttgcg acttcggcct ggccagggtc gccgaccccg accacgacca caccggctc 360				
ctggccgagt tcgtggccac cagatggta agggccccc agatcatgct gaacagcaag 420				
ggctacacca agagcatcga catctggagc gtgggctgca tcctggccga gatgctgagc 480				
aacaggccca tcttcccg caagcaactac ctggaccagc tg 522				
<210> 27				
<211> 556				
<212> DNA				
<213> artificial sequence				
<220>				
<223> synthetic				
<400> 27				
gctagcgccg gctactggca gaggaccctg agggagatca agatcctgct gaggttcagg 60				
cacgagaaca tcatcgccat caacgacatc atcagggccc ccaccatcga gcagatgaag 120				

gacgtgtaca tcgtgcagga cctgatggag accgacctgt acaagctgct gaagaccagg 180
 cacctgagca acgaccacat ctgctacttc ctgtaccaga tcctgagggg cctgaagtac 240
 atccacagcg ccaacgtgct gcacaggac ctgaagccca gcaacctcct gctgaacacc 300
 acctgtgacc tgaagattt cgacttcggc ctggccaggg tcggccaccc cgaccacgac 360
 cacacggct tcctggccga gttcgtggcc accagatggt acagggcccc cgagatcatg 420
 ctgaacagca agggctacac caagagcatc gacatctgga gcgtgggctg catcctggcc 480
 gagatgtiga gcaacaggcc catcttcccc ggcaagcact acctgtgacca gctgcccggg 540
 ggaggcggaa tcgatt 556

<210> 28
 <211> 565
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> synthetic
 <400> 28
 gctagcgcca ccatggccgg ctactgccag aggaccctga gggagatcaa gatcctgctg 60

agtttcaggc acgagaacat catcgccatc aacgacatca tcagggcccc caccatcgag 120
 cagatgaagg acgtgtacat cgtcaggac ctgatggaga ccgacctgta caagctgctg 180
 aagacccagc acctgagcaa cgaccacatc tgctacttcc tgtaccagat cctgagggc 240
 ctgaagtaca tccacagcgc caacgtgctg cacaggacc tgaagccag caacctcctg 300
 ctgaacacca cctgtgaccc gaagatttgc gacttcggcc tggccagggt cccgacccc 360
 gaccacgacc acacccggctt ccggccgag ttctggcca ccagatggta cagggcccc 420
 gagatcatgc tgaacagcaa gggctacacc aagagcatcg acatctggag cgtggctgc 480

atcctggccg agatgctgag caacaggccc atctccccg gcaagcacta cctggaccag 540

ctgccccggg gaggcgaaat cgatt 565

<210> 29

<211> 145

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 29

Glu His Gln Thr Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu
1 5 10 15

Leu Arg Phe Arg His Glu Asn Val Ile Gly Ile Arg Asp Ile Leu Arg
20 25 30

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

Met Glu Thr Asp Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Ser Gln Gln Leu Ser Asn
50 55 60

Asp His Ile Cys Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr
65 70 75 80

Ile His Ser Ala Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu
85 90 95

Leu Ile Asn Thr Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala
100 105 110

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

Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys

130 135 140

Gly
145

```
<210> 30
<211> 435
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
```

```
<223> synthetic  
<400> 30  
gaggcaccaga cctactgcc a gaggacccctg agggagatcc agatcctgtc gaggttcagg 60
```

cacgagaacg tgatcgcat cagggacatc ctgagggcca gcaccctcga agccatgagg 120

gacgtgtaca tcgtgcagga cctgatggag accgacctgt acaagctgct gaaaagccag 180

cagctgagca acgaccacat ctgctacttc ctgtaccaga tcctgagggg cctgaagtac 240

atccacagcg ccaacgtgct gcacaggac ctgaagccca gcaacctct gatcaacacc 300

acctgtgacc tgaagatttgcgacttcggc ctggccagga tcgcccaccc cgagcacgac 360

cacaccggct tcctggccga ggccgtggcc accagatggt acagggcccc cgagatcatg 420

ctgaacagca agggc 435

<210> 31
<211> 469
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

```
<223> synthetic  
<400> 31  
gctagcgccg gcgagcacca gacctactgc cagaggaccc tgagggagat ccagatcctg 60
```

ctgagggtca ggcacgagaa cgtgatcgcc atcaggaca tcctgaggc cagcaccctc 120

gaagccatga gggacgtgta catcgtgcag gacctgatgg agaccgacct gtacaagctg 180

ctgaaaagcc agcagctgag caacgaccac atctgtact tcctgtacca gatcctgagg 240

ggcctgaagt acatccacag cgccaacgtg ctgcacaggg acctaagcc cagcaacctc 300

ctgatcaaca ccacctgtga cctgaagatt tgcgacttcg gcctggccag gatcgccac 360

cccgagcacg accacaccgg cttcctggcc gaggccgtgg ccaccagatg gtacagggcc 420

cccgagatca tgctgaacag caagggcccc gggggaggcg gaatcgatt 469

<210> 32

<211> 478

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 32

gctagcgcca ccatggccgg cgagcaccag acctactgcc agaggaccct gagggagatc 60

cagatcctgc tgaggttcag gcacgagaac gtgatggca tcagggacat cctgagggcc 120

agcaccctcg aagccatgag ggacgtgtac atcgtgcagg acctgtatgg gaccgacctg 180

tacaagctgc taaaaagcca gcagctgagc aacgaccaca tctgtactt cctgtaccag 240

atcctgaggg gcctgaagta catccacagc gccaacgtgc tgcacaggga cctgaagccc 300

agcaacctcc tcatcaaacac cacctgtgac ctgaagattt gcgacttcgg cctggccagg 360

atcgccgacc ccgagcacga ccacaccggc ttccctggccg agggccgtgg caccagatgg 420

tacagggccc ccgagatcat gctgaacagc aagggccccg ggggaggcg aatcgatt 478

<210> 33

<211> 84

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 33

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

Thr Arg Trp Arg Arg Pro Ala Ala Ala Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg
20 25 30

Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Phe Pro Gly Gly Gly Ala Asp Pro Asp
 35 40 45

His Asp His Thr Gly Phe Leu Ala Glu Ala Val Ala Thr Arg Trp Arg
50 55 60

Arg Pro Ala Ala Ala Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile
65 70 75 80

Leu Leu Arg Phe

<210> 34
<211> 252
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 34
ggcgaccccg accacgacca caccgggttc ctggggcagg ccgtggccac cagatggagg 60

aggccccccgg ccggcttactg ccagaggacc ctggggaga tccagatcct gctgggttc 120

ccccggggccg gggccggaccc cggaccacggac cacaccgggtt tcctggccga ggccgtggcc 180

accagatggc ggaggccccgc cggccctatc tggccagagga ccctgaggaa gatccatgtc 240

ctgactgaggt tc 252

<210> 35
<211> 286

<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 35

gctagcgccc gcgccgaccc cgaccacgac cacaccggc tcctggccga ggccgtggcc 60

accagatgga ggaggccgc cgccgcctac tgccagagga ccctgaggga gatccagatc 120

ctgctgaggt tccccggcgg cggcgccgac cccgaccacg accacaccgg ctccctggcc 180

gaggccgtgg ccaccagatg gaggagggcc gccgcccct actgccagag gaccctgagg 240

gagatccaga tcctgctgag gttcccccggg ggaggcggaa tcgatt 286

<210> 36
<211> 295
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 36

gctagcgcca ccatggccgg cgccgacccc gaccacgacc acaccggctt cctggccgag 60

gccgtggcca ccagatggag gaggccgcgccc gccgcctact gccagaggac cctgagggag 120

atccagatcc tgctgagggtt cccggcggc ggcgccgacc ccgaccacga ccacaccggc 180

ttcctggccg aggccgtggc caccagatgg aggaggcccg ccggcccta ctgccagagg 240

accctgaggg agatccagat cctgctgagg ttccccgggg gagggcggaat cgatt 295

<210> 37
<211> 393
<212> PRT
<213> human
<220>

<221> misc_feature
<222> (218)..(218)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature
<222> (222)..(222)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature
<222> (298)..(298)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature
<222> (300)..(300)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 37

Met Pro Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15

Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30

Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45

Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60

Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95

Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110

Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125

Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu

130	135	140
-----	-----	-----

His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg	145	150	155	160
---	-----	-----	-----	-----

Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly	165	170	175
---	-----	-----	-----

Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys	180	185	190
---	-----	-----	-----

Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp	195	200	205
---	-----	-----	-----

Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Xaa Met Ala Asn Xaa Phe Val	210	215	220
---	-----	-----	-----

Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met	245	250	255
---	-----	-----	-----

Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu	260	265	270
---	-----	-----	-----

Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro	275	280	285
---	-----	-----	-----

Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Xaa Ser Xaa Gly Met Asp Ser	290	295	300
---	-----	-----	-----

Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu	305	310	315	320
---	-----	-----	-----	-----

Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp	325	330	335
---	-----	-----	-----

Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
 340 345 350

Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
 355 360 365

Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
 370 375 380

Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
 385 390

<210> 38
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> synthetic
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (202)..(202)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (204)..(204)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 38

Met Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Gly Gly Gly Glu Pro Arg Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Gly Val Gly Pro Gly Val Pro Gly Glu Val Glu Met Val Lys
 20 25 30

Gly Gln Pro Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Gln Leu Gln Tyr Ile
 35 40 45

Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Ser Ser Ala Tyr Asp His Val Arg
 50 55 60

Lys Thr Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Ser Pro Phe Glu His Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Phe Arg
 85 90 95

His Glu Asn Val Ile Gly Ile Arg Asp Ile Leu Arg Ala Ser Thr Leu
 100 105 110

Glu Ala Met Arg Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp
 115 120 125

Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Ser Gln Gln Leu Ser Asn Asp His Ile Cys
 130 135 140

Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
 145 150 155 160

Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn Thr
 165 170 175

Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Ala Asp
 180 185 190

Pro Glu His Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg
 195 200 205

Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys
 210 215 220

Ser Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser
 225 230 235 240

Asn Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His

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

Ile Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile	260	265 270
---	-----	---------

Ile Asn Met Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ser Lys Thr	275	280 285
---	-----	---------

Lys Val Ala Trp Ala Lys Leu Phe Pro Lys Ser Asp Ser Lys Ala Leu	290	295 300
---	-----	---------

Asp Leu Leu Asp Arg Met Leu Thr Phe Asn Pro Asn Lys Arg Ile Thr	305	310 315 320
---	-----	-------------

Val Glu Glu Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro	325	330 335
---	-----	---------

Thr Asp Glu Pro Val Ala Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala Met Glu Leu	340	345 350
---	-----	---------

Asp Asp Leu Pro Lys Glu Arg Leu Lys Glu Leu Ile Phe Gln Glu Thr	355	360 365
---	-----	---------

Ala Arg Phe Gln Pro Gly Val Leu Glu Ala Pro	370	375
---	-----	-----

<210> 39

<211> 360

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> misc_feature

<222> (185)..(185)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (187)..(187)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 39

Met Ala Ala Ala Ala Ala Gly	Ala Gly Pro Glu Met Val Arg Gly
1	5
	10
	15

Gln Val Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Asn Leu Ser Tyr Ile Gly		
20	25	30

Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Cys Ser Ala Tyr Asp Asn Val Asn Lys		
35	40	45

Val Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Ser Pro Phe Glu His Gln Thr Tyr		
50	55	60

Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Ile Leu Leu Arg Phe Arg His			
65	70	75	80

Glu Asn Ile Ile Gly Ile Asn Asp Ile Ile Arg Ala Pro Thr Ile Glu		
85	90	95

Gln Met Lys Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp Leu		
100	105	110

Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys Tyr		
115	120	125

Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn		
130	135	140

Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Leu Asn Thr Thr			
145	150	155	160

Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp Pro		
165	170	175

Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg Trp

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

Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Ser	195	200
---	-----	-----

205

Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser Asn	210	215
---	-----	-----

220

Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile	225	230
---	-----	-----

235

240

Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile	245	250
---	-----	-----

255

Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys	260	265
---	-----	-----

270

Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp	275	280
---	-----	-----

285

Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val	290	295
---	-----	-----

300

Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser	305	310
---	-----	-----

315

320

Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp	325	330
---	-----	-----

335

Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala	340	345
---	-----	-----

350

Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser	355	360
---------------------------------	-----	-----

<210> 40

<211> 178

<212> PRT

<213> human
 <400> 40

Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val
 1 5 10 15

Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met
 20 25 30

Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu
 35 40 45

Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val
 50 55 60

Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser
 65 70 75 80

Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
 85 90 95

Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala
 100 105 110

Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp
 115 120 125

Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile
 130 135 140

Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys
 165 170 175

Glu Ile

<210> 41
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

 <223> synthetic
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 41

Gly Val Ser Gly Gly Leu Ile Asp Xaa Met Ala Asn Xaa Phe Val Gly
 1 5 10 15

Thr Arg Ser Tyr Met Ser
 20

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

 <223> synthetic
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 42

Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Xaa Ser Xaa Gly Met Asp Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

 <223> synthetic
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 43

Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg
 1 5 10 15

Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
 20 25

<210> 44
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

 <223> synthetic
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 44

Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
 1 5 10 15

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly
20

<210> 45
<211> 39
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<220>

<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 45

Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp Pro Asp His Asp His
1 5 10 15

Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
20 25 30

Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
35

<210> 46
<211> 174
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<220>

<221> misc_feature
<222> (122)..(122)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature

<222> (124)..(124)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 46

Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Ile Leu Leu Arg Phe Arg
 1 5 10 15

His Glu Asn Ile Ile Gly Ile Asn Asp Ile Ile Arg Ala Pro Thr Ile
 20 25 30

Glu Gln Met Lys Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp
 35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys
 50 55 60

Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
 65 70 75 80

Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Asn Thr
 85 90 95

Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp
 100 105 110

Pro Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala Thr Arg
 115 120 125

Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys
 130 135 140

Ser Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu
 165 170

<210> 47
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

 <223> synthetic
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (126)..(126)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (128)..(128)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 47

Glu His Gln Thr Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Phe Arg His Glu Asn Val Ile Gly Ile Arg Asp Ile Leu Arg
 20 25 30

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

Met Glu Thr Asp Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Ser Gln Gln Leu Ser Asn
 50 55 60

Asp His Ile Cys Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr
 65 70 75 80

Ile His Ser Ala Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu
 85 90 95

Leu Ile Asn Thr Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala
 100 105 110

Arg Ile Ala Asp Pro Glu His Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa
 115 120 125

Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys
130 135 140

Gly
145

<210> 48
<211> 19
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<220>

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220>

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 48

Ala Asp Pro Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Xaa Glu Xaa Val Ala
1 5 10 15

Thr Arg Trp

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 49

Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 50

Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

<210> 51
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> synthetic
<400> 51

Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
1 5 10 15

Tyr Trp Phe Tyr Arg
20