



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0058388
(43) 공개일자 2019년05월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **A61K 9/00** (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) **C12N 15/86** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7037891
- (22) 출원일자(국제) 2017년10월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년12월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/056030
- (87) 국제공개번호 WO 2018/071465
국제공개일자 2018년04월19일
- (30) 우선권주장
62/406,552 2016년10월11일 미국(US)

- (71) 출원인
웰스테이트 웹탈릭스 코퍼레이션
 미국 메릴랜드 20850, 록빌, 스위트 600, 세이디
 그로브 로드 14200
- (72) 발명자
루오, 티안시
 미국, 메릴랜드 21029, 클라크스빌, 티퍼래리 코
 트 6512
장, 준
 미국, 메릴랜드 21029, 클라크스빌, 스위프트 커
 런트 웨이 6109
- (74) 대리인
특허법인세신

전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **짧은 형태의 간상체 유래 원추체 생존능 인자와 친수성 펩타이드 사이의 융합 단백질**

(57) 요 약

제1 N-말단 신호 펩타이드 서열, 신호 펩타이드 서열의 C-말단 쪽의 제2 펩타이드 서열 및 제2 펩타이드 서열의 C-말단 쪽의 제3 펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질이 기재된다; 상기 제2 펩타이드 서열 및 상기 제3 펩타이드 서열 중 하나는 RdCVF-짧은 펩타이드 서열이고 다른 하나는 친수성 펩타이드 서열인 것을 특징으로 하는 방법이다. 번역 후, 신호 펩타이드가 절단되어, 제2 펩타이드 서열 및 제3 펩타이드 서열-신호 펩타이드를 포함하는 융합 단백질이 남는다. 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 발현 벡터, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포뿐만 아니라 융합 단백질, 핵산 및 발현 벡터의 처리 및 용도에 관한 것이다. 융합 단백질은 코딩된 융합 단백질의 발현 및 분비를 허용하는 조건하에 본 발명의 세포를 배양하고 융합 단백질을 세포 배양물로부터 분리함으로써 시험관 내에서 생성될 수 있다.

대 표 도 - 도1a

M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L
 E N R L V LL F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L
 T D E E Y V L R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L
 K D M P K K W L F L P F E D D L R R (SEQ ID NO:5)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/0036 (2013.01)
C12Y 108/01008 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 제1 N-말단 신호 웨타이드 서열, 상기 신호 웨타이드 서열 C-말단의 제2 웨타이드 서열 및 상기 제2 웨타이드 서열 C-말단의 제3 웨타이드 서열; 또는

(b) 제2 웨타이드 서열 및 상기 제2 웨타이드 서열 C-말단의 제3 웨타이드 서열;을 포함하고

상기 제2 웨타이드 서열 및 상기 제3 웨타이드 서열 중 하나는 RdCVF-짧은 웨타이드 서열이고 다른 하나는 친수성 웨타이드 서열인, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제2 웨타이드 서열은 RdCVF-짧은 웨타이드 서열이고 상기 제3 웨타이드 서열은 친수성 웨타이드 서열인, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 웨타이드 서열은 친수성 웨타이드 서열이고 상기 제3 웨타이드 서열은 RdCVF-짧은 웨타이드 서열인, 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신호 웨타이드 서열은 인간 신호 웨타이드 서열인, 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 신호 웨타이드 서열은 Igk 신호 웨타이드 서열 및 일부민 신호 웨타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 일부민 신호 웨타이드 서열은 인간 일부민 신호 웨타이드 서열인 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 RdCVF-짧은 웨타이드 서열은 인간 RdCVF-짧은 웨타이드 서열인 것인, 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 RdCVF-짧은 웨타이드 서열은 RdCVF1 짧은 웨타이드 서열 및 RdCVF2-짧은 웨타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 융합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 친수성 웨타이드 서열은 친수성 단백질, 친수성 단백질 도메인, 친수성 올리고웨타이드 및 친수성 폴리웨타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 융합 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 친수성 웨타이드 서열이 일부민인, 융합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 일부민은 인간 일부민인, 융합 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 친수성 펩타이드 서열은 사람에게 면역원성이 아닌 것인 융합 단백질.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 소수성 지수가 -0.20 미만인, 융합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 융합 단백질은 소수성 지수가 -0.30 미만인, 융합 단백질.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 제1 펩타이드 서열은 단일 펩타이드 결합에 의해 상기 제2 펩타이드 서열에 공유 결합되는 것인, 융합 단백질.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 제1 펩타이드 서열과 상기 제2 펩타이드 서열 사이에 스페이서가 존재하는 것인, 융합 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제1 펩타이드 서열과 상기 제2 펩타이드 서열 사이의 스페이서는 2 내지 14개의 아미노산을 갖는 것인, 융합 단백질.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 제2 펩타이드 서열은 단일 펩타이드 결합에 의해 상기 제3 펩타이드 서열에 공유 결합되는 것인, 융합 단백질.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 제2 펩타이드 서열과 상기 제3 펩타이드 서열 사이에 스페이서가 존재하는 것인, 융합 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 및 상기 제3 펩타이드 서열 사이의 스페이서는 2 내지 4개의 아미노산을 갖는 것인, 융합 단백질.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 제3 펩타이드 서열에 대한 C-말단의 폴리아데닐화 시그널을 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 제1 펩타이드 서열은 인간 알부민 신호 서열이고, 상기 제2 펩타이드 서열은 인간 알부민이고, 상기 제3 펩타이드 서열은 RdCVF-짧은 서열인, 융합 단백질.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 1의 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 25-717을 갖는 것인, 융합 단백질.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 제1 펩타이드 서열은 Igk 신호 서열이고, 상기 제2 펩타이드 서열은 RdCVF-짧은 서열이고, 상기 제3 펩타이드 서열은 인간 알부민인, 융합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 3의 서열 또는 서열번호 3의 아미노산 22-732를 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 신호 웹타이드 서열, 상기 RdCVF-짧은 웹타이드 서열 및 친수성 웹타이드 서열 중 하나, 둘 또는 모두가 상응하는 야생형 서열과 상이한, 융합 단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 신호 웹타이드 서열, 상기 RdCVF-짧은 웹타이드 서열 및 상기 친수성 웹타이드 서열 중 하나, 둘 또는 모두가 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 상응하는 야생형 서열과 상이한, 융합 단백질.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 핵산은 DNA인, 핵산.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 신호 웹타이드 서열, 상기 RdCVF-짧은 웹타이드 서열 및 상기 친수성 웹타이드 서열 중 하나, 둘 또는 모두에 대한 코딩 서열은 상응하는 야생형 서열과 비교하여 재코딩되는, 핵산.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 RdCVF-짧은 웹타이드 서열에 대한 코딩 서열은 재코딩되는, 핵산.

청구항 32

제29항에 있어서, 하나 이상의 인트론을 추가로 포함하는, 핵산.

청구항 33

제28항에 있어서, 서열번호 1의 서열을 갖는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 34

제33항에 있어서, 서열번호 2의 서열을 갖는 핵산.

청구항 35

제28항에 있어서, 서열번호 3의 서열을 갖는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 36

제35항에 있어서, 서열번호 4의 서열을 갖는 핵산.

청구항 37

제어 서열과 작동 가능하게 연결된 제28항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 제어 서열이 프로모터인, 발현 벡터.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 프로모터가 CMV 프로모터인, 발현 벡터.

청구항 40

제37항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인, 발현 벡터.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 벡터는 AAV 발현 플라스미드인, 발현 벡터.

청구항 42

제37항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인, 발현 벡터.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 AAV 벡터, 렌티 바이러스 벡터, 레트로 바이러스 벡터, 아데노 바이러스 벡터 및 합성 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 발현 벡터.

청구항 44

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 핵산 또는 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 45

(i) 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 제28항 내지 제36항 중 어느 한 항의 핵산, 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제44항의 세포로 이루어진 군에서 선택된 성분; 및 (ii) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 46

포유류 환자에서 질환을 치료하는 방법으로서,

상기 질환은 망막 이영양증, 스타가르트 병, 망막색소 변성증, 건성 노인화 관련 황반변성(건성 AMD), 지도상 위축증(건성 AMD의 진행 단계), 습성 노화 관련 황반변성(습성 AMD), 고안암이 있거나 없는 녹내장, 당뇨병성 망막증, 바르테 비들(Bardet-Biedel) 증후군, 바센 코르츠바이크(Bassen-Kornzweig) 증후군, 베스트(best) 질환, 맥락막 결여(choroidema), 우곡상 위축증, 선천성 흑암시, 레프섬(refsun) 증후군, 어셔(Usher) 증후군, 갑상선 관련 눈 질환, 그레이브스 병, 망막 색소 상피 세포 관련 질환, 전안부 세그먼트 질환, 수정체 질환/백내장, 안구컵 장애, 포도막염, 알츠하이머 병, 헌팅턴 병, 파킨슨 병 및 후각 질환;으로 이루어진 군에서 선택되고,

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 제28항 내지 제36항 중 어느 한 항의 핵산, 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 벡터, 제44항의 세포, 또는 제45항의 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 증상이 안구 질환이고 상기 투여가 망막 하 주사 및 유리체 강내 주사로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 48

환자의 눈에 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 제28항 내지 제36항 중 어느 한 항의 핵산, 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항의 벡터, 제44항의 세포, 또는 제45항의 약학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 안구 광 수용체 세포를 보호하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 투여가 망막 하 주사 및 유리체 강내 주사로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 50

제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 인간 환자인 방법.

청구항 51

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 생산하는 방법으로서, 제44항의 세포를 인코딩된 융합 단백질의 발현 및 분비를 허용하는 조건 하에 배양하는 단계, 및 상기 융합 단백질을 세포 배양물로부터 단리하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 짧은 형태의 간상체 유래 원추체 생존능 인자와 친수성 웨타이드 사이의 융합 단백질에 관한 것이다. 부록 C / ST.25 텍스트 파일 형태로 전자적으로 제출된 서열 목록과 관련 파일 참조 WO2019PCT는 본 발명의 일부이다.

배경 기술

[0002]

RdCVF는 망막의 간상 광수용 세포(rod photoreceptor cell)에 의해 특이적으로 발현되는 티오레독신 유사 단백질이다(Léveillardet al. (2004) Nature Genetics 36 : 755-759 및 보충 정보). 두 개의 상이한 RdCVF 유전자들은 사람에서 발견되고 이들을 RdCVF1 및 RdCVF2로 명명한다. 2개의 RdCVF 유전자는 선택적 접합(alternative splicing)을 통해 2개의 산물을 인코딩한다: 각각 RdCVF-장(RdCVFL)과 RdCVF-단(RdCVFS)으로 알려진, 전체 길이 단백질 및 C-말단 후-전사 절단 단백질. nucleoredoxin-like-1 유전자(Nxn11)는 선택적 접합 메커니즘으로 길고 짧은 형태의 RdCVF를 인코딩한다. Nxn11 네아웃은 생쥐에서 간상체와 원추체의 접진적 손실을 가져오며, 이것은 유전자 수준에서 이 유전자가 광수용체 세포의 생존과 적절한 망막 생리학(physiology) 및 기능 유지에 근본적으로 필수적인 것임을 시사한다.

[0003]

RdCVFS는 원추체 생존을 촉진하는 분비 영양 인자(secreted trophic factor)이며, RdCVFL은 세포 내 단백질과 상호 작용하는 산화환원(redox) 활성 효소로 기술되어 있다(Léveillardet al. (2010) SciTransl Med 2 (26) : 26ps16). 예를 들어, tau는 RdCVF-L의 결합 파트너로 기술되고, tau는 세포 내에서만 존재한다(Fridlich et al. (2009) Molecular & Cellular Proteomics 8 (6) : 1206-18).

[0004]

일부 망막 이영양증(retinal dystrophies)을 앓고 있는 사람은 망막 이영양증을 앓고 있지 않는 사람보다 그들의 눈에서 RdCVF 단백질의 수치가 더 낮은 것으로 나타났다(PCT 공개 WO2019PCT / 081513).

[0005]

상이한 형태의 RdCVF 단백질이 시험관 내(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*)에서 원추 광수용 세포 생존을 촉진할 수 있음이 입증되었다. 예를 들어, 단형(short form) 인간 RdCVF1(RdCVF1S) 단백질의 안구 내(intraocular) 주사는 원추 세포를 변성(degeneration)으로부터 방지할 뿐만 아니라 유전적 망막 변성의 동물 모델에서도 원추 세포의 기능을 보존했다(Yang et al. (2009) Mol Therapy 17 : 787-795). 그러나, 이 단백질의 생체 내 원추 세포 보호 효과의 설명은 다중 안구 내 주입을 필요로 했다.

[0006]

망막 색소 변성(retinitis pigmentosa, RP)은 점진적인 간상 세포 변형 및 이어지는 원추 세포의 이차적 손실을 특징으로 하는 망막 변성 안질환이다. RP는 유전적 실명의 주요 원인으로, 미국에서만 연간 약 2,000 명의 신규 환자가 발생하며, 약 10 만 명의 환자에게 영향을 준다. RP는 모든 인종에 영향을 미친다. 전 세계적으로 150만 명이 넘는 사람이 RP의 영향을 받는다. 불행하게도, 환자들을 위한 RP에 대한 효과적인 치료법이나 승인된 치료법이 없다. 따라서 RP에 대한 긴급하고 충족되지 못한 의학적 요구가 남아 있다.

[0007]

RP는 수십 년에 걸친 임상 경과를 가진 만성 망막 퇴행성 질환이므로 유전자 치료는 망막에서 본질적으로 RdCVF를 발현시킴으로써 RP 증상(indication)에 이상적일 수 있다. 망막 박리와 같은 급성 응급 증상의 경우, 단백질 요법이 도움이 될 수 있다. 그것은 망막이 안구 뒤편, 즉 망막 색소 상피 및 맥락막 층에 재연결되기 전에 광수용체가 죽는 것을 막기 위해 재조합 RdCVF 단백질을 사용하는 것이다. 불행하게도 이 분야의 과학자들은 RdCVF 단백질, 특히 짧은 형태의 RdCVF를 효과적으로 발현 및 분비하는 데 상당한 어려움을 겪었다. 예를 들어, 미국 특허 공보 제20110034546 호의 단락[0004]를 참조한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명은 제1 N-말단 신호 펩타이드 서열, 상기 신호 펩타이드 서열의 C-말단 쪽의 제2 펩타이드 서열 및 제2 펩타이드 서열의 C-말단 쪽의 제3 펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 제2 펩타이드 서열 및 제3 펩타이드 서열 중 하나는 RdCVF 짧은 펩타이드 서열이고 다른 하나는 친수성 펩타이드 서열이다. 번역 후, 상기 신호 펩타이드는 소포체에서 절단되어 제2 펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질을 남기고, 제3 펩타이드 서열에서 신호 펩타이드를 제외한다. 따라서, 본 발명은 또한 제2 펩타이드 서열 및 상기 제2 펩타이드 서열의 C-말단 쪽의 제3 펩타이드 서열을 포함하는 융합 단백질을 제공하고; 상기 제2 펩타이드 서열 및 상기 제3 펩타이드 서열 중 하나는 RdCVF 짧은 펩타이드 서열이고 다른 하나는 친수성 펩타이드 서열이다. 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 및 발현 벡터, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포, 및 융합 단백질, 핵산 및 발현 벡터의 처리 방법 및 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 인코딩된 융합 단백질의 발현 및 분비를 허용하는 조건 하에서 본 발명의 세포를 배양하는 단계, 및 세포 배양물로부터 융합 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 생산 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0009]

도 1a은 인간 짧은 형태의 간상체 유래 원추체 생존능 인자의 아미노산 서열을 나타낸다. 사람의 짧은 RdCVF에 대한 아미노산 조성은 매우 소수성이다. 짧은 RdCVF에서 아미노산의 38.5 %는 소수성이다. 밀줄 친 아미노산은 소수성이다.

도 1b는 인간 긴 형태 간상체 유래 원추체 생존능 인자의 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산의 25 %는 긴 RdCVF의 C-말단에서 소수성이다(밀줄 친 아미노산은 긴 형태의 RdCVF의 C-말단에서 소수성이다).

도 2. 짧은 RdCVF와 친수성 도메인 사이의 융합 단백질.

도 2은 2개의 인간 짧은 RdCVF 융합 단백질의 개략도를 나타낸다. 인간 짧은 RdCVF는 그것의 N-말단 또는 C-말단에서 친수성 도메인과 융합된다. 융합 단백질은 세포로부터의 분비를 촉진하기 위한 신호 펩타이드를 갖는다.

도 3. 인간 알부민과 인간 짧은 RdCVF 사이의 새로운 융합 단백질의 발현과 분비.

도 3은 인간 짧은 RdCVF 및 인간 알부민 융합 단백질의 웨스턴 블랏 분석을 나타낸다.

레인 1 : 대조군으로서 GFP를 인코딩하는 AAV 벡터인, AAV-GFP로 형질 도입 된 인간 293 세포 유래 세포 배지 30 $\mu\ell$;

레인 2 : 짧은 RdCVF의 N-말단에서 인간 알부민과 융합된 짧은 형태 인간 RdCVF를 인코딩하는 AAV 벡터인, AAV-ALB-RdCVFS로 형질도입된 인간 293 세포 유래 세포 배지 30 $\mu\ell$;

레인 3 : 짧은 RdCVF의 C-말단에서 인간 알부민과 융합된 짧은 형태 인간 RdCVF를 코딩하는 AAV 벡터인, AAV-RdCVFS-ALB로 형질도입된 인간 293 세포 유래 세포 배지 30 $\mu\ell$.

왼쪽의 숫자는 KDa로 나타낸 분자량이다.

[서열 목록의 간단한 설명]

서열번호 1: 융합 단백질(ALB-RdCVFS)의 N-말단에서 인간 알부민을 갖는, 인간 알부민과 짧은 RdCVF 사이의 융합 단백질의 아미노산 서열.

서열번호 2: N-말단에서 인간 알부민(ALB-RdCVFS)과 융합된 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

서열번호 3: 융합 단백질(RdCVFS-ALB)의 C-말단에서 인간 알부민을 갖는, 인간 알부민과 짧은 RdCVF 사이의 융합 단백질의 아미노산 서열. RdCVFS와 인간 알부민 사이에는 4개의 아미노산 스페이서가 있다. N-말단으로부터의 처음 21개 아미노산은 마우스 Igk로부터의 신호 서열이다. 신호 서열과 RdCVFS 사이에 14개의 아미노산 스페이서(linker)가 있다.

서열번호 4: C-말단에서 인간 알부민과 융합된 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(RdCVFS-ALB).

서열번호 5: 인간 짧은 형태 간상체 유래 원추체 생존능 인자의 아미노산 서열.

서열번호 6. 인간 긴 형태 간상체 유래 원추체 생존능 인자의 아미노산 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 이론에 구속되기를 바라지는 않지만, 짧은 형태 RdCVF를 발현하고 분비하는 것의 어려움은 아마도 높은 소수성 아미노산 조성 때문일 수 있다. 짧은 형태와 긴 형태 모두의 인간 RdCVF 단백질의 아미노산 조성을 면밀히 분석한 결과, 짧은 형태 RdCVF 단백질은 매우 소수성인 것으로 나타났다(도면 1a 및 1b). 109 개 중 42개의 아미노산(38.5%)은 짧은 RdCVF에서 소수성 아미노산이다. 6개의 소수성 아미노산들의 가지 1 개, 4개의 소수성 아미노산들의 가지 1 개, 각각 3개의 소수성 아미노산들의 가지 2개가 뺀어있다. 소수성 아미노산 조성의 높은 비율은 소수성 - 소수성 상호 작용을 통해 지질 맴브레인에 달라 붙을 가능성이 높기 때문에, 포유 동물 세포로부터 시험관 내 및 생체 내에서 효과적으로 짧은 RdCVF를 발현 및 분비하는 것을 매우 어렵게 할 가능성이 높다. 흥미롭게도, 긴 형태 RdCVF의 N-말단 109개의 아미노산들은 전체 짧은 RdCVF와 동일하지만, 긴 RdCVF의 C-말단 103개의 아미노산들은 소수성이 아니며 아미노산의 25%만이 소수성이다(103 개 중 26 개). 이러한 긴 RdCVF의 C-말단에서 가장 긴 소수성 아미노산 가지는 단지 4개의 아미노산 길이이다. 3개의 소수성 아미노산들의 가지는 없다. 긴 RdCVF의 C-말단에서 비교적 친수성인 성질은 긴 RdCVF의 전체 소수성을 감소시키는데 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0011] 본 발명의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 제2 웨بت아이드 서열은 RdCVF 짧은 웨بت아이드 서열이고 제3 웨بت아이드 서열은 친수성 웨بت아이드 서열이다. 또 다른 실시형태에서, 제2 웨بت아이드 서열은 친수성 웨بت아이드 서열이고 제3 웨بت아이드 서열은 RdCVF- 짧은 웨بت아이드 서열이다.
- [0012] 이 융합 단백질을 발현하는 세포로부터 융합 단백질의 분비를 촉진시키는 N-말단 신호 웨بت아이드 서열이 있어야 한다. 포유류 세포에서 단백질을 분비할 수 있는 임의의 신호 웨بت아이드를 활용할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 신호 웨بت아이드 서열은 Igk 신호 웨بت아이드 서열 및 알부민 신호 웨بت아이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적인 실시형태에서, IgK 신호 웨بت아이드 서열은 마우스 IgK 신호 웨بت아이드 서열이고 알부민 신호 웨بت아이드 서열은 인간 알부민 신호 웨بت아이드 서열이다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, RdCVF-짧은 웨بت아이드 서열은 인간 RdCVF-짧은 웨بت아이드 서열이다. 적절한 RdCVF-짧은 웨بت아이드 서열의 예는 RdCVF1-짧은 웨بت아이드 서열, RdCVF2-짧은 웨بت아이드 서열 및 대응하는 야생형 서열과 상이한, 예를 들어 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의한, RdCVF-짧은 웨بت아이드 서열을 포함한다.
- [0014] 본 발명에 따르면, 친수성 웨بت아이드 서열없이 RdCVF-짧은 웨بت아이드 서열과 비교하여 융합 단백질의 소수성 지수를 낮춘다면, 임의의 친수성 웨بت아이드 서열이 사용될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 존재한다면 임의의 신호 웨بت아이드 서열을 포함하는 융합 단백질은 - 0.20 미만, 보다 바람직하게는 - 0.30 미만의 소수성 지수를 갖는다.
- [0015] 바람직하게는 친수성 웨بت아이드 서열은 사람에게 면역원성(immunogenic)이 아니며, 인간 망막 생리학 또는 정상 망막 기능에 어떠한 다른 부정적인 효과를 나타내지 않으며, 짧은 RdCVF의 생물학적 기능에 영향을 주지 않는다. 친수성 웨بت아이드 서열은 친수성 단백질, 친수성 단백질 도메인, 친수성 올리고웨بت아이드 또는 친수성 폴리웨بت아이드일 수 있다. 하나 이상의 친수성 도메인이 짧은 RdCVF를 갖는 친수성 융합 파트너로서 후보 물질이 될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 친수성 웨بت아이드 서열은 알부민, 예를 들어 인간 알부민이다.
- [0016] 본 발명의 융합 단백질에 따라, 제1 웨بت아이드 서열과 제2 웨بت아이드 서열 사이, 제2 웨بت아이드 서열과 제3 웨بت아이드 서열 사이 또는 둘 다에 하나 이상의 아미노산의 스페이서가 선택적으로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 제1 웨بت아이드 서열과 제2 웨بت아이드 서열 사이에는 스페이서가 없으며, 즉 제1 웨بت아이드 서열은 단일 웨بت아이드 결합에 의해 제2 웨بت아이드 서열과 공유 결합된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 웨بت아이드 서열과 제2 웨بت아이드 서열 사이에는 스페이서가 존재한다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 제2 웨بت아이드 서열과 제3 웨بت아이드 서열 사이에는 스페이서가 없으며, 달리 말해서 제2 웨بت아이드 서열은 단일 웨بت아이드 결합에 의해 제3 웨بت아이드 서열과 공유 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 제2 웨بت아이드 서열과 제3 웨بت아이드 서열 사이에는 스페이서가 있다. 원칙적으로 스페이서의 크기에는 제한이 없다. 본 발명의 일 실시형태에서, 제1 및 제2 웨بت아이드 서열 사이의 스페이서는 2 내지 14개의 아미노산을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 제2 및 제3 웨بت아이드 서열 사이의 스페이서는 2 내지 14개의 아미노산, 보다 구체적으로는 2 내지 4개의 아미노산을 갖는다.
- [0017] 본 발명의 융합 단백질 코딩 서열의 한 실시형태는 제3 웨بت아이드 서열 코딩 서열에 대한 폴리아데닐화 신호 C-말단을 추가로 포함한다. 폴리아데닐화 신호(Poly A)는 임의의 폴리 A일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 제1 웨بت아이드 서열은 인간 알부민 신호 서열이고, 제2 웨بت아이드 서열은 인간 알부민이고, 제3 웨بت아이드 서열은 RdCVF- 짧은 서열이다. 보다 특정한 형태에서, 융합 단백질은 서열(서열번호 1) 또는 아미노산 25-717(서열번호 1)을 갖는다. 본 발명의 융합 단백질의 또 다른 실시형태에서, 제

1 펩타이드 서열은 Igk 신호 서열이고, 제2 펩타이드 서열은 RdCVF-짧은 서열이고, 제3 펩타이드 서열은 인간 알부민이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 융합 단백질은 서열(서열번호 3) 또는 아미노산 22-732(서열번호 3)를 갖는다.

[0019] 본 발명의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 신호 펩타이드 서열, RdCVF-짧은 펩타이드 서열 및 친수성 펩타이드 서열 중 하나, 둘 또는 모두가 상응하는 야생형 서열과 상이하다. 보다 구체적인 양태에서, 상기 차이는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 더 구체적인 실시형태에서, 아미노산 치환은 하나 이상의 보존적 아미노산 치환으로 제한된다.

[0020] 본 발명에 따른 융합 단백질은 글리코실화되거나 또는 글리코실화되지 않을 수 있다. 일반적으로 글리코실화는 단백질의 안정성과 용해도에 유리하다. 일 실시형태에서, 본 발명에 따라 발현 벡터에 의해 형질 도입된 세포에서 발현된 융합 단백질은 글리코실화되고 세포로부터 분비된 후에 당화된다.

[0021] 일 실시형태에서, 본 발명의 핵산은 DNA이다. 또 다른 실시형태에서, 신호 펩타이드 서열, RdCVF-짧은 펩타이드 서열 및 친수성 펩타이드 서열 중 하나, 둘 또는 모두에 대한 코딩 서열은 상응하는 야생형 서열과 비교하여 재코딩된다. 보다 특정한 실시형태에서, RdCVF-짧은 펩타이드 서열에 대한 코딩 서열이 재코딩된다. 본 발명의 핵산은 제1 및 제2 펩타이드 서열 사이, 제2 및 제3 펩타이드 서열 사이 또는 다른 곳에 하나 이상의 인트론을 선택적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 핵산은 서열(서열번호 1)을 갖는 융합 단백질, 예를 들어 서열(서열번호 2)을 갖는 핵산을 인코딩한다. 또 하나의 실시형태에서, 핵산은 서열(서열번호 3)을 갖는 융합 단백질, 예를 들어 서열(서열번호 4)을 갖는 핵산을 인코딩한다. 다른 핵산 서열은 유전 암호의 퇴행(degeneracy) 관점에서 쉽게 구상될 수 있다.

[0022] 본 발명의 실시형태는 제어 서열, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된 전술한 핵산을 포함하는 발현 벡터이다. RdCVFS 융합 단백질을 구동하는 프로모터는 임의의 프로모터일 수 있으며, CMV 프로모터에 한정되지 않는다. 프로모터와 융합 단백질 코딩 서열 사이에 인트론이 존재할 때, 임의의 적절한 통상의 인트론이 이용될 수 있다. 예를 들어 β -글로빈 인트론이 적절하다.

[0023] 실험에서 두 개의 융합 단백질은 인간 짧은 RdCVF를 친수성 도메인과 융합시킴으로써 만들어졌다(도식은 도 2 참조). 하나는 융합 단백질의 N-말단에 알부민 신호 펩타이드를 갖는 N-말단에서 인간 알부민과 융합된 인간 짧은 RdCVF였다(서열번호 1). 이 융합 단백질을 발현 및 분비하는 발현 구조물은 rAAV-ALB-RdCVFS로 명명된, AAV 벡터의 구성에서(in the context of) 설계되었다. 이 벡터는 N-말단에서 인간 알부민과 융합된 코돈 최적화된(재코딩된) 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하였다(서열번호 2). 융합 단백질은 ALB-RdCVFS로 명명되었다. 인간 알부민 신호 펩타이드의 코딩 서열은 또한 융합 단백질 코딩 서열의 융합 단백질 발현 구조물 상류(upstream)에 혼입되었다. 발현 구조물은 CMV 프로모터, 및 융합 단백질 코딩 서열에 연결된 인트론을 추가로 함유하였다. 발현 구조물은 융합 단백질 코딩 서열의 C-말단에 폴리아데닐화 신호를 추가로 함유하였다. 전체 발현 카세트를 AAV 발현 플라스미드에 클로닝하고 플라스미드를 발현 구조물의 완전성을 확인하기 위해 DNA 시퀀싱에 적용시켰다.

[0024] 다른 예시된 융합 단백질은 융합 단백질의 N-말단에 마우스 Igk 신호 펩타이드 (서열번호 3)를 갖는 C-말단에서 인간 알부민과 융합된 인간 짧은 RdCVF이었다. 이 융합 단백질을 발현 및 분비하기 위한 발현 구조물은 rAAV-RdCVFS-ALB로 명명된 AAV 벡터의 구성에서 조작되었다. 이 벡터는 C-말단에서 인간 알부민과 융합된 코돈 최적화(재코딩) 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하였다(서열번호 4). 융합 단백질은 RdCVFS-ALB로 명명되었다. 변형된 마우스 Igk 신호 펩타이드의 코딩 서열은 또한 융합 단백질 코딩 서열의 융합 단백질 발현 구조물 상류(upstream)에 혼입되었다. 발현 구조물은 CMV 프로모터 및 융합 단백질 코딩 서열에 연결된 인트론을 추가로 함유하였다. 전체 발현 구조물은 융합 단백질 코딩 서열의 C-말단에 폴리아데닐화 신호를 추가로 함유하였다. 전체 발현 카세트를 AAV 발현 플라스미드에 클로닝하고 플라스미드를 발현 구조물의 완전성을 확인하기 위해 DNA 시퀀싱에 적용시켰다.

[0025] 총 20개의 자연발생 아미노산이 있다. 그들을 중 일부는 소수성이며 그들을 중 일부는 친수성이다. 아미노산의 소수성 지수는 그것의 측쇄의 소수성 또는 친수성을 나타내는 숫자이다. 숫자가 클수록 아미노산이 더 소수성이다(표 1). 가장 소수성인 아미노산은 이소류이신(4.5)과 발린(4.2)이다. 가장 친수성인 것은 아르기닌(-4.5)과 라이신(-3.9)이다. 단백질의 소수성 또는 친수성은 2차, 3차 및 4차 구조뿐만 아니라, 어떤 아미노산으로 구성되는가에 의존하더라도, 단백질의 소수성 지수는 단백질의 소수성에 대한 예측 가치를 가질 수 있다.

표 1

[0026]

아미노산	소수성 지수
Ala	1.800
Arg	-4.500
Asn	-3.500
Asp	-3.500
Cys	2.500
Gln	-3.500
Glu	-3.500
Gly	-0.400
His	-3.200
Ile	4.500
Leu	3.800
Lys	-3.900
Met	1.900
Phe	2.800
Pro	-1.600
Ser	-0.800
Thr	-0.700
Trp	-0.900
Tyr	-1.300
Val	4.200

[0027]

공개적으로 이용 가능한 GPMAW 프로그램을 사용하여 짧은 RdCVF 및 2개의 짧은 RdCVF 및 일부민 융합 단백질에 대한 소수성 지수를 계산하였다. 인간 RdCVF의 천연 짧은 형태(RdCVFS)에 대한 소수성 지수는 -0.12이다. 인간 일부민을 RdCVFS의 N-말단에 융합시킨 후, 융합 단백질인 ALB-RdCVFS의 소수성 지수는 -0.12에서 -0.32(신호 펩타이드 포함)까지 감소하여, 소수성 지수가 266.7% 감소했다. 인간 일부민을 RdCVFS의 C-말단에 융합시킨 후, 최종 융합 단백질인 RdCVFS-ALB는 소수성 지수는 -0.12에서 -0.33 (신호 펩타이드 포함)까지 감소하여 소수성 지수가 275% 감소했다. 소수성 지수의 극적인 감소는 융합 단백질의 효율적인 발현 및 분비에 기여했을 수 있다.

[0028]

또한, 융합 단백질 코딩 서열은 AAV-2 발현 구조물에 클로닝되었으며, 여기에 포함된 데이터는 이 신규 융합 단백질이 RdCVF 특이적 항체를 갖는 웨스턴 블로트에 의해 검출된 바와 같이 효율적으로 발현된다는 것을 명백하게 나타내었다(도 3). 짧은 RdCVF의 융합 파트너는 인간 일부민에 국한되지 않는다. 친수성 단백질 또는 친수성 단백질 도메인 또는 친수성 펩타이드는 단백질의 소수성을 감소시키기 위해 짧은 RdCVF를 갖는 융합 단백질을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 바람직한 친수성 도메인은 인간에게 비면역원성(non-immunogenic)이다.

[0029]

AAV(Adeno-associated Virus) 백터, 렌티 바이러스 백터, 합성 백터, 아데노 바이러스 백터, 레트로 바이러스 백터, 네이키드 DNA, 나노 입자 등과 같은 유전자 치료 백터에 의해 단백질을 암호화하고 전달할 수 있다. 달리는, 융합 단백질은 재조합 단백질로서 망막에 전달될 수 있다. 친수성 융합 도메인은 인간의 망막 생리학 또는 정상 망막 기능에 어떠한 부정적인 영향도 주어서는 안되며 짧은 RdCVF의 생물학적 기능에 영향을 주어서도 안된다. 잠재적으로, 하나 이상의 친수성 도메인이 짧은 RdCVF를 갖는 친수성 융합 파트너로서 후보 물질이 될 수 있다. 실시예에서 인간 일부민은 인간 짧은 RdCVF의 융합 파트너 역할을 하는 친수성 도메인으로 사용되었다.

[0030]

본 발명은, (i) 본 발명의 융합 단백질, 핵산, 발현 백터 또는 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 성분; 및 (ii) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0031]

본 발명은 포유류 환자에서 이러한 치료를 받을 수 있는 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 이 치료법은 본원에 기재된 단백질, 핵산, 백터, 세포 또는 약제학적 조성물의 유효량을 환자에게 투여하는 단계, 이에 따라 환자의 질환을 치료하는 단계를 포함한다. 본 발명의 실시형태에서, 상기 질환은 망막 이영양증, 스타가르트 병, 망막 색소 변성증, 건성 노인화 관련 황반변성(건성 AMD), 지도상 위축증(건성 AMD의 진행 단계), 습성 노화 관련 황반변성(습성 AMD), 고안압이 있거나 없는 녹내장, 당뇨병성 망막증, 바르테 비들(Bardet-Biedel) 증후군, 바센 코르즈바이크(Bassen-Kornzweig) 증후군, 베스트(best) 질환, 맥락막 결여(choroidema), 우곡상 위축증, 선천성 흑암시, 레프섬(refsun) 증후군, 어셔(Usher) 증후군, 갑상선 관련 눈 질환, 그레이브스 병, 망막 색소 상피

세포 관련 질환, 전안부 세그먼트 질환, 수정체 질환/백내장, 안구컵 장애, 포도막염, 알츠하이머 병, 헌팅턴 병, 파킨슨 병 및 후각 질환으로 이루어진 군에서 선택된다. 임의의 통상적인 투여 경로, 예를 들어, 눈에 주사, 정맥 주사 또는 다른 전신 투여가 이용될 수 있다. 본 발명의 방법의 일 실시형태에서, 상기 질환은 안구 질환이고, 상기 투여는 망막하 주사 및 유리체 강내 주사로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적인 양태에서, 환자는 인간 환자이다.

[0032] 본 발명은 본 발명의 융합 단백질, 핵산, 벡터, 세포 또는 약제학적 조성물을의 유효량을 환자의 눈에 투여하여, 환자의 안구 광 수용체 세포를 보호하는 것을 포함하는, 환자의 안구 광 수용체 세포를 보호하는 방법을 제공한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 투여는 망막 하 주사 및 유리체 강내 주사로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 환자는 인간 환자이다.

[0033] 본 발명은 이제 하기 실시예를 참조하여 설명된다. 이들 실시예는 설명의 목적으로만 제공되며, 본 발명은 결코 이들 실시예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안되며 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0034] 본 발명의 특정 실시형태가 설명의 목적으로 설명되었지만, 당업자는 첨부된 청구 범위에 설명된 본 발명을 벗어나지 않고 많은 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0035] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특히 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특히 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 여기에 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 전체적으로 참조로 포함된다. 또한 상기 언급된 간행물, 특히 및 특허 출원 중 어느 하나와 함께 발행된 보충 정보가 참고로 포함된다. 예를 들어, 일부 저널 기사는 온라인에서 일반적으로 제공되는 보충 정보로 게시된다.

실시예

[0037] **실시예 1 :** 인간 짧은 형태 간상체 유래 원추체 생존능 인자 및 알부민 융합 단백질을 인코딩하는 rAAV 벡터의 생성

플라스미드 클로닝

[0039] N-말단에서 인간 알부민과 융합된 RdCVF 단백질의 코돈 최적화 인간 짧은 형태의 cDNA는 GENEART®(fee-for-service company)에 의해 합성되고 아데노 연관 바이러스 벡터 플라스미드 pAAV-MCS(Cell Biolabs, San Diego, CA)에 클로닝되었으며, 플라스미드 pAAV-ALB-RdCVFS를 제작하였다. 인간 알부민으로부터의 이 신호 펩타이드는 또한 RdCVF 및 알부민 융합 단백질 코딩 서열의 상류(upstream)에 혼입되었다.

[0040] pAAV-ALB-RdCVFS 플라스미드는 AAV-ITRs 사이에 다음 특징을 포함한다 :

[0041] CMV 프로모터 - β -글로빈 인트론 - 신호 서열-알부민-짧은 RdCVF - 폴리 A

[0042] 이 RdCVF 및 알부민 융합 단백질에 대한 최종 아미노산 서열을 서열번호 1에 나타내었다.

[0043] C-말단에서 인간 알부민과 융합된 코돈 최적화 인간 짧은 형태의 cDNA는 GENEART® 회사(a fee-for-service company)에 의해 합성되고 아데노 연관 바이러스 벡터 플라스미드 pAAV-MCS(Cell Biolabs, San Diego, CA)로 클로닝되었으며, 플라스미드 pAAV-RdCVFS-ALB를 제조하였다. 마우스 Igk로부터의 이 신호 펩타이드는 또한 RdCVF 및 알부민 융합 단백질 코딩 서열의 상류에 혼입되었다.

[0044] pAAV-RdCVFS-ALB 플라스미드는 AAV-ITRs 사이에 다음 특징을 포함한다 :

[0045] CMV 프로모터 - β -글로빈 인트론 - 신호 서열 - 짧은 RdCVF-알부민 - 폴리 A

[0046] 이 RdCVF 및 알부민 융합 단백질에 대한 최종 아미노산 서열을 서열번호 3에 나타내었다.

제조 AAV-ALB-RdCVFS 및 AAV-RdCVFS-ALB 벡터의 생산 및 정제

[0048] pAAV-ALB-RdCVFS 또는 pAAV-RdCVFS-ALB, pHelper(Cell BioLabs, 카탈로그 번호 340202) 및 pRC2(Cell BioLabs, Catalog No. 340201)를 DH10B 수용성(competent) 박테리아 세포(Invitrogen, 카탈로그 번호 18297-010)로 형질전환하고, 제조사의 지시에 따라 QiagenEndoFree Plasmid Maxi Kit 또는 EndoFree Plasmid Mega Kit를 사용하여 확대시켰다. Beckman DU-600 분광 광도계를 사용하여 플라스미드 농도를 측정하였다. 각각의 플라스미드의 동일성은 제한 효소 절단 및 DNA 시퀀싱 분석에 의해 확인되었다.

[0049] rAAV-ALB-RdCVFS 또는 rAAV-RdCVFS-ALB 벡터를 생산하기 위해, cDMEM(10 % FBS, 1 % 글루타민, 1 % 비 필수 아

미노산 및 1 % 페니실린/스트렙토 마이신이 보충된 DMEM)에 15 cm 디쉬 당 4백만개의 세포에 293AAV 세포(Cel1 BioLabs, 카탈로그 번호 AAV-10)를 배양했다. 다음날 배지를 25 mL의 신선한 cDMEM으로 교체하였다. 2 시간 후에 형질 감염을 수행하였다. 물(57.4 mL)을 1.3 mg의 pHELPER, 650 μg의 pRC2, 650 μg의 pAAV-ALB-RdCVFS 또는 pAAV-RdCVFS-ALB 및 8.1 mL의 2 M CaCl₂ (물/플라스미드/CaCl₂ 혼합물)와 혼합하였다. 2xHBS(Lonza, Sku : RR07005)의 12.5 mL 부피를 5개의 50 mL 원추형 투브 각각으로 옮겼다. 볼텍싱하는 동안, 12.5 mL의 물/플라스미드/CaCl₂ 혼합물을 2xHBS를 함유하는 각각의 원뿔형 투브에 서서히 첨가하였다. 5분 배양 후, 혼탁액 2.5 mL를 293AAV 세포를 함유하는 각 세포 배양 접시에 첨가하였다.

[0050] 다음날 배지는 접시 당 25 mL의 새로운 cDMEM 배지로 교체되었다. 이를 후 세포 리프터를 사용하여 세포를 수확하고 세포/배지 혼합물을 250 mL 원뿔형 투브로 옮겼다. 샘플을 4 °C에서 15 분간 3,000 rpm으로 원심 분리하고, 상등액을 버리고 세포 펠렛을 110 mL DMEM에 재현탁하였다. 재현탁된 세포 샘플(30 mL)을 50 mL 원추형 투브에 분주하고 에탄올/드라이 아이스 육조와 37°C 온수 육조를 사용하여 동결/해동/동결 단계를 수행했다. 투브는 물질의 추가 공정이 이루어질 때까지 -80 °C에서 보관 하였다. 동일한 공정을 사용하여, 플라스미드 pAAV-ALB-RdCVFS를 플라스미드 pAAV-GFP(Cel1 BioLabs Catalog No. AAV-400)로 대체하여 rAAV-GFP 대조군 벡터를 제조하였다.

[0051] rAAV - ALB - RdCVFS 벡터를 정화하기 위해, 동결/해동/동결 단계에서 벡터를 포함하는 4개의 50 mL 원뿔형 투브는 수조에서 37°C에서 해동되었다. 각 투브에 BENZONASE®(nuclease)(Sigma, 카탈로그 번호 E8263-25kU) 40 μM를 넣고 이어서 37°C에서 30분간 배양하였다. 투브를 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하고 상등액을 500 mL 병으로 옮겼다. 6 mL의 10 % 나이트륨 데옥시콜레이트 용액(82 mL 물 중 8.2 g)을 첨가하였다. 샘플을 간단히 혼합하고 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 혼탁액을 5 μm 필터를 사용하여 여과하였다. 이어서, 0.8 μm 필터를 사용하는 또 다른 여과 단계가 수행되었다. 헤파린 아가로스 컬럼(8mL)(Sigma, 카탈로그 번호 H6508-25mL)을 제조하고 컬럼을 48mL 인산염 완충 식염수(PBS)(Invitrogen, 카탈로그 번호 10010-049)로 평형화시켰다. 여과된 세포 용해물을 컬럼에 로딩하고 컬럼을 40 mL 세척 완충액(20 mL 5M NaCl, 980 mL PBS)으로 세척하였다. 벡터를 15mL 용리 완충액(80 mL 5M NaCl, 920 mL PBS)을 사용하여 용출시키고 새로운 50mL 원뿔형 투브에 수집하였다.

[0052] 벡터를 원심 여과에 의해 농축시켰다. AMICON ULTRA-15 원심 분리 필터 유닛 (Millipore, 카탈로그 번호 UFC910024)을 PBS로 한번 행구고, 용출된 샘플을 장치에 첨가하였다. 시료가 1-2 mL 부피가 될 때까지 2200rpm, 22°C에서 Beckman Allegro 6KR 원심 분리기에서 원심 분리를 수행했다. 15mL 부피의 PBS를 첨가하고 샘플 부피가 1mL 이하가 될 때까지 원심 분리를 반복했다. 정제된 벡터를 수집하고 필터 벽을 100 μL의 PBS로 행구었다. 샘플을 혼합하고 벡터의 30 μL 분취액을 사용할 때까지 600 μL 원추형 투브에 80°C에서 보관했다.

[0053] 이 과정을 반복하여 rAAV-RdCVFS-ALB 및 rAAV-GFP 벡터를 정제하였다.

[0054] 실시예 2 : rAAV 벡터에 의해 매개되는 인간 짧은 RdCVF 및 인간 알부민 융합 단백질의 발현 및 분비

[0055] 4-20% SDS-PAGE 겔을 사용하는 웨스턴 블로트 분석을 사용하여 표준 기술을 사용하여 RdCVF 및 알부민 융합 단백질 발현을 검출하였다. 대조군으로 5 μL 부피의 MAGICMARK™ XP Western Protein Standard(Invitrogen, 카탈로그 번호 LC5602)를 외부 웰에 첨가했다. 단백질 시료 완충액과 혼합된 각각의 rAAV 벡터 형질 전환 인간 293 세포 유래 30 μL의 세포 배양 배지를 각 웰에 첨가하였다. 염료가 겔의 바닥에 도달 할 때까지 겔을 200V에서 작동시켰다. 웨스턴 블로트 분석은 Vector Laboratories의 VECTASTAIN®ABC-Amp Western blot 분석 키트를 사용하여 제조사 지시에 따라 수행했다. SDS-PAGE를 이동 완충액에서 20분간 평형시키고 SDS-PAGE로 분리된 단백질을 Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell을 사용하여 20V에서 40분 동안 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 이동이 완료되면, 멤브레인을 실온(RT)에서 적어도 2시간 동안 또는 하룻밤동안 4°C에서 로커 플랫폼상에서 부드럽게 교반하면서 1X 카제인 용액 200mL 중에서 차단시켰다. 멤브레인을 토키 항-RdCVF 단백질 특이적 항체(Covance에 의해 생성된 1차 항체(Denver, PA))를 포함하는 50 mL 1X 카제인 용액과 함께 1 : 2,000으로 희석하여, 온화한 교반 하에 4°C에서 밤새 또는 실온에서 1시간 항온 배양하였다. 멤브레인을 1X 카제인 용액 30mL로 4회씩 5분 동안 세척한 후, 실온에서 완만하게 교반했다. 1X 카제인 용액으로 1 : 10,000 희석한 비오티닐화 염소 항-토끼 IgG(2차 항체)와 함께 실온에서 부드럽게 교반한 후 1시간 동안 인큐베이팅했다. 부드럽게 교반하면서 실온에서 각각 5분간 3회씩 1X 카제인 용액 30mL로 멤브레인을 세척하였다. 멤브레인을 100 μL의 시약 A 및 100 μL의 시약 B를 함유하는 50mL의 1X 카제인인 Vectastain ABC-AmP에서 45분 동안 항온처리 하였다. 멤브레인을 1X 카제인 용액 30 mL에서 5분 동안 3회 부드럽게 교반하면서 실온에서 세척하였다.

[0056] 멤브레인을 트리스(Tris), pH 9.5에서 배양하였다. DUOLOX 기질(Vector Laboratories, Catalog No. SK 6605)

6mL를 사용하여 화학 발광 신호를 얻었고 뮤브레인을 필름 카세트에 있는 KODAK BIOMAX MS X-레이 필름(Kodak Carestream Health, 카탈로그 번호 8572786)에 10초~5분 동안 노출시키고, 이어서 KODAK 현상액(Kodak GBX, 카탈로그 번호 1900984) 및 KODAK Fixer 용액을 사용하여 필름을 현상했다.

[0057] 도 4에 나타낸 바와 같이, rAAV-ALB-RdCVFS 및 rAAV-RdCVFS-ALB 형질 도입 인간 293 세포로부터의 세포 배양 배지는 토끼 항-RdCVF 항체와 특이적으로 반응하는 분자량 약 80kDa의 밴드를 함유하였다. 이 밴드는 rAAV-GFP 제어 벡터 형질 전환 세포로부터의 세포 배양 배지에서 검출되지 않았다. 이 데이터는 인간 세포에서의 rAAV-ALB-RdCVFS 및 rAAV-RdCVFS-ALB 벡터 매개 인간 짧은 RdCVF 및 일부민 융합 단백질 발현 및 분비를 시사한다.

[0058] rAAV-ALB-RdCVFS 또는 rAAV-RdCVFS-ALB 벡터는 위에 열거된 질병을 치료하기위한 안구 내 투여에 사용할 수 있다. 특히, 벡터는 망막 하 주사 또는 유리체 강내 주사를 통해 전달될 수 있다.

요약

[0060] N-말단에서 인간 일부민 융합 단백질 코딩 서열과 융합된 코돈 최적화(재코딩) 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하는 재조합 AAV 벡터는 인간 세포에서의 융합 단백질 발현 및 인간 세포로부터의 분비를 매개할 수 있었다. C-말단에서 인간 일부민 융합 단백질과 융합된 코돈 최적화 인간 짧은 RdCVF를 인코딩하는 재조합 AAV 벡터는 인간 세포에서의 융합 단백질 발현 및 인간 세포로부터의 분비를 매개할 수 있었다.

도면

도면1a

```

M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L
E N R L V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L
T D E F Y V L R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L
K D M P K K W L F L P F E D D L R R   (SEQ ID NO:5)

```

도면1b

```

M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L
E N R L V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R
L T D E F Y V L R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F
L K D M P K K W L F L P F E D D L R R D L G R Q F S V E R L
P A V V V L K P D G D V L T R D G A D E I Q R L G T A C F A
N W Q E A A E V L D R N F Q L P E D L E D Q E P R S L T E C L
R R H K Y R V E K A A R G G R D P G G G G G E E G G A G G L
E   (SEQ ID NO:6)

```

도면2



도면3



서 열 목록

- <110> Wellstat Ophthalmics Corporation
- <120> Fusion Protein Between Short Form Rod-Derived Cone Viability Factor and a Hydrophilic Peptide
- <130> WO2019019PCT
- <150> US 62/406,552
- <151> 2016-10-11
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 717
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><221> SIGNAL
- <222> (1)..(24)
- <223> Signal sequence from human albumin
- <220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(609)

<223> Human albumin (including N-terminal signal peptide)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(609)

<223> Human albumin (excluding N-terminal signal peptide)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (610)..(717)

<223> RdCVFS

<400> 1

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala

20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp

85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala

100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln

115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val

130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys

145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro

165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu

195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys

210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly

260 265 270

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

275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu

290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp

305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser

325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly

340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val

355 360 365

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

370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

420	425	430
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val		
435	440	445
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His		
450	455	460
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val		
465	470	475
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg		
485	490	495
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe		
500	505	510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
545	550	555
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
565	570	575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
580	585	590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
595	600	605
Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp		
610	615	620
Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn		
625	630	635
Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln		
645	650	655
Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu		
660	665	670
Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln		

675

680

685

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys

690

695

700

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg

705 710 715

<210> 2

<211> 2154

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagtggg taaccttat ttccctttt tttctttta gtcggctta ttccagggtt	60
gtgttcgtc gagatgcaca caagagttag gttgctcatc ggttaaaga tttggagaa	120
gaaaattca aagccttggt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt	180

gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttgc caaaaacatg tggtgctgat	240
gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt cataccctttt ttggagacaa attatgcaca	300
gttgcacac ttctgtgaaac ctatggtaaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct	360
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg	420
agaccagagg ttgtatgtat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac attttgaaa	480
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ctttactttt atgccccgaa actcctttc	540
tttgcataaa ggtataaagc tgctttaca gaatgttgc aagctgctga taaagctgcc	600

tgcctgtgc caaagctcgta tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag	660
agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag cttcaagc atggcagta	720
gctcgctgaa gccagagatt tccaaagct gagtttgcag aagtttccaa gttatgtaca	780
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgcatt tgctgtgac	840
aggcgccgacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag	900
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgcccagt ggaaatgat	960
gagatgcctg ctgacttgc ttcattagct gctgatttg ttgaaagtaa ggatgttgc	1020

aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtctc ctggcatgt tttgtatga atatgcaaga	1080
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaccact	1140
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatct catgaatgct atgccaagt gttcgtgaa	1200
tttaaacctc ttgtgaaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gcttttgag	1260

cagcttggag agtacaatt ccagaatgcg ctattagtcc gttacaccaa gaaagtaccc	1320
caagtgtcaa ctccaactct tgttagaggc tcaagaacc tagaaaaagt gggcagcaaa	1380
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggc	1440

ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc	1500
tgcacagaat ccttgtgaa caggcgacca tgctttcag ctctgaaagt ccatgaaaca	1560
tacgttccca aagagttaa tgctgaaaca ttcacccatc atgcagatat atgcacactt	1620
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag	1680
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagag	1740
aagtgcgtca aggctgacga taaggagacc tgcttgccg aggaggtaa aaaacttgtt	1800
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttagcc agcctgttca gcggccggat cctgatcagg	1860

aacaacagcg accaggacga gctggacacc gaggccgaag tgagcaggag gctggagaac	1920
agactggcgc tgctgttctt tggcgccgga gcctgcctc agtgcaggc cttcggtccc	1980
atcctgaagg attctttgt gcggtgacc gacgagttct acgtgctgag agccgcccag	2040
ctggccctgg tgtatgttag ccaggacagc accgaggagc agcaggacct gttcctgaag	2100
gacatgccca agaagtggct gttcctgccc ttcgaggacg acctgcccggat atga	2154

<210> 3

<211> 732

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal signal sequence from mouse IgK, followed by spacer,

followed by RdCVFS, followed by spacer, followed by human albumin
at C-terminus.

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(21)

<223> Signal sequence from mouse Igk.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(35)

<223> Spacer

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(143)

<223> RdCVFS

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (144)..(147)

<223> Spacer

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (148)..(732)

<223> Human albumin

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Val Arg Ser

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

Leu Val Pro Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn

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

Ser Asp Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu

50	55	60
----	----	----

Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln

65	70	75	80
----	----	----	----

Cys Gln Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr

85	90	95
----	----	----

Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Gln Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Lys Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Gly

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

Arg Asp Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp

145 150 155 160

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

165	170	175
-----	-----	-----

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu

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

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

195	200	205
-----	-----	-----

Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn

245 250 255

Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr

260 265 270

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu

275 280 285

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe

290 295 300

Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys

340 345 350

Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln

355 360 365

Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp

370 375 380

Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys

385 390 395 400

Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp

405 410 415

Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu

420 425 430

Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp

435 440 445

Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys

450	455	460
Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu		
465	470	475
Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu		
485	490	495
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp		
500	505	510
Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val		
515	520	525
Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln		
530	535	540
Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys		
545	550	555
Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn		
565	570	575
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg		
580	585	590
Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys		
595	600	605
Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys		
610	615	620
Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val		
625	630	635
Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe		
645	650	655
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys		
660	665	670
Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys		
675	680	685
Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys		
690	695	700
Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys		

705 710 715 720

Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

725 730

<210> 4

<211> 2199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal signal sequence from mouse IgK, followed by spacer, followed by RdCVFS, followed by spacer, followed by human albumin at C-terminus.

<400> 4

atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgcct gggttccagg ttccactggt	60
gacgcggccc agccggccag gcgcgccgt a cgaagcttg taccggccag cctgttcagc	120
ggccggatcc t gatcaggaa caacagcgcac caggacgagc tggacaccga ggccgaagtg	180

agcaggaggc tggagaacag actggtgctg ctgttcttg gcgcggagc ctgcctcag	240
tgcaggcct tcgtgccccat cctgaaggat ttctttgtgc ggctgaccga cgagttctac	300
gtgctgagag ccgcaggact ggcctgggt tatgtgagcc aggacagcac cgaggaggcag	360
caggacctgt tcctgaagga catgccaag aagtggctgt tcctgcctt cgaggacgac	420
ctgcccggagag gacgagatgc agatgcacac aagagtgagg ttgctcatcg gtttaagat	480
ttgggagaag aaaatttcaa agcctgggtg ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag	540
tgtccatttgc aagatcatgt aaaatttagtg aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt	600

gttgcgtatg agtcagctga aaattgtgac aaatcacttc atacccttt tggagacaaa	660
ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc tatggtaaaa tggctgactg ctgtgcaaaa	720
caagaacctg agagaaatga atgcttcttgc caacacaag atgacaaccc aaacctcccc	780
cgattggtga gaccagaggt tgatgtgatg tgcactgcctt ttcatgacaa tgaagagaca	840
ttttgaaaa aatacttata taaaattgcc agaagacatc cttacttttgc tggccggaa	900
ctccctttctt ttgctaaaag gtataaagct gctttacag aatgttgccca agctgctgat	960
aaagctgcct gcctgttgc aagctcgat gaacttcggg atgaagggaa ggcttcgtct	1020

gccaaacaga gactcaagtgc tgccagtctc caaaaatttg gagaaagagc tttcaagca	1080
tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt cccaaagctg agtttgcaga agtttccaag	1140
ttagtgcacag atttaccaa agtccacacgc gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt	1200

gctgtatgaca gggcgaccc tgccaaggat atctgtaaaa atcaagattc gatctccagt	1260
aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg ttggaaaaat cccactgcat tgccgaagtg	1320
gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgct tcattagctg ctgattttgt tgaaagtaag	1380
gatgttgtca aaaactatgc tgaggcaaag gatgtttcc tggcatgtt tttgtatgaa	1440

tatgcaagaa ggcacatcctga ttactctgtc gtgctgctgc tgagacttgc caagacatat	1500
gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgt gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg	1560
ttcgatgaat ttaaacctct tggaaagag cctcagaatt taatcaaaca aaattgtgag	1620
cttttgagc agctggaga gtacaaattc cagaatgcgc tattagttcg ttacaccaag	1680
aaagtacccc aagtgtcaac tccaaacttt gtagaggctt caagaaacct aggaaaagtg	1740
ggcagcaaat gttgtaaaca tcctgaagca aaaagaatgc cctgtcaga agactatcta	1800
tccgtgttcc tgaaccagtt atgtgtgtt catgagaaaa cggcagtaag tgacagagtc	1860

accaaatgct gcacagaatc ctggtaac aggcgaccat gctttcagc tctggaaatc	1920
gatgaaacat acgtcccaa agagttat gctgaaacat tcaccttcca tgcagatata	1980
tgcacactt ctgagaagga gagacaaatc aagaaacaaa ctgcacttgt tgagctcg	2040
aaacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa ctgaaagctg ttatggatga tttcgagct	2100
ttttagaga agtgcgtcaa ggctgacgat aaggagacct gcttggcga ggaggtaaa	2160
aaacttgttgc tgcagaatca agtgcctta ggcttataaa	2199

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln

35 40 45

Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu

50 55 60

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln

65 70 75 80
Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
 85 90 95
Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg
 100 105

<210> 6
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp

1 5 10 15
Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30
Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45
Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
 50 55 60
Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80

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

145 150 155 160
Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser
 165 170 175

Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala
180 185 190
Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Gly Ala
195 200 205
Gly Gly Leu Phe
210