



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월21일

(11) 등록번호 10-1708730

(24) 등록일자 2017년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/505 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) **A61K 38/20** (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01) **A61K 38/27** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01) **C07K 14/555** (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01) **C07K 14/59** (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/505 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7022989(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년02월05일
심사청구일자 2016년09월22일
(85) 번역문제출일자 2016년08월23일
(65) 공개번호 10-2016-0103176
(43) 공개일자 2016년08월31일
(62) 원출원 특허 10-2016-7010991
원출원일자(국제) 2007년02월05일
심사청구일자 2016년04월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/003014
(87) 국제공개번호 WO 2007/094985
국제공개일자 2007년08월23일
(30) 우선권주장
60/764,761 2006년02월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US05792460 A*
US05759818 A
US06238890 B1
US20030216313 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
옵코 바이오로직스 엘티디.
이스라엘 74140 네스 지오나 세컨드 플로어 골다
메이어 스트리트 7
(72) 발명자
페어스 푸어드
이스라엘 25155 아워피시 빌리지 피.오. 박스 423
피마 우디 이얄
이스라엘 84833 비어-쉐바 알벡 스트리트 30
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

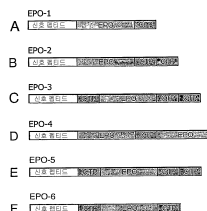
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **장기 작용 폴리펩티드 및 그의 생산 및 투여 방법**

(57) 요약

관심의 대상인 펩티드에 부착된 적어도 2개의 융모막 고나도트로핀 카복시-말단 펩티드(CTP) 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 개시된다. 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약제학적 조성물 및 그의 사용 방법 또한 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1816 (2013.01)
A61K 38/20 (2013.01)
A61K 38/24 (2013.01)
A61K 38/27 (2013.01)
C07K 14/52 (2013.01)
C07K 14/555 (2013.01)
C07K 14/59 (2013.01)
C07K 14/61 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드(chorionic gonadotrophin carboxy terminal peptide)가 아미노 말단에 부착되어 있고, 제2 및 제3 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드가 카복시 말단에 부착되어 있는, 관심의 대상인 펩티드로 이루어지는 분리된 폴리펩티드로서, 여기서 상기 관심의 대상인 펩티드는 성장 호르몬 펩티드이고, 상기 분리된 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드를 결여한 폴리펩티드의 성숙한 형태로 이루어지는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나의 아미노산 서열은 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타나는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리펩티드의 전구체 형태의 서열은 서열번호 39로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나는 글리코실화된 것인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 5

성장 장애를 가진 대상에서 성장 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 제1항에 따른 분리된 폴리펩티드의 치료적 유효량을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 6

성장 호르몬 결핍 장애를 가진 대상에서 성장 호르몬 결핍 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 제1항에 따른 분리된 폴리펩티드의 치료적 유효량을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 7

체중 증가가 필요한 대상에서 체중 증가를 위한 약학적 조성물로서, 제1항에 따른 분리된 폴리펩티드의 치료적 유효량을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 대상은 성장 호르몬 결핍인, 약학적 조성물.

청구항 9

성장 장애 또는 성장 호르몬 결핍 장애를 가진 대상에서, 성장 장애 또는 성장 호르몬 결핍 장애를 치료하기 위한 치료적 유효량의 분리된 폴리펩티드로서, 상기 분리된 폴리펩티드는, 제1 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드가 아미노 말단에 부착되어 있고, 제2 및 제3 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드가 카복시 말단에 부착되어 있는 관심의 대상인 펩티드로 이루어지고, 여기서 상기 관심의 대상인 펩티드는 성장 호르몬 펩티드인

고, 상기 분리된 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드를 결여한 폴리펩티드의 성숙한 형태로 이루어지는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 대상은 성장 호르몬 결핍인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나의 아미노산 서열은 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타나는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 폴리펩티드의 전구체 형태의 서열은 서열번호 39로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나는 글리코실화된 것인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 14

체중 증가가 필요한 대상에서, 체중 증가를 위한 치료적 유효량의 분리된 폴리펩티드로서, 상기 분리된 폴리펩티드는, 제1 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드가 아미노 말단에 부착되어 있고, 제2 및 제3 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드가 카복시 말단에 부착되어 있는 관심의 대상인 펩티드로 이루어지고, 여기서 상기 관심의 대상인 펩티드는 성장 호르몬 펩티드이고, 상기 분리된 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드를 결여한 폴리펩티드의 성숙한 형태로 이루어지는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 대상은 성장 호르몬 결핍인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나의 아미노산 서열은 서열번호 17 및 서열번호 18로 나타나는 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 분리된 폴리펩티드.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 폴리펩티드의 전구체 형태의 서열은 서열번호 39로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 용모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드 중 적어도 하나는 글리코실화된 것인, 분리된 폴리펩티드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관심의 대상인 펩티드에 부착된 융모막 고나도트로핀(chorionic gonadotrophin)의 적어도 2개의 카복시-말단 펩티드(CTP: carboxy-terminal peptide)를 포함하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 개시된다. 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약제학적 조성물 및 그의 사용 방법 또한 개시된다.

배경 기술

[0002] 폴리펩티드는 혈액, 간 또는 신장에서 변성되거나 효소적으로 분해되기 쉽다. 따라서, 통상적으로 폴리펩티드는 수 시간의 짧은 순환상 반감기를 가진다. 낮은 안정성으로 인해, 펩티드 약물은 보통 지속적인 빈도로 전달되어 활성 펩티드의 유효 혈장 농도를 유지할 수 있도록 한다. 더욱이, 펩티드 약물은 보통 주입(infusion)에 의해 투여되므로, 펩티드 약물의 빈번한 주사는 대상에게 상당한 불편을 야기한다. 따라서, 치료적 폴리펩티드의 높은 약리학적 효능을 유지하면서도 그의 반감기를 연장시킬 기술이 필요하다. 이러한 바람직한 펩티드 약물은, 대상에게 주사하였을 때 혈장 안정성이 증진되고, 활성이 높으며, 바람직하지 않은 면역 반응을 유도할 가능성이 낮아야 한다는 요건도 충족시켜야 한다.

[0003] 짧은 혈청 반감기와 같이 불리한 약물 동력학은, 다른 점에서는 유망한 많은 후보 약물의 약제학적 개발을 방해할 수 있다. 혈청 반감기는 분자의 실험상 특징으로서, 각각의 신규한 잠재적 약물에 대하여 실험적으로 결정되어야 한다. 예를 들어, 저분자량 폴리펩티드 약물에 있어서는, 요구되는 투약 처방 계획(dosing regimen)의 비용 또는 빈도로 인하여 신장 여과와 같은 생리적 정화(clearance) 기전이 약물의 치료적 수준 유지를 실행하기 어렵게 할 수 있다. 반대로, 약물 또는 그의 대사 산물이 독성 부작용을 가진 경우에는 긴 혈청 반감기가 바람직하지 못하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 관심의 대상인 펩티드에 부착된 적어도 2개의 융모막 고나도트로핀 카복시-말단 펩티드(CTP) 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 개시된다. 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약제학적 조성물 및 그의 사용 방법 또한 개시된다.

과제의 해결 수단

[0005] 발명의 요약

[0006] 한 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 적어도 2개의 융모막 고나도트로핀 카복시 말단 펩티드(CTP) 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0007] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 융모막 고나도트로핀 CTP 아미노산(AA: amino acid) 서열 및 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 두 번째 CTP 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0008] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 2개의 융모막 고나도트로핀 CTP 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0009] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 융모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 두 번째 및 세 번째 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0010] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 적어도 3개의 융모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0011] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 적어도 2개의 융모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

- [0012] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 관심의 대상인 폴리펩티드서열의 카복시 말단에 부착된 두 번째 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0013] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0014] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 두 번째 및 세 번째 CTP AA 서열을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0015] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 적어도 3개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0016] 다른 구체예에서, 본 발명은 대상에게 치료적 유효량의 CTP-hGH를 투여함으로써 성장 또는 체중-관련된 병태를 가진 대상을 치료하는 단계를 특징으로 하여, 대상 내에서 성장, 체중-관련된 또는 대사작용성 병태(metabolic condition)를 치료하는 방법을 제공한다. (hGH는 일반적으로 성장 장애 및 특히 성장 호르몬 결핍 관련 장애를 위한 것이다. 본 명세서의 실시예에서는 뇌하수체 적출 랫트(성장 호르몬이 분비되지 않는)에서 CTP-hGH 주사에 의한 성장 증진(growth gain)을 입증하였다.)
- [0017] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 적어도 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 부착하는 단계를 특징으로 하여, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 생물학적 반감기를 개선하는 방법을 제공한다.
- [0018] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 적어도 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 부착하는 단계를 특징으로 하여, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 방법을 제공한다.
- [0019] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드에 부착된 적어도 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0020] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 EPO 펩티드의 카복시 말단에 부착된 두 번째 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0021] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드의 카복시 말단에 부착된 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0022] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 EPO 펩티드의 카복시 말단에 부착된 두 번째 및 세 번째 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0023] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드에 부착된 적어도 3개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0024] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드에 부착된 적어도 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0025] 다른 구체예에서, 본 발명은 EPO 펩티드의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 EPO 펩티드의 카복시 말단에 부착된 두 번째 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0026] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드의 카복시 말단에 부착된 2개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0027] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착된 첫 번째 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 및 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된 두 번째 및 세 번째 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0028] 다른 구체예에서, 본 발명은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 적어도 3개의 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0029] 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 EPO-CTP를 대상에게 투여함으로써 빈혈증(anemia)을 가진 대상을 치료하는 단계를 특징으로 하여, 대상 내에서 빈혈증에 연계된 발병을 치료하거나 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 관심의 대상인 펩티드에 부착된 적어도 2개의 용모막 고나도트로핀 카복시-말단 펩티드(CTP) 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 개시된다. 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 약제학적 조성물 및 그의 사용 방법 또한 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a - 도 1f는 6개 EPO-CTP 작제물을 설명하는 도식이다.

도 1a는 서열 번호 1의 폴리펩티드의 도식이다.

도 1b는 서열 번호 2의 폴리펩티드의 도식이다.

도 1c는 서열 번호 3의 폴리펩티드의 도식이다.

도 1d는 서열 번호 4의 폴리펩티드의 도식이다.

도 1e는 서열 번호 5의 폴리펩티드의 도식이다.

도 1f는 서열 번호 6의 폴리펩티드의 도식이다.

도 2는 형질 감염된 DG44 세포로부터 EPO-CTP 변이체의 발현을 설명하는 사진이다. 형질 감염된 세포로부터의 최종 시험 시료는 "시료 제조"에 기술된 바와 같이 제조하여 SDS/PAGE 상에 전개하였다. 단백질은 웨스턴 블로팅으로 검출하였다.

도 3은 재조합 hEPO 유도체 및 EPO-3(서열 번호 3)의 생체내 생물활성을 설명하는 그래프이다. ICR 마우스(n=7/그룹)에 3 주 동안 EPO-3, rhEPO-WT (서열 번호 16), 레코몬(Recormon)(상업적 EPO)을 주 1회 IV 투여(15 μ g/kg)하거나 레코몬(5 μ g/kg)을 주 3회 투여하였다. 대조군 동물에는 PBS를 IV 주사하였다. 혈액 시료를 주 3회 수집하여 적혈구 용적을 수준을 검출하였다. 각 포인트는 그룹 평균 적혈구 용적율(%) $\pm$ SE를 의미한다.

도 4는 재조합 hEPO 유도체 및 EPO-1(서열 번호 1)의 생체내 생물활성을 설명하는 그래프이다. ICR 마우스(n=7/그룹)에 3 주 동안 EPO-1, rhEPO-WT (서열 번호 16), 레코몬을 주 1회 IV 투여(15 μ g/kg)하거나 레코몬(5 μ g/kg)을 주 3회 투여하였다. 대조군 동물에는 PBS를 IV 주사하였다. 혈액 시료를 주 3회 수집하여 적혈구 용적을 수준을 검출하였다. 각 포인트는 그룹 평균 적혈구 용적율(%) $\pm$ SE를 의미한다.

도 5는 재조합 hEPO 유도체 및 EPO-2(서열 번호 2)의 생체내 생물활성을 설명하는 그래프이다. ICR 마우스(n=7/그룹)에 3 주 동안 EPO-2(서열 번호 2), rhEPO-WT (서열 번호 16), 레코몬을 주 1회 IV 투여(15 μ g/kg)하거나 레코몬(5 μ g/kg)을 주 3회 투여하였다. 대조군 동물에는 PBS를 IV 주사하였다. 혈액 시료를 주 3회 수집하여 적혈구 용적을 수준을 검출하였다. 각 포인트는 그룹 평균 적혈구 용적율(%) $\pm$ SE를 의미한다.

도 6은 EPO-0(서열 번호 16), EPO-3(서열 번호 3) 및 아라네스프(Aranesp)의 단일 볼루스 투여에 따른 망상 적혈구 수준의 변화를 설명하는 시간 그래프이다.

도 7은 EPO-0(서열 번호 16), EPO-3(서열 번호 3) 및 아라네스프의 단일 볼루스 투여에 따른 헤모글로빈 수준의 변화(기준선으로부터의 변화로 표현됨)를 설명하는 시간 그래프이다.

도 8은 EPO-0(서열 번호 16), EPO-3(서열 번호 3) 및 아라네스프의 단일 볼루스 투여에 따른 적혈구 용적율 수준의 변화를 설명하는 시간 그래프이다.

도 9는 i.v. 주사후 EPO-0(서열 번호 16), EPO-3(서열 번호 3) 및 아라네스프의 혈청 농도 변화를 설명하는 그래프이다.

도 10은 MOD-4020 (서열 번호 36), MOD-4021 (서열 번호 37), MOD-4022 (서열 번호 38), MOD-4023 (서열 번호 39) 및 MOD-4024 (서열 번호 40)의 분자량 및 정체성(identity)을 설명하는 웨스턴 블로팅이다. 단클론 항-hGH 항체를 사용하여 PAGE SDS 겔을 블로팅 및 염색하였다. 사진은 상업적 hGH 및 야생형 hGH와 같이 MOD-7020-4 변이체도 항 hGH 항체에 의해 인지됨을 나타낸다.

도 11은 본 발명의 GH-CTP 폴리펩티드 투여 후 하수체 적출 랫트(hypophysectomized rat)의 체중 증가를 설명하는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 발명의 상세한 설명

[0033] 한 구체예에서, 본 발명은 장기 작용 폴리펩티드 및 그의 제조 및 사용 방법을 기술한다. 한 구체예에서, 장기 작용 폴리펩티드는 인간 융모막 고나도트로핀(hCG: human Chorionic Gonadotropin)의 카복시 말단 펩티드(CTP)를 포함한다. 한 구체예에서, CTP는 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드의 분해에 대한 보호제로서 작용한다. 한 구체예에서, CTP는 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드의 순환상 반감기를 연장시킨다. 한 구체예에서, CTP는 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드의 유효성(potency)을 증진한다.

[0034] 다른 구체예에서, "CTP 펩티드", "카복시 말단 펩티드" 및 "CTP 서열"은 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 다른 구체예에서, 카복시 말단 펩티드는 전체-길이 CTP이다. 다른 구체예에서, 카복시 말단 펩티드는 절단된(truncated) CTP이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

[0035] 다른 구체예에서, "EPO 펩티드" 및 "EPO 서열"은 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 다른 구체예에서, EPO 펩티드는 EPO 단백질이다. 다른 구체예에서, 카복시 말단 펩티드는 절단된 EPO 단백질이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

[0036] 다른 구체예에서, "신호 서열(signal sequence)" 및 "신호 펩티드(signal peptide)"는 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드에 관련하여 "서열"은 코딩(coding) 부분을 지칭할 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

[0037] 다른 구체예에서, "관심의 대상인 펩티드" 및 "관심의 대상인 폴리펩티드 서열"은 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 펩티드는 전체-길이 단백질이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 펩티드는 단백질 단편이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

[0038] 한 구체예에서는, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 부착된 융모막 고나도트로핀의 적어도 2개의 카복시-말단 펩티드(CTP) 서열을 포함하며, 여기에서 적어도 2개의 CTP 서열의 첫 번째 CTP 서열은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착되고 적어도 2개의 CTP 서열의 두 번째 CTP 서열은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 카복시 말단에 부착된, 폴리펩티드가 제공된다. 다른 구체예에서, 카복시-말단 펩티드(CTP) 서열은 인간 융모막 고나도트로핀의 서열이다.

[0039] 다른 구체예에서, 카복시-말단 펩티드(CTP)는 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 연결부(linker)를 통해 부착된다. 다른 구체예에서, CTP 서열을 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 연결하는 연결부는 공유결합이다. 다른 구체예에서, CTP 서열을 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 연결하는 연결부는 펩티드 결합이다. 다른 구체예에서, CTP 서열을 관심의 대상인 폴리펩티드 서열에 연결하는 연결부는 치환된 펩티드 결합이다.

[0040] 다른 구체예에서, 어구 "관심의 대상인 폴리펩티드 서열"은 임의의 폴리펩티드 서열, 예를 들어 생물학적 활성을 포함하는 것을 지칭한다. 다른 구체예에서, 펩티드는 글리코실화된 것이다. 다른 구체예에서, 펩티드는 글리코실화되지 않은 것이다. 순환상 반감기의 연장에 의해 개선되는 폴리펩티드의 예는 에리트로포이에틴(EPO: erythropoietin), 인터페론, 인간 성장 호르몬(hGH: human growth hormone) 및 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1: glucagon-like peptide-1)을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0041] 다른 구체예에서, 인간 융모막 고나도트로핀(hCG)의 카복시 말단 펩티드(CTP)는 단백질에 융합된다. 다른 구체예에서, 인간 융모막 고나도트로핀(hCG)의 카복시 말단 펩티드(CTP)는 당단백질에 융합된다. 다른 구체예에서, 인간 융모막 고나도트로핀(hCG)의 카복시 말단 펩티드(CTP)는 당단백질 호르몬에 융합된다. 다른 구체예에서, 인간 융모막 고나도트로핀(hCG)의 카복시 말단 펩티드(CTP)는 당단백질 호르몬으로부터 유래된 펩티드에 융합된다. 일부 구체예에서, 당단백질 호르몬은 EPO, FSH, 또는 TSH 및 그로부터 유래된 펩티드를 포함한다.

[0042] 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝 및 폴리펩티드의 카복시 말단 끝 양자 모두의 CTP 서열은 단백질의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝 및 폴리펩티드의 카복시 말단 끝 양자 모두의 CTP 서열은 부착된 단백질의 연장된 반감기를 제공한다.

[0043] 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 카복시 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 단백질의 분해에 대한 증진된 보호를 제

공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 카복시 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 연장된 반감기를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 카복시 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 증진된 활성을 제공한다.

[0044] 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 아미노 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 아미노 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 연장된 반감기를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 끝의 CTP 서열, 폴리펩티드의 카복시 말단 끝의 CTP 서열, 및 CTP 서열의 아미노 말단에 직렬로 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 증진된 활성을 제공한다.

[0045] 다른 구체예에서, 본 발명의 카복시 말단 펩티드(CTP) 펩티드는 서열 번호 17에 보이는 바와 같이 인간 용모막 고나도트로핀의 AA 112에서 위치 145까지의 아미노산(AA) 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 서열은 서열 번호 18에 보이는 바와 같이 인간 용모막 고나도트로핀의 AA 118에서 위치 145까지의 AA 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, CTP 서열은 또한 인간 용모막 고나도트로핀의 위치 112-118 사이의 임의의 위치에서 시작하여 위치 145에서 끝난다. 일부 구체예에서, CTP 서열 펩티드는 길이가 28, 29, 30, 31, 32, 33 또는 34 AA이며, CTP AA 서열의 위치 112, 113, 114, 115, 116, 117 또는 118에서 시작한다.

[0046] 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체(variant)로서, 이는 미국 특허 제5,712,122 호에 기술된 바와 같이 1-5개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체로서, 이는 1개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체로서, 이는 2개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체로서, 이는 3개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체로서, 이는 4개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, CTP 펩티드는 용모막 고나도트로핀 CTP의 변이체로서, 이는 5개의 보존성 AA 치환에 있어서 천연 CTP와 상이하다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 AA 서열은 천연 CTP AA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 70% 상동적(homologous)이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 AA 서열은 천연 CTP AA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 80% 상동적이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 AA 서열은 천연 CTP AA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 90% 상동적이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 AA 서열은 천연 CTP AA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 95% 상동적이다.

[0047] 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 70% 상동적이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 80% 상동적이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 90% 상동적이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대하여 적어도 95% 상동적이다.

[0048] 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 중 적어도 하나가 절단된 것이다. 다른 구체예에서, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열은 양자 모두 절단된 것이다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 중 2개가 절단된 것이다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 중 2개 이상이 절단된 것이다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 모두가 절단된 것이다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 10개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 11개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 12개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 13개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 14개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 15개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최초 16개 AA를 포함한다. 다른 구체예에서, 절단된 CTP는 서열 번호 43의 최종 14개 AA를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

[0049] 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 중 적어도 하나가 글리코실화된다. 다른 구체예에서, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열은 양자 모두 글리코실화된다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA

서열 중 2개가 글리코실화된다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 중 2개 이상이 글리코실화된다. 다른 구체예에서는, 용모막 고나도트로핀 CTP AA 서열 모두가 글리코실화된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 서열은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 서열은 2개의 글리코실화 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 서열은 3개의 글리코실화 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 CTP 서열은 4개의 글리코실화 부위를 포함한다.

[0050] 일부 구체예에서는, 본 발명의 교시에 따라 에리트로포이에틴(EPO)이 이용된다. 일부 구체예에서, 임의의 EPO 암호화 AA 서열은 EPO 서열이다. 일부 구체예에서, 임의의 EPO 암호화 핵산 서열은 EPO 서열이다. 일부 구체예에서, EPO 단백질의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP 서열의 부착은, 재조합 EPO 및 EPO와 CTP의 다른 조합에 비교할 때, 적혈구 생성 자극(도 3 - 도 5 및 실시예 4의 표 6)에 있어서의 유효성을 증가시킨다. TF-1 세포의 증식을 자극함에 있어서 3개 CTP 서열에 부착된 EPO가 야생형 EPO와 동일하게 효과적임을 입증하는 실시예 3의 표 4에서 증명되는 바와 같이, 일부 구체예에서, 3개의 CTP 서열에 부착된 EPO는 그의 수용체와의 결합에 영향을 미치지 않는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드는 서열 번호 3 및 서열 번호 6에 나타난다.

[0051] 한 구체예에서, "에리트로포이에틴"은 포유류 에리트로포이에틴을 의미한다. 한 구체예에서, "에리트로포이에틴은" 제뱅크 수납번호(GenBank Accession No.) AAA52400에 나타난 것과 같은 인간 에리트로포이에틴을 의미한다.

[0052] 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 또는 EPO 서열은 또한 상동체도 의미한다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI: National Center of Biotechnology Information)의 블라스트P(BlastP) 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 50% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 60% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 70% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 80% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 90% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 에리트로포이에틴 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 AAA52400에 나타난 에리트로포이에틴 서열에 대해 적어도 95% 상동적이다.

[0053] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 1에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 추가의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 1에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 2에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 3에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 4에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 5에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 6에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 16에 나타난, 빈혈증 치료를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나

가진, 서열 번호 22에 나타난, 줄기세포 이식생착의 개선을 위한 EPO 펩티드를 제공한다.

[0070] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 줄기세포 이식생착의 개선을 위한 EPO 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 줄기세포 이식생착의 개선을 위한 EPO 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 줄기세포 이식생착의 개선을 위한 EPO 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 암호화하는, 서열 번호 20에 나타난 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 줄기세포 이식생착의 개선을 위한 EPO 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP AA 펩티드를 암호화하는, 서열 번호 21에 나타난 핵산을 제공한다.

[0071] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 재생불량성 빈혈(aplastic anemia) 또는 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome)을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 1에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 추가의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 1에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 2에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 3에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 4에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 5에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 6에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 16에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 22에 나타난, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 제공한다.

[0072] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 암호화하는, 서열 번호 20에 나타난 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 재생불량성 빈혈 또는 골수이형성 증후군을 가진 환자의 생존을 증가를 위한 EPO 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP AA 펩티드를 암호화하는, 서열 번호 21에 나타난 핵산을 제공한다.

[0073] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 상동성은 결실(deletion), 삽입(insertion) 또는 치환(substitution) 변이체, 예를 들어 그의 AA 치환 및 그의 생물학적 활성 폴리펩티드 단편도 포함한다. 한 구체예에서 치환 변이체는 에리트로포이에틴 AA 서열의 위치 104의 글리신이 세린으로 치환된 것(서열 번호 22)을 포함한다.

[0074] 일부 구체예에서, 본 발명의 교시에 따라 인간 성장 호르몬(hGH)이 이용된다. 일부 구체예에서, hGH 단백질의

아미노 및 카복시 말단에서의 CTP 서열의 부착은 양자 모두 유효성을 증가시킨다(도 11). 일부 구체예에서, hGH 단백질의 아미노 및 카복시 말단에서의 CTP 서열의 부착은 양자 모두 생체내 활성의 장기 지속성을 유발한다. 한 구체예에서, 본 발명의 CTP-hGH 폴리펩티드는 서열 번호 39 - 서열 번호 41에 나타난다.

[0075] 한 구체예에서, 어구 "인간 성장 호르몬"(hGH)은, 제뱅크 수납번호 P01241(서열 번호 47)에 나타난 것과 같이 hGH 활성(즉, 성장 자극)을 보이는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0076] 한 구체예에서, "인간 성장 호르몬"(hGH)은, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 것과 같은, hGH 활성(즉, 성장 자극)을 보이는 폴리펩티드를 지칭한다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH는 또한 상동체를 지칭한다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 50% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 60% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 70% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 80% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 90% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 hGH AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 제뱅크 수납번호 P01241에 나타난 hGH 서열에 대해 적어도 95% 상동적이다.

[0077] 본 발명의 예시적 CTP-hGH 폴리펩티드는 서열 번호 39, 서열 번호 40 및 서열 번호 41에 나타난다.

[0078] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 23에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 36에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 37에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 38에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 39에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 40에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 41에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 42에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 44에 나타난, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다.

[0079] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 포함하는, 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 서열 번호 45의 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장 자극을 위한 hGH 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP AA 펩티드를 암호화하는 서열 번호 46의 핵산을 제공한다.

[0080] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 골 성장 자극을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 골 성장 자극을 위한 hGH 펩티드

- [0105] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 23에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 36에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 37에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 38에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 39에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 40에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 41에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 42에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 44에 나타난, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 제공한다.
- [0106] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 포함하는, REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드를 암호화하는 서열 번호 45의 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 REM 수면 회복을 위한 hGH 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP AA 펩티드를 암호화하는 서열 번호 46의 핵산을 제공한다.
- [0107] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 상동성은 결실, 삽입 또는 치환 변이체, 예를 들어 그의 AA 치환 및 그의 생물학적 활성 폴리펩티드 단편도 포함한다. 한 구체예에서 치환 변이체는 hGH의 위치 65의 글루타민이 발린으로 치환된 것(서열 번호 23)이다(Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83).
- [0108] 일부 구체예에서, 본 발명의 교시에 따라 인터페론이 이용된다. 일부 구체예에서, 인터페론 단백질의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP 서열의 부착은 유효성을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 인터페론 단백질의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP 서열의 부착은 생체내 활성의 장기 지속성을 유발한다.
- [0109] 한 구체예에서, "인터페론"은 포유류 인터페론 폴리펩티드 타입 I을 지칭한다. 한 구체예에서, "인터페론"은 포유류 인터페론 폴리펩티드 타입 II를 지칭한다. 일부 구체예에서, 당업자에게 공지된 추가의 적합한 인터페론 폴리펩티드가 이용된다. 일부 구체예에서, 인터페론은 알파-인터페론이다. 일부 구체예에서, 인터페론은 베타-인터페론이다. 일부 구체예에서, 인터페론은 감마-인터페론이다. 일부 구체예에서, 인터페론은 오메가-인터페론이다. 일부 구체예에서, 인터페론은 아종(subspecies) 인터페론이다. 한 구체예에서, 아종 인터페론(IFN)은 IFN- α 2a이다. 한 구체예에서, 아종 인터페론(IFN)은 IFN- α 2b이다. 한 구체예에서, 아종 인터페론(IFN)은 IFN- β 1a이다. 한 구체예에서, 인터페론(IFN) 아종은 IFN- β 1b이다.
- [0110] 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론은 인터페론 활성, 예를 들어 항바이러스 또는 항증식성 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 인터페론의 비한정적인 예의 제벡크 수납 번호를 하기 표 1에 열거한다.
- [0111] 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론은 또한 상동체를 지칭한다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 50% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 60% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 70% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 80% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초

기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 90% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 표 1에 열거된 인터페론 서열들에 대해 적어도 95% 상동적이다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 상동성은 결실, 삽입 또는 치환 변이체, 예를 들어 그의 AA 치환 및 그의 생물학적 활성 폴리펩티드 단편도 포함한다. 한 구체예에서는 인터페론 β 의 위치 17의 시스테인이 세린으로 치환된다(서열 번호 24).

[0112] 하기 표 1은 인터페론의 예를 각각의 NCBI 서열 번호와 함께 열거한다.

표 1

[0113]

인터페론 명칭	NCBI 서열 번호
interferon, α 1	NP_076918.1
interferon, α 10	NP_002162.1
interferon, α 13	NP_008831.2
interferon, α 14	NP_002163.1
interferon, α 16	NP_002164.1
interferon, α 17	NP_067091.1
interferon, α 2	NP_000596.2
interferon, α 21	NP_002166.1
interferon, α 4	NP_066546.1
interferon, α 5	NP_002160.1
interferon, α 6	NP_066282.1
interferon, α 7	NP_066401.2
interferon, α 8	NP_002161.2
interferon, β 1	NP_002167.1
interferon, ϵ 1	NP_795372.1
interferon, γ	NP_000610.2
interferon, ϵ	NP_064509.1
interferon, Ω 1	NP_002168.1

[0114]

다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 다발성 경화증의 치료 또는 저해를 위한 인터페론 베타 1 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 다발성 경화증의 치료 또는 저해를 위한 인터페론 베타 1 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 24에 나타난, 다발성 경화증의 치료 또는 저해를 위한 인터페론 베타 1 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 서열 번호 26의 신호 펩티드 및 서열 번호 26의 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 서열 번호 24의 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 24에 나타난, 다발성 경화증의 치료 또는 저해를 위한 인터페론 베타 1 펩티드를 제공한다.

[0115]

일부 구체예에서는, 본 발명의 교시에 따라 글루카곤-유사 펩티드-1이 이용된다. 일부 구체예에서, "글루카곤-유사 펩티드-1"의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP 서열의 부착은 유효성을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 펩티드의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP의 부착은 생체내 활성의 장기 지속성을 유발한다. 일부 구체예에서, 글루카곤-유사 펩티드의 아미노 및 카복시 말단 양자 모두에의 CTP의 부착은 생체내 활성의 장기 지속성을 유발한다.

[0116]

한 구체예에서, "글루카곤-유사 펩티드-1"(GLP-1)은 포유류 폴리펩티드를 지칭한다. 한 구체예에서, "글루카곤-유사 펩티드-1"(GLP-1)은 인간 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 구체예에서 GLP-1은, GLP-1 수용체에 결합하여 신호 전달 경로를 개시시킴으로써 인슐린 분비촉진 활성(insulinotropic activity)을 유발하는 능력을 가진 글루카곤 프리프로단백질(preproprotein)(젠뱅크 수납 번호 NP002045)로부터 절단된다. 한 구체예에서 "인슐린 분비촉진 활성"은, 상승된 글루코즈 수준에 반응하여 인슐린 분비를 자극함으로써 세포에 의한 글루코즈 흡수를 유발하고 혈장 글루코즈 수준을 감소시키는 능력을 의미한다. 일부 구체예에서, GLP-1 폴리펩티드는 원용에 의해 본 명세서에 포함된 미국 특허 제5,118,666호에 기술된 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0117]

한 구체예에서 "GLP-1"은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용

하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 서열에 나타난 것과 같은 폴리펩티드를 지칭한다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1은 또한 GLP-1 상동체를 지칭한다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 50% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 60% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 70% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 80% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 90% 상동적이다. 한 구체예에서, 본 발명의 GLP-1 AA 서열은, 초기값 변수를 사용하는 국립생물공학정보센터(NCBI)의 블라스트P 소프트웨어를 이용하여 결정된 바와 같이, 서열 번호 25에 나타난 GLP-1 서열에 대해 적어도 95% 상동적이다.

[0118] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 타입 II 당뇨병의 치료 또는 저해를 위한 GLP-1 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 2개의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 타입 II 당뇨병의 치료 또는 저해를 위한 GLP-1 펩티드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 서열 번호 25에 나타난, 타입 II 당뇨병의 치료 또는 저해를 위한 GLP-1 펩티드를 제공한다.

[0119] 한 구체예에서, 상동체는 결실, 삽입 또는 치환 변이체, 예를 들어 그의 AA 치환 및 그의 생물학적 활성 폴리펩티드 단편도 포함한다.

[0120] 한 구체예에서 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 EPO이다. 한 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 인테페론이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 hGH이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 GLP-1이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 인슐린이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 엔케팔린(enkephalin)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 ACTH이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 글루카곤이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 인슐린-유사 성장 인자(insulin-like growth factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 상피세포 성장 인자(epidermal growth factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 산성 또는 염기성 섬유아세포 성장 인자(acidic or basic fibroblast growth factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 파립구-CSF이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 대식세포-CSF이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 IL-2이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 IL-3이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 종양 괴사 인자이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 LHRH이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 LHRH 유사체이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 소마토스타틴이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 성장 호르몬 방출 인자(growth hormone releasing factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 엔도르핀이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 폐포 계면활성 단백질(alveolar surfactant protein)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 나트륨 이뇨 인자(natriuretic factor)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 부착 인자(adhesin)이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 안지오테닌이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 엔도스타틴이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 수용체 펩티드이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 수용체 결합 리간드이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 항체이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 항체 단편이다. 다른 구체예에서, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열은 임의의 변형된 형태를 포함하는 펩티드 또는 단백질이다.

[0121] 다른 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진 관심의 대상인 펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진 관심의 대상인 펩티드는 하기로부터 선택된 단백질을 포함한다

다: 인슐린, 알부테인/알부민, 액티바제 알티플라제/tPA(activase altiplate/tPA), 아데노신 데아미나제, 면역 글로불린, 글루코세레브로시다제, 류킨-사그라모스틴/GM-CSF(Leukine-sargramostim/GM-CSF), G-CSF, 베노글로 불린-S/IgG(Venoglobulin-S/IgG), 프로류킨 알데스류킨(Proleukin aldesleukin), DNase, 인자 VIII, 헬릭세이 트(Helixate), L-아스파라기나제(L-asparaginase), 윈로 SDF Rh I(WinRho SDF Rh I), 레타바제 레타플라제 /tPA(Retavase retaplast/tPA), 인자 IX, FSH, 글로불린, 피브리, 인터류킨-11, 베카플레르민 /PDGF(becaplermin/PDGF), 레피루딘/헤루딘(lepirudin/herudin), TNF, 티모글로불린(Thymoglobulin), 인자 VIIa, 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파 n-1, 인터페론 알파-N3, 인터페론 베타-1b, 인터페론 감마-1b, 인터류 킨-2, HGH, 또는 단클론 항체.

- [0122] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 당뇨병의 치료를 위한 인슐린을 제공한다.
- [0123] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 저혈량성 쇼크(hypovolemic shock), 혈액투석 또는 심폐 우회술(cardiopulmonary bypass)의 치료를 위한 알부민을 제공한다.
- [0124] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 급성 심근경색(acute myocardial infarction), 급성 대량 폐색전증(acute massive pulmonary embolism) 또는 허혈성 뇌졸중(전반에 걸친 변화)의 치료를 위한 액티바제- 알티플라제/tPA를 제공한다.
- [0125] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 중증 복합 면역결핍 질환(severe combined immunodeficiency disease)의 치료를 위한 아데노 신 데아미나제를 제공한다.
- [0126] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 이식 수혜자(transplant recipients)의 치료를 위한 면역 글로불린을 제공한다.
- [0127] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법이 제공하는 면역 글로불린은 CMV 면역 글로불린이다. 다른 구체예에서 본 발 명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 고셔병 (Gaucher disease)의 치료를 위한 글루코세레브로시다제를 제공한다.
- [0128] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 조혈 모세포(hematopoietic progenitor cell)의 자극을 위한 류킨-사그라모스틴/GM-CSF를 제 공한다.
- [0129] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 호중구 감소증(Neutropenia)의 치료를 위한 G-CSF를 제공한다. 다른 구체예에서 본 발명의 방 법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 면역결핍 질환 의 치료를 위한 베노글로불린-S/IgG를 제공한다.
- [0130] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 신장 암종(renal carcinoma) 또는 전이성 흑색종(metastatic melanoma)의 치료를 위한 프로류 킨-알데스류킨을 제공한다.
- [0131] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 낭포성 섬유증(Cystic fibrosis)의 치료를 위한 DNase를 제공한다.
- [0132] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, A형 혈우병(Hemophilia A)의 치료를 위한 인자 VIII를 제공한다.
- [0133] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, A형 혈우병의 치료를 위한 헬릭세이트를 제공한다.
- [0134] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia)의 치료를 위한 L-아스파라기나제를 제 공한다.
- [0135] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드 를 추가로 가진, Rh 동종면역(Rh isoimmunization) 및 면역 혈소판감소성 자반증(immune thrombocytopenic

purpura)의 치료를 위한 원로 SDF Rh IgG를 제공한다.

- [0136] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 급성 심근경색의 치료를 위한 레타바제 레타플라제/tPA를 제공한다.
- [0137] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, B형 혈우병의 치료를 위한 인자 IX를 제공한다.
- [0138] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, B형 혈우병의 치료를 위한 인자 IX를 제공한다.
- [0139] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 보조 생식(assisted reproduction) 과정에서 배란(ovulation)의 자극을 위한 FSH를 제공한다.
- [0140] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 호흡기 세포융합 바이러스 질환(respiratory syncytial virus disease)의 예방을 위한 글로불린을 제공한다.
- [0141] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 상처 관리 및 지혈을 위한 피브린을 제공한다. 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 화학요법-유도된 혈소판 감소증(chemotherapy-induced thrombocytopenia)을 위한 인터류킨-11을 제공한다.
- [0142] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 당뇨병성 족부궤양(diabetic foot ulcers)의 치료를 위한 베카플레트민/PDGF를 제공한다.
- [0143] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 헤파린-유도된 혈소판 감소증에서의 항응고를 위한 레피루딘/헤루딘을 제공한다.
- [0144] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 류머티즘성 관절염의 치료를 위한 가용성 TNF를 제공한다.
- [0145] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 장기이식 거부질환의 치료를 위한 티모글로불린을 제공한다.
- [0146] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 혈우병의 치료를 위한 인자 VIIa를 제공한다.
- [0147] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia) 및 AIDS-관련 카포시 육종(AIDS-related Kaposi's sarcoma)의 치료를 위한 인터페론 알파-2a를 제공한다.
- [0148] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 모발상 세포 백혈병, 생식기 사마귀(genital warts), AIDS-관련 카포시 육종, C형 간염, B형 간염, 악성 흑색종(malignant melanoma) 및 여포성 림프종(follicular lymphoma)의 치료를 위한 인터페론 알파-2b를 제공한다.
- [0149] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 생식기 사마귀의 치료를 위한 인터페론 알파-N3을 제공한다.
- [0150] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 만성 육아종 질환(chronic granulomatous disease)의 치료를 위한 인터페론 감마-1b를 제공한다.
- [0151] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, C형 간염 감염의 치료를 위한 인터페론 알파 n-1을 제공한다.
- [0152] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA

펩티드를 추가로 가진, 신장 암종 및 전이성 흑색종의 치료를 위한 인터류킨-2를 제공한다.

- [0153] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 다발성 경화증의 치료를 위한 인터페론 베타-1b를 제공한다.
- [0154] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 소모성 질환, AIDS, 악액질(cachexia) 또는 hGH 결핍증의 치료를 위한 hGH를 제공한다.
- [0155] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 장기 이식을 위한 OKT3 단클론 항체를 제공한다.
- [0156] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 관상동맥 중재술(coronary intervention) 및 혈관 성형술(angioplasty)에 의한 합병증의 예방을 위한 레오(Reo) 단클론 항체를 제공한다.
- [0157] 다른 구체예에서 본 발명의 방법은, N-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드 및 C-말단에 적어도 하나의 CTP AA 펩티드를 추가로 가진, 결장직장암(colorectal cancer), 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma), 신장 이식 거부, 전이성 유방암의 치료 또는 호흡기 세포융합 바이러스 질환의 예방을 위한 단클론 항체를 제공한다.
- [0158] 한 구체예에서, 본 발명은 수의학에 이용된다. 한 구체예에서 본 발명은, 인간의 반려로서 사육되거나(예를 들어, 개, 고양이, 말), 현저한 상업적 가치를 가지거나(예를 들어, 젖소, 육우, 경주 동물), 현저한 과학적 가치를 가지거나(예를 들어, 멸종 위기에 처한 동물의 포획 또는 야생 표본), 다른 가치를 가진 가축화된(domesticated) 포유류의 치료를 제공한다.
- [0159] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 항체 또는 폴리뉴클레오티드는 동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 햄스터, 기니아 피그, 돼지, 마이크로 돼지, 닭, 낙타, 염소, 말, 암소, 양, 개, 고양이, 비-인간 영장류 및 인간)에게 투여된다. 한 구체예에서, 상술된 응용은 광범위한 숙주에서 용도를 가진다. 일부 구체예에서, 이러한 숙주는, 인간, 쥐과, 토끼, 염소, 기니아 피그, 낙타, 말, 마우스, 랫트, 햄스터, 돼지, 마이크로 돼지, 닭, 염소, 암소, 양, 개, 고양이 또는 비-인간 영장류를 포함하며 이에 한정되지는 않는다.
- [0160] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 농경용 가축을 치료한다. 한 구체예에서, 농경용 가축은 돼지, 축우, 젖소, 말, 염소, 양, 닭, 칠면조, 거위, 오리 및 관련 종을 포함한다. 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 실험용 동물을 치료한다. 한 구체예에서, 실험용 동물은 랫트, 마우스, 기니아 피그, 토끼, 염소, 원숭이, 개, 고양이 등을 포함한다. 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 동물원의 동물을 치료한다. 한 구체예에서, 동물원의 동물은 동물원에 사육되는 모든 척추 동물을 포함한다. 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 수생 동물(aquatic animal)을 치료한다. 한 구체예에서, 수생 동물은 물고기, 뱀장어, 거북이, 물개, 펭귄, 상어, 고래 및 관련 종을 포함한다. 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 가축을 치료한다. 한 구체예에서, 가축은 임의의 애완동물, 예를 들어 고양이 및 개, 또는 인간에 의해 사육되는 동물, 예를 들어 말, 축우, 돼지, 염소, 토끼, 닭, 칠면조, 거위, 오리 등을 포함한다.
- [0161] 본 발명에 따라 용어 돼지는 돼지(pig), 새끼 돼지(piglet), 식용 돼지(hog), 어린 암돼지(gilt), 거세한 수돼지(barrow), 성숙한 수돼지(boar) 및 성숙한 암돼지(sow)를 포함한다. 다른 구체예에서, "축우"는 송아지(calf), 성숙한 암소(cow), 젖소(dairy cow), 출산 경험이 없는 암소(heifer), 거세된 수소(steer) 및 성숙한 수소(bull)를 지칭한다.
- [0162] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 소 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 인공적인 소 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 인공적인 소 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 AAA72262에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 인공적인 소 성장 호르몬은 당업계에서 공지된 임의의 다른 인공적인 소 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0163] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 양 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 양 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 NP_001009315에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 양 성장 호르몬은 당업계에서 공지된 임의의 다른 양 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0164] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 말 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 말 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 AAA21027에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 말 성장 호르몬은 당업계에서 공지된 임의의 다른 말 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

- [0165] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 닭 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 닭 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 CAA3561에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 닭 성장 호르몬은 당업계에 공지된 임의의 다른 닭 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0166] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 쥐과 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 쥐과 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 NP_032143에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 쥐과 성장 호르몬은 당업계에 공지된 임의의 다른 쥐과 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0167] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 틸라피아(tilapia) 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 틸라피아 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 CAA00818에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 틸라피아 성장 호르몬은 당업계에 공지된 임의의 다른 틸라피아 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0168] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 소 EPO가 사용된다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 인공적인 소 성장 호르몬이 사용된다. 한 구체예에서, 인공적인 소 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 NP_776334에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 소 EPO는 당업계에 공지된 임의의 다른 소 EPO이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0169] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 돼지 EPO가 사용된다. 한 구체예에서, 돼지 EPO는 NCBI 서열 번호 NP_999299에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 돼지 EPO는 당업계에 공지된 임의의 다른 돼지 EPO이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0170] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 양 EPO가 사용된다. 한 구체예에서, 양 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 NP_001019908에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 양 성장 호르몬은 당업계에 공지된 임의의 다른 양 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0171] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 쥐과 EPO가 사용된다. 한 구체예에서, 쥐과 성장 호르몬은 NCBI 서열 번호 CAA72707에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 쥐과 성장 호르몬은 당업계에 공지된 임의의 다른 쥐과 성장 호르몬이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0172] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 소 GLP-1이 사용된다. 한 구체예에서, 소 GLP-1은 NCBI 서열 번호 P01272에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 소 GLP-1은 당업계에 공지된 임의의 다른 소 GLP-1이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0173] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 양 GLP-1이 사용된다. 한 구체예에서, 양 GLP-1은 NCBI 서열 번호 Q8MJ25에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 양 GLP-1은 당업계에 공지된 임의의 다른 양 GLP-1이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0174] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 돼지 GLP-1이 사용된다. 한 구체예에서, 닭 GLP-1은 NCBI 서열 번호 P01274에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 닭 GLP-1은 당업계에 공지된 임의의 다른 닭 GLP-1이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0175] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 쥐과 GLP-1이 사용된다. 한 구체예에서, 쥐과 GLP-1은 NCBI 서열 번호 NP_032127에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 쥐과 GLP-1은 당업계에 공지된 임의의 다른 쥐과 GLP-1이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0176] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 소 인터페론 알파가 사용된다. 한 구체예에서, 소 인터페론 알파는 NCBI 서열 번호 ABD57311에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 소 인터페론 알파는 당업계에 공지된 임의의 다른 소 인터페론 알파이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0177] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 양 인터페론 알파가 사용된다. 한 구체예에서, 양 인터페론 알파는 NCBI 서열 번호 CAA41790에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 양 인터페론 알파는 당업계에 공지된 임의의 다른 양 인터페론 알파이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0178] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 돼지 인터페론 알파가 사용된다. 한 구체예에서, 닭 인터페론 알파는 NCBI 서열 번호 AAP92118에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 돼지 인터페론 알파는 당업계에 공지된 임의의 다른 돼지 인터페론 알파이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.
- [0179] 한 구체예에서는, 본 발명의 방법에 의해 쥐과 인터페론 알파가 사용된다. 한 구체예에서, 쥐과 인터페론 알파

는 NCBI 서열 번호 AAA37886에 나타난 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 쥐과 인터페론 알파는 당업계에 공지된 임의의 다른 쥐과 인터페론 알파이다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체예를 나타낸다.

- [0180] 일부 구체예에서, CTP 서열 변형은 더 낮은 투여량을 사용할 수 있도록 함에 있어서 유리하다.
- [0181] 일부 구체예에서, 본 명세서에 사용하는 "폴리펩티드"는 천연 폴리펩티드(분해 산물, 합성적으로 합성된 폴리펩티드 또는 재조합 폴리펩티드) 및 모방 펩티드(peptidomimetics)(통상적으로, 합성적으로 합성된 폴리펩티드)와 함께, 폴리펩티드 유사체로서 일부 구체예에서 폴리펩티드를 체내에서 더욱 안정하게 하거나 세포 내로 더욱 잘 침투하게 하는 변형을 가진 펩토이드(peptoid) 및 세미펩토이드(semipeptoid)를 포함한다.
- [0182] 일부 구체예에서, 변형은 N 말단 변형, C 말단 변형, 폴리펩티드 결합 변형, 비한정적인 예를 들어, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH 또는 CF=CH, 골격 변형 및 잔기 변형을 포함하며 이에 한정되지는 않는다. 모방 펩티드 화합물의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 포함되는 문헌(Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992))에 상술되어 있다. 이와 관련하여 추가의 상세한 내용은 하기에 제공된다.
- [0183] 일부 구체예에서, 폴리펩티드 내의 폴리펩티드 결합(-CO-NH-)은 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 N-메틸화된 결합(-N(CH₃)-CO-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 에스테르 결합(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 케토메틸렌 결합(-CO-CH₂-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 α-아자 결합(-NH-N(R)-CO-), 여기에서 R은 임의의 알킬, 예를 들어 메틸, 카바 결합(-CH₂-NH-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 하이드록시에틸렌 결합(-CH(OH)-CH₂-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 티오아미드 결합(-CS-NH-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 올레핀 이중 결합(-CH=CH-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 레트로 아미드(retro amide) 결합(-NH-CO-)에 의해 치환된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드 결합은 폴리펩티드 유도체(-N(R)-CH₂-CO-)에 의해 치환되며, 여기에서 R은 탄소 원자상에 자연적으로 나타나는 "정상적인" 측쇄이다. 일부 구체예에서, 이러한 변형은 폴리펩티드 쇄를 따라 임의의 결합에 발생하며 동시에 수 개(2-3개 결합)에서도 발생한다.
- [0184] 일부 구체예에서, 폴리펩티드의 자연적인 방향족 AA, 예를 들어 Trp, Tyr 및 Phe은 합성 비-자연적 산, 예를 들어 페닐글리신, TIC, 나프틸엘라닌(Nol), Phe의 환-메틸화 유도체, Phe의 할로젠화 유도체 또는 o-메틸-Tyr을 치환한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 변형된 AA 또는 하나 이상의 비-AA 단량체(예를 들어 지방산, 복합 탄수화물(complex carbohydrate) 등)를 포함한다.
- [0185] 한 구체예에서, "AA" 또는 "AA"는 자연적으로 존재하는 20개 AA; 종종 생체내에서 단백질 합성 후에(post-translationally) 변형되는 AA, 예를 들어 하이드록시프롤린, 포스포세린 및 포스포트레오닌; 및 2-아미노아디프산, 하이드록시라이신, 이소데스모신, 노르-발린, 노르-류신 및 오르니틴을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 특수한 AA를 포함하는 것으로 이해된다. 한 구체예에서, "AA"는 D- 및 L-AA를 모두 포함한다.
- [0186] 일부 구체예에서는, 폴리펩티드가 가용성 형태를 취할 것이 요구되는 치료학에 본 발명의 폴리펩티드가 이용된다. 일부 구체예에서 본 발명의 폴리펩티드는, 하이드록실-함유 측쇄로 인하여 폴리펩티드의 용해도를 증가시킬 수 있는, 세린 및 트레오닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 비-자연적 또는 자연적 극성 AA를 포함한다.
- [0187] 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 선형 형태로 사용되나, 고리화(cyclization)가 폴리펩티드의 특징을 심하게 방해하지 않는 경우에는 고리형 형태의 폴리펩티드도 사용될 수 있음을 당업자는 인식할 것이다.
- [0188] 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 표준 고체상 기술(solid phase technique)과 같은 것을 이용하여 생화학적으로 합성된다. 일부 구체예에서, 이러한 생화학적 방법은 배제 고체상 합성(exclusive solid phase synthesis), 부분적 고체상 합성(partial solid phase synthesis), 단편 축합(fragment condensation) 또는 전통적 용액 합성(solution synthesis)을 포함한다. 일부 구체예에서, 이러한 방법은 폴리펩티드가 상대적으로 짧은 경우(약 5-15 kDa) 및/또는 재조합 기술로 이를 생산할 수 없기 때문에(즉, 핵산 서열에 의해 암호화되지 않음) 상이한 화학이 관련되는 경우에 이용된다.
- [0189] 일부 구체예에서, 고체상 폴리펩티드 합성 절차는 당업자에게 주지되어 있으며 문헌(John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)에 추가로 기술된다. 일부 구체예에서, 합성 폴리펩티드는 분취용 고속 액체 크로마토그래피에 의해 정제되며 (Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.) 그의 조성

은 당업자에게 공지된 방법에 의한 AA 서열 분석을 통해 확인할 수 있다.

- [0190] 일부 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드를 생성시키기 위하여 재조합 단백질 기술이 이용된다. 일부 구체예에서는, 상대적으로 긴 폴리펩티드(예를 들어 18-25 AA를 초과)의 생성을 위하여 재조합 단백질 기술이 이용된다. 일부 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드를 다량으로 생성시키기 위하여 재조합 단백질 기술이 이용된다. 일부 구체예에서, 재조합 기술은 문헌(Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544; Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89; Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514; Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311; Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 및 Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843; Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565; 및 Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463)에 기술된다.
- [0191] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 합성된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 시스-조절 서열(cis-regulatory sequence)(예를 들어 프로모터 서열)의 전사 제어(transcriptional control)를 포함하는 발현 벡터 내에 결합된다. 일부 구체예에서, 시스-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 항상적 발현(constitutive expression)을 위해 적합하다. 일부 구체예에서, 시스-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 조직 특이적 발현을 위해 적합하다. 일부 구체예에서, 시스-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 유도적 발현(inducible expression)을 위해 적합하다.
- [0192] 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 20, 21, 44, 45 및 46에 나타낸다.
- [0193] 일부 구체예에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 조직-특이적 프로모터는 특이적 세포군에서 기능성인 서열로서, 예를 들어 간 특이적인 알부민 프로모터(Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), 림프계 특이적 프로모터(Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), 특히 T-세포 수용체(Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733) 및 면역글로불린(Banerji et al. (1983) *Cell* 33729-740)의 프로모터, 신경미세섬유(neurofilament) 프로모터와 같은 뉴런-특이적 프로모터(Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), 채장-특이적 프로모터(Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916) 또는 유청(milk whey) 프로모터와 같은 유선-특이적 프로모터(미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 특허 출원 공개 제264,166호)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 유도적 프로모터는 예를 들어 테트라사이클린-유도 가능 프로모터(Srouf, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405)를 포함한다.
- [0194] 한 구체예에서 어구 "폴리뉴클레오티드"는, RNA 서열, 상보적 폴리뉴클레오티드 서열(cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 혼성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어 상기의 조합)의 형태로 분리되고 제공되는 단일 또는 이중 가닥 핵산 서열을 지칭한다.
- [0195] 한 구체예에서 "상보적 폴리뉴클레오티드 서열"은, 역전사 효소 또는 임의의 다른 RNA 의존성 DNA 중합 효소를 사용하는 전령 RNA의 역전사로부터 얻어지는 서열을 지칭한다. 한 구체예에서, 서열은 이어서 DNA 중합 효소를 사용하여 생체내 또는 시험관내에서 증폭할 수 있다.
- [0196] 한 구체예에서 "게놈 폴리뉴클레오티드 서열"은 염색체로부터 유래된(분리된) 서열을 지칭하며, 따라서 이는 염색체의 연속적인(contiguous) 부분을 나타낸다.
- [0197] 한 구체예에서, "혼성 폴리뉴클레오티드 서열"은 적어도 부분적으로 상보적이고 적어도 부분적으로 게놈성인 서열을 지칭한다. 한 구체예에서, 혼성 서열은 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하기 위해 필요한 일부 엑손 서열과 함께 그들 사이에 삽입된 일부 인트론 서열을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 인트론 서열은 임의의 근원, 예를 들어 다른 유전자로부터 유래할 수 있으며, 통상적으로는 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 한 구체예에서, 인트론 서열은 시스작용 발현조절요소(cis acting expression regulatory elements)를 포함한다.
- [0198] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드의 분비를 위한 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 신호 서열은 서열 번호 19에 나타난 EPO의 내인성 신호 서열 또는 서열 번호 26에 나타난 IFN-01의 내인성 신호서열을 포함하며 이에 한정되지는 않는다. 다른 구체예에서, 신호 서열은 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 N-말단에 있는 CTP 서열의 N-말단에 있다; 예를 들어 그 서열은 (a) 신호 서열- (b) CTP- (c) 관심의 대상인 서열- (d) 임의로 하나 이상의 추가의 CTP 서열이다. 다른 구체예에서는, 관심의 대상인 폴리펩티드 서열의 신호 서열과 관심의 대상인 폴리펩티드 서열 자체의 사이에 하나 이상의 CTP 서열이 삽입되어 관심의 대상인 야생형 서열을 중단시킨다. 각각의 가능성은 본 발명의 개별적인 구체

예를 나타낸다.

- [0199] 한 구체예에서는, 발현 및 분비 후에 신호 펩티드가 전구체 단백질로부터 절단되어 성숙한 단백질이 만들어진다.
- [0200] 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 실시예 1에 기술된 바와 같은 PCR 기술 또는 당업자에게 공지된 다른 방법 또는 절차를 이용하여 제조된다. 일부 구체예에서, 그 절차는 2개의 상이한 DNA 서열의 결합을 포함한다(예를 들어, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992 참조).
- [0201] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터(즉, 핵산 작제물) 내에 삽입되어 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현을 가능하게 한다. 한 구체예에서 본 발명의 발현 벡터는, 그 벡터가 원핵생물에서의 복제 및 통합(integration)에 적합하도록 하는 추가의 서열을 포함한다. 한 구체예에서 본 발명의 발현 벡터는, 그 벡터가 진핵생물에서의 복제 및 통합에 적합하도록 하는 추가의 서열을 포함한다. 한 구체예에서 본 발명의 발현 벡터는, 그 벡터가 원핵생물 및 진핵생물 양자 모두에서의 복제 및 통합에 적합하도록 하는 셔틀 벡터(shuttle vector)를 포함한다. 일부 구체예에서, 클로닝 벡터는 전사 및 단백질 합성 개시 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서(enhancer)) 및 전사 및 단백질 합성 종결자(예를 들어 폴리아데닐화 신호)를 포함한다.
- [0202] 한 구체예에서는, 다양한 원핵 또는 진핵 세포들이 숙주-발현 시스템으로 사용되어 본 발명의 폴리펩티드를 발현시킨다. 일부 구체예에서, 이들은 미생물, 예를 들어 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파아지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질 변환된 박테리아; 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질 변환된 효모; 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는, 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염시키거나 재조합 플라스미드 발현 벡터, 예를 들어 Ti 플라스미드로 형질 변환된 식물 세포 시스템을 포함하며 이에 한정되지는 않는다.
- [0203] 일부 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키기 위해 비-박테리아 발현 시스템을 이용한다(예를 들어 CHO 세포와 같은 포유류 발현 시스템). 한 구체예에서, 포유류 세포에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위해 사용되는 발현 벡터는 CMV 프로모터 및 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 pCI-DHFR 벡터이다. pCI-dhfr 벡터의 작제는 한 구체예에 따라 실시예 1에 기술된다.
- [0204] 일부 구체예에서는, 본 발명의 박테리아 시스템에서, 발현되는 폴리펩티드에 대해 의도되는 용도에 따라 다수의 발현 벡터들이 유리하게 선택될 수 있다. 한 구체예에서는, 다량의 폴리펩티드가 요구된다. 한 구체예에서는, 단백질 산물을 용이하게 정제할 수 있는 박테리아의 주변 세포질(periplasm) 또는 배양 배지 내로 발현된 산물을 내보내는 소수성 신호 서열과 융합된 형태로 단백질 산물을 높은 수준으로 발현되도록 하는 벡터가 바람직하다. 한 구체예에서, 어떤 융합 단백질은 특이적 절단 부위를 가지도록 조작되어 폴리펩티드의 회수를 용이하게 한다. 한 구체예에서, 이러한 조작을 가할 수 있는 벡터는 E. 콜라이 발현 벡터의 pET 계열을 포함하며 이에 한정되지는 않는다(Studier *et al.*, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)).
- [0205] 한 구체예에서는, 효모 발현 시스템이 이용된다. 한 구체예에서는, 미국 특허 출원 제5,932,447호에 개시된 바와 같이 항상적 또는 유도적 프로모터를 함유하는 다수의 벡터들이 효모에서 사용 가능하다. 다른 구체예에서는, 외래 DNA 서열이 효모 염색체 내로 통합되도록 촉진하는 벡터가 사용된다.
- [0206] 한 구체예에서 본 발명의 발현 벡터는, 예를 들어 프로모터-키메릭 폴리펩티드의 게놈 통합을 위한 서열 및 내부 리보솜 진입부위(IRES: internal ribosome entry site)와 같이 단일 mRNA로부터 몇 개의 단백질이 합성될 수 있도록 하는 부가적인 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0207] 일부 구체예에서, 포유류 발현 벡터는 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수 가능한 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, 프로메가(Promega)로부터 입수 가능한 pCI, 스트래티진(Stratagene)으로부터 입수 가능한 pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, 클로텍(Clontech)으로부터 입수 가능한 pTRES, 및 이들의 유도체를 포함하며 이에 한정되지는 않는다.
- [0208] 일부 구체예에서는, 레트로바이러스와 같은 진핵세포 바이러스로부터의 조절 요소를 함유하는 발현 벡터가 본 발명에 사용된다. SV40 벡터는 pSVT7 및 pMT2를 포함한다. 일부 구체예에서, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)로부터 유래된 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하며, 엡슈타인 바르 바이러스(Epstein Bar virus)로

부터 유래된 벡터는 pHEBO 및 p205를 포함한다. 다른 예시적 벡터는 pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, 바큇로바이러스(baculovirus) pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 쥐과 유선 종양 바이러스 프로모터, 라우스 사코마 바이러스(Rous sarcoma virus) 프로모터, 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터, 또는 진핵세포에서의 발현에 있어서 효과적임이 증명된 다른 프로모터의 지배하에 단백질이 발현되도록 하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.

[0209] 일부 구체예에서, 재조합 바이러스 벡터는 본 발명의 폴리펩티드의 생체내 발현에 있어서 유용한데, 이는 이들이 측방 감염(lateral infection) 및 표적화 특이성과 같은 장점을 제공하기 때문이다. 한 구체예에서, 측방 감염은 예를 들어 레트로바이러스의 생활사에 있어서 고유한 것으로서, 단일 감염 세포가 다수의 후대 비리온(virion)을 생산하고 이들이 분리되어 나와서 인접한 세포들을 감염시키는 과정이다. 한 구체예에서는, 결과적으로 넓은 영역이 신속하게 감염되며, 이 중의 대부분이 처음에는 원래의 바이러스 입자에 의해 감염되어 있지 않았다. 한 구체예에서는, 측방으로 확산될 수 없는 바이러스 벡터가 생산된다. 한 구체예에서, 국소적인 수의 표적 세포에만 특이적 유전자를 도입하고자 하는 목적일 경우에 이러한 특징이 유용할 수 있다.

[0210] 한 구체예에서, 본 발명의 발현 벡터를 세포 내로 도입하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995); Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988); Gilboa et al., Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986)에 일반적으로 기술되어 있으며, 예를 들어 안정적 또는 일시적 형질 감염(transfection), 리포펙션(lipofection), 전기 천공법(electroporation) 및 재조합 바이러스 벡터에 의한 감염을 포함한다. 추가로 양성-음성 선택 방법에 있어서는 미국 특허 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조한다.

[0211] 일부 구체예에서, 바이러스의 감염성 성질로 인해 높은 형질 감염 효율을 얻을 수 있으므로, 바이러스 감염에 의한 핵산의 도입은 리포펙션 및 전기 천공법과 같은 다른 방법에 비하여 몇 가지 장점을 제공한다.

[0212] 한 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드가 본 명세서에 상기한 임의의 적합한 투여 방식(즉 생체내 유전자 요법)을 이용하여 개체에게 투여한 핵산 작제물로부터 발현될 수도 있음이 인식될 것이다. 한 구체예에서는, 적절한 유전자 전달 비하일/방법(형질 감염, 형질 도입(transduction), 상동적 재조합 등) 및 필요한 발현 시스템을 통해 핵산 작제물이 적합한 세포 내에 도입된 후 변형된 세포를 배양 중에 증식시켜 개체에게 다시 복귀시킨다(즉 생체외(ex vivo) 유전자 요법).

[0213] 한 구체예에서는 EPO를 사용하는 생체내 유전자 요법이 설치류(Bohl et al., Blood. 2000; 95:2793-2798), 영장류(Gao et al., Blood, 2004, Volume 103, Number 9)와 같은 동물 모델에서 시도되었으며, 만성 신부전증을 가진 환자에 대한 인간 임상 시험에서 성공적임이 증명되었다(Lippin et al Blood 2005, 106, Number 7).

[0214] 한 구체예에서는 식물 발현 벡터가 사용된다. 한 구체예에서는, 다수의 프로모터에 의해 폴리펩티드 코딩 서열의 발현이 추진된다. 일부 구체예에서는, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터(Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)), 또는 TMV의 외피 단백질 프로모터(Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987))가 사용된다. 다른 구체예에서는, 예를 들어 RUBISCO의 작은 서브유닛(Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)) 또는 열충격 프로모터, 예를 들어 대두 hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B(Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986))와 같은 식물 프로모터가 사용된다. 한 구체예에서는, Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접적 DNA 형질 변환, 미량주사법(microinjection), 전기 천공법 및 당업자에게 주지된 다른 기술을 사용하여 작제물을 식물 세포 내에 도입한다. 예를 들어 문헌(Weissbach & Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988))을 참조한다. 당업계에 주지된 곤충 및 포유류 숙주 세포 시스템과 같은 다른 발현 시스템도 본 발명에 이용될 수 있다.

[0215] 삽입된 코딩 서열(폴리펩티드를 암호화하는)의 전사 및 단백질 합성에 필수적인 요소를 함유하는 외에, 본 발명의 발현 작제물은 발현되는 폴리펩티드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 활성을 최적화하기 위해 조작된 서열들도 포함할 수 있음이 인식될 것이다.

[0216] 일부 구체예에서는, 본 발명의 발현 벡터를 숙주 세포 시스템 내에 도입하기 위하여 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 방법들은 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995); Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988); Gilboa et al., Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986)에 일반적으로 기술되어 있으며, 예를 들어 안정적 또는 일시적 형질 감염, 리포펙션, 전기 천공법 및 재조합 바이러스 벡터에 의한 감염을 포함한다. 추가로 양성-음성 선택 방법에 있어서는 미국 특허 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조한다.

- [0217] 일부 구체예에서, 형질 변환된 세포는 많은 양의 재조합 폴리펩티드를 발현시키기에 효과적인 조건 하에서 배양된다. 일부 구체예에서, 효과적인 배양 조건은 단백질 생산을 위한 효과적인 배지, 생물 반응기(bioreactor), 온도, pH 및 산소조건을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 효과적인 배지는 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위하여 세포를 배양하는 임의의 배지를 지칭한다. 일부 구체예에서, 배지는 통상적으로 동화할 수 있는 탄소, 질소 및 포스페이트 공급원, 및 적절한 염, 무기물, 금속 및 다른 영양소, 예를 들어 비타민을 함유하는 수용액을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 세포는 전통적인 발효 생물 반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 마이크로타이터 디쉬(microtiter dish) 및 페트리 플레이트(petri plate)에서 배양될 수 있다. 일부 구체예에서, 배양은 재조합 세포에 적절한 온도, pH 및 산소 함량에서 실행된다. 일부 구체예에서, 배양 조건은 당업자의 전문 지식 범위 내에 있다.
- [0218] 일부 구체예에서는, 생산에 사용된 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 얻어진 본 발명의 폴리펩티드가 재조합 세포 내에 잔류하거나 발효 배지 내에 분비되거나 E. 콜라이의 주변 세포질 공간(periplasmic space)과 같은 2개 세포막 사이 공간 내로 분비되거나 세포 또는 바이러스 막의 외부 표면 상에 보유된다.
- [0219] 한 구체예에서는, 배양에서 미리 결정된 시간에 따라 재조합 폴리펩티드의 회수가 이루어진다.
- [0220] 한 구체예에서, 본 명세서에 사용되는 어구 "재조합 폴리펩티드의 회수"는 폴리펩티드를 함유하는 전체 배양 배지를 수집함을 의미하며, 분리 또는 정제의 부가적 단계를 필연적으로 수반하지는 않는다.
- [0221] 한 구체예에서 본 발명의 폴리펩티드는, 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography), 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography), 역상 크로마토그래피(reverse phase chromatography), 콘카나발린 A 크로마토그래피(concanavalin A chromatography), 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 분별 가용화(differential solubilization)를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 표준 단백질 정제 기술을 이용하여 정제된다.
- [0222] 한 구체예에서는, 회수를 용이하게 하기 위하여, 발현되는 코딩 서열이 본 발명의 폴리펩티드 및 융합된 절단 가능 부분을 암호화하도록 조작할 수 있다. 한 구체예에서는, 폴리펩티드를 친화성 크로마토그래피에 의해, 예를 들어 절단 가능 부분에 특이적인 컬럼 상에 고정화함으로써 용이하게 분리할 수 있도록 융합 단백질을 설계할 수 있다. 한 구체예에서는, 절단 부위가 폴리펩티드와 절단 가능 부분 사이에 위치하도록 조작되며, 융합 단백질을 이 부위에서 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 약제를 처리함으로써 크로마토그래피 컬럼으로부터 폴리펩티드를 유리시킬 수 있다(예를 들어, Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990) 참조).
- [0223] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 "실질적으로 순수한" 형태로 회수된다.
- [0224] 한 구체예에서, 어구 "실질적으로 순수한"은 본 명세서에 기술된 적용에 있어서 단백질을 효과적으로 사용할 수 있도록 하는 순도를 의미한다.
- [0225] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 시험관내 발현 시스템을 이용하여 합성할 수도 있다. 한 구체예에서, 시험관내 합성 방법은 당업계에 주지되어 있으며 그 시스템의 컴포넌트는 상업적으로 이용 가능하다.
- [0226] 한 구체예에서, 재조합 DNA 기술을 이용한 CTP-EPO-CTP 폴리펩티드의 생산은 실시예 1에 설명된다.
- [0227] 일부 구체예에서는, 재조합 폴리펩티드가 합성 및 정제되고, 그의 치료적 효능을 생체내 또는 시험관내에서 에세이할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 재조합 EPO 폴리펩티드의 결합 활성은 실시예 2 - 실시예 6 및 실시예 8 - 실시예 9에 기술된 바와 같이 다양한 에세이를 이용하여 확인할 수 있다. 한 구체예에서는, TF-1 세포의 증식을 자극하는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 시험관내 결합 활성을 확인한다. 한 구체예에서는, 적혈구 용적율(haematocrit) 수준(도 3 - 도 5) 및/또는 망상 적혈구(reticulocyte) 백분율을 분석함으로써 생체내 활

성을 추론한다.

- [0228] 한 구체예에서, 본 발명의 EPO 폴리펩티드는 다양한 에리트로포이에틴-연계 병태를 가진 대상의 치료에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 대상은 인간 대상이다.
- [0229] 일부 구체예에서, 어구 "에리트로포이에틴-연계 병태"는 에리트로포이에틴의 정상 미만, 비정상 또는 부적절한 조정과 연계된 임의의 병태를 지칭한다. 일부 구체예에서, 이러한 병태와 연계된 에리트로포이에틴 수준은 당업자가 인정하고 이용하는 임의의 수단에 의해 결정된다. 일부 구체예에서, 에리트로포이에틴-연계 병태는 통상적으로 빈혈증 병태를 포함한다.
- [0230] 일부 구체예에서, "빈혈증 병태"는 빈혈증과 연계된 임의의 병태, 질환 또는 장애를 지칭한다. 일부 구체예에서, 빈혈증 병태는 재생불량성 빈혈, 자가면역성 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 골수 이식, 처그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 다이아몬드 블랙판 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 판코니 빈혈(Fanconi's anemia), 펠티 증후군(Felty syndrome), 이식편 대 숙주 질환(graft versus host disease), 조혈 줄기세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation), 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome), 골수이형성 증후군, 발작성 야간혈색소뇨증(nocturnal paroxysmal hemoglobinuria), 골수 섬유증(osteomyelofibrosis), 범혈구 감소증(pancytopenia), 진성 적혈구계 무형성증(pure red-cell aplasia), 쾨라인-헤노흐 자반병(purpura Schoenlein-Henoch), 철적모구성 빈혈(sideroblastic anemia), 과다 모세포 불응성 빈혈(refractory anemia with excess of blasts), 류머티즘성 관절염, 슈와크만 증후군(Shwachman syndrome), 겸상 적혈구 질환, 중증 지중해 빈혈(thalassemia major), 경증 지중해 빈혈(thalassemia minor), 혈소판 감소성 자반증 등을 포함하며 이에 한정되지는 않는다.
- [0231] 한 구체예에서, 본 발명은 CTP-hGH-CTP 폴리펩티드를 포함한다. 한 구체예에서는, 실시예 7에 설명된 바와 같이 CTP-hGH-CTP 폴리펩티드의 생산을 위해 재조합 DNA 기술 방법이 이용된다. 한 구체예에서는, 본 발명의 CTP-hGH-CTP 폴리펩티드의 치료적 효능을 생체내에서 에세이한다. 한 구체예에서는, 본 발명의 CTP-hGH-CTP 폴리펩티드의 치료적 효능을 시험관내에서 에세이한다. 한 구체예에서는, 인간 성장 호르몬 수용체로 미리 형질 감염시킨 Nb2(프롤락틴-의존성 랫트 림프종 세포주(ECACC Cell Bank)) 또는 FCD-P1 쥐과 세포주를 사용하여 본 발명의 재조합 hGH 폴리펩티드의 결합 활성을 측정한다. 한 구체예에서는, 이들 수용체에 대한 hGH의 결합이 세포 증식을 유도하며, 이는 한 구체예에서 hGH 활성의 함수로서의 MTT 세포 염색의 수준에 의해 측정된다. 한 구체예에서는, 처리군 성장 호르몬 결핍 동물의 시간에 따른 체중 증가를 측정함으로써 생체내 활성을 추론한다.
- [0232] 일부 구체예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩티드는 성장결핍 장애, AIDS 소모증, 노화, HIV-감염된 대상의 손상된 면역 기능, 이화성 질병(catabolic illness), 수술 회복(surgical recovery), 울혈성 심근증(congestive cardiomyopathy), 간 이식, 간 절제술 후의 간 재생, 만성 신부전, 신성 골이영양증(renal osteodystrophy), 골다공증, 연골 무형성증/연골 형성저하증(achondroplasia/hypochondroplasia), 골격 이형성증(skeletal dysplasia), 만성 염증성 또는 영양 장애, 예를 들어 크론병(Crohn's disease), 단장 증후군(short bowel syndrome), 유년성 만성 관절염(juvenile chronic arthritis), 낭포성 섬유증, 남성 불임, X 염색체 연관성 저인산혈성 구루병(X-linked hypophosphatemic rickets), 다운 증후군, 이분 척추증(Spina bifida), 누난 증후군(Noonan Syndrome), 비만, 손상된 근력 및 섬유근통과 같이 성장 및 체중에 관련된 병태를 가진 대상을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0233] 일부 구체예에서, 본 발명의 인터페론 폴리펩티드는 모발상 세포 백혈병(HCL), 카포시 육종(KS), 만성 골수성 백혈병(CML: chronic myelogenous leukemia), 만성 C형 간염(CHC: chronic hepatitis C), 첨형 콘딜로마(CA: condylomata acuminata) (CA), 만성 B형 간염, 악성 흑색종, 여포성 비-호지킨 림프종(follicular non-Hodgkin's lymphoma), 다발성 경화증, 만성 육아종 질환, 마이코박테리움 아비움 콤플렉스(MAC: Mycobacterium avium complex), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis) 및 골다공증과 같은 다양한 병태를 가진 대상을 치료하기 위해 사용된다.
- [0234] 일부 구체예에서, 본 발명의 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1)은 비-인슐린 의존성 당뇨병, 비만, 뇌졸중, 심근경색, 뇌졸중, 스트레스-유도된 고혈당증 또는 과민성 대장 증후군을 가진 대상을 치료하기 위해 사용된다.
- [0235] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 그 자체로서 개체에게 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합된 약제학적 조성물의 일부로서 개체에게 제공될 수 있다.
- [0236] 한 구체예에서, "약제학적 조성물"은 본 명세서에 기술된 하나 이상의 활성 성분 및 다른 화학적 성분, 예를 들어 생리적으로 적합한 담체 및 부형제의 제제를 지칭한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체에 화합물을 용이하

게 투여하기 위한 것이다.

- [0237] 한 구체예에서, "활성 성분"은 생물학적 효과를 지닐 개연성이 있는 관심의 대상인 폴리펩티드 서열을 지칭한다.
- [0238] 일부 구체예에서, 본 발명의 임의의 조성물은 임의의 형태로 관심의 대상인 단백질에 결합된 적어도 2개의 CTP 서열을 포함할 것이다. 한 구체예에서, 본 발명은 배합 제제(combined preparation)를 제공한다. 한 구체예에서, "배합 제제"는 특히 "부품(part)들의 키트"를 정의하며, 이는 상기 정의된 배합 상대(combination partner)가 독립적으로 또는 배합 상대의 양을 달리하는 상이한 결정 배합을 사용하여, 즉, 동시에, 공동으로, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있음을 의미한다. 일부 구체예에서, 부품들의 키트의 부품은 예를 들어 동시에 또는 시기적으로 엇갈리게, 즉 부품들의 키트의 임의의 부품에 대하여 상이한 시점에 동일하거나 상이한 시간 간격으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서는, 배합 상대의 총량의 비율이 배합 제제로 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 배합 제제는 예를 들어 치료할 환자 부차 집단의 필요 또는 단일 환자의 필요에 대처하기 위하여 변경될 수 있으며, 여기에서 상이한 필요는 특정 질환, 질환의 중증도, 연령, 성별 또는 체중에 기인한 것일 수 있고, 이는 당업자에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.
- [0239] 한 구체예에서, 호환적으로 사용되는 어구 "생리적으로 허용되는 담체" 및 "약제학적으로 허용되는 담체"는, 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 훼손하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 애드juvant(adjuvant)는 이들 어구에 포함된다. 한 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 담체에 포함된 성분 중의 하나는 예를 들어 유기 및 수성 매질 모두에서 광범위한 용해도를 가진 생체적합성 중합체인 폴리에틸렌 글리콜(PEG: polyethylene glycol)일 수 있다(Mutter et al. (1979)).
- [0240] 한 구체예에서, "부형제"는 활성 성분의 투여를 추가로 용이하게 하기 위하여 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 한 구체예에서, 부형제는 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당 및 타입의 전분, 셀룰로즈 유도체, 젤라틴, 식물성 유지 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0241] 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술은 원용에 의해 본 명세서에 포함된 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition)에서 찾을 수 있다.
- [0242] 한 구체예에서, 적합한 투여 경로는 예를 들어 경구, 직장, 경점막(transmucosal), 경비(transnasal), 장(intestinal) 또는 비경구 전달, 예를 들어 근육내, 피하 및 척수내(intramedullary) 주사와 함께 척수강내(intrathecal), 직접적 뇌실내(direct intraventricular), 정맥내, 복강내, 비내 또는 안내 주사를 포함한다.
- [0243] 한 구체예에서는, 전신적이 아닌 국소적 방식으로, 예를 들어 환자 신체의 특이적 영역 내에 제제를 직접 주사함으로써 제제가 투여된다.
- [0244] 본 발명에 의해 투여량 범위의 다양한 구체예가 고찰되었다. 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드의 투여량은 0.05-80 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.05-50 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.1-20 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.1-10 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.1-5 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.5-5 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 0.5-50 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 5-80 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 35-65 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 35-65 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 20-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 40-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 45-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 40-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 60-120 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 120-240 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 40-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 240-400 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 45-60 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 15-25 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 5-10 mg/일의 범위이다. 다른 구체예에서, 투여량은 55-65 mg/일의 범위이다.
- [0245] 다른 구체예에서, 투여량은 20 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 30 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 40 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 50 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 60 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 70 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 80 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 90 mg/일이다. 다른 구체예에서, 투여량은 100 mg/일이다.
- [0246] 한 구체예에서, 경구 투여는 정제, 캡슐, 로젠지(lozenge), 저작성 정제(chewable tablet), 현탁액, 에멀전 등을 포함하는 단위 투여형을 포함한다. 이러한 단위 투여형은 목적 화합물 또는 화합물들의 안전하고 효과적인 양을 함유하며, 이들 각각은 한 구체예에서 약 0.7 또는 3.5 mg 내지 약 280 mg/70 kg, 또는 다른 구체예에서

약 0.5 또는 10 mg 내지 약 210 mg/70 kg이다. 경구적 투여를 위한 단위 투여형의 제조에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 당업계에 주지되어 있다. 일부 구체예에서, 정제는 전통적인 약제학적-적합성 애쥬번트로서 탄산칼슘, 탄산나트륨, 만니톨, 락토즈 및 셀룰로스와 같은 불활성 희석제; 전분, 젤라틴 및 수크로스와 같은 결합제; 전분, 알긴산 및 크로스카멜로스와 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 및 활석과 같은 윤활제를 통상적으로 포함한다. 한 구체예에서는, 분말-혼합물의 유동 특질을 개선하기 위하여 실리콘 디옥사이드와 같은 활택제(glidant)를 사용할 수 있다. 한 구체예에서는, 외관을 위하여 FD&C 염료와 같은 착색제를 첨가할 수 있다. 감미료 및 착향료, 예를 들어 아스파탐, 사카린, 멘톨, 페퍼민트 및 과일향은 저작성 정제에 있어서 유용한 애쥬번트이다. 캡슐은 통상적으로 상기 개시된 하나 이상의 고체 희석제를 포함한다. 일부 구체예에서, 담체 성분의 선택은 부차적인 고려 사항, 예를 들어 맛, 비용 및 저장 안정성에 의존하며, 이는 본 발명의 목적에 있어서 결정적이지 않고 당업자에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.

[0247] 한 구체예에서, 경구 투여형은 미리 정해진 방출 프로파일을 포함한다. 한 구체예에서 본 발명의 경구 투여형은 장기 방출형 정제, 캡슐, 로젠지 또는 저작성 정제를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 경구 투여형은 서방형 정제, 캡슐, 로젠지 또는 저작성 정제를 포함한다. 한 구체예에서 본 발명의 경구 투여형은 즉시 방출형 정제, 캡슐, 로젠지 또는 저작성 정제를 포함한다. 한 구체예에서, 경구 투여형은 당업자에게 공지된 약제학적 활성 성분의 목적하는 방출 프로파일에 따라 제형화된다.

[0248] 일부 구체예에서, 경구적 조성물은 액체 용액, 에멀전, 현탁액 등을 포함한다. 일부 구체예에서, 이러한 조성물의 제조에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 당업계에 주지되어 있다. 일부 구체예에서, 액체 경구 조성물은 약 0.012% 내지 약 0.933%의 목적 화합물 또는 화합물들을 포함하거나, 다른 구체예에서 약 0.033% 내지 약 0.7%를 포함한다.

[0249] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용하는 조성물은 용액 또는 에멀전을 포함하며, 이는 일부 구체예에서 본 발명의 화합물의 안전하고 효과적인 양 및 임의로 국소적 비내 투여를 위한 다른 화합물을 함유하는 수성 용액 또는 에멀전이다. 일부 구체예에서, 조성물은 약 0.01% 내지 약 10.0% (w/v), 더욱 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 2.0%의 대상 화합물을 함유하며, 이는 비내 경로에 의한 화합물의 전신 전달에 사용된다.

[0250] 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 액체 제제의 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 구체예에서, 액체는 용액, 현탁액, 분산액(dispersion), 에멀전, 오일 등을 포함한다. 한 구체예에서, 약제학적 조성물은 정맥내 투여되므로, 정맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 동맥내 투여되므로, 동맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구체예에서 약제학적 조성물은 근육내 투여되므로, 근육내 투여에 적합한 형태로 제형화된다.

[0251] 추가로, 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 신체 표면에 국소적으로 투여되므로, 국소 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 적합한 국소 제형은 겔, 연고, 크림, 로션, 점적제 등을 포함한다. 국소 투여에 있어서, 본 발명의 화합물은 추가의 적절한 치료 약제 또는 약제들과 배합되어, 약제학적 담체의 존재 또는 부재 하에 생리적으로 허용되는 희석제 중의 용액, 현탁액 또는 에멀전으로서 제조 및 적용된다.

[0252] 한 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 주지된 방법, 예를 들어 전통적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 연화(levigating), 에멀전화, 캡슐화, 포획(entrapping) 또는 동결건조 방법에 의해 제조된다.

[0253] 한 구체예에서, 본 발명에 따라 사용하는 약제학적 조성물은 부형제 및 보조제(auxiliary)를 포함하는 생리적으로 허용되는 하나 이상의 담체를 사용하여 전통적인 방식으로 제형화되며, 이들은 활성 성분을 약제학적으로 사용할 수 있는 제제로 가공함을 용이하게 한다. 한 구체예에서, 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0254] 한 구체예에서, 본 발명의 주사제는 수성 용액 중에 제형화된다. 한 구체예에서, 본 발명의 주사제는 행크 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 생리적 염 완충액과 같은 생리적으로 적합성인 완충액 내에 제형화된다. 일부 구체예에서는, 경점막 투여를 위하여 투과하고자 하는 장벽에 적절한 침투제(penetrant)가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0255] 한 구체예에서, 본 명세서에 기술된 제제는, 예를 들어 볼루스 주사(bolus injection) 또는 연속적 주입(infusion)에 의한 비경구 투여를 위해 제형화된다. 일부 구체예에서, 주사용 제형은 예를 들어 앰플 내의 단위 투여형으로 또는 임의로 방부제가 첨가된 다중 투여 용기 내에 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 유성 또는 수성 비히클 내의 현탁액, 용액 또는 에멀전으로서, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제(dispersing agent)와 같은 제형화 약제를 포함한다.

[0256] 일부 구체예에서, 조성물은 또한 벤즈알코늄 클로라이드 및 티메로살 등과 같은 방부제; 에테데이트 소듐 등과

같은 킬레이트화제; 포스페이트, 시트레이트 및 아세테이트와 같은 완충제; 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린, 만니톨 등과 같은 긴장성 조절제(tonicity agent); 아스코르브산, 아세틸시스틴, 소듐 메타비술파이트 등과 같은 항산화제; 방향성 약제(aromatic agent); 셀룰로즈 및 그의 유도체를 포함하는 중합체와 같은 점도 조절제; 및 폴리비닐 알콜 및 필요에 따라 이들 수성 조성물의 pH를 조정하기 위한 산 및 염기를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 또한 국소 마취제 또는 다른 활성 물질을 포함한다. 조성물은 스프레이(spray), 분무제(mist), 점적제 등으로서 사용될 수 있다.

[0257] 일부 구체예에서, 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 수용성 형태의 활성 제제의 수용액을 포함한다. 추가로, 일부 구체예에서는, 활성 성분의 현탁액이 적절한 유성 또는 수성 기체의 주사용 현탁액으로서 제조된다. 일부 구체예에서, 적합한 친유성(lipophilic) 용매 또는 비히클은 지방 유지(fatty oil), 예를 들어 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올리에이트, 트리글리세리드 또는 리포솜(liposome)을 포함한다. 일부 구체예에서, 수성 주사용 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로즈, 소르비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유한다. 다른 구체예에서, 현탁액은 또한, 활성 성분의 용해도를 증가시켜 고농도 용액의 제조를 가능하게 하는 약제 또는 적합한 안정화제를 포함한다.

[0258] 다른 구체예에서는, 활성 화합물을 베시클(vesicle), 특히 리포솜 안에 넣어 전달할 수 있다(Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; 일반적으로 동일 문헌 참조).

[0259] 다른 구체예에서, 조절된 방출 시스템으로 전달되는 약제학적 조성물은 정맥내 주입, 이식 가능한 삼투압 펌프, 경피 패치, 리포솜 또는 다른 투여 양식을 위해 제형화된다. 한 구체예에서는 펌프가 사용된다(Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989) 참조). 다른 구체예에서는 중합체 재료가 사용될 수 있다. 또 다른 구체예에서는, 조절된 방출 시스템을 치료 표적, 즉, 뇌에 근접하여 위치시킴으로써 전신 용량의 한 분획만이 필요하게 할 수 있다(예를 들어, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 조절된 방출 시스템에 관해서는 개관 문헌(Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990))에 논의된다.

[0260] 일부 구체예에서는, 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 발열 물질이 없는 멸균수 기체의 용액으로 구성할 수 있도록 활성 성분이 분말 형태이다. 일부 구체예에서, 조성물은 무화(atomization) 및 흡입 투여를 위해 제형화된다. 다른 구체예에서, 조성물은 무화 수단이 부착된 용기에 들어있다.

[0261] 한 구체예에서, 본 발명의 제제는 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 전통적인 좌제 기제를 사용하여 좌제 또는 정제 관장(retention enema)과 같은 직장 투여 조성물로 제형화된다.

[0262] 일부 구체예에서, 본 발명과 관련하여 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은, 의도하는 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 활성 성분이 함유된 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 유효량은 질환의 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나 치료 받는 대상의 생존을 연장하기에 효과적인 활성 성분의 양을 의미한다.

[0263] 한 구체예에서, 치료적 유효량의 결정은 당업자의 역량 범위 내에 있다.

[0264] 조성물은 또한 벤즈알코늄 클로라이드 및 티메osal 등과 같은 방부제; 에데테이트 소듐 등과 같은 킬레이트화제; 포스페이트, 시트레이트 및 아세테이트와 같은 완충제; 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린, 만니톨 등과 같은 긴장성 조절제; 아스코르브산, 아세틸시스틴, 소듐 메타비술파이트 등과 같은 항산화제; 방향성 약제; 셀룰로즈 및 그의 유도체를 포함하는 중합체와 같은 점도 조절제; 및 폴리비닐 알콜 및 필요에 따라 이들 수성 조성물의 pH를 조정하기 위한 산 및 염기를 포함한다. 조성물은 또한 국소 마취제 또는 다른 활성 물질을 포함한다. 조성물은 스프레이, 분무제, 점적제 등으로서 사용될 수 있다.

[0265] 약제학적으로 허용되는 담체 또는 그의 성분으로 사용될 수 있는 물질의 일부 예는, 락토즈, 글루코즈 및 수크로스와 같은 당; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 소듐 카복시메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 메틸 셀룰로즈와 같은 셀룰로즈 및 그의 유도체; 분말화된 트래거칸스(tragacanth); 맥아(malt); 젤라틴; 활석; 스테아르산 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 고체 윤활제; 황산칼슘; 낙화생유, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 테오브로마(theobroma) 유지와 같은 식물성 유지; 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 알긴산; 트윈(Tween)(등록상표) 상표의 에멀전화제와 같은 에멀전화제; 소듐 라우릴 설페이트와 같은 습윤제; 착색제; 착향료; 타정 약제(tableting agent), 안정화제; 항산화제; 방부제; 발열

물질이 없는 물; 등장성 식염수; 및 포스페이트 완충용액이다. 화합물과 함께 사용할 약제학적으로 허용되는 담체의 선택은 그 화합물을 투여할 방법에 의해 기본적으로 결정된다. 한 구체예에서, 대상 화합물이 주사용이라면, 약제학적으로 허용되는 담체는 혈액-적합성 현탁화제를 함유하고 pH가 약 7.4로 조정된 멸균 생리 식염수이다.

[0266] 또한, 조성물은 결합제(예를 들어 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴, 카보머, 에틸 셀룰로즈, 구아 검, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈, 포비돈), 붕해제(예를 들어 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 실리콘 디옥사이드, 크로스카멜로즈 소듐, 크로스포비돈, 구아 검, 소듐 전분 글리콜레이트), 다양한 pH 및 이온 세기의 완충제(예를 들어 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), 표면 흡착을 방지하기 위한 알부민 또는 젤라틴과 같은 첨가제, 세정제(detergent)(예를 들어 트윈 20, 트윈 80, 플루로닉 F68, 담즙산염), 프로테아제 저해제, 계면활성제(예를 들어 소듐 라우릴 설페이트), 투과성 증진제(permeation enhancer), 가용화제(solubilizing agents)(예를 들어 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 항산화제(예를 들어 아스코르브산, 소듐 메타비설파이트, 부틸화된 하이드록시아니솔), 안정화제(예를 들어 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈), 점증제(예를 들어 카보머, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드, 에틸 셀룰로즈, 구아 검), 감미료(예를 들어 아스파탐, 시트르산), 방부제(예를 들어 티메로살, 벤질 알콜, 파라벤), 윤활제(예를 들어 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트), 유동-보조제(flow-aids)(예를 들어 콜로이드성 실리콘 디옥사이드), 가소제(예를 들어 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트), 에멀전화제(예를 들어 카보머, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 소듐 라우릴 설페이트), 중합체 코팅(예를 들어 폴록사머 또는 폴록사민), 코팅 및 필름 형성 약제(예를 들어 에틸 셀룰로즈, 아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트) 및/또는 애쥬번트를 추가로 포함한다.

[0267] 시럽, 엘릭시르(elixir), 에멀전 및 현탁액을 위한 담체의 통상적 성분은, 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 수크로즈, 소르비톨 및 물을 포함한다. 현탁액에 있어서, 통상적인 현탁화제는 메틸 셀룰로즈, 소듐 카복시메틸 셀룰로즈, 셀룰로즈(예를 들어 아비셀(Avicel)(등록상표), RC-591), 트래거캔스 및 소듐 알기네이트를 포함하고; 통상적인 습윤제는 레시틴 및 폴리에틸렌 옥사이드 소르비탄(예를 들어 폴리소르베이트 80)을 포함한다. 통상적인 방부제는 메틸 파라벤 및 소듐 벤조에이트를 포함한다. 다른 구체예에서, 경구적 액체 조성물은 상기 개시된 감미료, 착향료 및 착색제와 같은 하나 이상의 성분도 포함한다.

[0268] 조성물은 또한 활성 재료를 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등과 같은 중합체 화합물의 미립자 제제 상에 또는 그 내부에 혼입시키거나, 리포솜, 마이크로에멀전, 마이셀(micell), 유니라멜라(unilamellar) 또는 멀티라멜라(multilamellar) 베시클, 적혈구 유령세포(erythrocyte ghost) 또는 스페로플라스트(spheroplast)에 혼입시킨 것을 포함한다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 정화율(clearance)에 영향을 미칠 것이다.

[0269] 중합체(예를 들어 폴록사머 또는 폴록사민)로 코팅된 미립자 조성물 및 조직 특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대한 항체에 결합되거나 조직 특이적 수용체의 리간드에 결합된 화합물도 본 발명에 포함된다.

[0270] 일부 구체예에서는, 수용성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로즈, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리프롤린의 공유적 부착에 의해 화합물을 변형시킨다. 다른 구체예에서, 변형된 화합물의 정맥내 주사 후 혈중 반감기는, 상응하는 비변형 화합물에 비하여 실질적으로 더 길어진다. 한 구체예에서, 변형은 또한 수용액 내에서의 화합물 용해도를 증가시키고, 응집(aggregation)을 제거하며, 화합물의 물리적 및 화학적 안정성을 증진하고, 화합물의 면역원성 및 반응성을 크게 감소시킨다. 다른 구체예에서는, 이러한 중합체-화합물 부가물(abduct)을 비변형 화합물에 비해 더 낮은 빈도 또는 더 낮은 용량으로 투여함에 의해 목적하는 생체내 생물학적 활성을 달성한다.

[0271] 일부 구체예에서, 효과적인 양 또는 용량의 제제는 초기에 시험관내 에세이로 평가할 수 있다. 한 구체예에서는, 동물 모델에서 용량을 제형화할 수 있으며, 이러한 정보를 이용하여 인간에서 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정할 수 있다.

[0272] 한 구체예에서, 본 명세서에 기술된 활성 성분의 독성 및 치료적 효능은 표준 약제학적 절차에 의해 시험관내, 세포 배양 또는 실험 동물에서 결정될 수 있다. 한 구체예에서, 이들 시험관내 및 세포 배양 에세이 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에게 사용할 투여량 범위의 제형화에 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 투여량은 채택된 투여형 및 이용하는 투여 경로에 따라 변화한다. 한 구체예에서, 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 병태에 입각하여 의사 개개인에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조).

- [0273] 한 구체예에서, 치료하고자 하는 병태의 중증도 및 반응성(responsiveness)에 따라, 투여는 단일 또는 복수 투여일 수 있으며, 치료 과정은 수 일 내지 수 주 또는 치유가 이루어지거나 질환 상태의 감퇴가 달성될 때까지 지속할 수 있다.
- [0274] 한 구체예에서 투여되는 조성물의 양은, 치료할 대상, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 당연히 종속한다.
- [0275] 한 구체예에서는 또한, 적합성의 약제학적 담체 내에 제형화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물을 제조하여 적절한 용기에 넣고 지시된 병태의 치료에 대해 표지할 수 있다.
- [0276] 한 구체예에서 본 발명의 조성물은, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 투여형을 포함하는 팩(pack) 또는 분급 장치(dispenser device), 예를 들어 FDA 승인 키트 내에 제공된다. 한 구체예에서 팩은, 예를 들어 금속 또는 플라스틱 박막, 예를 들어 발포팩(blister pack)을 포함한다. 한 구체예에서, 팩 또는 분급 장치에는 투여 지침이 동반된다. 한 구체예에서, 팩 또는 분급기는 약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 양식으로 용기와 관련된 고지를 수용하며, 이 고지는 기관에 의해 조성물의 형태 또는 인간 또는 가축 투여가 승인되었음을 반영한다. 한 구체예에서, 이러한 고지는 처방 약물 또는 승인 제품 인서트(insert)에 대하여 미국 식품의약국에 의해 승인된 표지이다.
- [0277] 한 구체예에서는, 본 발명의 폴리펩티드를 추가의 활성 약제와 함께 개체에게 제공함으로써, 각 약제를 단독으로 사용하여 치료하는 경우에 비해 개선된 치료 효과를 달성할 수 있음이 인식될 것이다. 다른 구체예에서는, 조합 요법에 연계된 불리한 부작용에 대한 조치(예를 들어 보완 약제의 선택 및 투여)를 취한다.
- [0278] 본 발명의 추가적인 목적, 장점 및 신규 특징은, 한정을 의도하지 않는 하기 실시예의 고찰에 의해 당업자에게 자명할 것이다. 또한, 상기와 같이 서술되고 하기 청구의 범위 섹션에 청구된 본 발명의 다양한 구체예 및 태양은 각각 하기 실시예에 의해 실험적으로 뒷받침된다.
- [0279] 일반적으로, 본 명세서에 사용된 명명법 및 본 발명에 이용된 실험실적 절차는 분자적, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예를 들어 원용에 의해 포함된 문헌("Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 개시된 방법; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique", Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 이용 가능한 번역 에세이는 예를 들어 하기 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기술됨. 미국 특허 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호 및 제5,281,521호; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 및 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996))을 참조할 수 있다.

[0280] **실시예 1**

[0281] **EPO 작제물의 생성**

[0282] **재료 및 방법:**

- [0283] 발현 벡터 pCI-dhfr의 작제: pCI-neo 포유류 발현 벡터는 프로메가(catalog no.E1841)로부터 구매하였다. 이 벡터는 CMV IE 인핸서/프로모터 및 네오마이신 포스포트랜스페라제 유전자를 포함한다. pSV2-dhfr 클론은 ATCC(Catalog No.37146)로부터 구매하였다. 이 플라스미드는 쥐과 dhfr 유전자를 포함한다. pCI-dhfr 벡터의 작제는 하기와 같이 수행되었다:
- [0284] a. pSV2-dhfr 플라스미드를 제한효소 BglIII로 절단하였다(dhfr 유전자의 3' 말단). DNA 폴리머라제 I, 대(클레노우) 단편(Large (Klenow) Fragment)을 사용하여 5' 돌출부(overhang)를 채움으로써 평활 말단(blunt end)을 형성시켰다. DNA를 제한 효소 AvrII로 절단하였다(dhfr 유전자의 5' 말단). dhfr 유전자(AvrII-평활 말단) 단편을 분리하였다.
- [0285] b. pCI-neo 벡터를 제한효소 BstXI로 절단하였다(neo 유전자의 3' 말단). DNA 폴리머라제 I, 대(클레노우) 단편을 사용하여 3' 돌출부를 제거함으로써 평활 말단을 형성시켰다. DNA를 제한 효소 AvrII로 절단하였다(neo 유전자의 5' 말단). 발현 벡터(AvrII-평활 말단)를 분리하였다.
- [0286] c. dhfr 유전자를 pCI 벡터 내에 결합하여 dhfr 유전자를 포함하는 발현 벡터(pCI-dhfr)를 형성시켰다.
- [0287] hEPO-CTP 변이체의 작제: hCG의 베타 서브유닛의 C-말단 펩티드(CTP)를 포함하는 카세트 유전자(cassette gene)를 상이한 위치에서 인간 EPO (NP_000790.2)의 코딩 서열에 융합시켰다. 도 1a - 도 1d에 설명된 바와 같이 4개의 EPO-CTP 변이체가 작제되었다. 분비성 EPO-CTP 변이체의 작제에는 proEPO 신호 펩티드를 사용하였다. EPO 서열을 포함하는 XbaI - NotI 단편을 본 발명의 pCI-dhfr 발현 벡터에 결합시켰다.
- [0288] 하기의 표 2는 본 발명의 CTP-포함 폴리펩티드의 작제에 사용된 프라이머 서열을 요약한다.

표 2

프라이머 번호	서열 번호	서열	제한효소 부위 (서열 내에 밑줄로 표시)
1	7	5' AATCTAGAGGTCATCATGGGGGTGC 3'	XbaI
2	8	5'ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'	Not I
17 ^R	9	5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI
10	10	5' CCAATATTACCACAAGCCCCACCACGCTCAT 3'	SspI
11 ^R	11	5'TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3'	Not I
15	12	5' GCCCTGCTGTCGGAAGC 3'	
2 ^R	13	5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG	Not I
23 ^R	14	5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	15	5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3'	
38 ^R	16	5' GCTTCGACAGCAGGGC 3'	

- [0290] EPO-1 701-1-p17-6(Epo-1 - 서열 번호 1): 상기 프라이머(서열 번호 7-16)를 사용하는 PCR에 의해 XbaI-NotI 702 bp 단편을 작제하였다. EPO-ctp 서열을 포함하는 XbaI-NotI PCR 단편을 pCI-dhfr 발현 벡터 내에 결합하였다.
- [0291] EPO-2 701-2-p24-2(Epo-2 - 서열 번호 2): pCI-dhfr-401-2-p21-2(hGH-ctpx2)의 XbaI/ApaI 단편(hGH-ctp)을 701-1-p17-6의 XbaI/ApaI 단편(EPO-ctp)으로 교체하여 Epo-ctpx2를 만들었다.
- [0292] EPO-4-701-4-p42-1(Epo-4 - 서열 번호 4): 첫째로, 프라이머 1 및 17을 사용하는 PCR 후에 XbaI/SspI 절단으로 pCI-dhfr- EPO-ctp(701-1-p17-6)로부터의 단편을 작제하였다. EPO 및 부분적 5'CTP를 포함하는 단편이 얻어졌다.
- [0293] 둘째로, 프라이머 10 및 프라이머 11을 사용하여, 템플레이트로서의 pGT123-hEpo 상에서 중첩 PCR(overlapping PCR)에 의해 신규의 단편을 작제하였다. SspI/NotI 절단에 의해 3' 부분적 CTP 및 EPO를 포함하는 단편이 얻어졌다.
- [0294] 두 단편을 pCI-dhfr 내에 결합하여 p701-4-p42-1 클론을 작제하였다.

- [0295] **EPO-3-p56-6(Epo-3 서열 번호 3):** 프라이머는 시그마-제노시스(Sigma-Genosys)로부터 구매하였다. 프라이머 15 (서열 번호 12) 및 프라이머 2^R (서열 번호 13)를 사용하고 pCI-dhfr- EP0-ctp x2(701-2-p24-2)의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 증폭의 결과로서, 486 bp 산물이 형성되고 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01) 내에 결찰되었다. *Epo-ctp x2 서열을 포함하는 Stu I - NotI 단편이 분리되었다(209 bp).
- [0296] 순차적인 3개의 PCR 반응이 수행되었다. 첫 번째 반응은 프라이머 1(서열 번호 7) 및 프라이머 23^R(서열 번호 14)을 사용하고 pGT123-epo-ctp의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 80 bp 산물이 형성되었다(신호 펄스).
- [0297] 두 번째 반응은 프라이머 24(서열 번호 15) 및 프라이머 11^R (서열 번호 11)을 사용하고 701-4-p42-1의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 610 bp 산물이 형성되었다.
- [0298] 마지막 반응은 프라이머 1(서열 번호 7) 및 11^R(서열 번호 11)을 사용하고 앞선 두 반응 산물의 혼합물을 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 700 bp 산물이 형성되고 XbaI-StuI 단편이 분리되었다.
- [0299] 2개의 단편(XbaI-StuI 및 StuI-NotI)을 진핵생물 발현 벡터 pCI-dhfr (삼중 결찰)에 삽입하여 701-3-p56-6 클론을 산출하였다.
- [0300] **EPO-5-p91-4(Epo-5 서열 번호 5 - (ctp- Epo):** 프라이머는 시그마-제노시스에 주문하였다. PCR 반응은 프라이머 1(서열 번호 7) 및 프라이머 11^R(서열 번호 11)을 사용하고 pCI-dhfr- ctp-EP0-ctp x2(701-3-p56-6)를 템플레이트로 하여 수행하였으며; PCR 증폭의 결과로서 670 bp 산물이 형성되어 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01)에 결찰되었다. ctp-Epo 서열을 포함하는 XbaI-NotI 단편을 본 발명의 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr 내에 결찰하여 701-5-p91-4 클론을 산출하였다.
- [0301] **EPO-6-p90-1(Epo-6 서열 번호 6 - (ctp- Epo-ctp):** 3개의 PCR 반응이 수행되었다. 첫 번째 반응은 프라이머 1 (서열 번호 7) 및 프라이머 38^R(서열 번호 16)을 사용하고 701-3-p56-6의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 400 bp 산물이 형성되었다.
- [0302] 두 번째 반응은 프라이머 15(서열 번호 12) 및 프라이머 2^R(서열 번호 13)를 사용하고 701-1-p17-6의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 390 bp 산물이 형성되었다.
- [0303] 마지막 반응은 프라이머 1(서열 번호 7) 및 2^R(서열 번호 13)을 사용하고 앞선 두 반응 산물의 혼합물을 템플레이트로 하여 실행되었으며; PCR 증폭의 결과로서 787 bp 산물이 형성되어 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01) 내에 결찰되었다. ctp-Epo-ctp 서열을 포함하는 XbaI-NotI 단편을 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr에 결찰하여 701-6-p90-1 클론을 산출하였다.
- [0304] **실시예 2**
- [0305] **EPO-CTP 폴리펩티드의 발현 및 분리**
- [0306] **재료 및 방법**
- [0307] **DNA 형질 감염 및 클론 선택:** FuGENE6 시약(FuGENE Transfection Reagent - Roche Cat.11 815 091 001)을 사용하여 EPO-CTP 변이체를 포함하는 pCI-DHFR 발현 벡터로 DG44 세포를 형질 감염시켰다. 형질 감염 후 48 시간에 세포를 희석하여 웰당 50-200 세포로 선택 배지(CD DG44 배지 w/o HT (Gibco: Scotland part: #07990111A) Sku num.:8 mM L-글루타민(Biological Industries: Cat: 03-020-1A)으로 보충된 ME060027 및 18 mL/L의 10 % 플루로닉 F-68 용액 (Gibco: Cat: 240040-032)에 접종하였다. 선택된 클론으로부터 가장 많은 단백질을 생산하는 클론을 상업적인 ELISA를 이용하여 스크리닝하였다. 각 변이체당 3-5 생산 클론을 백업 세포 은행(backup cell bank)을 위해 동결시켰다. 각 변이체에서 선택된 클론을 오비탈 셰이커 플랫폼(orbital shaker platform)에서 1 L 플라스크까지의 대규모 배양에 성장 적응시켰다. 상등액을 수집하여 ELISA, SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅으로 분석하였다. 분석을 취한 후에 단백질-함유 상등액을 추가 사용시까지 동결 보관하였다.
- [0308] **세포 배양:** 8 mM L-글루타민(Biological Industries: Cat: 03-020-1A) 및 18 mL/L의 10% 플루로닉 F-68 용액 (Gibco: Cat: 240040-032)으로 보충한 HT(cat# 12610-010, Gibco)를 함유하는 DG44 배지에서 DG44 세포를 가습

된 8% CO₂ 배양기 내에 37 °C에서 유지 배양하였다. HT 보충제, 하이포크산틴 및 티미딘을 함유하지 않고 플루론산 및 L-글루타민을 함유하는 DG44 기초 배지에서, 형질 감염된 클론을 유지 배양하였다.

[0309] **시료 제조:** 상등액을 수집하고 여과한 후 ELISA로 분석하여 단백질 농도를 결정하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 순도 및 정체성을 결정하였다. ELISA에 이어서, 시료 농도를 정의하고 용액을 PBS에 투석하였다. 분획을 취한 후에, 단백질-함유 상등액을 추가 사용시까지 -20 °C에서 동결 보관하였다.

[0310] **웨스턴 블로팅:** 비변성 15% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 시료를 전기영동하였다. 20%(vol/vol) 메탄올 중의 25 mM 트리스 및 192 mM 글리신 내에서 10 분 동안 겔을 평형시켰다. 미니 트랜스-블롯 전기영동 셀(Mini Trans-Blot electrophoresis cell)(Biorad Laboratories, Richmond, CA)을 사용하여 250 mA에서 3 시간 동안 기공 크기 0.2 μm의 니트로셀룰로즈 막(Sigma, Saint Louis, MO)에 단백질을 이전하였다. 니트로셀룰로즈 막을 5% 탈지 분유 내에 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 막을 EPO 항-혈청(1:1000 역가)과 함께 4 °C에서 밤새 배양한 후 0.1% 트윈을 함유하는 PBS에서 연속 3회 세척하였다(10 분/세척). 호스 라디쉬 퍼옥시다제(HRP: Horse Radish Peroxidase)(Zymed, San Francisco, CA)에 접합된 2차 항체와 함께 실온에서 2 시간 동안 막을 배양한 후, 3회 세척하였다. 마지막으로, 니트로셀룰로즈 지를 증진된 화학발광 기질(ECL: enhanced chemiluminescent substrate)(Pierce, Rockford, IL)과 5 분 동안 반응시키고, 왓만 시트(Whatman sheet)로 건조시키고, X-선 필름에 노출시켰다.

[0311] **결과**

[0312] 하기의 표 3은 선택된 5개 클론으로부터 얻어진 다양한 CTP-변형된 EPO 형태의 농도 및 추가 시험을 위한 그의 제조를 나타낸다.

표 3

#버전	# 클론	스톡 역가 (Stock Titer) IU/ml ¹	Epo3 역가에 따른 모의 상등액 (Mock sup.) 희석 후 IU/ml ²	한외여과 후 IU/ml ³
Epo0 서열 번호 16	17	3093	102	335
Epo1 서열 번호 1	47	1049	104	291
Epo2 서열 번호 2	67	2160	110	303
Epo3 서열 번호 3	85	105	119	392
Epo4 서열 번호 4	112	6100	ND	342

[0314] 1. EPO 변이체 스톡 농도는 ELISA에 의해 결정되었다(Quantikine IVD Epo ELISA, DEPO0, R&D Systems).

[0315] 2. 시료 EPO-0, 1, 2 및 4는 모의 상등액에서 105 IU/ml로 희석되었다(Epo3 역가에 맞춤). Epo0 = CTP 변형된 EPO와 동일한 시스템에서 발현된 야생형 EPO.

[0316] 3. 모든 시료를 농축하여 PBS에 대한 한외여과에 의해 최종 농도 180 IU/ml로 투석하였다.

[0317] 모든 단백질은 도 2에 설명된 바와 같이 웨스턴 블로팅에 의해 검출되었다.

[0318] **실시예 3**

[0319] **본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드의 생물학적 활성**

[0320] TF-1 생물 활성 시험은 EPO-CTP 변이체가 그의 수용체에 결합하여 세포 증식을 유발하는 활성을 자극하는 능력을 나타낸다. 그러므로 이 시험은 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드의 생물학적 효능을 평가하는 첫 단계로 이용되었다.

[0321] **재료 및 방법**

[0322] **세포 증식 분석:** EPO 활성의 함수로서 MTT 세포 염색의 수준을 측정하여, TF-1 세포주로 증식 에세이를 수행하였다(Kitamura *et al.*, Kitamura, T. *et al.* (1989) *Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates*; Hammerling U. *et al.* In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. *Journal of Pharm. Biomed. Analysis* 14(11): 1455-1469 (1996)). 지수적으로 성장하는 TF-1 세포를 2회 세척하고, 약 10^4 세포/웰로 마이크로타이터 플레이트에 평판 배양하여 기초 배지 내에서 적정된 연속 희석 EPO(레코몬), EPO 표준품(NIBSC 표준품), rhEPO (MOD-7010), MOD-701 변이체 (EPO-1, EPO-2, EPO-3 및 EPO-4)와 함께 48 시간 동안 배양하였다. 세포 증식 에세이를 실시하기 4 시간 전에, MTT 시약을 웰에 가하고 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다. 에프렉스(에포에틴(EPO)-인간 호르몬의 인공 형태)의 용량-반응 표준 곡선으로부터, 각 변이체 단백질에 대하여 계산된 단백질 농도 값이 얻어졌다.

[0323] **결과**

[0324] EPO-의존성 세포주, 인간 적백혈병 TF-1(DSMZ Cell Bank)으로 EPO 폴리펩티드의 시험관내 생물학적 활성을 결정하였다(Dong *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 339, Issue 1, 6 January 2006, Pages 380-385). MTT 에세이를 수행하여(Hammerling U. *et al.* In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. *Journal of Pharm. Biomed. Analysis* 14(11): 1455-1469 (1996)), 표준 곡선을 생성시키기 위해 사용된 EPO의 실험실 표준품을 국제 표준(NIBSC의 Epo 앰플 코드 87/684)에 대해 보정하였다.

[0325] 결과는 하기의 표 4에 요약된다. 이 결과는 2 IU/ml 및 0.5 IU/ml 농도에서 모두 EPO 3 및 EPO 0을 사용할 때 가장 높은 효능이 달성됨을 나타낸다.

표 4

[0326]

에프렉스 STD	TF-1 생물 활성 IU/ml						
IU/ml	EPO 0 서열 번호 16	EPO 1 서열 번호 1	EPO 2 서열 번호 2	EPO 3 서열 번호 3	EPO 4 서열 번호 4	레코몬	EPO st
2	4.93	2.32	2.13	6.91	3.55	3.44	7.40
0.5	1.60	0.76	0.53	1.34	0.84	0.87	1.53

[0327] **결론**

[0328] 상기 표 4에 요약된 바와 같이 EPO-CTP 폴리펩티드들은 상이한 수준의 효능을 나타냄으로써 수용체 결합에 있어서 차이가 있음을 시사하였다. EPO-CTP 폴리펩티드들은 CTP 카세트의 수 및 그의 융합 위치에 있어서 상이하다. EPO-1 및 EPO-2는 1개 CTP 서열 또는 2개 CTP 서열을 EPO의 C-말단에 포함하는 반면에, EPO-3은 N-말단에 1개 CTP 및 C-말단에 2개 CTP 서열을 포함한다. EPO-4는 2개 EPO 분자가 CTP 서열에 의해 연결된 이량체이다. EPO-3은 WT-EPO와 상당히 유사한 효능 수준을 나타내는 반면에, EPO-1 및 EPO-4는 WT-EPO 보다 약 50% 약한 효능을 보였고, EPO-2는 50% 보다도 더욱 낮은 효능을 보였다.

[0329] **실시예 4**

[0330] **마우스 모델에서 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드의 평가**

[0331] 하기 실험은 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드와 상업적 EPO의 생물 활성을 비교하기 위하여 수행되었다.

[0332] **재료 및 방법**

[0333] **동물:**

[0334] 종/품종: 약 20-25 g의 각 성별의 ICR 또는 CD-1 마우스

[0335] 그룹 크기: n=7

[0336] 그룹 수: 9

[0337] 동물 총수: n=63

[0338] 연구 실험 설계: 하기의 표 5에 요약된 바와 같이 실험을 구성하였다.

표 5

[0339]

그룹 번호	그룹 당 마우스 수	처리		투약 처방 계획
		화합물	투여 수준	
1	n=7	비히클 (대조군)	0	주 1회
2		모의		
3		MOD-7010	15 µg/kg	
4		MOD-7011		
5		MOD-7012		
6		MOD-7013		
7		MOD-7014		
8		상업적	15 µg/kg	
9		rhEPO	5 µg/kg	주 3회

[0340] 동물 처리: 모든 동물에게 대조군 또는 본 발명의 시험 EPO 폴리펩티드를 볼루스 주사로 투여하였다. 주사 부피는 10 ml/kg을 초과하지 않았다. 실험 기간은 22 일이었다. 이환율(morbidity) 및 사망율은 매일 조사하였다.

[0341] 망상 적혈구 계수 및 적혈구 용적율(hct) 검사: 각각 비히클 또는 처리의 최초 주사 후 제2일 및 14 시간에 모든 시험 동물에서 망상 적혈구 계수를 실행하였다. HCT는 모든 동물에서 초기 처리 전에 1회("0" 기준선 대조군) 및 각각 비히클 또는 처리의 최초 주사 후 24 시간에 결정하였고, 그 후로는 연구 종료(제22일)까지 주 2회 결정하였다.

[0342] 결과

[0343] 도 3 - 도 5에 설명된 적혈구 용적율 결과는, EPO 1, EPO 2, 레코몬 1, 레코몬 3, rhEPO, 및 비히클과 비교할 때 EPO 3가 가장 높은 기준선 대비 적혈구 용적 백분율 변화를 나타냄을 보여준다. EPO-CTP 폴리펩티드로 처리한 마우스에서의 망상 적혈구 백분율을 나타내는 결과는 하기의 표 6에 요약된다. 이들 결과는 EPO-3이 적혈구 생성을 가장 강력하게 자극함을 입증한다.

표 6

[0344]

일	% 망상 적혈구	
	2	14
대조군	3.72	3.46
	1.08	0.8
모의	3.5	3.64
	0.6	1.13
7010 서열 번호 16	3.5	3.9
	0.6	1.54
7011 서열 번호 1	3.52	1.94
	1.38	1.08
7012 서열 번호 2	3.82	3.0
	1.02	0.88
7013 서열 번호 3	2.66	5.20
	0.97	2.96
7014 서열 번호 4	3.48	3.82
	0.71	0.90
레코몬 1/W	3.23	3.27
	0.73	0.59
레코몬 3/W	4.13	4.24
	1.21	1.14

[0345] 결론

[0346] 생체내 실험은 2개 변수를 측정하기 위해 설계되었다; 첫 번째는 망상 적혈구 백분율 및 헤모글로빈, RBC 및 적혈구 용적을 수준의 증가와 같은 적혈구 생성 변수를 측정하는 것이었다. 두 번째는 주 1회 용량의 주사에 의한 각 변이체의 생물학적 활성의 내구성을 측정하는 것이었다. 적혈구 생성을 자극하는 능력에 있어서 EPO-3가 정상 마우스에서 우수한 성과를 나타내었다.

[0347] 실시예 5

[0348] 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드의 아라네스프에 대한 비교

[0349] 하기 실험은 본 발명의 일부 EPO-CTP 폴리펩티드, 상업적 EPO 및 아라네스프의 단일 볼루스 용량의 생물학적 활성을 비교하기 위해 수행되었다. 아라네스프는 상업적인 장기 작용 재조합 에리트로포이에틴으로서, 여기에는 2개의 부위 돌연변이가 도입됨으로써 추가의 2개 N-글리코실화 부위가 생기고 혼입된 시알산 잔기의 수가 증가되어 있다.

[0350] 재료 및 방법

[0351] 동물:

[0352] 종/품종: 약 20-25 g의 각 성별의 자성 CD-1 마우스

[0353] 그룹 크기: n=3

[0354] 연구 실험 설계: 하기의 표 7에 요약된 바와 같이 실험을 구성하였다.

표 7

그룹 #	시험 품목	동물/ 그룹/ 시점	용량 용액 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	용량 부피 (mL/kg)	시점 * (투여 후 시간)
1	MOD-7010 서열 번호 11	3	1.5	10	0 (투여 전), 용량 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 및 336 시간
2	MOD-7013 서열 번호 3	3	1.5	10	용량 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 및 336 시간
3	아라네스프	3	1.5	10	용량 투여 후 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 및 336 시간

[0356] 동물 처리: 모든 동물에게 대조군 또는 본 발명의 시험 EPO 폴리펩티드를 볼루스 주사로 투여하였다. 주사 부피는 10 ml/kg을 초과하지 않았다. 실험 기간은 14 일이었다. 이환율 및 사망율은 매일 조사하였다.

[0357] 망상 적혈구 계수 및 적혈구 용적율(hct) 검사: 망상 적혈구 계수 및 적혈구 용적율 검사는 상기한 바와 같이 수행되었다.

[0358] 결과

[0359] 결과는 도 6 - 도 9에 설명된다. 15 $\mu\text{g/kg}$ 의 EPO 3을 단일 I.V. 주사한 후에, 적혈구 생성과 연계된 3개 변수 모두, 즉 망상 적혈구 수, 헤모글로빈 수준 및 적혈구 용적율이 rhEPO 또는 아라네스프의 유사한 주사 용량에 의해 얻어지는 것에 비해 개선되었다.

[0360] 실시예 6

[0361] 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드의 아라네스프에 대한 약물동력학적 비교

[0362] 하기 실험은 본 발명의 EPO-CTP 폴리펩티드, 상업적 EPO 및 아라네스프의 약물동력학을 비교하기 위해 수행되었다.

[0363] 재료 및 방법

[0364] 각 시료의 특이적 농도 수준을 결정하기 위하여 혈청 시료를 분석하였다. 농도 및 시점 데이터는 WinNonLin 비

구획 분석(noncompartmental analysis)을 이용해 처리하였다. 결정된 변수는 AUC, CL, Ke, t1/2, Cmax, Tmax 및 Vdz를 포함한다.

[0365] 혈청 농도는 2개 ELISA 키트를 병행으로 사용하여 결정하였다. EPO-3 혈청 농도는 스템셀(StemCell) ELISA 키트로 결정하여, R&D 시스템 ELISA 키트로 결정한 EPO-0 및 아라네스프 혈청 농도와 비교하였다.

[0366] **결과**

[0367] 약물 동력학 분석 결과는 하기의 표 8에 요약된다. 이들 결과는 예를 들어 AUC 측정, t1/2, 및 Cmax에서 나타나는 바와 같이 EPO 3이 유리한 약물 동력학적 측정을 보였음을 입증한다. Tmax 측정은 EPO-0, EPO-3 및 아라네스프와 동일하였다.

표 8

[0368]

변수	단위	EPO-0	EPO-3	아라네스프
AUClast	hr*mIU/mL	31739	306072	178661
CL [^]	mL/hr/kg	1.1152	0.2188	0.1207
Ke	1/hr	0.157	0.0529	0.0639
t1/2	hr	4.4139	13.1141	10.84
Cmax	mIU/mL	10766	16466	13266
Tmax	Hr	0.25	0.25	0.25
Vdz	mL/kg	7.1017	4.1394	1.8877

[0369] 혈청 농도 분석의 결과는 도 9에 설명된다. 이들 결과는 EPO-3이 약 190 시간 후에도 여전히 혈청에서 검출 가능하였음을 보여준다. EPO-0 및 아라네스프는 모두 각각 약 140 시간 및 50 시간 후에 혈청에서 검출되지 않았다.

[0370] **결론**

[0371] CD-1 마우스의 혈액으로부터 EPO-3(MOD-7013)의 정화율은 rhEPO 또는 아라네스프의 경우에 비해 유의적으로 느렸다. 상응하는 계산 반감기는, rhEPO - 4.41 시간; 아라네스프 - 0.84 시간; 및 MOD-7013 - 13.11 시간이었다.

[0372] **실시예 7**

[0373] **hGH 작제물의 생성**

[0374] **재료 및 방법**

[0375] 4개의 hGH 클론(20kD 단백질의 변이체)이 합성되었다. 4개 변이체로부터의 hGH 서열을 포함하는 Xba I - Not I 단편들을, XbaI - NotI로 미리 절단한 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr 내에 결합하였다. 4개 클론으로부터의 DNA(401-0, 1, 2, 3 및 4)를 준비하였다. 22kD 단백질로부터 또 다른 부분적 hGH 클론(1-242 bp) 또한 합성하였다(0606114). 프라이머는 시그마-제노시스에 주문하였다. 본 발명의 hGH-CTP 폴리펩티드를 생성시키기 위해 사용된 프라이머 서열은 하기의 표 9에 요약된다.

표 9

[0376]

프라이머 번호	서열 번호	서열	제한효소 부위 (서열 내에 밑줄로 표시)
25	27	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	30	5' CCAAACTCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTCG 3'	

37 ^R	34	5' ACGCGGCCGCATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 ^R	35	5' GCGGCCGCGGACTCATCAGAAGCCGAGCTGCCC 3'	

- [0377] **402-0-p69-1(hGH) 서열 번호 36의 작제:** MOD-4020은 하기 실험에서 대조군으로 사용하기 위해 제조된 야생형 재조합 인간 성장 호르몬(CTP 부재)이다.
- [0378] 3개의 PCR 반응이 수행되었다. 첫 번째 반응은 프라이머 25 및 프라이머 32^R를 사용하고 0606114(hGH 1-242 bp의 부분적 클론)의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 245 bp 산물이 형성되었다.
- [0379] 두 번째 반응은 프라이머 33 및 프라이머 4^R를 사용하고 401-0-p57-2의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 542 bp 산물이 형성되었다.
- [0380] 마지막 반응은 프라이머 25 및 프라이머 4^R를 사용하고 앞선 두 반응 산물의 혼합물을 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 705 bp 산물이 형성되어 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01) 내에 절찰되었다. hGH-0 서열을 포함하는 XbaI - NotI 단편을 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr 내에 절찰하였다. 이 벡터를 DG-44 CHO 세포에 형질 감염 시켰다. 세포를 단백질이 없는 배지에서 성장시켰다.
- [0381] **402-1-p83-5(hGH-CTP) - 서열 번호 37 및 402-2-p72-3(hGH-CTPx2) - 서열 번호 38의 작제:** MOD-4021은 1 카피(copy)의 인간 용모막 고나도트로핀 베타 쇠의 C-말단 펩티드(CTP)에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4021의 CTP 카세트는 C-말단에 부착되었다(1개 카세트). MOD-4022는 2 카피의 인간 용모막 고나도트로핀 베타 쇠의 C-말단 펩티드(CTP)에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4022의 2개 CTP 카세트는 C-말단에 부착되었다(2개 카세트).
- [0382] hGH-CTP 및 hGH-CTP-CTP의 작제는 hGH-0의 작제와 동일한 방법으로 수행되었다. pCI-dhfr-401-1-p20-1(hGH*-ctp) 및 pCI-dhfr-401-2-p21-2(hGH*-ctp x2)를 두 번째 PCR 반응에서 템플레이트로 사용하였다.
- [0383] MOD-4021 및 MOD-4022는 DG-44 CHO 세포에서 발현되었다. 세포는 단백질이 없는 배지에서 성장시켰다. hGH가 22 Kd의 MW를 가지며 각 "CTP 카세트"가 전체 분자량에 8.5 Kd를 기여하므로(도 10 참조), MOD-4021의 분자량은 ~30.5 Kd이다. MOD-4022의 분자량은 ~39 Kd이다(도 10 참조).
- [0384] **402-3-p81-4(CTP-hGH-CTP-CTP) - 서열 번호 39 및 402-4-p82-9(CTP*hGH-CTP-CTP) - 서열 번호 40의 작제:** MOD-4023은 3 카피의 인간 용모막 고나도트로핀 베타 쇠의 C-말단 펩티드(CTP)에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4023의 3개 CTP 카세트는 N-말단(1개 카세트) 및 C-말단(2개 카세트) 모두에 부착되었다. MOD-4024는 1개 절단된 카피 및 2개 완전한 카피의 인간 용모막 고나도트로핀 베타 쇠의 C-말단 펩티드(CTP)에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4024의 절단된 CTP 카세트는 N-말단에 부착되었고, 2개의 CTP 카세트는 C-말단에 부착되었다(2개 카세트).
- [0385] 3개의 PCR 반응이 수행되었다. 첫 번째 반응은 프라이머 25 및 프라이머 35^R를 사용하고 p401-3-p12-5 또는 401-4-p22-1의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 265 또는 220 bp 산물이 형성되었다. 두 번째 반응은 프라이머 34 및 프라이머 37^R를 사용하고 TA-hGH-2-q65-1의 플라스미드 DNA를 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 695 bp 산물이 형성되었다. 마지막 반응은 프라이머 25 및 프라이머 37^R를 사용하고 앞선 두 반응 산물의 혼합물을 템플레이트로 하여 수행되었으며, PCR 증폭의 결과로서 938 또는 891 bp 산물이 형성되어 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01) 내에 절찰되었다. hGH 서열을 포함하는 Xba I - Not I 단편은 본 발명의 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr 내에 절찰되었다..
- [0386] MOD-4023 및 MOD-4024는 DG-44 CHO 세포에서 발현되었다. 세포는 단백질이 없는 배지에서 성장시켰다. MOD-4023의 분자량은 ~47.5 Kd이고 (도 10 참조) MOD-4024의 분자량은 ~43.25 Kd이다(도 10 참조).
- [0387] **402-6-p95a-8(CTP-hGH-CTP) - 서열 번호 41의 작제:** hGH-6의 작제는 hGH-3의 작제와 동일한 방법으로 수행되었다. 두 번째 PCR 반응에서는 pCI-dhfr-402-1-p83-5(hGH-ctp)를 템플레이트로 사용하였다.
- [0388] **402-5-p96-4(CTP-hGH) - 서열 번호 42의 작제:** 프라이머 25 및 프라이머 39^R를 사용하고 pCI-dhfr- ctp-EPO-

ctp(402-6-p95a-8)를 템플레이트로 하여 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 증폭의 결과로서 763 bp 산물이 형성되어 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01) 내에 결합되었다. ctp-hGH 서열을 포함하는 Xba I - Not I 단편은 본 발명의 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr 내에 결합되어 402-5-p96-4 클론을 산출하였다.

[0389] 실시예 8

[0390] 본 발명의 hGH-CTP 폴리펩티드의 생체내 생물 활성 시험

[0391] 상업적 재조합 인간 GH 및 MOD-4020과 비교하여 hGH-CTP 폴리펩티드의 잠재적 장기 작용 생물학적 활성을 시험하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[0392] 재료 및 방법

[0393] 자성 하수체 적출 랫트(60-100 g)에게 매주 21.7 μ g hGH-CTP 폴리펩티드를 S.C. 주사하거나 매일 5 μ g의 대조군 상업적 rhGH를 S.C. 주사하였다.

[0394] 모든 동물의 체중을 처리 전 및 최초 주사 후 24 시간에 측정하고, 그 후부터 제21일의 연구 종료까지는 격일로 측정하였다. 각 점은 그룹의 평균 체중 증가 백분율((제0일 체중-최종일 체중)/제0일 체중)을 나타낸다. 평균 체중 증가를 상업적 hGH의 일일 주사에 대하여 표준화하였다. 처리 일정은 표 10에 요약된다.

표 10

번호	약물	N	경로	처리 일정	동물 용량 (μ g/rat)	누적 투여량 (μ g/rat)	용량 부피 (ml)
1	베시클	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	NA	NA	0.25
2	모의	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	NA	NA	0.25
3	MOD-4020 서열 번호 36	7	s.c.	제 1, 7 및 13; 1/W	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 서열 번호 37	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 서열 번호 38	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 서열 번호 39	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 서열 번호 40	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
8	상업적 hGH v.1	7	s.c.	제 1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
9	Commercial hGH v.1	7	s.c.	제 1-13 일; d/W	5	65	0.25

[0396] 결과

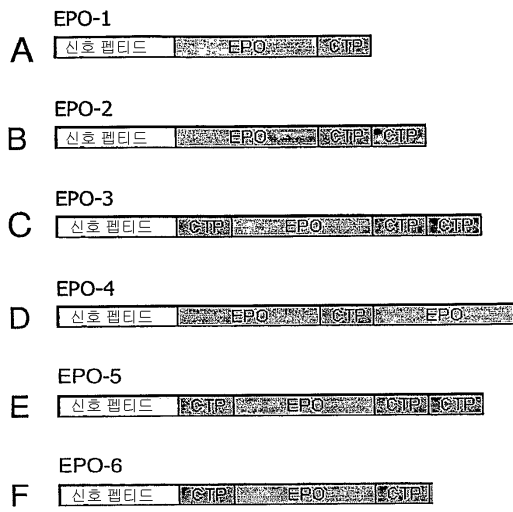
[0397] 결과는 도 11에 요약된다. 이들 결과는 100% 체중 증가를 유도한 상업적 rhGH에 비하여 MOD-4023(서열 번호 39) 및 MOD-4024(서열 번호 40)는 120% 이상의 체중 증가를 유도하였음을 보여준다.

[0398] 결론

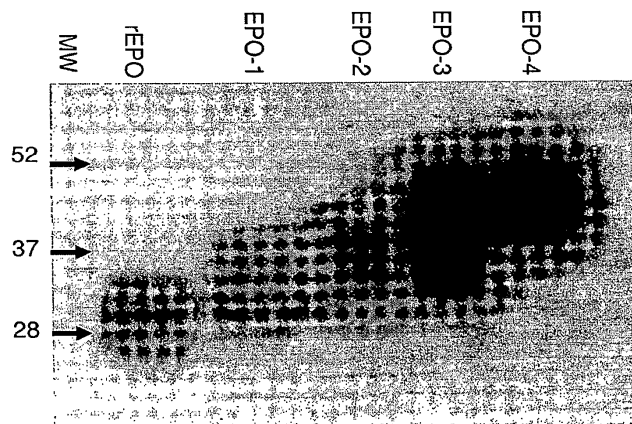
[0399] 21.7 μ g의 MOD-4023(서열 번호 39) 및 MOD-4024(서열 번호 40)의 3 주간 주 1회 용량(주사일; 1, 7, 및 13)은, 5 μ g의 용량으로 13 일 동안 매일 1회 투여하여 동일한 누적 용량으로 주사된 상업적 rhGH와 비교할 때, 하수체 적출 랫트에서 30% 높은 체중 증가를 유도하였다.

도면

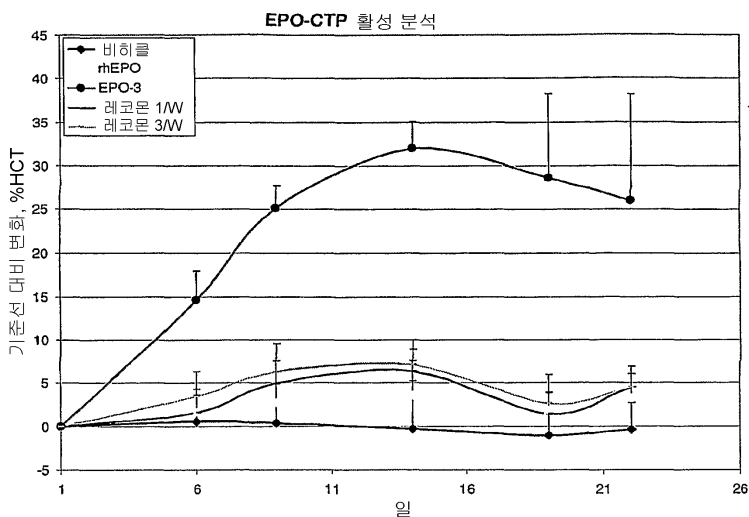
도면1



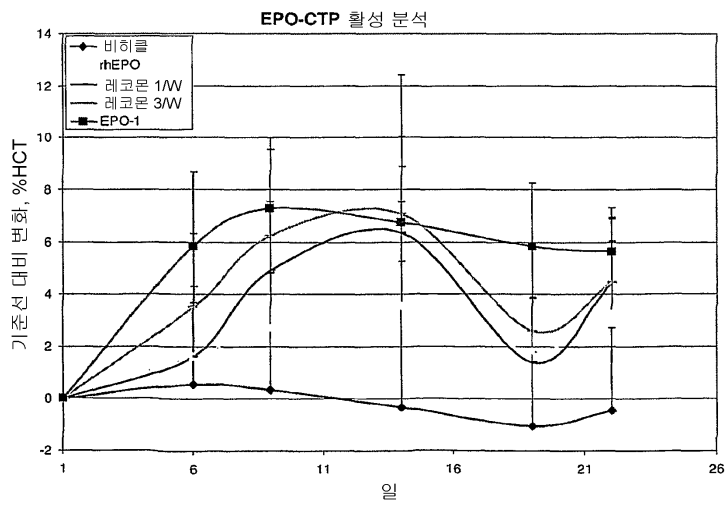
도면2



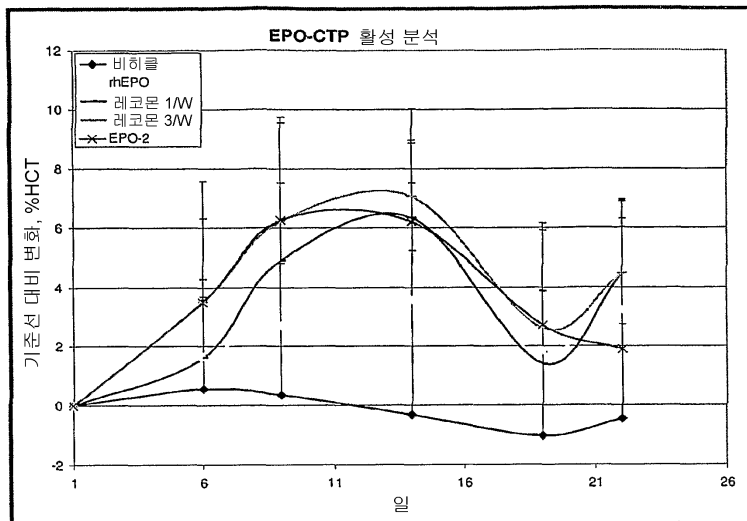
도면3



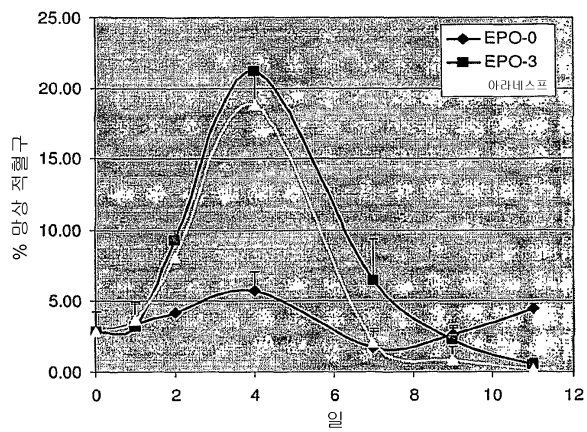
도면4



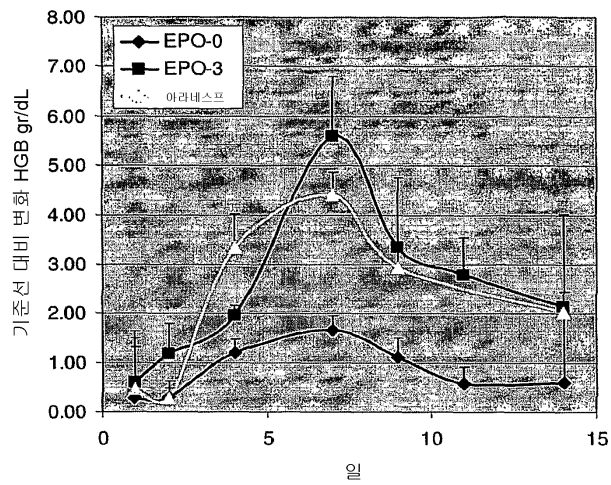
도면5



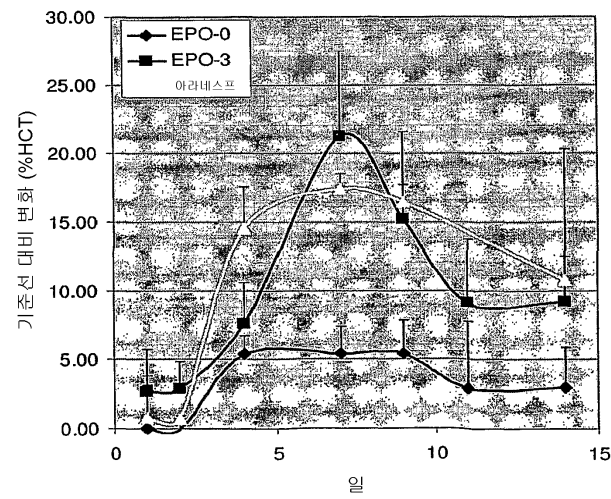
도면6



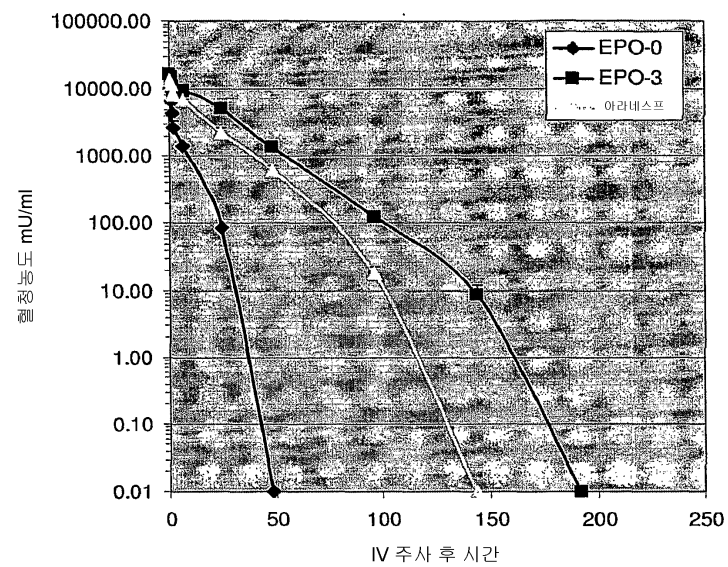
도면7



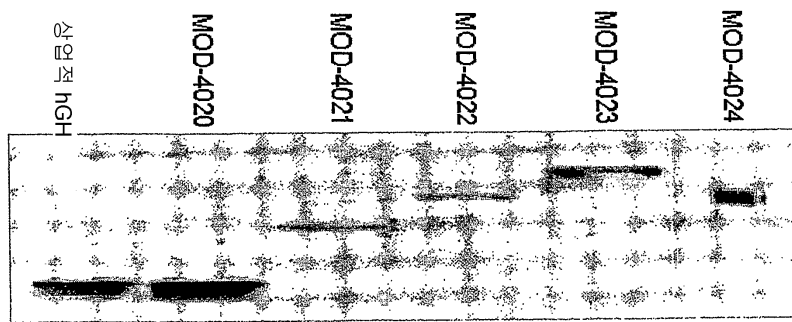
도면8



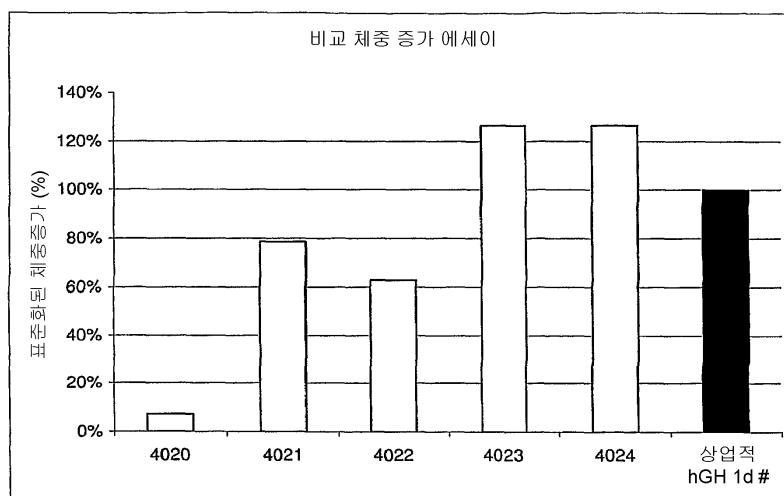
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> FARES, Fuad

FIMA, Udi Eyal

<120> LONG-ACTING POLYPEPTIDES AND METHODS OF PRODUCING AND ADMINISTERING SAME

<130> P-9520-PC1

<140> PCT

<141> 2007-02-05

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190
Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220
<210> 2
<211> 249
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

100 105 110

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

115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu

165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly

225					230					235					240		
Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln									
				245													
<210>	3																
<211>	277																
<212>	PRT																
<213>	Homo sapiens																
<400>	3																
Met	Gly	Val	His	Glu	Cys	Pro	Ala	Trp	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu		
1				5				10				15					
Leu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys		
				20					25					30			
Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser		
				35					40					45			
Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser		
				50					55					60			
Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile		
65					70					75					80		
Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val		
				85					90					95			
Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly		
				100					105					110			
Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala		
				115					120					125			
Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu		
				130					135					140			
Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu		
145					150					155					160		
Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro		
				165					170					175			
Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr		

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
245 250 255
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
260 265 270

Pro Ile Leu Pro Gln

275

<210> 4

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

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

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro
210 215 220

Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala
225 230 235 240

Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu
245 250 255

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
260 265 270

Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu
275 280 285

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn
290 295 300

Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val
305 310 315 320

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln
325 330 335

Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg
340 345 350

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn

355 360 365
 Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr
 370 375 380
 Gly Asp Arg
 385
 <210> 5
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

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

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

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

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190
Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205
Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
210 215 220
<210> 6
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80
Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95
Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140
Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr

180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu

195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser

210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly

225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

245

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Artificial short sequence

<400> 7

aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Artificial short sequence

<400> 8

attgcggccg cggatccaga agacctttat tg 32

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Artificial short sequence

<400> 9

taaatatattgg ggtgtccgag ggccc	25
<210> 10	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 10	
ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at	32
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 11	
tgcggccgcg gatccttata tgteccctgt cctgc	35
<210> 12	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 12	
gccctgctgt cggaagc	17
<210> 13	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 13	
attgcggccg cggatccaga agacctttat tg	32
<210> 14	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	

<400> 14

ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc

32

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Was it fun? Wierd? Tell me about it

<400> 15

cctgggctcc tcttcctcaa aggc

24

<210> 16

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

100 105 110

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

115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190
Arg

<210> 17
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Artificial short sequence
<400> 17

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30
Pro Gln

<210> 18
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Artificial short sequence
<400> 18

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15
Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 19
<211>
> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly

20 25

<210> 20

<211> 786

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg ctgtggcttc tctgtccct 60

tctgtcgtc cctctgggcc tccagtcct gggtcctct tctcaaagg cccctcccc 120

gagccttcca agtccatccc gactcccggg gcctcggac accccaatat taccacaagc 180

cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtcaactct tccagccgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctaccactc tgcctcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcttccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct ctctctcaa ggccctccc ccgagccttc caagtccatc 720

ccgactcccc gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc 780

ggccgc 786

<210> 21

<211> 873

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg ctgtggcttc tctgtccct 60

tctgtcgtc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tctcaaagg cccctcccc 120

gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180

cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctcaccactc tgttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct ctctctcaaa ggccctccc ccgagccttc caagtccatc 720

ccgactcccc gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc 780

tctccatcc ctgccatccc cctccggct gcttgcccc tctgacacce ctatctgcc 840

tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc 873

<210> 22

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 22

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Ser Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

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

 Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 195 200 205
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 210 215 220
 <210> 23
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

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

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln

1 5 10 15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu

20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln

35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln

50 55 60

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

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

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15
 Thr Thr Ala Leu Ser
 20

<210> 27

<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 27	
ctctagagga catggccac	19
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 28	
acagggaggt ctgggggttc tgca	24
<210> 29	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 29	
tcgagaaccc ccagacctcc ctgtgc	26
<210> 30	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 30	
ccaaactcat caatgtatct ta	22
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 31	

ctctagagga catggccac	19
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 32	
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc	25
<210> 33	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 33	
gcctttgaca cctaccagga gttcg	25
<210> 34	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 34	
acgcggccgc atccagacct tcatcactga ggc	33
<210> 35	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Artificial short sequence	
<400> 35	
gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gccc	34
<210> 36	
<211> 217	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	

<400> 36

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215

<210> 37

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro

210 215 220

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr

225 230 235 240
 Pro Ile Leu Pro Gln
 245
 <210> 38
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190

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

<210> 39
 <211> 301
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 39

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

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

115 120 125
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 130 135 140
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 165 170 175
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 180 185 190

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

 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270
 Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 290 295 300

 <210> 40
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala

20 25 30
 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 35 40 45
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 50 55 60
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr

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

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

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

 260 265 270

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
275 280 285

<210> 41

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

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

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

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp

195 200 205
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

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

Gln

<210> 42

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

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

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

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val

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

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

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial short protein

<400> 43

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

1 5 10

<210> 44

<211> 853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggetccac ccccatctct 120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180

catccccctg agcaggctgt tgcacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct	240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag	300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgcctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttgccaaca gcctggtgta	480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta	600
cagcaagtgc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct	660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc	780
ctcccaagc aggtgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc	840
tggatgcggc cgc	853
<210> 45	
<211> 937	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 45	
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg	60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggtccac ccccatctct	120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac	180
catccccctg agcaggctgt tgcacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct	240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag	300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgcctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttgccaaca gcctggtgta	480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta	600
cagcaagtgc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct	660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc	780
ctcccaagc aggtgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcttc	840

taaggccctt cctccatccc tgccatcccc ctcccggctg cctggccctt ctgacacccc 900
 tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937
 <210> 46
 <211> 889
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggtccac ccccagcct 120
 gcccttcccc accatcccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggtcacag 180
 gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccagga 240
 gcagaagtac agcttcctgc agaaccccc gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc 300
 cccccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc 360
 cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcaa 420
 cagcctgggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480
 gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540
 caagcagacc tacgcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgcc tgctgaagaa 600
 ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tctgaggat 660
 cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc 720
 cccgagcctg ccttcccaa gcaggtgcc tgggcccctc gacacaccaa tcttgccaca 780
 gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc cctcccggc tgccctggccc 840
 ctctgacacc cctatctgc ctcatgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

<210> 47
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165 170 175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

180 185 190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys

195 200 205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215