



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0071065
(43) 공개일자 2020년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A61K 35/22 (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 35/22 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7008265
(22) 출원일자(국제) 2018년08월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/048026
(87) 국제공개번호 WO 2019/040920
국제공개일자 2019년02월28일
- (30) 우선권주장
62/550,543 2017년08월25일 미국(US)
62/656,956 2018년04월12일 미국(US)

- (71) 출원인
코디악 바이오사이언시즈, 인크.
미국, 02140, 매사추세츠 캄브릿지, 스위트 500,
캠버리지파크 드라이브 35
- (72) 발명자
둘리, 케빈, 피.
미국 매사추세츠주 02139 캄브릿지, 테크놀로지
스퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크
하리슨, 레니, 에이.
미국 매사추세츠주 02139 캄브릿지, 테크놀로지
스퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인충현

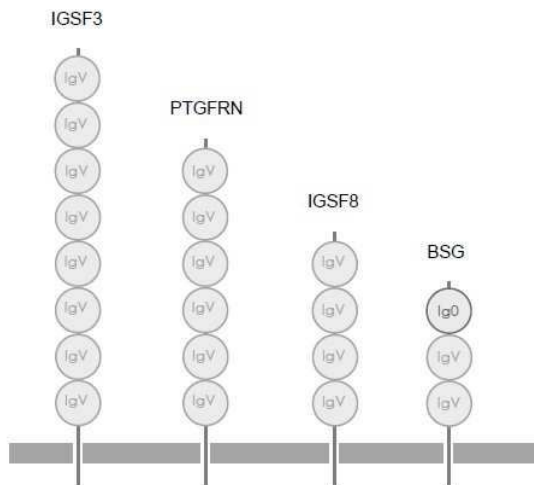
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 막 단백질을 사용한 치료용 엑소좀의 제조

(57) 요약

본 발명은 엑소좀의 표면 상에 풍부한 것으로 새로 식별된 단백질을 사용하여 치료용 엑소좀을 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 엑소좀의 친화성 정제를 위해서 단백질을 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 엑소좀 상에 치료 단백질을 국지화시키는 방법 및 단백질을 사용함으로써 특정 기관, 조직 또는 세포에 엑소좀을 표적화시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 엑소좀 단백질, 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편 중 1종 이상을 더 높은 밀도로 포함하는 표면-조작된 엑소좀을 생성시키는 것을 포함한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 14/70503 (2013.01)

C07K 14/70596 (2013.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C12N 2509/10 (2013.01)

(72) 발명자

매코닐, 러셀, 이.

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

쥬, 케

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

하우드, 다미안

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

로스, 니키

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

하우트, 소나

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

쿨만, 존, 디.

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

윌리엄스, 더글라스, 이.

미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지, 테크놀로지 스
퀘어 500, 9층, 코디악 바이오사이언시즈, 인크

명세서

청구범위

청구항 1

엑소좀(exosome)을 분리시키는 방법으로서,

상기 엑소좀을 포함하는 샘플을 제공하는 단계;

상기 샘플을 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 결합제와 접촉시키는 단계로서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체(transporter) 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 상기 접촉시키는 단계; 및

상기 표적 단백질과 상기 결합제 간의 결합에 기초하여 상기 엑소좀을 분리시키는 단계를 포함하는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 샘플은 시험관내에서 성장된 세포로부터 획득되고, 선택적으로 상기 세포는 HEK293 세포인, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 샘플은 대상체의 체액으로부터 획득되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 세포는 상기 표적 단백질을 발현하도록 유전자 변형되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 5

제2항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포는 상기 표적 단백질을 암호화하는 발현 플라스미드를 포함하는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 세포는 상기 결합제에 대한 친화성을 갖는 태그를 발현하는 외인성 서열을 포함하도록 유전자 변형되고, 상기 외인성 서열은 상기 세포의 게놈에 삽입되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 내인성 서열의 3' 또는 5' 단부에 위치된 게놈 부위에 삽입되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 내인성 서열 내에 위치된 게놈 부위에 삽입되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 표적 단백질은 상기 태그, 및 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 융합 단백질인, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형되는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엑소솜은 상기 표적 단백질을 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 및 ATP 수송체로부터 선택되는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체의 단편 또는 변이체를 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질이되, 상기 친화성 태그는 결합제에 대한 친화성을 갖는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 결합제는 면역글로불린, 단백질, 펩타이드 또는 소분자를 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 고체 지지체에 부착되되, 선택적으로 상기 고체 지지체는 다공성 아가로스 비드, 마이크로타이터 플레이트, 자성 비드, 또는 막을 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 고체 지지체는 크로마토그래피 칼럼을 형성하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 샘플을 상기 결합제와 접촉시키는 단계는 상기 샘플을 상기 크로마토그래피 칼럼에 적용함으로써 수행되는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플의 하위셋을 상이한 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 상이한 결합제와 접촉시키는 단계; 및

상기 상이한 표적 단백질과 상기 상이한 결합제 간의 결합에 기초하여 상기 엑소솜을 분리시키는 단계를 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상이한 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 엑소솜을 분리시키는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상이한 표적 단백질은 PTGFRN 또는 이의 단편 또는 변이체를

포함하는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 상이한 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함하는, 엑소좀을 분리시키는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해서 생산된, 엑소좀.

청구항 25

제24항의 엑소좀 및 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 상기 샘플보다 더 낮은 농도의 거대분자를 포함하되, 상기 거대분자는 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물 또는 이들의 조합물인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 상기 거대분자가 실질적으로 존재하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 28

표적 단백질을 포함하는 엑소좀으로서, 상기 표적 단백질의 적어도 일부는 외인성 서열로부터 발현되고, 그리고 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF8, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이들의 단편 또는 변이체를 포함하는, 엑소좀.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 표적 단백질은 상이한 엑소좀의 상이한 표적 단백질보다 더 높은 밀도로 상기 엑소좀의 상기 표면 상에 존재하고, 상기 상이한 표적 단백질은 종래의 엑소좀 단백질 또는 이들의 변이체를 포함하는, 엑소좀.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 종래의 엑소좀 단백질은 CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI 앵커(anchor) 단백질, 락타드헤린(lactadherin), LAMP2, LAMP2B 및 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 엑소좀.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함하는, 엑소좀.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질과 결합제 간의 결합에 기초하여 분리되는, 엑소좀.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 서열을 포함하도록 유전자 변형된 세포로부터 생산되, 선택적으로 상기 세포는 HEK293 세포인, 엑소좀.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 세포는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형되는, 엑소좀.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 세포는 상기 외인성 서열을 포함하는 플라스미드를 포함하는, 엑소좀.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 상기 세포의 계놈 내에 삽입된 상기 외인성 서열을 포함하는, 엑소좀.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 계놈 서열의 3' 또는 5' 단부에 위치된 계놈 부위 내에 삽입되는, 엑소좀.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 계놈 서열 내에 삽입되는, 엑소좀.

청구항 39

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질이되, 상기 친화성 태그는 결합제에 대한 친화성을 갖는, 엑소좀.

청구항 40

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 치료용 펩타이드를 포함하는 융합 단백질인, 엑소좀.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 자연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 치료 화합물에 대한 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는, 엑소좀.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 치료 화합물은 뉴클레오타이드, 아미노산, 지질, 탄수화물 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 엑소좀.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체인, 엑소좀.

청구항 44

제40항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 효소, 리간드, 수용체, 또는 이의 단편 또는 변이체인, 엑소좀.

청구항 45

제40항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 항미생물성 펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체인, 엑소좀.

청구항 46

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 표적화 모이어티를 포함하는 융합 단백질인, 엑소좀.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 기관, 조직 또는 세포에 대해서 특이적인, 엑소좀.

청구항 48

제28항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 표적 단백질을 더 포함하되, 상기 상이한 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 엑소좀.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 상이한 표적 단백질과 상이한 결합제 간의 결합에 기초하여 분리되는, 엑소좀.

청구항 50

제28항 내지 제49항 중 어느 한 항의 엑소좀 및 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 거대분자가 실질적으로 존재하지 않되, 상기 거대분자는 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물 및 이들의 조합물로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 52

제28항 내지 제49항 중 어느 한 항의 엑소좀을 생산하기 위한 세포주.

청구항 53

엑소좀을 생산하기 위한 세포주로서, PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF2, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 게놈 서열 내에 삽입된 외인성 서열을 포함하되, 상기 외인성 서열 및 상기 게놈 서열은 융합 단백질을 암호화하는, 세포주.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 외인성 서열은 친화성 태그를 암호화하는, 세포주.

청구항 55

제53항에 있어서, 상기 외인성 서열은 치료용 펩타이드를 암호화하는, 세포주.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 자연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 치료 화합물에 대한 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포주.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 치료 화합물은 뉴클레오타이드, 아미노산, 지질, 탄수화물 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포주.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체인, 세포주.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 효소, 리간드, 수용체, 또는 이의 단편 또는 변이체인, 세포주.

청구항 60

제55항에 있어서, 상기 치료용 펩타이드는 항미생물성 펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체인, 세포주.

청구항 61

제53항에 있어서, 상기 외인성 서열은 표적화 모이어티를 암호화하는, 세포주.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 기관, 조직 또는 세포에 대해서 특이적인, 세포주.

청구항 63

제53항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포주는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형된, 세포주.

청구항 64

제53항 내지 제63항 중 어느 한 항의 세포주로부터 생산된 엑소좀.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 엑소좀은 상이한 엑소좀의 표면 상의 상이한 융합 단백질보다 더 높은 밀도로 표면 상에 상기 융합 단백질을 포함하되, 상기 상이한 엑소좀은 종래의 엑소좀 단백질을 암호화하는 상이한 게놈 서열 내에 삽입된 상기 외인성 서열을 포함하는 상이한 세포주로부터 생산되고, 상기 외인성 서열 및 상기 상이한 게놈 서열은 상기 상이한 융합 단백질을 암호화하는, 엑소좀.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 종래의 엑소좀 단백질은 CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI 앵커 단백질, 락타드헤린 (lactadherin), LAMP2, LAMP2B 및 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 엑소좀.

청구항 67

비-엑소좀성 물질(non-exosomal material)을 분리시키는 방법으로서,

엑소좀 및 비-엑소좀 물질을 포함하는 샘플을 제공하는 단계;

상기 샘플을 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 결합제와 접촉시킴으로써 상기 엑소좀이 상기 결합제에 결합하는 것을 유도하는 단계로서, 상기 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 상기 유도하는 단계; 및

상기 비-엑소좀 물질을 분리시키는 단계를 포함하는, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 비-엑소좀성 물질은 바이러스 또는 단백질인, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 비-엑소좀성 물질은 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노-연관 바이러스 또는 다른 외피 보유(enveloped) 또는 외피 비보유(non-enveloped) 바이러스인, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, 상기 비-엑소좀성 물질은 재조합 단백질인, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 71

제67항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분리된 비-엑소좀성 물질은 엑소좀이 실질적으로 존재하지 않는, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 72

제67항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 단백질은 친화성 태그를 더 포함하되, 상기 친화성 태그는 상기 결합제에 대한 친화성을 갖는, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 73

제67항 내지 제72항 중 어느 한 항항에 있어서, 상기 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함하는, 비-엑소좀성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 74

제67항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 면역글로불린, 단백질, 펩타이드 또는 소분자를 포함하는, 비-엑소솜성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 75

제67항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합제는 고체 지지체에 부착되되, 선택적으로 상기 고체 지지체는 다공성 아가로스 비드, 마이크로타이터 플레이트, 자성 비드, 또는 막을 포함하는, 비-엑소솜성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 고체 지지체는 크로마토그래피 칼럼을 형성하는, 비-엑소솜성 물질을 분리시키는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 샘플을 상기 결합제와 접촉시키는 상기 단계는 상기 샘플을 상기 크로마토그래피 칼럼에 적용함으로써 수행되는, 비-엑소솜성 물질을 분리시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

서열 목록

[0002]

본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되고, 전문이 참고로 본 명세서에 포함된 서열 목록을 포함한다. 2018년 8월 22일자로 생성된 상기 ASCII 복사본은 파일명이 40714PCT_CRF_sequencelisting.txt이고, 크기가 175,092바이트이다.

배경 기술

[0003]

엑소솜(exosome)은 세포간 의사소통의 중요한 매개인자이다. 이것은 또한 다수의 질환, 예컨대, 암의 진단 및 예후의 중요한 바이오마커이다. 약물 전달 비히클인 엑소솜은 다수의 치료 분야에서 새로운 치료 양상으로서 전통적인 약물 전달 방법보다 다수의 이점을 제공한다.

[0004]

치료 목적을 위한 엑소솜의 사용은, 엑소솜이 오염 단백질, DNA, 탄수화물 및 지질을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 불순물이 존재하지 않거나 거의 존재하지 않을 것이 요구된다. 현재 정제 방법은 상당한 양의 이러한 불순물을 제거하기에 충분한 선택성을 제공하지 않아서 순도를 개선시키기 위해서 추가 공정이 필요하다.

[0005]

추가로, 엑소솜이 인간 질환의 치료에 보다 빈번하게 사용됨에 따라서, 임상적 예측을 충족시키기 위해서 노력하고 있는데, 그 이유는 분자 표적화, 면역 회피 및 제어된 약물 방출을 부여하는 이의 물리화학적 파라미터의 이질성(heterogeneity) 때문이다. 이는 주로 엑소솜 특성(예를 들어, 조성, 크기, 형상, 강성(rigidity), 표면 전하, 친수성, 안정성 및 리간드 유형 및 밀도), 페이로드 특성(payload property)(예를 들어, 약물 유형, 용해도, 로딩, 효력, 투여량, 면역반응 및 방출 동역학), 및 엑소솜 통과에 대한 생체내의 생리학적 장벽(예를 들어, 면역 감시, 입자 유출(extravasation), 조직 표적화, 조직 관통, 및 세포 흡수)의 이질성 및 복잡성으로 인한 것이다. 상당히 노력하였지만, 목적하는 특성을 갖는 치료용 엑소솜, 예를 들어, 치료용 페이로드를 함유하고, 적절한 표적화 모이더티를 갖는 엑소솜의 별개의 하위 집단을 얻기 위한 효과적인 방법은 아직 쉽게 입수 가능하지 않다.

[0006]

엑소솜 기반 기술의 치료 용도 및 다른 응용을 보다 양호하게 가능하게 하기 위해서 엑소솜의 별개의 하위 집단을 생성, 분리 및 정제시키기 위한 적합한 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0007]

본 발명의 양상은 치료 용도를 위한 엑소솜의 신규 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 방법은 엑소솜의 표면 상에 풍부한 것으로 새로 식별된 표면 마커를 사용한다. 특히, 단백질(예를 들어, 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(prostaglandin F2 receptor negative regulator: PTGFRN); basigin(BSG); 면역글로불린 슈퍼패

밀리 구성원 2(immunoglobulin superfamily member 2: IGSF2); 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3); 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8); 인테그린 베타-1(ITGB1); 인테그린 알파-4(ITGA4); 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2); 및 ATP 수송체(transporter) 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4))의 군이 엑소좀의 표면 상에 상당히 풍부한 것으로 식별되었다.

[0008] 새로-식별된 단백질은 본 발명의 다양한 실시형태에서 사용될 수 있다. 본 발명의 일 양상은 새로-식별된 엑소좀 단백질 및 치료 단백질을 접합시킴으로써 융합 단백질을 생성시키고, 표면 상에 융합 단백질을 함유하는 조작된 엑소좀을 제조하는 것에 관한 것이다. 치료 단백질의 네이티브 전장 또는 생물학적 활성 단편은 엑소좀-풍부 단백질에 접합됨으로써 엑소좀의 표면에 이송될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 새로-식별된 엑소좀 단백질을 사용하는 방법은, 관련 기술분야에 공지된 일부 다른 엑소좀 스캐폴드 단백질(예를 들어, Lamp2B, PDGFR, 락타드헤린(lactadherin) CD9, CD63 및/또는 CD81 또는 이의 단편)을 사용하는 방법보다, 표면 조작된 엑소좀의 생산에 있어서 더 양호하다. 이론에 얽매이지 않음은 아니지만, 새로-식별된 단백질은 보다 양호하다고 여겨지는데, 그 이유는 관련 기술 분야에 공지된 몇몇 엑소좀 스캐폴드 단백질, 즉, 테트라스판닌(tetraspannin) 단백질, 예컨대, CD9, CD63 및 CD81이 엑소좀 내강(lumen)에서 이의 C-말단 및 N-말단 둘 모두를 갖기 때문이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양상은 모든 엑소좀에 공통적이거나 또는 단세포 유형으로부터 유래된 모든 엑소좀에 공통적인 엑소좀 단백질을 사용하여 불균질 용액, 예컨대, 세포 배양 배지 또는 플라즈마로부터의 친화성 정제에 의해서 엑소좀을 정제시키는 것에 관한 것이다. 일부 실시형태는 엑소좀의 하위 집단에 특이적인 표면 마커를 사용함으로써 전체 엑소좀으로부터 엑소좀의 하위 집단을 분리시키는 것에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 양상은 엑소좀이 오염 생성물일 때 샘플로부터 엑소좀을 제거하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 자연 또는 조작된 바이러스는 오염 엑소좀으로부터 정제될 수 있다. 따라서 본 명세서에 기재된 엑소좀 단백질은, 유사한 크기, 형상 및/또는 전하의 다른 입자가 목적하는 생성물인 생물학적 공정으로부터 엑소좀을 선택적으로 제거하는 데 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양상은 보다 효율적인 친화성 정제를 위해서 또는 표면 상의 표적화 모이어티 또는 치료적으로 관련된 단백질의 제시를 위해서 설계된 표면-조작된 엑소좀의 생성 또는 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 엑소좀 표면은 표면 상에 네이티브 전장 엑소좀 단백질 및/또는 네이티브 엑소좀 단백질의 단편 또는 변형된 단백질을 더 높은 밀도로 함유하도록 변형될 수 있다.

[0012] 본 발명 추가로 이러한 표면-조작된 엑소좀을 생산하기 위한 생산자(producer) 세포 또는 생산자 세포의 생성 방법에 관한 것이다. 외인성 폴리뉴클레오타이드를 생산자 세포에 일시적으로 또는 안정적으로 도입하여 생산자 세포가 표면-조작된 엑소좀을 생성시키도록 할 수 있다.

[0013] 구체적으로, 본 발명의 양상은 엑소좀을 분리시키는 방법에 관한 것이며, 이 방법은, (1) 엑소좀을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (2) 샘플을 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 결합제와 접촉시키는 단계로서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 상기 접촉시키는 단계; 및 (3) 표적 단백질과 결합제 간의 결합에 기초하여 상기 엑소좀을 분리시키는 단계를 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 샘플은 시험관내에서 성장된 세포로부터 획득되고, 선택적으로 여기서 세포는 HEK293 세포, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포 또는 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell: MSC)이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 대상체의 체액으로부터 획득된다.

[0015] 일부 실시형태에서, 세포는 표적 단백질을 발현하도록 유전자 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포는 표적 단백질을 암호화하는 발현 플라스미드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 결합제에 대한 친화성을 갖는 태그를 발현하는 외인성 서열을 포함하도록 유전자 변형되고, 여기서 외인성 서열은 세포의 게놈에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 외인성 서열은 TGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 내인성 서열의 3' 또는 5' 단부에 위치한 게놈 부위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 내인성 서열은 IGSF8을 암호화하지 않는다. 일부 실시형태에서, 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 내인성 서열 내에 위치한 게놈 부위에 삽입된다.

[0016] 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 태그, 및 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 표적 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편 또는 변형이 아니다. 일부 실시형태에서,

세포는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형된다.

- [0017] 일부 실시형태에서, 엑소솜은 표적 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 및 ATP 수송체로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질이고, 여기 친화성 태그는 결합제에 대한 친화성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편 또는 변형을 포함하지 않는다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 결합제는 면역글로불린, 단백질, 펩타이드 또는 소분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합제는 고체 지지체에 부착되고, 선택적으로 여기서 고체 지지체는 다공성 아가로스 비드, 마이크로타이터 플레이트, 자성 비드, 또는 막을 포함한다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 고체 지지체는 크로마토그래피 칼럼을 형성한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 결합제와 접촉시키는 단계는 샘플을 크로마토그래피 칼럼에 적용함으로써 수행된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 방법은, (1) 샘플의 하위세트를 상이한 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 상이한 결합제와 접촉시키는 단계; 및 (2) 상이한 표적 단백질과 상이한 결합제 간의 결합에 기초하여 엑소솜을 분리시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상이한 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상이한 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양상은 본 명세서에 제공된 방법에 의해서 생산된 엑소솜에 관한 것이다.
- [0022] 추가의 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 엑소솜 및 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 엑소솜 공급원을 포함하는 샘플보다 더 낮은 농도의 거대분자를 포함하고, 여기서 거대분자는 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물 또는 이들의 조합물이다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 거대분자가 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양상은 표적 단백질을 포함하는 엑소솜에 관한 것이며, 여기서 표적 단백질의 적어도 일부는 외인성 서열로부터 발현되고, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 엑소솜은 표적 단백질과 결합제 간의 결합에 기초하여 분리된다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 엑소솜은 외인성 서열을 포함하도록 유전자 변형된 세포로부터 생산되고, 선택적으로 여기서 세포는 HEK293 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 간엽 줄기세포(MSC)이다. 일부 실시형태에서, 세포는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형된다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 세포는 외인성 서열을 포함하는 플라스미드를 포함한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 세포는 세포의 게놈 내에 삽입된 외인성 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 게놈 서열의 3' 또는 5' 단부에 위치한 게놈 부위 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 게놈 서열 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 외인성 서열은 IGSF8을 암호화하지 않는다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질이고, 여기 친화성 태그는 결합제에 대한 친화성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편을 포함하지 않는다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 치료용 펩타이드를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편을 포함하지 않는다.
- [0030] 치료용 펩타이드는 자연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 치료 화합물에 대한 링커로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 치료 화합물은 뉴클레오타이드, 아미노산, 지질, 탄수화물 및 소분자로 이루어진

군으로부터 선택될 수 있다.

- [0031] 치료용 펩타이드는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 치료용 펩타이드는 효소, 리간드, 수용체, 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 치료용 펩타이드는 항미생물성 펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 표적화 모이어티를 포함하는 융합 단백질이다. 표적화 모이어티는 기관, 조직 또는 세포에 특이적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편을 포함하지 않는다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 엑소솜은 제2의 상이한 표적 단백질을 추가로 포함하고, 여기서 상이한 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소솜은 상이한 표적 단백질과 상이한 결합제 간의 결합에 기초하여 분리된다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편을 포함하지 않는다.
- [0034] 일 양상에서, 본 발명은 본 발명의 엑소솜 및 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 거대분자가 실질적으로 존재하지 않고, 여기서 거대분자는 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물 및 이들의 조합물로부터 선택된다.
- [0036] 일 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 제공된 엑소솜을 생산하기 위한 세포에 관한 것이다.
- [0037] 구체적으로, 일부 실시형태는 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 암호화하는 게놈 서열 내에 삽입된 외인성 서열을 포함하는, 엑소솜을 생산하기 위한 세포에 관한 것이며, 여기서 외인성 서열 및 게놈 서열은 융합 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 게놈 서열은 IGSF8을 암호화하지 않는다.
- [0038] 외인성 서열은 친화성 태그를 암호화할 수 있다.
- [0039] 외인성 서열은 치료용 펩타이드를 암호화할 수 있다. 치료용 펩타이드는 자연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 치료 화합물에 대한 링커로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 치료 화합물은 뉴클레오타이드, 아미노산, 지질, 탄수화물 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 치료용 펩타이드는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 치료용 펩타이드는 효소, 리간드, 수용체, 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 치료용 펩타이드는 항미생물성 펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다.
- [0040] 외인성 서열은 표적화 모이어티를 암호화할 수 있다. 표적화 모이어티는 기관, 조직 또는 세포에 특이적일 수 있다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 세포주는 ADAM10의 감소된 발현을 갖도록 유전자 변형된다.
- [0042] 일 양상에서, 본 발명은 본 발명의 세포주로부터 생산된 엑소솜을 제공한다. 일부 실시형태에서, 엑소솜은 상이한 엑소솜의 표면 상의 상이한 융합 단백질보다 더 높은 밀도로 표면 상에 융합 단백질을 포함하고, 여기서 상이한 엑소솜은 종래의 엑소솜 단백질을 암호화하는 상이한 게놈 서열 내에 삽입된 외인성 서열을 포함하는 상이한 세포주로부터 생산되고, 여기서 외인성 서열 및 상이한 게놈 서열은 상이한 융합 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 종래의 엑소솜 단백질은 CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI 앵커 단백질, LAMP2, LAMP2B 및 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0043] 또 다른 양상에서, 본 발명은 비-엑소솜성 물질(non-exosomal material)을 분리시키는 방법에 관한 것이며, 이 방법은, 엑소솜 및 비-엑소솜 물질을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 샘플을 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 결합제와 접촉시킴으로써 엑소솜이 결합제에 결합하는 것을 유도하는 단계로서, 여기서 표적 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 상기 유도하는 단계; 및 비-엑소솜 물질을 분리시키는 단계를 포함한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 비-엑소솜성 물질은 바이러스 또는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 비-엑소솜성 물질은 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노-연관 바이러스 또는 다른 외피 보유(enveloped) 또는 외피 비보유(non-enveloped) 바이러스이다. 일부 실시형태에서, 비-엑소솜성 물질은 재조합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 분리된 비-엑소솜성 물질은 엑소솜이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 친화성 태그를 더 포함하고, 상기 친화성 태그는 상기 결합제에 대한 친화성

을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적 단백질은 서열번호 33의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합체는 면역글로불린, 단백질, 펩타이드 또는 소분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합체는 고체 지지체에 부착되고, 선택적으로 여기서 고체 지지체는 다공성 아가로스 비드, 마이크로타이터 플레이트, 자성 비드, 또는 막을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고체 지지체는 크로마토그래피 칼럼을 형성한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 결합체와 접촉시키는 단계는 샘플을 크로마토그래피 칼럼에 적용함으로써 수행된다.

[0046] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 정제 방법은 나노소포(nanovesicle)의 정제를 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 나노소포에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도면은 단지 예시의 목적을 위해서 본 발명의 다양한 실시형태를 도시한다. 당업자는 본 명세서에 예시된 구조 및 방법의 대안적인 실시형태가 본 명세서에 기재된 본 발명의 원칙으로부터 벗어나지 않으면서 사용될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다.

도 1은 초원심분리 후 샘플-함유 Optiprep^(상표명) 밀도 구배의 영상을 제공한 도면. 엑소좀을 함유하는 상부 분획("상부"), 세포 부스러기를 함유하는 중간 분획("중간") 및 고밀도 응집물 및 세포 부스러기를 함유하는 하부 분획("하부")을 괄호로 표시한다.

도 2는 Optiprep^(상표명) 초원심분리의 상부 분획으로부터 식별된 단백질(Y축) 및 하부 분획(X축)으로부터 식별된 단백질을 나타내는 점-그래프. 점선 위에 플로팅된 단백질은 엑소좀-풍부 단백질을 나타내는 반면, 점선 아래의 단백질은 엑소좀에 특이적이지 않은 단백질을 나타낸다.

도 3은 PTGFRN(서열번호 1)의 트립신 처리(tryptic) 펩타이드 커버리지 맵을 제공한, 도면.

도 4는 IGSF8(서열번호 14)의 트립신 처리 펩타이드 커버리지 맵을 제공한 도면.

도 5는 Basigin(BSG)(서열번호 9)의 트립신 처리 펩타이드 커버리지 맵을 제공한 도면.

도 6A는 HEK293 세포로부터 수집된 전체 세포 용해물(좌측) 및 정제된 엑소좀 집단(우측)의 단백질 블로팅으로부터의 사진을 나타낸 도면. 도 6B는 PTGFRN에 대한 항체를 사용한 도 6A에 제공된 겔의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸 도면. 우측 칼럼 상에서 검출된 밴드는 도 6A의 약 110kDa에서의 밴드에 상응한다.

도 7A는 자가-형성 Optiprep^(상표명) 구배를 사용한 정제로부터 수집된 12개의 분획의 단백질 블로팅을 나타낸 도면. 도 7B는 ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF3, IGSF8, Basigin, Alix 또는 Syntenin에 대한 항체를 사용한 도 7A에 제시된 겔의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸 도면. 신규 엑소좀 표면 단백질(ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, Basigin) 각각은 널리 공지된 엑소좀 마커 단백질(Alix, Syntenin)과 동일한 분획에서 검출된다.

도 8은 예를 들어, 엑소좀의 표면 상의 융합 단백질의 표적화를 위해서 또는 엑소좀의 친화성 정제를 위한 표적으로서, 본 발명의 다양한 실시형태를 위해서 사용되는 엑소좀 표면 단백질(ITGA4, ITGB1, PTGFRN, IGSF8, BSG)을 도시한 도면.

도 9A는 PTGFRN의 IgV 도메인의 경계(화살표) 및 C 말단에 융합된 GFP의 식별과 함께 PTGFRN의 구조를 도시한 도면. 도 9B는 다양한 GFP-PTGFRN 융합 단백질을 과발현하는 세포 배양물로부터 단리된 엑소좀의 웨스턴 블로팅으로부터의 겔 사진을 제공한 도면. GFP-PTGFRN 융합 단백질은 GFP에 대한 항체를 사용하여 검출되었다.

도 10은 다양한 GFP-PTGFRN 융합 단백질을 과발현하는 세포로부터 단리된 정제된 엑소좀의 전체 단백질을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면.

도 11A는 PTGFRN의 IgV 도메인의 경계(화살표) 및 N 말단에 융합된 FLAG의 식별과 함께 PTGFRN의 구조를 도시한 도면. 도 11B는 다양한 FLAG-PTGFRN 융합 단백질을 과발현하는 세포 배양물로부터 단리된 엑소좀의 웨스턴 블로팅으로부터의 겔 사진을 제공한 도면. GFP-PTGFRN 융합 단백질은 FLAG 태그에 대한 항체를 사용하여 검출되었다.

도 12A는 야생형 세포(ADAM10+) 또는 ADAM10 녹아웃 세포(knockout cell)(ADAM10-)로부터 단리된 정제된 엑소좀의 전체 단백질을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면(각각의 세포는 전장 PTGFRN(PTGFRN-GFP) 또는 절두된 PTGFRN(PTGFRN_IgV3-GFP)을 함유하는 GFP 융합 단백질을 발현함). 도 12B는 ADAM10에 대한 항체를 사용하여 도 12A의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면. 도 12C는 GFP에 대한 항체를 사용하여 도 12A의 샘플을

웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 13은 6개의 IgV 도메인 중 5개가 결핍된 PTGFRN을 함유하는 융합 단백질(PTGFRN-IgV6), FLAG 태그, 및 융합 파트너 단백질의 구조를 도시한 도면.

도 14A는 PTGFRN-IgV6의 서열(#451)(서열번호 42) 및 4개의 추가 아미노산이 결핍된(#452)(서열번호 43), 8개의 추가 아미노산이 결핍된(#453)(서열번호 44) 또는 12개의 추가 아미노산이 결핍된 PTGFRN-IgV6(#454)(서열번호 45)의 연속 절두 돌연변이의 서열을 제공한 도면. **도 14B**는 융합 단백질 #451, 452, 453 또는 454를 과발현하는 세포로부터 단리된 정제된 엑소좀의 전체 단백질을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면. **도 14C**는 FLAG에 대한 항체를 사용하여 도 14B의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 도면을 제공한 도면.

도 15는 다양한 GFP 융합 단백질을 과발현하는 세포로부터 단리된 엑소좀으로부터 검출된 GFP 형광 신호를 제공한 도면(GFP 융합 단백질은 빈번하게 사용되는 pDisplay 스캐폴드(PDGF 수용체), PalmPalm(팔미토일화(palmitoylation) 서열), CD81, 또는 전장 PTGFRN(FL) 또는 PTGFRN_454(sIgV) 중 어느 하나의 내강 면에 융합된 GFP를 함유함).

도 16A는 IGSF8 및 IGSF8의 C 말단에 융합된 GFP를 함유하는 융합 단백질의 구조를 도시한 도면. **도 16B**는 형질 주입되지 않은 HEK293 세포(네이티브) 또는 IGSF8-GFP 융합 단백질을 암호화하는 작제물이 안정적으로 형질주입된 HEK 세포로부터 단리된 엑소좀으로부터의 전체 단백질을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면. **도 16B**는 하단에 GFP에 대한 항체를 사용하여 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 도면을 또한 제공한다.

도 17는 다양한 GFP 융합 단백질을 과발현하는 세포로부터 단리된 엑소좀으로부터 검출된 GFP 형광 신호를 제공한 도면(GFP 융합 단백질은 빈번하게 사용되는 pDisplay 스캐폴드(PDGF 수용체), CD81, 전장 IGSF8, 또는 전장 PTGFRN(FL) 또는 PTGFRN_454(sIgV) 중 어느 하나의 내강 면에 융합된 GFP를 함유함).

도 18은 PTGFRN의 세포외 도메인(세포외 도메인: ECD), N 말단에서의 내인성 신호 펩타이드(SP), PAR1 절단 부위, 및 C-말단에서의 Fc 도메인을 함유하는 융합 단백질의 구조를 제공한 도면. 도 18은 서열번호 46을 개시한다.

도 19A는 280nm의 UV 형광에서 Superdex 200 칼럼(밀포어 시그마사(Millpore Sigma))을 사용하여 PBS pH 7.4 중에서 PTGFRN의 정제된 ECD의 겔 여과 크로마토그래피 결과를 제공한 도면. **도 19B**는 PTGFRN의 정제된 ECD를 함유하는 용해물의 겔 여과 크로마토그래피로부터의 SDS-PAGE 겔 사진을 제공한 도면.

도 20A는 PTGFRN ECD, 항-VLA4 항체 및 BSA의 크기 배제 크로마토그래피/다각 광산란(size exclusion chromatography/multiangle light scattering: SEC-MALS) 결과를 제공한 도면. **도 20B**는 구아니디늄 클로라이드(GuHCl)의 부재 또는 1M 또는 2M의 구아니디늄 클로라이드(GuHCl)의 존재 하에서의 PTGFRN ECD의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 결과를 제공한 도면. PTGFRN의 단량체 또는 이량체를 나타낸 피크가 제시된다.

도 21은 pH 7.4에서 결합 검정으로부터의 PTGFRN 엑토도메인 결합 파트너로서 식별된 상위 3개의 히트(상단), 및 pH 5.6에서 결합 검정으로부터 식별된 상위 5개의 히트(하부)를 제공한 도면.

도 22는 증가하는 농도의 LGALS1의 존재 하에서 PTGFRN과 LGALS1 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(bio-layer interferometry: BLI) 결과를 제공한 도면.

도 23은 증가하는 농도의 락토스의 존재 하에서 PTGFRN과 LGALS1 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 24는 증가하는 농도의 항-CD315 항체의 존재 하에서 PTGFRN과 항-CD315 항체 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 25는 증가하는 농도의 HEK293로부터 단리된 네이티브 엑소좀의 존재 하에서 항-CD315 항체와 네이티브 엑소좀 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 26은 증가하는 농도의 변형된 엑소좀의 존재 하에서 항-CD315 항체와 PTGFRN을 과발현하도록 변형된 엑소좀(PTGFRN++ 엑소좀) 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 27은 항-CD315 항체와 네이티브 엑소좀 간의 상호작용 또는 항-CD315 항체와 PTGFRN을 과발현하도록 변형된 엑소좀(PTGFRN++) 간의 상호작용을 비교하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 28은 항-CD315 항체와 전장 PTGFRN 간의 상호작용 또는 항-CD315 항체와 PTGFRN의 일련의 절두된 돌연변이체

간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 29A는 형질주입된 HEK 세포로부터 단리된 재조합 PTGFRN의 절두된 돌연변이체, 및 HEK293 세포로부터의 정제된 엑소좀을 포함하는 생체내 바이오틴일화된 단백질을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면. **도 29B**는 풀링된 다클론성 PTGFRN 항체를 사용하여 도 29A의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 30은 다클론성 PTGFRN 항체와 PTGFRN의 다양한 절두 돌연변이체 간의 상호작용을 연구하기 위한 생물층 간섭계법(BLI) 결과를 제공한 도면.

도 31은 상이한 기원(HEK293SF, 신장; HT1080, 결합 조직; K562, 골수; MDA-MB-231, 유방; Raji, 림프아구; 간엽 줄기세포(MSC), 골수)의 다양한 세포주로부터 정제된 엑소좀에 대한 표면 단백질(PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 및 CD9)의 펩타이드 스펙트럼 매치(peptide spectrum match: PSM)의 수를 제공한 도면.

도 32A는 네이티브 엑소좀 및 PTGFRN 녹아웃(KO) 엑소좀을 전개시킨 겔 사진을 제공한 도면. **도 32B**는 풀링된 다클론성 PTGFRN 항체를 사용하여 도 32A의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 33은 정제된 네이티브(y축) 및 PTGFRN KO(x축) 엑소좀으로부터의 펩타이드 스펙트럼 매치(PSM)의 산포도를 제공한 도면.

도 34는 다클론성 항-CD315 항체와 네이티브, PTGFRN++, 및 PTGFRN KO 엑소좀 간의 상호작용을 연구하기 위한 BLI 결과를 제공한 도면.

도 35A는 고정된 다클론성 항-PTGFRN 항체를 사용한 네이티브 엑소좀 및 PTGFRN 녹아웃(KO) 엑소좀의 시험관내 엑소좀 정제로부터의 폴리아크릴아마이드 겔의 사진을 제공한 도면. **도 35B**는 항-PTGFRN 항체를 사용하여 도 35A의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 도면을 제공한 도면.

도 36A는 네이티브 엑소좀 또는 PTGFRN-BDDFIII을 발현하도록 조작된 변형된 엑소좀을 전개시킨 폴리아크릴아마이드 겔의 사진을 제공한 도면. **도 36B**는 CD81 항체(상단) 또는 FVIII 항체(하단)를 사용하여 도 36A로부터의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 37A는 네이티브 엑소좀 또는 XTEN-PTGFRN-GFP를 발현하도록 조작된 변형된 엑소좀을 전개시킨 폴리아크릴아마이드 겔의 사진을 제공한 도면. **도 37B**는 ALIX 항체(상단) 또는 GFP 항체(하단)를 사용하여 도 37A로부터의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 38은 4개의 상이한 엑소좀의 군 - (i) CD9-GFP, (ii) CD81-GFP 또는 (iii) PTGFRN-GFP를 발현하도록 조작된 변형된 엑소좀 또는 (iv) 비변형된 네이티브 엑소좀에서 GFP-양성 입자의 백분율(흑색 막대, 좌측 y축) 및 평균 형광 강도(회색 막대, 우측 y축)를 제공한 그래프.

도 39는 네이티브 PTGFRN(PTGFRN-GFP), 그 자신의 신호 펩타이드를 갖는 절두된 PTGFRN(454-PTGFRN-GFP) 또는 DsbA11로부터의 합성 신호 펩타이드를 갖는 절두된 PTGFRN(454-PTGFRN-GFP)을 함유하는 GFP 융합 단백질을 발현하는 변형된 엑소좀의 GFP 형광 강도(FU)를 제공한 도면.

도 40A는 렉틴 CLEC9A를 인식하는 단일쇄 Fab, 전장 PTGFRN, GFP, 및 FLAG 태그로 이루어진 융합 단백질의 구조를 나타낸 도면. **도 40B**는 항-ALIX 항체(상단) 또는 GFP 항체(하단)를 사용한 Optiprep^(상표명) 정제된 엑소좀의 웨스턴 블로팅으로부터의 겔 사진을 제공한 도면.

도 41은 렉틴 CLEC9A를 인식하는 단일쇄 Fab, 전장 PTGFRN, GFP 및 FLAG 태그로 이루어진 융합 단백질("α CLEC9A-PTGFRN")을 발현하도록 변형된 엑소좀과 CLEC9A-Fc 간의 상호작용을 연구하기 위한 BLI 결과를 제공한 도면.

도 42는 PTGFRN, ALIX, TSG101, CD63, CD9 또는 CD81에 대한 항체를 사용하여 HEK293SF 세포("HEK") 또는 MSC("MSC")로부터 정제된 엑소좀을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 43A는 형질주입되지 않은 HEK 세포, FLAG 태그에 융합된 전장 PTGFRN을 발현하는 플라스미드("PTGFRN-FLAG 플라스미드")가 형질주입된 HEK 세포, 형질주입되지 않은 CHO 세포 또는 PTGFRN-FLAG 플라스미드가 형질주입된 CHO 세포로부터 정제된 엑소좀을 전개시킨 폴리아크릴아마이드 겔의 사진을 제공한 도면. **도 43B**는 PTGFRN에 대한 항체를 사용하여 도 43A로부터의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면. **도 43C**는 FLAG 태그에 대한 항체를 사용하여 도 43A로부터의 샘플을 웨스턴 블로팅한 겔 사진을 제공한 도면.

도 44A 및 **도 44B**는 CD9(**도 44A**) 또는 PTGFRN(**도 44B**)을 사용하여 엑소좀 내강에 카고 단백질(cargo protein)을 로딩하는 것을 시험하기 위한 실험 시스템을 도시한 도면. **도 44A**는 라파마이신의 존재 하에서 V5 태그 및 FKBP에 융합된 mCherry와 상호작용할 수 있는, GFP, FLAG 태그 및 FKBP에 융합된 CD9를 발현하는 세포를 도시한 도면. **도 44B**는 라파마이신의 존재 하에서 V5 태그 및 FKBP에 융합된 mCherry와 상호작용할 수 있는, GFP, FLAG 태그 및 FKBP에 융합된 PTGFRN를 발현하는 세포를 도시한 도면.

도 45A는 **도 44A**(CD9) 또는 **도 44B**(PTGFRN)(상단)에 도시된 세포 배양 샘플로부터 정제된 엑소좀을 전개시킨 폴리아크릴아마이드 겔의 사진을 제공한 도면. 이 도면은 또한 FLAG(α Flag) 또는 V5(α V5)(하단)에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 결과를 제공한다. **도 45B**는 농도계에 의해서 측정되고, 수집된 엑소좀의 양에 대해서 정규화된, **도 45A**에서의 웨스턴 블로팅으로부터의 FLAG 및 V5에 대한 밴드 강도를 제공한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 정의

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자에 의해서 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 하기 용어는 하기에 주어진 의미를 갖는다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**세포의 소포**" 또는 "**EV**"는 내부 공간을 둘러싼 막을 포함하는 세포-유래된 소포를 지칭한다. 세포의 소포는 그것이 유래된 세포보다 더 작은 직경을 갖는 모든 막-결합된 소포를 포함한다. 일반적으로 세포의 소포는 직경이 20nm 내지 1000nm의 범위이며, 내부 공간 내에, 세포의 소포의 외부 표면 상에 디스플레이된 그리고/또는 막을 지나는 다양한 거대분자 카고를 포함할 수 있다. 상기 카고는 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 소분자 및/또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 예의 방식으로 그리고 비제한적으로, 세포의 소포는 세포사멸체, 세포의 단편, 직접 또는 간접적 조작(예를 들어, 연속 압출 또는 알칼리성 용액으로의 처리)에 의해 세포로부터 유래된 소포, 소포형성된(vesiculated) 소기관, 및 살아있는 세포에 의해서(예를 들어 직접적인 원형질막 버딩(budding) 또는 후기 엔도솜과 원형질막의 융합에 의해서) 생산된 소포를 포함한다. 세포의 소포는 살아있거나 죽은 유기체, 체외이식 조직 또는 기관 및/또는 배양된 세포로부터 유래될 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**엑소좀**"은 세포-유래된 작은 (20 내지 300nm 직경, 보다 바람직하게는 40 내지 200nm 직경) 소포이며, 내부 공간을 둘러싸는 막을 포함하고, 직접적인 원형질막 버딩 또는 후기 엔도솜과 원형질 막의 융합에 의해서 상기 세포로부터 생성되는 소포를 지칭한다. 엑소좀은 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함하고, 선택적으로 페이로드(예를 들어, 치료제), 리시버(예를 들어, 표적화 모이어티), 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 핵산, RNA, 또는 DNA), 당(예를 들어, 단순당, 다당류, 또는 글리칸) 또는 다른 분자를 포함한다. 엑소좀은 생산자 세포로부터 유래되고, 그것의 크기, 밀도, 생화학적 파라미터, 또는 이들의 조합을 기초로 생산자 세포로부터 분리될 수 있다. 엑소좀은 세포의 소포의 종이다. 일반적으로, 엑소좀 생산/생물발생은 생산자 세포의 파괴를 초래하지 않는다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "**나노소포**"는 세포-유래된 작은 (20 내지 250nm 직경, 보다 바람직하게는 30 내지 150nm 직경) 소포이며, 내부 공간을 둘러싸는 막을 포함하고, 상기 나노소포가 직접 또는 간접적 조작 없이 상기 생산자 세포에 의해서 생산되지 않도록 상기 조작에 의해 상기 세포로부터 생성되는 소포를 지칭한다. 상기 생산자 세포의 적절한 조작은 연속 압출, 알칼리성 용액으로의 처리, 초음파처리 또는 이들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 나노소포의 생산은 일부 예에서 상기 생산자 세포의 파괴를 초래하지 않을 수 있다. 바람직하게는, 나노소포의 집단은 원형질막으로부터의 직접적인 버딩 또는 후기 엔도솜과 원형질막의 융합에 의해서 생산자 세포로부터 유래된 소포가 실질적으로 존재하지 않는다. 나노소포는 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함하고, 선택적으로 페이로드(예를 들어, 치료제), 리시버(예를 들어, 표적화 모이어티), 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 핵산, RNA, 또는 DNA), 당(예를 들어, 단순당, 다당류, 또는 글리칸) 또는 다른 분자를 포함한다. 나노소포는, 그것이 상기 조작에 따라서 생산자 세포로부터 유래되면, 그것의 크기, 밀도, 생화학적 파라미터, 또는 이들의 조합을 기초로 생산자 세포로부터 분리될 수 있다. 나노소포는 세포의 소포의 종이다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "**표면-조작된 엑소좀**"은 조성이 변형된 막 변형된 엑소좀을 지칭한다. 예를 들어, 막은 단백질, 지질, 소분자, 탄수화물 등의 조성이 변형된다. 조성은 화학적, 물리학적 또는 생물학적 방법에 의해서 변화될 수 있거나 또는 화학적, 물리학적 또는 생물학적 방법에 의해서 이전에 변형되거나 또

는 동시에 변형되는 세포로부터의 생산에 의해서 변화될 수 있다. 구체적으로, 조성은 유전자 조작에 의해서 변화되거나 또는 유전자 조작에 의해서 이미 변형된 세포로부터의 생산에 의해서 변화될 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 단백질의 "**변형**"은 단백질의 비-돌연변이체 아미노산 서열과 적어도 15% 동일성을 갖는 단백질을 지칭한다. 단백질의 변형은 단백질의 단편 또는 변이체를 포함한다. 단백질의 변형은 단백질의 단편 또는 변이체에 대한 화학적 또는 물리학적 변형을 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 단백질의 "**단편**"은 자연 발생 단백질에 비해서 N- 및/또는 C-말단이 결실된 단백질을 지칭한다. 바람직하게는, PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체의 단편은 엑소좀에 대해서 특이적으로 표적화될 능력을 보유한다. 이러한 단편은 또한 "**기능성 단편**"이라고 지칭된다. 단편이 이러한 의미로 기능성 단편인지의 여부는, 웨스턴 블롯, FACS 분석 및 단편과 자가형광 단백질 등, 예를 들어, GFP의 융합을 비롯한 엑소좀의 단백질 함량을 결정하기 위한 임의의 당업계에 공지된 방법에 의해서 평가될 수 있다. 특정 실시형태에서 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체의 단편은, 엑소좀에 대해서 특이적으로 표적화될 자연 발생 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체의 능력의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%를 보유한다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 단백질의 "**변이체**"는 당업계에 공지된 방법에 의한 정렬 시에 또 다른 단백질과 특정 아미노산 서열 동일성을 공유하는 단백질을 지칭한다. 단백질의 변이체는 또 다른 단백질에서 치환, 삽입, 결실, 프레임시프트(frameshift) 또는 재배열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 변이체는 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체의 단편에 대해서 적어도 70% 동일성을 갖는 변이체이다. 일부 실시형태에서 PTGFRN의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 1에 따른 PTGFRN 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 BSG의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 9에 따른 BSG 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 IGSF2의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 34에 따른 IGSF2 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 IGSF3의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 20에 따른 IGSF3 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 IGSF8의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 14에 따른 IGSF8 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ITGB1의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 21에 따른 ITGB1 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ITGA4의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 22에 따른 ITGA4 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 SLC3A2의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 23에 따른 SLC3A2 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP1A1의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 24에 따른 ATP1A1 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP1A2의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 25에 따른 ATP1A2 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP1A3의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 26에 따른 ATP1A3 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP1A4의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 27에 따른 ATP1A4 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP1B3의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 28에 따른 ATP1B3 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP2B1의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 29에 따른 ATP2B1 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP2B2의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 30에 따른 ATP2B2 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP2B3의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 31에 따른 ATP2B3 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시형태에서 ATP2B4의 변이체 또는 이의 단편의 변이체는 서열번호 32에 따른 ATP2B4 또는 이의 기능성 단편과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 상기 경우 각각에서, 변이체 또는 단편의 변이체는 엑소좀에 대해서 특이적으로 표적화되는 능력을 보유하는 것이 바람직하다.

[0057] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘은 문헌

[Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48: 443 (1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31 (1988); Higgins and Sharp, Gene 73: 15 237-44 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-3 (1989) Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16: 10881-90 (1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8: 155-65 (1992); 및 Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24: 307-31 (1994)]에 기재되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)[Altschul 20 et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990) J]은 서열 분석 프로그램 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 함께 사용하기 위해서 국립 생물정보 센터(National Center for Biological Information)(NCBI, 미국 메릴랜드주 베 테스다 소재)를 비롯한 몇몇 공급원으로부터 그리고 인터넷 상에서 입수 가능하다. BLAST 및 이러한 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 결정하는 방법의 설명은 NIH(National Institute of Health) 하의 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 공식 웹사이트에서 접근될 수 있다.

[0058] 본 명세서에 제공된 임의의 단백질의 언급은 단백질의 기능성 변이체를 포함한다. 용어 단백질의 "**기능성 변이체**"는 엑소좀에 대해서 특이적으로 표적화되는 능력을 보유하는 단백질의 변이체를 지칭한다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "**생산자 세포**"는 엑소좀을 생성시키기 위해서 사용되는 세포를 지칭한다. 생산자 세포는 시험관내에서 배양된 세포이거나 또는 생체내 세포일 수 있다. 생산자 세포는 엑소좀을 생성시키는 데 효과적이라고 공지된 세포, 예를 들어, HEK293 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 및 간엽 줄기세포(MSC)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "**표적 단백질**"은 엑소좀의 표면에 표적화될 수 있는 단백질을 지칭한다. 표적 단백질은 엑소좀 막에 자연적으로 표적화되는 비-돌연변이체 단백질, 또는 비-돌연변이체 단백질의 단편 또는 변이체일 수 있다. 표적 단백질은 flag 태그, 치료용 펩타이드, 표적화 모이어티 또는 비-돌연 변이체 단백질 또는 비-돌연변이체 단백질의 변이체 또는 단편에 부착된 다른 펩타이드를 함유하는 융합 단백질 일 수 있다. 표적 단백질은 막관통 단백질, 내재 단백질(integral protein), 주변 단백질(peripheral protein) 또는 링커에 의해서 막에 부착된 가용성 단백질을 포함할 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "**오염 단백질**"은 엑소좀과 회합되지 않은 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 오염 단백질은 엑소좀 내에 포함되지 않고, 엑소좀의 막에 부착되지 않거나 혼입되지 않은 단백질을 포함한다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**단리시키다**", "**단리된**", 및 "**단리시키는**" 또는 "**순도**", "**정제된**", 및 "**정제시키는**"뿐만 아니라 "**추출된**" 및 "**추출시키는**"은 상호 교환 가능하게 사용되며, 하나 이상의 정제 공정, 예를 들어, 목적하는 엑소좀 제제의 선택 또는 풍부화를 겪은 목적하는 EV의 제제(예를 들어, 복수의 기지 또는 미지의 양 및/또는 농도)의 상태를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 단리시키는 또는 정제시키는은 샘플 함유 생산자 세포로부터 엑소좀(분획)을 제거, 부분적으로 제거시키는 공정이다. 일부 실시형태에서, 단리된 엑소좀 조성물은 검출 가능한 목적하지 않은 활성도를 갖지 않거나 또는, 대안적으로, 목적하지 않은 활성도의 수준 또는 양은 허용 가능한 수준 또는 양 또는 그 미만이다. 다른 실시형태에서, 단리된 엑소좀 조성물은 허용 가능한 양 및/또는 농도 또는 그 초과인 양 및 농도의 목적하는 엑소좀을 갖는다. 다른 실시형태에서, 단리된 엑소좀 조성물은, 조성물이 획득된 출발 물질(예를 들어, 생산자 세포 제제)에 비해서 풍부화된다. 이러한 풍부화는 출발 물질과 비교할 때 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99%, 99.999%, 99.9999% 또는 99.9999% 초과만큼일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 엑소좀 제제는 잔류하는 생물학적 생성물이 실질적으로 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, 단리된 엑소좀 제제는 임의의 오염 생물학적 물질이 100% 존재하지 않거나, 99% 존재하지 않거나, 98% 존재하지 않거나, 97% 존재하지 않거나, 96% 존재하지 않거나, 95% 존재하지 않거나, 94% 존재하지 않거나, 93% 존재하지 않거나, 92% 존재하지 않거나, 91% 존재하지 않거나 또는 90% 존재하지 않는다. 잔류하는 생물학적 생성물은 무 생물 물질(화학물질 포함) 또는 원치않는 핵산, 단백질, 지질 또는 대사산물을 포함할 수 있다. 잔류하는 생물학적 생성물이 실질적으로 존재하지 않는 것은 또한 엑소좀 조성물이 검출 가능한 생산자 세포를 함유하지 않고, 엑소좀 만이 검출 가능하다는 것을 의미할 수 있다.

[0063] 용어 "**부형제**" 또는 "**담체**"는 화합물의 투여를 추가로 가능하게 하기 위해서 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 용어 "**약제학적으로-허용 가능한 담체**" 또는 "**약제학적으로-허용 가능한 부형제**"는 인간을 비롯한 동물에서의 사용을 위해서 미국 약전에 열거되거나 미국 연방 정부의 규제 기관에 의해서 승인된 작용제 중 임의의 것뿐만 아니라 대상체에게 유의한 자극을 유발하지 않고 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 제거하지 않는 임의의 담체 또는 희석제를 포함한다. 약제학적 조성물의 제조에 유용하고, 일반적으로

안전하고, 비독성이고, 바람직한 부형제 및 담체가 포함된다.

- [0064] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**페이로드**"는 EV와 접촉되는 표적(예를 들어, 표적 세포)에 대해서 작용하는 치료제를 지칭한다. 엑소좀 및/또는 생산자 세포 내에 도입될 수 있는 페이로드는 치료제, 예컨대, 뉴클레오타이드(예를 들어, 검출 가능한 모이어티 또는 독소를 포함하거나 전사를 방해하는 뉴클레오타이드), 핵산(예를 들어, 폴리펩타이드, 예컨대, 효소를 암호화하는 DNA 또는 mRNA 분자 또는 조절 기능을 갖는 RNA 분자, 예컨대, miRNA, dsDNA, lncRNA 및 siRNA), 아미노산(예를 들어, 검출 가능한 모이어티 또는 독소를 포함하거나 또는 전사를 방해하는 아미노산), 폴리펩타이드(예를 들어, 효소), 지질, 탄수화물 및 소분자(예를 들어, 소분자 약물 및 독소)를 포함한다.
- [0065] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "**포유동물 대상체**"는 인간, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험 동물(예를 들어, 원숭이, 래트, 마우스, 토끼, 기니피그 등)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 모든 포유동물을 포함한다.
- [0066] 용어 "**개체**", "**대상체**", "**숙주**", 및 "**환자**"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되며, 진단, 치료 또는 요법이 필요한 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 방법은 인간 요법 및 수의학 적 응용 둘 모두에 적용 가능하다. 일부 실시형태에서, 대상체는 포유동물이고, 다른 실시형태에서 대상체는 인간이다.
- [0067] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**실질적으로 존재하지 않는**"은 엑소좀을 포함하는 샘플이 질량/부피 (m/v) 백분율 농도를 기준으로 10% 미만의 거대분자를 포함한다는 것을 의미한다. 일부 분획은 0.001% 미만, 0.01% 미만, 0.05% 미만, 0.1% 미만, 0.2% 미만, 0.3% 미만, 0.4% 미만, 0.5% 미만, 0.6% 미만, 0.7% 미만, 0.8% 미만, 0.9% 미만, 1% 미만, 2% 미만, 3% 미만, 4% 미만, 5% 미만, 6% 미만, 7% 미만, 8% 미만, 9% 미만 또는 10%(m/v) 미만의 거대분자를 함유할 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**거대분자**"는 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물 또는 이들의 조합물을 의미한다.
- [0069] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**종래의 엑소좀 단백질**"은 CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI 앵커 단백질, 락타드헤린 LAMP2, 및 LAMP2B, 이들의 단편 또는 이들에 결합하는 펩타이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 엑소좀에서 풍부하다고 이전에 공지된 단백질을 의미한다.
- [0070] **2. 다른 해석 관습**
- [0071] 본 명세서에 언급된 범위는 언급된 종점을 포함하여, 범위 내의 값 모두에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 이루어진 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합 또는 하위 범위를 포함하도록 이해된다.
- [0072] **3. 엑소좀 단백질**
- [0073] 본 발명의 양상은 엑소좀 막 상에 고도로 풍부한, 엑소좀 단백질의 식별, 사용 및 변형에 관한 것이다. 이러한 엑소좀 단백질은 질량 분광분석법 또는 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 고도로 정제된 엑소좀을 분석함으로써 식별될 수 있다.
- [0074] 엑소좀 단백질은 엑소좀 막 상에 풍부한 다양한 막 단백질, 예컨대, 막관통 단백질, 내재 단백질 및 주변 단백질을 포함한다. 이것은 다양한 CD 단백질, 수송체, 인테그린, 렉틴 및 카르헤린을 포함한다. 구체적으로, 이러한 단백질은 (1) 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PTGFRN), (2) basigin(BSG), (3) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3), (4) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8), (5) 인테그린 베타-1(ITGB1), (6) 인테그린 알파-4(ITGA4), (7) 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2), (8) ATP 수송체 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), 및 (9) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 2(IGSF2)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0075] 생산자 세포, 생산 조건, 정제 방법 또는 엑소좀의 의도된 응용에 따라서 본 명세서에서 식별된 1종 이상의 엑소좀 단백질이 선택적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 엑소좀의 특정 집단 상에 풍부한 엑솜(exome) 단백질을 사용하여 엑소좀의 특정 집단을 정제시킬 수 있다. 특정 크기 범위, 표적화 모이어티, 전하 밀도, 페이로드 등을 갖는 특정 엑소좀의 표면 상에 풍부한 엑소좀 단백질이 식별되고, 본 발명의 일부 실시형태에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 1종 초과 엑소좀 단백질이 치료용 엑소좀의 생성, 정제, 및 단리를 위해서 동시에

또는 이어서 사용될 수 있다.

[0076] 4. 표면-조작된 엑소좀

[0077] 본 발명의 또 다른 양상은 표면-조작된 엑소좀의 생성 및 사용에 관한 것이다. 표면-조작된 엑소좀은 조성이 변형된 막을 갖는다. 예를 들어, 이의 막 조성은 막의 단백질, 지질 또는 글리칸 함량을 변화시킴으로써 변형될 수 있다.

[0078] 일부 실시형태에서, 표면-조작된 엑소좀은 화학적 및/또는 물리적 방법, 예컨대, PEG-유도된 융합 및/또는 초음파 융합에 의해서 생성된다.

[0079] 다른 실시형태에서, 표면-조작된 엑소좀은 유전자 조작에 의해서 생성된다. 유전자적으로-변형된 생산자 세포 또는 유전자적으로-변형된 세포의 자손으로부터 생산된 엑소좀은 변형된 막 조성물을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면-조작된 엑소좀은 더 높은 밀도 또는 더 낮은 밀도로 엑소좀 단백질을 갖거나 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0080] 예를 들어, 표면-조작된 엑소좀은 엑소좀 단백질 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하는 외인성 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 외인성 서열로부터 발현된 단백질을 포함하는 엑소좀은 변형된 막 단백질 조성물을 포함할 수 있다.

[0081] 엑소좀 단백질의 다양한 변형 또는 단편이 본 발명의 실시형태를 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 결합체를 사용하여 정제될 수 있는 표면-조작된 엑소좀을 생성시키기 위해서 결합체에 대해서 향상된 친화성을 갖도록 변형된 단백질이 사용될 수 있다. 엑소좀 및/또는 막에 대해서 보다 효과적으로 표적화되도록 변형된 단백질이 사용될 수 있다. 엑소좀 막에 대한 특이적이고 효과적인 표적화를 위해서 필요한 최소 단편을 포함하도록 변형된 단백질이 또한 사용될 수 있다.

[0082] 융합 단백질이 사용될 수 있고, 예를 들어, 친화성 태그(예를 들어, His 태그, GST 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, S-펩타이드, HA, Myc, FLAG^(상표명)(시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich Co.)), MBP, SUMO 및 단백질 A)에 융합된 엑소좀 단백질 또는 이의 단편이 친화성 태그에 특이적인 결합체를 사용한 표면-조작된 엑소좀의 정제 또는 제거를 위해서 사용될 수 있다.

[0083] 치료 활성을 갖는 융합 단백질이 또한 표면-조작된 엑소좀을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 치료용 펩타이드를 포함할 수 있다. 치료용 펩타이드는 자연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 치료 화합물에 대한 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치료 화합물은 뉴클레오타이드, 아미노산, 지질, 탄수화물 및 소분자일 수 있다. 치료용 펩타이드는 항체, 효소, 리간드, 수용체, 항미생물성 펩타이드 또는 이의 단편 또는 변이체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료용 펩타이드는 핵산 결합 단백질이다. 핵산 결합 단백질은 다이서(Dicer), 알고너트(Argonaute) 단백질, TRBP 또는 MS2 박테리오파지 코트 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 결합 단백질은 1종 이상의 RNA 또는 DNA 분자를 추가로 포함한다. 1종 이상의 RNA는 miRNA, siRNA, 가이드 RNA, lincRNA, mRNA, 안티센스 RNA, dsRNA 또는 이들의 조합물일 수 있다.

[0084] 일부 실시형태에서, 치료용 펩타이드는 단백질-단백질 상호작용 시스템의 부분이다. 일부 실시형태에서, 단백질-단백질 상호작용 시스템은 FRB-FKBP 상호작용 시스템, 예를 들어, 문헌[Banaszynski et al., J Am Chem Soc. 2005 Apr 6;127(13):4715-21]에 기재된 바와 같은 FRB-FKBP 상호작용 시스템을 포함한다.

[0085] 융합 단백질은 엑소좀의 표면에 표적화될 수 있고, 엑소좀에 치료 활성을 제공한다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편 또는 변형을 포함하지 않는다.

[0086] 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티를 갖는 융합 단백질이 사용된다. 예를 들어, 융합 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체, 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 표적화 모이어티는 엑소좀을 사용한 치료를 위해서 특이적 기관, 조직 또는 세포에 대해서 엑소좀을 표적화하기 위해서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 항체 및 이의 항원-결합 단편은 전체 항체, 다클론성, 단클론성 및 재조합 항체, 이의 단편을 포함하고, 추가로 단일-쇄 항체, 인간화 항체, 뮤린 항체, 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 단클론성 항체, 항-이디오타입 항체, 항체 단편, 예를 들어, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', 및 F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb 및 Fd 단편, 다이아바디 및 항체-관련 폴리펩타이드를 포함한다. 항체 및 이의 항원-결합 단편은 또한, 이

중특이적 항체 및 다중특이적 항체가 목적하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 한 이들을 포함한다.

[0087] 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 IGSF8 또는 이의 단편 또는 변형을 포함하지 않는다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 표면-조작된 엑소솜은 당업계에서 공지된 표면-조작된 엑소솜에 비해서 우수한 특징을 나타낸다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 새로-식별된 엑소솜 단백질을 사용함으로써 생산된 표면-조작된 엑소솜은 선행 기술에서의 엑소솜, 예를 들어, 종래의 엑소솜 단백질을 사용하여 생산된 것보다 표면 상에 보다 상당히 풍부한 변형된 단백질을 함유한다. 추가로, 본 발명의 표면-조작된 엑소솜은 당업계에서 공지된 표면-조작된 엑소솜에 비해서 더 크거나, 보다 특이적이거나 보다 제어된 생물학적 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 엑소솜 표면 단백질 또는 이의 단편(예를 들어, PTGFRN 또는 이의 단편)에 융합된 치료 또는 생물학적으로 관련된 외인성 서열을 포함하는 표면 조작된 엑소솜은 당업계에서 공지된 스캐폴드에 대한 융합보다 더 목적하는 조작된 특징을 가질 수 있다. 당업계에 공지된 스캐폴드 단백질은 테트라스파닌 분자(예를 들어, CD63, CD81, CD9 등), 라이소솜-연관 막 단백질 2(LAMP2 및 LAMP2B), 혈소판-유래된 성장 인자 수용체(PDGFR), GPI 앵커 단백질, 락타드헤린 및 이들의 단편 및 이들 단백질 또는 이들의 단편 중 임의의 것에 친화성을 갖는 펩타이드를 포함한다. 이전에, 외인성 단백질의 과발현은 표면-조작된 엑소솜을 생산하기 위한 엑소솜 상의 외인성 단백질의 확률론적 또는 무작위 배치에 좌우되었다. 이것은 엑소솜 상의 외인성 단백질의 낮은 수준의 예측 가능하지 않은 밀도를 초래하였다. 따라서, 본 명세서에 기재된 엑소솜 표면 단백질 및 이의 단편은 신규 엑소솜 조성물 및 이의 제조 방법에서 중요한 발전을 제공한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 새로-식별된 엑소솜 표면 단백질 및 외인성 서열을 함유하는 융합 단백질을 포함하는 표면-조작된 엑소솜은, 당업계에 공지된 종래의 엑소솜 단백질에 접합된 외인성 서열을 포함하는 유사하게 조작된 엑소솜보다 더 높은 밀도의 융합 단백질(예를 들어, CD9, CD63, CD81, PDGFR, GPI 앵커 단백질, 락타드헤린 LAMP2 및 LAMP2B, 이의 단편 또는 이에 결합된 펩타이드)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 새로-식별된 엑소솜 단백질을 함유하는 상기 융합 단백질은 종래의 엑소솜 단백질을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 엑소솜 표면 상에 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 새로-식별된 엑소솜 단백질을 함유하는 상기 융합 단백질은 종래의 엑소솜 단백질을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 엑소솜 표면 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다.

[0090] 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 CD9를 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 CD63을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 CD81을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 PDGFR를 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 GPI 앵커 단백질을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 락타드헤린을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 LAMP2를 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소솜 단백질의 단편을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소솜 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소솜 단백질의 변이체를 사용하여 유

사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다.

[0091] 특정 실시형태에서, PTGFRN의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, BSG의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, IGSF2의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, IGSF3의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, IGSF8의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ITGB1의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ITGA4의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, SLC3A2의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ATP 수송체의 융합 단백질, 이의 변이체, 단편, 단편의 변이체 또는 변형은 종래의 엑소좀 단백질(예를 들어, 테트라스파닌 분자, 예컨대, CD63)을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 새로-식별된 엑소좀 단백질을 함유하는 상기 융합 단백질은 종래의 엑소좀 단백질을 사용하여 유사하게 변형된 다른 엑소좀 표면 상의 융합 단백질보다 엑소좀 표면 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다.

[0092] 본 명세서에 제공된 융합 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체, 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 추가 펩타이드를 포함할 수 있다. 추가 펩타이드는 엑소좀 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체의 N 말단 또는 C 말단 중 어느 하나에 부착될 수 있다. 추가 펩타이드는 엑소좀 단백질에 부착된 엑소좀의 내부에(내강 면에) 또는 외부에 배치될 수 있다.

[0093] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 융합 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체, 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 2종의 추가 펩타이드를 포함한다. 2종의 추가 펩타이드 둘 다는 엑소좀 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체의 N 말단 또는 C 말단 중 어느 하나에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2종의 추가 펩타이드 중 하나는 N 말단에 부착되고, 2종의 추가 펩타이드 중 나머지는 엑소좀 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체의 C 말단에 부착된다. 추가 펩타이드는 엑소좀 단백질에 부착된 엑소좀의 내부에(내강 면에) 또는 외부에 또는 둘 다에 배치될 수 있다.

[0094] 5. 표면-조작된 엑소좀의 생산을 위한 생산자 세포

[0095] 본 발명의 엑소좀은 시험관내에서 성장된 세포 또는 대상체의 체액으로부터 생산될 수 있다. 엑소좀이 시험관내 세포 배양물로부터 생산된 경우, 다양한 생산자 세포, 예를 들어, HEK293 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 간엽 줄기세포(MSC)가 본 발명을 위해서 사용될 수 있다.

[0096] 생산자 세포는 1종 이상의 외인성 서열을 포함하여 표면-조작된 엑소좀을 생산하도록 유전자 변형될 수 있다.

유전자적으로-변형된 생산자 세포는 일시적인 형질전환 또는 안정적인 형질전환에 의해서 도입된 외인성 서열을 함유할 수 있다. 외인성 서열은 플라스미드로서 생산자 세포에 도입될 수 있다. 외인성 서열은 표적화된 부위에서 또는 무작위 부위에서, 생산자 세포의 게놈 서열 내에 안정적으로 통합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 안정적인 세포주는 표면-조작된 엑소솜의 생산을 위해서 생성된다.

[0097] 외인성 서열은 엑소솜 단백질을 암호화하는 내인성 서열의 상류(5'-단부) 또는 하류(3'-단부) 내에 배치된, 생산자 세포의 게놈 서열 내에 삽입될 수 있다. 생산자 세포 내에 외인성 서열을 도입하기 위해서 당업계에 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 유전자 편집 방법(예를 들어, 상동 재조합, 트랜스포존-매개된 시스템, loxP-Cre 시스템, CRISPR/Cas9 또는 TALEN)을 사용하여 변형된 세포가 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0098] 외인성 서열은 엑소솜 단백질 또는 엑소솜 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 엑소솜 단백질을 암호화하는 서열의 추가 카피를 도입시켜 더 높은 밀도로 엑소솜 단백질을 갖는 표면-조작된 엑소솜을 생산할 수 있다. 엑소솜 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하는 외인성 서열을 도입시켜 엑소솜 단백질의 변형 또는 단편을 함유하는 표면-조작된 엑소솜을 생성시킬 수 있다. 친화성 태그를 암호화하는 외인성 서열을 도입시켜 엑소솜 단백질에 부착된 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질을 함유하는 표면-조작된 엑소솜을 생성시킬 수 있다.

[0099] 일부 실시형태에서, 표면-조작된 엑소솜은 동일하거나 또는 유사한 생산자 세포 유형으로부터 단리된 네이티브 엑소솜보다 더 높은 밀도의 엑소솜 단백질을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 엑소솜 단백질은 상기 네이티브 엑소솜보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 상기 엑소솜 단백질은 상기 네이티브 엑소솜보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 엑소솜 단백질을 포함하는 융합 단백질은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 엑소솜 단백질보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 엑소솜 단백질의 단편 또는 변이체는 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 엑소솜 단백질보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다.

[0100] 특정 실시형태에서, PTGFRN, PTGFRN의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 PTGFRN보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, BSG, BSG의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 BSG보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, IGSF2, IGSF2의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 IGSF2보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, IGSF3, IGSF3의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 IGSF3보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ITGB1, ITGB1의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 ITGB1보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ITGA4, ITGA4의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 ITGA4보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, SLC3A2, SLC3A2의 단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소솜 상의 비변형된 SLC3A2보다 상기 표면-조작된 엑소솜 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다. 특정 실시형태에서, ATP 수송체, ATP 수송체의

단편 또는 변이체, 또는 이의 변형은 상기 네이티브 엑소좀 상의 비변형된 ATP 수송체보다 상기 표면-조작된 엑소좀 상에 2 내지 4배, 4 내지 8배, 8 내지 16배, 16 내지 32배, 32 내지 64배, 64 내지 100배, 100 내지 200배, 200 내지 400배, 400 내지 800배, 800 내지 1,000배 또는 더 높은 밀도로 존재한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 추가 외인성 서열을 포함하도록 추가로 변형된다. 예를 들어, 추가 외인성 서열을 도입시켜 내인성 유전자 발현을 조절하고, 페이로드로서 특정 폴리펩타이드를 포함하는 엑소좀을 생산할 수 있다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 2개의 외인성 서열을 포함하도록 변형되는데, 하나는 엑소좀 단백질 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하고, 나머지는 페이로드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 엑소좀에 추가 기능, 예를 들어, 생체내에서의 특이적 표적화 능력, 전달 기능, 효소 기능, 증가 또는 감소된 반감기를 부여하는 추가 외인성 서열을 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 2개의 외인성 서열을 포함하도록 변형되는데, 하나는 엑소좀 단백질 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하고, 나머지는 엑소좀에 추가 기능을 부여하는 단백질을 암호화한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 2개의 외인성 서열을 포함하도록 변형되는데, 2개의 외인성 서열 각각은 엑소좀 표면 상의 융합 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포로부터의 표면-조작된 엑소좀은 동일하거나 또는 유사한 세포 유형의 비변형된 세포로부터 단리된 네이티브 엑소좀에 비해서 더 높은 밀도의 엑소좀 단백질을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표면-조작된 엑소좀은 동일하거나 또는 유사한 세포 유형의 비변형된 세포로부터 단리된 네이티브 엑소좀보다 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 100-, 200-, 400-, 800-, 1,000배 또는 더 높은 밀도로 엑소좀 단백질을 함유한다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 추가 외인성 서열을 포함하도록 추가로 변형된다.

[0103] 보다 구체적으로, 표면-조작된 엑소좀은 (1) 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PGFRN), (2) basigin(BSG), (3) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3), (4) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8), (5) 인테그린 베타-1(ITGB1), (6) 인테그린 알파-4(ITGA4), (7) 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2), (8) ATP 수송체 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), 및 (9) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 2(IGSF2)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 1종 이상의 엑소좀 표면 단백질 또는 이의 변이체를 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 본 명세서에 기재된 1종 이상의 엑소좀 표면 단백질 중 임의의 것은 플라스미드, 게놈에 삽입된 외인성 서열 또는 다른 외인성 핵산, 예컨대, 합성 메신저 RNA(mRNA)로부터 생산자 세포에서 발현될 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 1종 이상의 엑소좀 표면 단백질은 이의 전장, 내인성 형태를 암호화하는 외인성 서열로 형질전환된 세포에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 1의 PGFRN 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 9의 BSG 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 14의 IGSF8 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 20의 IGSF3 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 21의 ITGB1 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 22의 ITGA4 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 23의 SLC3A2 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 24의 ATP1A1 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 25의 ATP1A2 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 26의 ATP1A3 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 27의 ATP1A4 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 28의 ATP1B3 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 29의 ATP2B1 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 30의 ATP2B2 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 31의 ATP2B3 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 32의 ATP2B4 단백질 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 이러한 외인성 서열은 서열번호 34의 IGSF2 단백질 단백질을 암호화한다.

[0105] 표면-조작된 엑소좀은 (1) 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PGFRN), (2) basigin(BSG), (3) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3), (4) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8), (5) 인테그린 베타-1(ITGB1), (6) 인테그린 알파-4(ITGA4), (7) 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2), (8) ATP 수송체 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), 및 (9) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 2(IGSF2)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 1종 이상의 엑소좀 표면 단백질의 단편을 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열은 네이티브 단백질의 N-말단으로부터 적어도 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800개의 아미노산이 결핍된 엑소좀 표면 단백질의

단편을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 서열은 네이티브 단백질의 C-말단으로부터 적어도 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800개의 아미노산이 결핍된 엑소좀 표면 단백질의 단편을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 서열은 네이티브 단백질의 N-말단 및 C-말단 둘 다로부터 적어도 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800개의 아미노산이 결핍된 엑소좀 표면 단백질의 단편을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 서열은 네이티브 단백질의 하나 이상의 기능성 또는 구조 도메인이 결핍된 엑소좀 표면 단백질의 단편을 암호화한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 엑소좀 표면 단백질의 단편은 1종 이상의 이종 단백질에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 단편의 N-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 단편의 C-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 단편의 N-말단 및 C-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 인간 단백질이다.

[0107] 표면 조작된 엑소좀은 PTGFRN의 단편을 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 단편은 하나 이상의 기능성 또는 구조 도메인, 예컨대, IgV가 결핍되어 있다. 예를 들어, PTGFRN의 단편은 서열번호 2 내지 7 또는 33의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, PTGFRN의 단편은 1종 이상의 이종 단백질에 융합된다. 1종 이상의 이종 단백질은 상기 PTGFRN 단편의 N-말단에 융합될 수 있다. 1종 이상의 이종 단백질은 상기 PTGFRN 단편의 C-말단에 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 PTGFRN 단편의 N-말단 및 C-말단 둘 다에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 인간 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 PTGFRN 단편에 융합된 상기 이종 단백질은 신호 서열 펩타이드를 추가로 함유한다. 신호 서열 펩타이드는 서열번호 8의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0108] 표면 조작된 엑소좀은 Basigin의 단편을 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, Basigin의 단편은 하나 이상의 기능성 또는 구조 도메인, 예컨대, IgV가 결핍되어 있다. 예를 들어, Basigin의 단편은 서열번호 10 내지 12의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, Basigin의 단편은 1종 이상의 이종 단백질에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 Basigin 단편의 N-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 Basigin 단편의 C-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 Basigin 단편의 N-말단 및 C-말단 둘 다에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 인간 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 Basigin 단편에 융합된 상기 이종 단백질은 신호 서열 펩타이드를 추가로 함유한다. 신호 서열 펩타이드는 서열번호 13의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0109] 표면 조작된 엑소좀은 IGSF8의 단편을 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, IGSF8의 단편은 하나 이상의 기능성 또는 구조 도메인, 예컨대, IgV가 결핍되어 있다. 예를 들어, IGSF8의 단편은 서열번호 15 내지 18의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IGSF8의 단편은 1종 이상의 이종 단백질에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF8 단편의 N-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF8 단편의 C-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF8 단편의 N-말단 및 C-말단 둘 다에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 인간 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 IGSF8 단편에 융합된 상기 이종 단백질은 신호 서열 펩타이드를 추가로 함유한다. 신호 서열 펩타이드는 서열번호 19의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0110] 표면 조작된 엑소좀은 IGSF2의 단편을 암호화하는 서열로 형질전환된 세포로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, IGSF2의 단편은 하나 이상의 기능성 또는 구조 도메인, 예컨대, IgV가 결핍되어 있다. 일부 실시형태에서, IGSF2의 단편은 1종 이상의 이종 단백질에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF2 단편의 N-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF2 단편의 C-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 이종 단백질은 상기 IGSF2 단편의 N-말단 및 C-말단 둘 다에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 실시형태에서, 이종 단백질은 인간 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 IGSF2 단편에 융합된 상기 이종 단백질은 신호 서열 펩타이드를 추가로 함유한다. 신호 서열 펩타이드는 서열번호 35의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0111] 일부 실시형태에서 표면-조작된 엑소좀은 (1) 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PTGFRN), (2) basigin(BSG), (3) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3), (4) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8),

(5) 인테그린 베타-1(ITGB1), (6) 인테그린 알파-4(ITGA4), (7) 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2), (8) ATP 수송체 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), 및 (9) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 2(IGSF2)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 동일하거나 유사한 서열의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 50% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 50% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 60% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 60% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 70% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 70% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 80% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 90% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 90% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 95% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 95% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 99% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 99% 동일하다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 네이티브 엑소좀 표면 단백질의 전장 또는 단편과 99.9% 동일하고, 예를 들어, 서열번호 1 내지 34와 99.9% 동일하다.

[0112] 6. 친화성 정제

[0113] 본 발명의 일부 실시형태는 엑소좀 막 상에 풍부한 단백질과 고정된 결합제 간의 특이적 결합 상호작용을 사용한 엑소좀의 분리, 정제 및 하위 분별(sub-fractionation)에 관한 것이다. 이러한 방법은 일반적으로 (1) 엑소좀을 포함하는 샘플을 적용 또는 로딩하는 단계, (2) 선택적으로 엑소좀의 표적 단백질과 결합제 간의 결합 상호작용을 유지시키는 적절한 완충제를 사용하여 미결합 샘플 성분을 세척하는 단계 및 (3) 결합 상호작용이 더 이상 일어나지 않도록 완충제 조건을 변경시킴으로써 고정된 결합제로부터 엑소좀을 용리(해리 및 회수)시키는 단계를 포함한다.

[0114] 일부 실시형태는 엑소좀 막 상에 풍부한 단백질과 고정된 결합제 간의 특이적 결합 상호작용을 사용하여 샘플로부터 엑소좀을 제거하는 방법에 관한 것이다. 이 경우, 결합제에 결합된 엑소좀은 결합제로부터 용리되지 않고, 결합제에 결합하지 않은 분획이 수집될 수 있다. 방법을 사용하여 샘플을 엑소좀 및 비-엑소좀성 물질, 예컨대, 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노-연관 바이러스 또는 임의의 다른 외피 보유 또는 외피 비보유 바이러스) 또는 재조합 단백질(예를 들어, 항체, 효소 또는 다른 폴리펩타이드)을 포함하는 샘플을 정제시킬 수 있고, 여기서 엑소좀은 오염 입자이다. 결합된 엑소좀은 결합제에 결합되어 유지될 수 있고, 엑소좀이 실질적으로 존재하지 않은 비-엑소좀성 물질이 수집된다.

[0115] 이러한 분리, 정제, 하위 분별 또는 제거 공정을 위해서 사용되는 표적 단백질은 생산자 세포의 계능으로부터 생산된 내인성 단백질, 유전자 변형에 의해서 생산자 세포에 도입된 단백질 또는 화학적, 물리적 또는 다른 생물학적 방법에 의해서 변형된 단백질일 수 있다. 일부 경우에, 단백질은 비-돌연변이체 단백질 또는 돌연변이체 단백질, 예를 들어, 내인성 단백질의 변이체 또는 단편이다. 일부 경우에, 단백질은 융합 단백질이다.

[0116] 표적 단백질에 대해서 친화성을 갖는 다양한 결합제가 본 발명의 실시형태를 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 단백질에 대한 특이적 친화성을 갖는 단백질, 펩타이드, 및 소분자가 결합제로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합제는 유기 또는 무기 공급원으로부터 획득된다. 유기 공급원으로부터의 결합제의 예는 혈청 단백질, 렉틴 또는 항체를 포함한다. 무기 공급원으로부터의 결합제의 예는 붕산, 금속 킬레이트 및 트라이아진 염료를 포함한다.

[0117] 결합제는 고체 지지체에 화학적으로 고정되거나 커플링될 수 있어서 결합제에 대해서 특이적 친화성을 갖는 엑소좀이 결합된다. 고체 지지체의 다양한 형태, 예를 들어, 다공성 아가로스 비드, 마이크로타이터 플레이트, 조성 비드 또는 막이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고체 지지체는 크로마토그래피 칼럼을 형성하고, 엑소좀의 친화성 크로마토그래피를 위해서 사용될 수 있다.

[0118] 일부 경우에, 엑소좀의 분리, 정제, 하위 분별 및 제거는 결합제 및 고체 지지체가 패키징된 칼럼을 사용하여 칼럼 크로마토그래피에 의해서 수행된다. 일부 실시형태에서, 엑소좀을 함유하는 샘플을 칼럼을 통해 전개시켜 정지시키고, 세척 완충액을 칼럼을 통해서 전개시키고, 그 다음 용리 완충액을 칼럼에 적용하여, 수집한다. 이러한 단계는 주변 압력에서 또는 추가 압력을 적용하여 수행될 수 있다.

[0119] 일부 경우에, 엑소좀의 분리, 정제, 하위 분별 및 제거는 배척 처리를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 샘플을

용기에서 고체 지지체에 부착된 결합제에 첨가하고, 혼합하고, 고체 지지체를 분리하고, 액체 상을 제거하고, 세척하고, 원심분리시키고, 용리 완충액을 첨가하고, 재원심분리시키고, 용리물을 제거한다.

[0120] 일부 경우에, 복합 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플을 용기에서 고체 지지체 부착된 결합제에 첨가하고, 그 다음 엑소좀에 결합된 고체 지지체를 칼럼 상에 패킹하고, 세척 및 용리를 칼럼 상에서 수행한다.

[0121] 일부 경우에, 엑소좀의 단리, 정제, 하위 분별 및 제거는 마이크로타이터 플레이트, 자성 비드 또는 막에 부착된 결합제를 사용하여 수행된다. 이러한 경우에, 샘플을 고체 지지체에 부착된 결합제에 첨가하고, 그 다음 혼합하고, 고체 지지체를 분리하고, 액체 상을 제거하고, 세척하고, 세척 완충액을 제거하고, 용리 완충액을 첨가하고, 용리물을 제거하는 단계가 이어진다.

[0122] 결합제와 엑소좀 상의 표적 단백질 간의 결합은 결합제와 엑소좀 상의 표적 단백질 간의 특이적 상호작용을 위한 최상의 다양한 생리학적 조건에서 수행된다. 결합된 엑소좀의 용리는 염 농도, pH, pI, 전하 및 이온 강도를 변화시킴으로써 직접적으로 또는 구배를 통해서 달성될 수 있다.

[0123] 일부 실시형태에서, 하나의 결합제를 사용하여 단리, 정제 또는 하위 분별된 샘플은 그 다음 상이한 결합제를 사용하여 가공된다.

[0124] 일부 실시형태에서, 하나 초과와 칼럼이 연속적으로 사용되는데, 여기서 다수의 칼럼 각각은 상이한 표적 단백질에 특이적인 상이한 결합제를 함유한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 단일 칼럼이 다수의 결합제를 함유하고, 각각이 상이한 표적 단백질에 대해서 특이적이다.

[0126] 일부 경우에, 결합제 및 고체 지지체는 주기적인 위생처리 단계의 도입에 의해서 재사용된다. 예를 들어, 이것은 프로필렌 글리콜, 아이소프로판올, 고 이온 농도 및/또는 수산화나트륨의 조합물로 위생처리될 수 있다.

[0127] 6.1 샘플 제조

[0128] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 엑소좀을 포함하는 다양한 샘플로부터 엑소좀을 정제, 단리, 하위 분별 또는 제거할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 엑소좀을 함유하는 정화된 수거 물질이다. 일부 경우에, 샘플은 당업계에 널리 공지된 정제 방법에 의해서 부분적으로 정제된 엑소좀을 포함한다. 예를 들어, 한외여과/투석여과, 하이드록실 아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 딥(deep) 여과 또는 이온 교환 결합/용리 크로마토그래피를 사용하여 친화성 정제를 위한 결합제를 적용하기 이전에 엑소좀을 부분적으로 정제시킬 수 있다.

[0129] 일부 경우에, 부분적으로 정제된 물질은 결합제와의 목적하는 상호작용을 위한 특정 생리학적 조건(예를 들어, pH, 온도, 염 농도, 염 유형, 극성도)을 갖도록 추가로 가공된다. 샘플은 희석 또는 농축에 의해서 특정 엑소좀 농도를 얻음으로써 또는 부형제를 첨가하여 엑소좀의 구조를 변화시킴으로써 제조될 수 있다. 일부 경우에, 부분적으로 정제된 물질은 임의의 조작 없이 결합제에 적용된다.

[0130] 6.2. 결합

[0131] 본 명세서에 기재된 방법은 엑소좀의 표적 단백질과 결합제 간의 특이적 상호작용이 필요하다. 고-처리량 스크리닝을 수행하여 염 농도, pH를 변화시키고/거나 유기 변형제, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 유레아를 사용하여 극성을 감소시킴으로써 특이적 결합을 위한 이상적인 완충제 조건을 식별할 수 있다. 표적 단백질과 결합제 간의 상호작용은 또한 샘플 조건(예를 들어, 크로마토그래피 수지의 부피당 로딩되는 샘플량, 엑소좀의 농도, 불순물의 농도), 로딩 완충액(예를 들어, pH, 염 농도, 염 유형, 극성), 및 다른 물리적 조건(예를 들어, 온도)에 따라서 변화될 수 있다. 추가로, 엑소좀의 구조를 변경시키는 부형제를 첨가하는 것이 또한 이들의 상호작용을 변화시킬 수 있다. 또한, 불순물과 엑소좀 간의 차동 흡수 속도를 기초로 체류 시간을 조정할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 다양한 정제 조건을 시험하여 이러한 단계를 위한 이상적인 조건을 식별할 수 있다.

[0132] 유사한 접근법을 사용하여 순도 및 수율을 개선시키고, 엑소좀의 하위집단을 풍부화, 걸쭉 또는 단리시키는 것을 도울 수 있다. 로딩 도전(load challenge)을 최대화하고, 보다 엄격한 용리 조건을 적용하는 것과 함께, 이러한 특성을 사용하여 엑소좀의 농도를 추가로 향상시킬 수 있다.

[0133] 6.2.1. 용리

[0134] 엑소좀의 용리는 유기 변형제, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 유레아를 사용하여 염 농도, pH 및/또는

극성을 변경시킴으로써 달성될 수 있다.

- [0135] 엑소좀의 선택적인 용리는 고정된 pH에서, 1가 양이온성 할라이드 염(예를 들어, 염화나트륨, 염화칼륨, 브로민화나트륨, 염화리튬, 아이오딘화나트륨, 브로민화칼륨, 브로민화리튬, 플루오린화나트륨, 플루오린화칼륨, 플루오린화리튬, 아이오딘화리튬, 아세트산나트륨, 아세트산칼륨, 아세트산리튬, 및 아이오딘화칼륨), 2가 또는 3가 염(예를 들어, 염화칼슘, 염화마그네슘, 황산칼슘, 황산나트륨, 황산마그네슘, 크롬 트라이클로라이드, 황산크롬, 시트르산나트륨, 염화철(III), 염화이트륨(III), 인산칼륨, 황산칼륨, 인산나트륨, 염화제1철, 시트르산칼슘, 인산마그네슘, 및 염화제2철) 또는 이들의 조합물의 증가 구배(단계적 또는 선형)의 사용을 통해서, 용리 완충액 중에서, 1가 양이온성 할라이드 염(예를 들어, 염화나트륨, 염화칼륨, 브로민화나트륨, 염화리튬, 아이오딘화나트륨, 브로민화칼륨, 브로민화리튬, 플루오린화나트륨, 플루오린화칼륨, 플루오린화리튬, 아이오딘화리튬, 아세트산나트륨, 아세트산칼륨, 아세트산리튬 및 아이오딘화 칼륨), 2가 또는 3가 염(예를 들어, 염화칼슘, 염화마그네슘, 황산칼슘, 황산나트륨, 황산마그네슘, 크롬 트라이클로라이드, 황산크롬, 시트르산나트륨, 염화철(III), 염화이트륨(III), 인산칼륨, 황산칼륨, 인산나트륨, 염화제1철, 시트르산칼슘, 인산마그네슘, 염화제2철) 또는 이들의 조합물의 농도를 증가시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0136] 칼럼 로딩 단계 동안 불순물을 통해서 유동시키고, 선택적인 부형제 세척 동안 불순물을 용리시키고, 칼럼에 결합된 추가 불순물을 남겨두면서 용리 동안 생성물을 선택적으로 용리시킴으로써 상당한 엑소좀 순도가 달성될 수 있다. 칼럼 용해물로부터 측정된 흡광도는 이러한 방법에 의해서 획득된 엑소좀의 정제를 나타낼 수 있다.
- [0137] 용리는 또한 pH 범위, 염, 유기 용매, 소분자, 세제, 쯔비터이온, 아미노산, 중합체, 온도 및 이들 중 임의의 조합을 조정함으로써 달성될 수 있다. 유사한 용리제를 사용하여 순도를 개선시키고, 수율을 개선시키고, 엑소좀의 하위 집단을 분리시킬 수 있다.
- [0138] 용리는 또한 상이한 특성, 예컨대, pH, 염, 유기 용매, 소분자, 세제, 쯔비터이온, 아미노산, 중합체, 온도 및 이들 중 임의의 조합을 갖는 다수의 용리 완충액을 사용하여 수행될 수 있다. 복수의 용리된 분획을 수집할 수 있는데, 여기서 각각의 분획에서 수집된 엑소좀은 상이한 특성을 갖는다. 예를 들어, 하나의 분획에서 수집된 엑소좀은 다른 분획 중의 엑소좀보다 더 높은 순도, 더 작거나 큰 평균 크기, 바람직한 조성 등을 갖는다.
- [0139] 복수의 용리된 분획이 수집되는 동안 상이한 특성을 갖는 용리 완충액이 연속적 유동으로서 적용될 수 있다. 등용매(isocratic) 용리 또는 구배 용리 동안 용리된 분획이 수집될 수 있다. 적어도 하나의 용리된 분획이 수집된 후, 용리된 분획의 조성을 분석할 수 있다. 예를 들어, 각각의 용리된 분획에서 엑소좀, 숙주 세포 단백질, 오염 단백질, DNA, 탄수화물 또는 지질의 농도를 측정할 수 있다. 각각의 용리된 분획 중의 엑소좀의 다른 특성을 또한 측정할 수 있다. 특성은 평균 크기, 평균 전하 밀도, 및 생체 분포와 관련된 다른 생리학적 특성, 세포 흡수, 반감기, 약리학, 효력, 투여, 면역 반응, 로딩 효율, 안정성 또는 다른 화합물에 대한 반응성을 포함한다.
- [0140] **6.2.2. 세척**
- [0141] 선택적으로, 엑소좀의 순도는 용리 이전에 샘플을 세척함으로써 추가로 개선될 수 있다. 일부 실시형태에서, 부형제는 세척 완충제일 수 있다. 부형제 특정 pH 범위를 갖는 용액, 염, 유기 용매, 소분자, 세제, 쯔비터이온, 아미노산, 중합체 및 이들 중 임의의 조합물일 수 있다.
- [0142] 보다 구체적으로, 부형제는 아르기닌, 라이신, 글리신, 히스티딘, 칼슘, 나트륨, 리튬, 칼륨, 아이오다이드, 마그네슘, 철, 아연, 망간, 유레아, 프로필렌 글리콜, 알루미늄, 암모늄, 구아니디늄 폴리에틸렌 글리콜, EDTA, EGTA, 세제, 클로라이드, 설페이트, 카복실산, 시알산, 포스페이트, 아세테이트, 글리신, 보레이트, 폼에이트, 퍼클로레이트, 브로민, 나이트레이트, 다이티오프레이트, 베타 머캅토에탄올 또는 트라이-n-부틸 포스페이트를 포함할 수 있다.
- [0143] 부형제는 또한 세틸 트라이메틸암모늄 클로라이드, 옥톡시놀-9, TRITON^(상표명) X-100(즉, 폴리에틸렌 글리콜 p-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 에터) 및 시그마-알드리치사로부터 입수 가능한 TRITON^(상표명) CG-110; 소듐 도데실 설페이트; 소듐 라우릴 설페이트; 데옥시콜산; 폴리솔베이트 80(즉, 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 모노올레이트); 폴리솔베이트 20(즉, 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 모노라우레이트); 알코올 에톡실레이트; 알킬 폴리에틸렌 글리콜 에터; 데실 글루코사이드; 옥토글루코사이드; SafeCare; 다우 케미컬사(DOW Chemical)로부터 입수 가능한 ECOSURF^(상표명) EH9, ECOSURF^(상표명) EH6, ECOSURF^(상표명) EH3, ECOSURF^(상표명) SA7, 및 ECOSURF^(상표명) SA9; 바스프사(BASF)로부터 입수 가능한 LUTENSOL^(상표명) M5, LUTENSOL^(상표명) XL, LUTENSOL^(상표명) XP 및 APG^(상표명) 325N;

에어 프로덕츠사(AIR PRODUCTS)로부터 입수 가능한 TOMADOL^(상표명) 900; 크로다사(CRODA)로부터 입수 가능한 NATSURF^(상표명) 265; 베스트켄사(Bestchem)로부터 입수 가능한 SAFECARE^(상표명) 1000, 다우사(DOW)로부터 입수 가능한 TERGITOL^(상표명) L64; 카프틸산; 루브리졸사(Lubrizol)로부터 입수 가능한 CHEMBETAINE^(상표명) LEC; 및 Mackol DG로 이루어진 군으로부터 선택된 세제를 포함할 수 있다.

[0144] 6.3. 결과를 개선시키기 위한 다른 방법

[0145] 크로마토그래피 수지의 부피당 로딩될 수 있는 엑소좀의 양은 공급 물질을 조정함으로써, 예를 들어, 엑소좀의 농도를 증가시키거나, 불순물의 농도를 감소시키거나, pH를 변경시키거나, 염 농도를 감소시키거나, 이온 강도를 감소시키거나 또는 엑소좀의 특정 하위 집단을 변경시킴으로써 개선될 수 있다. 질량 전달 제약 및 수지 상의 엑소좀의 느린 흡착 및 탈착으로 인해서, 크로마토그래피 수지의 부피당 로딩될 수 있는 엑소좀의 양은 칼럼 로딩 동안 유량을 느리게 함으로써, 더 긴 칼럼을 사용하여 체류 시간을 증가시킴으로써 증가될 수 있다.

[0146] 7. 응용

[0147] 7.1. 엑소좀의 정제

[0148] 의학 용도를 위한 엑소좀의 사용은, 엑소좀이 거대분자, 예컨대, 핵산, 오염 단백질, 지질, 탄수화물, 대사산물, 소분자, 금속 또는 이들의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 불순물이 존재하지 않거나 거의 존재하지 않을 것이 요구된다. 본 발명은 오염 거대분자로부터 엑소좀을 정제시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 정제된 엑소좀은 오염 거대분자가 실질적으로 존재하지 않는다.

[0149] 7.2. 엑소좀의 하위 분별

[0150] 본 발명의 실시형태는 막 단백질, 크기, 전하 밀도, 리간드 유형(예를 들어, 테트라스판닌) 및 헤파린 또는 다른 설페이트화된 탄수화물 결합 부위를 기초로 엑소좀의 집단을 하위 분별시키는 방법을 추가로 제공한다. 친화성 태그, 로딩 및 용리 완충액 조성물 및 프로토콜의 선택이 엑소좀의 상이한 하위 집단의 용리를 초래할 수 있다.

[0151] 예를 들어, 본 발명의 실시형태는 더 작거나 더 큰 크기를 갖는 엑소좀의 집단을 정제시키는 방법을 제공한다. 엑소좀의 크기는 당업계에 입수 가능한 방법에 의해서 결정될 수 있다. 예를 들어, 크기는 나노입자 트래킹(tracking) 분석, 다각 광산란, 단일각 광산란, 크기 배제 크로마토그래피, 분석용 초원심분리, 장 흐름 분별법(field flow fractionation), 레이저 회절, 조정 가능한 저항성 펄스 감지(tunable resistive pulse sensing) 또는 동적 광산란에 의해서 측정될 수 있다.

[0152] 본 발명의 실시형태는 추가로 전하 밀도에 기초하여 엑소좀을 하위 분별시키는 방법에 관한 것이다. 엑소좀의 전하 밀도는 전위차 적정, 음이온 교환, 양이온 교환, 등전점 전기영동(isoelectric focusing), 제타 전위(zeta potential), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis), 모세관 영역 전기영동(capillary zone electrophoresis), 겔 전기영동에 의해서 결정될 수 있다.

[0153] 본 발명의 실시형태는 또한 다른 생리학적 특성, 예컨대, 생체 분포, 세포 흡수, 반감기, 약력학, 효력, 투여, 면역 반응, 로딩 효율, 안정성 또는 다른 화합물에 대한 반응성에 기초하여 엑소좀을 하위 분별시키는 것에 관한 것이다. 방법은 특정 응용에 적절한 엑소좀의 집단의 단리를 가능하게 한다.

[0154] 8. 엑소좀의 특징규명

[0155] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 각각의 수집된 분획 내에 함유된 엑소좀을 특징규명하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀의 함량은 연구 및 특징규명을 위해서 추출될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 크기, 형상, 모폴로지 또는 분자 조성, 예컨대, 핵산, 단백질, 대사산물 및 지질을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 지표에 의해서 단리 및 특징규명된다.

[0156] 8.1. 엑소좀의 함량의 측정

[0157] 엑소좀은 단백질, 펩타이드, RNA, DNA 및 지질을 포함할 수 있다. 전체 RNA는 산-페놀:클로로포름 추출을 사용하여 추출될 수 있다. 이어서, RNA는 전체 RNA를 함유하는 작은-RNA를 회수하거나 또는 더 긴 RNA 종, 예컨대 mRNA로부터 200개 미만의 뉴클레오타이드의 작은 RAN 종을 분리하는 조건 하에서 유리-섬유 필터를 사용하여 정제될 수 있다. RNA는 작은 부피로 용리되기 때문에, RNA의 단리를 위해서 알코올 침전 단계가 필요하지 않을 수 있다.

- [0158] 엑소좀 조성물은 전사체학(transcriptomics), 서열분석(sequencing), 프로테오믹스(proteomics), 질량 분광분석법 또는 HP-LC를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해서 평가될 수 있다.
- [0159] 단리된 엑소좀(RNA 및 DNA 포함)과 회합된 뉴클레오타이드의 조성물은 당업자에게 널리 공지된 다양한 기술(예를 들어, 정량 또는 반정량 RT-PCR, 노던 블롯 분석, 용액 혼성화 검출)을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 RNA의 수준은 엑소좀 조성물로부터 RNA를 역전사시켜 표적 올리고데옥시뉴클레오타이드의 세트를 제공하고, 표적 올리고데옥시뉴클레오타이드를 하나 이상의 RNA-특이적 프로브 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, RNA-특이적 프로브 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 마이크로어레이)에 혼성화시켜 엑소좀 조성물에 혼성화 프로파일을 제공하고, 엑소좀 조성물 혼성화 프로파일을 대조군 샘플로부터 생성된 혼성화 프로파일과 비교함으로써 측정된다. 대조군 샘플에 대한 시험 샘플 중의 적어도 하나의 RNA의 신호의 변경이 RNA 조성을 나타낸다.
- [0160] 또한, 마이크로어레이는 공지된 RNA 서열로부터 생성된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 제조될 수 있다. 어레이는 각각의 RNA에 대해서 2개의 상이한 올리고뉴클레오타이드 프로브를 함유할 수 있는데, 하나는 활성 성숙 서열을 함유하고, 나머지는 RNA(예를 들어 miRNA 및 프리(pre)-miRNA)에 대해서 특이적이다. 어레이는 또한 대조군, 예컨대, 몇몇 염기만 인간 오쏘로그와 상이한 하나 이상의 마우스 서열을 함유할 수 있는데, 이것은 혼성화 엄격성 조건에 대한 대조군으로서 제공될 수 있다. 두 종 모두로부터의 tRNA 및 다른 RNA(예를 들어, rRNA, mRNA)가 또한 마이크로칩 상에 인쇄되어, 특이적 혼성화에 대한 내부의 비교적 안정한 양성 대조군을 제공할 수 있다. 비-특이적 혼성화를 위한 하나 이상의 적절한 대조군이 또한 마이크로칩 상에 포함될 수 있다. 이러한 목적을 위해서, 서열은 임의의 공지된 RNA와의 임의의 상동성의 부재를 기초로 선택된다.
- [0161] 마이크로어레이는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 적절한 길이, 예를 들어, 40개의 뉴클레오타이드의 프로브 올리고뉴클레오타이드는 위치 C6에서 변형된 5'-아민이고, 상업적으로 입수 가능한 마이크로어레이 시스템, 예를 들어, GeneMachine OmniGrid,^(상표명) 100 Microarrayer 및 Amersham CodeLink,^(상표명)를 사용하여 활성화된 슬라이드 상에 인쇄된다. 표적 RNA에 상응하는 표지된 cDNA 올리고머는 표지된 프라이머를 갖는 표적 RNA를 역전사시킴으로써 제조된다. 첫 번째 가닥의 합성 후에, RNA/DNA 혼성체는 변성되어 RNA 주형을 절단한다. 이어서, 이렇게 제조된 표지된 표적 cDNA는 혼성화 조건 하에서, 예를 들어, 25℃에서 6배의 SSPE/30% 폼아마이드 중에서 18시간 동안, 그 다음 0.75배의 TNT 중에서 37℃에서 40분 동안 세척함으로써 마이크로어레이에 혼성화된다. 고정된 프로브 DNA가 샘플 중의 상보성 표적 cDNA를 인식하는 어레이 상의 위치에서, 혼성화가 일어난다. 표지된 표적 cDNA는 결합이 일어나는 어레이 상의 정확한 위치를 표시하여, 자동 검출 및 정량이 가능하다. 결과는 혼성화 사건의 목록으로 이루어지는데, 이것은 특정 cDNA 서열의 상대적인 존재비(abundance)을 나타내고, 따라서 엑소좀 제제 중의 상응하는 상보성 RNA의 상대적인 존재비를 나타낸다. 일 실시형태에 따라서, 표지된 cDNA 올리고머는 바이오틴-표지된 프라이머로부터 제조된 바이오틴-표지된 cDNA이다. 이어서, 마이크로어레이는 예를 들어, 스트렙타비딘-알렉사647 접합체를 사용하여 바이오틴 함유 전사체를 직접 검출하고, 종래의 스캐닝 방법을 사용하여 스캐닝함으로써 가공된다. 어레이 상의 각각의 스팟의 영상 강도는 엑소좀 중의 상응하는 RNA의 존재비에 비례한다.
- [0162] 데이터 마이닝(data mining) 작업은 스캐닝 칩, 신호 획득, 영상 처리, 정규화, 통계학적 처리 및 데이터 비교뿐만 아니라 경로 분석을 비롯한, 바이오인포매틱스에 의해서 완결된다. 이와 같이, 마이크로어레이는 수 백 및 수 천개의 폴리뉴클레오타이드를 고 처리율 성능으로 동시에 프로파일링할 수 있다. mRNA 발현의 마이크로어레이 프로파일링 분석은 기본적인 연구에서 유전자 발현 연구를 위한 가치있는 데이터를 성공적으로 제공하였다. 그리고 이러한 기술은 약제학적 산업 및 임상 진단에서 추가로 실행되었다. 사용 가능해지는 miRNA 데이터의 양의 증가 및 유전자 조절에서의 miRNA의 중요성의 증거가 축적됨에 따라서, 마이크로어레이는 고 처리율 miRNA 연구를 위한 유용한 기술이 된다. 폴리뉴클레오타이드 프로브를 사용한 miRNA 수준의 분석이 마찬가지로 다양한 물리적 포맷으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 마이크로타이터 플레이트 또는 자동화의 사용은 상당한 수의 시험 샘플의 가공을 가능하게 하는 데 사용될 수 있다.
- [0163] **8.2. 엑소좀의 크기 측정**
- [0164] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 정제된 분획 중에 포함된 엑소좀 및/또는 엑소좀의 집단의 크기를 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀 크기는 가장 긴 측정 가능한 치수로서 측정된다. 일반적으로, 엑소좀의 가장 긴 일반적인 치수는 또한 이의 직경이라고 지칭된다.
- [0165] 엑소좀 크기는 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어, 나노입자 트래킹 분석, 다각 광산란, 단일각 광산란,

크기 배제 크로마토그래피, 분석용 초원심분리, 장 흐름 분별법, 레이저 회절, 조정 가능한 저항성 펄스 감지 또는 동적 광산란을 사용함으로써 측정될 수 있다.

[0166] 엑소좀 크기는 동적 광산란(DLS) 및/또는 다각 광산란(MALS)을 사용하여 측정될 수 있다. 엑소좀의 크기를 측정하기 위한 DLS 및/또는 MALS의 사용 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 나노입자 트래킹 검정(예를 들어, Malvern Nanosight NS300 나노입자 트래킹 장치를 사용한 NTA)을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 엑소좀 크기는 Malvern Nanosight NS300을 사용하여 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 (예를 들어, Malvern Nanosight NS300을 사용하여) NTA에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다.

[0167] 엑소좀 크기는 조정 가능한 저항성 펄스 감지(TRPS)를 사용하여 측정될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, TRPS에 의해서 측정되는 경우 엑소좀 크기는 iZON qNANO Gold를 사용하여 측정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 TRPS(예를 들어, iZON qNano Gold)에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 (예를 들어, iZON qNano Gold를 사용하여) TRPS에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다.

[0168] 엑소좀 크기는 전자 현미경을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소좀 크기를 측정하는 데 사용되는 전자 현미경 방법은 투과 전자 현미경이다. 구체적인 실시형태에서, 엑소좀 크기를 측정하는 데 사용되는 투과 전자 현미경은 Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN이다. 전자 현미경을 사용하여 엑소좀 크기를 측정하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 임의의 이러한 방법이 엑소좀 크기를 측정하는 데 적절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀은 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit

BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 20 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 90%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 95%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 엑소좀 집단은 집단을 포함하는데, 여기서 상기 엑소좀의 99%는 주사 전자 현미경(예를 들어, Tecnai^(상표명) G2 Spirit BioTWIN 주사 전자 현미경)에 의해서 측정되는 경우 약 40 내지 1000nm의 가장 긴 치수를 갖는다.

[0169] **8.3. 엑소좀의 전하 밀도의 측정**

[0170] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 정제된 분획 중에 포함된 엑소좀 및/또는 엑소좀의 집단의 전하 밀도를 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전하 밀도는 전위차 측정, 음이온 교환, 양이온 교환, 등전점 전기영동, 제타 전위, 모세관 전기영동, 모세관 영역 전기 영동 또는 겔 전기영동에 의해서 결정된다.

[0171] **8.4. 엑소좀 단백질의 밀도의 측정**

[0172] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 엑소좀 표면 상의 엑소좀 단백질의 밀도를 측정하는 것을 포함한다. 표면 밀도는 단위면적당 질량, 면적당 단백질의 수, 엑소좀당 분자의 수 또는 분자 신호의 강도, 단백질의 몰량 등으로서 계산되거나 제공될 수 있다. 표면 밀도는 당업계에서 공지된 방법에 의해서, 예를 들어, 생물층간섭계법(BLI), FACS, 웨스턴 블로팅, 형광(예를 들어, GFP-융합 단백질) 검출, 나노-유세포 분석법, ELISA, 알파LISA를 사용함으로써 그리고/또는 단백질 겔 상의 밴드를 측정함으로써 농도계에 의해서 실험에 의해서 측정될 수 있다.

[0173] **9. 실시예**

[0174] 하기 실시예는 본 발명을 제조 및 사용하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하도록 제시되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범주를 제한하도록 의도되지 않고, 하기 실험이 수행되는 전부이거나 또는 유일한 실험이라는 것을 나타내도록 의도되지 않는다. 사용된 수치(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해서 노력했지만 일부 실험 오류 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 제시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다. 표준 약어, 예를 들어, bp, 염기쌍(들); kb, 킬로베이스(들); pL, 피코리터(들); s 또는 sec, 초(들); min, 분(들); h 또는 hr, 시간(들); aa, 아미노산(들); nt, 뉴클레오타이드(들) 등이 사용될 수 있다.

[0175] 달리 제시되지 않는 한, 본 발명의 실시는 당업계의 기술 내의 단백질 화학, 생화학, 제조용 DNA 기술, 약리학의 종래의 방법을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다(예를 들어, 문헌[T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992)] 참고).

[0176] **9.1. 실시예 1: 엑소좀 단백질의 식별**

[0177] **9.1.1. 엑소좀의 수집**

[0178] 엑소좀을 9일 후에 HEK293 SF 세포의 고밀도 현탁 배양물의 상청액으로부터 수집하였다. 상청액을 여과시키고, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해서 분별시키고, 염화나트륨의 단계적 구배로 용리시켰다. 최고 단백질 농도를 갖는 피크 분획은 엑소좀 및 오염 세포 성분을 함유하였다. 피크 분획을 단리시키고, 초원심분리에 의해서

Optiprep^(상표명) (60% 아이오딕산을 w/v) 밀도 구배 상에서 추가로 분별시켰다.

[0179] 엑소좀 분획을 초원심분리에 의해서 SW 32 Ti 로터용의 38.5ml Ultra-Clear(344058) 튜브 내에서 133,900×g로 4℃에서 3시간 동안 농축시켰다. 펠릿화된 물질을 1ml의 PBS 및 3ml의 Optiprep^(상표명) 중에 재현탁시켜, 45%의 최종 아이오딕산을 농도를 만들었다. Optiprep^(상표명) 구배를 위해서, SW 41 Ti 로터용의 12ml Ultra-Clear(344059) 튜브 내에서 재현탁된 물질을 함유하는 4ml의 45% 아이오딕산을, 3ml의 30% 아이오딕산을, 2ml의 22.5% 아이오딕산을, 2ml의 17.5% 아이오딕산을, 및 1ml의 PBS를 사용하여 4-역가 멸균 구배를 제조하였다. Optiprep^(상표명) 구배를 150,000×g로 4℃에서 16시간 동안 초원심분리시켜 엑소좀 분획을 분리하였다. 초원심분리는 엑소좀을 함유한다고 알려진 상부 분획, 중간 밀도의 세포 부스러기를 함유하는 중간 분획, 및 고밀도 응집물 및 세포 부스러기를 함유하는 하부 분획을 초래하였다(도 1). 이어서, 엑소좀 층을 튜브의 상부 약 3ml로부터 조심스럽게 수집하였다.

[0180] 엑소좀 분획을 38.5ml Ultra-Clear(344058) 튜브 내에서 약 32ml의 PBS 중에 희석시키고, 133,900×g로 4℃에서 3시간 동안 초원심분리시켜 정제된 엑소좀을 펠릿화시켰다. 이어서 펠릿화된 엑소좀을 최소 부피의 PBS(약 200μl) 중에 재현탁시키고, 4℃에서 저장하였다.

[0181] 9.1.2. LC-MS/MS 분석을 위한 샘플 제조

[0182] 엑소좀에 대해서 특이적인 단백질을 결정하기 위해서, Optiprep^(상표명) 구배의 상부 분획 및 하부 분획을 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광분석법에 의해서 분석하였다. 모든 샘플을 인산염 완충 염수(PBS) 완충액 또는 PBS 및 5% 수크로스 중에서 제공받았다. 분석 전에, 각각의 샘플의 전체 단백질 농도를 바이신코닌산(bicinchoninic acid: BCA) 검정에 의해서 결정하고, 그 후 각각의 샘플을 PBS 완충액 중에서 125μg/ml로 적절하게 희석시켰다. 다음으로, 50.0μl의 각각의 샘플을 동일 부피의 엑소좀 용해 완충액(60mM Tris, 400mM GdmCl, 100mM EDTA, 20mM TCEP, 1.0% Triton X-100)을 함유하는 별도의 1.5ml의 마이크로원심분리 튜브에 첨가하고, 그 다음 2.0μl의 1.0% Triton X-100 용액을 전달하였다. 이어서, 모든 샘플을 55℃에서 60분 동안 인큐베이션시켰다.

[0183] 1250μl의 에탄올을 -20℃에서 첨가함으로써 단백질 침전을 수행하였다. 효율을 개선시키기 위해서, 샘플을 대략 10분 동안 격렬하게 보텍싱시키고, 이어서 -20℃에서 60분 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 샘플을 5분 동안 수욕 중에서 초음파처리하였다. 5분 동안 15,000g로 4℃에서 원심분리시킴으로써 침전된 물질을 펠릿화시켰다. 상청액을 경사분리시키고, 펠릿화된 물질을 질소 기체를 사용하여 완전히 건조시켰다. 펠릿을 30.0μl의 소화 완충액(30mM Tris, 1.0M GdmCl, 100mM EDTA, 50mM TCEP, pH 8.5) 중에 재현탁시켰는데, 이것은 또한 다이설파이드 결합을 환원시켰다. 5.0μl의 알킬화 용액(375mM 아이오도아세트아마이드, 50mM Tris, pH 8.5)을 첨가함으로써 유리 시스테인 잔기를 알킬화시키고, 생성된 용액을 실온 암실에서 적어도 30분 동안 인큐베이션시켰다.

[0184] 인큐베이션 후, 각각의 샘플을 30.0μl의 50mM Tris pH 8.5를 사용하여 희석시키고, 2.0μg의 트립신을 첨가함으로써 단백질분해 소화를 개시시켰다. 모든 샘플을 혼합하고, 이어서 37℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 5.0μl의 10% 폼산을 첨가함으로써 트립신 활성을 중단시켰다. LC-MS/MS에 의한 분석 전에, 각각의 샘플을 Pierce C18 스핀 칼럼을 사용하여 탈염시켰다. 이 과정 이후에, 각각의 샘플을 건조시키고, 0.1% 폼산을 함유하는 50.0μl의 물 중에 재구성시키고, 분석용 HPLC 바이알로 옮겼다.

[0185] 9.1.3. LC-MS/MS 분석

[0186] 샘플을 UltiMate 3000 RSCLnano(써모 피셔 사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific)) 저 유동 크로마토그래피 시스템에 주입시키고, 1.000μl/min의 유량에서 로딩 이동상(MPL: 물질, 0.1% 폼산)을 사용하여 트립신 처리 펩타이드를 Acclaim PepMap 100 C18 트래핑 칼럼(75μm×2cm, 3μm 입자 크기, 100Å 공극 크기, 써모 피셔 사이언티픽사) 상에 로딩하였다. 펩타이드를 용리시키고, 이동상 A(MPA: 물질, 0.1% 폼산) 및 이동상 B(MPB: 아세트나이트릴, 0.1% 폼산)의 구배를 사용하여 EASY-Spray C18 분석용 칼럼(75μm×25cm, 2μm 입자 크기, 100Å 공극 크기, 써모 피셔 사이언티픽사)을 통해서 300nL/min의 유량에서 분리시켰다. 용리를 위해서 사용되는 단계식 구배는 2% MPB에서 시작하였으며, 여기서 그것을 로딩 동안 8분 동안 유지시켰다. 이어서, MPB의 백분율을 35분에 걸쳐서 2에서 17%로, 다시 45분에 걸쳐서 17에서 25%로, 마지막으로 10분에 걸쳐서 25에서 40%로 증가시켰다. 5분에 걸쳐서 MPB를 98%로 증가시키고, 10분 동안 유지시킴으로써 대부분의 소수성 종을 제거하였다. 방법에 대한 총 실험 시간은 135분이었고, 이러한 시간은 칼럼 재평형화에 충분한 시간을 허용하였다. 동일하지 않은 분

석용 주입 사이에 세척 사이클을 수행하여 캐리오버(carry-over)를 최소화하였다.

[0187] Q Exactive Basic(써모 피셔 사이언티픽사) 질량 분석계를 사용하여 질량 분석을 수행하였다. 70,000의 분해능에서 400 내지 1600Da의 m/z 범위에 걸쳐서 전구체 이온 질량 스펙트럼을 측정하였다. 10개의 가장 강력한 전구체 이온을 선택하고, 27의 충돌 에너지를 사용하여 HCD 세포에서 단편화시키고, 35,000의 분해능에서 MS/MS 스펙트럼을 200 내지 2000Da의 m/z 범위에 걸쳐서 측정하였다. 2 내지 4의 전하 상태를 갖는 이온을 단편화를 위해서 선택하고, 동적 제외 시간을 30초로 설정하였다. 14개의 일반적인 폴리실록산을 함유하는 제외 목록을 사용하여 공지된 오염물의 식별오류를 최소화하였다.

[0188] 9.1.4. 데이터 처리

[0189] 단백질을 Proteome Discoverer 소프트웨어(버전 2.1.1.21, 써모 피셔 사이언티픽사)를 사용하여 먼저 식별 및 정량(라벨 없음)하고, Sequest HT 알고리즘을 Target Decoy PSM Validator와 조합하였다. 완전 Swiss-Prot 호모 사피엔스(full Swiss-Prot Homo sapiens)(분류학 9606 버전 2017-05-10: 42,153 엔트리) 참고 데이터베이스, 뿐만 아니라 E1a 단백질(7 엔트리)을 함유하는 통상의 Uniprot 데이터베이스에 대해서 검색을 수행하였다. 하기 검색 파라미터를 사용하였다: 효소, 트립신; 최대 2개의 누락된 절단; 6개 잔기의 최소 펩타이드 길이; 10ppm의 전구체 질량 오차; 및 0.02Da의 단편 질량 오차. 검색은 또한 특정 동적 변형(M의 산화; N 또는 Q의 탈아미드화; S, T 또는 Y의 인산화; 펩타이드-말단 E의 파이로-글루타메이트화(pyro-glutamation); 및 단백질 N 말단의 아세틸화) 및 고정 변형(C의 카바마이드메틸화)을 포함하였다.

[0190] Target Decoy PSM Validator에서, 최대 델타 Cn 및 엄격 및 관대한 표적 오류 발견율(false discovery rate: FDR)을 1로 설정하였는데, 그 이유는 데이터가 스캐폴드 소프트웨어(버전 4.8.2, 프로테오 소프트웨어사(Proteome Software Inc.))를 사용하여 다시 검색되었기 때문이었다. 스캐폴드에서, 또한 X! 탠덤 오픈 소스 알고리즘(X! Tandem open source algorithm)을 사용하여 데이터를 검색하여 99.0%의 단백질 역치, 최소 2개의 펩타이드, 및 95%의 펩타이드 역치를 사용하여 단백질을 식별하였다.

[0191] 신규 엑소좀-특이적 단백질의 동일성을 결정하기 위해서, 전체 펩타이드 스펙트럼 매치(PSM)를, Optiprep^(상표명) 구매의 상부 엑소좀 분획에서 발견된 단백질과 더 아래 분획에서 발견된 단백질에 대해서 비교하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 상부-분획 단백질(Y축) 및 하부 분획 단백질(X축) 사이에 약한 상관관계가 존재하였다. 점선 위에 플로팅된 단백질은 엑소좀-풍부 단백질을 나타내는 반면, 점선 아래의 단백질은 오염물-풍부 단백질을 나타낸다. 중요하게는, (1) 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자(PTGFRN), (2) basigin(BSG), (3) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 3(IGSF3), (4) 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원 8(IGSF8), (5) 인테그린 베타-1(ITGB1), (6) 인테그린 알파-4(ITGA4), (7) 4F2 세포-표면 항원 중쇄(SLC3A2) 및 (8) ATP 수송체 단백질의 부류(ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4)를 비롯한, 엑소좀 분획에 상당히 풍부하다고 식별된 다수의 막-연관 단백질이 존재하였다. 도 3 내지 도 5에서 트립신 처리 펩타이드 커버리지 맵에 도시된 바와 같이, 질량 분광분석법 연구는 PTGFRN(도 3), IGSF8(도 4), 및 Basigin(도 5)의 넓은 커버리지를 초래하였다. 함께, 이러한 결과는, 이질(heterogeneous) 집단으로부터 엑소좀을 정제하는 데 유용할 수 있거나 또는 조작된 엑소좀의 생성에 있어서 스캐폴드로서 사용하는 데 유용할 수 있는 정제된 엑소좀 집단에 풍부한 다수의 막관통 단백질이 존재함을 입증한다.

[0192] 9.2. 실시예 2: 표면 단백질 발현의 검증

[0193] 질량 분광분석법 연구에서 식별된 엑소좀-특이적 단백질이 엑소좀의 표면 상에 상당히 풍부하다는 것을 확인하기 위해서, HEK293 세포로부터의 전체 세포 용해물 및 정제된 엑소좀 집단 상에서 단백질 블로팅을 수행하였다. 도 6A에 나타난 바와 같이, 전체 단백질 패턴은 전체 세포 용해물(좌측)과 엑소좀 용해물(우측) 사이에 상당히 상이하였다. 구체적으로, 엑소좀 용해물에서 약 110kDa에서 강한 밴드가 존재하였는데, 이것은 전체 세포 용해물에 존재하지 않는 것이었다. PTGFRN에 대한 웨스턴 블롯은, 엑소좀 용해물에서의 110kDa의 예측된 크기에서의 밴드를 나타냈고, 이 밴드는 세포 용해물에는 존재하지 않았는데(도 6B), 이는, PTGFRN이 엑소좀에 상당히 풍부하며, 전체 엑소좀 용해물에서 육안으로 검출 가능할 수 있음을 나타낸다.

[0194] 질량 분광분석법 연구는 몇몇 신규 엑소좀-연관 막 단백질의 존재를 나타내었다. 이러한 연관을 추가로 확인하기 위해서, 엑소좀 분획을 자가 형성 Optiprep^(상표명) 구매 상에서 정제시키고, 웨스턴 블롯에 의해서 분석하였다. 도 7A에 나타난 바와 같이, 전체 단백질은 구매의 모든 분획에서 검출되며, 엑소좀 마커 단백질 Alix 및 Syntenin은 분획 2 내지 6에서 풍부하다. 중요하게는, 분석된 신규 표면 마커 단백질 각각은 이러한 동일한 분획에서 풍부하였는데, 이는 엑소좀과 강하고 특이적으로 연관됨을 나타낸다(도 7B). 이러한 막관통 단백

질이 엑소솜에서 높게 발현되고, 풍부하다는 입증은, 이러한 단백질 중 임의의 것에 대해서 지향되는 결합제를 사용함으로써 엑소솜을 정제시킬 기회를 제공할 뿐만 아니라 이러한 신규 단백질 중 임의의 것에 접합되는 이질 단백질을 함유하는 고 발현 표면-변형된 엑소솜을 생성시킬 기회를 제공한다(도 8).

[0195] **9.3. 실시예 3: PTGFRN의 도메인 특징규명**

[0196] PTGFRN, BSG, IGSF3 및 IGSF8은 세포외/소포외(extravesicular) 환경에 대면하는 N-말단 및 C-말단을 갖는 모든 타입 I 싱글-패스(single-pass) 막관통 단백질이고, 이것은 도 8에 도시된 바와 같이 적어도 2개의 번역글로 불린 V(IgV) 반복부를 함유한다. PTGFRN은 도 2에 도시된 질량 분광분석법에서 검출된 가장 고도로 풍부한 표면 단백질이었다. GFP와 전장 PTGFRN 또는 도 9A 및 도 9B에 기재된 PTGFRN의 다양한 IgV 절두 변이체 간의 융합 단백질을 암호화하는 발현 작제물은 HEK293 세포에서 안정적으로 발현되었다. 엑소솜을 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 HEK293 세포 배양물로부터 단리시키고, 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해서 분석하였다. 도 9B에 도시된 바와 같이, GFP와 전장 또는 절두된 PTGFRN 간의 융합 단백질의 발현은 정제된 엑소솜에서 검출되었다. 흥미롭게도, 제1 IgV 도메인의 결실은 전장 단백질의 과발현으로 검출 가능하지 않은 더 낮은 분자량 밴드("절단된 생성물"이라고 표시됨)를 초래하였다. 이러한 더 작은 생성물은 모든 절두 변이체에서 일관되게 검출되었는데, 이는 그것이 프로테아제 절단의 결과로서 생성되었음을 시사한다. 다양한 GFP-PTGFRN 융합 단백질을 함유하는 엑소솜을 SDS-PAGE mini-PROTEAN(등록상표) TGX Stain-Free Gel(바이오라드사(Bio-Rad, Inc.)) 상에서 분석하여 전체 엑소솜 단백질을 측정하였다. 결과를 도 10에 제공한다. GFP 및 전장 PTGFRN의 융합 단백질의 발현은 쉽게 검출 가능하였고, 정제된 엑소솜에서 전체 단백질의 약 50%만큼 높은 수준으로 매우 풍부하였다(레인 2). 더 낮은 분자량의 절단 생성물("절단된 생성물"이라고 표시)은 명확하게 보이지 않았기 때문에, 네 이티브 엑소솜 또는 전장 PTGFRN을 과발현하는 엑소솜(레인 1 및 레인 2)에 존재하지 않았는데, 이는 단백질의 N-말단에서의 제1 IgV 도메인(IgV 1)이 PTGFRN의 절단을 예방할 수 있다는 것을 시사한다.

[0197] 이어서 전장 PTGFRN 및 다양한 절두된 PTGFRN 돌연변이체는 HEK293 세포에서 N-말단 FLAG 태그와 함께 안정적으로 발현되었다(도 11A). 세포 배양물로부터의 엑소솜을 수집하고, 웨스턴 블롯에 의해서 항-FLAG 항체를 사용하여 분석하였다. 결과를 도 11B에 제공한다. C-말단에 GFP를 함유하는 융합 단백질과 대조적으로(도 9 및 도 10), N-말단에 FLAG 태그를 함유하는 융합 단백질은 저분자량 밴드(도 11B에서 "절단 생성물 없음"이라고 표시)를 생성시키지 않았고, 더 짧은 절두체가 낮은 수준으로 검출되었다. 이러한 결과는, 절단 사건이 웨스턴 블롯을 위해서 사용되는 FLAG 에피토프에 연결된 단백질의 N-말단을 제거할 가능성이 있음을 시사한다(도 11B).

[0198] 도 6A 및 도 6B에 제공된 웨스턴 블롯 결과에 의해서 시사된 바와 같이, PTGFRN은 세포 용해물에서 불량하게 검출되고, 무손상 PTGFRN과 절단된 PTGFRN의 혼합물이 정제된 엑소솜에서 검출된다. 이는, PTGFRN은 엑소솜막에 국지화 및 통합되는 동안 또는 엑소솜의 형성 동안 절단된다는 것을 시사한다. ADAM10(A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10)은 종래의 엑소솜 단백질 및 막-연관 메탈로프로테아제이다. HEK293 세포에 Cas9 및 ADAM10 유전자좌를 표적으로 하는 4종의 가이드 RNA(CRISPR32174_SG, CRISPR726928_SG, CRISPR726931_SG 및 CRISPR726933_SG, 씨모 피셔 사이언티픽사)를 형질주입시켜 ADAM10 녹아웃 세포를 생성시켰다. 이어서 ADAM10 녹아웃 세포(ADAM 10 -) 또는 야생형 세포(ADAM10 +)에 GFP에 융합된 전장 PTGFRN을 함유하는 융합 단백질 또는 GFP에 융합된 첫 번째 3개의 IgV 도메인이 결합된 절두된 PTGFRN을 함유하는 상이한 융합 단백질(PTGFRN_IgV3-GFP)을 암호화하는 작제물을 안정적으로 형질주입시켰다. 엑소솜을 이러한 세포로부터 단리시키고, 항-GFP 항체를 사용하여 전체 단백질 PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해서 융합 단백질의 발현을 측정하였다. 도 12A는 전체 단백질의 대등한 양을 각각의 레인에 로딩한 것을 나타낸다. 항-ADAM10 항체(ab124695; 압캄사)를 사용한 웨스턴 블롯은 녹아웃 세포에서 ADAM 10의 효율적인 결실을 나타내었다(도 12B). 항-GFP 항체를 사용한 웨스턴 블롯은, 도 12C(레인 1 및 레인 2)에 제공된 바와 같이 야생형(ADAM10 +) 및 ADAM10 녹아웃 세포(ADAM10 -) 둘 다에서 전장 PTGFRN 및 GFP를 함유하는 융합 단백질의 높은 수준 발현을 나타내었다. 이러한 결과는, 전장 PTGFRN을 함유하는 융합 단백질의 절단이 검출되지 않은 도 9B의 결과와 일치한다. 흥미롭게도, PTGFRN_IgV3-GFP에 대해서 이미 검출된 절단 생성물은 야생형 세포에서 검출되었지만, ADAM10 녹아웃 세포에는 존재하지 않았다(도 12C, 레인 3 및 레인 4). 이는, ADAM10이 엑소솜성 PTGFRN 단편의 절단을 매개한다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 또한, 절두된 PTGFRN 단편을 함유하는 융합 단백질은 ADAM10이 결합된(ADAM10 -) 세포로부터의 엑소솜 상에서 보다 성공적으로 발현될 것이라는 것을 시사한다.

[0199] PTGFRN은 고밀도 엑소솜 데코레이션(decoration)/로딩을 위한 매력적인 융합 파트너로서 사용될 수 있지만, 크기(약 100kDa)로 인해서, 큰 생물학적 활성 분자의 공동 발현을 허용하기 위해서 더 작은 절두된 버전이 바람직할 것이다. IgV 절두 돌연변이체 각각에서 검출된 ADAM10-의존적 절단은 고밀도 로딩을 위한 문제를 제시하는데, 그 이유는 임의의 융합 단백질의 특정 백분율이 엑소솜 표면으로부터 절단되어, 로딩/디스플레이

정도를 감소시킬 것이기 때문이다. 프로테아제 절단을 겪지 않고 고밀도 엑소솜 표면 디스플레이를 가능하게 하는 최소 PTGFRN 단편을 식별하기 위해서, 6개의 IgV 도메인 중 5개가 결핍된 PTGFRN(PTGFRN_IgV6)을 FLAG 태그에 대한 융합부 및 융합 파트너 단백질로서 발현시켰다(도 13). PTGFRN_IgV6을 함유하는 융합 단백질의 발현은 이미 식별된 예측된 절단 생성물을 산출하였다(도 14B, #451). 한 번에 4개의 추가 아미노산이 결핍된 PTGFRN_IgV6의 연속 절두 돌연변이체를 또한 시험하였고, 12개의 아미노산의 제거는 PTGFRN의 절단을 겪지 않은 엑소솜을 산출하였다(도 14A, 도 14B, #454). PTGFRN #454는 서열번호 33의 폴리펩타이드이다. 추가로, FLAG 태그는 절단 부위에 대해서 N-말단이기 때문에, PTGFRN_IgV6의 더 짧은 절두체는 융합 단백질의 더 높은 발현을 초래하였는데, 이는 절단이 이러한 절두체로 일어나지 않음을 시사한다(도 14C).

[0200] 도 15에 제공된 결과는, 전장 PTGFRN(FL) 및 PTGFRN_454(sIgV)가 엑소솜 상에서 그리고/또는 엑소솜 내에서 내강(C-말단 융합) 또는 표면(N-말단) 단백질의 고밀도 발현을 위한 이상적인 융합 파트너라는 것을 추가로 시사한다. 이러한 가설을 시험하기 위해서, 몇몇 스캐폴드 단백질을, 고밀도 디스플레이 엑소솜을 생산하는 능력에 대해서 시험하였다. 스캐폴드 단백질 및 GFP를 포함하는 융합 단백질, 구체적으로 빈번하게 사용되는 pDisplay 스캐폴드(PDGF 수용체), PalmPalm(팔미토일화 서열), CD81, 또는 전장 PTGFRN(FL) 또는 PTGFRN_454(sIgV) 중 어느 하나의 내강 면에 융합된 GFP를 함유하는 융합 단백질을 세포 배양물에서 발현시켰다. 각각의 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 세포로부터 정제된 엑소솜의 용량 적정은, PTGFRN 융합 단백질이 널리 공지된 엑소솜 단백질 CD81을 비롯한 임의의 다른 스캐폴드보다 훨씬 더 큰 GFP 형광을 초래하였다는 것을 입증하였다. pDisplay 스캐폴드에 비해서, 전장 PTGFRN 및 sIgV는 로딩 효율에 있어서 25배 초과를 향상을 초래하였다(도 15). 이러한 결과는, 융합 파트너로서, 전장 PTGFRN 또는 절단 부위를 제거하기에 충분히 짧은 절두된 PTGFRN(sIgV)을 사용하는 것이 고밀도 디스플레이 또는 엑소솜 로딩을 허용한다는 것을 시사한다.

[0201] 9.4. 실시예 4: IGSF8 과발현은 고밀도 엑소솜 디스플레이로 이어지지 않는다

[0202] PTGFRN의 발현 수준은, 그것이 조작된 엑소솜을 생산하기 위한 이상적인 융합 파트너일 것이라는 것을 시사한다. 면역글로불린-함유 단백질 패밀리의 다른 구성원이 엑소솜 조작에 적합함을 결정하기 위해서, HEK293 세포에 IGSF8-GFP 융합 단백질을 안정적으로 형질주입시키고, 생성된 엑소솜을 정제시켰다(도 16A). 네이티브 엑소솜 및 IGSF8-GFP 엑소솜을 SDS-PAGE mini-PROTEAN(등록상표) TGX Stain-Free Gel(바이오라드사) 상에서 분석하였는데, 이것은 도 16B에 제공된 바와 같이 트립토판-결합 염료를 사용하여 단백질을 검출한다. IGSF8은 10개의 트립토판 잔기를 함유하여, 이의 용이한 검출을 가능하게 한다. 항-GFP 항체를 사용한 웨스턴 블롯은 과발현 엑소솜 상에서의 IGSF8-GFP의 발현을 확인해주었다(도 16B, 하단). 흥미롭게도, IGSF8-GFP 엑소솜을 pDisplay 스캐폴드(PDGF 수용체)에 대한 GFP 융합체와 비교하여 GFP 형광에 대해서 시험하는 경우, CD81, 또는 전장 PTGFRN(FL) 또는 PTGFRN_454(sIgV), IGSF8(FL IGSF8)는 pDisplay에서 관찰된 낮은 수준의 확률론적 디스플레이에 비해서 GFP 풍부화를 나타내지 않았다(도 17). 이러한 결과는, 모든 IgV 패밀리 구성원이 고밀도 엑소솜 표면 디스플레이/내강 로딩을 조작하기 위한 융합 단백질로서 사용될 수 있는 것은 아니며, PTGFRN 및 다른 패밀리 구성원이 이와 관련하여 IGSF8보다 더 우수함을 시사한다. 그러나, IGSF8 발현은 비변형된 엑소솜의 표면 상에서 더 높은 수준으로 검출되었는데, 이는 IGSF8가 엑소솜 친화성 정제를 위한 표적으로서 사용되는 것을 허용할 것이다.

[0203] 9.5. 실시예 5: 포유동물 세포에서 PTGFRN의 세포외 도메인의 발현 및 특징규명

[0204] PTGFRN의 세포외 도메인(ECD)은 98kDa이고, 6개의 tandem IgV 반복부를 함유한다. PTGFRN의 ECD는, 크기 및 높은 발현 수준으로 인해서 엑소솜 친화성 정제 시약을 위한 바람직한 표적일 수 있다. PTGFRN의 이러한 분절을 특징규명하기 위해서, PTGFRN ECD를, N-말단의 내인성 신호 펩타이드(SP), PAR1 절단 부위 및 C-말단의 Fc 도메인을 갖는 융합 단백질로서 발현시켰다(도 18). PAR1은 트롬빈에 대한 기질이고, 단백질 A 수지를 사용하여 Fc 융합 단백질을 용리시키는 데 사용될 수 있다. PTGFRN은 9개의 예측된 N-연결된 글리코실화 부위 및 6개의 예측된 다이스설파이드 결합을 갖는데, 이것이 내인성 당단백질의 생산을 위한 박테리아 발현 시스템의 사용을 불가능하게 한다. PTGFRN ECD를, 고 수율 포유동물 재조합 단백질을 생산하는 데 사용되는 Expi293 발현 시스템(쓰모 피서 사이언티픽사)을 사용하여 과발현시켰다. 형질주입된 Expi293 세포로부터의 컨디셔닝된 세포 배양물 배지를 0.2 μm 필터로 여과시키고, 단백질 A 상에서 정제시키고, 그 다음 낮은 pH 글리신으로 용리시키고, 즉시 중화시켰다. Fc 태그를 트롬빈 처리로 제거하고, 절단된 단백질을 풀을 단백질 A에 대해서 재전개시켰다. 통과액을 수집하고, 농축시키고, 정제용 SEC 상에서 폴리싱(polishing)시켰다. 정제된 PTGFRN ECD를 PBS pH 7.4 중에서 Superdex 200 칼럼(지이 헬스케어사(GE Healthcare))을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피에 의해서 분석하고, 280nm UV 형광으로 검출하였다. 도 19A는 약 55mL에서의 단일 용리 피크를 나타내고, 도 19B는 용리액 피크를 변성 SDS-PAGE mini-PROTEAN(등록상표) TGX Stain-Free Gel(바이오라드사) 상에서 분석한 경우

PTGFRN ECD의 예측된 크기에서 단일 단백질 생성물을 나타내는데, 이는 PTGFRN ECD가 포유동물 세포로부터 정제될 수 있음을 나타낸다.

[0205] PTGFRN ECD의 적절한 발현을 확인하기 위해서, 비교를 위한 표준품으로서 BSA 및 항-VLA4 항체를 사용하여, 정제된 단백질을 크기 배제 크로마토그래피/다각 광 산란(SEC-MALS)에 의해서 분석하였다. 재조합 PTGFRN ECD를 예측된 분자량의 약 2×로 용리시켰다(예측된 분자량, 98kDa과 비교할 때 198kDa; 도 20A). PTGFRN ECD가 용액 중에서 동종이량체를 형성하는지를 결정하기 위해서, 재조합 PTGFRN ECD를 PBS 중에서 구아니디늄 클로라이드(GuHCl)의 부재 하에서 또는 1M 또는 2M의 구아니디늄 클로라이드(GuHCl)의 존재 하에서, 분석용 SEC 칼럼(토소사(Tosoh), 7.8×30cm, G3000SW x1) 상에서 전개시켰다. 도 20B는 증가하는 GuHCl(GuHCl 없음("PTGFRN"이라고 표시된 곡선), 1M GuHCl("PTGFRN + 1M GuHCl"이라고 표시된 곡선), 또는 2M GuHCl("PTGFRN + 2M GuHCl"이라고 표시된 곡선)) 하에서의 PTGFRN ECD의 용리 프로파일 및 예측된 이량체 피크의 단량체 피크로의 전환을 나타낸다. 이러한 결과는, PTGFRN ECD가 동종이량체를 형성하고, PTGFRN 이량체화는 엑소좀 표면 상에서 자연 발생할 수 있음을 시사한다.

[0206] 9.6. 실시예 6: PTGFRN 단백질 어레이

[0207] PTGFRN은 문헌에서 저조하게 특징규명되어 있고, 엑소좀성 단백질로서의 이의 역할은 광범위하게 검토되어 있지 않다. PTGFRN은 엑소좀의 표면 상에서 또한 발견되는 CD9와의 상호작용으로 인해서 CD9 파트너 1(CD9P-1)라고도 공지되어 있다. PTGFRN이 어느 단백질에 결합하는지를 추가로 이해하기 위해서, 재조합 모노-바이오틴일화된 인간 PTGFRN ECD를 생성시키고, 81%의 인간 프로테오솜을 포함하는 20,000종 초과 단백질 함유하는 단백질 마이크로어레이(CDI 레보러토리즈사(CDI Laboratories)) 상에서 프로빙하였다. pH 5.6 및 7.4에서 결합 분석을 수행하여 각각 산성화 엔도솜 및 사이토솔의 pH를 나타내었다. 9종의 양성 히트가 pH 7.4에서 식별되었고, 16종이 pH 5.6에서 식별되었다. 3종의 단백질(LGALS1, galectin-1; FCN1, ficolin-1; MGAT4B, 알파-1,3-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사민일트랜스퍼라제 B)이 pH 5.6 및 pH 7.4 둘 다에서 식별되었다(도 21). LGALS1은 단량체 탄수화물 및 복합체 글리칸에 결합한다고 공지되어 있지만, PTGFRN 결합 파트너로서 관련되지 않았다. PTGFRN과 LGALS1 간의 상호작용을 확인하기 위해서, 바이오틴일화된 재조합 PTGFRN ECD를 스트렙타비딘 광학 프로브에 결합시키고, Octet(등록상표) RED96(폴사(Pal))을 사용하여 생물층 간섭계법(BLI)에 의해서 분석하였다. PTGFRN에 대한 galectin-1의 용량-의존적 결합을 BLI에 의해서 확인하였다(도 22). LGALS1과 PTGFRN 간의 상호작용은 가역적이었고, 용량-의존적 방식으로 락토스와 경쟁하였는데(도 23), 이는 이러한 상호작용의 특이성을 입증한다. 이러한 결과는, 또한 엑소좀이 친화성 시약으로서 PTGFRN 결합 파트너를 사용함으로써 정제될 수 있다는 것을 시사한다.

[0208] 9.7. 실시예 7: PTGFRN 또는 엑소좀에 대한 항-PTGFRN 항체의 결합

[0209] 바이오틴일화된 PTGFRN을 Octet(등록상표) RED96(폴사)의 스트렙타비딘 프로브에 결합시키고, PTGFRN(MABT883, 밀리포어 시그마사(Millipore Sigma))에 대한 다른 명칭인 CD315에 대한 단클론성 래트 항체의 농도를 증가시키면서 PBS+0.1% Tween 20 중에서 인큐베이션시켰다. 용량-의존적 결합이 검출되었고, 이는 항체에 의한 PTGFRN의 특이적 인식을 시사한다(도 24). 항-CD315 항체가 엑소좀에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해서, 항-CD315 항체를 단백질 L 프로브에 결합시키고, Optiprep^(상표명) 정제된 HEK293 엑소좀의 양을 증가시키면서 인큐베이션시켰다(도 25). 도 25에 도시된 바와 같이, 정제된 엑소좀과의 인큐베이션 후 용량-의존적 굴절은 항-CD315 항체가 엑소좀 표면 상의 내인성 PTGFRN을 인식할 수 있다는 것을 나타낸다. PTGFRN 과발현 엑소좀(PTGFRN++ 엑소좀)을 생성시키도록 전장 PTGFRN이 안정적으로 형질주입된 HEK293 세포를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 과발현 엑소좀을 고정된 항-CD315 항체와 함께 인큐베이션시켰고, 용량-의존적 굴절이 초래하였는데, 이는 항체와 엑소좀 간의 특이적 결합을 나타낸다(도 26). 네이티브 또는 PTGFRN 과발현 엑소좀에 대한 항체 결합의 정도를 비교하기 위해서, 각각의 종의 1.1E11 엑소좀을 항-CD315 항체의 존재 하에서 인큐베이션시키고, BLI에 의해서 측정하였다. 도 27에 도시된 바와 같이, PTGFRN 과발현 엑소좀은 네이티브 엑소좀보다 훨씬 더 큰 굴절로 이어졌는데, 이는 증가된 수준의 PTGFRN이 더 큰 결합으로 이어지고, 따라서 PTGFRN 결합이 엑소좀 정제를 위해서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0210] 9.8. 실시예 8: 항-PTGFRN 항체에 의한 도메인 인식

[0211] 실시예 6 및 7의 결과는, 엑소좀이 PTGFRN과의 친화성 상호작용에 기초하여 정제될 수 있음을 시사한다. 전장 PTGFRN 및 일련의 절두 돌연변이체를 상기에 기재된 Expi293 시스템을 사용하여 모노-바이오틴일화된 재조합 단백질을 발현시켰다(도 28, 좌측). 절두체 각각을 항-CD315 항체와 함께 인큐베이션시키고, 결합을 BLI에 의해서 측정하였다. 전장 PTGFRN 만 항-CD315 항체에 결합하였는데, 이는 에피토프가 제1 IgV 도메인 내의 단백질의

N-말단에 존재한다는 것을 나타낸다.

[0212] 토끼에게 도 28의 작제물 1과 유사하지만 바이오틴일화 서열이 결핍된 PTGFRN의 재조합 전장 엑토-도메인을 주입함으로써 다클론성 항체 풀을 생성시켰다. 다클론성 항체 풀을 단백질 A에 의해서 최종 혈액으로부터 정제시키고, PTGFRN 절두 단편에 대한 반응성에 대해서 시험하였다. 단편 각각을 변성 SDS-PAGE mini-PROTEAN(등록상표) TGX Stain-Free Gel(바이오라드사) 상에서 분석하여 적절한 길이의 단백질의 발현을 확인하였다(도 29A). 이어서 웨스턴 블롯을 폴딩된 다클론성 토끼 항체를 사용하여 샘플 상에서 수행하였고, 적절한 크기의 밴드를 각각의 레인에서 그리고 대조군 네이티브 엑소좀에 대해서 검출하였고, 이는 다클론성 PTGFRN 항체와의 특이적 반응성을 확인해주었다(도 29B). 이러한 결과를 확인하기 위해서, 바이오틴일화된 PTGFRN 단편 각각을 BLI에 의해서 분석하였고, 그 결과를 도 30에 제공한다. 다클론성 항체 풀과의 인큐베이션은 모든 조건에서 결합을 나타내었는데, 이는 PTGFRN의 IgV 도메인 각각에 대한 항체와의 광범위한 반응성을 입증한다.

[0213] **9.9. 실시예 9: 다양한 세포주로부터의 엑소좀은 IgV 패밀리 구성원 및 다른 신규 표면 단백질을 발현한다**

[0214] 상이한 기원의 조직의 세포주(HEK293SF, 신장; HT1080, 결합 조직; K562, 골수; MDA-MB-231, 유방; Raji, 림프아구)를 지수기까지 성장시키고, 엑소좀-고갈 혈청이 보충된 배지로 약 6일 동안 옮겼다. 골수-유래된 간엽 줄기세포(MSC)를 3D 마이크로캐리어 상에서 5일 동안 성장시키고, 3일 동안 무혈청 배지를 보충하였다. 상청액을 단리시키고, 엑소좀을 상기에 기재된 Optiprep^(상표명) 밀도-구배 초원심분리 방법을 사용하여 정제시켰다. 정제된 엑소좀 각각을 상기에 기재된 바와 같이 LC-MS/MS에 의해서 분석하였고, 몇몇 엑소좀 표면 단백질에 대한 펩타이드 스펙트럼 매치(PSM)의 수를 정량하고(PTGFRN, IGSF8, IGSF3, BSG, SLC3A2, ITGB1, CD81 및 CD9), 결과물도 31에 제공한다. 테트라스파닌(tetraspanin) CD81 및 CD9는 대부분의 정제된 엑소좀 집단에서 검출 가능하지만, 일부 경우에는 다른 표면 마커와 동일하거나 더 낮았다(예를 들어, 모든 세포주에서 CD9를 PTGFRN, BSG, 및 SLC3A2과 비교함). 이러한 발견은, IgV 단백질 패밀리 구성원을 비롯한 새로 식별된 표면 마커가 상이한 조직으로부터 유래된 몇몇 관련되지 않은 세포주를 위한 엑소좀 친화성 정제 방법을 개발하기에 적합한 표적이라는 것을 나타낸다.

[0215] **9.10. 실시예 10: PTGFRN 녹아웃 세포 및 엑소좀**

[0216] PTGFRN 녹아웃 세포를 생성시키기 위해서, HEK293SF 세포에 재조합 Cas9, 및 PTGFRN의 엑손 2 및 막관통 영역을 표적으로 하는 가이드 RNA를 형질주입시켰다. 씨모피서사에 의해서 생성된 엑손2를 표적으로 하는 가이드 RNA는 하기를 포함하였다: (1) CGTTGGCAGTCCGCCTAAC, CRISPR926045_CR(서열번호 36); (2) CATAGTCACTGACGTTGCAG, CRISPR926054_CR(서열번호 37); (3) TTGTGGAGCTTGCAAGCACC, CRISPR926055_CR(서열번호 38); 및 (4) GTTCTTTATGTGGAGCTCCA, CRISPR926071_CR(서열번호 39). 씨모피서사에 의해서 생성된 막관통 영역을 표적으로 하는 가이드 RNA는 (1) TATCCCTTGCTGATCGGCGT, TMgRNA5.1.97(서열번호 40); (2) GCTGCAGTACCCGATGAGAC, TMgRNA3.7.87(서열번호 41)을 포함하였다.

[0217] PTGFRN의 엑손 2 및 막관통 영역의 표적화된 유전자 편집 및 결실을 PCR 및 서열분석에 의해서 확인하였다. 5종의 클론성 PTGFRN 녹아웃(PTGFRN KO) 세포주로부터의 엑소좀을 상기에 기재된 바와 같이 정제시키고, 실시예 8에 기재된 다클론성 토끼 항체 풀을 사용하여 웨스턴 블롯 및 PAGE에 의해서 분석하였다. 도 32B에 도시된 바와 같이, PTGFRN에 상응하는 밴드는 5종의 녹아웃 클론 중 어느 것에서도 검출되지 않았는데, 이는 생산자 세포 및 정제된 엑소좀에서 PTGFRN의 표적화된 결실을 입증한다. 중요하게는, 엑소좀 생산 수율 및 전체 단백질 밴딩 패턴(도 32A)은 PTGFRN 결실에 의해서 영향을 받지 않았는데, 이는 PTGFRN KO 엑소좀이 실험 목적을 위해서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0218] PTGFRN 결실이 정제된 엑소좀의 프로테오믹 프로파일을 변경하였는지를 결정하기 위해서, 비교 질량 분광분석법에 의해서 네이티브 엑소좀 및 PTGFRN KO 엑소좀을 분석하였다. 도 33에 도시된 바와 같이, 네이티브 엑소좀 및 PTGFRN KO 엑소좀의 단백질 함량은 PTGFRN(이것은 PTGFRN KO 엑소좀에서는 검출 가능하지 않았음)만을 제외하고는 매우 유사하였다. 엑소좀 마커 Alix, CD81, TSG101, 및 CD9는 군 간에 상당히 상이하지는 않았다. 이러한 데이터는, PTGFRN은 엑소좀의 프로테오믹 프로파일을 변경시키지 않으면서 엑소좀으로부터 제거될 수 있다는 것을 입증한다.

[0219] PTGFRN 결실이 PTGFRN의 완전한 기능성 제거를 초래하였는지를 검증하기 위해서, 그리고 실시예 7에 기재된 항-PTGFRN(항-CD315) 항체가 PTGFRN에 대해서 특이적인지를 입증하기 위해서, BLI를 사용한 엑소좀 결합 실험을 네이티브 엑소좀, PTGFRN 과발현 엑소좀(PTGFRN++) 및 PTGFRN KO 엑소좀을 사용하여 수행하였다. 도 27 및 실시예 7에 기재된 실험 결과와 유사하게, PTGFRN++ 엑소좀은 네이티브 엑소좀보다 더 높은 친화성으로 고정된 항-

CD315 항체에 결합하였다(도 34). 이에 반해서, 동일한 수의 PTGFRN KO 엑소솜은 고정된 항체에 결합하지 않았는데(도 34), 이는 PTGFRN 결실이 PTGFRN KO 엑소솜과 항-PTGFRN 친화성 시약의 상호작용을 제거하였다는 것을 입증하였다.

[0220] **9.11. 실시예 11: 엑소솜은 PTGFRN을 인식하는 친화성 시약으로 정제될 수 있다**

[0221] PTGFRN에 대한 통상의 단클론성 항체를 실시예 8에 기재된 바와 같은 면역화된 토끼로부터 생성시켰다. PTGFRN을 사용함으로써 엑소솜이 단리될 수 있는지를 결정하기 위해서, 5×10^{10} 개의 네이티브 또는 PTGFRN KO 엑소솜을 자성 단백질 A 비드(카탈로그 #10001D; 인비트로젠사(Invitrogen)) 또는 10 μ g의 통상의 항-PTGFRN 단클론성 항체로 작용화된 단백질 A 비드에 첨가하였다. 각각의 엑소솜-비드 혼합물을 30분 동안 실온에서 인큐베이션시키고, PBS+0.1% v/v TWEEN(등록상표) 20으로 3회 세척하였다. 세척된 비드를 용리 완충액(20mM 글리신 pH 3.6, 2 $\times$ Laemmli 샘플 완충액(카탈로그 #1610737, 바이오라드사), 10% β -머캅토에탄올) 중에서 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 인큐베이션시킴으로써 용리시키고, 비등시킨 상청액을 PAGE에 의해서 분석하고, 상이한 통상의 항-PTGFRN 단클론성 항체를 사용하여 항-PTGFRN 웨스턴 블로팅하였다. PAGE에 의해서 분석된 전체 단백질은 항-PTGFRN 항체의 존재 하에서 네이티브 엑소솜 조건에서만 PTGFRN의 분자량에 상응하는 밴드를 나타내었다(도 35A). 이러한 밴드는 웨스턴 블롯에 의해서 PTGFRN로서 검증되었다(도 35B). HC 및 LC는 각각 정제를 위해서 사용된 항-PTGFRN 항체의 중쇄 및 경쇄에 상응하였다. 이러한 데이터는, PTGFRN-함유 엑소솜이 엑소솜 표면 상의 PTGFRN을 사용함으로써 용액으로부터 정제될 수 있음을 입증한다.

[0222] **9.12. 실시예 12: 다양한 이종 단백질을 PTGFRN에 융합시켜 엑소솜 상에서 과발현을 가능하게 할 수 있다**

[0223] 도 11, 도 13, 도 14 및 도 15에 제공된 실험 데이터는, 몇몇 단백질이 과발현 스캐폴드로서 PTGFRN을 사용함으로써 극적으로 과발현될 수 있다는 것을 입증한다. PTGFRN을 사용한 과발현은 다른 엑소솜 과발현 스캐폴드를 사용한 발현보다 상당히 더 양호하였다. PTGFRN에 융합됨으로써 성공적으로 과발현될 수 있는 단백질의 범위를 결정하기 위해서, 몇몇 조각된 엑소솜을 생성시켰다. 인자 VIII(FVIII)은 응고 캐스케이드에 관여된 큰 효소이다. B 도메인이 결핍된 FVIII의 단편(BDDFVIII)을 PTGFRN의 N-말단(외부에 대면하는 면)에 융합시켰고, HEK293SF 세포에서 발현시켰다. 정제된 엑소솜을 PAGE(도 36A) 및 웨스턴 블롯(도 36B)에 의해서 분석하였다. 세포 배양물 중에서 전장 FVIII의 가공에 의해서 생성된 FVIII의 경쇄는 FVIII(도 36B; 카탈로그 #GMA-8025, 그린 마운틴 안티바디즈사(Green Mountain Antibodies))에 대한 항체를 사용하여, 조각된 엑소솜에서 쉽게 검출되었지만, 네이티브 엑소솜에서는 쉽게 검출되지 않았다. 전장 FVIII는 165kDa의 분자량을 갖고, 이것은 PTGFRN(약 120kDa)의 분자량보다 상당히 더 큰 것인데, 이는 효소를 비롯한 매우 큰 단백질이 엑소솜의 표면 상에서 PTGFRN 융합체로서 성공적으로 발현될 수 있음을 입증한다.

[0224] 상기에 기재된 PTGFRN 융합 파트너는 정렬된 3차원 구조를 갖는 모든 단백질이다. XTEN(등록상표) 펩타이드(Amunix; 마운틴 뷰사(Mountain View), 미국 캘리포니아주 소재)는 이의 일차 서열에 비해서 극적으로 증가된 겉보기 분자량을 갖는 긴 비정렬된 반복적인 서열을 갖는다. XTEN(8%의 Ala, 12%의 Glu, 18%의 Gly, 17%의 Pro, 28%의 Ser 및 17%의 Thr을 포함하는 무작위 288-아미노산을 포함하는 단백질)을 암호화하는 융합 작제물, PTGFRN의 단편(서열번호 33) 및 GFP는 HEK293SF 세포에서 안정적으로 발현되었다. 정제된 엑소솜을 단리시키고, PAGE(도 37A) 및 웨스턴 블로팅(도 37B)에 의해서 분석하였다. 도 37B에 도시된 바와 같이, 융합 단백질의 C-말단 GFP는 웨스턴 블롯에 의해서 검출되었는데, 이는 정제된 엑소솜 상의 융합 단백질의 인-프레임 번역을 입증하였다. 이러한 결과는, 비구조화된 단백질이 또한 PTGFRN에 대한 융합체로서 안정적으로 발현될 수 있음을 입증한다. 추가로, 이러한 결과는, 이종 단백질이 PTGFRN의 N-말단 및 C-말단에 동시에 융합될 수 있고, 각각 엑소솜 표면 및 내강 상에 디스플레이되는 무손상 단백질을 초래한다는 것을 나타낸다. 따라서, PTGFRN은 N-말단 또는 C-말단 중 하나 또는 둘 다 상에서 몇몇 아미노산(예를 들어, FLAG 태그)으로부터 다양한 구조 또는 부류의 150kDa(BDDFVIII)을 초과하는 크기 범위까지의 단백질 융합체에 적용되는 강력한 스캐폴드이다.

[0225] **9.13. 실시예 13: PTGFRN 서열은 다른 엑소솜성 과발현 시스템보다 엑소솜 상에서 이종 단백질의 발현에 있어서 더 양호하다**

[0226] 실시예 3 및 도 15의 데이터는, PTGFRN이 엑소솜의 벌크 집단에서 이종 단백질의 발현에 있어서 다른 엑소솜 스캐폴드보다 더 우수함을 입증한다. 그러나, 이러한 결과는 엑소솜의 하위세트에서의 증가된 발현 대 정제된 집단에서 모든 엑소솜에 걸친 일관되게 증가되는 발현 사이에서 구별될 수 없었다. 일관된 엑소솜 치료제를 개발하려는 목적을 위해서, 고도로 과발현되는 엑소솜 및 비변형된 엑소솜을 포함하는 이질 엑소솜 집단보다 일관되게 증가되는 발현을 갖는 동질(homogenous) 엑소솜 집단을 갖는 것이 바람직하다. 이러한 문제를 다루기 위해서, 본 발명자들은 Flow NanoAnalyzer(나노에프씨엠사(NanoFCM, Inc.); 중국 샤먼 소재)를 사용한 나노-유

세포 분석법에 의해서 입자별 기준으로 엑소좀 집단에서 개별 엑소좀을 특징규명하였다. Flow NanoAnalyzer는 직경이 10nm만큼 작은 개별 나노입자의 광 산란 및 형광 방출을 측정할 수 있다. CD9, CD81, 또는 PTGFRN에 대한 내강 GFP 융합체를 암호화하는 변형된 엑소좀 및 네이티브 엑소좀을 안정적으로 형질주입된 HEK293SF 세포로부터 단리시키고, 상기에 기재된 바와 같이 Optiprep(등록상표) 밀도 구배 초원심분리에 의해서 정제시켰다. 여기 488/방출 509로 설정된 Flow NanoAnalyzer에 의한 분석은, 입자별 분석에서 GFP 발현에 대해서 CD9-GFP 엑소좀이 약 48% 양성이었으며, CD81-GFP 엑소좀이 약 80% 양성이었으며, PTGFRN-GFP 엑소좀이 약 97% 양성이었음을 입증하였다(도 38, 좌측). 추가로, 평균 형광 강도(MFI)는 유사한 경향을 따랐고, PTGFRN-GFP 엑소좀은 전체적으로 CD81-GFP 엑소좀보다 약 2배 더 밝았다(도 38, 우측). 이러한 데이터는, PTGFRN-GFP 융합 단백질을 발현하도록 변형된 엑소좀이 융합 단백질을 높게 발현하는 동질 엑소좀 집단이며, 전체 발현 수준은 다른 엑소좀 스케폴드에 융합된 GFP를 발현하는 변형된 엑소좀 또는 네이티브 엑소좀보다 훨씬 더 높았음을 입증한다.

[0227] PTGFRN의 N-말단은 예측된 신호 펩타이드 서열(아미노산 1-21; 서열번호 8)로 이루어진다. 이러한 서열이 정제된 엑소좀 상에서 트랜스젠의 발현을 향상시킬 수 있는지를 결정하기 위해서, PTGFRN 신호 펩타이드를 이중 단백질, DsbA11의 신호 펩타이드와 비교하였다. HEK293SF 세포에 (i) GFP에 융합된 전장 야생형 PTGFRN; (ii) GFP에 융합된 내인성 PTGFRN 신호 펩타이드를 함유하는 PTGFRN의 짧은 단편(454-PTGFRN; 서열번호 33); 또는 (iii) GFP에 융합된, 박테리아 유전자 DsbA11(Koerber *et al.*, Journal of molecular biology, 427.2 (2015): 576-586)로부터의 신호 펩타이드로 대체된 내인성 PTGFRN 신호 펩타이드를 갖는 PTGFRN의 짧은 단편(454-PTGFRN; 서열번호 33)을 암호화하는 발현 작제물을 안정적으로 형질주입시켰다. 도 39에 도시된 바와 같이, 내인성 PTGFRN 신호 펩타이드를 함유하는 전장 또는 절두된 PTGFRN-GFP를 함유하는 GFP 융합 단백질을 발현하는 세포는 GFP를 포함하는 엑소좀을 유사하게 높은 수준으로 생산하였다. 그러나, DsbA11 신호 펩타이드를 갖는 절두된 PTGFRN을 함유하는 GFP 융합 단백질을 발현하는 세포는 GFP를 발현하는 엑소좀을 훨씬 더 낮은 수준으로 생성시켰다. 이러한 결과는, PTGFRN 신호 펩타이드가 조작된 엑소좀의 고밀도 데코레이션을 촉진시킨다는 것을 입증한다.

[0228] **9.14. 실시예 14: 항체 단편은 스케폴드로서 PTGFRN을 사용하여 엑소좀 표면 상에서 기능적으로 발현될 수 있다**

[0229] 상기에 기재된 실험 데이터는, PTGFRN이 다수의 부류의 단백질의 과발현에 적용되는 강력한 스케폴드임을 입증한다. 항체 및 항체의 항원-결합 단편은 다수의 질환 치료 분야에서 다양한 응용을 갖는 중요한 부류의 치료용 펩타이드이다. 기능성 항원-결합 단편이 스케폴드로서 PTGFRN을 사용하여 엑소좀 상에서 발현될 수 있는지를 결정하기 위해서, 랙틴 CLEC9A를 인식하는 단일쇄 Fab(클론 10B4, 밀리포어 시그마사, 카탈로그 # 04-148; 및 문헌[Caminschi *et al.*, Blood, 112: 8 (2008)]에 기술된 바와 같음), 전장 PTGFRN, GFP, 및 FLAG 태그로 이루어진 융합 단백질을 발현하도록 HEK293SF 세포를 안정적으로 형질주입시켰다(도 40A). Optiprep^(상표명) 정제된 엑소좀을 무-염색(stain-free) 단백질 겔 상에서 전개시키고, FLAG 태그에 대한 항체로 블로팅하였는데, 이는 전장 융합 단백질의 상당한 과발현을 나타낸다(도 40B).

[0230] 정제된 항-CLEC9A 엑소좀을, 고정된 CLEC9A-Fc(알앤디 시스템즈사(R&D Systems), 카탈로그 # 6049-CL-050; 및 문헌[Uto *et al.*, Nature Communications 7: 11273(2016)]에 기재된 바와 같음)에 대한 결합에 대해서 BLI에 의해서 시험하였다. CLEC9A-Fc를 PBS + 0.1%(v/v) Tween20 중의 0.5 μ g/ml의 최종 농도로 단백질 A 프로브에 결합시켰고, 1 $\times$ 10¹¹개의 비변형된 엑소좀 또는 도 40A에 도시된 바와 같은 랙틴 CLEC9A를 인식하는 단일쇄 Fab, 전장 PTGFRN, GFP, 및 FLAG 태그로 이루어진 융합 단백질("αCLEC9A-PTGFRN")을 발현하도록 변형된 엑소좀과 함께 인큐베이션시켰다. 도 41에 도시된 바와 같이, 항-CLEC9A-PTGFRN 엑소좀 만 CLEC9A-Fc 프로브에 결합하였는데, 이는 세포 표면 마커와 항원-결합 단편을 과발현하도록 조작된 엑소좀 간의 기능성 인식을 입증한다.

[0231] **9.15. 실시예 15: 간엽 줄기세포는 PTGFRN을 발현한다**

[0232] 몇몇 세포 유형으로부터의 치료용 엑소좀은 연구 및 임상 목적을 위해서 사용되어 왔다. 중성 전구체 줄기세포 및 간엽 줄기세포를 비롯한 몇몇 종의 줄기세포는 치료 이익을 갖는 것으로 밝혀져 있지만, 이러한 세포를 사용한 대부분의 연구는 자연의 비변형된 엑소좀에 좌우된다. 따라서, 이러한 세포주를 특이적 리간드 또는 다른 표적 단백질을 과발현하도록 조작하는 것이 바람직할 것이다. 골수-유래된 간엽 줄기세포를 1.1L의 마이크로캐리어-기반 3D 생물반응기 시스템에서 성장시켰다. 세포 확장 5일 후, 성장 배지를 폐기하고, 세포를 무혈청 배지 중에서 추가로 3일 동안 배양시켰다. 무혈청 배지를 100 μ m 필터를 통해서 여과시켜 마이크로캐리어를 제거하고, 저속으로 원심분리시켜 세포 부스러기 및 오염물을 제거하였다. 이어서 정화된 배지를 실시예 1에 기재된 바와 같이 Optiprep^(상표명) 밀도-구배 초원심분리에 의해서 정제시켰다. HEK293SF 세포 및 MSC로부터의 정제된 엑소좀

을 PTGFRN, 및 확립된 엑소솜 단백질 ALIX, TSG101, CD63, CD9 및 CD81에 대해서 웨스턴 블롯에 의해서 분석하였다. 도 42에 도시된 바와 같이, 이러한 단백질 모두는 HEK293SF 세포 및 MSC 둘 다에서 발현되었는데, 이는 엑소솜 단백질, 예를 들어, PTGFRN이 표면-조작된 MSC 엑소솜을 생성시키기 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있음을 시사한다.

[0233] **9.16. 실시예 16: PTGFRN은 비-인간 세포로부터의 엑소솜 상에서 과발현될 수 있다**

[0234] 실시예 9 및 실시예 15의 결과는, 다수의 인간-유래된 세포가 PTGFRN 및 실시예 1에서 식별된 다른 신규 엑소솜 단백질을 자연적으로 발현한다는 것을 입증한다. PTGFRN이 범용 엑소솜 스캐폴드 단백질로서 사용될 수 있는지를 결정하기 위해서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에, FLAG 태그에 융합된 전장 PTGFRN을 발현하는 플라스미드 ("PTGFRN-FLAG 플라스미드")를 안정적으로 형질주입시켰다. 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 야생형 HEK293SF 세포, PTGFRN-FLAG 플라스미드가 형질주입된 HEK293SF 세포, CHO 세포, 및 PTGFRN-FLAG 플라스미드가 형질주입된 CHO 세포로부터 엑소솜을 정제시켰다. 도 43A 내지 도 43C에 도시된 바와 같이, PTGFRN-FLAG는, 무염색 PAGE(도 43A)에 의해서 그리고 PTGFRN(도 43B) 및 FLAG(도 43C)에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블롯에 의해서 검출되는 바와 같이 HEK293SF 세포 및 CHO 세포 둘 다에서 성공적으로 과발현되었다. 이러한 결과는, 인간 세포(예를 들어, HEK 세포)뿐만 아니라 비-인간 세포(예를 들어, CHO 세포)가 인간 PTGFRN을 과발현하는 엑소솜을 생산할 수 있다는 것을 입증한다. 이러한 결과는, PTGFRN이 다수의 상이한 유형 및 종으로부터 조작된 엑소솜을 생성시키기 위한 범용 스캐폴드 단백질이라는 것을 나타낸다.

[0235] **9.17. 실시예 17: PTGFRN은 종래의 엑소솜 단백질에 비해서 내강 카고의 개선된 로딩을 제공한다**

[0236] 이전 실시예는, PTGFRN 과발현이 종래의 엑소솜 단백질에 비해서 더 많은 단백질 수 및/또는 활성도를 갖는 엑소솜을 초래한다는 것을 입증하였다(예를 들어, 실시예 13; 도 15). PTGFRN은 막관통 단백질이고, 소포의 면 상에 N-말단을 갖고, 엑소솜 내강에 C-말단을 갖기 때문에, PTGFRN은 엑소솜의 내강에 카고 단백질을 로딩하기에 적합한 스캐폴드 단백질일 수 있다. 이러한 가능성을 연구하기 위해서, HEK293SF 세포를 소분자 라파마이신을 사용하여 단백질-단백질 상호작용을 용이하게 하는 이분(bipartite) 리포터 시스템을 안정적으로 발현하도록 조작하였다. CD9(도 44A) 또는 PTGFRN(도 44B)을 GFP, FLAG 태그, 및 FKBP에 융합시켰다. 세포를 또한 V5 태그 및 FRB에 융합된 mCherry를 안정적으로 발현하도록 조작하였다. 소분자 라파마이신의 존재 하에서, 단백질 FRB 및 FKBP는 이량체화되어 안정적인 복합체를 형성한다. 따라서 라파마이신의 존재 하에서 세포를 배양하는 것은 엑소솜 생물발생 동안 mCherry 카고 단백질과 CD9 또는 PTGFRN 중 어느 하나 간의 회합을 허용할 수 있다. 이러한 세포로부터 정제된 엑소솜을 세척하여 라파마이신을 제거하여, 엑소솜 내강 내의 가용성 카고로서의 mCherry의 방출을 허용할 것이다(도 44A 및 도 44B).

[0237] CD9 로딩 리포터 세포를 라파마이신의 존재 하에서 0, 1 또는 2일 동안 성장시켰다. PTGFRN 로딩 리포터 세포를 라파마이신의 존재 하에서 5일 동안 성장시켰다. 엑소솜을 라파마이신의 부재 하에서 세포 배양물로부터 정제시켜 엑소솜 내강에서 카고 방출을 허용하였다. 정제된 엑소솜 샘플을 변성 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 전개시키고, 전체 단백질의 존재에 대해서 분석하고, 스캐폴드 단백질(항-FLAG) 또는 mCherry 카고(항-V5)에 대해서 웨스턴 블로팅하였다. PTGFRN 샘플은 CD9 샘플에 비해서 훨씬 더 적은 물질이 폴리아크릴아마이드 겔 상에 로딩되었지만, PTGFRN은 FLAG 웨스턴 블롯에 의해서 쉽게 검출 가능하였다. 카고 mCherry가 또한 PTGFRN과 CD9 스캐폴드 샘플 사이에서 대등한 수준으로 검출되었다(도 45A). 스캐폴드 및 카고 단백질 밴드를 농도계에 의해서 측정하고, 수집된 엑소솜의 양에 대해서 정규화시키는 경우, PTGFRN 스캐폴드는 더 높은 수준으로 발현되었고, CD9 스캐폴드 단백질에 함유된 훨씬 더 많은 mCherry 카고를 로딩할 수 있었다(도 45B). 이러한 데이터는, PTGFRN이 종래의 엑소솜 단백질 CD9보다 더 높은 정도로 내강 로딩 펩타이드에 대한 융합 단백질로서 발현될 수 있고, PTGFRN의 사용이 종래의 엑소솜 단백질에 비해서 더 높은 유도된 카고 로딩을 초래한다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는, 복합체, 다중-부분 조작된 시스템이 PTGFRN 스캐폴드의 맥락으로 사용될 수 있고, 엑소솜 내강에서 강력한 카고 로딩을 초래한다는 것을 나타낸다.

[0238] **9.18. 실시예 18: 변형된 엑소솜 단백질의 생성**

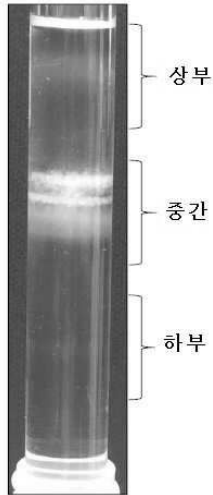
[0239] 변형된 엑소솜 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전체 엑소솜 단백질 또는 절두된 엑소솜 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 생성시킨다. 다양한 절두된 엑소솜 단백질을 스크리닝하고, 엑소솜 막 내에 혼입하는 최적의 능력 및 결합제와 상호작용하는 최적의 능력을 갖는 절두된 단백질을 선택함으로써 특정 절두된 엑소솜 단백질을 선택한다. 엑소솜 막에 대한 절두된 단백질의 표적화를 나노-유세포 분석법에 의해서 시험한다.

- [0240] 친화성 태그(글루타티온-S-트랜스퍼라제, S-펩타이드, FLAG 태그, GFP 등)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전체 또는 절두된 엑소좀 단백질(예를 들어, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, 및 ATP 수송체)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 첨가함으로써 변형된 엑소좀 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 생성시킨다. 변형된 폴리뉴클레오타이드는 융합 단백질을 발현한다. 엑소좀 막 내로의 표적화 및/또는 결합체에 대한 친화성을 개선시키기 위해서 폴리뉴클레오타이드를 추가로 변형시킨다.
- [0241] 치료용 펩타이드(예를 들어, 항체, 효소, 리간드, 수용체, 항미생물 펩타이드, 이의 변이체 또는 단편)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전체 또는 절두된 엑소좀 단백질(예를 들어, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 및 ATP 수송체)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 첨가함으로써 변형된 엑소좀 단백질을 암호화하는 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드를 생성시킨다. 변형된 폴리뉴클레오타이드는 엑소좀의 표면 상에 제시되는 융합 단백질을 발현한다. 융합 단백질은 치료용 펩타이드의 치료 활성도를 유지시킨다.
- [0242] 표적화 모이어티(예를 들어, 특정 기관, 조직 또는 세포에 특이적인 표적화 모이어티)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전체 또는 절두된 엑소좀 단백질(예를 들어, PTGFRN, BSG, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, 및 ATP 수송체)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 첨가함으로써 변형된 엑소좀 단백질을 암호화하는 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드를 생성시킨다. 변형된 폴리뉴클레오타이드는 엑소좀의 표면 상에 제시되는 융합 단백질을 발현한다. 융합 단백질은 엑소좀이 특정 기관, 조직 또는 세포에 대해서 표적화되는 것을 가능하게 한다.
- [0243] 엑소좀 표면 상의 변형된 엑소좀 단백질의 국지화를 또한 나노 유세포 분석법에 의해서 시험한다.
- [0244] **9.19. 실시예 19: 표면-조작된 엑소좀의 생성**
- [0245] 엑소좀 단백질 또는 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하는 외인성 서열을 도입함으로써 표면-조작된 엑소좀을 생성시키는 생산자 세포를 제조한다. 엑소좀 단백질을 암호화하는 플라스미드를 일시적으로 형질주입시켜 엑소좀 표면 상에서 엑소좀 단백질의 높은 수준 발현을 유도한다. 변형된 엑소좀 단백질을 암호화하는 플라스미드를 일시적으로 형질주입시켜 표면 상에 변형된 엑소좀 단백질을 갖는 엑소좀을 생성시킨다.
- [0246] 엑소좀 단백질, 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 친화성 태그, 치료용 펩타이드 또는 표적화 모이어티를 암호화하는 외인성 서열을 생산자 세포 내에서 형질전환시켜 표면-조작된 엑소좀을 생산한다. 친화성 태그, 치료용 펩타이드 또는 표적화 모이어티를 암호화하는 외인성 서열을 엑소좀 단백질을 암호화하는 게놈 부위 내에 삽입하여 엑소좀 단백질에 부착된 친화성 태그를 포함하는 융합 단백질을 생성시킨다. 변형된 엑소좀 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 엑소좀 단백질을 암호화하는 게놈 부위에 녹인시킨다(knock in).
- [0247] 적어도 2개의 폴리뉴클레오타이드(각각 엑소좀 단백질, 엑소좀 단백질의 변이체 또는 단편, 또는 외인성 펩타이드(예를 들어, 친화성 태그, 표적화 모이어티, 치료용 펩타이드)를 암호화함)를 안정적으로 형질주입시킴으로써 생산자 세포주를 생성시킨다. 2개 이상의 외인성 서열(예를 들어, 친화성 태그, 마커, 표적 펩타이드, 치료용 펩타이드 등을 암호화하는 외인성 서열)을 다수의 게놈 부위에, 엑소좀 단백질을 암호화하는 게놈 서열 내에 또는 그것과 인접하게 삽입시킴으로써 상이한 생산자 세포주를 생성시켜서 다수의 변형된 엑소좀 단백질을 포함하는 표면-조작된 엑소좀을 생성시킨다. 복수의 변형된 엑소좀 단백질 각각은 엑소좀의 표면에 표적화된다. 엑소좀은 2개의 상이한 결합체에 대한 친화성을 갖고, 결합체 중 어느 하나 또는 둘 다에 의해서 정제된다.
- [0248] **9.20. 실시예 20: 친화성 정제에 의한 엑소좀의 분리, 정제 및 하위 분별**
- [0249] 온화한 조건 하에서 용리시키는 바이오패닝(biopanning)/유도 진화(directed evolution)에 의해서 엑소좀의 친화성 정제를 위한 결합체를 개발한다.
- [0250] 결합체를 고체 지지체(예를 들어, 다공성 아가로스 비드)에 부착시키고, 종래의 크로마토그래피 시스템(예를 들어, GE AKTA)으로 형성시킨다. 엑소좀을 함유하는 샘플을 친화성 정제용 칼럼에 적용한다.
- [0251] **참고에 의한 포함**
- [0252] 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 다른 문헌은, 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 또는 다른 문헌이 모든 목적을 위해서 참고로 포함된 것으로 개별적으로 제시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해서 전문이 참고로 본 명세서에 포함된다.
- [0253] **등가물**
- [0254] 본 개시내용은 특히 카나비노이드의 조성물 및 주변물질(entourage) 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 카

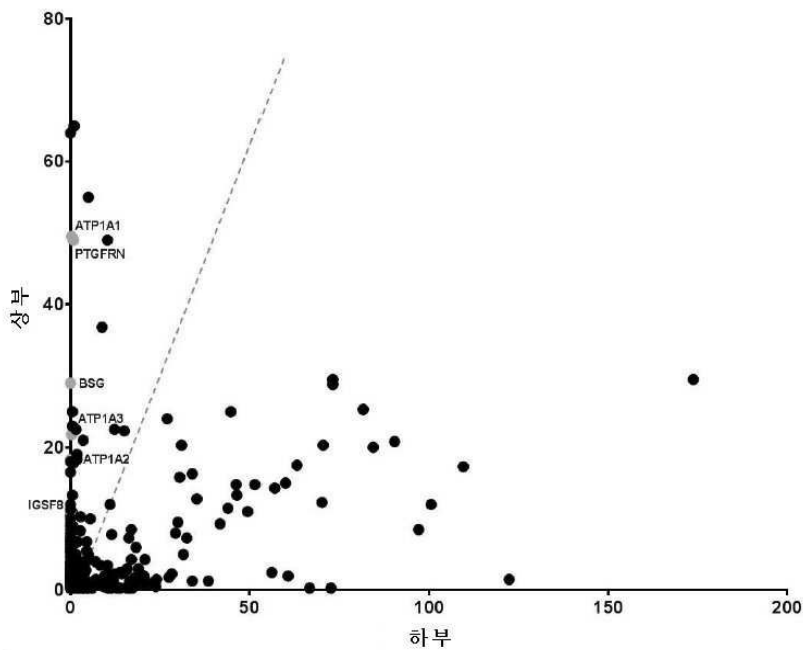
나비노이드 및 주변물질 조성물을 투여함으로써 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 구체적인 실시형태가 예시되어 있지만, 상기 명세서는 제한이 아니다. 본 발명(들)의 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변경이 수행될 수 있음이 인지될 것이다. 다양한 변경은 본 개시내용을 읽은 당업자에게 자명할 것이다.

도면

도면1

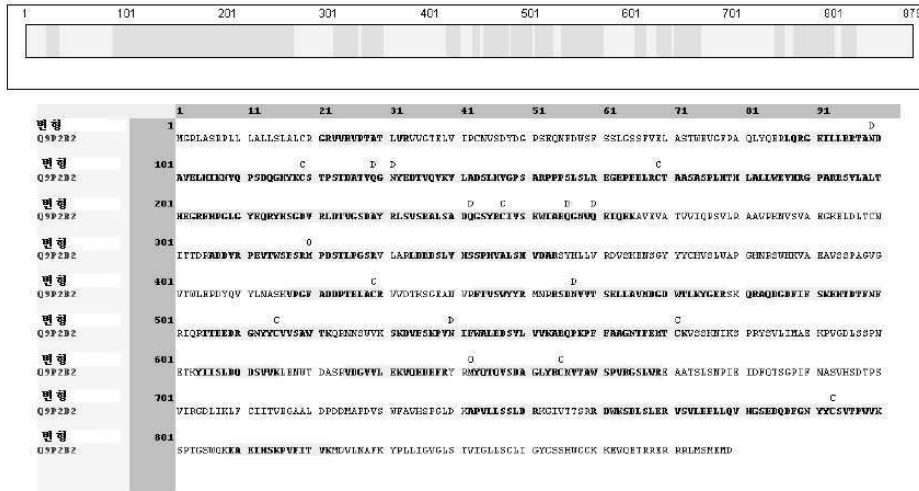


도면2



도면3

PTGFRN (Q9P2B2)

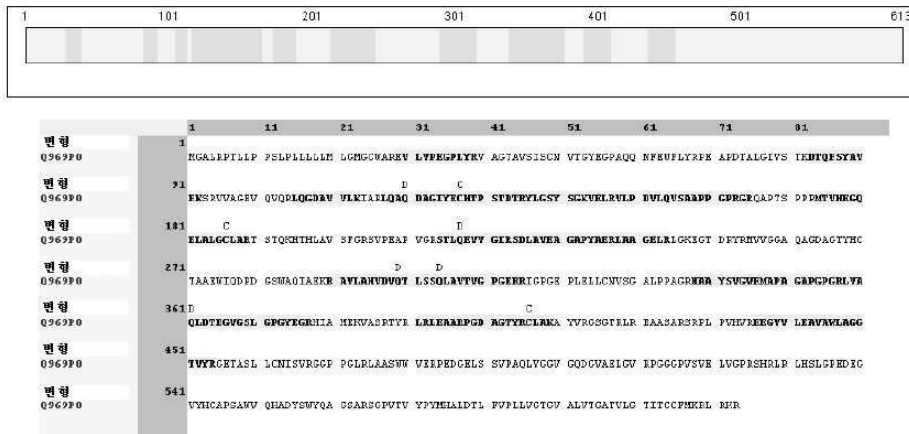


변형

- C: 카보아마이도메틸 (C)
D: 탈아마이드화된 (Q, N)
O: 산화 (M)

도면4

IGSF8 (Q969P0)

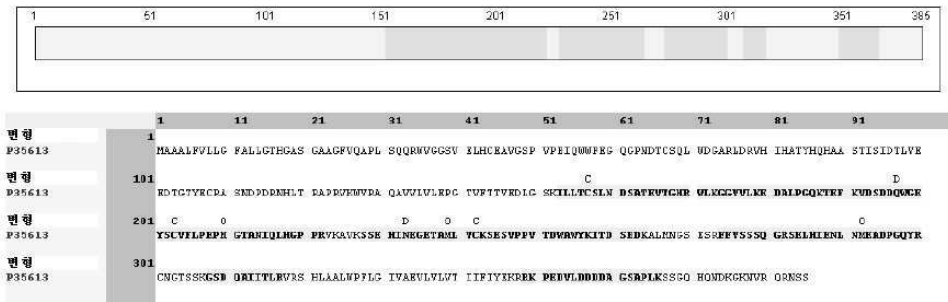


변형

- C: 카보아마이도메틸 (C)
D: 탈아마이드화된 (Q)

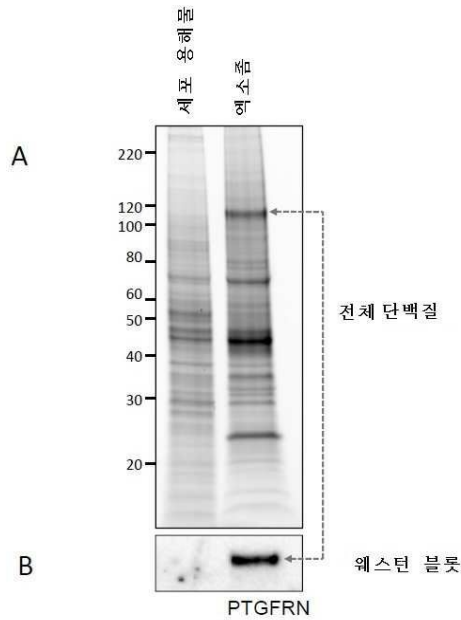
도면5

BSG (P35613)

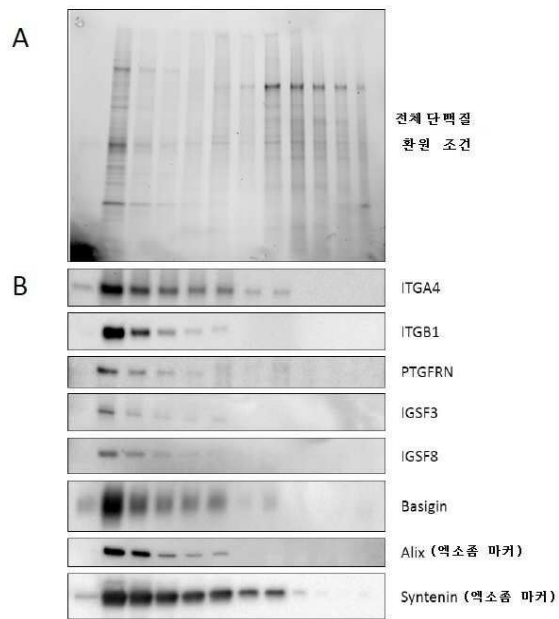


변형
C: 카르바마이드메틸 (C)
D: 탈아미드화된 (N, Q)
O: 산화 (M)

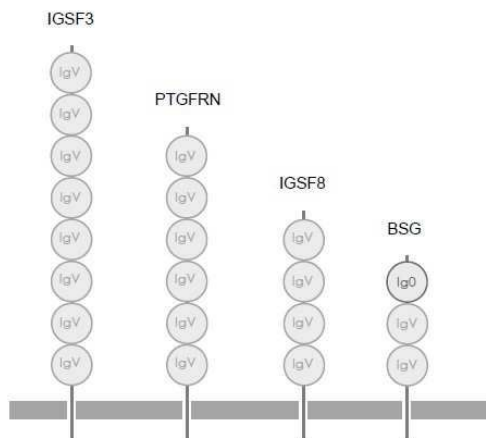
도면6



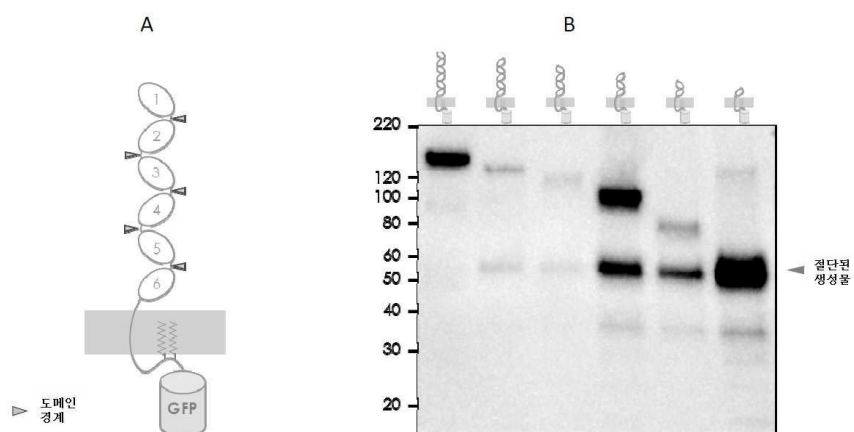
도면7



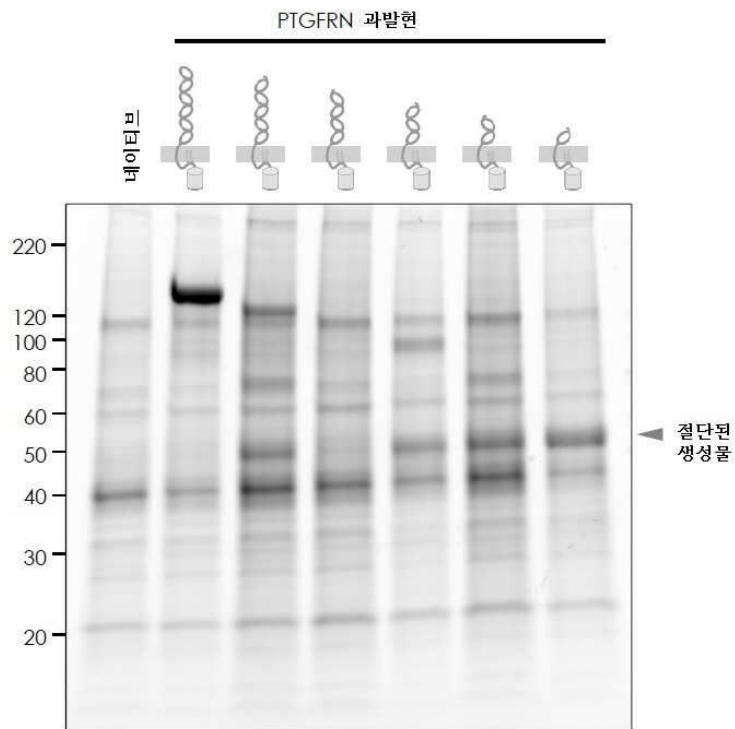
도면8



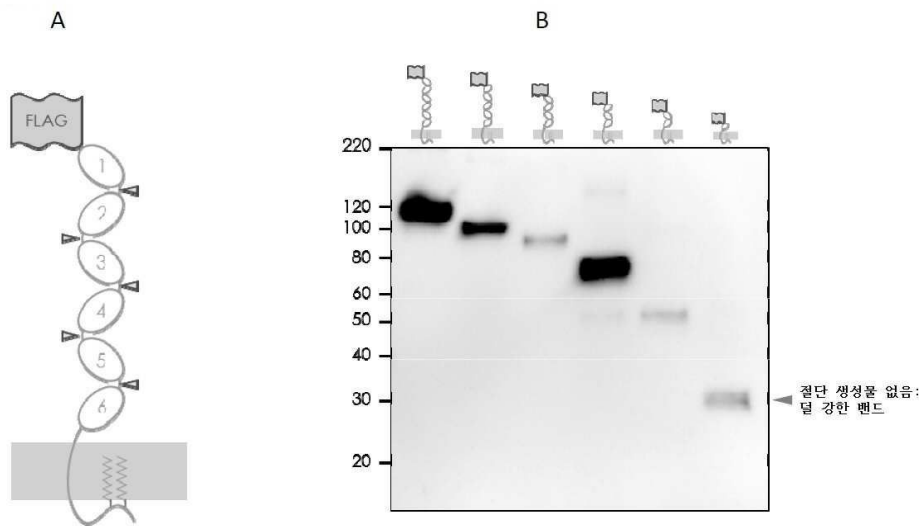
도면9



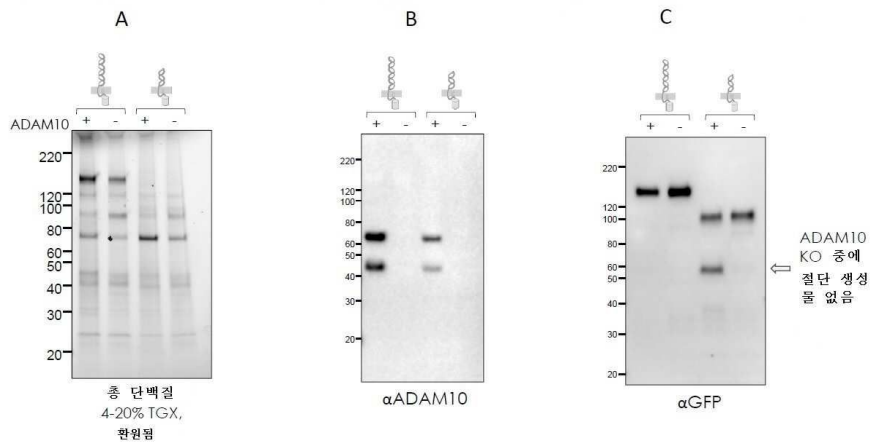
도면10



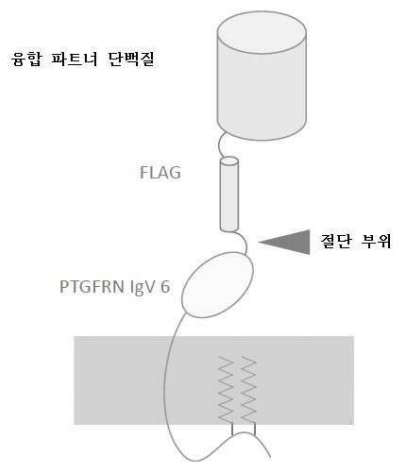
도면11



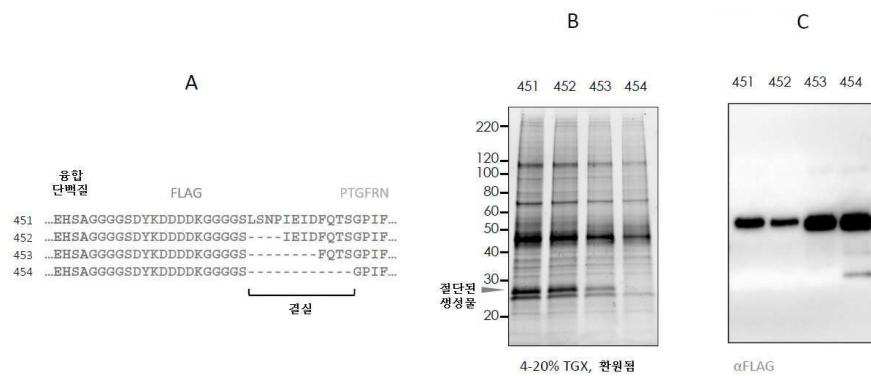
도면12



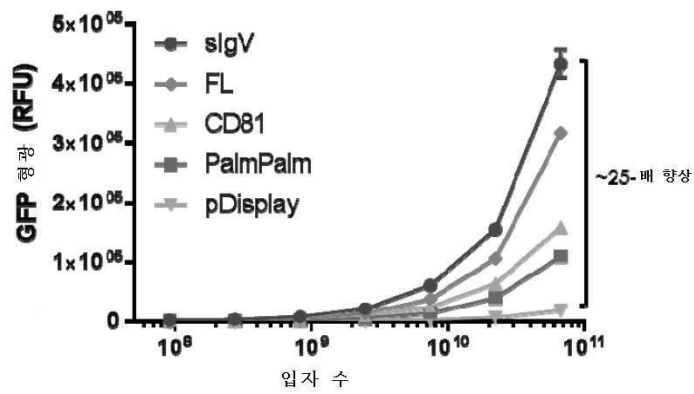
도면13



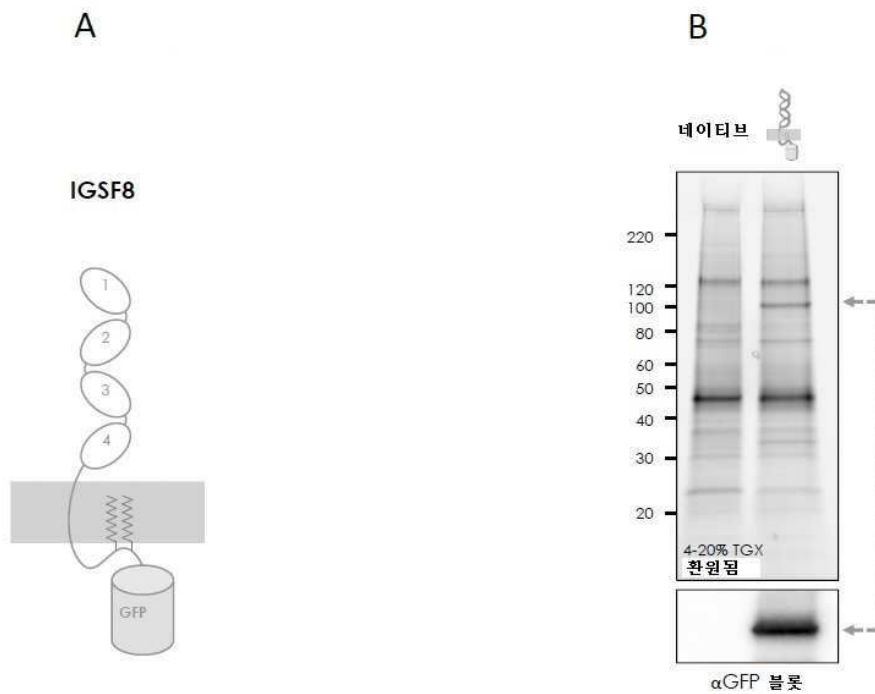
도면14



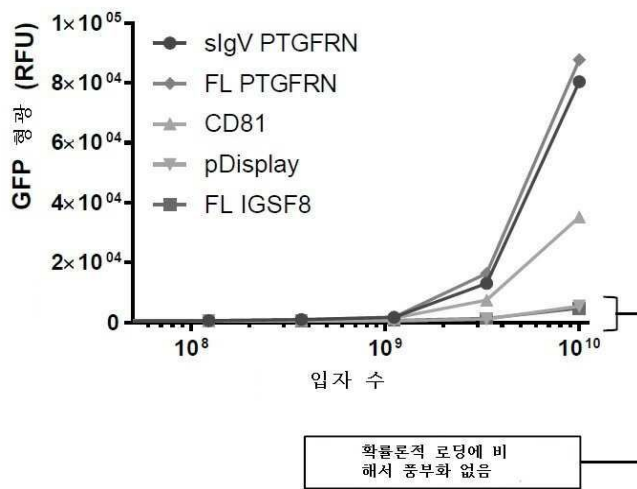
도면15



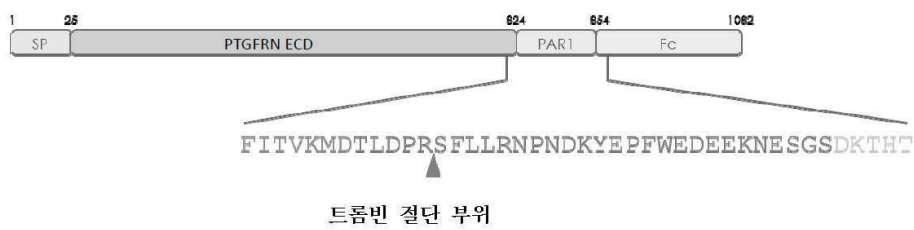
도면16



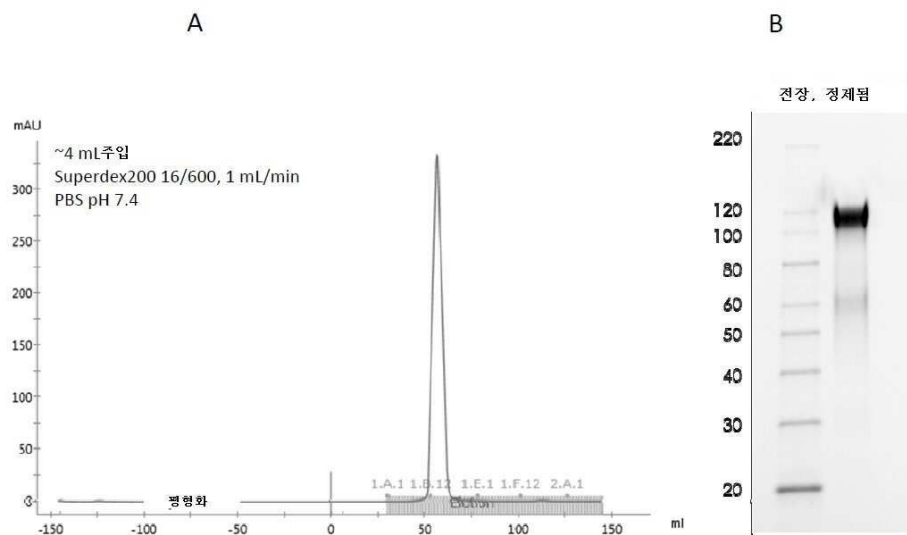
도면17



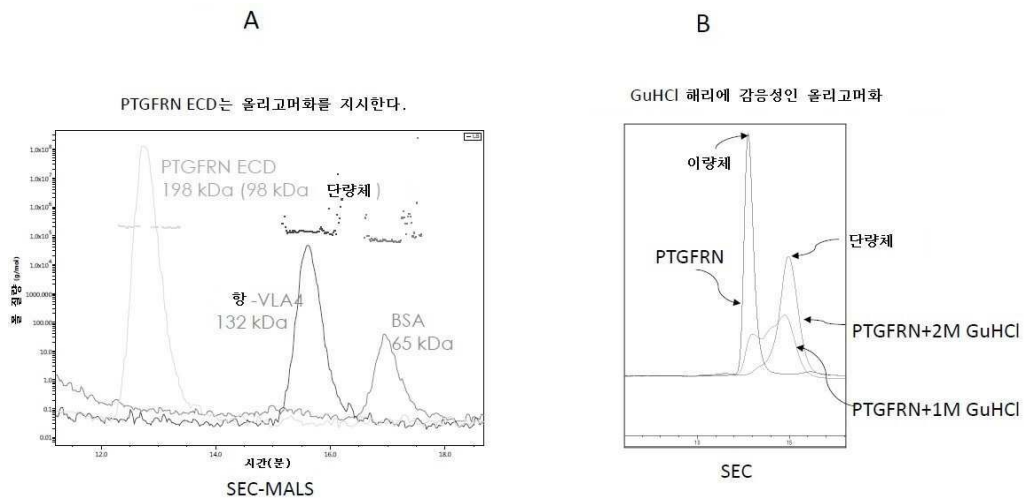
도면18



도면19



도면20



도면21

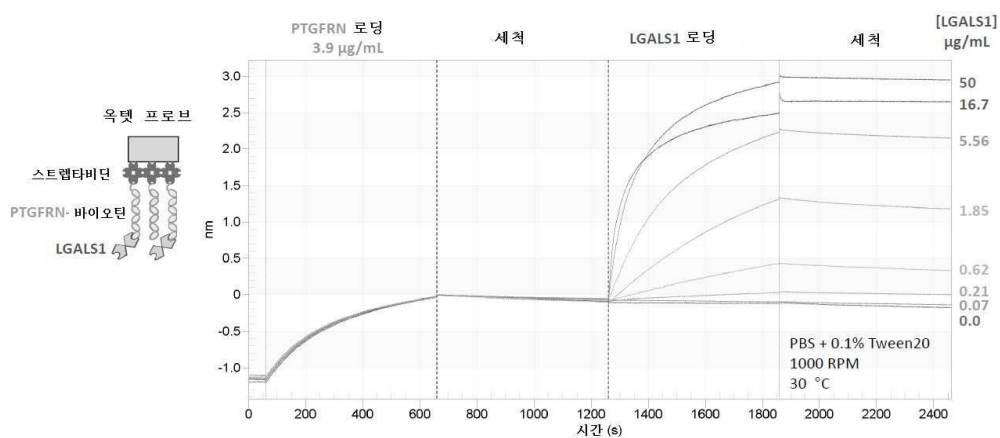
PTGFRN 엑토도메인 결합 파트너 (pH 7.4)

순위	명칭	A 점수
1	LGALS1	144.801
2	FCN1	20.788
3	MGAT4B	9.738

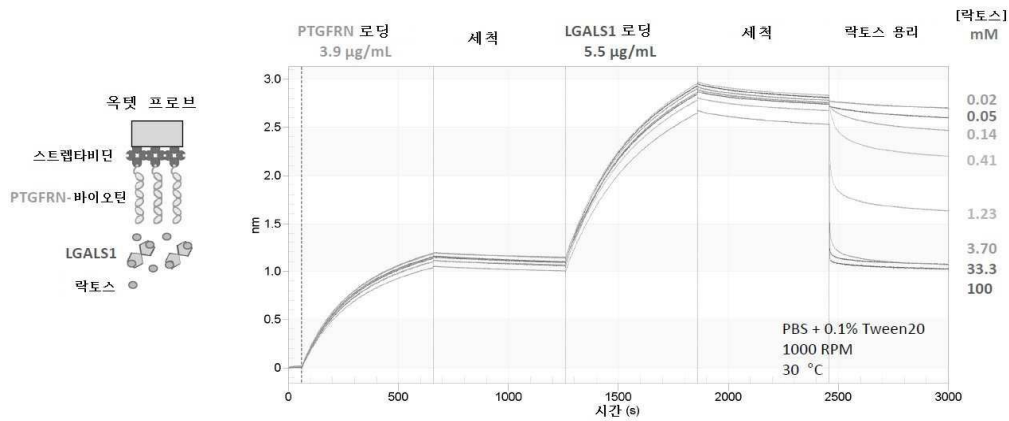
PTGFRN 엑토도메인 결합 파트너 (pH 5.6)

순위	명칭	A 점수
1	EPN1	112.017
2	LGALS1	82.059
3	ZCCHC8	29.974
4	MGAT4B	13.778
5	FCN1	10.605

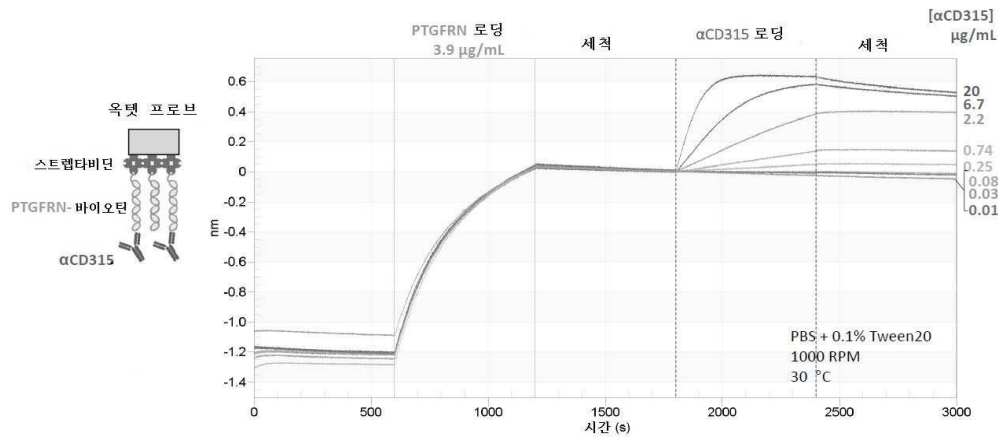
도면22



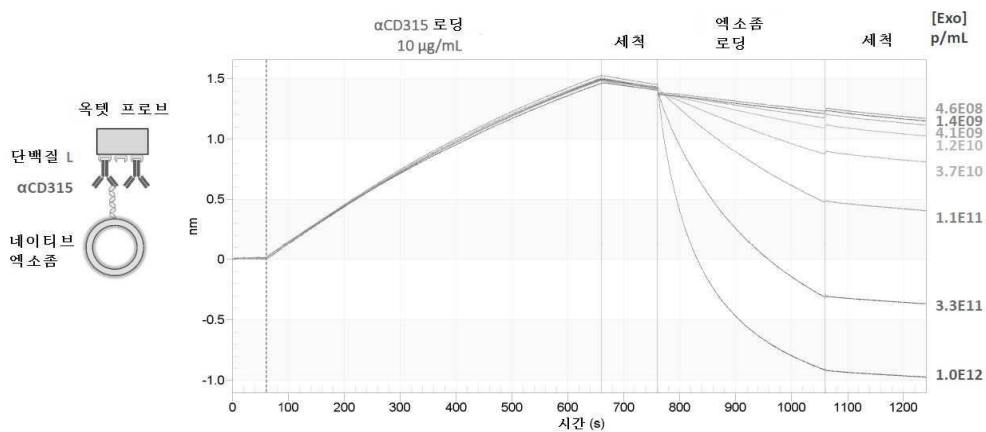
도면23



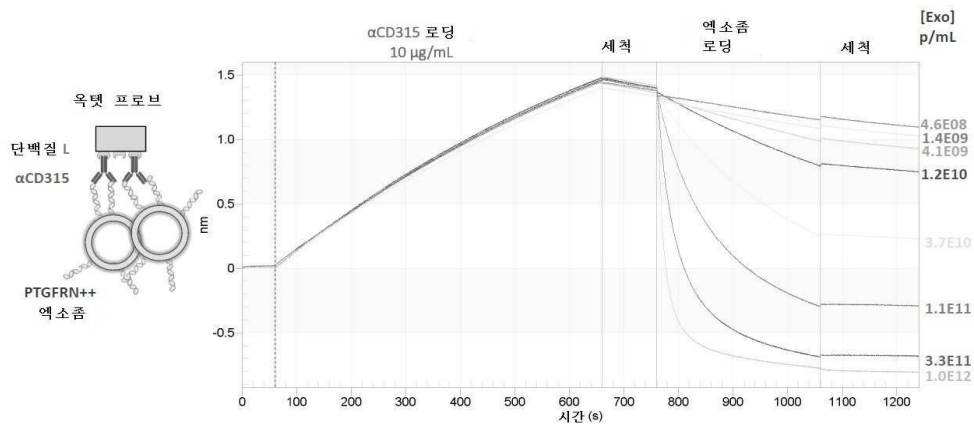
도면24



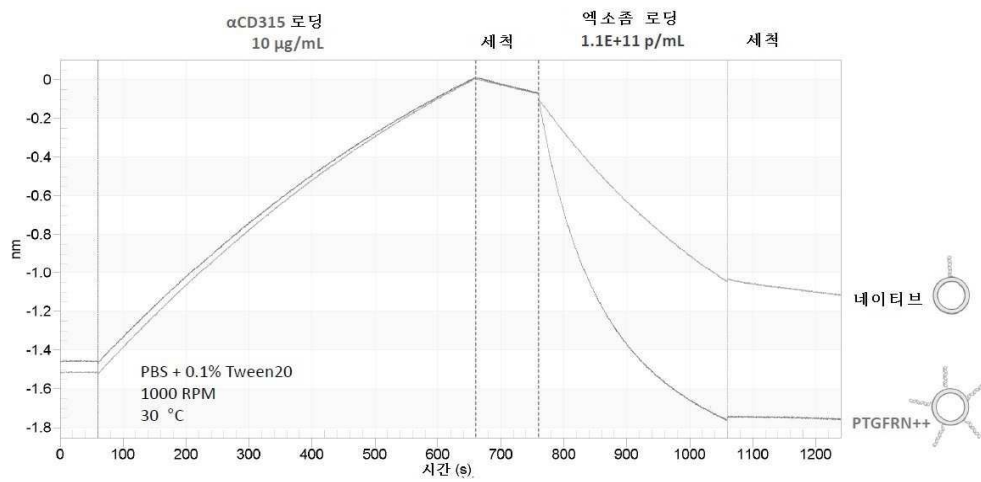
도면25



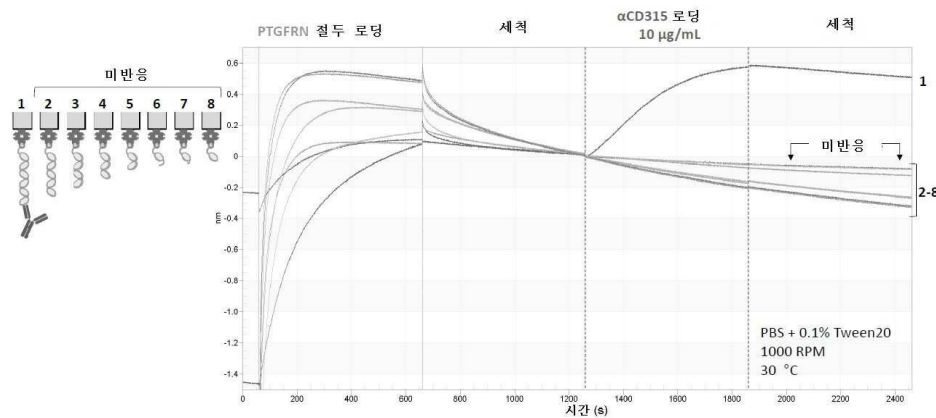
도면26



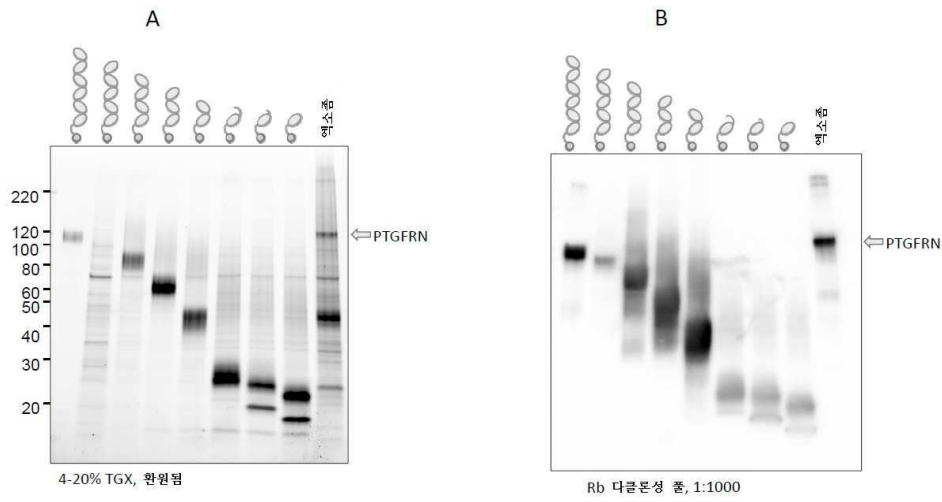
도면27



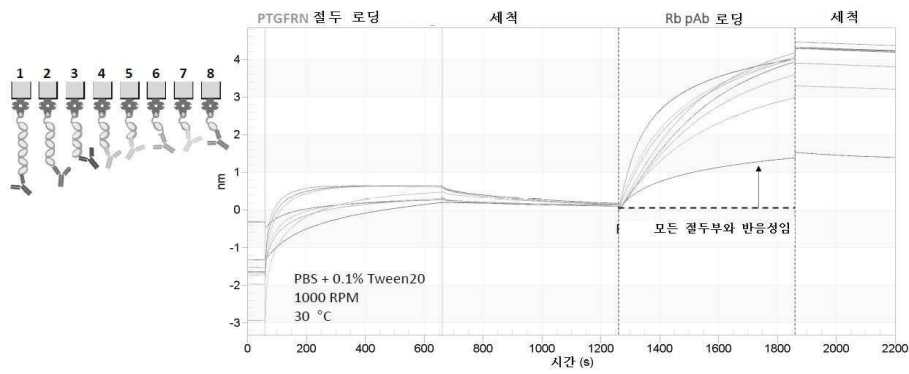
도면28



도면29



도면30



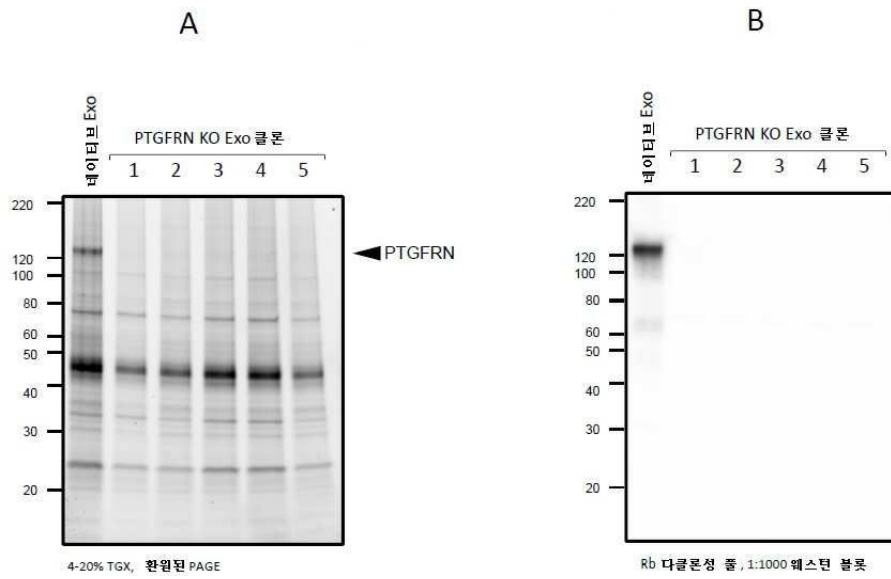
도면31

펩타이드 스펙트럼 매치 (PSM)의 수

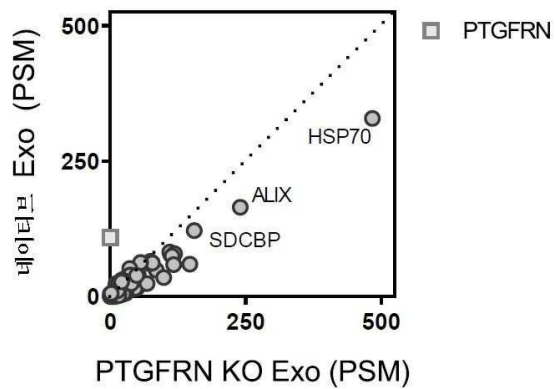
유전자 명칭	HEK	HT1080	K562	MB231	Raji	MSC*
PTGFRN	197	151	37	0	0	111
IGSF8	61	19	31	5	10	52
IGSF3	5	3	14	0	0	0
BSG	91	60	62	24	48	82
SLC3A2	163	117	59	117	95	35
ITGB1	74	400	82	252	95	319
CD81	34	21	2	9	9	48
CD9	21	6	0	31	0	41

*별개의 실험으로 수행됨

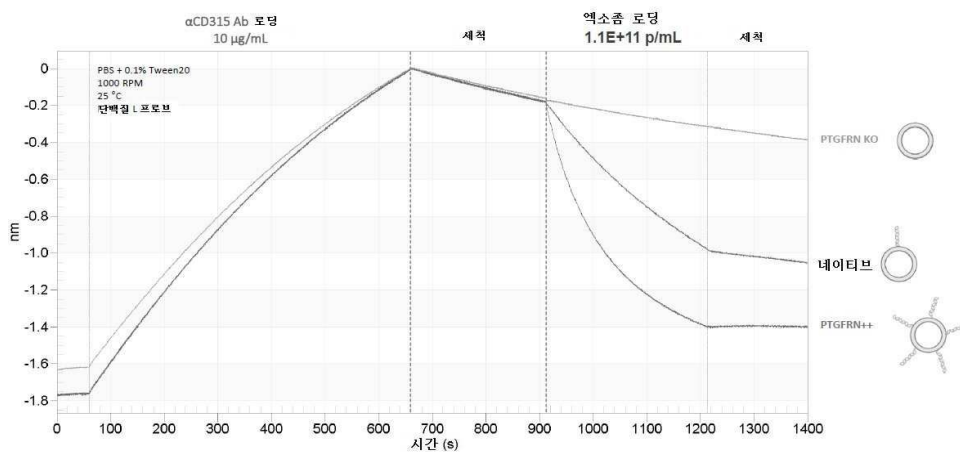
도면32



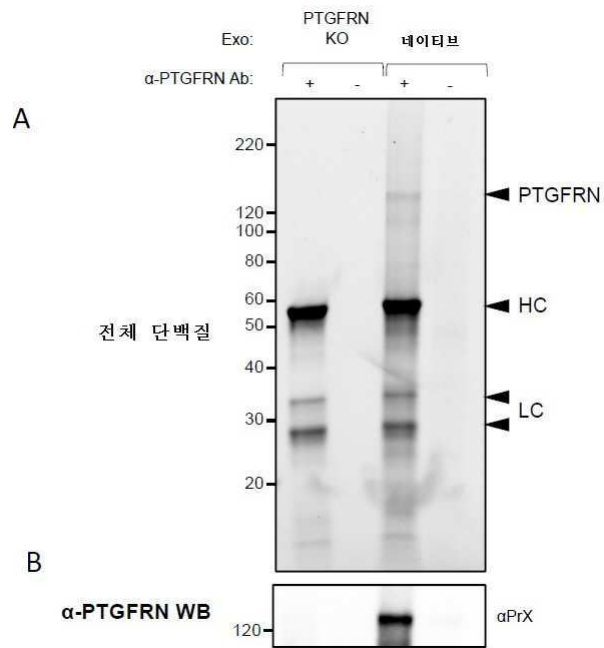
도면33



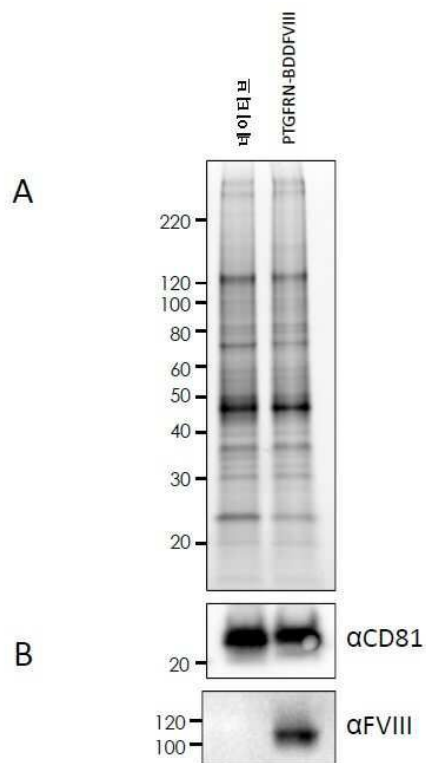
도면34



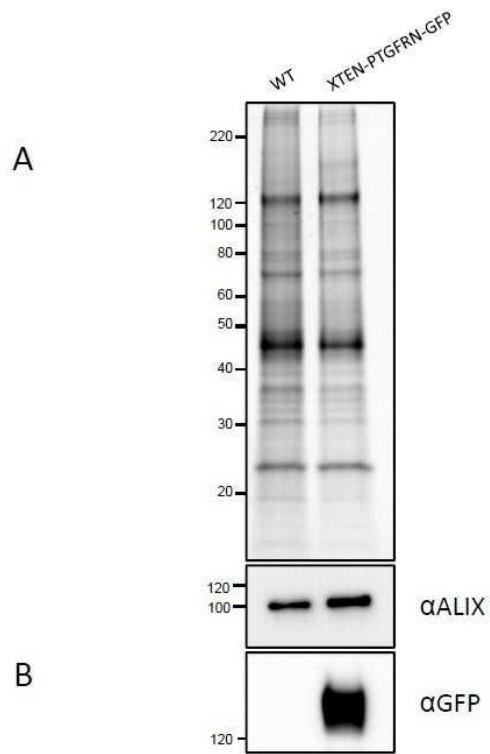
도면35



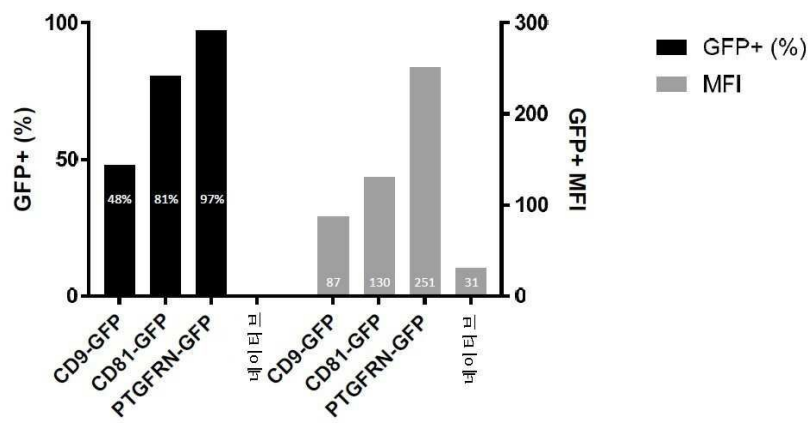
도면36



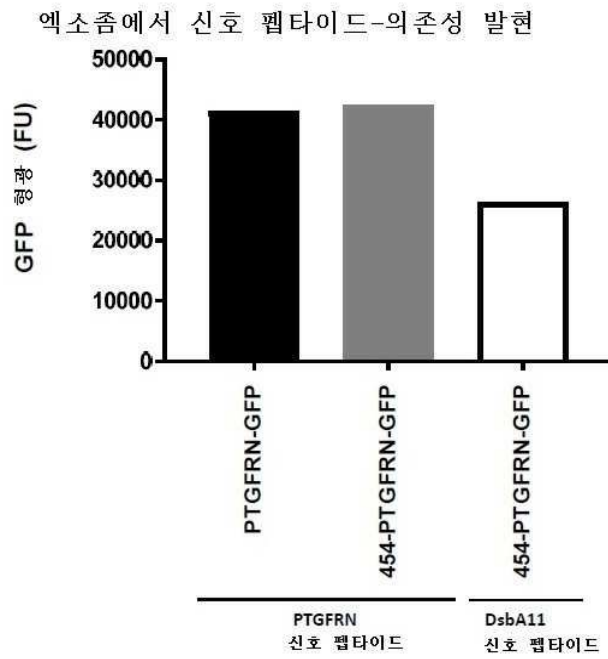
도면37



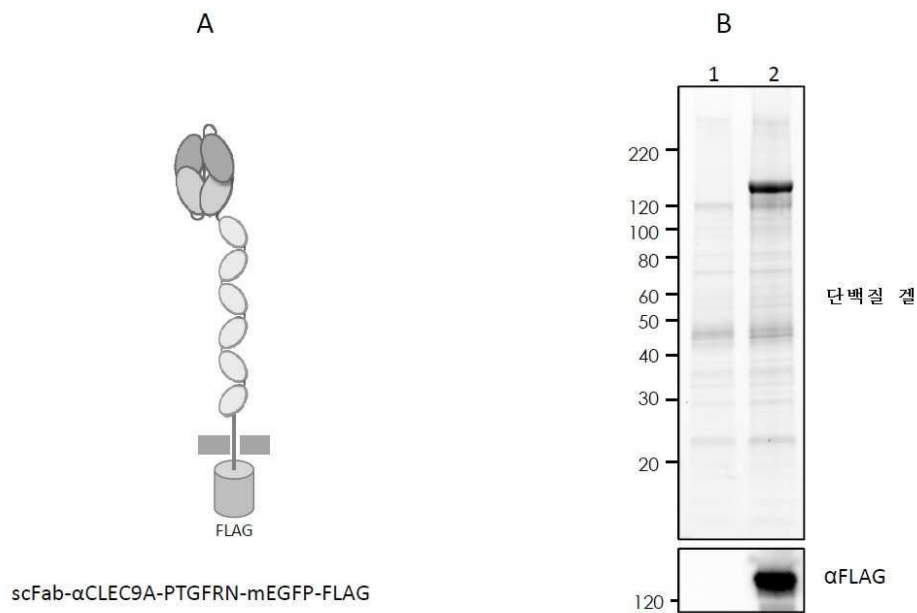
도면38



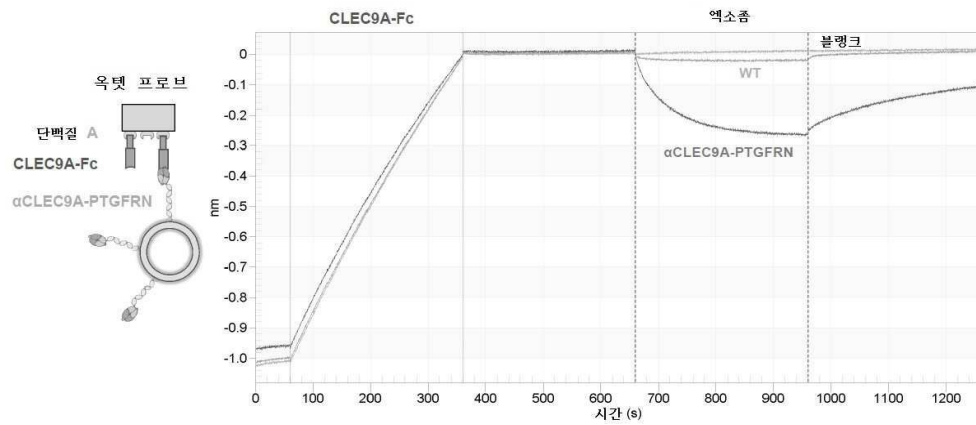
도면39



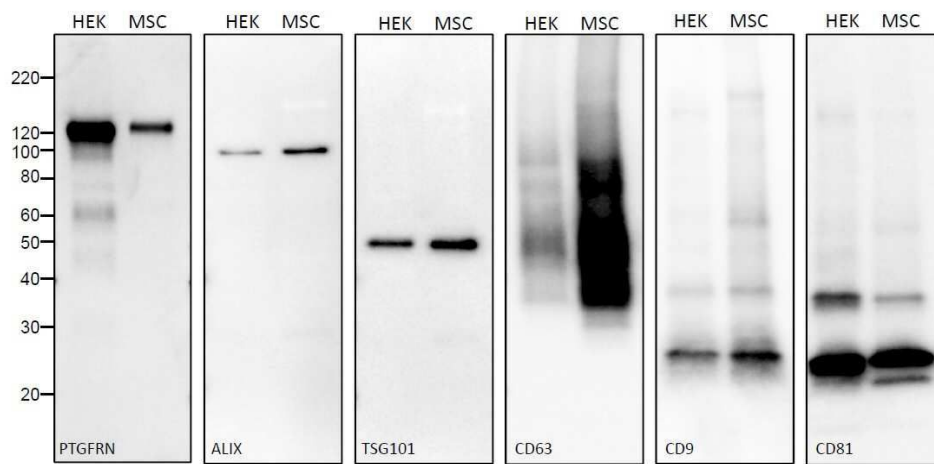
도면40



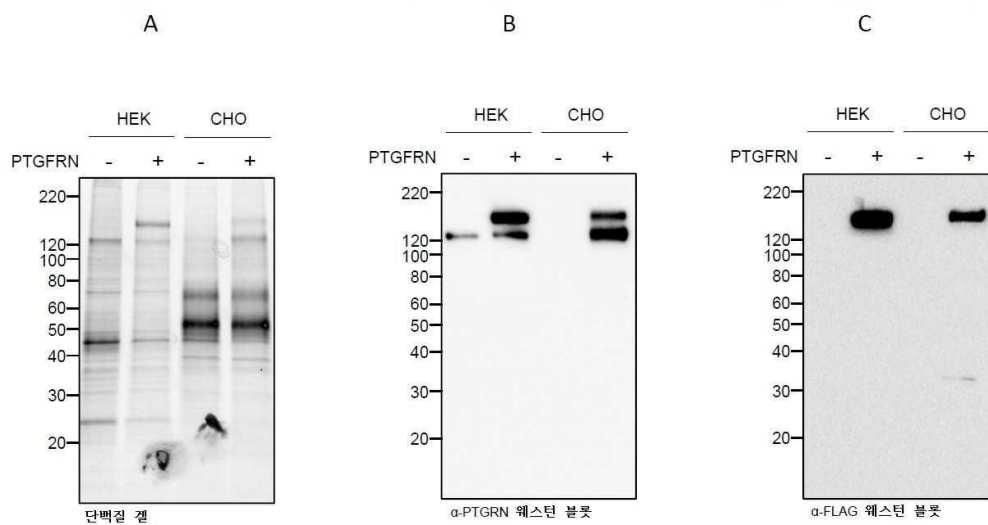
도면41



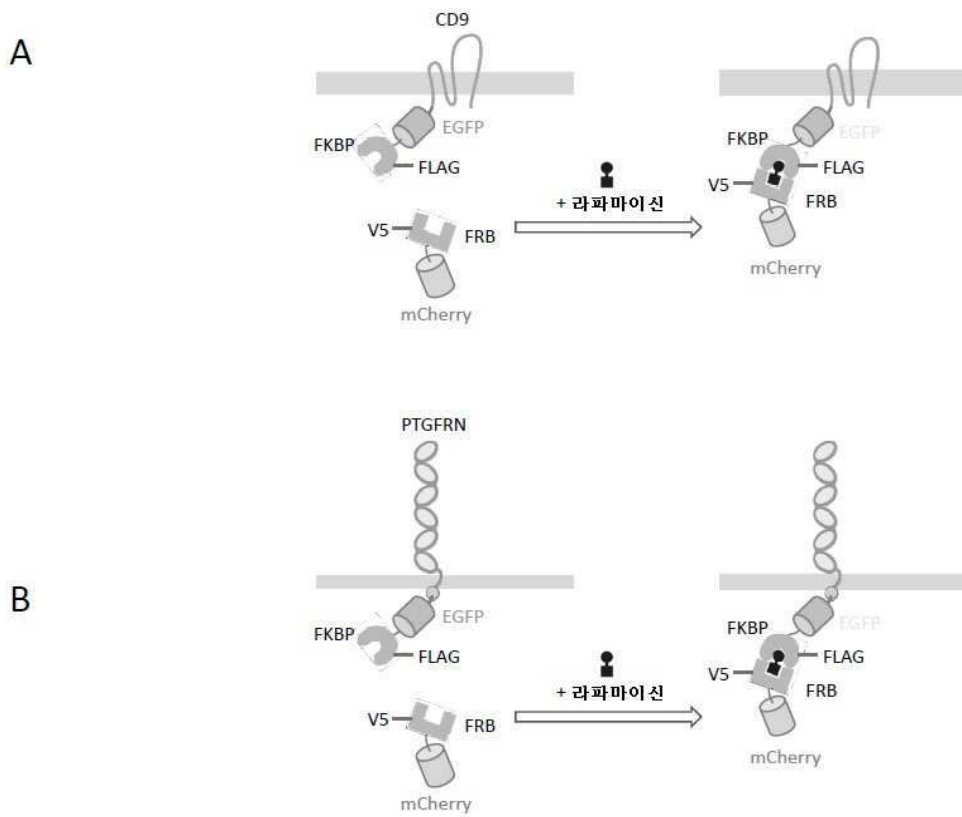
도면42



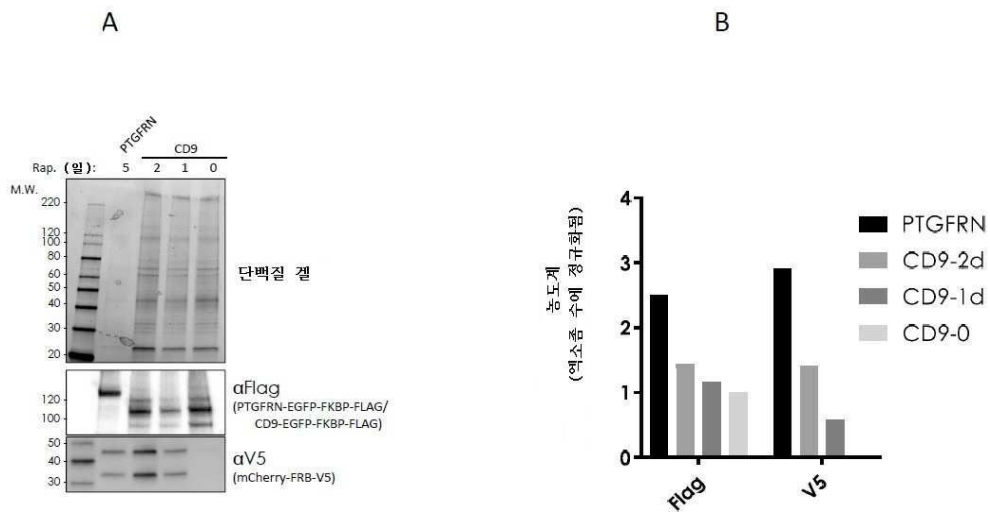
도면43



도면44



도면45



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CODIAK BIOSCIENCES, INC.

<120> PREPARATION OF THERAPEUTIC EXOSOMES USING MEMBRANE PROTEINS

<130> WO/2019/040920

<140> PCT/US2018/048026

<141> 2018-08-24

<150> US 62/656,956

<151> 2018-04-12

<150> US 62/550,543

<151> 2017-08-25

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 879

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Arg Leu Ala Ser Arg Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Ala Leu Cys Arg Gly Arg Val Val Arg Val Pro Thr Ala Thr Leu Val
20 25 30

Arg Val Val Gly Thr Glu Leu Val Ile Pro Cys Asn Val Ser Asp Tyr
35 40 45

Asp Gly Pro Ser Glu Gln Asn Phe Asp Trp Ser Phe Ser Ser Leu Gly
50 55 60

Ser Ser Phe Val Glu Leu Ala Ser Thr Trp Glu Val Gly Phe Pro Ala
65 70 75 80

Gln Leu Tyr Gln Glu Arg Leu Gln Arg Gly Glu Ile Leu Leu Arg Arg
85 90 95

Thr Ala Asn Asp Ala Val Glu Leu His Ile Lys Asn Val Gln Pro Ser
100 105 110

Asp Gln Gly His Tyr Lys Cys Ser Thr Pro Ser Thr Asp Ala Thr Val
115 120 125

Gln Gly Asn Tyr Glu Asp Thr Val Gln Val Lys Val Leu Ala Asp Ser
130 135 140

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

145 150 155 160
 Glu Gly Glu Pro Phe Glu Leu Arg Cys Thr Ala Ala Ser Ala Ser Pro
 165 170 175
 Leu His Thr His Leu Ala Leu Leu Trp Glu Val His Arg Gly Pro Ala
 180 185 190
 Arg Arg Ser Val Leu Ala Leu Thr His Glu Gly Arg Phe His Pro Gly
 195 200 205

 Leu Gly Tyr Glu Gln Arg Tyr His Ser Gly Asp Val Arg Leu Asp Thr
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Ala Tyr Arg Leu Ser Val Ser Arg Ala Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Asp Gln Gly Ser Tyr Arg Cys Ile Val Ser Glu Trp Ile Ala Glu Gln
 245 250 255
 Gly Asn Trp Gln Glu Ile Gln Glu Lys Ala Val Glu Val Ala Thr Val
 260 265 270

 Val Ile Gln Pro Ser Val Leu Arg Ala Ala Val Pro Lys Asn Val Ser
 275 280 285
 Val Ala Glu Gly Lys Glu Leu Asp Leu Thr Cys Asn Ile Thr Thr Asp
 290 295 300
 Arg Ala Asp Asp Val Arg Pro Glu Val Thr Trp Ser Phe Ser Arg Met
 305 310 315 320
 Pro Asp Ser Thr Leu Pro Gly Ser Arg Val Leu Ala Arg Leu Asp Arg
 325 330 335

 Asp Ser Leu Val His Ser Ser Pro His Val Ala Leu Ser His Val Asp
 340 345 350
 Ala Arg Ser Tyr His Leu Leu Val Arg Asp Val Ser Lys Glu Asn Ser
 355 360 365
 Gly Tyr Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Trp Ala Pro Gly His Asn Arg
 370 375 380
 Ser Trp His Lys Val Ala Glu Ala Val Ser Ser Pro Ala Gly Val Gly
 385 390 395 400

Val Thr Trp Leu Glu Pro Asp Tyr Gln Val Tyr Leu Asn Ala Ser Lys
405 410 415

Val Pro Gly Phe Ala Asp Asp Pro Thr Glu Leu Ala Cys Arg Val Val
420 425 430

Asp Thr Lys Ser Gly Glu Ala Asn Val Arg Phe Thr Val Ser Trp Tyr
435 440 445

Tyr Arg Met Asn Arg Arg Ser Asp Asn Val Val Thr Ser Glu Leu Leu
450 455 460

Ala Val Met Asp Gly Asp Trp Thr Leu Lys Tyr Gly Glu Arg Ser Lys
465 470 475 480

Gln Arg Ala Gln Asp Gly Asp Phe Ile Phe Ser Lys Glu His Thr Asp
485 490 495

Thr Phe Asn Phe Arg Ile Gln Arg Thr Thr Glu Glu Asp Arg Gly Asn
500 505 510

Tyr Tyr Cys Val Val Ser Ala Trp Thr Lys Gln Arg Asn Asn Ser Trp
515 520 525

Val Lys Ser Lys Asp Val Phe Ser Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala
530 535 540

Leu Glu Asp Ser Val Leu Val Val Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe
545 550 555 560

Phe Ala Ala Gly Asn Thr Phe Glu Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys
565 570 575

Asn Ile Lys Ser Pro Arg Tyr Ser Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro
580 585 590

Val Gly Asp Leu Ser Ser Pro Asn Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu
595 600 605

Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg
610 615 620

Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr
625 630 635 640

Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Arg Cys Met

645					650					655									
Val	Thr	Ala	Trp	Ser	Pro	Val	Arg	Gly	Ser	Leu	Trp	Arg	Glu	Ala	Ala				
660					665					670									
Thr	Ser	Leu	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	Ile	Asp	Phe	Gln	Thr	Ser	Gly	Pro				
675					680					685									
Ile	Phe	Asn	Ala	Ser	Val	His	Ser	Asp	Thr	Pro	Ser	Val	Ile	Arg	Gly				
690					695					700									
Asp	Leu	Ile	Lys	Leu	Phe	Cys	Ile	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Ala	Leu				
705					710					715					720				
Asp	Pro	Asp	Asp	Met	Ala	Phe	Asp	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Val	His	Ser				
725					730					735									
Phe	Gly	Leu	Asp	Lys	Ala	Pro	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Asp	Arg	Lys				
740					745					750									
Gly	Ile	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Arg	Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu				
755					760					765									
Glu	Arg	Val	Ser	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Val	His	Gly	Ser	Glu				
770					775					780									
Asp	Gln	Asp	Phe	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Val	Thr	Pro	Trp	Val	Lys				
785					790					795					800				
Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Trp	Gln	Lys	Glu	Ala	Glu	Ile	His	Ser	Lys	Pro				
805					810					815									
Val	Phe	Ile	Thr	Val	Lys	Met	Asp	Val	Leu	Asn	Ala	Phe	Lys	Tyr	Pro				
820					825					830									
Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Cys				
835					840					845									
Leu	Ile	Gly	Tyr	Cys	Ser	Ser	His	Trp	Cys	Cys	Lys	Lys	Glu	Val	Gln				
850					855					860									
Glu	Thr	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Met	Ser	Met	Glu	Met	Asp					
865					870					875									
<210> 2																			
<211> 731																			

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Ser Ala Arg Pro Pro Pro Ser Leu Ser Leu Arg Glu Gly Glu Pro

1 5 10 15

Phe Glu Leu Arg Cys Thr Ala Ala Ser Ala Ser Pro Leu His Thr His

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Leu Thr His Glu Gly Arg Phe His Pro Gly Leu Gly Tyr Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Arg Leu Ser Val Ser Arg Ala Leu Ser Ala Asp Gln Gly Ser

85 90 95

Tyr Arg Cys Ile Val Ser Glu Trp Ile Ala Glu Gln Gly Asn Trp Gln

100 105 110

Glu Ile Gln Glu Lys Ala Val Glu Val Ala Thr Val Val Ile Gln Pro

115 120 125

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

130 135 140

Lys Glu Leu Asp Leu Thr Cys Asn Ile Thr Thr Asp Arg Ala Asp Asp

145 150 155 160

Val Arg Pro Glu Val Thr Trp Ser Phe Ser Arg Met Pro Asp Ser Thr

165 170 175

Leu Pro Gly Ser Arg Val Leu Ala Arg Leu Asp Arg Asp Ser Leu Val

180 185 190

His Ser Ser Pro His Val Ala Leu Ser His Val Asp Ala Arg Ser Tyr

195 200 205

His Leu Leu Val Arg Asp Val Ser Lys Glu Asn Ser Gly Tyr Tyr Tyr

210 215 220

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

 275 280 285
 Gly Glu Ala Asn Val Arg Phe Thr Val Ser Trp Tyr Tyr Arg Met Asn
 290 295 300
 Arg Arg Ser Asp Asn Val Val Thr Ser Glu Leu Leu Ala Val Met Asp
 305 310 315 320
 Gly Asp Trp Thr Leu Lys Tyr Gly Glu Arg Ser Lys Gln Arg Ala Gln
 325 330 335
 Asp Gly Asp Phe Ile Phe Ser Lys Glu His Thr Asp Thr Phe Asn Phe

 340 345 350
 Arg Ile Gln Arg Thr Thr Glu Glu Asp Arg Gly Asn Tyr Tyr Cys Val
 355 360 365
 Val Ser Ala Trp Thr Lys Gln Arg Asn Asn Ser Trp Val Lys Ser Lys
 370 375 380
 Asp Val Phe Ser Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala Leu Glu Asp Ser
 385 390 395 400
 Val Leu Val Val Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe Phe Ala Ala Gly

 405 410 415
 Asn Thr Phe Glu Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys Asn Ile Lys Ser
 420 425 430
 Pro Arg Tyr Ser Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro Val Gly Asp Leu
 435 440 445
 Ser Ser Pro Asn Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser
 450 455 460
 Val Val Lys Leu Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val

465 470 475 480
 Val Leu Glu Lys Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln
 485 490 495
 Thr Gln Val Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Arg Cys Met Val Thr Ala Trp
 500 505 510
 Ser Pro Val Arg Gly Ser Leu Trp Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser
 515 520 525
 Asn Pro Ile Glu Ile Asp Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala

 530 535 540
 Ser Val His Ser Asp Thr Pro Ser Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys
 545 550 555 560
 Leu Phe Cys Ile Ile Thr Val Glu Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp
 565 570 575
 Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp
 580 585 590
 Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr

 595 600 605
 Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser
 610 615 620
 Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe
 625 630 635 640
 Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly
 645 650 655
 Ser Trp Gln Lys Glu Ala Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr

 660 665 670
 Val Lys Met Asp Val Leu Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly
 675 680 685
 Val Gly Leu Ser Thr Val Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr
 690 695 700
 Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg
 705 710 715 720
 Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met Glu Met Asp

725

730

<210> 3

<211> 611

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Ala Thr Val Val Ile Gln Pro Ser Val Leu Arg Ala Ala Val Pro

1 5 10 15

Lys Asn Val Ser Val Ala Glu Gly Lys Glu Leu Asp Leu Thr Cys Asn

20 25 30

Ile Thr Thr Asp Arg Ala Asp Asp Val Arg Pro Glu Val Thr Trp Ser

35 40 45

Phe Ser Arg Met Pro Asp Ser Thr Leu Pro Gly Ser Arg Val Leu Ala

50 55 60

Arg Leu Asp Arg Asp Ser Leu Val His Ser Ser Pro His Val Ala Leu

65 70 75 80

Ser His Val Asp Ala Arg Ser Tyr His Leu Leu Val Arg Asp Val Ser

85 90 95

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

100 105 110

Gly His Asn Arg Ser Trp His Lys Val Ala Glu Ala Val Ser Ser Pro

115 120 125

Ala Gly Val Gly Val Thr Trp Leu Glu Pro Asp Tyr Gln Val Tyr Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Ser Trp Tyr Tyr Arg Met Asn Arg Arg Ser Asp Asn Val Val Thr

180 185 190

Ser Glu Leu Leu Ala Val Met Asp Gly Asp Trp Thr Leu Lys Tyr Gly

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

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

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

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

 435 440 445

Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe
450 455 460

Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser
465 470 475 480

Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser
485 490 495

Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val

500 505 510

His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr
515 520 525

Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala Glu Ile
530 535 540

His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu Asn Ala
545 550 555 560

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

565 570 575

Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys
580 585 590

Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met
595 600 605

Glu Met Asp
610

<210> 4

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Pro Ala Gly Val Gly Val Thr Trp Leu Glu Pro Asp Tyr Gln Val
1 5 10 15

Tyr Leu Asn Ala Ser Lys Val Pro Gly Phe Ala Asp Asp Pro Thr Glu
20 25 30

Leu Ala Cys Arg Val Val Asp Thr Lys Ser Gly Glu Ala Asn Val Arg

35 40 45
 Phe Thr Val Ser Trp Tyr Tyr Arg Met Asn Arg Arg Ser Asp Asn Val
 50 55 60
 Val Thr Ser Glu Leu Leu Ala Val Met Asp Gly Asp Trp Thr Leu Lys
 65 70 75 80

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

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

 Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu Glu Asn
 210 215 220
 Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser Asp Ala
 245 250 255
 Gly Leu Tyr Arg Cys Met Val Thr Ala Trp Ser Pro Val Arg Gly Ser
 260 265 270

 Leu Trp Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu Ile Asp
 275 280 285

Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr
 290 295 300
 Pro Ser Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr
 305 310 315 320
 Val Glu Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser
 325 330 335
 Trp Phe Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu
 340 345 350
 Ser Ser Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp
 355 360 365
 Lys Ser Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu
 370 375 380
 Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser
 385 390 395 400
 Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala
 405 410 415
 Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu
 420 425 430
 Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser Thr Val
 435 440 445
 Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys
 450 455 460
 Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met
 465 470 475 480
 Ser Met Glu Met Asp
 485
 <210> 5
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala Leu Glu Asp Ser Val Leu Val Val

1 5 10 15
 Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe Phe Ala Ala Gly Asn Thr Phe Glu
 20 25 30
 Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys Asn Ile Lys Ser Pro Arg Tyr Ser

 35 40 45
 Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro Val Gly Asp Leu Ser Ser Pro Asn
 50 55 60
 Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys
 85 90 95
 Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser

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

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

 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr
 245 250 255

Cys Ser Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys
 260 265 270
 Glu Ala Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp
 275 280 285
 Val Leu Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser
 290 295 300
 Thr Val Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His
 305 310 315 320
 Trp Cys Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg
 325 330 335
 Leu Met Ser Met Glu Met Asp
 340
 <210> 6
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Val Arg Gly Ser Leu Trp Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro
 1 5 10 15
 Ile Glu Ile Asp Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val
 20 25 30
 His Ser Asp Thr Pro Ser Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe
 35 40 45
 Cys Ile Ile Thr Val Glu Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala
 50 55 60
 Phe Asp Val Ser Trp Phe Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala
 65 70 75 80
 Pro Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser
 85 90 95
 Arg Arg Asp Trp Lys Ser Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu
 100 105 110
 Glu Phe Leu Leu Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn

115 120 125
Tyr Tyr Cys Ser Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp

130 135 140
Gln Lys Glu Ala Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys

145 150 155 160
Met Asp Val Leu Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly

165 170 175
Leu Ser Thr Val Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser

180 185 190
Ser His Trp Cys Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg

195 200 205
Arg Arg Leu Met Ser Met Glu Met Asp

210 215

<210> 7

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys Lys

35 40 45
Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met Glu

50 55 60

Met Asp

65

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Arg Leu Ala Ser Arg Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Ala Leu Cys Arg Gly

20

<210> 9

<211> 385

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Ala Ala Leu Phe Val Leu Leu Gly Phe Ala Leu Leu Gly Thr

1 5 10 15

His Gly Ala Ser Gly Ala Ala Gly Phe Val Gln Ala Pro Leu Ser Gln

20 25 30

Gln Arg Trp Val Gly Gly Ser Val Glu Leu His Cys Glu Ala Val Gly

35 40 45

Ser Pro Val Pro Glu Ile Gln Trp Trp Phe Glu Gly Gln Gly Pro Asn

50 55 60

Asp Thr Cys Ser Gln Leu Trp Asp Gly Ala Arg Leu Asp Arg Val His

65 70 75 80

Ile His Ala Thr Tyr His Gln His Ala Ala Ser Thr Ile Ser Ile Asp

85 90 95

Thr Leu Val Glu Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Glu Cys Arg Ala Ser Asn

100 105 110

Asp Pro Asp Arg Asn His Leu Thr Arg Ala Pro Arg Val Lys Trp Val

115 120 125

Arg Ala Gln Ala Val Val Leu Val Leu Glu Pro Gly Thr Val Phe Thr

130 135 140

Thr Val Glu Asp Leu Gly Ser Lys Ile Leu Leu Thr Cys Ser Leu Asn

145 150 155 160

Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val

165 170 175

Val Leu Lys Glu Asp Ala Leu Pro Gly Gln Lys Thr Glu Phe Lys Val
180 185 190

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

Pro Met Gly Thr Ala Asn Ile Gln Leu His Gly Pro Pro Arg Val Lys
210 215 220

Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn Glu Gly Glu Thr Ala Met Leu
225 230 235 240

Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro Val Thr Asp Trp Ala Trp Tyr
245 250 255

Lys Ile Thr Asp Ser Glu Asp Lys Ala Leu Met Asn Gly Ser Glu Ser
260 265 270

Arg Phe Phe Val Ser Ser Ser Gln Gly Arg Ser Glu Leu His Ile Glu
275 280 285

Asn Leu Asn Met Glu Ala Asp Pro Gly Gln Tyr Arg Cys Asn Gly Thr
290 295 300

Ser Ser Lys Gly Ser Asp Gln Ala Ile Ile Thr Leu Arg Val Arg Ser
305 310 315 320

His Leu Ala Ala Leu Trp Pro Phe Leu Gly Ile Val Ala Glu Val Leu
325 330 335

Val Leu Val Thr Ile Ile Phe Ile Tyr Glu Lys Arg Arg Lys Pro Glu
340 345 350

Asp Val Leu Asp Asp Asp Ala Gly Ser Ala Pro Leu Lys Ser Ser
355 360 365

Gly Gln His Gln Asn Asp Lys Gly Lys Asn Val Arg Gln Arg Asn Ser
370 375 380

Ser

385

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Pro Gly Thr Val Phe Thr Thr Val Glu Asp Leu Gly Ser Lys Ile Leu
1 5 10 15
Leu Thr Cys Ser Leu Asn Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg
20 25 30
Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu Lys Glu Asp Ala Leu Pro Gly Gln
35 40 45
Lys Thr Glu Phe Lys Val Asp Ser Asp Asp Gln Trp Gly Glu Tyr Ser
50 55 60
Cys Val Phe Leu Pro Glu Pro Met Gly Thr Ala Asn Ile Gln Leu His
65 70 75 80
Gly Pro Pro Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn Glu
85 90 95
Gly Glu Thr Ala Met Leu Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro Val
100 105 110
Thr Asp Trp Ala Trp Tyr Lys Ile Thr Asp Ser Glu Asp Lys Ala Leu
115 120 125
Met Asn Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val Ser Ser Ser Gln Gly Arg
130 135 140
Ser Glu Leu His Ile Glu Asn Leu Asn Met Glu Ala Asp Pro Gly Gln
145 150 155 160
Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Ser Ser Lys Gly Ser Asp Gln Ala Ile Ile
165 170 175
Thr Leu Arg Val Arg Ser His Leu Ala Ala Leu Trp Pro Phe Leu Gly
180 185 190
Ile Val Ala Glu Val Leu Val Leu Val Thr Ile Ile Phe Ile Tyr Glu
195 200 205
Lys Arg Arg Lys Pro Glu Asp Val Leu Asp Asp Asp Ala Gly Ser
210 215 220
Ala Pro Leu Lys Ser Ser Gly Gln His Gln Asn Asp Lys Gly Lys Asn
225 230 235 240

Val Arg Gln Arg Asn Ser Ser

245

<210> 11

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

His Gly Pro Pro Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn

1 5 10 15

Glu Gly Glu Thr Ala Met Leu Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro

20 25 30

Val Thr Asp Trp Ala Trp Tyr Lys Ile Thr Asp Ser Glu Asp Lys Ala

35 40 45

Leu Met Asn Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val Ser Ser Ser Gln Gly

50 55 60

Arg Ser Glu Leu His Ile Glu Asn Leu Asn Met Glu Ala Asp Pro Gly

65 70 75 80

Gln Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Ser Ser Lys Gly Ser Asp Gln Ala Ile

85 90 95

Ile Thr Leu Arg Val Arg Ser His Leu Ala Ala Leu Trp Pro Phe Leu

100 105 110

Gly Ile Val Ala Glu Val Leu Val Leu Val Thr Ile Ile Phe Ile Tyr

115 120 125

Glu Lys Arg Arg Lys Pro Glu Asp Val Leu Asp Asp Asp Ala Gly

130 135 140

Ser Ala Pro Leu Lys Ser Ser Gly Gln His Gln Asn Asp Lys Gly Lys

145 150 155 160

Asn Val Arg Gln Arg Asn Ser Ser

165

<210> 12

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser His Leu Ala Ala Leu Trp Pro Phe Leu Gly Ile Val Ala Glu Val

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

65

<210> 13

<211> 18

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Ala Ala Leu Phe Val Leu Leu Gly Phe Ala Leu Leu Gly Thr

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

His Gly

<210> 14

<211> 613

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Ala Leu Arg Pro Thr Leu Leu Pro Pro Ser Leu Pro Leu Leu

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

Leu Leu Leu Met Leu Gly Met Gly Cys Trp Ala Arg Glu Val Leu Val

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

Pro Glu Gly Pro Leu Tyr Arg Val Ala Gly Thr Ala Val Ser Ile Ser

35	40	45
----	----	----

Cys Asn Val Thr Gly Tyr Glu Gly Pro Ala Gln Gln Asn Phe Glu Trp
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Arg Pro Glu Ala Pro Asp Thr Ala Leu Gly Ile Val Ser
 65 70 75 80
 Thr Lys Asp Thr Gln Phe Ser Tyr Ala Val Phe Lys Ser Arg Val Val
 85 90 95
 Ala Gly Glu Val Gln Val Gln Arg Leu Gln Gly Asp Ala Val Val Leu
 100 105 110
 Lys Ile Ala Arg Leu Gln Ala Gln Asp Ala Gly Ile Tyr Glu Cys His
 115 120 125
 Thr Pro Ser Thr Asp Thr Arg Tyr Leu Gly Ser Tyr Ser Gly Lys Val
 130 135 140
 Glu Leu Arg Val Leu Pro Asp Val Leu Gln Val Ser Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Pro Arg Gly Arg Gln Ala Pro Thr Ser Pro Pro Arg Met Thr Val
 165 170 175
 His Glu Gly Gln Glu Leu Ala Leu Gly Cys Leu Ala Arg Thr Ser Thr
 180 185 190
 Gln Lys His Thr His Leu Ala Val Ser Phe Gly Arg Ser Val Pro Glu
 195 200 205
 Ala Pro Val Gly Arg Ser Thr Leu Gln Glu Val Val Gly Ile Arg Ser
 210 215 220
 Asp Leu Ala Val Glu Ala Gly Ala Pro Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Glu Leu Arg Leu Gly Lys Glu Gly Thr Asp Arg Tyr Arg Met Val
 245 250 255
 Val Gly Gly Ala Gln Ala Gly Asp Ala Gly Thr Tyr His Cys Thr Ala
 260 265 270
 Ala Glu Trp Ile Gln Asp Pro Asp Gly Ser Trp Ala Gln Ile Ala Glu
 275 280 285
 Lys Arg Ala Val Leu Ala His Val Asp Val Gln Thr Leu Ser Ser Gln

290 295 300
 Leu Ala Val Thr Val Gly Pro Gly Glu Arg Arg Ile Gly Pro Gly Glu
 305 310 315 320
 Pro Leu Glu Leu Leu Cys Asn Val Ser Gly Ala Leu Pro Pro Ala Gly
 325 330 335
 Arg His Ala Ala Tyr Ser Val Gly Trp Glu Met Ala Pro Ala Gly Ala
 340 345 350

 Pro Gly Pro Gly Arg Leu Val Ala Gln Leu Asp Thr Glu Gly Val Gly
 355 360 365
 Ser Leu Gly Pro Gly Tyr Glu Gly Arg His Ile Ala Met Glu Lys Val
 370 375 380
 Ala Ser Arg Thr Tyr Arg Leu Arg Leu Glu Ala Ala Arg Pro Gly Asp
 385 390 395 400
 Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Leu Ala Lys Ala Tyr Val Arg Gly Ser Gly
 405 410 415

 Thr Arg Leu Arg Glu Ala Ala Ser Ala Arg Ser Arg Pro Leu Pro Val
 420 425 430
 His Val Arg Glu Glu Gly Val Val Leu Glu Ala Val Ala Trp Leu Ala
 435 440 445
 Gly Gly Thr Val Tyr Arg Gly Glu Thr Ala Ser Leu Leu Cys Asn Ile
 450 455 460
 Ser Val Arg Gly Gly Pro Pro Gly Leu Arg Leu Ala Ala Ser Trp Trp
 465 470 475 480

 Val Glu Arg Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Val Pro Ala Gln Leu
 485 490 495
 Val Gly Gly Val Gly Gln Asp Gly Val Ala Glu Leu Gly Val Arg Pro
 500 505 510
 Gly Gly Gly Pro Val Ser Val Glu Leu Val Gly Pro Arg Ser His Arg
 515 520 525
 Leu Arg Leu His Ser Leu Gly Pro Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys
 530 535 540

Ala Pro Ser Ala Trp Val Gln His Ala Asp Tyr Ser Trp Tyr Gln Ala
 545 550 555 560
 Gly Ser Ala Arg Ser Gly Pro Val Thr Val Tyr Pro Tyr Met His Ala
 565 570 575
 Leu Asp Thr Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Gly Thr Gly Val Ala Leu
 580 585 590
 Val Thr Gly Ala Thr Val Leu Gly Thr Ile Thr Cys Cys Phe Met Lys
 595 600 605

Arg Leu Arg Lys Arg

610

<210> 15

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

50 55 60

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

115 120 125

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

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

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

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

 305 310 315 320
 Ser Trp Trp Val Glu Arg Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Val Pro
 325 330 335
 Ala Gln Leu Val Gly Gly Val Gly Gln Asp Gly Val Ala Glu Leu Gly
 340 345 350
 Val Arg Pro Gly Gly Gly Pro Val Ser Val Glu Leu Val Gly Pro Arg
 355 360 365
 Ser His Arg Leu Arg Leu His Ser Leu Gly Pro Glu Asp Glu Gly Val

 370 375 380

Tyr His Cys Ala Pro Ser Ala Trp Val Gln His Ala Asp Tyr Ser Trp
 385 390 395 400
 Tyr Gln Ala Gly Ser Ala Arg Ser Gly Pro Val Thr Val Tyr Pro Tyr
 405 410 415
 Met His Ala Leu Asp Thr Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Gly Thr Gly
 420 425 430
 Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Thr Val Leu Gly Thr Ile Thr Cys Cys
 435 440 445
 Phe Met Lys Arg Leu Arg Lys Arg
 450 455
 <210> 16
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Ala His Val Asp Val Gln Thr Leu Ser Ser Gln Leu Ala Val Thr Val
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Glu Arg Arg Ile Gly Pro Gly Glu Pro Leu Glu Leu Leu
 20 25 30
 Cys Asn Val Ser Gly Ala Leu Pro Pro Ala Gly Arg His Ala Ala Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Trp Glu Met Ala Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gly Arg
 50 55 60
 Leu Val Ala Gln Leu Asp Thr Glu Gly Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Tyr Glu Gly Arg His Ile Ala Met Glu Lys Val Ala Ser Arg Thr Tyr
 85 90 95
 Arg Leu Arg Leu Glu Ala Ala Arg Pro Gly Asp Ala Gly Thr Tyr Arg
 100 105 110
 Cys Leu Ala Lys Ala Tyr Val Arg Gly Ser Gly Thr Arg Leu Arg Glu
 115 120 125
 Ala Ala Ser Ala Arg Ser Arg Pro Leu Pro Val His Val Arg Glu Glu

130 135 140
 Gly Val Val Leu Glu Ala Val Ala Trp Leu Ala Gly Gly Thr Val Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Glu Thr Ala Ser Leu Leu Cys Asn Ile Ser Val Arg Gly Gly

 165 170 175
 Pro Pro Gly Leu Arg Leu Ala Ala Ser Trp Trp Val Glu Arg Pro Glu
 180 185 190
 Asp Gly Glu Leu Ser Ser Val Pro Ala Gln Leu Val Gly Gly Val Gly
 195 200 205
 Gln Asp Gly Val Ala Glu Leu Gly Val Arg Pro Gly Gly Gly Pro Val
 210 215 220
 Ser Val Glu Leu Val Gly Pro Arg Ser His Arg Leu Arg Leu His Ser

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

 290 295 300
 Val Leu Gly Thr Ile Thr Cys Cys Phe Met Lys Arg Leu Arg Lys Arg
 305 310 315 320
 <210> 17
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Arg Glu Glu Gly Val Val Leu Glu Ala Val Ala Trp Leu Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Tyr Arg Gly Glu Thr Ala Ser Leu Leu Cys Asn Ile Ser Val

20 25 30

Arg Gly Gly Pro Pro Gly Leu Arg Leu Ala Ala Ser Trp Trp Val Glu

35 40 45

Arg Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Val Pro Ala Gln Leu Val Gly

50 55 60

Gly Val Gly Gln Asp Gly Val Ala Glu Leu Gly Val Arg Pro Gly Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu His Ser Leu Gly Pro Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Ala Pro

100 105 110

Ser Ala Trp Val Gln His Ala Asp Tyr Ser Trp Tyr Gln Ala Gly Ser

115 120 125

Ala Arg Ser Gly Pro Val Thr Val Tyr Pro Tyr Met His Ala Leu Asp

130 135 140

Thr Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Gly Thr Gly Val Ala Leu Val Thr

145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Thr Ile Thr Cys Cys Phe Met Lys Arg Leu

165 170 175

Arg Lys Arg

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Thr Val Leu Gly Thr Ile Thr Cys Cys

1 5 10 15

Phe Met Lys Arg Leu Arg Lys Arg

20

<210> 19

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gly Ala Leu Arg Pro Thr Leu Leu Pro Pro Ser Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Met Leu Gly Met Gly Cys Trp Ala

20 25

<210> 20

<211> 1195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Lys Cys Phe Phe Pro Val Leu Ser Cys Leu Ala Val Leu Gly Val

1 5 10 15

Val Ser Ala Gln Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Gly Pro Leu Tyr Arg

20 25 30

Thr Glu Gly Ser His Ile Thr Ile Trp Cys Asn Val Ser Gly Tyr Gln

35 40 45

Gly Pro Ser Glu Gln Asn Phe Gln Trp Ser Ile Tyr Leu Pro Ser Ser

50 55 60

Pro Glu Arg Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Met Asp Ser Ser Phe Pro

65 70 75 80

Tyr Ala Ile Tyr Thr Gln Arg Val Arg Gly Gly Lys Ile Phe Ile Glu

85 90 95

Arg Val Gln Gly Asn Ser Thr Leu Leu His Ile Thr Asp Leu Gln Ala

100 105 110

Arg Asp Ala Gly Glu Tyr Glu Cys His Thr Pro Ser Thr Asp Lys Gln

115 120 125

Tyr Phe Gly Ser Tyr Ser Ala Lys Met Asn Leu Val Val Ile Pro Asp

130 135 140

Ser Leu Gln Thr Thr Ala Met Pro Gln Thr Leu His Arg Val Glu Gln

145 150 155 160

Asp Pro Leu Glu Leu Thr Cys Glu Val Ala Ser Glu Thr Ile Gln His

165 170 175

Ser His Leu Ser Val Ala Trp Leu Arg Gln Lys Val Gly Glu Lys Pro

180 185 190

Val Glu Val Ile Ser Leu Ser Arg Asp Phe Met Leu His Ser Ser Ser

195 200 205

Glu Tyr Ala Gln Arg Gln Ser Leu Gly Glu Val Arg Leu Asp Lys Leu

210 215 220

Gly Arg Thr Thr Phe Arg Leu Thr Ile Phe His Leu Gln Pro Ser Asp

225 230 235 240

Gln Gly Glu Phe Tyr Cys Glu Ala Ala Glu Trp Ile Gln Asp Pro Asp

245 250 255

Gly Ser Trp Tyr Ala Met Thr Arg Lys Arg Ser Glu Gly Ala Val Val

260 265 270

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

275 280 285

Lys Arg Leu His Thr Val Gly Glu Pro Val Glu Phe Arg Cys Ile Leu

290 295 300

Glu Ala Gln Asn Val Pro Asp Arg Tyr Phe Ala Val Ser Trp Ala Phe

305 310 315 320

Asn Ser Ser Leu Ile Ala Thr Met Gly Pro Asn Ala Val Pro Val Leu

325 330 335

Asn Ser Glu Phe Ala His Arg Glu Ala Arg Gly Gln Leu Lys Val Ala

340 345 350

Lys Glu Ser Asp Ser Val Phe Val Leu Lys Ile Tyr His Leu Arg Gln

355 360 365

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

370 375 380

Val Thr Gly Glu Phe Ile Asp Lys Glu Ser Lys Arg Pro Lys Asn Ile

385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Leu Pro Leu Lys Ser Ser Ile Ser Val Glu Val Ala

405 410 415
Ser Asn Ala Ser Val Ile Leu Glu Gly Glu Asp Leu Arg Phe Ser Cys

420 425 430
Ser Val Arg Thr Ala Gly Arg Pro Gln Gly Arg Phe Ser Val Ile Trp

435 440 445
Gln Leu Val Asp Arg Gln Asn Arg Arg Ser Asn Ile Met Trp Leu Asp

450 455 460
Arg Asp Gly Thr Val Gln Pro Gly Ser Ser Tyr Trp Glu Arg Ser Ser

465 470 475 480
Phe Gly Gly Val Gln Met Glu Gln Val Gln Pro Asn Ser Phe Ser Leu

485 490 495
Gly Ile Phe Asn Ser Arg Lys Glu Asp Glu Gly Gln Tyr Glu Cys His

500 505 510
Val Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Asp Gly Glu Trp Gln Ile Val Gly

515 520 525
Glu Arg Arg Ala Ser Thr Pro Ile Ser Ile Thr Ala Leu Glu Met Gly

530 535 540
Phe Ala Val Thr Ala Ile Ser Arg Thr Pro Gly Val Thr Tyr Ser Asp

545 550 555 560
Ser Phe Asp Leu Gln Cys Ile Ile Lys Pro His Tyr Pro Ala Trp Val

565 570 575
Pro Val Ser Val Thr Trp Arg Phe Gln Pro Val Gly Thr Val Glu Phe

580 585 590
His Asp Leu Val Thr Phe Thr Arg Asp Gly Gly Val Gln Trp Gly Asp

595 600 605
Arg Ser Ser Ser Phe Arg Thr Arg Thr Ala Ile Glu Lys Ala Glu Ser

610 615 620
Ser Asn Asn Val Arg Leu Ser Ile Ser Arg Ala Ser Asp Thr Glu Ala

625 630 635 640
Gly Lys Tyr Gln Cys Val Ala Glu Leu Trp Arg Lys Asn Tyr Asn Asn

645 650 655

Thr Trp Thr Arg Leu Ala Glu Arg Thr Ser Asn Leu Leu Glu Ile Arg
 660 665 670
 Val Leu Gln Pro Val Thr Lys Leu Gln Val Ser Lys Ser Lys Arg Thr
 675 680 685
 Leu Thr Leu Val Glu Asn Lys Pro Ile Gln Leu Asn Cys Ser Val Lys
 690 695 700
 Ser Gln Thr Ser Gln Asn Ser His Phe Ala Val Leu Trp Tyr Val His
 705 710 715 720
 Lys Pro Ser Asp Ala Asp Gly Lys Leu Ile Leu Lys Thr Thr His Asn
 725 730 735
 Ser Ala Phe Glu Tyr Gly Thr Tyr Ala Glu Glu Glu Gly Leu Arg Ala
 740 745 750
 Arg Leu Gln Phe Glu Arg His Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Leu Thr
 755 760 765
 Val Gln Arg Ala Glu Val Ser Asp Ser Gly Ser Tyr Tyr Cys His Val
 770 775 780
 Glu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Asn Tyr Ala Trp Tyr Lys Leu Ala Glu
 785 790 795 800
 Glu Val Ser Gly Arg Thr Glu Val Thr Val Lys Gln Pro Asp Ser Arg
 805 810 815
 Leu Arg Leu Ser Gln Ala Gln Gly Asn Leu Ser Val Leu Glu Thr Arg
 820 825 830
 Gln Val Gln Leu Glu Cys Val Val Leu Asn Arg Thr Ser Ile Thr Ser
 835 840 845
 Gln Leu Met Val Glu Trp Phe Val Trp Lys Pro Asn His Pro Glu Arg
 850 855 860
 Glu Thr Val Ala Arg Leu Ser Arg Asp Ala Thr Phe His Tyr Gly Glu
 865 870 875 880
 Gln Ala Ala Lys Asn Asn Leu Lys Gly Arg Leu His Leu Glu Ser Pro
 885 890 895
 Ser Pro Gly Val Tyr Arg Leu Phe Ile Gln Asn Val Ala Val Gln Asp

900	905	910	
Ser Gly Thr Tyr Ser Cys His Val Glu Glu Trp Leu Pro Ser Pro Ser			
915	920	925	
Gly Met Trp Tyr Lys Arg Ala Glu Asp Thr Ala Gly Gln Thr Ala Leu			
930	935	940	
Thr Val Met Arg Pro Asp Ala Ser Leu Gln Val Asp Thr Val Val Pro			
945	950	955	960
Asn Ala Thr Val Ser Glu Lys Ala Ala Phe Gln Leu Asp Cys Ser Ile			
965	970	975	
Val Ser Arg Ser Ser Gln Asp Ser Arg Phe Ala Val Ala Trp Tyr Ser			
980	985	990	
Leu Arg Thr Lys Ala Gly Gly Lys Arg Ser Ser Pro Gly Leu Glu Glu			
995	1000	1005	
Gln Glu Glu Glu Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp			
1010	1015	1020	
Asp Asp Asp Asp Pro Thr Glu Arg Thr Ala Leu Leu Ser Val Gly			
1025	1030	1035	
Pro Asp Ala Val Phe Gly Pro Glu Gly Ser Pro Trp Glu Gly Arg			
1040	1045	1050	
Leu Arg Phe Gln Arg Leu Ser Pro Val Leu Tyr Arg Leu Thr Val			
1055	1060	1065	
Leu Gln Ala Ser Pro Gln Asp Thr Gly Asn Tyr Ser Cys His Val			
1070	1075	1080	
Glu Glu Trp Leu Pro Ser Pro Gln Lys Glu Trp Tyr Arg Leu Thr			
1085	1090	1095	
Glu Glu Glu Ser Ala Pro Ile Gly Ile Arg Val Leu Asp Thr Ser			
1100	1105	1110	
Pro Thr Leu Gln Ser Ile Ile Cys Ser Asn Asp Ala Leu Phe Tyr			
1115	1120	1125	
Phe Val Phe Phe Tyr Pro Phe Pro Ile Phe Gly Ile Leu Ile Ile			
1130	1135	1140	

Thr Ile Leu Leu Val Arg Phe Lys Ser Arg Asn Ser Ser Lys Asn
1145 1150 1155
Ser Asp Gly Lys Asn Gly Val Pro Leu Leu Trp Ile Lys Glu Pro
1160 1165 1170
His Leu Asn Tyr Ser Pro Thr Cys Leu Glu Pro Pro Val Leu Ser
1175 1180 1185
Ile His Pro Gly Ala Ile Asp
1190 1195
<210> 21
<211> 798
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys
1 5 10 15
Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala
20 25 30
Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys
35 40 45
Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys
50 55 60
Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile
65 70 75 80
Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr
85 90 95
Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
100 105 110
Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
115 120 125
Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
130 135 140
Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu

145 150 155 160
 Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile

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

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

 290 295 300
 Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala
 305 310 315 320
 His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala
 325 330 335
 Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile
 340 345 350
 Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile

 355 360 365
 Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr
 385 390 395 400

Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser
 405 410 415
 Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser
 420 425 430
 Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu
 435 440 445
 Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys
 450 455 460
 Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val
 485 490 495
 Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met
 500 505 510
 Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn
 515 520 525
 Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr
 530 535 540
 Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys
 545 550 555 560
 Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys
 565 570 575
 Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys
 580 585 590
 Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn
 595 600 605
 Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys
 610 615 620
 Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys
 625 630 635 640
 Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu

645 650 655
 Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys
 660 665 670
 Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val

675 680 685
 Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr
 690 695 700
 Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn
 705 710 715 720
 Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val
 725 730 735
 Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys

740 745 750
 Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys
 755 760 765
 Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys
 770 775 780
 Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
 785 790 795

<210> 22

<211> 1032

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

50 55 60
 Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala
 65 70 75 80
 Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn
 85 90 95
 Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Asn Gly Glu
 100 105 110
 Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn Gln Trp Leu Gly
 115 120 125

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

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

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

Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn Ala Asp Gly Phe
305 310 315 320

Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr Ile Arg Glu Glu
325 330 335

Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Ala Val Met Asn
340 345 350

Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe
355 360 365

Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn Asp Gly Phe Glu
370 375 380

Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu Gln Gly Ala Ile
385 390 395 400

Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser Thr Phe Ser Gln
405 410 415

Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln
420 425 430

Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val
435 440 445

Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr Arg
450 455 460

Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro Glu Ser Val Asn
465 470 475 480

Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro Ser Val Cys Ile
485 490 495

Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu Val Pro Gly Tyr
500 505 510

Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ala Glu
515 520 525

Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr Ser Asp Val Ile
530 535 540

Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn Cys Arg Thr His

545 550 555 560
 Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu Thr Pro Ile Gln
 565 570 575

 Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile Ser Lys Arg Ser
 580 585 590
 Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln Gln Lys Lys Glu
 595 600 605
 Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg Phe Cys Ala His
 610 615 620
 Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys Ile Gly Phe Leu
 625 630 635 640

 Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly Ser Met Lys Thr
 645 650 655
 Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp Asp Ala Tyr Glu
 660 665 670
 Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Ile
 675 680 685
 Leu Glu Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val Thr Asp Asn Ser
 690 695 700

 Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile Tyr Val Asp His
 705 710 715 720
 Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val Ser Ser Leu Ser
 725 730 735
 Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala Thr Cys Glu Asn
 740 745 750
 Glu Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val Thr Val Ala Ile
 755 760 765

 Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly Phe Val Asn Pro
 770 775 780
 Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu Pro Glu Thr Cys
 785 790 795 800

Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile Asn Thr Gly Asn

805 810 815

Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val Pro Asn Ser Phe

820 825 830

Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp Val Gln Thr Thr

835 840 845

Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val Cys Ala Leu Glu

850 855 860

Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile Val Arg Phe Leu

865 870 875 880

Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys Ala Asp Pro His

885 890 895

Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu

900 905 910

Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ile Leu Glu Met

915 920 925

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

930 935 940

Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala

945 950 955 960

His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg Tyr Phe

965 970 975

Thr Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ile Val Leu

980 985 990

Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe Phe Lys Arg Gln

995 1000 1005

Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp Ser Trp Ser

1010 1015 1020

Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp

1025 1030

<210> 23

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Leu Gln Pro Pro Glu Ala Ser Ile Ala Val Val Ser Ile Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Asp Asp Ser Glu Leu Gly Ser His Cys Val Ala Gln Thr Gly

35 40 45

Leu Glu Leu Leu Ala Ser Gly Asp Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gln Asn

50 55 60

Ala Glu Met Ile Glu Thr Gly Ser Asp Cys Val Thr Gln Ala Gly Leu

65 70 75 80

Gln Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Ala Leu Ala Ser Lys Asn Ala

85 90 95

Glu Val Thr Glu Thr Gly Phe His His Val Ser Gln Ala Asp Ile Glu

100 105 110

Phe Leu Thr Ser Ile Asp Pro Thr Ala Ser Ala Ser Gly Ser Ala Gly

115 120 125

Ile Thr Gly Thr Met Ser Gln Asp Thr Glu Val Asp Met Lys Glu Val

130 135 140

Glu Leu Asn Glu Leu Glu Pro Glu Lys Gln Pro Met Asn Ala Ala Ser

145 150 155 160

Gly Ala Ala Met Ser Leu Ala Gly Ala Glu Lys Asn Gly Leu Val Lys

165 170 175

Ile Lys Val Ala Glu Asp Glu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Phe

180 185 190

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

195 200 205

Trp Val Arg Thr Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu Phe Trp Leu Gly Trp

210 215 220

Leu Gly Met Leu Ala Gly Ala Val Val Ile Ile Val Arg Ala Pro Arg
225 230 235 240

Cys Arg Glu Leu Pro Ala Gln Lys Trp Trp His Thr Gly Ala Leu Tyr
245 250 255

Arg Ile Gly Asp Leu Gln Ala Phe Gln Gly His Gly Ala Gly Asn Leu
260 265 270

Ala Gly Leu Lys Gly Arg Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Val Lys
275 280 285

Gly Leu Val Leu Gly Pro Ile His Lys Asn Gln Lys Asp Asp Val Ala
290 295 300

Gln Thr Asp Leu Leu Gln Ile Asp Pro Asn Phe Gly Ser Lys Glu Asp
305 310 315 320

Phe Asp Ser Leu Leu Gln Ser Ala Lys Lys Lys Ser Ile Arg Val Ile
325 330 335

Leu Asp Leu Thr Pro Asn Tyr Arg Gly Glu Asn Ser Trp Phe Ser Thr
340 345 350

Gln Val Asp Thr Val Ala Thr Lys Val Lys Asp Ala Leu Glu Phe Trp
355 360 365

Leu Gln Ala Gly Val Asp Gly Phe Gln Val Arg Asp Ile Glu Asn Leu
370 375 380

Lys Asp Ala Ser Ser Phe Leu Ala Glu Trp Gln Asn Ile Thr Lys Gly
385 390 395 400

Phe Ser Glu Asp Arg Leu Leu Ile Ala Gly Thr Asn Ser Ser Asp Leu
405 410 415

Gln Gln Ile Leu Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu Thr
420 425 430

Ser Ser Tyr Leu Ser Asp Ser Gly Ser Thr Gly Glu His Thr Lys Ser
435 440 445

Leu Val Thr Gln Tyr Leu Asn Ala Thr Gly Asn Arg Trp Cys Ser Trp
450 455 460

Ser Leu Ser Gln Ala Arg Leu Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ala Gln Leu

465 470 475 480
 Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Met Leu Phe Thr Leu Pro Gly Thr Pro Val
 485 490 495

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

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

 Asp Leu Leu Leu Ser Thr Gln Pro Gly Arg Glu Glu Gly Ser Pro Leu
 625 630 635 640
 Glu Leu Glu Arg Leu Lys Leu Glu Pro His Glu Gly Leu Leu Leu Arg
 645 650 655
 Phe Pro Tyr Ala Ala
 660

 <210> 24
 <211> 1023
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Met Gly Lys Gly Val Gly Arg Asp Lys Tyr Glu Pro Ala Ala Val Ser
 1 5 10 15

Glu Gln Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Gly Lys Lys Asp Arg Asp Met

20 25 30

Asp Glu Leu Lys Lys Glu Val Ser Met Asp Asp His Lys Leu Ser Leu

35 40 45

Asp Glu Leu His Arg Lys Tyr Gly Thr Asp Leu Ser Arg Gly Leu Thr

50 55 60

Ser Ala Arg Ala Ala Glu Ile Leu Ala Arg Asp Gly Pro Asn Ala Leu

65 70 75 80

Thr Pro Pro Pro Thr Thr Pro Glu Trp Ile Lys Phe Cys Arg Gln Leu

85 90 95

Phe Gly Gly Phe Ser Met Leu Leu Trp Ile Gly Ala Ile Leu Cys Phe

100 105 110

Leu Ala Tyr Ser Ile Gln Ala Ala Thr Glu Glu Glu Pro Gln Asn Asp

115 120 125

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

130 135 140

Cys Phe Ser Tyr Tyr Gln Glu Ala Lys Ser Ser Lys Ile Met Glu Ser

145 150 155 160

Phe Lys Asn Met Val Pro Gln Gln Ala Leu Val Ile Arg Asn Gly Glu

165 170 175

Lys Met Ser Ile Asn Ala Glu Glu Val Val Val Gly Asp Leu Val Glu

180 185 190

Val Lys Gly Gly Asp Arg Ile Pro Ala Asp Leu Arg Ile Ile Ser Ala

195 200 205

Asn Gly Cys Lys Val Asp Asn Ser Ser Leu Thr Gly Glu Ser Glu Pro

210 215 220

Gln Thr Arg Ser Pro Asp Phe Thr Asn Glu Asn Pro Leu Glu Thr Arg

225 230 235 240

Asn Ile Ala Phe Phe Ser Thr Asn Cys Val Glu Gly Thr Ala Arg Gly

245 250 255

Ile Val Val Tyr Thr Gly Asp Arg Thr Val Met Gly Arg Ile Ala Thr

260 265 270
 Leu Ala Ser Gly Leu Glu Gly Gly Gln Thr Pro Ile Ala Ala Glu Ile

 275 280 285
 Glu His Phe Ile His Ile Ile Thr Gly Val Ala Val Phe Leu Gly Val
 290 295 300
 Ser Phe Phe Ile Leu Ser Leu Ile Leu Glu Tyr Thr Trp Leu Glu Ala
 305 310 315 320
 Val Ile Phe Leu Ile Gly Ile Ile Val Ala Asn Val Pro Glu Gly Leu
 325 330 335
 Leu Ala Thr Val Thr Val Cys Leu Thr Leu Thr Ala Lys Arg Met Ala

 340 345 350
 Arg Lys Asn Cys Leu Val Lys Asn Leu Glu Ala Val Glu Thr Leu Gly
 355 360 365
 Ser Thr Ser Thr Ile Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Gln Asn
 370 375 380
 Arg Met Thr Val Ala His Met Trp Phe Asp Asn Gln Ile His Glu Ala
 385 390 395 400
 Asp Thr Thr Glu Asn Gln Ser Gly Val Ser Phe Asp Lys Thr Ser Ala

 405 410 415
 Thr Trp Leu Ala Leu Ser Arg Ile Ala Gly Leu Cys Asn Arg Ala Val
 420 425 430
 Phe Gln Ala Asn Gln Glu Asn Leu Pro Ile Leu Lys Arg Ala Val Ala
 435 440 445
 Gly Asp Ala Ser Glu Ser Ala Leu Leu Lys Cys Ile Glu Leu Cys Cys
 450 455 460
 Gly Ser Val Lys Glu Met Arg Glu Arg Tyr Ala Lys Ile Val Glu Ile

 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Ser Thr Asn Lys Tyr Gln Leu Ser Ile His Lys Asn Pro
 485 490 495
 Asn Thr Ser Glu Pro Gln His Leu Leu Val Met Lys Gly Ala Pro Glu
 500 505 510

Arg Ile Leu Asp Arg Cys Ser Ser Ile Leu Leu His Gly Lys Glu Gln
515 520 525

Pro Leu Asp Glu Glu Leu Lys Asp Ala Phe Gln Asn Ala Tyr Leu Glu

530 535 540

Leu Gly Gly Leu Gly Glu Arg Val Leu Gly Phe Cys His Leu Phe Leu
545 550 555 560

Pro Asp Glu Gln Phe Pro Glu Gly Phe Gln Phe Asp Thr Asp Asp Val
565 570 575

Asn Phe Pro Ile Asp Asn Leu Cys Phe Val Gly Leu Ile Ser Met Ile
580 585 590

Asp Pro Pro Arg Ala Ala Val Pro Asp Ala Val Gly Lys Cys Arg Ser

595 600 605

Ala Gly Ile Lys Val Ile Met Val Thr Gly Asp His Pro Ile Thr Ala
610 615 620

Lys Ala Ile Ala Lys Gly Val Gly Ile Ile Ser Glu Gly Asn Glu Thr
625 630 635 640

Val Glu Asp Ile Ala Ala Arg Leu Asn Ile Pro Val Ser Gln Val Asn
645 650 655

Pro Arg Asp Ala Lys Ala Cys Val Val His Gly Ser Asp Leu Lys Asp

660 665 670

Met Thr Ser Glu Gln Leu Asp Asp Ile Leu Lys Tyr His Thr Glu Ile
675 680 685

Val Phe Ala Arg Thr Ser Pro Gln Gln Lys Leu Ile Ile Val Glu Gly
690 695 700

Cys Gln Arg Gln Gly Ala Ile Val Ala Val Thr Gly Asp Gly Val Asn
705 710 715 720

Asp Ser Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile Gly Val Ala Met Gly Ile

725 730 735

Ala Gly Ser Asp Val Ser Lys Gln Ala Ala Asp Met Ile Leu Leu Asp
740 745 750

Asp Asn Phe Ala Ser Ile Val Thr Gly Val Glu Glu Gly Arg Leu Ile

755 760 765
Phe Asp Asn Leu Lys Lys Ser Ile Ala Tyr Thr Leu Thr Ser Asn Ile

770 775 780
Pro Glu Ile Thr Pro Phe Leu Ile Phe Ile Ile Ala Asn Ile Pro Leu

785 790 795 800
Pro Leu Gly Thr Val Thr Ile Leu Cys Ile Asp Leu Gly Thr Asp Met

805 810 815
Val Pro Ala Ile Ser Leu Ala Tyr Glu Gln Ala Glu Ser Asp Ile Met

820 825 830
Lys Arg Gln Pro Arg Asn Pro Lys Thr Asp Lys Leu Val Asn Glu Arg

835 840 845
Leu Ile Ser Met Ala Tyr Gly Gln Ile Gly Met Ile Gln Ala Leu Gly

850 855 860
Gly Phe Phe Thr Tyr Phe Val Ile Leu Ala Glu Asn Gly Phe Leu Pro

865 870 875 880
Ile His Leu Leu Gly Leu Arg Val Asp Trp Asp Asp Arg Trp Ile Asn

885 890 895
Asp Val Glu Asp Ser Tyr Gly Gln Gln Trp Thr Tyr Glu Gln Arg Lys

900 905 910
Ile Val Glu Phe Thr Cys His Thr Ala Phe Phe Val Ser Ile Val Val

915 920 925
Val Gln Trp Ala Asp Leu Val Ile Cys Lys Thr Arg Arg Asn Ser Val

930 935 940
Phe Gln Gln Gly Met Lys Asn Lys Ile Leu Ile Phe Gly Leu Phe Glu

945 950 955 960
Glu Thr Ala Leu Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Cys Pro Gly Met Gly Val

965 970 975
Ala Leu Arg Met Tyr Pro Leu Lys Pro Thr Trp Trp Phe Cys Ala Phe

980 985 990
Pro Tyr Ser Leu Leu Ile Phe Val Tyr Asp Glu Val Arg Lys Leu Ile

995 1000 1005

Ile Arg Arg Arg Pro Gly Gly Trp Val Glu Lys Glu Thr Tyr Tyr

1010

1015

1020

<210> 25

<211> 1020

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Glu Tyr Ser Pro Ala Ala Thr Thr Ala

1

5

10

15

Glu Asn Gly Gly Gly Lys Lys Lys Gln Lys Glu Lys Glu Leu Asp Glu

20

25

30

Leu Lys Lys Glu Val Ala Met Asp Asp His Lys Leu Ser Leu Asp Glu

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Pro Pro Thr Thr Pro Glu Trp Val Lys Phe Cys Arg Gln Leu Phe Gly

85

90

95

Gly Phe Ser Ile Leu Leu Trp Ile Gly Ala Ile Leu Cys Phe Leu Ala

100

105

110

Tyr Gly Ile Gln Ala Ala Met Glu Asp Glu Pro Ser Asn Asp Asn Leu

115

120

125

Tyr Leu Gly Val Val Leu Ala Ala Val Val Ile Val Thr Gly Cys Phe

130

135

140

Ser Tyr Tyr Gln Glu Ala Lys Ser Ser Lys Ile Met Asp Ser Phe Lys

145

150

155

160

Asn Met Val Pro Gln Gln Ala Leu Val Ile Arg Glu Gly Glu Lys Met

165

170

175

Gln Ile Asn Ala Glu Glu Val Val Val Gly Asp Leu Val Glu Val Lys

180

185

190

Gly Gly Asp Arg Val Pro Ala Asp Leu Arg Ile Ile Ser Ser His Gly

195 200 205
 Cys Lys Val Asp Asn Ser Ser Leu Thr Gly Glu Ser Glu Pro Gln Thr
 210 215 220
 Arg Ser Pro Glu Phe Thr His Glu Asn Pro Leu Glu Thr Arg Asn Ile
 225 230 235 240
 Cys Phe Phe Ser Thr Asn Cys Val Glu Gly Thr Ala Arg Gly Ile Val
 245 250 255
 Ile Ala Thr Gly Asp Arg Thr Val Met Gly Arg Ile Ala Thr Leu Ala
 260 265 270

 Ser Gly Leu Glu Val Gly Arg Thr Pro Ile Ala Met Glu Ile Glu His
 275 280 285
 Phe Ile Gln Leu Ile Thr Gly Val Ala Val Phe Leu Gly Val Ser Phe
 290 295 300
 Phe Val Leu Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Ser Trp Leu Glu Ala Val Ile
 305 310 315 320
 Phe Leu Ile Gly Ile Ile Val Ala Asn Val Pro Glu Gly Leu Leu Ala
 325 330 335

 Thr Val Thr Val Cys Leu Thr Leu Thr Ala Lys Arg Met Ala Arg Lys
 340 345 350
 Asn Cys Leu Val Lys Asn Leu Glu Ala Val Glu Thr Leu Gly Ser Thr
 355 360 365
 Ser Thr Ile Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Gln Asn Arg Met
 370 375 380
 Thr Val Ala His Met Trp Phe Asp Asn Gln Ile His Glu Ala Asp Thr
 385 390 395 400

 Thr Glu Asp Gln Ser Gly Ala Thr Phe Asp Lys Arg Ser Pro Thr Trp
 405 410 415
 Thr Ala Leu Ser Arg Ile Ala Gly Leu Cys Asn Arg Ala Val Phe Lys
 420 425 430
 Ala Gly Gln Glu Asn Ile Ser Val Ser Lys Arg Asp Thr Ala Gly Asp
 435 440 445

Ala Ser Glu Ser Ala Leu Leu Lys Cys Ile Glu Leu Ser Cys Gly Ser
450 455 460

Val Arg Lys Met Arg Asp Arg Asn Pro Lys Val Ala Glu Ile Pro Phe
465 470 475 480

Asn Ser Thr Asn Lys Tyr Gln Leu Ser Ile His Glu Arg Glu Asp Ser
485 490 495

Pro Gln Ser His Val Leu Val Met Lys Gly Ala Pro Glu Arg Ile Leu
500 505 510

Asp Arg Cys Ser Thr Ile Leu Val Gln Gly Lys Glu Ile Pro Leu Asp
515 520 525

Lys Glu Met Gln Asp Ala Phe Gln Asn Ala Tyr Met Glu Leu Gly Gly
530 535 540

Leu Gly Glu Arg Val Leu Gly Phe Cys Gln Leu Asn Leu Pro Ser Gly
545 550 555 560

Lys Phe Pro Arg Gly Phe Lys Phe Asp Thr Asp Glu Leu Asn Phe Pro
565 570 575

Thr Glu Lys Leu Cys Phe Val Gly Leu Met Ser Met Ile Asp Pro Pro
580 585 590

Arg Ala Ala Val Pro Asp Ala Val Gly Lys Cys Arg Ser Ala Gly Ile
595 600 605

Lys Val Ile Met Val Thr Gly Asp His Pro Ile Thr Ala Lys Ala Ile
610 615 620

Ala Lys Gly Val Gly Ile Ile Ser Glu Gly Asn Glu Thr Val Glu Asp
625 630 635 640

Ile Ala Ala Arg Leu Asn Ile Pro Met Ser Gln Val Asn Pro Arg Glu
645 650 655

Ala Lys Ala Cys Val Val His Gly Ser Asp Leu Lys Asp Met Thr Ser
660 665 670

Glu Gln Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn His Thr Glu Ile Val Phe Ala
675 680 685

Arg Thr Ser Pro Gln Gln Lys Leu Ile Ile Val Glu Gly Cys Gln Arg

690 695 700
 Gln Gly Ala Ile Val Ala Val Thr Gly Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro
 705 710 715 720

 Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile Gly Ile Ala Met Gly Ile Ser Gly Ser
 725 730 735
 Asp Val Ser Lys Gln Ala Ala Asp Met Ile Leu Leu Asp Asp Asn Phe
 740 745 750
 Ala Ser Ile Val Thr Gly Val Glu Glu Gly Arg Leu Ile Phe Asp Asn
 755 760 765
 Leu Lys Lys Ser Ile Ala Tyr Thr Leu Thr Ser Asn Ile Pro Glu Ile
 770 775 780

 Thr Pro Phe Leu Leu Phe Ile Ile Ala Asn Ile Pro Leu Pro Leu Gly
 785 790 795 800
 Thr Val Thr Ile Leu Cys Ile Asp Leu Gly Thr Asp Met Val Pro Ala
 805 810 815
 Ile Ser Leu Ala Tyr Glu Ala Ala Glu Ser Asp Ile Met Lys Arg Gln
 820 825 830
 Pro Arg Asn Ser Gln Thr Asp Lys Leu Val Asn Glu Arg Leu Ile Ser
 835 840 845

 Met Ala Tyr Gly Gln Ile Gly Met Ile Gln Ala Leu Gly Gly Phe Phe
 850 855 860
 Thr Tyr Phe Val Ile Leu Ala Glu Asn Gly Phe Leu Pro Ser Arg Leu
 865 870 875 880
 Leu Gly Ile Arg Leu Asp Trp Asp Asp Arg Thr Met Asn Asp Leu Glu
 885 890 895
 Asp Ser Tyr Gly Gln Glu Trp Thr Tyr Glu Gln Arg Lys Val Val Glu
 900 905 910

 Phe Thr Cys His Thr Ala Phe Phe Ala Ser Ile Val Val Val Gln Trp
 915 920 925
 Ala Asp Leu Ile Ile Cys Lys Thr Arg Arg Asn Ser Val Phe Gln Gln
 930 935 940

Gly Met Lys Asn Lys Ile Leu Ile Phe Gly Leu Leu Glu Glu Thr Ala
 945 950 955 960
 Leu Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Cys Pro Gly Met Gly Val Ala Leu Arg
 965 970 975

Met Tyr Pro Leu Lys Val Thr Trp Trp Phe Cys Ala Phe Pro Tyr Ser
 980 985 990
 Leu Leu Ile Phe Ile Tyr Asp Glu Val Arg Lys Leu Ile Leu Arg Arg
 995 1000 1005
 Tyr Pro Gly Gly Trp Val Glu Lys Glu Thr Tyr Tyr
 1010 1015 1020

<210> 26

<211> 1026

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ser Tyr Arg Ile Ala Thr Ser Gln Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Lys Asp Ser Pro Lys Lys Asn Lys Gly Lys Glu Arg
 20 25 30
 Arg Asp Leu Asp Asp Leu Lys Lys Glu Val Ala Met Thr Glu His Lys
 35 40 45
 Met Ser Val Glu Glu Val Cys Arg Lys Tyr Asn Thr Asp Cys Val Gln
 50 55 60
 Gly Leu Thr His Ser Lys Ala Gln Glu Ile Leu Ala Arg Asp Gly Pro
 65 70 75 80

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

130 135 140
 Ile Thr Gly Cys Phe Ser Tyr Tyr Gln Glu Ala Lys Ser Ser Lys Ile
 145 150 155 160
 Met Glu Ser Phe Lys Asn Met Val Pro Gln Gln Ala Leu Val Ile Arg
 165 170 175
 Glu Gly Glu Lys Met Gln Val Asn Ala Glu Glu Val Val Val Gly Asp
 180 185 190
 Leu Val Glu Ile Lys Gly Gly Asp Arg Val Pro Ala Asp Leu Arg Ile
 195 200 205

 Ile Ser Ala His Gly Cys Lys Val Asp Asn Ser Ser Leu Thr Gly Glu
 210 215 220
 Ser Glu Pro Gln Thr Arg Ser Pro Asp Cys Thr His Asp Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Glu Thr Arg Asn Ile Thr Phe Phe Ser Thr Asn Cys Val Glu Gly Thr
 245 250 255
 Ala Arg Gly Val Val Val Ala Thr Gly Asp Arg Thr Val Met Gly Arg
 260 265 270

 Ile Ala Thr Leu Ala Ser Gly Leu Glu Val Gly Lys Thr Pro Ile Ala
 275 280 285
 Ile Glu Ile Glu His Phe Ile Gln Leu Ile Thr Gly Val Ala Val Phe
 290 295 300
 Leu Gly Val Ser Phe Phe Ile Leu Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Ala Val Ile Phe Leu Ile Gly Ile Ile Val Ala Asn Val Pro
 325 330 335

 Glu Gly Leu Leu Ala Thr Val Thr Val Cys Leu Thr Leu Thr Ala Lys
 340 345 350
 Arg Met Ala Arg Lys Asn Cys Leu Val Lys Asn Leu Glu Ala Val Glu
 355 360 365
 Thr Leu Gly Ser Thr Ser Thr Ile Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu
 370 375 380

Thr Gln Asn Arg Met Thr Val Ala His Met Trp Phe Asp Asn Gln Ile
385 390 395 400

His Glu Ala Asp Thr Thr Glu Asp Gln Ser Gly Thr Ser Phe Asp Lys
405 410 415

Ser Ser His Thr Trp Val Ala Leu Ser His Ile Ala Gly Leu Cys Asn
420 425 430

Arg Ala Val Phe Lys Gly Gly Gln Asp Asn Ile Pro Val Leu Lys Arg
435 440 445

Asp Val Ala Gly Asp Ala Ser Glu Ser Ala Leu Leu Lys Cys Ile Glu
450 455 460

Leu Ser Ser Gly Ser Val Lys Leu Met Arg Glu Arg Asn Lys Lys Val
465 470 475 480

Ala Glu Ile Pro Phe Asn Ser Thr Asn Lys Tyr Gln Leu Ser Ile His
485 490 495

Glu Thr Glu Asp Pro Asn Asp Asn Arg Tyr Leu Leu Val Met Lys Gly
500 505 510

Ala Pro Glu Arg Ile Leu Asp Arg Cys Ser Thr Ile Leu Leu Gln Gly
515 520 525

Lys Glu Gln Pro Leu Asp Glu Glu Met Lys Glu Ala Phe Gln Asn Ala
530 535 540

Tyr Leu Glu Leu Gly Gly Leu Gly Glu Arg Val Leu Gly Phe Cys His
545 550 555 560

Tyr Tyr Leu Pro Glu Glu Gln Phe Pro Lys Gly Phe Ala Phe Asp Cys
565 570 575

Asp Asp Val Asn Phe Thr Thr Asp Asn Leu Cys Phe Val Gly Leu Met
580 585 590

Ser Met Ile Asp Pro Pro Arg Ala Ala Val Pro Asp Ala Val Gly Lys
595 600 605

Cys Arg Ser Ala Gly Ile Lys Val Ile Met Val Thr Gly Asp His Pro
610 615 620

Ile Thr Ala Lys Ala Ile Ala Lys Gly Val Gly Ile Ile Ser Glu Gly

625 630 635 640
 Asn Glu Thr Val Glu Asp Ile Ala Ala Arg Leu Asn Ile Pro Val Ser
 645 650 655

 Gln Val Asn Pro Arg Asp Ala Lys Ala Cys Val Ile His Gly Thr Asp
 660 665 670
 Leu Lys Asp Phe Thr Ser Glu Gln Ile Asp Glu Ile Leu Gln Asn His
 675 680 685
 Thr Glu Ile Val Phe Ala Arg Thr Ser Pro Gln Gln Lys Leu Ile Ile
 690 695 700
 Val Glu Gly Cys Gln Arg Gln Gly Ala Ile Val Ala Val Thr Gly Asp
 705 710 715 720

 Gly Val Asn Asp Ser Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile Gly Val Ala
 725 730 735
 Met Gly Ile Ala Gly Ser Asp Val Ser Lys Gln Ala Ala Asp Met Ile
 740 745 750
 Leu Leu Asp Asp Asn Phe Ala Ser Ile Val Thr Gly Val Glu Glu Gly
 755 760 765
 Arg Leu Ile Phe Asp Asn Leu Lys Lys Ser Ile Ala Tyr Thr Leu Thr
 770 775 780

 Ser Asn Ile Pro Glu Ile Thr Pro Phe Leu Leu Phe Ile Met Ala Asn
 785 790 795 800
 Ile Pro Leu Pro Leu Gly Thr Ile Thr Ile Leu Cys Ile Asp Leu Gly
 805 810 815
 Thr Asp Met Val Pro Ala Ile Ser Leu Ala Tyr Glu Ala Ala Glu Ser
 820 825 830
 Asp Ile Met Lys Arg Gln Pro Arg Asn Pro Arg Thr Asp Lys Leu Val
 835 840 845

 Asn Glu Arg Leu Ile Ser Met Ala Tyr Gly Gln Ile Gly Met Ile Gln
 850 855 860
 Ala Leu Gly Gly Phe Phe Ser Tyr Phe Val Ile Leu Ala Glu Asn Gly
 865 870 875 880

Phe Leu Pro Gly Asn Leu Val Gly Ile Arg Leu Asn Trp Asp Asp Arg
885 890 895
Thr Val Asn Asp Leu Glu Asp Ser Tyr Gly Gln Gln Trp Thr Tyr Glu
900 905 910

Gln Arg Lys Val Val Glu Phe Thr Cys His Thr Ala Phe Phe Val Ser
915 920 925
Ile Val Val Val Gln Trp Ala Asp Leu Ile Ile Cys Lys Thr Arg Arg
930 935 940
Asn Ser Val Phe Gln Gln Gly Met Lys Asn Lys Ile Leu Ile Phe Gly
945 950 955 960
Leu Phe Glu Glu Thr Ala Leu Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Cys Pro Gly
965 970 975

Met Asp Val Ala Leu Arg Met Tyr Pro Leu Lys Pro Ser Trp Trp Phe
980 985 990
Cys Ala Phe Pro Tyr Ser Phe Leu Ile Phe Val Tyr Asp Glu Ile Arg
995 1000 1005
Lys Leu Ile Leu Arg Arg Asn Pro Gly Gly Trp Val Glu Lys Glu
1010 1015 1020
Thr Tyr Tyr
1025

<210> 27

<211> 1029

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Gly Leu Trp Gly Lys Lys Gly Thr Val Ala Pro His Asp Gln Ser

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

50 55 60
 Val Asp Leu Thr Lys Gly His Ser His Gln Arg Ala Lys Glu Ile Leu

 65 70 75 80
 Thr Arg Gly Gly Pro Asn Thr Val Thr Pro Pro Pro Thr Thr Pro Glu

 85 90 95
 Trp Val Lys Phe Cys Lys Gln Leu Phe Gly Gly Phe Ser Leu Leu Leu

 100 105 110
 Trp Thr Gly Ala Ile Leu Cys Phe Val Ala Tyr Ser Ile Gln Ile Tyr

 115 120 125
 Phe Asn Glu Glu Pro Thr Lys Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ile Val Leu

 130 135 140
 Ser Val Val Val Ile Val Thr Gly Cys Phe Ser Tyr Tyr Gln Glu Ala

 145 150 155 160
 Lys Ser Ser Lys Ile Met Glu Ser Phe Lys Asn Met Val Pro Gln Gln

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

 180 185 190
 Val Val Leu Gly Asp Leu Val Glu Ile Lys Gly Gly Asp Arg Val Pro

 195 200 205
 Ala Asp Leu Arg Leu Ile Ser Ala Gln Gly Cys Lys Val Asp Asn Ser

 210 215 220
 Ser Leu Thr Gly Glu Ser Glu Pro Gln Ser Arg Ser Pro Asp Phe Thr

 225 230 235 240
 His Glu Asn Pro Leu Glu Thr Arg Asn Ile Cys Phe Phe Ser Thr Asn

 245 250 255
 Cys Val Glu Gly Thr Ala Arg Gly Ile Val Ile Ala Thr Gly Asp Ser

 260 265 270
 Thr Val Met Gly Arg Ile Ala Ser Leu Thr Ser Gly Leu Ala Val Gly

 275 280 285
 Gln Thr Pro Ile Ala Ala Glu Ile Glu His Phe Ile His Leu Ile Thr

 290 295 300

Val Val Ala Val Phe Leu Gly Val Thr Phe Phe Ala Leu Ser Leu Leu
305 310 315 320
Leu Gly Tyr Gly Trp Leu Glu Ala Ile Ile Phe Leu Ile Gly Ile Ile
325 330 335
Val Ala Asn Val Pro Glu Gly Leu Leu Ala Thr Val Thr Val Cys Leu
340 345 350
Thr Leu Thr Ala Lys Arg Met Ala Arg Lys Asn Cys Leu Val Lys Asn
355 360 365
Leu Glu Ala Val Glu Thr Leu Gly Ser Thr Ser Thr Ile Cys Ser Asp
370 375 380
Lys Thr Gly Thr Leu Thr Gln Asn Arg Met Thr Val Ala His Met Trp
385 390 395 400
Phe Asp Met Thr Val Tyr Glu Ala Asp Thr Thr Glu Glu Gln Thr Gly
405 410 415
Lys Thr Phe Thr Lys Ser Ser Asp Thr Trp Phe Met Leu Ala Arg Ile
420 425 430
Ala Gly Leu Cys Asn Arg Ala Asp Phe Lys Ala Asn Gln Glu Ile Leu
435 440 445
Pro Ile Ala Lys Arg Ala Thr Thr Gly Asp Ala Ser Glu Ser Ala Leu
450 455 460
Leu Lys Phe Ile Glu Gln Ser Tyr Ser Ser Val Ala Glu Met Arg Glu
465 470 475 480
Lys Asn Pro Lys Val Ala Glu Ile Pro Phe Asn Ser Thr Asn Lys Tyr
485 490 495
Gln Met Ser Ile His Leu Arg Glu Asp Ser Ser Gln Thr His Val Leu
500 505 510
Met Met Lys Gly Ala Pro Glu Arg Ile Leu Glu Phe Cys Ser Thr Phe
515 520 525
Leu Leu Asn Gly Gln Glu Tyr Ser Met Asn Asp Glu Met Lys Glu Ala
530 535 540
Phe Gln Asn Ala Tyr Leu Glu Leu Gly Gly Leu Gly Glu Arg Val Leu

545 550 555 560
 Gly Phe Cys Phe Leu Asn Leu Pro Ser Ser Phe Ser Lys Gly Phe Pro
 565 570 575
 Phe Asn Thr Asp Glu Ile Asn Phe Pro Met Asp Asn Leu Cys Phe Val

 580 585 590
 Gly Leu Ile Ser Met Ile Asp Pro Pro Arg Ala Ala Val Pro Asp Ala
 595 600 605
 Val Ser Lys Cys Arg Ser Ala Gly Ile Lys Val Ile Met Val Thr Gly
 610 615 620
 Asp His Pro Ile Thr Ala Lys Ala Ile Ala Lys Gly Val Gly Ile Ile
 625 630 635 640
 Ser Glu Gly Thr Glu Thr Ala Glu Glu Val Ala Ala Arg Leu Lys Ile

 645 650 655
 Pro Ile Ser Lys Val Asp Ala Ser Ala Ala Lys Ala Ile Val Val His
 660 665 670
 Gly Ala Glu Leu Lys Asp Ile Gln Ser Lys Gln Leu Asp Gln Ile Leu
 675 680 685
 Gln Asn His Pro Glu Ile Val Phe Ala Arg Thr Ser Pro Gln Gln Lys
 690 695 700
 Leu Ile Ile Val Glu Gly Cys Gln Arg Leu Gly Ala Val Val Ala Val

 705 710 715 720
 Thr Gly Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile
 725 730 735
 Gly Ile Ala Met Gly Ile Ser Gly Ser Asp Val Ser Lys Gln Ala Ala
 740 745 750
 Asp Met Ile Leu Leu Asp Asp Asn Phe Ala Ser Ile Val Thr Gly Val
 755 760 765
 Glu Glu Gly Arg Leu Ile Phe Asp Asn Leu Lys Lys Ser Ile Met Tyr

 770 775 780
 Thr Leu Thr Ser Asn Ile Pro Glu Ile Thr Pro Phe Leu Met Phe Ile
 785 790 795 800

Ile Leu Gly Ile Pro Leu Pro Leu Gly Thr Ile Thr Ile Leu Cys Ile
805 810 815

Asp Leu Gly Thr Asp Met Val Pro Ala Ile Ser Leu Ala Tyr Glu Ser
820 825 830

Ala Glu Ser Asp Ile Met Lys Arg Leu Pro Arg Asn Pro Lys Thr Asp
835 840 845

Asn Leu Val Asn His Arg Leu Ile Gly Met Ala Tyr Gly Gln Ile Gly
850 855 860

Met Ile Gln Ala Leu Ala Gly Phe Phe Thr Tyr Phe Val Ile Leu Ala
865 870 875 880

Glu Asn Gly Phe Arg Pro Val Asp Leu Leu Gly Ile Arg Leu His Trp
885 890 895

Glu Asp Lys Tyr Leu Asn Asp Leu Glu Asp Ser Tyr Gly Gln Gln Trp
900 905 910

Thr Tyr Glu Gln Arg Lys Val Val Glu Phe Thr Cys Gln Thr Ala Phe
915 920 925

Phe Val Thr Ile Val Val Val Gln Trp Ala Asp Leu Ile Ile Ser Lys
930 935 940

Thr Arg Arg Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gly Met Arg Asn Lys Val Leu
945 950 955 960

Ile Phe Gly Ile Leu Glu Glu Thr Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ser Tyr
965 970 975

Thr Pro Gly Met Asp Val Ala Leu Arg Met Tyr Pro Leu Lys Ile Thr
980 985 990

Trp Trp Leu Cys Ala Ile Pro Tyr Ser Ile Leu Ile Phe Val Tyr Asp
995 1000 1005

Glu Ile Arg Lys Leu Leu Ile Arg Gln His Pro Asp Gly Trp Val
1010 1015 1020

Glu Arg Glu Thr Tyr Tyr
1025

<210> 28

<211> 279

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

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

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

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

           180          185          190
Ser Lys Asn Glu Asp Ile Pro Asn Val Ala Val Tyr Pro His Asn Gly
           195          200          205
Met Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Pro Tyr Tyr Gly Lys Lys Leu His Val
           210          215          220

```

Gly Tyr Leu Gln Pro Leu Val Ala Val Gln Val Ser Phe Ala Pro Asn
 225 230 235 240
 Asn Thr Gly Lys Glu Val Thr Val Glu Cys Lys Ile Asp Gly Ser Ala
 245 250 255
 Asn Leu Lys Ser Gln Asp Asp Arg Asp Lys Phe Leu Gly Arg Val Met
 260 265 270
 Phe Lys Ile Thr Ala Arg Ala
 275
 <210> 29
 <211> 1258
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Met Gly Asp Met Ala Asn Asn Ser Val Ala Tyr Ser Gly Val Lys Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Glu Ala Asn His Asp Gly Asp Phe Gly Ile Thr Leu Ala
 20 25 30
 Glu Leu Arg Ala Leu Met Glu Leu Arg Ser Thr Asp Ala Leu Arg Lys
 35 40 45
 Ile Gln Glu Ser Tyr Gly Asp Val Tyr Gly Ile Cys Thr Lys Leu Lys
 50 55 60
 Thr Ser Pro Asn Glu Gly Leu Ser Gly Asn Pro Ala Asp Leu Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Glu Ala Val Phe Gly Lys Asn Phe Ile Pro Pro Lys Lys Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Leu Gln Leu Val Trp Glu Ala Leu Gln Asp Val Thr Leu Ile
 100 105 110
 Ile Leu Glu Ile Ala Ala Ile Val Ser Leu Gly Leu Ser Phe Tyr Gln
 115 120 125
 Pro Pro Glu Gly Asp Asn Ala Leu Cys Gly Glu Val Ser Val Gly Glu
 130 135 140

Glu Glu Gly Glu Gly Glu Thr Gly Trp Ile Glu Gly Ala Ala Ile Leu

145 150 155 160

Leu Ser Val Val Cys Val Val Leu Val Thr Ala Phe Asn Asp Trp Ser

165 170 175

Lys Glu Lys Gln Phe Arg Gly Leu Gln Ser Arg Ile Glu Gln Glu Gln

180 185 190

Lys Phe Thr Val Ile Arg Gly Gly Gln Val Ile Gln Ile Pro Val Ala

195 200 205

Asp Ile Thr Val Gly Asp Ile Ala Gln Val Lys Tyr Gly Asp Leu Leu

210 215 220

Pro Ala Asp Gly Ile Leu Ile Gln Gly Asn Asp Leu Lys Ile Asp Glu

225 230 235 240

Ser Ser Leu Thr Gly Glu Ser Asp His Val Lys Lys Ser Leu Asp Lys

245 250 255

Asp Pro Leu Leu Leu Ser Gly Thr His Val Met Glu Gly Ser Gly Arg

260 265 270

Met Val Val Thr Ala Val Gly Val Asn Ser Gln Thr Gly Ile Ile Phe

275 280 285

Thr Leu Leu Gly Ala Gly Gly Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Glu Lys

290 295 300

Lys Lys Glu Lys Lys Asn Lys Lys Gln Asp Gly Ala Ile Glu Asn Arg

305 310 315 320

Asn Lys Ala Lys Ala Gln Asp Gly Ala Ala Met Glu Met Gln Pro Leu

325 330 335

Lys Ser Glu Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Lys Asp Lys Lys Lys Ala

340 345 350

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

355 360 365

Leu Ala Val Gln Ile Gly Lys Ala Gly Leu Leu Met Ser Ala Ile Thr

370 375 380

Val Ile Ile Leu Val Leu Tyr Phe Val Ile Asp Thr Phe Trp Val Gln

385 390 395 400
 Lys Arg Pro Trp Leu Ala Glu Cys Thr Pro Ile Tyr Ile Gln Tyr Phe

 405 410 415
 Val Lys Phe Phe Ile Ile Gly Val Thr Val Leu Val Val Ala Val Pro
 420 425 430
 Glu Gly Leu Pro Leu Ala Val Thr Ile Ser Leu Ala Tyr Ser Val Lys
 435 440 445
 Lys Met Met Lys Asp Asn Asn Leu Val Arg His Leu Asp Ala Cys Glu
 450 455 460
 Thr Met Gly Asn Ala Thr Ala Ile Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu

 465 470 475 480
 Thr Met Asn Arg Met Thr Val Val Gln Ala Tyr Ile Asn Glu Lys His
 485 490 495
 Tyr Lys Lys Val Pro Glu Pro Glu Ala Ile Pro Pro Asn Ile Leu Ser
 500 505 510
 Tyr Leu Val Thr Gly Ile Ser Val Asn Cys Ala Tyr Thr Ser Lys Ile
 515 520 525
 Leu Pro Pro Glu Lys Glu Gly Gly Leu Pro Arg His Val Gly Asn Lys

 530 535 540
 Thr Glu Cys Ala Leu Leu Gly Leu Leu Leu Asp Leu Lys Arg Asp Tyr
 545 550 555 560
 Gln Asp Val Arg Asn Glu Ile Pro Glu Glu Ala Leu Tyr Lys Val Tyr
 565 570 575
 Thr Phe Asn Ser Val Arg Lys Ser Met Ser Thr Val Leu Lys Asn Ser
 580 585 590
 Asp Gly Ser Tyr Arg Ile Phe Ser Lys Gly Ala Ser Glu Ile Ile Leu

 595 600 605
 Lys Lys Cys Phe Lys Ile Leu Ser Ala Asn Gly Glu Ala Lys Val Phe
 610 615 620
 Arg Pro Arg Asp Arg Asp Asp Ile Val Lys Thr Val Ile Glu Pro Met
 625 630 635 640

Ala Ser Glu Gly Leu Arg Thr Ile Cys Leu Ala Phe Arg Asp Phe Pro
645 650 655

Ala Gly Glu Pro Glu Pro Glu Trp Asp Asn Glu Asn Asp Ile Val Thr
660 665 670

Gly Leu Thr Cys Ile Ala Val Val Gly Ile Glu Asp Pro Val Arg Pro
675 680 685

Glu Val Pro Asp Ala Ile Lys Lys Cys Gln Arg Ala Gly Ile Thr Val
690 695 700

Arg Met Val Thr Gly Asp Asn Ile Asn Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr
705 710 715 720

Lys Cys Gly Ile Leu His Pro Gly Glu Asp Phe Leu Cys Leu Glu Gly
725 730 735

Lys Asp Phe Asn Arg Arg Ile Arg Asn Glu Lys Gly Glu Ile Glu Gln
740 745 750

Glu Arg Ile Asp Lys Ile Trp Pro Lys Leu Arg Val Leu Ala Arg Ser
755 760 765

Ser Pro Thr Asp Lys His Thr Leu Val Lys Gly Ile Ile Asp Ser Thr
770 775 780

Val Ser Asp Gln Arg Gln Val Val Ala Val Thr Gly Asp Gly Thr Asn
785 790 795 800

Asp Gly Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Val Gly Phe Ala Met Gly Ile
805 810 815

Ala Gly Thr Asp Val Ala Lys Glu Ala Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp
820 825 830

Asp Asn Phe Thr Ser Ile Val Lys Ala Val Met Trp Gly Arg Asn Val
835 840 845

Tyr Asp Ser Ile Ser Lys Phe Leu Gln Phe Gln Leu Thr Val Asn Val
850 855 860

Val Ala Val Ile Val Ala Phe Thr Gly Ala Cys Ile Thr Gln Asp Ser
865 870 875 880

Pro Leu Lys Ala Val Gln Met Leu Trp Val Asn Leu Ile Met Asp Thr

885 890 895
 Leu Ala Ser Leu Ala Leu Ala Thr Glu Pro Pro Thr Glu Ser Leu Leu
 900 905 910
 Leu Arg Lys Pro Tyr Gly Arg Asn Lys Pro Leu Ile Ser Arg Thr Met

 915 920 925
 Met Lys Asn Ile Leu Gly His Ala Phe Tyr Gln Leu Val Val Val Phe
 930 935 940
 Thr Leu Leu Phe Ala Gly Glu Lys Phe Phe Asp Ile Asp Ser Gly Arg
 945 950 955 960
 Asn Ala Pro Leu His Ala Pro Pro Ser Glu His Tyr Thr Ile Val Phe
 965 970 975
 Asn Thr Phe Val Leu Met Gln Leu Phe Asn Glu Ile Asn Ala Arg Lys

 980 985 990
 Ile His Gly Glu Arg Asn Val Phe Glu Gly Ile Phe Asn Asn Ala Ile
 995 1000 1005
 Phe Cys Thr Ile Val Leu Gly Thr Phe Val Val Gln Ile Ile Ile
 1010 1015 1020
 Val Gln Phe Gly Gly Lys Pro Phe Ser Cys Ser Glu Leu Ser Ile
 1025 1030 1035
 Glu Gln Trp Leu Trp Ser Ile Phe Leu Gly Met Gly Thr Leu Leu

 1040 1045 1050
 Trp Gly Gln Leu Ile Ser Thr Ile Pro Thr Ser Arg Leu Lys Phe
 1055 1060 1065
 Leu Lys Glu Ala Gly His Gly Thr Gln Lys Glu Glu Ile Pro Glu
 1070 1075 1080
 Glu Glu Leu Ala Glu Asp Val Glu Glu Ile Asp His Ala Glu Arg
 1085 1090 1095
 Glu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn Arg

 1100 1105 1110
 Ile Gln Thr Gln Met Asp Val Val Asn Ala Phe Gln Ser Gly Ser
 1115 1120 1125

Ser Ile Gln Gly Ala Leu Arg Arg Gln Pro Ser Ile Ala Ser Gln
1130 1135 1140

His His Asp Val Thr Asn Ile Ser Thr Pro Thr His Ile Arg Val
1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

Glu Ser Arg Ser Ser Ile His Asn Phe Met Thr His Pro Glu Phe
1175 1180 1185

Arg Ile Glu Asp Ser Glu Pro His Ile Pro Leu Ile Asp Asp Thr
1190 1195 1200

Asp Ala Glu Asp Asp Ala Pro Thr Lys Arg Asn Ser Ser Pro Pro
1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Leu Thr Ile Glu Met Asn Lys Ser Ala Thr Ser Ser Ser Pro Gly
1235 1240 1245

Ser Pro Leu His Ser Leu Glu Thr Ser Leu
1250 1255

<210> 30

<211> 1272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gly Asp Met Thr Asn Ser Asp Phe Tyr Ser Lys Asn Gln Arg Asn

1 5 10 15

Glu Ser Ser His Gly Gly Glu Phe Gly Cys Thr Met Glu Glu Leu Arg

20 25 30

Ser Leu Met Glu Leu Arg Gly Thr Glu Ala Val Val Lys Ile Lys Glu

35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Gly Leu Pro Gly Thr Ala Pro Asp Leu Glu Lys Arg Lys Gln

65				70				75				80			
Ile	Phe	Gly	Gln	Asn	Phe	Ile	Pro	Pro	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Phe	Leu
85				90				95							
Gln	Leu	Val	Trp	Glu	Ala	Leu	Gln	Asp	Val	Thr	Leu	Ile	Ile	Leu	Glu
100				105				110							
Ile	Ala	Ala	Ile	Ile	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	His	Pro	Pro	Gly
115				120				125							
Glu	Gly	Asn	Glu	Gly	Cys	Ala	Thr	Ala	Gln	Gly	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu
130				135				140							
Gly	Glu	Ala	Glu	Ala	Gly	Trp	Ile	Glu	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser
145				150				155				160			
Val	Ile	Cys	Val	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Phe	Asn	Asp	Trp	Ser	Lys	Glu
165				170				175							
Lys	Gln	Phe	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Glu	Gln	Glu	Gln	Lys	Phe
180				185				190							
Thr	Val	Val	Arg	Ala	Gly	Gln	Val	Val	Gln	Ile	Pro	Val	Ala	Glu	Ile
195				200				205							
Val	Val	Gly	Asp	Ile	Ala	Gln	Val	Lys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu	Pro	Ala
210				215				220							
Asp	Gly	Leu	Phe	Ile	Gln	Gly	Asn	Asp	Leu	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Ser
225				230				235				240			
Leu	Thr	Gly	Glu	Ser	Asp	Gln	Val	Arg	Lys	Ser	Val	Asp	Lys	Asp	Pro
245				250				255							
Met	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	His	Val	Met	Glu	Gly	Ser	Gly	Arg	Met	Leu
260				265				270							
Val	Thr	Ala	Val	Gly	Val	Asn	Ser	Gln	Thr	Gly	Ile	Ile	Phe	Thr	Leu
275				280				285							
Leu	Gly	Ala	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Asp	Lys	Lys	Gly	Val
290				295				300							
Lys	Lys	Gly	Asp	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Gly	Ala	Ala	Ala
305				310				315				320			

Ser Asn Ala Ala Asp Ser Ala Asn Ala Ser Leu Val Asn Gly Lys Met
325 330 335

Gln Asp Gly Asn Val Asp Ala Ser Gln Ser Lys Ala Lys Gln Gln Asp
340 345 350

Gly Ala Ala Ala Met Glu Met Gln Pro Leu Lys Ser Ala Glu Gly Gly
355 360 365

Asp Ala Asp Asp Arg Lys Lys Ala Ser Met His Lys Lys Glu Lys Ser
370 375 380

Val Leu Gln Gly Lys Leu Thr Lys Leu Ala Val Gln Ile Gly Lys Ala
385 390 395 400

Gly Leu Val Met Ser Ala Ile Thr Val Ile Ile Leu Val Leu Tyr Phe
405 410 415

Thr Val Asp Thr Phe Val Val Asn Lys Lys Pro Trp Leu Pro Glu Cys
420 425 430

Thr Pro Val Tyr Val Gln Tyr Phe Val Lys Phe Phe Ile Ile Gly Val
435 440 445

Thr Val Leu Val Val Ala Val Pro Glu Gly Leu Pro Leu Ala Val Thr
450 455 460

Ile Ser Leu Ala Tyr Ser Val Lys Lys Met Met Lys Asp Asn Asn Leu
465 470 475 480

Val Arg His Leu Asp Ala Cys Glu Thr Met Gly Asn Ala Thr Ala Ile
485 490 495

Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr Asn Arg Met Thr Val Val
500 505 510

Gln Ala Tyr Val Gly Asp Val His Tyr Lys Glu Ile Pro Asp Pro Ser
515 520 525

Ser Ile Asn Thr Lys Thr Met Glu Leu Leu Ile Asn Ala Ile Ala Ile
530 535 540

Asn Ser Ala Tyr Thr Thr Lys Ile Leu Pro Pro Glu Lys Glu Gly Ala
545 550 555 560

Leu Pro Arg Gln Val Gly Asn Lys Thr Glu Cys Gly Leu Leu Gly Phe

565 570 575
 Val Leu Asp Leu Lys Gln Asp Tyr Glu Pro Val Arg Ser Gln Met Pro
 580 585 590
 Glu Glu Lys Leu Tyr Lys Val Tyr Thr Phe Asn Ser Val Arg Lys Ser

 595 600 605
 Met Ser Thr Val Ile Lys Leu Pro Asp Glu Ser Phe Arg Met Tyr Ser
 610 615 620
 Lys Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Lys Lys Cys Cys Lys Ile Leu Asn
 625 630 635 640
 Gly Ala Gly Glu Pro Arg Val Phe Arg Pro Arg Asp Arg Asp Glu Met
 645 650 655
 Val Lys Lys Val Ile Glu Pro Met Ala Cys Asp Gly Leu Arg Thr Ile

 660 665 670
 Cys Val Ala Tyr Arg Asp Phe Pro Ser Ser Pro Glu Pro Asp Trp Asp
 675 680 685
 Asn Glu Asn Asp Ile Leu Asn Glu Leu Thr Cys Ile Cys Val Val Gly
 690 695 700
 Ile Glu Asp Pro Val Arg Pro Glu Val Pro Glu Ala Ile Arg Lys Cys
 705 710 715 720
 Gln Arg Ala Gly Ile Thr Val Arg Met Val Thr Gly Asp Asn Ile Asn

 725 730 735
 Thr Ala Arg Ala Ile Ala Ile Lys Cys Gly Ile Ile His Pro Gly Glu
 740 745 750
 Asp Phe Leu Cys Leu Glu Gly Lys Glu Phe Asn Arg Arg Ile Arg Asn
 755 760 765
 Glu Lys Gly Glu Ile Glu Gln Glu Arg Ile Asp Lys Ile Trp Pro Lys
 770 775 780
 Leu Arg Val Leu Ala Arg Ser Ser Pro Thr Asp Lys His Thr Leu Val

 785 790 795 800
 Lys Gly Ile Ile Asp Ser Thr His Thr Glu Gln Arg Gln Val Val Ala
 805 810 815

Val Thr Gly Asp Gly Thr Asn Asp Gly Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp
820 825 830

Val Gly Phe Ala Met Gly Ile Ala Gly Thr Asp Val Ala Lys Glu Ala
835 840 845

Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp Asp Asn Phe Ser Ser Ile Val Lys Ala
850 855 860

Val Met Trp Gly Arg Asn Val Tyr Asp Ser Ile Ser Lys Phe Leu Gln
865 870 875 880

Phe Gln Leu Thr Val Asn Val Val Ala Val Ile Val Ala Phe Thr Gly
885 890 895

Ala Cys Ile Thr Gln Asp Ser Pro Leu Lys Ala Val Gln Met Leu Trp
900 905 910

Val Asn Leu Ile Met Asp Thr Phe Ala Ser Leu Ala Leu Ala Thr Glu
915 920 925

Pro Pro Thr Glu Thr Leu Leu Leu Arg Lys Pro Tyr Gly Arg Asn Lys
930 935 940

Pro Leu Ile Ser Arg Thr Met Met Lys Asn Ile Leu Gly His Ala Val
945 950 955 960

Tyr Gln Leu Ala Leu Ile Phe Thr Leu Leu Phe Val Gly Glu Lys Met
965 970 975

Phe Gln Ile Asp Ser Gly Arg Asn Ala Pro Leu His Ser Pro Pro Ser
980 985 990

Glu His Tyr Thr Ile Ile Phe Asn Thr Phe Val Met Met Gln Leu Phe
995 1000 1005

Asn Glu Ile Asn Ala Arg Lys Ile His Gly Glu Arg Asn Val Phe
1010 1015 1020

Asp Gly Ile Phe Arg Asn Pro Ile Phe Cys Thr Ile Val Leu Gly
1025 1030 1035

Thr Phe Ala Ile Gln Ile Val Ile Val Gln Phe Gly Gly Lys Pro
1040 1045 1050

Phe Ser Cys Ser Pro Leu Gln Leu Asp Gln Trp Met Trp Cys Ile

1055	1060	1065
Phe Ile Gly Leu Gly Glu Leu	Val Trp Gly Gln Val	Ile Ala Thr
1070	1075	1080
Ile Pro Thr Ser Arg Leu Lys	Phe Leu Lys Glu Ala	Gly Arg Leu
1085	1090	1095
Thr Gln Lys Glu Glu Ile Pro	Glu Glu Glu Leu Asn	Glu Asp Val
1100	1105	1110
Glu Glu Ile Asp His Ala Glu	Arg Glu Leu Arg Arg	Gly Gln Ile
1115	1120	1125
Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn	Arg Ile Gln Thr Gln	Ile Glu Val
1130	1135	1140
Val Asn Thr Phe Lys Ser Gly	Ala Ser Phe Gln Gly	Ala Leu Arg
1145	1150	1155
Arg Gln Ser Ser Val Thr Ser	Gln Ser Gln Asp Ile	Arg Val Val
1160	1165	1170
Lys Ala Phe Arg Ser Ser Leu	Tyr Glu Gly Leu Glu	Lys Pro Glu
1175	1180	1185
Ser Arg Thr Ser Ile His Asn	Phe Met Ala His Pro	Glu Phe Arg
1190	1195	1200
Ile Glu Asp Ser Gln Pro His	Ile Pro Leu Ile Asp	Asp Thr Asp
1205	1210	1215
Leu Glu Glu Asp Ala Ala Leu	Lys Gln Asn Ser Ser	Pro Pro Ser
1220	1225	1230
Ser Leu Asn Lys Asn Asn Ser	Ala Ile Asp Ser Gly	Ile Asn Leu
1235	1240	1245
Thr Thr Asp Thr Ser Lys Ser	Ala Thr Ser Ser Ser	Pro Gly Ser
1250	1255	1260
Pro Ile His Ser Leu Glu Thr	Ser Leu	
1265	1270	
<210> 31		
<211> 874		
<212> PRT		

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Gly Asp Met Ala Asn Ser Ser Ile Glu Phe His Pro Lys Pro Gln

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

20 25 30
Glu Leu Arg Thr Leu Met Glu Leu Arg Gly Ala Glu Ala Leu Gln Lys

35 40 45
Ile Glu Glu Ala Tyr Gly Asp Val Ser Gly Leu Cys Arg Arg Leu Lys

50 55 60
Thr Ser Pro Thr Glu Gly Leu Ala Asp Asn Thr Asn Asp Leu Glu Lys

65 70 75 80
Arg Arg Gln Ile Tyr Gly Gln Asn Phe Ile Pro Pro Lys Gln Pro Lys

85 90 95
Thr Phe Leu Gln Leu Val Trp Glu Ala Leu Gln Asp Val Thr Leu Ile

100 105 110
Ile Leu Glu Val Ala Ala Ile Val Ser Leu Gly Leu Ser Phe Tyr Ala

115 120 125
Pro Pro Gly Glu Glu Ser Glu Ala Cys Gly Asn Val Ser Gly Gly Ala

130 135 140
Glu Asp Glu Gly Glu Ala Glu Ala Gly Trp Ile Glu Gly Ala Ala Ile

145 150 155 160
Leu Leu Ser Val Ile Cys Val Val Leu Val Thr Ala Phe Asn Asp Trp

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

180 185 190
Gln Lys Phe Thr Val Ile Arg Asn Gly Gln Leu Leu Gln Val Pro Val

195 200 205
Ala Ala Leu Val Val Gly Asp Ile Ala Gln Val Lys Tyr Gly Asp Leu

210 215 220
Leu Pro Ala Asp Gly Val Leu Ile Gln Ala Asn Asp Leu Lys Ile Asp

225 230 235 240
 Glu Ser Ser Leu Thr Gly Glu Ser Asp His Val Arg Lys Ser Ala Asp
 245 250 255
 Lys Asp Pro Met Leu Leu Ser Gly Thr His Val Met Glu Gly Ser Gly

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

 325 330 335
 Ala Glu Gly Gly Glu Met Glu Glu Arg Glu Lys Lys Lys Ala Asn Ala
 340 345 350
 Pro Lys Lys Glu Lys Ser Val Leu Gln Gly Lys Leu Thr Lys Leu Ala
 355 360 365
 Val Gln Ile Gly Lys Ala Gly Leu Val Met Ser Ala Ile Thr Val Ile
 370 375 380
 Ile Leu Val Leu Tyr Phe Val Ile Glu Thr Phe Val Val Glu Gly Arg

 385 390 395 400
 Thr Trp Leu Ala Glu Cys Thr Pro Val Tyr Val Gln Tyr Phe Val Lys
 405 410 415
 Phe Phe Ile Ile Gly Val Thr Val Leu Val Val Ala Val Pro Glu Gly
 420 425 430
 Leu Pro Leu Ala Val Thr Ile Ser Leu Ala Tyr Ser Val Lys Lys Met
 435 440 445
 Met Lys Asp Asn Asn Leu Val Arg His Leu Asp Ala Cys Glu Thr Met

 450 455 460
 Gly Asn Ala Thr Ala Ile Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr
 465 470 475 480

Asn Arg Met Thr Val Val Gln Ser Tyr Leu Gly Asp Thr His Tyr Lys
 485 490 495
 Glu Ile Pro Ala Pro Ser Ala Leu Thr Pro Lys Ile Leu Asp Leu Leu
 500 505 510
 Val His Ala Ile Ser Ile Asn Ser Ala Tyr Thr Thr Lys Ile Leu Pro
 515 520 525
 Pro Glu Lys Glu Gly Ala Leu Pro Arg Gln Val Gly Asn Lys Thr Glu
 530 535 540
 Cys Ala Leu Leu Gly Phe Val Leu Asp Leu Lys Arg Asp Phe Gln Pro
 545 550 555 560
 Val Arg Glu Gln Ile Pro Glu Asp Lys Leu Tyr Lys Val Tyr Thr Phe
 565 570 575
 Asn Ser Val Arg Lys Ser Met Ser Thr Val Ile Arg Met Pro Asp Gly
 580 585 590
 Gly Phe Arg Leu Phe Ser Lys Gly Ala Ser Glu Ile Leu Leu Lys Lys
 595 600 605
 Cys Thr Asn Ile Leu Asn Ser Asn Gly Glu Leu Arg Gly Phe Arg Pro
 610 615 620
 Arg Asp Arg Asp Asp Met Val Arg Lys Ile Ile Glu Pro Met Ala Cys
 625 630 635 640
 Asp Gly Leu Arg Thr Ile Cys Ile Ala Tyr Arg Asp Phe Ser Ala Gly
 645 650 655
 Gln Glu Pro Asp Trp Asp Asn Glu Asn Glu Val Val Gly Asp Leu Thr
 660 665 670
 Cys Ile Ala Val Val Gly Ile Glu Asp Pro Val Arg Pro Glu Val Pro
 675 680 685
 Glu Ala Ile Arg Lys Cys Gln Arg Ala Gly Ile Thr Val Arg Met Val
 690 695 700
 Thr Gly Asp Asn Ile Asn Thr Ala Arg Ala Ile Ala Ala Lys Cys Gly
 705 710 715 720
 Ile Ile Gln Pro Gly Glu Asp Phe Leu Cys Leu Glu Gly Lys Glu Phe

725 730 735
 Asn Arg Arg Ile Arg Asn Glu Lys Gly Glu Ile Glu Gln Glu Arg Leu
 740 745 750
 Asp Lys Val Trp Pro Lys Leu Arg Val Leu Ala Arg Ser Ser Pro Thr
 755 760 765
 Asp Lys His Thr Leu Val Lys Gly Ile Ile Asp Ser Thr Thr Gly Glu

 770 775 780
 Gln Arg Gln Val Val Ala Val Thr Gly Asp Gly Thr Asn Asp Gly Pro
 785 790 795 800
 Ala Leu Lys Lys Ala Asp Val Gly Phe Ala Met Gly Ile Ala Gly Thr
 805 810 815
 Asp Val Ala Lys Glu Ala Ser Asp Ile Ile Leu Thr Asp Asp Asn Phe
 820 825 830
 Thr Ser Ile Val Lys Ala Val Met Trp Gly Arg Asn Val Tyr Asp Ser

 835 840 845
 Ile Ser Lys Phe Leu Gln Phe Gln Leu Thr Val Asn Val Val Ala Val
 850 855 860
 Ile Val Ala Phe Thr Gly Ala Cys Ile Thr
 865 870
 <210> 32
 <211> 1241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Met Thr Asn Pro Ser Asp Arg Val Leu Pro Ala Asn Ser Met Ala Glu
 1 5 10 15
 Ser Arg Glu Gly Asp Phe Gly Cys Thr Val Met Glu Leu Arg Lys Leu

 20 25 30
 Met Glu Leu Arg Ser Arg Asp Ala Leu Thr Gln Ile Asn Val His Tyr
 35 40 45
 Gly Gly Val Gln Asn Leu Cys Ser Arg Leu Lys Thr Ser Pro Val Glu
 50 55 60

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

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

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

 210 215 220
 Ile Leu Ile Gln Gly Asn Asp Leu Lys Ile Asp Glu Ser Ser Leu Thr
 225 230 235 240
 Gly Glu Ser Asp His Val Lys Lys Ser Leu Asp Lys Asp Pro Met Leu
 245 250 255
 Leu Ser Gly Thr His Val Met Glu Gly Ser Gly Arg Met Val Val Thr
 260 265 270
 Ala Val Gly Val Asn Ser Gln Thr Gly Ile Ile Leu Thr Leu Leu Gly

 275 280 285
 Val Asn Glu Asp Asp Glu Gly Glu Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys Gln
 290 295 300
 Gly Val Pro Glu Asn Arg Asn Lys Ala Lys Thr Gln Asp Gly Val Ala

305 310 315 320
 Leu Glu Ile Gln Pro Leu Asn Ser Gln Glu Gly Ile Asp Asn Glu Glu
 325 330 335
 Lys Asp Lys Lys Ala Val Lys Val Pro Lys Lys Glu Lys Ser Val Leu

 340 345 350
 Gln Gly Lys Leu Thr Arg Leu Ala Val Gln Ile Gly Lys Ala Gly Leu
 355 360 365
 Leu Met Ser Ala Leu Thr Val Phe Ile Leu Ile Leu Tyr Phe Val Ile
 370 375 380
 Asp Asn Phe Val Ile Asn Arg Arg Pro Trp Leu Pro Glu Cys Thr Pro
 385 390 395 400
 Ile Tyr Ile Gln Tyr Phe Val Lys Phe Phe Ile Ile Gly Ile Thr Val

 405 410 415
 Leu Val Val Ala Val Pro Glu Gly Leu Pro Leu Ala Val Thr Ile Ser
 420 425 430
 Leu Ala Tyr Ser Val Lys Lys Met Met Lys Asp Asn Asn Leu Val Arg
 435 440 445
 His Leu Asp Ala Cys Glu Thr Met Gly Asn Ala Thr Ala Ile Cys Ser
 450 455 460
 Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Met Asn Arg Met Thr Val Val Gln Ala

 465 470 475 480
 Tyr Ile Gly Gly Ile His Tyr Arg Gln Ile Pro Ser Pro Asp Val Phe
 485 490 495
 Leu Pro Lys Val Leu Asp Leu Ile Val Asn Gly Ile Ser Ile Asn Ser
 500 505 510
 Ala Tyr Thr Ser Lys Ile Leu Pro Pro Glu Lys Glu Gly Gly Leu Pro
 515 520 525
 Arg Gln Val Gly Asn Lys Thr Glu Cys Ala Leu Leu Gly Phe Val Thr

 530 535 540
 Asp Leu Lys Gln Asp Tyr Gln Ala Val Arg Asn Glu Val Pro Glu Glu
 545 550 555 560

Lys Leu Tyr Lys Val Tyr Thr Phe Asn Ser Val Arg Lys Ser Met Ser
 565 570 575
 Thr Val Ile Arg Asn Pro Asn Gly Gly Phe Arg Met Tyr Ser Lys Gly
 580 585 590
 Ala Ser Glu Ile Ile Leu Arg Lys Cys Asn Arg Ile Leu Asp Arg Lys
 595 600 605
 Gly Glu Ala Val Pro Phe Lys Asn Lys Asp Arg Asp Asp Met Val Arg
 610 615 620
 Thr Val Ile Glu Pro Met Ala Cys Asp Gly Leu Arg Thr Ile Cys Ile
 625 630 635 640
 Ala Tyr Arg Asp Phe Asp Asp Thr Glu Pro Ser Trp Asp Asn Glu Asn
 645 650 655
 Glu Ile Leu Thr Glu Leu Thr Cys Ile Ala Val Val Gly Ile Glu Asp
 660 665 670
 Pro Val Arg Pro Glu Val Pro Asp Ala Ile Ala Lys Cys Lys Gln Ala
 675 680 685
 Gly Ile Thr Val Arg Met Val Thr Gly Asp Asn Ile Asn Thr Ala Arg
 690 695 700
 Ala Ile Ala Thr Lys Cys Gly Ile Leu Thr Pro Gly Asp Asp Phe Leu
 705 710 715 720
 Cys Leu Glu Gly Lys Glu Phe Asn Arg Leu Ile Arg Asn Glu Lys Gly
 725 730 735
 Glu Val Glu Gln Glu Lys Leu Asp Lys Ile Trp Pro Lys Leu Arg Val
 740 745 750
 Leu Ala Arg Ser Ser Pro Thr Asp Lys His Thr Leu Val Lys Gly Ile
 755 760 765
 Ile Asp Ser Thr Val Gly Glu His Arg Gln Val Val Ala Val Thr Gly
 770 775 780
 Asp Gly Thr Asn Asp Gly Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Val Gly Phe
 785 790 795 800
 Ala Met Gly Ile Ala Gly Thr Asp Val Ala Lys Glu Ala Ser Asp Ile

805 810 815
 Ile Leu Thr Asp Asp Asn Phe Thr Ser Ile Val Lys Ala Val Met Trp
 820 825 830
 Gly Arg Asn Val Tyr Asp Ser Ile Ser Lys Phe Leu Gln Phe Gln Leu
 835 840 845
 Thr Val Asn Val Val Ala Val Ile Val Ala Phe Thr Gly Ala Cys Ile

 850 855 860
 Thr Gln Asp Ser Pro Leu Lys Ala Val Gln Met Leu Trp Val Asn Leu
 865 870 875 880
 Ile Met Asp Thr Phe Ala Ser Leu Ala Leu Ala Thr Glu Pro Pro Thr
 885 890 895
 Glu Ser Leu Leu Lys Arg Arg Pro Tyr Gly Arg Asn Lys Pro Leu Ile
 900 905 910
 Ser Arg Thr Met Met Lys Asn Ile Leu Gly His Ala Phe Tyr Gln Leu

 915 920 925
 Ile Val Ile Phe Ile Leu Val Phe Ala Gly Glu Lys Phe Phe Asp Ile
 930 935 940
 Asp Ser Gly Arg Lys Ala Pro Leu His Ser Pro Pro Ser Gln His Tyr
 945 950 955 960
 Thr Ile Val Phe Asn Thr Phe Val Leu Met Gln Leu Phe Asn Glu Ile
 965 970 975
 Asn Ser Arg Lys Ile His Gly Glu Lys Asn Val Phe Ser Gly Ile Tyr

 980 985 990
 Arg Asn Ile Ile Phe Cys Ser Val Val Leu Gly Thr Phe Ile Cys Gln
 995 1000 1005
 Ile Phe Ile Val Glu Phe Gly Gly Lys Pro Phe Ser Cys Thr Ser
 1010 1015 1020
 Leu Ser Leu Ser Gln Trp Leu Trp Cys Leu Phe Ile Gly Ile Gly
 1025 1030 1035
 Glu Leu Leu Trp Gly Gln Phe Ile Ser Ala Ile Pro Thr Arg Ser

 1040 1045 1050

Leu Lys Phe Leu Lys Glu Ala Gly His Gly Thr Thr Lys Glu Glu
 1055 1060 1065
 Ile Thr Lys Asp Ala Glu Gly Leu Asp Glu Ile Asp His Ala Glu
 1070 1075 1080
 Met Glu Leu Arg Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn
 1085 1090 1095
 Arg Ile Gln Thr Gln Ile Asp Val Ile Asn Thr Phe Gln Thr Gly

 1100 1105 1110
 Ala Ser Phe Lys Gly Val Leu Arg Arg Gln Asn Met Gly Gln His
 1115 1120 1125
 Leu Asp Val Lys Leu Val Pro Ser Ser Ser Tyr Ile Lys Val Val
 1130 1135 1140
 Lys Ala Phe His Ser Ser Leu His Glu Ser Ile Gln Lys Pro Tyr
 1145 1150 1155
 Asn Gln Lys Ser Ile His Ser Phe Met Thr His Pro Glu Phe Ala

 1160 1165 1170
 Ile Glu Glu Glu Leu Pro Arg Thr Pro Leu Leu Asp Glu Glu Glu
 1175 1180 1185
 Glu Glu Asn Pro Asp Lys Ala Ser Lys Phe Gly Thr Arg Val Leu
 1190 1195 1200
 Leu Leu Asp Gly Glu Val Thr Pro Tyr Ala Asn Thr Asn Asn Asn
 1205 1210 1215
 Ala Val Asp Cys Asn Gln Val Gln Leu Pro Gln Ser Asp Ser Ser

 1220 1225 1230
 Leu Gln Ser Leu Glu Thr Ser Val
 1235 1240
 <210> 33
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr Pro Ser Val Ile

1 5 10 15
 Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr Val Glu Gly Ala
 20 25 30
 Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe Ala Val

 35 40 45
 His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp
 50 55 60
 Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val His Gly
 85 90 95
 Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr Pro Trp

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

 165 170 175
 Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met Glu Met
 180 185 190
 Asp

<210> 34

<211> 1021

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Ala Gly Ile Ser Tyr Val Ala Ser Phe Phe Leu Leu Leu Thr Lys
 1 5 10 15

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

Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Ser Ile Gly Cys Asn Val Thr Gly His
 35 40 45

Gln Gly Pro Ser Glu Gln His Phe Gln Trp Ser Val Tyr Leu Pro Thr
 50 55 60

Asn Pro Thr Gln Glu Val Gln Ile Ile Ser Thr Lys Asp Ala Ala Phe
 65 70 75 80

Ser Tyr Ala Val Tyr Thr Gln Arg Val Arg Ser Gly Asp Val Tyr Val
 85 90 95

Glu Arg Val Gln Gly Asn Ser Val Leu Leu His Ile Ser Lys Leu Gln
 100 105 110

Met Lys Asp Ala Gly Glu Tyr Glu Cys His Thr Pro Asn Thr Asp Glu
 115 120 125

Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ser Ala Lys Thr Asn Leu Ile Val Ile Pro
 130 135 140

Asp Thr Leu Ser Ala Thr Met Ser Ser Gln Thr Leu Gly Lys Glu Glu
 145 150 155 160

Gly Glu Pro Leu Ala Leu Thr Cys Glu Ala Ser Lys Ala Thr Ala Gln
 165 170 175

His Thr His Leu Ser Val Thr Trp Tyr Leu Thr Gln Asp Gly Gly Gly
 180 185 190

Ser Gln Ala Thr Glu Ile Ile Ser Leu Ser Lys Asp Phe Ile Leu Val
 195 200 205

Pro Gly Pro Leu Tyr Thr Glu Arg Phe Ala Ala Ser Asp Val Gln Leu
 210 215 220

Asn Lys Leu Gly Pro Thr Thr Phe Arg Leu Ser Ile Glu Arg Leu Gln
 225 230 235 240

Ser Ser Asp Gln Gly Gln Leu Phe Cys Glu Ala Thr Glu Trp Ile Gln
 245 250 255

Asp Pro Asp Glu Thr Trp Met Phe Ile Thr Lys Lys Gln Thr Asp Gln

260	265	270
Thr Thr Leu Arg Ile Gln Pro Ala Val Lys Asp Phe Gln Val Asn Ile		
275	280	285
Thr Ala Asp Ser Leu Phe Ala Glu Gly Lys Pro Leu Glu Leu Val Cys		
290	295	300
Leu Val Val Ser Ser Gly Arg Asp Pro Gln Leu Gln Gly Ile Trp Phe		
305	310	315
Phe Asn Gly Thr Glu Ile Ala His Ile Asp Ala Gly Gly Val Leu Gly		
325	330	335
Leu Lys Asn Asp Tyr Lys Glu Arg Ala Ser Gln Gly Glu Leu Gln Val		
340	345	350
Ser Lys Leu Gly Pro Lys Ala Phe Ser Leu Lys Ile Phe Ser Leu Gly		
355	360	365
Pro Glu Asp Glu Gly Ala Tyr Arg Cys Val Val Ala Glu Val Met Lys		
370	375	380
Thr Arg Thr Gly Ser Trp Gln Val Leu Gln Arg Lys Gln Ser Pro Asp		
385	390	395
Ser His Val His Leu Arg Lys Pro Ala Ala Arg Ser Val Val Met Ser		
405	410	415
Thr Lys Asn Lys Gln Gln Val Val Trp Glu Gly Glu Thr Leu Ala Phe		
420	425	430
Leu Cys Lys Ala Gly Gly Ala Glu Ser Pro Leu Ser Val Ser Trp Trp		
435	440	445
His Ile Pro Arg Asp Gln Thr Gln Pro Glu Phe Val Ala Gly Met Gly		
450	455	460
Gln Asp Gly Ile Val Gln Leu Gly Ala Ser Tyr Gly Val Pro Ser Tyr		
465	470	475
His Gly Asn Thr Arg Leu Glu Lys Met Asp Trp Ala Thr Phe Gln Leu		
485	490	495
Glu Ile Thr Phe Thr Ala Ile Thr Asp Ser Gly Thr Tyr Glu Cys Arg		
500	505	510

Val Ser Glu Lys Ser Arg Asn Gln Ala Arg Asp Leu Ser Trp Thr Gln
515 520 525

Lys Ile Ser Val Thr Val Lys Ser Leu Glu Ser Ser Leu Gln Val Ser
530 535 540

Leu Met Ser Arg Gln Pro Gln Val Met Leu Thr Asn Thr Phe Asp Leu
545 550 555 560

Ser Cys Val Val Arg Ala Gly Tyr Ser Asp Leu Lys Val Pro Leu Thr
565 570 575

Val Thr Trp Gln Phe Gln Pro Ala Ser Ser His Ile Phe His Gln Leu
580 585 590

Ile Arg Ile Thr His Asn Gly Thr Ile Glu Trp Gly Asn Phe Leu Ser
595 600 605

Arg Phe Gln Lys Lys Thr Lys Val Ser Gln Ser Leu Phe Arg Ser Gln
610 615 620

Leu Leu Val His Asp Ala Thr Glu Glu Glu Thr Gly Val Tyr Gln Cys
625 630 635 640

Glu Val Glu Val Tyr Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Asn Asn Arg Pro Pro
645 650 655

Arg Ala Ser Ala Ile Ser His Pro Leu Arg Ile Ala Val Thr Leu Pro
660 665 670

Glu Ser Lys Leu Lys Val Asn Ser Arg Ser Gln Val Gln Glu Leu Ser
675 680 685

Ile Asn Ser Asn Thr Asp Ile Glu Cys Ser Ile Leu Ser Arg Ser Asn
690 695 700

Gly Asn Leu Gln Leu Ala Ile Ile Trp Tyr Phe Ser Pro Val Ser Thr
705 710 715 720

Asn Ala Ser Trp Leu Lys Ile Leu Glu Met Asp Gln Thr Asn Val Ile
725 730 735

Lys Thr Gly Asp Glu Phe His Thr Pro Gln Arg Lys Gln Lys Phe His
740 745 750

Thr Glu Lys Val Ser Gln Asp Leu Phe Gln Leu His Ile Leu Asn Val

755	760	765	
Glu Asp Ser Asp Arg Gly Lys Tyr His Cys Ala Val Glu Glu Trp Leu			
770	775	780	
Leu Ser Thr Asn Gly Thr Trp His Lys Leu Gly Glu Lys Lys Ser Gly			
785	790	795	800
Leu Thr Glu Leu Lys Leu Lys Pro Thr Gly Ser Lys Val Arg Val Ser			
805	810	815	
Lys Val Tyr Trp Thr Glu Asn Val Thr Glu His Arg Glu Val Ala Ile			
820	825	830	
Arg Cys Ser Leu Glu Ser Val Gly Ser Ser Ala Thr Leu Tyr Ser Val			
835	840	845	
Met Trp Tyr Trp Asn Arg Glu Asn Ser Gly Ser Lys Leu Leu Val His			
850	855	860	
Leu Gln His Asp Gly Leu Leu Glu Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Arg Arg			
865	870	875	880
His Leu His Cys Tyr Arg Ser Ser Ser Thr Asp Phe Val Leu Lys Leu			
885	890	895	
His Gln Val Glu Met Glu Asp Ala Gly Met Tyr Trp Cys Arg Val Ala			
900	905	910	
Glu Trp Gln Leu His Gly His Pro Ser Lys Trp Ile Asn Gln Ala Ser			
915	920	925	
Asp Glu Ser Gln Arg Met Val Leu Thr Val Leu Pro Ser Glu Pro Thr			
930	935	940	
Leu Pro Ser Arg Ile Cys Ser Ser Ala Pro Leu Leu Tyr Phe Leu Phe			
945	950	955	960
Ile Cys Pro Phe Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ser Leu Leu Cys			
965	970	975	
Leu Tyr Trp Lys Ala Arg Lys Leu Ser Thr Leu Arg Ser Asn Thr Arg			
980	985	990	
Lys Glu Lys Ala Leu Trp Val Asp Leu Lys Glu Ala Gly Gly Val Thr			
995	1000	1005	

Thr Asn Arg Arg Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Gly Asn

1010

1015

1020

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Gly Ile Ser Tyr Val Ala Ser Phe Phe Leu Leu Leu Thr Lys

1

5

10

15

Leu Ser Ile Gly

20

<210> 36

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 36

cgttggcagt ccgcctaac

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 37

catagtcact gacgttcag

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 38
 ttgtggagct tgcaagcacc 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 39
 gttctttatg tggagctcca 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 40
 tatcccttgc tgatcggcgt 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 41
 gctgcagtac ccgatgagac 20

<210> 42
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 42
 Glu His Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu Ile Asp Phe Gln

20 25 30

Thr Ser Gly Pro Ile Phe

35

<210> 43

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 43

Glu His Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Ile Glu Ile Asp Phe Gln Thr Ser Gly Pro

20 25 30

Ile Phe

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 44

Glu His Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe

20 25 30

<210> 45

<211> 26

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Glu His Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ile Phe

20 25

<210> 46

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 46

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

1 5 10 15

Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys

20 25 30

Asn Glu Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr

35 40