



등록특허 10-2811896



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월23일
(11) 등록번호 10-2811896
(24) 등록일자 2025년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/745 (2006.01) *A01K 67/027* (2024.01)
A61K 38/46 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/745 (2013.01)
A01K 67/0271 (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7036279
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월19일
심사청구일자 2021년04월27일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월15일
- (65) 공개번호 10-2018-0005249
- (43) 공개일자 2018년01월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/033236
- (87) 국제공개번호 WO 2016/187408
국제공개일자 2016년11월24일
- (30) 우선권주장
62/163,500 2015년05월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02014126965 A2*
US20070015145 A1
US20140377859 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 28 항

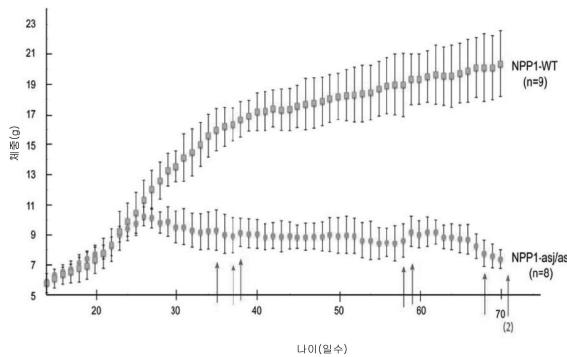
심사관 : 김상준

(54) 발명의 명칭 병리학적 석회화 형태를 치료하기 위한 조성물, 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 일정 실시형태에서, 상기 질환 또는 장애는 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 특발성 소아 동맥 석회화 (IIAC), 후종 인대의 골화증(OPLL), 저인산혈 구루병, 골관절염, 동맥경화반의 석회화, PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증 및 조로증으로 이루어진 군에서 선택된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 38/46 (2013.01)
A61K 38/465 (2013.01)
C12Y 301/04001 (2013.01)
C12Y 306/01009 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염:

PROTEIN-Z-DOMAIN (I)

(상기 화학식 (I)에서,

PROTEIN은 서열번호 20의 잔기 23-849, 또는 서열번호 18의 잔기 23-852, 또는 서열번호 16의 잔기 93-925로 구성되며;

DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인(Fc)이며;

Z는 아미노산 서열 L I N이며;

상기 화합물은 음으로 하전된 뼈 표적화 서열이 결여된 것인 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PROTEIN의 뉴클레아제 도메인이 부재하는 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 1에 대해 잔기 524 내지 잔기 885의 뉴클레아제 도메인이 상기 PROTEIN에서 부재하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, DOMAIN은 서열번호 26의 아미노산 서열의 Fc이고, PROTEIN은 서열번호 16의 잔기 93-925로 구성되는 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, DOMAIN은 서열번호 26의 아미노산 서열의 Fc이고, PROTEIN은 서열번호 18의 잔기 23-852로 구성되는 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서, DOMAIN은 서열번호 26의 아미노산 서열의 Fc이고, PROTEIN은 서열번호 20의 잔기 23-849로 구성되는 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, $3.4(\pm 0.4) \text{ s}^{-1} \text{ 효소}^{-1}$ 보다 크거나 또는 동일한 k_{cat} 값을 가지며, 상기 k_{cat} 은 상기 화합물의 ATP 가수분해 속도를 측정하여 결정하는 것인 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, $2 \mu\text{M}$ 보다 작거나 또는 동일한 K_m 값을 가지며, 상기 K_m 은 상기 화합물의 ATP 가수분해 속도를 측정하여 결정하는 것인 화합물.

청구항 9

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환 또는 장애는 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 특발성 소아 동맥 석회화(IIAC), 후종 인대의 골화(OPLL), 저인산혈

구루병, 골관절염, 및 동맥경화반의 석회화로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 10

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환 또는 장애는 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증 및 조로증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 11

GACI 및 PXE로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 질환 또는 장애를 앓는 피험체에서, 심장 석회화, 동맥 석회화 및 탄력 섬유 무기물화로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 감소시키거나 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하여, 상기 화합물의 투여가 피험체에서 세포외 파이로포스페이트(PPi) 농도를 증가시킴으로써, 상기 피험체에서 심장 석회화, 동맥 석회화 및 탄력 섬유 무기물화로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 감소시키거나 또는 예방하는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물이 피하 투여용인 약학 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 조성물의 투여는 상기 피험체의 세포외 파이로포스페이트 농도를 GACI, PXE, 또는 GACI 및 PXE를 앓지 않는 피험체에서 확인되는 범위 이내의 수준으로 복원시키는 것인 약학 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 피험체는 상기 조성물의 투여 전에 성장 장애(failure to thrive)를 나타내거나, 성장 장애로 진단받거나, 또는 성장 장애를 나타내고 또한 성장 장애로 진단받은 것인 약학 조성물.

청구항 15

ABCC6의 기능 상실 돌연변이를 갖는 것을 특징으로 하는 질환을 앓는 피험체에서, 심장 석회화, 동맥 석회화, 및 탄력 섬유 무기물화로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 감소시키거나 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 16

ENPP1의 기능 상실 돌연변이를 갖는 것을 특징으로 하는 질환을 앓는 피험체에서, 심장 석회화, 동맥 석회화, 및 탄력 섬유 무기물화로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 감소시키거나 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물.

청구항 19

제12항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 20

제12항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물.

청구항 21

제13항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 22

제13항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물.

청구항 23

제14항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 24

제14항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 26

제15항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물.

청구항 27

제16항에 있어서, 상기 피험체는 포유동물인 약학 조성물.

청구항 28

제16항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 약학 조성물

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 그 전체로 참조로 본원에 편입되는, 2015년 5월 19일 출원된 미국 가출원 제62/163,500호에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 청구한다.

배경 기술

[0003] 소아 전신 동맥 석회화(GACI)는 신생아기에 심혈관계 혀탈 및 사망을 초래하는, 거대 크기 및 중간 크기 혈관내 광범위한 동맥 석회화의 유아기 발병을 특징으로 하는 극희귀 신생아기 질환이다. 이 질환은 임상적으로 심부전증, 호흡 곤란증, 고혈압, 청색증, 및 심장비대증을 나타낸다. 예후는 심각한데, 보다 오래된 보고서에 따르면 6개월 사망률이 85%였고, 최근에 바이포스포네이트를 사용한 집중 치료에서는 6개월 사망률이 55%로 낮아졌다. 이러한 명확한 진척을 잠재운 것은 GACI를 갖는 환자에서 에트리도네이트의 장기간 사용과 연관된 중증 골격 독성, 제한된 입수 데이터가 바이포스포네이트 치료가 진짜로 보호적인지 또는 덜 영향받은 환자에서 질환의 자연사를 반영하는지를 결정하는 것을 어렵게 만든다는 관찰, 및 초기에 시행된 경우에도 일부 환자에서 사망을 방지하는 바이포스포네이트의 무효능이다.

[0004] GACI의 전체 발병률은 드문데, 의학 문헌에 200건의 사례가 보고되었고 질환 빈도는 391,000명 중 한 명꼴이다. 이 질환은 1901년 Bryant 및 White가 처음 설명하였지만, Rutsch와 그의 동료들이 혈청 PPi 수준 및 ENPP1 효소 활성이 GACI 환자들에서 상당히 손상되었음을 언급한 것은 2000년이 되어서 였다. ENPP1(NPP1 또는 PC-1이라고도 알려짐)은 포스포다이에스터라제 활성을 특징으로 하고, 뇌 모세관의 혈관 표면을 비롯하여, 골아세포 및 연골세포의 미네랄-침착 매트릭스 소포체 상에 위치하는 II형 세포의 막 결합 당단백질인, 엑토뉴클레오타이드

파이로포스파타제/포스포다이에스터라제(ENPP 또는 NPP로도 알려짐) 효소 패밀리의 구성원이다. ENPP1은 세포외 ATP의 AMP 및 PPi로의 분해를 이화작용한다. PPi는 아마도 발생기 또는 성장하는 하이드록시아파타이트(HA) 결정의 표면 상에서 Pi 부위의 일부를 차지하여, 결정 성장의 확대를 서행시키거나 또는 종료시키는 불규칙성을 생성시켜 이소성 조직 무기질화를 억제한다. ENPP1에 불활성화 돌연변이는 GACI 환자의 75%를 차지하며, 나머지 환자의 상당 부분은 *abcc6* 유전자에 의해 코딩되는 ATP 의존적 막 수송체 MRP6의 불활성화 돌연변이에 의한 것이다. *abcc6*의 돌연변이는 뉴클레오사이드 트라이포스페이트의 감소된 세포외 농도와 연관되어 있어서, 세포외 PPi로 ATP의 ENPP1 물질대사를 제한한다.

[0005] 신장은 포스페이트의 배출을 포함하여, 정상 뼈 및 무기물 물질대사의 유지에 필수적이다. 신부전증이 있는 환자는 혈청 무기물 평형을 적절하게 조절할 수 없고 다양한 식이 성분들로부터 흡수된 포스페이트를 유지하는 경향이 있다. 포스페이트의 높은 혈청 수준은 부갑상선 호르몬의 과도한 분비 및 혈관을 포함한 연조직의 석회화 경향과 연관된다.

[0006] 신부전증 환자에서, 포스페이트 및 파이로포스페이트 음이온의 과도한 제거가 혈액투석 또는 복막 투석 동안 일어날 수 있다. 조직 및 혈장으로부터 이들 음이온의 고갈은 연조직의 골연화 및 석회화 및 골질환을 포함한, 뼈 및 무기물 물질대사의 장애를 초래한다. 파이로포스페이트 결핍은 중증, 만성 통증을 유발시키는, 피부 및 기저 조직의 괴사를 초래할 수 있는 저항성 칼슘형성증이라고 하는 염증성 혈관염을 일으키는 피부의 소형 혈관으로 칼슘을 침착시키는 위험한 인자일 수 있다. 저항성 칼슘형성증은 이 병태에 효과적인 치료가 없어, 발병된 사지의 절단을 필요로 할 수 있고 일반적으로 치명적이다. 이소성 석회화는 미치료된 채로 남으면, 높은 이환 상태 및 사망을 초래한다. 시스템 내 파이로포스페이트의 양을 조절하고 환자에서 저항성 칼슘형성증의 발생을 감소시키는 것이 중요하다.

[0007] 2003년에, 1950만명의 미국 성인이 만성 신장 질환(CKD)을 가지고 있었으며, NKF/DQI(National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)가 정의한 바에 의하면, 1360만명이 2-5병기의 CKD를 갖고 있었다. 만성 신장 질환의 부정적인 결과는 종종 초기 검출 및 치료를 통해 예방될 수 있거나 또는 지연시킬 수 있다.

[0008] 말기 신장 질환(ESRD)의 유병률은 놀랄만한 속도로 증가되고 있다. 2000년대에, 말기 신장 질환은 미국에서 90,000명 이상의 사람에서 발병되었다. 투석 요법 중이거나 또는 이식을 필요로 하는 환자 개체군은 2003년에 380,000명이었고, 2010년에 환자가 651,000명이 되었다. ESRD 환자에 대한 간호는 벌써 미국에서 년간 180억불이 넘게 소비되고 있어서, 건강 관리 시스템의 상당한 부담이다.

[0009] 석회형성성 요독성 세동맥병증(CUA라고도 함)은 투석시 만성 신장 질환(CKD)을 갖는 환자에서 보이는 치명적인 질환이다. 소동맥의 석회화는 조직 및 피부의 허혈, 경색 및 혈전을 초래하고, 환자 사망률이 80%에 가깝다. 현재 CUA를 획득할 위험성에 있는 미국 내 투석 중인 450,000명의 환자가 있고, 질환에 대해 승인된 치료는 없다. CUA는 고수준의 섬유아세포 성장 인자 23(또는 FGF23) 및 저수준의 PPi를 나타내는 다른 석회화의 장애 및 GACI 와 유사한 특질을 갖는다. 투석을 필요로 하는 ESRD 환자에서, 이러한 석회화 과정은 더욱 가속화되어, 평균 기대 수명이 5-6년이다.

[0010] 탄력섬유성 가황색종(PXE)은 탄력의 손실 및 이완, 동맥 부전증, 심혈관 질환, 및 황반변성을 초래하는 망막 출혈과 연관된 피부 병변을 유발하는, 피부, 동맥 및 망막 내 탄력 섬유의 무기물화를 특징으로 하는 유전성 장애이다. PXE와 연관된 돌연변이가 또한 *abcc6* 유전자에 위치된다. 피부 징후는 PXE의 가장 일반적인 특징 중 하나이지만, 안구 및 심혈관 증상은 질환 사망률의 원인이다. 특징적인 피부 병변(얼굴, 목, 겨드랑이, 정주와, 슬와, 서혜부 및 배꼽주변부 상에서 전형적으로 보이는, 황색 구진 및 반 및 탄력 손실에 따른 이완)은 일반적으로 PXE의 초기 징후이고 중피에 비정상적인 무기물화된 탄력 섬유의 축적에 의한다. 그들은 일반적으로 소아기 또는 청소년기에 검출되어 서서히 그리고 종종 예측할 수 없게 진행된다. PXE 진단은 중간 및 하부 진피의 분열된 탄력 섬유의 석회화를 보이는 피부 생검을 통해 확인할 수 있다.

[0011] PXE의 일반적인 심혈관 합병증은 중형 동맥의 내탄력판 내 비정상적인 석회화된 탄력 섬유의 존재에 기인한다. 광범위한 표현형은 조숙한 동맥경화성 변화, 협심증 또는 간헐성 과행증 또는 둘 모두를 초래하는 내막 섬유증 식증, 초기 심근경색증 및 고혈압을 포함한다. 심장내막 및 방실판막의 섬유성 비후화는 또한 제한 심장근육병증을 유발시킬 수 있다. PXE 환자 중 대략 10%가 또한 전신 동맥벽 무기물화의 결과로서 위장 출혈 및 중추신경계 합병증(예컨대 졸중 및 치매)이 발생된다. 또한, 신장혈관 고혈압 및 심방성 격벽 동맥류가 PXE 환자에서 보일 수 있다.

- [0012] 혈청 포스페이트 수준이 감소되거나 또는 상승되는 병태를 각각 저인산염혈증 및 고인산염혈증이라고 한다. 종종 신장 포스페이트 소모로 인한 저인산염혈증은 X-연관 저인산혈 구루병(XLH), 고칼슘뇨증을 수반하는 유전성 저인산혈 구루병(HHRH), 저인산염혈증 골질환(HBD), 및 상염색체 우성 저인산염혈증성 구루병(ADHR)을 포함한 수많은 유전적 장애에 의해 야기된다. 적절한 혈청 포스페이트 농도가 유지되는 정확한 분자 기전은 불충분하게 이해되었지만, 상기 질환의 증상을 경감시키기 위해 혈청 포스페이트 수준을 유지시키는 것이 결정적이다.
- [0013] 따라서, 병리학적 석회화 및/또는 병리학적 골화와 연관된 질환 및 장애를 치료하기 위한 신규한 조성물 및 방법이 당분야에서 필요하다. 그러한 조성물 및 방법은 다른 생리학적 과정을 바람직하지 않게 파괴해서는 안된다. 본 발명은 이러한 요구를 충족한다.
- 발명의 내용**
- [0014] 본 발명은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물을 제공한다. 본 발명은 병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에서 치료하거나 또는 예방하는 방법을 더 제공한다. 본 발명은 GACI 및 PXE로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 질환 또는 장애를 앓는 유아에서 심장 석회화, 동맥 석회화 및/또는 탄력 섬유 무기물화증을 감소시키거나 또는 예방하는 방법을 더 제공한다.
- [0015] 일정 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y(I)이고, 화학식 (I)에서, PROTEIN은 서열번호 15, 서열번호 17, 서열번호 19, 및 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택되고, DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인(Fc라고도 함), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB라고도 함) 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되고; X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-20개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이고, Y는 부재하거나 또는 (DSS)_n(서열번호 4), (ESS)_n(서열번호 5), (RQQ)_n(서열번호 6), (KR)_n(서열번호 7), R_m(서열번호 8), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 9), EEEEEEEPRGDT(서열번호 10), APWHLSSQYSRT(서열번호 11), STLPIPHEFSRE(서열번호 12), VTKHLNQISQSY(서열번호 13), 및 E_m(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열이고, 여기서 m은 1 내지 15 범위의 정수이고, n은 1 내지 10 범위의 정수이다.
- [0016] 일정 실시형태에서, DOMAIN은 Fc 또는 이의 단편이다. 다른 실시형태에서, DOMAIN은 ALB 또는 이의 단편이다.
- [0017] 일정 실시형태에서, Y는 부재하고 화합물은 음으로 하전된 뼈 표적화 서열이 결여된다.
- [0018] 일정 실시형태에서, PROTEIN은 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 돌연변이를 갖는다. 다른 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체의 뉴클레아제 도메인은 부재한다. 또 다른 실시형태에서, 서열번호 1에 대해 대략 잔기 524 내지 대략 잔기 885의 뉴클레아제 도메인은 PROTEIN 또는 이의 돌연변이체에서 부재한다. 또 다른 실시형태에서, 퓨린 또는 신호 웹타이드 절단성 부위를 함유하는 NNP2의 세포의 영역의 절편은 PROTEIN 또는 이의 돌연변이체로 치환되거나, 또는 치환되지 않는다.
- [0019] 일정 실시형태에서, DOMAIN은 Fc 또는 이의 단편이고, 여기서 PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 15)-Z-(Fc 또는 이의 단편), (서열번호 17)-Z-(Fc 또는 이의 단편), (서열번호 19)-Z-(Fc 또는 이의 단편), (서열번호 24)-Z-(Fc 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.
- [0020] 일정 실시형태에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, (서열번호 24)-Z-(서열번호 26), 또는 서열번호 1에 대해 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.
- [0021] 일정 실시형태에서, DOMAIN은 ALB 또는 이의 단편이고, 여기서 PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 15)-Z-(ALB 또는 이의 단편), (서열번호 17)-Z-(ALB 또는 이의 단편), (서열번호 19)-Z-(ALB 또는 이의 단편), (서열번호 24)-Z-(ALB 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382,

Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

- [0022] 일정 실시형태에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 21, (서열번호 17)-Z-(서열번호 27), 서열번호 22, 서열번호 25, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.
- [0023] 일정 실시형태에서, 화합물은 약 $3.4(\pm 0.4) \text{ s}^{-1} \text{ 효소}^{-1}$ 보다 크거나 또는 동일한 k_{cat} 값을 가지며, 여기서 k_{cat} 은 화합물의 ATP 가수분해 속도를 측정하여 결정된다.
- [0024] 일정 실시형태에서, 화합물은 약 $2 \text{ } \mu\text{M}$ 보다 작거나 또는 동일한 K_m 값을 가지며, 여기서 K_m 은 화합물의 ATP 가수분해 속도를 측정하여 결정한다.
- [0025] 일정 실시형태에서, NPP1 폴리펩타이드는 엑토뉴클레오타이드 파이로포스페이트/포스포다이에스터라제-2(NPP2) 경막 도메인을 포함하는 전구체 NPP1 폴리펩타이드의 절단 생성물이다.
- [0026] 일정 실시형태에서, NPP2 경막 도메인은 서열번호 23에 상응하는, NCBI 수탁 번호 NP_001124335(서열번호 2)의 잔기 12-30이다.
- [0027] 일정 실시형태에서, 상기 방법은 본 발명의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0028] 일정 실시형태에서, 질환은 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 특발성 소아 동맥 석회화(IIAC), 후종 인대의 골화(OPLL), 저인산혈 구루병, 골관절염, 및 동맥경화반의 석회화로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함한다.
- [0029] 일정 실시형태에서, 질환은 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증 및 조로증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함한다.
- [0030] 일정 실시형태에서, Y는 부재하고 화합물은 음으로 하전된 뼈 표적화 서열이 결여된다.
- [0031] 일정 실시형태에서, 상기 방법은 엑토뉴클레오타이드 파이로포스페이트/포스포다이에스터라제-1(NPP1) 폴리펩타이드 및 IgG Fc 도메인을 포함하는 소정 폴리펩타이드의 치료 유효량을 유아에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 소정 폴리펩타이드는 폴리아스파르트산 도메인이 결여되어서, 소정 폴리펩타이드의 투여는 유아에서 세포외 파이로포스페이트(PPi) 농도를 증가시킨다.
- [0032] 일정 실시형태에서, 상기 방법은 엑토뉴클레오타이드 파이로포스페이트/포스포다이에스터라제-1(NPP1) 폴리펩타이드 및 ALB를 포함하는 소정 폴리펩타이드의 치료 유효량을 유아에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 소정 폴리펩타이드는 폴리아스파르트산 도메인이 결여되어, 소정 폴리펩타이드의 투여는 유아에서 세포외 파이로포스페이트(PPi) 농도를 증가시킨다.
- [0033] 일정 실시형태에서, 투여는 흡입, 경구, 비축, 직장, 비경구, 설하, 경피, 경점막(예를 들어, 설하, 설축, (경)구강, (경)요도, 질(예를 들어, 질경유 및 질주위), 비(내), 및 (경)직장), 방광내, 폐내, 십이지장내, 위내, 척추강내, 피하, 근육내, 피내, 동맥내, 정맥내, 기관지내, 흡입, 및 국소로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이다. 다른 실시형태에서, 투여는 피하이다.
- [0034] 일정 실시형태에서, 투여는 GACI 및/또는 PXE를 앓지 않는 유아에서 확인되는 범위내의 수준으로 유아의 세포외 파이로포스페이트 농도를 복원시킨다.
- [0035] 일정 실시형태에서, 유아는 투여 전에 "성장 장애"를 나타내고/내거나 그로 진단받는다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 본 발명의 예시적인 실시형태의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해하게 된다. 본 발명을 예시하는 목적을 위해, 특정 실시형태를 도면으로 보여준다. 그러나, 본 발명이 도면에 도시된 실시형태의

상세한 방식 및 수단에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

도 1A-1G는 자연사 실험을 예시하는 그래프 및 이미지의 세트를 포함한다. 도 1A: 촉진 식이 중인 ENPP1-asj/asj 및 ENPP1-WT 형제쌍의 평균 1일 체중. 70일 기간 동안 촉진 식이 중인 ENPP1-WT(청록색 사각형) 및 ENPP1-asj/asj 마우스(녹색 원형)의 1일 체중. 성장 장애 지점은 체중이 ENPP1-WT로부터 벗어날 때인, 26일에 ENPP1-asj/asj 코호트에서 나타났다. 폐사 사건은 적색 화살표로 표시하였다. 도 1B: 생존 곡선, 자연사 실험, ENPP1-asj/asj의 평균 생존은 58일이었다. ENPP1-WT 코호트에서 폐사가 관찰되지 않았다. 도 1C: 대표적인 마이크로-CT 및 조직학, 자연사 실험. 일부 asj/asj 동물은 E)에서 볼 수 있듯이 심장 및 대동맥에 극적인 석회화가 전개되었다. ENPP1-asj/asj 마우스의 대동맥은 모두 대동맥의 알자리안(Alzarian) 레드 염색으로 예시된 바와 같이, 혈관벽에 만연한 거의 주변 석회화를 보유하였다. 도 1F: asj/asj 마우스, 좌심실(40×)의 조직학. 반복되고, 오래된, 치유된 심근 경색의 존재를 밝혀준 반흔 조직으로 둘러쌓인 광범위한 석회화. 도 1G: asj/asj 마우스, 격막(100×)의 조직학. 보다 전형적으로, asj 마우스는 이전에 심근 경색으로도 진단된, 심근 격막에서, 여기서 보여지는 바와 같이 주변 반흔 조직과 함께 석회화의 작은 병소를 나타내었다.

도 2A-2E는 물질대사 경로를 비롯하여, 본 발명의 치료 단백질의 디자인, 안정성, 및 동역학적 특성을 예시한 그래프 및 이미지의 세트를 포함한다. 도 2A: 이소성 석회화와 관련된 푸린성 물질대사의 물질대사 경로의 계략도. ENPP1은 세포의 ATP를 AMP 및 PPi로 전환시키고, TNAP는 PPi를 Pi로 전환시키며, CD73은 AMP를 아데노신 및 Pi로 전환시킨다. *abcc6* 유전자는 ATP의 세포의 농도를 증가시키는 막 수송체인, MRP6을 코딩한다. TNAP의 기능 상실 돌연변이는 가족성 저인산증을 유발시킨다. ENPP1의 기능 상실 돌연변이는 GACI를 유발시키고, MRP6의 기능 상실 돌연변이는 PXE를 유발시키며, CD73의 기능 상실 돌연변이는 'ADCD'라고 하는 동맥 및 관절 석회화 질환을 유발시킨다. 도 2B: ENPP1 단백질 요법제의 디자인. 가용성 재조합 단백질을 생성시키기 위해서, 푸린 철단성 부위를 함유하는 NPP2의 세포의 영역의 절편을 이전에 기술된 대로 ENPP1에 치환시키고, 단백질을 인간 면역글로불린 1(IgG1)의 Fc 도메인과 C-말단에서 융합시켰다. 도 2C: ENPP1 요법제의 안정성. ENPP1-Fc Ap3A 활성은 PBS 중 냉동-해동 주기 후 -80°C 저장에 안정한 것으로 확인되었다. 도 2D-2E: hENPP1-Fc의 정상 상태 동역학. 도 2D: (아래에서 위로) 1.0, 2.0, 7.8, 125 및 250 μM의 ATP에 대한 10 nM hNPP1-Fc의 첨가 후 HPLC 분석으로 측정된 AMP 형성의 시간 경과. 데이터를 적합화시켰지만 매끄러운 곡선이 비선형 동역학 시간 경과 분석을 통해 얻어졌다. 삽입도는 패널 A의 낮은 [ATP] 시간 경과, (아래부터 위로) 1.0, 2.0, 7.8 μM ATP를 보여준다. 1.0 μM ATP의 시간 경과는 ATP가 1분 후에 완전하게 고갈되었고 따라서 그 속도를 결정할 수 없었다. 도 2E: 효소 당 ATP 농도 의존적 초기 ATP 가수분해 속도. 7.8 μM 이후 초기 속도는 본질적으로 k_{cat} (평균) = $3.4(\pm 0.4)$ s^{-1} 효소^{-1} 와 동일하다. 2.0 μM ATP 농도에서 초기 속도는 k_{cat} 값의 대략 절반이고, 따라서 hNPP1-Fc 단백질에 의한 ATP 가수분해에 대해 $K_m \sim 2 \mu M$ 로 추정된다.

도 3A-3D는 개념 증명 실험을 예시하는 그래프 및 이미지의 세트를 포함한다. 도 3A: 1일 동물 체중. 매일 PBS 중 500 au/Kg qD인 마우스 ENPP1-Fc(mENPP1-Fc) 및 매주 GK1.5 면역억제제를 투약한 ENPP1-asj/asj 형제쌍과 비교한 비히클을 투약(매주 GK 1.5가 보충된 매일 PBS 주사)한 ENPP1-WT 및 ENPP1-asj/asj 형제쌍의 평균 1일 체중. 투약 및 침량은 14일에 시작하였다. ENPP1-asj/asj + 비히클 코호트의 폐사는 폐사일에 적색 화살표로 표시된다. ENPP1-WT + 비히클 또는 ENPP1-asj/asj + ENPP1-Fc 코호트에서 폐사가 보이지 않았다. 도 3B: 생존 곡선, 개념 증명 실험. 도 3C: 좌심실 조직학, (40×, H&E), 자유벽에 미소경색 및 석회화의 거대 병소를 보이는 미처리 asj/asj 마우스. 도 3D: 좌심실 조직학, (40×, H&E), 처리된 asj/asj 마우스. 모든 처리된 ENPP1-asj 마우스는 비정상적인 좌심실 조직학을 보이지 않았다.

도 4A-4G는 대표적인 조직학 및 개념 증명 실험을 예시하는 이미지 세트를 포함한다. 도 4A-4B: 대동맥(40×, 알자리안 레드). 미처리된 ENPP1-asj 마우스(도 4A)는 거의 주변 대동맥 석회화를 보인데 반해, 처리된 ENPP1-asj 마우스(도 4B)는 보이지 않았다. 도 4C: 미처리 ENPP1-asj/asj 마우스, 우심실(40×, H&E). 2마리의 미처리 ENPP1-asj 마우스는 우심실의 자유벽에 거대한, 합류성 심근경색을 가졌다. 도 4D: 처리된 ENPP1-asj/asj 마우스, 우심실(40×, H&E). 모든 처리된 ENPP1-asj 마우스는 정상 우심실 심근을 보였다. 도 4E: 미처리된 ENPP1-asj/asj 마우스, 관상 동맥(100x, H&E). 모든 미처리된 ENPP1-asj/asj 마우스는 관상동맥 석회화를 가졌고, 대부분 허혈증 및 심근 경색으로 진단된, 반흔 조직으로 둘러쌓인 관상 동맥 내 주변 석회화를 보였다. 도 4F: 미처리된 ENPP1-asj/asj 마우스, 심근 격막(100x, H&E). 거의 모든 동물(77%)이 이 동물의 심근 격막에서 입증된 바와 같이, 반응 조직으로 둘러쌓인 심장내 석회화를 보였다. 도 4G: 표현형 비교, 처리 및 미처리 ENPP1-asj/asj 마우스. 처리 및 미처리 동물간에 극적인 크기 차이가 존재하였고, 동물의 건강 및 이동성에 두드러진 차이가 존재하였으며, 최고는 보충 데이터에 제출된 동영상에서 확인할 수 있다.

도 5A-5F는 질환 반응의 생체마커를 예시하는 그래프 및 이미지의 세트를 포함한다. 도 5A: 사후 고해상 마이크로-CT 스캔은 미처리된 ENPP1-asj/asj 마우스의 심장, 관상 동맥, 및 상행 및 하행 대동맥에서 광범위한 석회화를 밝혀주었지만, 처리 ENPP1-asj/asj 코호트 또는 ENPP1-WT 마우스의 이들 장기에서는 석회화가 전혀 없었다. 도 5B: ENPP1-WT 및 처리 및 미처리 ENPP1-asj/asj 동물의 혈장 [PPi]는 ENPP1-FC의 처리가 ENPP1-asj/asj 마우스에서 [PPi]를 WT 수준 이상, 및 미처리 ENPP1-asj/asj 마우스에서 존재하는 거의 미검출 수준 이상으로 충분히 증가시켰음을 밝혀주었다. 도 5C-5D: WT 및 asj/asj 동물의 머리에 주사된 ^{99m}PYP의 흡수율. 자연사 실험의 동물 머리에서 ^{99m}PYP의 흡수%를 측정한 식이 중인 WT 및 asj/asj 동물에서 매주 기록하여, ^{99m}PYP 흡수가 생후 80일 기간 동안 거의 일정하게 유지되지만, 2개 실험군 간에 두드러진 차이가 있음을 입증하였다. 도 5D: 자연사 실험에서, WT 동물 머리에서 평균 ^{99m}PYP 흡수율은 80일 기간 동안 주사된 용량의 대략 15%인데 반해, asj/asj 동물에서 PYP 흡수율은 대략 20%였다($p<0.001$, 스튜던트 양측 T 검정법). 도 5E-5F: WT, 및 처리 및 미처리 asj/asj 마우스의 머리에서 주사된 용량의 ^{99m}PYP 흡수율. ^{99m}PYP 흡수율은 실험군의 실험 중간(30-35일(도 5e)) 및 실험 종료 시(50-65일, 도 5F)에 기록하였다. WT 및 처리된 asj/asj 동물은 두개골 내 흡수율이 대략 15%인데 반해, 미처리된 ENPP1-asj/asj 코호트는 20% 또는 그 이상이었다. 처리 및 미처리 ENPP1-asj 마우스 사이의 차이는 통계적으로 유의한데 반해($p<0.001$, 스튜던트 양측 T 검정법), WT와 처리된 ENPP1-asj 마우스 사이의 차이는 그렇지 않았다.

도 6은 NPP1 융합 단백질의 비제한적인 일정 구성체들을 예시하는 패널 a-h를 포함한다. X 및 Y는 일부 실시형태에서, 선택적인 웹타이드이다. Z는 Fc 도메인 또는 HSA 도메인을 NPP1 단백질의 C 말단에 연결시키는 선택적 링커이다. NPP1 단백질의 N 말단 및 C 말단 영역은 도 6에서 N 및 C로 도시한다. 패널 a-d는 NPP2의 경막 도메인('*'로 표시) 및 NPP1 효소 도메인과 함께 NPP1('**'로 표시)을 포함하는 융합 단백질을 예시한다. NPP1의 효소 도메인은 PSCAKE 아미노산 서열로 시작하여 QED 아미노산 서열에서 종결된다. 패널 e-h는 NPP2의 신호 웹타이드('*'로 표시) 및 NPP1 효소 도메인과 NPP1의 경막 도메인('**'로 표시)을 포함하는 융합 단백질을 예시한다.

도 7은 실시예 1에 기술된 바와 같이 ENPP1-Fc로 처리된 마우스에서 측정된 혈장 PPi 수준을 예시하는 그래프이다.

도 8은 서열번호 22를 발현하는데 사용된 플라스미드의 계략적인 예시도이다.

도 9는 서열번호 25를 발현하는데 사용된 플라스미드의 계략적인 예시도이다.

도 10은 정제된 인간 및 마우스 NPP1-Fc 구성체로부터의 은 염색 영상을 예시하는 영상이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명은 NPP1-함유 폴리웹타이드, 이의 돌연변이체, 또는 돌연변이체 단편이 혈장 파이로포스페이트 불균형, 병리학적 석회화 및/또는 병리학적 골화를 포함한 질환 및 장애의 치료에 유용하다는 발견에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료할 수 있는 병리학적 석회화 및/또는 병리학적 골화를 포함한 질환 및 장애는 제한없이, 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 특발성 소아 동맥 석회화(IAC), 후종 인대의 골화증(OPL), 저인산혈 구루병, 동맥경화반의 석회화, 탄력섬유성 가황색증(PXE), 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 저항성 칼슘형성증(예컨대 말기 신장 질환에 의함) 및 조로증을 포함한다.

[0038] 이러한 질환은 수많은 원인의 결과인데, 원인의 일부는 유전자 돌연변이이고 일부는 당뇨병, 심부전증 또는 대규모 투석의 결과로 인한 합병증이다. 일정 실시형태에서, 그들은 혈장 파이로포스페이트 불균형 및/또는 광범위 석회화의 증상을 공통으로 공유한다.

정의

[0040] 달리 정의하지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및 재료를 기술한다.

[0041] 본원에서 사용시, 하기 용어들 각각은 이 부문에서 그들과 연관된 의미를 갖는다.

[0042] 관사 "한" 및 "하나"는 그 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 의미하고자 본원에서

사용된다. 예를 들어, "한 성분"은 하나의 성분 또는 하나 이상의 성분을 의미한다.

[0043] 측정가능한 값 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급시 사용되는 "약"은 특정값의 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 일정 실시형태에서 $\pm 5\%$, 일정 실시형태에서 $\pm 1\%$, 일정 실시형태에서 $\pm 0.1\%$ 의 편차를 포함하는 의미이며, 그과 같은 편차는 개시된 방법을 수행하는데 적절하다.

[0044] 유기체, 조직, 세포 또는 이의 성분과 관련하여 사용시 용어 "비정상"은 "정상"(예상되는) 개별 특징을 보이는 유기체, 조직, 세포 또는 이의 성분의 적어도 하나의 관찰가능하거나 또는 검출가능한 특징(예를 들어, 연령, 치료, 일수 등)과 상이한 유기체, 조직, 세포 또는 이의 성분을 의미한다. 하나의 세포 또는 조직 유형에서 정상이거나 또는 예상되는 특징은 다른 세포 또는 조직 유형에서 비정상일 수 있다.

[0045] 본원에서 사용시, 용어 "ALB"는 인간 혈청 알부민 단백질을 의미한다.

[0046] 질환 또는 장애는 그 질환 또는 장애의 증상의 중증도, 그러한 증상을 환자가 경험하는 빈도, 또는 둘 모두가 감소하면 "경감된다".

[0047] 본원에서 사용시 용어 "변경", "결합", "변이" 또는 "돌연변이"는 그것이 코딩하는 폴리펩타이드의 기능, 활성, 발현(전사 또는 번역) 또는 입체형태에 영향을 미치는 세포 내 유전자의 돌연변이를 의미한다. 본 발명에 포함되는 돌연변이는 코딩되는 단백질의 발현의 완전한 부재를 포함하여, 코딩되는 폴리펩타이드의 기능, 활성, 발현 또는 입체형태의 강화 또는 과괴를 유발하고 예를 들어, 미스센스 및 넌센스 돌연변이, 삽입, 결실, 프레임 시프트 및 미성숙 종결을 포함할 수 있는 세포 내 유전자의 임의 돌연변이일 수 있다. 그렇게 제한하지 않고, 본 발명에 포함되는 돌연변이는 mRNA의 스플라이싱을 변경(스플라이싱 부위 돌연변이)시킬 수 있거나 또는 리딩 프레임의 이동(프레임시프트)을 야기할 수 있다.

[0048] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 천연 서열 폴리펩타이드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미하다. 대개는, 아미노산 서열 변이체는 천연 폴리펩타이드와 적어도 약 70% 상동성, 적어도 약 80% 상동성, 적어도 약 90% 상동성, 또는 적어도 약 95% 상동성을 보유한다. 아미노산 서열 변이체는 천연 아미노산 서열의 아미노산 서열 내에 일정 위치에 치환, 결실, 및/또는 삽입을 보유한다.

[0049] 본원에서 사용시 용어 "항체"는 항원 상의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 의미한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원에서 유도된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 본 발명의 항체는 예를 들어, 다클론 항체, 단일클론 항체, 세포내 항체("인트라바디"), Fv, Fab 및 F(ab)₂를 비롯하여, 단체 항체(scFv), 중체 항체, 예컨대 낙타과 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 및 인간화 항체를 포함한 다양한 형태로 존재할 수 있다(Harlow, et al., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow, et al., 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston, et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird, et al., 1988, *Science* 242:423-426).

[0050] 본원에서 사용시, 용어 "Ap3P"는 아데노신-(5')-트라이포스포-(5')-아데노신 또는 이의 염을 의미한다.

[0051] 본원에서 사용시, 용어 "소아" 및 "유아"는 상호교환적으로 사용된다.

[0052] 본원에서 사용시 용어 "코딩 서열"은 mRNA 및/또는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 생성하도록 전사 및/또는 번역될 수 있는, 핵산의 서열 또는 이의 상보체, 또는 이의 일부분을 의미한다. 코딩 서열은 성숙한 mRNA를 제공하도록 세포의 생화학적 기구와 함께 연결되는, 미성숙한 1차 RNA 전사물 또는 게놈 DNA의 엑손을 포함한다. 암티센스 가닥은 그러한 핵산의 상보체이고, 코딩 서열은 그로부터 추론될 수 있다. 대조적으로, 본원에서 사용시, 용어 "넌코딩 서열"은 생체내에서 아미노산으로 번역되지 않거나, 또는 tRNA가 아미노산을 위치시키거나 또는 위치시키려고 시도하기 위해 상호작용하지 않는, 핵산의 서열 또는 이의 상보체, 또는 이의 일부분을 의미한다. 넌코딩 서열은 게놈 DNA의 인트론 서열 또는 미성숙 1차 RNA 전사물, 및 유전자-회합된 서열 예컨대 프로모터, 인핸서, 사일렌서 등을 포함한다.

[0053] 본원에서 사용시, 용어 "상보적" 또는 "상보성"은 염기쌍 규칙과 관련하여 폴리뉴클레오타이드(즉, 뉴클레오타이드의 서열)에 대해서 사용된다. 예를 들어, 서열 "A-G-T"는 서열 "T-C-A"에 상보적이다. 상보성은 핵산 염기의 오직 일부가 염기쌍 규칙에 따라서 일치되는 "부분적"일 수 있다. 또는 핵산 사이에 "완전" 또는 "전체" 상보성이 존재할 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성 정도는 핵산 가닥 사이의 혼성화 강도 및 효율에 상당한 영향을 준다. 이는 중폭 반응을 비롯하여, 핵산 간 결합에 의존적인 검출 방법에서 특히 중요하다.

- [0054] 본원에서 사용시, 용어 "보존성 변이" 또는 "보존성 치환"은 본원에서 다른, 생물학적으로 유사한 잔기로 아미노산 잔기의 치환을 의미한다. 보존성 변이 또는 치환은 웹타이드 사슬의 형상을 변화시키는 경향이 없다. 보존성 변이, 또는 치환의 예는 한 소수성 잔기 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌을, 다른 것으로 치환, 또는 한 극성 잔기를 다른 것으로 치환, 예컨대 리신으로 아르기닌의 치환, 아스파르트산으로 글루탐산의 치환, 또는 아스파라긴으로 글루타민의 치환을 포함한다.
- [0055] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없는 동물의 건강 상태이고, 여기서 질환이 경감되지 않으면 동물의 건강은 계속 악화된다.
- [0056] 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있지만, 동물의 건강 상태가 장애가 없을 때 보다 덜 호의적인 건강 상태이다. 미치료인 채로 남아 있으면, 장애가 동물의 건강 상태에 추가적인 감소를 반드시 야기시키지는 않는다.
- [0057] 본원에서 사용시, 용어 "도메인"은 공통 물리화학적 특징, 예컨대, 제한없이, 소수성, 극성, 구형 및 나선형 도메인 또는 특성을 공유하는 구조 또는 분자의 일부분을 의미한다. 결합 도메인의 특정예는 제한없이, DNA 결합 도메인 및 ATP 결합 도메인을 포함한다.
- [0058] 본원에서 사용시, 용어 "유효량", "약학적 유효량" 및 "치료 유효량"은 원하는 생물학적 결과를 제공하는 작용제의 무독성이지만 충분한 양을 의미한다. 그 결과는 질환의 정후, 증상, 또는 원인의 감소 및/또는 경감, 또는 생물계의 임의의 다른 바람직한 변경일 수 있다. 임의의 개별 사례에서 적절한 요법량은 통상의 실험을 사용해 당업자가 결정할 수 있다.
- [0059] "인코딩"은 뉴클레오타이드의 정해진 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 정해진 서열 및 그로부터 생성되는 생물학적 특성을 갖는 생물학적 과정의 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로 제공되는, 폴리뉴클레오타이드 내 뉴클레오타이드의 특정 서열, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA의 고유한 특성을 의미한다. 따라서, 유전자는 그 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물계에서 단백질을 생성시키면 단백질을 인코딩한다. mRNA 서열과 동일하고, 일반적으로 서열 목록으로 제공되는 뉴클레오타이드 서열인 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사용 주형으로 사용되는 넌코딩 가닥 둘 모두는 단백질 또는 유전자 또는 cDNA의 다른 생성물을 인코딩하는 것이라고 할 수 있다.
- [0060] 본원에서 사용시, 용어 "Fc"는 인간 IgG Fc 도메인을 의미한다.
- [0061] 본원에서 사용시, 용어 "성장 장애"는 그의 현재 체중 또는 체중 증가율이 유사한 연령 및 성별의 다른 소아보다 낮은 소아 또는 유아를 의미한다. 소아 또는 유아가 "성장 장애"인 상황은 의료 전문가와의 상담, 및/또는 기지의 평균 연령-특정 체중 또는 체중 증가율 데이터와 소아 또는 유아의 체중 또는 체중 증가율의 비교를 통해 식별할 수 있다.
- [0062] 본원에서 사용시, 핵산에 적용되는 용어 "단편"은 거대 핵산의 부분서열을 의미한다. 핵산의 "단편"은 적어도 약 15개 뉴클레오타이드 길이; 예를 들어, 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드; 적어도 약 100개 내지 약 500개 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개 내지 약 1000개 뉴클레오타이드; 적어도 약 1000개 뉴클레오타이드 내지 약 1500개 뉴클레오타이드; 약 1500개 뉴클레오타이드 내지 약 2500개 뉴클레오타이드; 또는 약 2500개 뉴클레오타이드(및 그 사이의 임의의 정수값)일 수 있다. 본원에서 사용시, 단백질 또는 웹타이드에 적용시 용어 "단편"은 거대 단백질 또는 웹타이드의 부분서열을 의미한다. 단백질 또는 웹타이드의 "단편"은 적어도 약 20개 아미노산 길이; 예를 들어, 적어도 약 50개 아미노산 길이; 적어도 약 100개 아미노산 길이; 적어도 약 200개 아미노산 길이; 적어도 약 300개 아미노산 길이; 또는 적어도 약 400개 아미노산 길이(및 그 사이의 임의의 정수값)일 수 있다.
- [0063] "상동성"은 2개 폴리웹타이드 또는 2개 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 의미한다. 2개의 비교된 서열 둘 모두의 위치를 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛이 차지하고 있는 경우, 예를 들어 2개 DNA 분자 각각의 위치를 아데닌이 차지하면, 분자는 그 위치에서 상동성이다. 2개 서열 간 상동성 비율은 2개 서열이 공유하는 상동성 위치 또는 일치하는 수를 비교된 위치의 수로 나누고 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 2개 서열의 위치 10개 중 6개가 일치하거나 또는 또는 상동성이면, 2개 서열은 60% 상동성이다. 예로서, DNA 서열 ATTGCC 및 TATGGC는 50% 상동성을 공유한다. 일반적으로, 2개 서열이 최대 상동성을 제공하도록 정렬될 때 비교한다.
- [0064] 본원에서 사용시, "면역검정법"은 표적 분자를 검출하고 정량하기 위해 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있는

항체를 사용하는 임의의 결합 검정법을 의미한다.

[0065] 본원에서 사용시 용어 "면역글로불린" 또는 "Ig"는 항체로서 기능하는, 단백질 부류로서 정의된다. B 세포에 의해 발현되는 항체는 때때로 BCR(B 세포 수용체) 또는 항원 수용체라고 한다. 단백질의 이 부류에 포함되는 5개 구성원은 IgA, IgG, IgM, IgD, 및 IgE이다. IgA는 신체 분비물, 예컨대 타액, 눈물, 모유, 위장 분비물 및 호흡기 및 비뇨생식관의 점액 분비물에 존재하는 주요 항체이다. IgG는 가장 일반적인 순환 항체이다. IgM은 대부분의 피험체에서 주요 면역 반응으로 생성되는 주요 면역글로불린이다. 응집반응, 보체 고정, 및 다른 항체 반응에서 가장 효율적인 면역글로불린이고, 박테리아 및 바이러스에 대항한 방어에서 중요하다. IgD는 알려진 항체 기능은 없지만, 항원 수용체로서 기능할 수 있는 면역글로불린이다. IgE는 알레르겐에 노출시 비만 세포 및 호흡기성 세포로부터 매개인자의 방출을 야기시켜 즉시 과민반응을 매개하는 면역글로불린이다.

[0066] 본원에서 사용시 "설명 자료"는 본원에 언급된 다양한 질환 또는 장애를 동정하거나 또는 경감시키거나 또는 치료하기 위한 키트 내에서 본 발명의 핵산, 웨타이드, 및/또는 화합물의 유용성을 알리기 위해 사용할 수 있는 출판물, 기록물, 다이아그램, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 경우에 따라 또는 대안적으로, 설명 자료는 피험체의 세포 또는 조직에서 질환 또는 장애를 동정하거나 또는 경감시키는 1 이상의 방법을 기술할 수 있다. 키트의 설명 자료는 예를 들어, 본 발명의 핵산, 폴리웨타이드, 및/또는 화합물을 함유하는 용기에 고정되거나, 또는 핵산, 폴리웨타이드, 및/또는 화합물을 함유하는 용기와 함께 수송될 수 있다. 대안적으로, 설명 자료는 수용자가 설명 자료 및 화합물을 협력적으로 사용하는 의도로 용기와 별개로 수송될 수 있다.

[0067] "단리된"은 천연 상태로부터 변경되거나 또는 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 핵산 또는 폴리웨타이드는 "단리된"것이 아니지만, 이의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전하게 분리된 동일한 핵산 또는 폴리웨타이드는 "단리된"것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는 비천연 환경 예컨대, 예를 들어 숙주 세포에 존재할 수 있다.

[0068] "단리된 핵산"은 천연 발생 상태에서 측정된 서열로부터 분리된 핵산 절편 또는 단편, 예를 들어 정상적으로 그 단편에 인접한 서열, 예를 들어 그것이 천연적으로 존재하는 게놈 내 그 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 의미한다. 이 용어는 세포 내에서 그것을 천연적으로 수반하는, 핵산, 예를 들어 RNA 또는 DNA 또는 단백질을 천연적으로 수반하는 다른 성분으로부터 실질적으로 정제시킨 핵산에도 적용된다. 따라서, 이 용어는 예를 들어, 백터, 자체적으로 복제되는 플라스미드 또는 바이러스, 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈 DNA에 도입되거나, 또는 다른 서열과 독립적으로 개별 분자(예를 들어, PCR 또는 제한효소 분해에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 또는 cDNA 단편)로 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 이는 또한 추가의 폴리웨타이드 서열을 코딩하는 하이브리드 유전자의 일부분인 재조합 DNA도 포함한다.

[0069] 본원에서 사용시, 용어 "NPP" 또는 "ENPP"는 엑토뉴클레오타이드 파이로포스파타제/포스포다이에스터라제를 의미한다.

[0070] "핵산"은 폴리뉴클레오타이드를 의미하고 폴리리보뉴클레오타이드 및 폴리데옥시뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명에 따른 핵산은 피리미딘 및 푸린 염기, 바람직하게 각각 시토신, 티민, 및 우라실, 및 아데닌 및 구아닌의 임의의 중합체 또는 올리고머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체로 본원에 편입시킨 문헌 [Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, at 793-800(Worth Pub. 1982)]을 참조한다. 또한, 본 발명은 임의의 데옥시뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 웨타이드 핵산 성분, 및 이의 임의의 화학적 변이체, 예컨대 이들 염기의 메틸화, 하이드록시메틸화 또는 글루코실화 형태를 고려한다. 상기 중합체 또는 올리고머는 조성이 불균질하거나 또는 균질할 수 있으며, 천연 발생 공급원으로부터 단리될 수 있거나 또는 인공적으로 또는 합성적으로 생성될 수 있다. 또한, 핵산은 DNA 또는 RNA, 또는 이의 혼합물일 수 있고, 호모듀플렉스, 헤테로듀플렉스, 및 하이브리드 상태를 포함하여, 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 영구적으로 또는 일시적으로 존재할 수 있다.

[0071] "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 적어도 2개, 일정 실시형태에서 적어도 8개, 15개 또는 25개 뉴클레오타이드 길이 범위인 핵산일 수 있지만, 최대 50개, 100개, 1000개, 또는 5000개 뉴클레오타이드 길이 또는 폴리뉴클레오타이드와 특이적으로 혼성화하는 화합물일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 공급원에서 단리되거나, 재조합적으로 생성되거나 또는 인공적으로 합성될 수 있는 데옥시핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 또는 이의 모방체를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 추가 예는 웨타이드 핵산(PNA)일 수 있다(그 전체로 참조로 본원에 편입되는 미국 특허 제6,156,501호 참조). 본 발명은 또한 비전형적인 염기쌍 예컨대 일정 tRNA 분자에서 동정되었고 삼중 나선형으로 존재하는 것으로 상정된 후그스턴 염기쌍이 존재하는 상황을 포함한다. "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 뉴클레오타

이드 서열이 본원에서 DNA 서열(예를 들어, A, T, G, 및 C)로 표시되는 경우, 이는 또한 "U"가 "T"를 대신하는 상응하는 RNA 서열(e.g., A, U, G, C)을 포함한다는 것을 이해한다.

[0072] 본원에서 사용시, 용어 "환자", "개체" 또는 "피험체"는 인간 또는 인간외 포유동물을 의미한다. 인간외 포유동물은, 예를 들어 가축 및 애완동물, 예컨대 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 젖과동물 포유동물을 포함한다. 일정 실시형태에서, 환자, 개체 또는 피험체는 인간이다.

[0073] 본원에서 사용시, 용어 "예방하다" 또는 "예방"은 어떠한 것도 발생되지 않았으면 장애 또는 질환 발생이 없거나, 또는 장애 또는 질환의 발생이 이미 있었으면 추가의 장애 또는 질환 발생이 없음을 의미한다. 또한, 장애 또는 질환과 연관된 증상의 일부 또는 전부를 예방하는 능력을 고려한다.

[0074] 본원에서 사용시, 용어 "약학 조성물" 또는 "조성물"은 약학적으로 허용되는 담체와 본 발명 내에서 유용한 적어도 하나의 화합물을 혼합물을 의미한다. 약학 조성물은 환자에게 화합물의 투여를 용이하게 한다. 화합물을 투여하는 다수의 기술이, 제한없이, 정맥내, 경구, 에어로졸, 흡입, 직장, 질, 경피, 비내, 구강, 설하, 비경구, 척추강내, 위내, 눈, 폐 및 국소 투여를 포함하여, 당분야에 존재한다.

[0075] 본원에서 사용시, 용어 "약학적으로 허용되는"은 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 폐기시키지 않고, 비교적 무독성인, 담체 또는 희석제와 같은 재료를 의미하고, 즉 상기 재료는 그것이 함유되는 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하거나 또는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기시키지 않고 개체에게 투여될 수 있다.

[0076] 본원에서 사용시, 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 그의 의도하는 기능을 수행할 수 있도록 환자에게 또는 환자 내에서 본 발명에서 유용한 화합물을 운반하거나 또는 수송하는데 관여되는, 약학적으로 허용되는 재료, 조성물 또는 담체, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 안정제, 분산제, 혼탁제, 희석제, 부형제, 증점제, 용매 또는 캡슐화 재료를 의미한다. 전형적으로, 그러한 구성체는 신체의 한 장기, 또는 일부분에서, 신체의 다른 장기, 또는 일부분으로 운반되거나 또는 수송된다. 각각의 담체는 본 발명에서 유용한 화합물을 포함하여, 제제의 다른 성분들과 상용성 관점에서 "허용가능"해야만하고, 환자에게 손상을 주어서는 안된다. 약학적으로 허용되는 담체로서 제공될 수 있는 재료의 일부 예는 당류, 예컨대 락토스, 포도당 및 수크로스; 전분 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스, 및 이의 유도체예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 죄약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실류, 흥화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레아이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 계면활성제; 알긴산; 발열원 무함유수; 등장성 염수; 렇거액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충 용액; 및 약학 제제에 적용되는 다른 무독성 상용성 물질을 포함한다. 본원에서 사용시, "약학적으로 허용되는 담체"는 또한 본 발명 내에서 유용한 화합물의 활성과 상용성이고, 환자에게 생리적으로 허용되는 임의의 모든 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 및 흡수 지연제를 포함한다. 보충적인 활성 화합물이 또한 조성물에 도입될 수 있다. "약학적으로 허용되는 담체"는 본 발명 내에서 유용한 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 실시에서 사용되는 약학 조성물에 포함될 수 있는 다른 추가 성분은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어 참조로 본원에 편입되는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences(Genero, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA)]에 기술되어 있다.

[0077] 본원에서 사용시, 표현 "약학적으로 허용되는 염"은 이의 무기산, 무기 염기, 유기산, 무기 염기, 용매화물, 수화물, 및 포접체를 포함한, 약학적으로 허용되는 무독성 산 및 염기로 제조된 투여되는 화합물의 염을 의미한다. 적합한 약학적으로 허용되는 산부가 염은 무기산 또는 유기산으로 제조될 수 있다. 무기산의 예는 셀페이트, 황산수소염, 염산, 브롬산, 요오드산, 질산, 탄산, 황산, 및 인산(인산수소 및 인산이수소 포함)을 포함한다. 적절한 유기산은 유기산의 지방족산, 지환족산, 방향족산, 방향지방족산, 복소환산, 카복실산 및 셀론산 부류에서 선택될 수 있고, 이의 예에는 포름산, 아세트산, 프로피온산, 산신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 안트라닐산, 4-하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 만델산, 엠본산(팜산), 메탄셀론산, 에탄셀론산, 벤젠셀론산, 판토테산, 트라이플루오로메탄셀론산, 2-하이드록시에탄셀론산, p-톨루엔셀론산, 셀파닐산, 시클로헥실아미노셀론산, 스테아르산, 알긴산, β-하이드록시부티르산, 살리실산, 갈락타르산 및 갈락투론산을 포함한다. 본 발명의 화합물의 적합한 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 예를 들어, 알칼리 금속, 알칼리토 금속 및 전이 금속 염 예컨대, 예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연 염을 포함한, 금속성 염을 포함한다. 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 또한 예를 들어, N,N'-다이벤질에틸렌-다이아민, 클로로프로카인,

콜린, 다이에탄올아민, 에틸렌다이아민, 메글루민(N-메틸글루카민) 및 프로카인과 같은 염기성 아민으로 제조된 유기 염을 포함한다. 모든 이를 염은 예를 들어, 적절한 산 또는 염기를 화합물과 반응시켜 상응하는 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0078] 본원에서 사용시, "폴리뉴클레오타이드"는 cDNA, RNA, DNA/RNA 하이브리드, 안티센스 RNA, 리보자임, 게놈 DNA, 합성 형태, 및 혼합 중합체, 센스 및 안티센스 가닥을 포함하고, 비천연 또는 유도화, 합성, 또는 반합성 뉴클레오타이드 염기를 함유하도록 화학적으로 또는 생화학적으로 변형될 수 있다. 또한, 제한없이, 1 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 삽입, 치환, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 서열과의 융합을 포함하여, 야생형 또는 합성 유전자의 변경을 고려한다.

[0079] 본원에서 사용시, 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔기로 구성된 중합체, 이의 관련 천연 발생 구조적 변이체, 및 합성 비천연 발생 유사체를 의미한다. 합성 폴리펩타이드는 예를 들어, 자동화 폴리펩타이드 합성기를 사용해 합성될 수 있다. 본원에서 사용시, 용어 "단백질"은 전형적으로 거대 폴리펩타이드를 의미한다. 본원에서 사용시, 용어 "펩타이드"는 전형적으로 짧은 폴리펩타이드를 의미한다. 폴리펩타이드 서열을 나타내기 위해 본원에서는 관습적인 표기법을 사용한다. 폴리펩타이드 서열의 좌측 말단은 아미노 말단이고, 폴리펩타이드 서열의 우측 말단은 카복실 말단이다.

[0080] 본원에서 사용시, 아미노산은 하기에 표시된 바와 같이, 그의 전체 명칭, 그에 상응하는 3글자 코드, 또는 그에 상응하는 1글자 코드로 표시된다: 아스파르트산(Asp/D); 글루탐산(Glu/E); 리신(Lys/K); 아르기닌(Arg/R); 히스티딘(His/H); 티로신(Tyr/Y); 시스테인(Cys/C); 아스파라긴(Asn/N); 글루타민(Gln/Q); 세린(Ser/S); 트레오닌(Thr/T); 글리신(Gly/G); 알라닌(Ala/A); 발린(Val/V); 류신(Leu/L); 이소류신(Ile/I); 메티오닌(Met/M); 프롤린(Pro/P); 페닐알라닌(Phe/F); 트립토판(Trp/W).

[0081] 본원에서 사용시 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 피험체로부터 단리된 생물학적 물질을 의미한다. 생물학적 샘플은 mRNA, 폴리펩타이드 또는 피험체에서 생리적 병리학적 과정의 다른 마커를 검출하는데 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있고, 개체로부터 획득된 체액, 조직, 세포 및/또는 빈세포 물질을 포함할 수 있다.

[0082] 항체와 관련하여 본원에서 사용시 용어 "특이적으로 결합하다"는 특이적 항원을 인식하지만, 샘플 내 다른 분자는 실질적으로 인식하거나 또는 결합하지 않는 항체를 의미한다. 예를 들어, 하나의 종에서 유래된 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 1 이상의 종에서 유래된 그 항원에도 역시 결합할 수 있다. 그러나, 그러한 교차 종 반응성은 그 자체가 특별하게 항체의 분류를 변경하지 않는다. 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 다른 대립유전자 형태에 결합할 수도 있다. 하지만, 그러한 교차 반응성은 그 자체가 특별히 항체의 분류를 변경하지 않는다. 일부 예에서, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합"은 제2 화학종과 항체, 단백질, 또는 펩타이드의 상호작용과 관련하여 사용될 수 있는데, 그 상호작용이 화학종 상에 특정 구조(예를 들어, 항원성 결정부 또는 에피토프)의 존재에 의존적임을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 항체는 대체로 단백질보다는 특이적 단백질 구조를 인식하여 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적이면, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서, 에피토프 A(또는 자유, 미표지된 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시키게 된다.

[0083] 본원에서 사용시, "실질적으로 정제된"은 다른 성분이 본질적으로 없는 것을 의미한다. 예를 들어, 실질적으로 정제된 폴리펩타이드는 정상적으로 이의 천연 발생 상태에서 회합된 다른 성분과 분리시킨 폴리펩타이드이다.

[0084] 본원에서 사용시, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상, 또는 질환 또는 장애가 발생될 가능성을 치유하거나, 치료하거나, 경감시키거나, 완화시키거나, 변경시키거나, 교정하거나, 개선시키거나, 호전시키거나 또는 영향을 주기 위한 목적으로, 환자에게 요법제, 즉 본 발명 내에서 유용한 화합물(단독으로 또는 다른 약학제와 조합)의 적용 또는 투여, 또는 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상 또는 질환 또는 장애가 발생될 가능성을 갖는, 환자 유래의 단리된 조직 또는 세포주에 요법제의 적용 또는 투여(예를 들어, 진단 또는 생체외 적용을 위함)로서 정의된다. 그러한 치료는 약리유전체학 분야에서 획득된 지식을 기반으로, 특별하게 맞춰지거나 또는 변형될 수 있다.

[0085] 본원에서 사용시, 용어 "야생형"은 천연 발생 공급원에서 단리된 유전자 또는 유전자 생성물을 의미한다. 야생형 유전자는 개체군에서 가장 빈번하게 관찰되는 것이고 따라서 임의로 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형태로 디자인된다. 대조적으로, 용어 "변형된" 또는 "돌연변이체"는 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교하여 서열 및/또는 기능적 특성에 변형(즉, 변경된 특징)을 나타내는 유전자 또는 유전자 생성물을 의미한다. 천연 발생 돌연변이체를 단리할 수 있는데, 이들은 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교시 그들이 변경된 특징(변

경된 핵산 서열 포함)을 갖는다는 사실에 의해 동정된다.

[0086] 범위: 본원의 전반에서, 본 발명의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기술은 단지 편리함과 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범주를 확고하게 제한하는 것으로 해석해서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 기술은 모든 가능한 하위 범위를 비롯하여 그 범위 내 개별 수치값을 특별히 개시하는 것으로 간주해야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기술은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위범위를 비롯하여, 그 범위 내 개별 수치, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 특별히 개시한 것으로 간주한다. 이는 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

설명

[0088] ENPP1은 신체 내에서 세포외 PPi의 주요 공급원이다. GACI의 발현, 진행 및 중증도의 다묘인성 및 다수의 유전적 병인에도 불구하고, 현재의 결과는 NPP1의 세포외 푸린성 물질대사의 파괴가 GACI와 연관된 병리학적 후유증 및 사망률의 원인이고, ENPP1을 사용한 효소 치환 요법이 다루기 쉬운 치료적 접근법임을 보여준다. 이는 '촉진식이' 중인 GACI의 ENPP1-asj 마우스 모델을 사용해 입증하였다.

[0089] 이소성 조직 석회화의 질환은 극희귀 질환, 예컨대 GACI에서부터 노령 인구에 거의 편재하는 병 예컨대 동맥의 경화 및 골관절염에 이른다. 인간 GACI의 유전적 병인은 치명적인 동맥 석회화가 ENPP1의 기능 상실 돌연변이 또는 세포외 PPi로 ENPP1에 의해 물질대사되는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상류 감소를 통한, 세포외 푸린성 물질대사의 손상에 의한 것임을 시사한다. 본원에서 입증한 바와 같이, 비표적화된 ENPP1 또는 비표적화된 ENPP1-Fc의 폐하 보충은 GACI의 동물 모델에서 심장 및 동맥 석회화를 비롯하여, 폐사율을 제거할 만큼 충분하게 세포외 PPi 농도를 증가시킨다. 이를 결과는 비표적화된 효소 치환 요법이 GACI 및 비제어적인 혈관 석회화를 초래하는 다른 질환에서 효과적일 수 있음을 의미한다.

[0090] 본 결과는 효능을 위해 뼈-표적화 모티프의 필요성을 주장한, 유전성 저인산증(HPP)을 치료하는 이전의 실험 관점에서는 놀라운 것이다. HPP는 뼈 무기물화의 감소/부재의 구루병-유사 질환이고, 재조합 TNAP를 사용한 치료는 임상적 효과를 획득하기 위해 뼈 표적화의 필요성을 언급하였다(Millan, et al., 2008, J. Bone Mineral Res. 23:777-787; Whyte, et al., 2012, New Engl. J. Med. 366:904-913). 비표적화된 TNAP가 농축된 혈청으로 HPP를 치료하고자 시도한 임상 실험은 실패하였다(Whyte, et al., 1982, J. Pediatrics 101:379-386; Whyte, et al., 1984, J. Pediatrics 105:926-933; Weninger, et al., 1989, Acta Paediatrica Scandinavica Suppl. 360:154-160). 또한, 본 발명의 시점에 문헌은 비표적화된 NPP1이 시험관내 석회화 검정법에서 효능을 보이지 않았음을 보여주었고(WO 2012/125182(Quinn, et al.), 예컨대 예를 들어, 이의 도 23 참조), 따라서 뼈 표적화가 NPP1 함유 생물 제제의 생체내 생물학적 활성을 위해 필수적이었음을 의미한다. 그러나, 일정 실시형태에서, 본 결과는 뼈 표적화가 치료적 효능에 필수적이지 않다는 것을 보여준다.

[0091] GACI의 동맥 석회화는 2번째로 희귀한 질병인, PXE의 전형인 피부 및 망막의 혈관밖 석회화를 수반할 수 있다. PXE는 GACI와 밀접하게 관련되지만, 대신 피부, 눈, 및 심혈관계에 영향을 주는 탄력 섬유의 이소성 조직 무기물화를 유발시킨다. PXE는 후발성의, 보다 느린 진행성을 갖고, GACI보다 비교적 더 일반적이며, 발병률이 1/25,000 내지 1/75,000이다. 임상적 징후는 가죽같은 피부의 거대 반으로 합쳐지는 작은 황색 구진의 발생이 피부에서 시작되어 눈에 혈관양선조가 뒷따르고 출혈, 흉터, 신생혈관생성, 진행성 시력 상실 및 실명이 초래된다. 심혈관계는 또한 중간 크기의 동맥 혈관의 진행성 무기물화에 의해 영향받을 수 있어, 고혈압, 과행, 장동맥의 우발적 출혈, 및 (드물게) 조숙한 심근 경색이 유발된다. PXE의 유전적 이유는 *abcc6* 유전자 내 기능 상실 돌연변이로서, MRP6 단백질의 기능 손상이 초래되어, 시험관 내 및 생체 내 세포외 뉴클레오타이포스페이트 (NTP) 농도가 감소된다. 이는 ENPP1 기질 농도를 감소시켜서, PPi의 세포외 생성을 제한한다.

[0092] GACI의 NPP1-asj 마우스 모델은 인간 GACI의 유전적 병인 및 병리학적 특성을 보유하지만, 마우스는 또한 GACI의 특징은 아니지만 비조절성 관절주위 석회화의 인간 질환 예컨대 골관절염 및 후종 인대의 골화증(OPLL)을 연상시키는 관절주위 석회화가 발생된다. ENPP1에 미스센스 돌연변이(V246D)를 보유하는 마우스는 마우스의 앞발에 진행성 관절주위 석회화의 발생을 반영하는, '강직 관절과 연관된(associated with stiffened joints)'이라는 'asj' 마우스로 처음에 기술되었다. OPLL에 대한 통찰력을 제공하기 위해 마우스의 ENPP1 돌연변이를 사용하여 *ttw/ttw* 마우스의 척추연 석회화의 모델을 만들었지만, GACI에서 ENPP1 돌연변이의 동정은 이를 동물에서 혈관 석회화의 존재에 대한 재평가를 야기시켰고 Uitto와 그의 동료들은, NPP1-asj 마우스가, 높은 Ca^{+2} 및 낮은 Mg^{+2} 의 특별한 식이를 공급시, 인간 GACI의 많은 본질적인 특성을 재현하였음을 보여주었다. ENPP1 단백질 수준은 인간에서 연골 석회화 및 골관절염의 중증도와 반비례적으로 상관이 있고, ENPP1 유전자 변이체는 질환의 유

전형 성향이 있는 환자 개체군 내 손 골관절염의 실질적인 비율을 차지한다. 일정 실시형태에서, ENPP1 효소 치환 요법은 ENPP1 결핍 및/또는 세포외 PPi 농도의 감소로 인한 골관절염 형태에 대한 실현가능한 치료 전략이다. 그러한 병태는 제한없이, PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 및 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증을 포함한다.

[0093] **조성물**

[0094] 일정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 하기 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 용매화물 또는 염(예컨대 약학적으로 허용되는 염)을 포함한다:

[0095] PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y (I)

[0096] 상기 화학식 (I)에서,

[0097] PROTEIN은 NPP121(서열번호 15), NPP71(서열번호 17), NPP1 N 말단 GLK가 결여된 NPP71(서열번호 19), 및 NPP51(서열번호 24)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이고;

[0098] DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB) 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이고;

[0099] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-20개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이고;

[0100] Y는 부재하거나 또는 (DSS)_n(서열번호 4), (ESS)_n(서열번호 5), (RQQ)_n(서열번호 6), (KR)_n(서열번호 7), R_m(서열번호 8), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 9), EEEEEEEPRGDT(서열번호 10), APWHLSSQYSRT(서열번호 11), STLPPIPHEFSRE(서열번호 12), VTKHLNQISQSY(서열번호 13), 및 E_m(서열번호 14)으로 이루어진 군에서 선택된 서열이고, 여기서 m은 1 내지 15 범위의 정수이고, n은 1 내지 10 범위의 정수이다.

[0101] 일정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 하기 화학식 II)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다:

[0102] PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y (II)

[0103] 상기 화학식 (II)에서,

[0104] PROTEIN은 NPP121(서열번호 15), NPP71(서열번호 17), NPP1 N 말단 GLK가 결여된 NPP71(서열번호 19), 및 NPP51(서열번호 24)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이고;

[0105] DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB) 및 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이고;

[0106] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-20개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이고;

[0107] Y는 (DSS)_n(서열번호 4), (ESS)_n(서열번호 5), (RQQ)_n(서열번호 6), (KR)_n(서열번호 7), R_m(서열번호 8), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 9), EEEEEEEPRGDT(서열번호 10), APWHLSSQYSRT(서열번호 11), STLPPIPHEFSRE(서열번호 12), VTKHLNQISQSY(서열번호 13), 및 E_m(서열번호 14)로 이루어진 군에서 선택된 서열이고, 여기서 m은 1 내지 15 범위의 정수이고, n은 1 내지 10 범위의 정수이다.

[0108] 일정 실시형태에서, DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인 또는 이의 단편을 포함한다. 다른 실시형태에서, DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인 또는 이의 단편으로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 실시형태에서, DOMAIN은 인간 IgG Fc 도메인 또는 이의 단편으로 이루어진다.

[0109] 일정 실시형태에서, DOMAIN은 인간 혈청 알부민 단백질 또는 이의 단편을 포함한다. 다른 실시형태에서, DOMAIN은 인간 혈청 알부민 단백질 또는 이의 단편으로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 실시형태에서, DOMAIN은 인간 혈청 알부민 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진다.

[0110] 일정 실시형태에서, Y는 음으로 하전된 뼈 표적화 서열이다. 일정 실시형태에서, Y는 부재한다. 일정 실시형태에서, Y는 부재하고, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 음으로 하전된 뼈 표적화 서열이 결여된다. 또 다른 실시형태에서, 폴리아스파르트산 도메인 및 서열번호 4-14는 음으로 하전된 뼈 표적화 서열의 비제한적인 예이다.

[0111] 일정 실시형태에서, PROTEIN은 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg

456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 돌연변이를 갖는다. 다른 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 뉴클레아제 도메인을 제거하기 위해 절단된다. 또 다른 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 서열번호 1에 대한 대략 잔기 524 내지 대략 잔기 885의 뉴클레아제 도메인을 제거하기 위해 절단되어, 단백질의 촉매 활성을 보존하기 위해 제공되는, 서열번호 1에 대해서 대략 잔기 186 내지 대략 잔기 686의 촉매 도메인만 남겨진다.

[0112] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 15)-Z-(Fc 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시 형태에서, Z는 L I N이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 16, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0113] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 17)-Z-(Fc 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시 형태에서, Z는 L I N이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 18, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이를 포함한다.

[0114] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 19)-Z-(Fc 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시 형태에서, Z는 L I N이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 20, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0115] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 24)-Z-(Fc 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시 형태에서, Z는 L I N이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 24)-Z-(서열번호 26), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0116] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 15)-Z-(ALB 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, Z는 서열번호 28-30으로 이루어진 군에서 선택된 하나이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 21, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0117]

일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 17)-Z-(ALB 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, Z는 서열번호 28-30으로 이루어진 군에서 선택된 하나이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 17)-Z-(서열번호 27), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함하며, 여기서 Z는 서열번호 28-30으로 이루어진 군에서 선택된 하나이다.

[0118]

일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 19)-Z-(ALB 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, Z는 서열번호 28-30으로 이루어진 군에서 선택된 하나이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 22, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0119]

일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 (서열번호 24)-Z-(ALB 또는 이의 단편), 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다. 다른 실시형태에서, Z는 트라이펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, Z는 서열번호 28-30으로 이루어진 군에서 선택된 하나이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)에서, PROTEIN-Z-DOMAIN은 서열번호 25, 또는 서열번호 1에 대해 Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 및 Gly 536으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 위치에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

[0120]

일정 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-18개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-16개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-14개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-12개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-10개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-8개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-6개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-5개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-4개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-3개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 1-2개 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, X 및 Z는 독립적으로 부재하거나 또는 단일 아미노산이다.

- [0121] 일정 실시형태에서, m 은 1이다. 다른 실시형태에서, m 은 2이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 3이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 4이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 5이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 6이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 7이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 8이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 9이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 10이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 11이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 12이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 13이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 14이다. 또 다른 실시형태에서, m 은 15이다. 또 다른 실시형태에서, m 의 각 존재는 1 내지 15, 2 내지 15, 3 내지 15, 4 내지 15, 5 내지 15, 6 내지 15, 7 내지 15, 8 내지 15, 9 내지 15, 10 내지 15, 11 내지 15, 12 내지 15, 13 내지 15, 14 내지 15, 1 내지 14, 2 내지 14, 3 내지 14, 4 내지 14, 5 내지 14, 6 내지 14, 7 내지 14, 8 내지 14, 9 내지 14, 10 내지 14, 11 내지 14, 12 내지 14, 13 내지 14, 1 내지 13, 2 내지 13, 3 내지 13, 4 내지 13, 5 내지 13, 6 내지 13, 7 내지 13, 8 내지 13, 9 내지 13, 10 내지 13, 11 내지 13, 12 내지 13, 1 내지 12, 2 내지 12, 3 내지 12, 4 내지 12, 5 내지 12, 6 내지 12, 7 내지 12, 8 내지 12, 9 내지 12, 10 내지 12, 11 내지 12, 1 내지 11, 2 내지 11, 3 내지 11, 4 내지 11, 5 내지 11, 6 내지 11, 7 내지 11, 8 내지 11, 9 내지 11, 10 내지 11, 1 내지 10, 2 내지 10, 3 내지 10, 4 내지 10, 5 내지 10, 6 내지 10, 7 내지 10, 8 내지 10, 9 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 9, 3 내지 9, 4 내지 9, 5 내지 9, 6 내지 9, 7 내지 9, 8 내지 9, 1 내지 8, 2 내지 8, 3 내지 8, 4 내지 8, 5 내지 8, 6 내지 8, 7 내지 8, 1 내지 7, 2 내지 7, 3 내지 7, 4 내지 7, 5 내지 7, 6 내지 7, 1 내지 6, 2 내지 6, 3 내지 6, 4 내지 6, 5 내지 6, 1 내지 5, 2 내지 5, 3 내지 5, 4 내지 5, 1 내지 4, 2 내지 4, 3 내지 4, 1 내지 3, 2 내지 3, 및 1 내지 2 범위의 정수로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다.
- [0122] 일정 실시형태에서, n 은 1이다. 다른 실시형태에서, n 은 2이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 3이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 4이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 5이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 6이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 7이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 8이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 9이다. 또 다른 실시형태에서, n 은 10이다. 또 다른 실시형태에서, n 의 각 존재는 1 내지 10, 2 내지 10, 3 내지 10, 4 내지 10, 5 내지 10, 6 내지 10, 7 내지 10, 8 내지 10, 9 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 9, 3 내지 9, 4 내지 9, 5 내지 9, 6 내지 9, 7 내지 9, 8 내지 9, 1 내지 8, 2 내지 8, 3 내지 8, 4 내지 8, 5 내지 8, 6 내지 8, 7 내지 8, 1 내지 7, 2 내지 7, 3 내지 7, 4 내지 7, 5 내지 7, 6 내지 7, 1 내지 6, 2 내지 6, 3 내지 6, 4 내지 6, 5 내지 6, 1 내지 5, 2 내지 5, 3 내지 5, 4 내지 5, 1 내지 4, 2 내지 4, 3 내지 4, 1 내지 3, 2 내지 3, 및 1 내지 2 범위의 정수로 이루어진 군에서 독립적으로 선택된다.
- [0123] 일정 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 서열번호 1과 비교하여, 퓨린 절단성 부위를 함유하는 NPP2의 세포외 영역의 절편으로 변형된다. 다른 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 서열번호 1과 비교하여, 퓨린 절단성 부위를 함유하는 NPP2의 세포외 영역의 절편으로 변형되지 않는다.
- [0124] 일정 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 서열번호 1과 비교하여, 신호 펩티다제 절단성 부위를 함유하는 NPP2의 세포외 영역의 절편으로 변형된다. 다른 실시형태에서, PROTEIN 또는 이의 돌연변이체는 서열번호 1과 비교하여, 신호 펩티다제 절단성 부위를 함유하는 NPP2의 세포외 영역의 절편으로 변형되지 않는다.
- [0125] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 가용성이다. 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 재조합 폴리펩타이드이다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 NPP1 폴리펩타이드 또는 NPP1 경막 도메인이 결여된 이의 돌연변이체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 NPP1 폴리펩타이드 또는 이의 돌연변이체를 포함하고, 여기서 NPP1 경막 도메인 또는 이의 돌연변이체는 제거(되고/되거나 절단)되었고 다른 폴리펩타이드, 예컨대 비제한적인 예로서, NPP2의 경막 도메인으로 치환되었다.
- [0126] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 NPP1 폴리펩타이드 또는 1개보다 많은 경막 도메인을 더 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.
- [0127] 일정 실시형태에서, NPP1은 인간 면역글로불린 1(IgG1)의 Fc 도메인에 C 말단으로 융합된다.
- [0128] 일정 실시형태에서, NPP1은 인간 혈청 알부민에 C 말단으로 융합된다.
- [0129] 일정 실시형태에서, NPP1의 단편 및/또는 변이체는 인간 혈청 알부민 또는 이의 변이체 및/또는 단편과 융합된다. 인간 혈청 알부민은 제한없이, 천연 발생되거나 또는 조작된 이황화 결합을 포함한, 화학적 링커를 통해서, 또는 NPP1, 또는 이의 단편 및/또는 변이체와의 유전자 융합에 의해 NPP1 단백질에 접합될 수 있다.
- [0130] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 NPP1 폴리펩타이드 또는 NPP1의 경막 도메인 및 다른 폴리펩타이드, 예컨대 비제한적인 예로서, NPP2를 포함하는 이의 돌연변이체를 포함한다.

- [0131] 일정 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 서열번호 21, 22 및 25로 이루어진 군에서 선택된 서열을 갖는다.
- [0132] 일정 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 서열번호 21, 22, 25 및 (서열번호 17)-Z-(서열번호 27)로 이루어진 군에서 선택된 서열을 갖는다.
- [0133] 일정 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 서열번호 16, 18, 20 및 (서열번호 24)-Z-(서열번호 26)으로 이루어진 군에서 선택된 서열을 갖는다.
- [0134] 일정 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 1개보다 많은 경막 도메인을 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 더욱 PEG화된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 1개보다 많은 경막 도메인을 갖고 더욱 PEG화된다.
- [0135] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 약 $3.4(\pm 0.4) \text{ s}^{-1} \text{ 효소}^{-1}$ 보다 크거나 또는 동일한 k_{cat} 값을 갖고, 여기서 k_{cat} 은 화합물에 대한 ATP의 가수분해 속도를 측정하여 결정된다.
- [0136] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 약 $2 \mu\text{M}$ 보다 작거나 또는 같은 K_m 값을 갖고, 여기서 K_m 은 화합물에 대한 ATP의 가수분해 속도를 측정하여 결정된다.
- [0137] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물은 액상 제제로서 제제화된다.
- [0138] 본 발명은 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 치료량을 포함하는 약학 조성물의 건조 생성물을 더 제공하며, 상기 건조 생성물은 액체 형태로 화합물의 용액으로 재구성가능하다.
- [0139] **방법**
- [0140] 본 발명은 NPP1 폴리펩타이드, 이의 단편, 유도체, 돌연변이체, 또는 돌연변이체 단편의 증가된 활성 또는 수준이 바람직한 피험체에서 장애 및 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일정 실시형태에서, 피험체는 본 발명의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량이 투여된다.
- [0141] 본 발명은 병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 질병을, 이의 치료 또는 예방이 필요한 피험체에서 치료하거나 또는 예방하는 방법을 더 제공하고, 상기 방법은 피험체에게 적어도 하나의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 질환은 GACI, IIAC, OPLL, 저인산혈구루병, 골관절염, 및 동맥경화반의 석회화를 포함한다.
- [0142] 본 발명은 병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를, 이의 치료 또는 예방이 필요한 피험체에서 치료하거나 또는 예방하는 방법을 더 제공하고, 상기 방법은 피험체에게 적어도 하나의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 질환은 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 또는 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증을 포함한다.
- [0143] 본 발명은 소아 전신 동맥 석회화(GACI)를 앓는 유아에서 심장 및/또는 동맥 석회화를 감소시키거나 또는 예방하는 방법을 더 제공한다. 일정 실시형태에서, 상기 방법은 유아에게 IgG Fc 도메인을 포함(또는 융합)하는 엑토뉴클레오타이드 파이로포스페이트/포스포다이에스터라제-1(NPP1) 폴리펩타이드를 포함하는(또는 이루어진) 화합물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 화합물 폴리아스파르트산 도메인이 결여되어, 화합물의 투여가 세포외 파이로포스페이트(PPi) 농도를 증가시켜서, 유아에서 심장 및/또는 동맥 석회화를 감소 또는 예방한다.
- [0144] 본 발명은 소아 전신 동맥 석회화(GACI)를 앓는 유아에서 심장 및/또는 동맥 석회화를 감소시키거나 또는 예방하는 방법을 더 제공한다. 일정 실시형태에서, 상기 방법은 인간 혈청 알부민 도메인 또는 이의 단편을 포함(또는 융합)하는 엑토뉴클레오타이드 파이로포스페이트/포스포다이에스터라제-1(NPP1) 폴리펩타이드를 포함하는(또는 이루어진) 화합물의 치료 유효량을 유아에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 화합물은 폴리아스파르트산 도메인이 결여되어, 투여가 세포외 파이로포스페이트(PPi) 농도를 증가시켜서, 유아에서 심장 및/또는 동맥 석회화를 감소시키거나 또는 예방한다.
- [0145] 일정 실시형태에서, 장애 및 질환은 GACI, IIAC, OPLL, 저인산혈 구루병, 골관절염, 조로증, 및 동맥경화반의 석회화로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함한다. 다른 실시형태에서, 장애 또는 질환은 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 조로증, 및 말기 신장 질환으로 인

한 저항성 칼슘형성증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함한다.

[0146] 일정 실시형태에서, 화합물은 피험체에게 급성으로 또는 만성으로 투여된다. 다른 실시형태에서, 화합물은 피험체에게 국소적으로, 국지적으로 또는 전신으로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 투여는 피하이다. 또 다른 실시형태에서, 피험체는 포유동물이다. 또 다른 실시형태에서, 포유동물은 인간이다.

[0147] 일정 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 이의 단편 또는 돌연변이체는 상응하는 야생형 NPP1 폴리펩타이드 또는 이의 단편과 비교하여 더 낮은 Ap3A 가수분해 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 이의 단편 또는 돌연변이체는 상응하는 야생형 NPP1 폴리펩타이드 또는 이의 단편과 비교하여 실질적으로 동일한 ATP 가수분해 활성을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 이의 단편 또는 돌연변이체는 상응하는 야생형 NPP1 폴리펩타이드 또는 이의 단편과 비교하여 더 낮은 Ap3A 가수분해 활성 및 실질적으로 동일한 ATP 가수분해 활성을 갖는다.

[0148] 일정 실시형태에서, NPP1 폴리펩타이드는 NPP2 경막 도메인을 포함하는 전구체 NPP1 폴리펩타이드의 절단 생성물을 포함한다.

[0149] 일정 실시형태에서, NPP2 경막 도메인은 IISLFTFAVGVNICLGFTA(서열번호 23)에 상응하는, NCBI 수탁 번호 NP_001124335(서열번호 2)의 잔기 12-30을 포함한다.

[0150] 일정 실시형태에서, 치료 유효량의 투여는 약 3-15 mg/kg qd의 NPP1-Fc 폴리펩타이드를 포함한다.

[0151] 일정 실시형태에서, 투여는 유아의 세포외 파이로포스페이트 농도를 GACI를 앓지 않는 유아에 존재하는 범위 내의 수준으로의 감소를 유발시킨다. 일정 실시형태에서, 유아는 투여 전에 "성장 장애"를 나타내고/내거나 진단 받는다.

[0152] 본원에 제공된 개시를 기반으로, 당업자는 전체(예를 들어, 전신)로 또는 부분(예를 들어, 국소, 조직, 장기)적으로 병리학적 석회화 또는 골화를 치료받고 있거나, 또는 치료받게 될 피험체에서 유용하다는 것을 이해한다. 일정 실시형태에서, 본 발명은 병리학적 석회화 또는 골화를 치료하거나 또는 예방하는데 유용하다. 당업자는 본원에 제공된 교시를 기반으로, 본원에 기술된 조성물 및 방법으로 치료할 수 있는 질환 및 장애가 석회화 또는 골화의 감소가 긍정적인 치료적 결과를 촉진하게 되는 임의의 질환 또는 장애를 포함한다는 것을 이해한다.

[0153] 본 발명이 고착된 질환 또는 장애의 치료에 제한되지 않는다는 것은 본원에 상세히 설명한 방법을 포함한 본 발명으로 무장되면, 당업자가 이해할 수 있다. 특히, 질환 또는 장애의 증상은 피험체에게 유해한 지점까지 나타낼 필요는 없고, 계다가 질환 또는 장애는 치료가 투여되는 피험체에서 검출될 필요가 없다. 즉, 질환 또는 장애로 인한 상당한 병상은 본 발명이 이를 제공할 수 있기 전에 일어날 필요가 없다. 따라서, 본 발명은 본원에 보다 완전하게 기술한 바와 같이, 피험체에서 질환 및 장애를 예방하기 위한 방법을 포함하고, 본원의 다른 곳에 기술한 바와 같이, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 이의 돌연변이체는 질환 또는 장애의 개시 전에 피험체에게 투여할 수 있어서, 질환 또는 질병이 발생되는 것을 예방한다.

[0154] 본원의 개시로 무장시, 당업자는 피험체에서 질환 또는 장애의 예방이 피험체에게 질환 또는 장애에 대한 예방적 조치로서 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0155] 본 발명은 본 발명의 방법을 실시하기 위해 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 이의 돌연변이체의 투여를 포함하며, 당업자는 본원에 제공된 개시를 기반으로, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 이의 돌연변이체를 어떻게 제제화하여 피험체에게 투여하는지를 이해할 것이다. 그러나, 본 발명은 임의의 특정 투여 방법 또는 치료 계획에 제한되지 않는다. 이는 본 발명의 화합물을 투여하는 방법이 약학 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다는 것은, 병리학적 석회화 또는 골화의 당분야에서 인식되는 모델을 사용하는 실시에 대한 감소를 포함하여, 본원에서 제공하는 개시를 갖춘, 당업자가 이해하게 되는 경우에 특히 진실이다.

약학 조성물 및 제제

[0156] 본 발명은 본 발명의 방법 내에서 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0157] 그러한 약학 조성물은 피험체에게 투여에 적합한 형태이거나, 또는 약학 조성물은 1 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 1 이상의 추가 성분, 또는 이들의 일부 조합을 더 포함할 수 있다. 약학 조성물의 다양한 성분은 생리적으로 허용되는 염, 예컨대 당분야에 잘 알려진 바와 같은 생리적으로 허용되는 양이온 또는 음이온과 조합된 형태로 존재할 수 있다.

[0158] 일 실시형태에서, 본 발명의 방법을 실시하는데 유용한 약학 조성물은 1 ng/kg/일 내지 100 mg/kg/일 사이의

용량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명을 실시하는데 유용한 약학 조성물은 1 ng/kg/일 내지 500 mg/kg/일의 용량을 전달하도록 투여될 수 있다.

[0160] 본 발명의 약학 조성물 내 활성 성분, 약학적으로 허용되는 담체, 및 임의의 추가 성분의 상대량은 치료하려는 피험체의 정체, 크기, 및 상태에 의존적으로, 그리고 조성물이 투여되는 경로에 더욱 의존적으로 가변적이다. 예로서, 조성물은 약 0.1% 내지 약 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0161] 본 발명의 방법에 유용한 약학 조성물은 흡입, 경구, 직장, 질, 비경구, 국부, 경피, 폐, 비내, 구강, 안구, 척추강내, 정맥내 또는 다른 투여 경로에 적합하게 개발될 수 있다. 다른 고려되는 제제는 프로젝터드된 나노입자, 리포솜 조제물, 활성 성분을 함유하는 재밀봉된 적혈구, 및 면역학적 기반 제제를 포함한다. 투여 경로(들)는 당업자에게 쉽게 이해되며 치료하려는 질환의 유형 및 중증도, 치료하려는 수의학적 또는 인간 환자의 유형 및 연령 등을 포함하는 임의 수의 인자들에 의존적이다.

[0162] 본원에 기술된 약학 조성물의 제제는 약리학 분야에 공지되거나 또는 이후에 개발되는 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 대체로, 그러한 제조 방법은 활성 성분을 담체 또는 1 이상의 다른 부속 성분과 희합되도록 하는 단계, 및 이후, 필요하거나 또는 바람직하다면, 바람직한 단일 또는 다수 용량 단위로 생성물을 성형 또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0163] 본원에서 사용시, "단위 용량"은 활성 성분의 예정된 양을 포함하는 약학 조성물의 개별 양이다. 활성 성분의 양은 대체로 피험체에게 투여되는 활성 성분의 용량 또는 그러한 용량의 편리한 분량 예컨대, 예를 들어 그러한 용량의 1/2 또는 1/3과 동일하다. 단위 제형은 단일 1일 용량이거나 또는 다수의 1일 용량 중 하나를 위한 것일 수 있다(예를 들어, 1일 당 약 1회 내지 4회 또는 그 이상). 다수의 1일 용량이 사용되는 경우, 단위 제형은 각 용량에 대해 동일하거나 또는 상이할 수 있다.

[0164] 본원에서 제공되는 약학 조성물의 설명이 주로 인간에 처방된 투여에 적합한 약학 조성물에 대한 것이지만, 그러한 조성물이 대체로 모든 종류의 동물에 투여에 적합하다는 것은 당업자가 이해한다. 조성물을 다양한 동물에 투여에 적합하게 하기 위해서 인간에 투여에 적합한 약학 조성물의 변형은 잘 이해되어 있으며, 통상의 전문 수의 약리학자가 필요하다면, 단지 일상적인 실험으로 그러한 변형을 디자인하고 수행할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여가 고려되는 피험체는 제한없이, 인간 및 다른 영장류, 상업적 관련 포유동물 예컨대 소, 폐지, 말, 양, 고양이 및 개를 포함한 포유동물을 포함한다.

[0165] 일정 실시형태에서, 조성물은 1 이상의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 사용해 제제화된다. 일정 실시 형태에서, 약학 조성물은 활성제의 치료 유효량 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 유용한 약학적으로 허용되는 담체는 제한없이, 글리세롤, 물, 염수, 에탄올 및 다른 약학적으로 허용되는 염 용액 예컨대 유기산의 염 및 포스페이트를 포함한다. 이들 및 다른 약학적으로 허용되는 담체의 예는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 1991, Mack Publication Co., New Jersey]에 기술되어 있다.

[0166] 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물, 및 식물성유를 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성을 예를 들어, 코팅제 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우, 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 폐놀, 아스코르브산, 티머로실 등에 의해 획득될 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들어, 당, 염화나트륨, 또는 폴리알콜 예컨대 만니톨 및 솔비톨이 조성물에 사용된다. 주사가능한 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아르산알루미늄 또는 젤라틴을 포함시켜 만들 수 있다.

[0167] 제제는 경구, 비경구, 코, 정맥내, 피하, 장, 또는 당분야에 공지된 임의의 다른 적합한 투여 방식에 적합한 통상의 부형제, 즉 약학적으로 허용되는 유기 또는 무기 담체 물질과의 혼합물로 적용될 수 있다. 약학 조제물은 멸균될 수 있고 바람직하다면 보조제, 예를 들어 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압 완충제에 영향을 주는 염, 착색제, 풍미제 및/또는 방향족 물질과 혼합될 수 있다. 그들은 또한 바람직한 경우 다른 활성제, 예를 들어 다른 진통제와 조합될 수 있다.

[0168] 본원에서 사용시, "추가 성분"은 제한없이, 하기 중 1 이상을 포함한다: 부형제; 계면 활성제; 분산제; 불활성 희석제; 과립화제 및 봉해제; 결합제; 윤활제; 습윤제; 풍미제; 착색제; 보존제; 생리적 분해성 조성물 예컨대 젤라틴; 수성 비히클 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 혼탁제; 분산제 또는 습윤제; 유화제, 완화제; 완충제; 염; 중점제; 충전제; 유화제; 항산화제; 항생제; 항진균제; 안정화제; 및 약학적으로 허용되는 중합체 또는 소

수성 물질. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 다른 "추가 성분"은 당분야에 공지되어 있고 예를 들어, 참조로 본원에 편입되는 문헌 [Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA]을 참조한다.

[0169] 본 발명의 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.005% 내지 2.0%의 보존제를 포함할 수 있다. 보존제는 환경의 오염물에 노출되는 경우 부패를 방지하기 위해 사용된다. 본 발명에 따라서 유용한 보존제의 예는 제한 없이 벤질 알콜, 솔브산, 파라벤, 이미드우레아 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것들을 포함한다. 특정 보존제는 약 0.5% 내지 2.0%의 벤질 알콜 및 0.05% 내지 0.5%의 솔브산의 조합이다.

[0170] 조성물은 화합물의 분해를 억제하는, 항산화제 및 퀼레이트화제를 포함할 수 있다. 일부 화합물에 대해 예시적인 항산화제는 약 0.01% 내지 0.3%의 예시적인 범위의 BHT, BHA, 알파-토코페롤 및 아스코르브산, 예를 들어 조성물의 총 중량을 기준으로 0.03 중량% 내지 0.1 중량% 범위의 BHT이다. 퀼레이트화제는 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01 중량% 내지 0.5 중량% 범위의 양으로 존재할 수 있다. 예시적인 퀼레이트화제는 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.01 중량% 내지 0.20 중량% 범위, 예를 들어 0.02 중량% 내지 0.10 중량% 범위의 에데테이트 염(예를 들어, 에데테이트산이나트륨) 및 시트르산을 포함한다. 퀼레이트화제는 제제의 수명에 유해할 수 있는 조성물 내 금속 이온을 퀼레이팅하는데 유용하다. BHT 및 에데테이트산이나트륨은 일부 화합물에 대해 각각 예시적인 항산화제 및 퀼레이트화제이지만, 다른 적합하고 균등한 항산화제 및 퀼레이트화제가 당업자에게 공지된 대로 교체될 수도 있다.

[0171] 액체 혼탁물은 수성 또는 유성 비히클 중 활성 성분의 혼탁물을 획득하기 위한 통상의 방법을 사용해 제조할 수 있다. 수성 비히클은 예를 들어, 물, 및 등장성 염수를 포함한다. 유성 비히클은 예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알콜, 식물성유 예컨대 땅콩, 올리브, 참깨 또는 코코넛 유, 분별 식물성유, 및 미네랄유 예컨대 액상 파라핀을 포함한다. 액체 혼탁물은 제한 없이, 혼탁제, 분산제 또는 습윤제, 유화제, 완화제, 보존제, 완충제, 염, 풍미제, 착색제 및 감미제를 포함한 1 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있다. 유성 혼탁물은 증점제를 더 포함할 수 있다. 기지의 혼탁제는 제한 없이, 솔비톨 시럽, 수소첨가 식용 지방, 알긴산나트륨, 폴리비닐파리돈, 겸 트라가칸트, 겸 아카시아, 및 셀룰로스 유도체(예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스)를 포함한다. 기지의 분산제 또는 습윤제는 제한 없이, 천연 발생 포스파타이드 예컨대 레시틴, 지방산, 장쇄 지방족 알콜, 지방 및 헥시톨에서 유도된 부분 에스테르, 또는 지방산 및 헥시톨 무수화물에서 유도된 부분 에스테르와 산화알킬렌의 축합 생성물(예를 들어, 각각 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 헵타데카에틸렌옥시세타놀, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 모노올레아이트, 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레아이트)을 포함한다. 기지의 유화제는 제한 없이, 레시틴, 및 아카시아를 포함한다. 기지의 보존제는 제한 없이, 메틸, 에틸, 또는 n-프로필 파라-하이드록시벤조아이트, 아스코르브산, 및 솔브산을 포함한다. 기지의 감미제는 예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 솔비톨, 수크로스 및 사카린을 포함한다. 유성 혼탁물에 대한 기지의 증점제는 예를 들어, 밀랍, 경질 파라핀 및 세틸 알콜을 포함한다.

[0172] 수성 또는 유성 용매 중 활성 성분의 액체 용액은 액체 혼탁물과 실질적으로 동일한 방식으로 제조될 수 있고, 주요 차이는 활성 성분을 용매에 혼탁하는 대신 용해시키는 것이다. 본원에서 사용시, "유성" 액체는 탄소-함유 액체 분자를 포함하고 물보다 낮은 극성 특징을 나타내는 것이다. 본 발명의 약학 조성물의 액체 용액은 액체 혼탁물과 관련하여 기술된 성분들 각각을 포함할 수 있고, 혼탁제가 용매 중 활성 성분의 용해를 반드시 보조하는 것은 아님을 이해한다. 수성 용매는 예를 들어, 물, 및 등장성 염수를 포함한다. 유성 용매는 예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알콜, 식물성유 예컨대 땅콩, 올리브, 참깨, 또는 코코넛 유, 분별 식물성유, 및 미네랄유 예컨대 액상 파라핀을 포함한다.

[0173] 본 발명의 약학 조제물의 분말 및 파립 제제는 기지의 방법을 사용해 제조될 수 있다. 예를 들어, 정제를 형성하거나, 캡슐을 충전하거나, 또는 그에 수성 또는 유성 비히클의 첨가에 의해 수성 또는 유성 혼탁물 또는 용액을 제조하여 사용되는 그러한 제제는 과험체에게 직접 투여될 수 있다. 이들 제제 각각은 분산제 또는 습윤제, 혼탁제, 및 보존제 중 1 이상을 더 포함할 수 있다. 추가의 부형제, 예컨대 충전제 및 감미제, 풍미제, 또는 착색제가 또한 이들 제제에 포함될 수 있다.

[0174] 본 발명의 약학 조성물은 또한 수중유 에멀션 또는 유중수 에멀션의 형태로 제조되거나, 포장되거나 또는 판매될 수 있다. 유성층은 식물성유 예컨대 올리브유 또는 땅콩유, 미네랄유 예컨대 액상 파라핀, 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 조성물은 1 이상의 유화제 예컨대 천연 발생 겸 예컨대 겸 아카시아 또는 겸 트라가칸트, 천연 발생 포스파타이드 예컨대 대두 또는 레시틴 포스파타이드, 지방산 및 헥시톨 무수물의 조합에서 유도된 에스테르 또는 부분 에스테르 예컨대 솔비탄 모노올레아이트, 및 이러한 부분 에스테르와 산화에틸렌 예컨대 폴

리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트의 축합 생성물을 더 포함할 수 있다. 이들 에멀션은 또한 예를 들어, 감미제 또는 풍미제를 포함하는 추가 성분을 함유할 수 있다.

[0175] 화학 조성물로 물질을 포화시키거나 또는 코팅시키기 위한 방법은 당분야에 공지되어 있고, 제한없이, 표면 상에 화학 조성물을 침착 또는 결합시키는 방법, 물질(즉, 예컨대 생리적 분해성 물질)의 합성 동안물질의 구조에 화학 조성물을 도입시키는 방법, 및 후속 건조 없이, 흡착 물질에 수성 또는 유성 용액 또는 혼탁물을 흡수시키는 방법을 포함한다.

투여/투약

[0177] 투여 계획은 무엇이 유효량을 구성하는가에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 몇몇 분할 용량을 비롯하여, 시차제 용량은 날마다 또는 순차적으로 투여될 수 있거나, 또는 용량은 연속적으로 주입될 수 있거나, 또는 볼러스 주사일 수 있다. 또한, 치료 제제의 용량은 치료적 또는 예방적 상황의 긴급 상황이 나타나는 것에 따라서 비례적으로 증가되거나 또는 감소될 수 있다.

[0178] 환자 예컨대 포유동물, 예컨대 인간에게 본 발명의 조성물의 투여는 환자에서 질환 또는 질병을 치료하는데 효과적인 시간 기간 및 용량으로, 기지 절차를 사용해 수행될 수 있다. 치료 효과를 획득하는데 필요한 치료 화합물의 유효량은 인자들 예컨대 적용되는 특정 화합물의 활성; 투여 시기; 화합물의 배출 속도; 치료 지속 기간; 화합물 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 또는 물질; 치료되는 환자의 질환 또는 장애의 상태, 연령, 성별, 체중, 병태, 일반 건강 및 사전 병력, 및 의료 분야에 잘 알려진 인자등에 따라 가변적일 수 있다. 용량 계획은 최적 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 분배된 용량은 날마다 투여될 수 있거나 또는 용량은 치료 상황의 긴급 상황이 나타내는 것에 비례적으로 감소될 수 있다. 본 발명의 치료 화합물의 유효 용량 범위의 비제한적인 예는 약 0.01 내지 50 mg/체중kg/일이다. 당업자는 관련 인자들을 실험할 수 있고 과도한 실험없이 치료 화합물의 유효량과 관련하여 결정할 수 있다.

[0179] 화합물은 1일 수회 빈도로 동물에게 투여될 수 있거나, 또는 덜 빈번하게, 예컨대 1일 1회, 1주 1회, 2주 마다 1회, 1개월에 1회, 또는 보다 덜 빈번하게, 예컨대 수개월 마다 1회 또는 1년에 1회 또는 그 이하로 투여될 수 있다. 1일 당 투여되는 화합물의 양은 비제한적인 예로, 날마다, 격일로, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 또는 5일 마다 투여될 수 있음을 이해한다. 예를 들어, 격일 투여의 경우, 1일 용량 당 5 mg이 월요일에 개시될 수 있고 제1 후속 1일 용량 당 5 mg은 수요일에 투여될 수 있고, 제2의 후속 1일 용량 당 5 mg이 금요일에 투여될 수 있다. 용량의 빈도는 당업자에게 쉽게 분명해지며 임의 수의 인자들, 예컨대 제한없이, 치료하려는 질환의 유형 및 중증도, 및 동물의 유형 및 연령에 의존적이다.

[0180] 본 발명의 약학 조성물 내 활성 성분의 실제 용량 수준은 환자에게 유해하지 않게, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 바람직한 치료 반응을 획득하도록 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 가변적일 수 있다.

[0181] 당분야의 통상의 기술을 갖는, 의사, 예를 들어, 내과 의사, 수의사는 필요한 약학 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 내과 의사 또는 수의사는 바람직한 치료 효과를 획득하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준에서 약학 조성물에 적용되는 본 발명의 화합물의 용량에서 출발하여 바람직한 효과가 획득될 때까지 용량을 점차적으로 증가시킬 수 있다.

[0182] 특정 실시형태에서, 투여의 용이함 및 용량의 균일성을 위해 단위 제형으로 화합물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용시 단위 제형은 치료하려는 환자에 대한 단일 용량으로서 적합한 물리적인 개별 유닛을 의미하며, 각각의 유닛은 필요한 약학 비히클과 연합하여 바람직한 치료 효과를 생성하도록 계산된 치료 화합물이 예정된 분량을 함유한다. 본 발명의 단위 제형은 (a) 치료 화합물의 고유한 특징 및 획득하려는 특정 치료 효과, 및 (b) 환자에서 질환 또는 장애의 치료를 위해 그러한 치료 화합물을 혼합/제제화하는 분야에 고유한 한계에 직접적으로 의존적이고 그에 의해 좌우된다.

[0183] 일정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 1일 당 1 내지 5회 또는 그 이상의 범위의 용량으로 환자에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 제한없이, 1일 1회, 2일에 1회, 3일에 1회 내지 1주에 1회, 및 2주에 1회를 포함한 용량 범위로 환자에게 투여된다. 본 발명의 다양한 조합 조성물의 투여 빈도는 제한없이, 연령, 치료하려는 질환 또는 장애, 성별, 전체 건강 및 다른 인자들을 포함한 많은 인자들에 따라서 피험체마다 가변적일 수 있음이 당업자에게는 쉽게 명백하다. 따라서, 본 발명은 임의의 특정 용량 계획에 제한되는 것으로 이해해서는 안되며, 임의의 환자에게 투여되는 정확한 용량 및 조성물은 환자에 대한 모든 다른 인자들을 고려하여 참관의가 결정하게 된다.

[0184] 투여를 위한 본 발명의 화합물은 약 1 mg 내지 약 7,500 mg, 약 20 mg 내지 약 7,000 mg, 약 40 mg 내지 약

6,500 mg, 약 80 mg 내지 약 6,000 mg, 약 100 mg 내지 약 5,500 mg, 약 200 mg 내지 약 5,000 mg, 약 400 mg 내지 약 4,000 mg, 약 800 mg 내지 약 3,000 mg, 약 1 mg 내지 약 2,500 mg, 약 2 mg 내지 약 2,000 mg, 약 5 mg 내지 약 1,000 mg, 약 10 mg 내지 약 750 mg, 약 20 mg 내지 약 600 mg, 약 30 mg 내지 약 500 mg, 약 40 mg 내지 약 400 mg, 약 50 mg 내지 약 300 mg, 약 60 mg 내지 약 250 mg, 약 70 mg 내지 약 200 mg, 약 80 mg 내지 약 150 mg, 및 그 사이의 임의의 모든 전체 또는 부분 중분량의 범위일 수 있다.

[0185] 일부 실시형태에서, 본 발명의 화합물의 용량은 약 0.5 mg 내지 약 5,000 mg이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 조성물에서 사용되는 본 발명의 화합물은 약 5,000 mg 미만, 또는 약 4,000 mg 미만, 또는 약 3,000 mg 미만, 또는 약 2,000 mg 미만, 또는 약 1,000 mg 미만, 또는 약 800 mg 미만, 또는 약 600 mg 미만, 또는 약 500 mg 미만, 또는 약 200 mg 미만, 또는 약 50 mg 미만이다. 유사하게, 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제2 화합물의 용량은 약 1,000 mg 미만, 또는 약 800 mg 미만, 또는 약 600 mg 미만, 또는 약 500 mg 미만, 또는 약 400 mg 미만, 또는 약 300 mg 미만, 또는 약 200 mg 미만, 또는 약 100 mg 미만, 또는 약 50 mg 미만, 또는 약 40 mg 미만, 또는 약 30 mg 미만, 또는 약 25 mg 미만, 또는 약 20 mg 미만, 또는 약 15 mg 미만, 또는 약 10 mg 미만, 또는 약 5 mg 미만, 또는 약 2 mg 미만, 또는 약 1 mg 미만, 또는 약 0.5 mg 미만, 및 이의 임의의 모든 전체 또는 부분 중분량이다.

[0186] 일정 실시형태에서, 본 발명은 단독으로 또는 제2 약학제와 조합하여, 본 발명의 화합물의 치료 유효량을 수용하는 용기, 및 환자에서 질환 또는 질병의 1 이상의 증상을 치료하거나, 예방하거나 또는 감소시키기 위해 화합물을 사용하기 위한 설명서를 포함하는 포장된 약학 조성물에 관한 것이다.

[0187] 용어 "용기"는 약학 조성물을 수용하기 위한 임의의 저장부이다. 예를 들어, 일정 실시형태에서, 용기는 약학 조성물을 함유하는 포장재이다. 다른 실시형태에서, 용기는 약학 조성물을 함유하는 포장재가 아니며, 즉, 용기는 포장된 약학 조성물 또는 미포장된 약학 조성물 및 약학 조성물의 사용을 위한 설명서를 함유하는 박스 또는 바이알이다. 또한, 포장 기술은 당분야에 잘 공지되어 있다. 약학 조성물의 사용을 위한 설명서가 약학 조성물을 함유하는 포장재 상에 함유될 수 있고, 그와 같이, 설명서는 포장된 제품에 대해 높은 관련성을 형성한다는 것을 이해해야 한다. 그러나, 설명서는 그의 의도하는 기능을 수행하는, 예를 들어 환자에서 질환 또는 장애를 치료하거나, 예방하거나, 또는 감소시키는 화합물의 능력에 관한 정보를 함유할 수 있다.

투여 경로

[0189] 본 발명의 임의 조성물의 투여 경로는 흡입, 경구, 코, 직장, 비경구, 설하, 경피, 경점막(예를 들어, 설하, 혀, (경)구강, (경)요도, 질(예를 들어, 질경유 및 질주변), 비(내), 및 (경)직장), 방광내, 폐내, 십이지장내, 위내, 척추강내, 피하, 근육내, 피내, 동맥내, 정맥내, 기관지내, 흡입, 및 국소 투여를 포함한다.

[0190] 적합한 조성물 및 제형은 예를 들어, 정제, 캡슐, 당의정, 알약, 젤 캡, 트로세, 분산물, 혼탁물, 용액, 시럽, 과립, 비드, 경피 팻치, 젤, 분말, 펠렛, 유제, 로젠지, 크림, 페이스트, 경고제, 로션, 디스크, 좌제, 코 또는 경구 투여용 액상 스프레이, 흡입용 건조 분말 또는 에어로졸화된 제제, 방광내 투여용 조성물 및 제제를 포함한다. 본 발명에서 유용한 제제 및 조성물은 본원에 기술된 특정 제제 및 조성물에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

경구 투여

[0192] 경구 적용을 위해서, 특히 바람직한 것은 정제, 드라제, 액체, 드롭, 좌제, 또는 캡슐, 당의정 및 젤캡이다. 경구 투여에 적합한 다른 제제는 제한없이, 분말 또는 과립형 제제, 수성 또는 유성 혼탁물, 수성 또는 유성 용액, 페이스트, 젤, 치약, 구강청결제, 코팅, 경구 린스, 또는 에멀션을 포함한다. 경구 사용을 의도한 조성물은 당분야에 공지된 임의 방법에 따라 제조될 수 있고 그러한 조성물은 정제의 제조에 적합한 불활성, 무독성 약학적 부형제로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 작용제를 함유할 수 있다. 그러한 부형제는 예를 들어, 불활성 희석제 예컨대 락토스; 과립화제 및 붕해제 예컨대 옥수수 전분; 결합제 예컨대 전분; 및 윤활제 예컨대 스테아르산마그네슘을 포함한다.

[0193] 정제는 코팅되지 않을 수 있거나 또는 그들은 피험체의 위장관에서 지연 풍해를 획득하여, 활성 성분의 지속 방출 및 흡수를 제공하도록 기지의 방법을 사용해 코팅될 수 있다. 예로서, 물질 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디아이스테아레이트가 정제를 코팅하는데 사용될 수 있다. 추가의 예로서, 정제는 삼투압 제어된 방출 정제를 형성시키기 위해 미국 특허 제4,256,108호; 제4,160,452호; 및 제4,265,874호에 기술된 방법을 사용해 코팅될 수 있다. 정제는 약학적으로 훌륭하고 입에 맞는 조제물을 제공하기 위해서 감미제, 풍미제, 착색제, 보존제, 또는 이들의 일부 조합을 더 포함할 수 있다.

- [0194] 활성 성분을 포함하는 경질 캡슐은 생리적으로 분해되는 조성물, 예컨대 젤라틴을 사용해 제조될 수 있다. 그러한 경질 캡슐은 활성 성분을 포함하고, 예를 들어 불활성 고체 희석제 예컨대 탄산칼슘, 인산칼슘, 또는 카올린을 포함한 추가 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0195] 활성 성분을 포함하는 연질 젤라틴 캡슐은 생리적으로 분해되는 조성물, 예컨대 젤라틴을 사용해 제조될 수 있다. 그러한 연질 캡슐은 물 또는 오일 매질 예컨대 땅콩유, 액상 파라핀, 또는 올리브유와 혼합된, 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0196] 경구 투여를 위해서, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용되는 부형제 예컨대 결합제; 충전제; 윤활제; 봉해제; 또는 습윤제를 사용해 통상의 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있다. 바람직하면, 정제는 적합한 방법 및 코팅 물질 예컨대 미국, 팬실베니아주, 웨스트 포인트 소재, 칼라콘(Colorcon)에서 입수할 수 있는 오파드라이(OPADRY)(상표명) 필름 코팅 시스템(예를 들어, 오파드라이 OY형, OYC형, 유기 장 OY-P형, 수성 장 OY-A형, OY-PM형 및 오파드라이 화이트, 32K18400)을 사용해 코팅할 수 있다.
- [0197] 경구 투여를 위한 액체 조제물은 용액, 시럽 또는 혼탁물의 형태일 수 있다. 액체 조제물은 약학적으로 허용되는 첨가제 예컨대 혼탁제(예를 들어, 솔비톨 시럽, 메틸 셀룰로스 또는 수소첨가 식용 지방); 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예를 들어, 아몬드유, 유성 에스테르 또는 에틸 알콜); 및 보존제(예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라-하이드록시 벤조에이트 또는 솔브산)를 사용해 통상의 수단으로 제조될 수 있다. 경구 투여에 적합한 본 발명의 약학 조성물의 액체 제제는 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클과 재구성하려는 건조 생성물의 형태이거나 또는 액체 형태로 제조, 포장 및 판매될 수 있다.
- [0198] 활성 성분을 포함하는 정제는 예를 들어, 선택적으로 1 이상의 추가 성분과 함께 활성 성분을 압착 또는 몰딩시켜 제조될 수 있다. 압착된 정제는 경우에 따라 결합제, 윤활제, 부형제, 계면 활성제, 및 분산제 중 1 이상과 혼합된, 자유 유동 형태 예컨대 분말 또는 과립 조제물인 활성 성분을 적합한 장치에서 압착시켜 제조될 수 있다. 몰딩된 정제는 활성 성분, 약학적으로 허용되는 담체, 및 적어도 혼합물을 습윤시키기에 충분한 액체의 혼합물을 적합한 장치에서 몰딩하여 제조될 수 있다. 정제의 제조에서 사용되는 약학적으로 허용되는 부형제는 제한없이, 불활성 희석제, 과립화제 및 봉해제, 결합제, 및 윤활제를 포함한다. 기지의 분산제는 제한없이, 감자 전분 및 전분 글리콜산나트륨을 포함한다. 기지의 계면 활성제는 제한없이, 나트륨 라우릴 설페이트를 포함한다. 기지의 희석제는 제한없이, 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 미정질 셀룰로스, 인산칼슘, 인산수소칼슘, 및 인산나트륨을 포함한다. 기지의 과립화제 및 봉해제는 제한없이, 옥수수 전분 및 알긴산을 포함한다. 기지의 결합제는 제한없이, 젤라틴, 아카시아, 전호화 옥수수 전분, 폴리비닐파롤리돈, 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스를 포함한다. 기지의 윤활제는 제한없이, 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 실리카 및 탈크를 포함한다.
- [0199] 과립화 기술은 활성 성분의 출발 분말 또는 다른 미립자 물질을 변형시키기 위해 약학 분야에서 잘 알려져 있다. 분말은 전형적으로 "과립화"라고 하는 보다 큰 영구적인 자유-유동성 응집체 또는 과립으로 결합제 물질과 혼합된다. 예를 들어, 용매 사용 "습식" 과립화 공정은 일반적으로 분말을 결합제 물질과 배합하고 용매가 이후에 증발되어야 하는 습식 과립화 덩어리의 형성을 유발시키는 조건 하에서 물 또는 유기 용매로 습윤되는 것을 특징으로 한다.
- [0200] 용융 과립화는 일반적으로 첨가된 물 또는 다른 액체 용매의 본질적 부재 하에서, 분말 또는 다른 물질의 과립화를 촉진하기 위해서 실온(즉, 비교적 낮은 연화점 또는 용융점 범위를 가짐)에서 고체 또는 반고체인 물질의 사용으로 구성된다. 용융점 범위의 온도로 가열시, 저용융 고체는 결합제 또는 과립화 매질로서 작용하도록 액화된다. 액화된 고체는 그것이 접촉하는 분말 물질의 표면 상에 그 자체가 확산되고, 냉각 시, 초기 물질이 함께 결합한 고체 과립화 덩어리를 형성한다. 이후에 최종 용융 과립화가 정제 프레스에 제공될 수 있거나 또는 경구 제형을 제조하기 위해 캡슐화될 수 있다. 용융 과립화는 고체 분산물 또는 고체 용액을 형성하여 활성물(즉, 약물)의 용해 속도 및 생체이용률을 개선시킨다.
- [0201] 미국 특허 제5,169,645호는 개선된 유동성을 갖는 직접 압착가능한 왁스 함유 과립을 개시한다. 이러한 과립은 왁스를 일정 흐름 개선 첨가제와 용융하여 혼합시킨 후, 혼합물을 냉각 및 과립화시키는 경우에 얻어진다. 일정 실시형태에서, 오직 왁스 그 자체는 왁스(들) 및 첨가제(들)의 용융 조합으로 용융되고, 다른 경우에서 왁스(들) 및 첨가제(들) 둘 모두가 용융된다.
- [0202] 본 발명은 또한 본 발명의 방법 내에서 유용한 1 이상의 화합물의 지연 방출을 제공하는 층, 및 본 발명의 방법 내에서 유용한 1 이상의 화합물의 즉시 방출을 제공하기 위한 추가 층을 포함하는 다중층 정제를 포함한다. 왁

스/pH-감응성 중합체 믹스를 사용하여, 자연 방출을 보장하게, 활성 성분이 포획된 위 불용성 조성물을 획득할 수 있다.

[0203] 비경구 투여

본원에서 사용시, 약학 조성물의 "비경구 투여"는 피험체의 조직의 물리적 파손을 특징으로 하는 임의의 투여 경로 및 조직에 파손을 통한 약학 조성물의 투여를 포함한다. 따라서 비경구 투여는 제한없이, 조상물의 주사에 의한 약학 조성물의 투여, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직 침투성 비외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등을 포함한다. 구체적으로, 비경구 투여는 제한없이, 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 흉골내 주사, 및 신장 투석 주입 기술을 포함하는 것을 고려한다.

비경구 투여에 적합한 약학 조성물의 제제는 약학적으로 허용되는 담체, 예컨대 멸균수 또는 멸균 등장성 염수와 배합된 활성 성분을 포함한다. 그러한 제제는 볼러스 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조되거나, 포장되거나, 또는 판매될 수 있다. 주사가능한 제제는 단위 제형, 예컨대 보존제를 함유하는 복수 용량 용기 또는 앰플로 제조되거나, 포장되거나, 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 제한없이, 혼탁물, 용액, 유성 또는 수성 비히를 중 예멀션, 페이스트, 및 이식가능한 지속 방출 또는 생체분해성 제제를 포함한다. 그러한 제제는 제한없이, 혼탁제, 안정화제 또는 분산제를 포함한 1 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제의 일 실시형태에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적합한 비히를(예를 들어, 멸균된 발열원 무함유수)과 재구성을 위한 건조(즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다.

약학 조성물은 멸균된 주사가능한 수성 또는 유성 혼탁물 또는 용액의 형태로 제조되거나, 포장되거나, 또는 판매될 수 있다. 이러한 혼탁물 또는 용액은 기지의 당분야에 따라 제제화될 수 있고, 활성 성분이외에도, 본원에 기술된 추가 성분 예컨대 분산제, 습윤제, 또는 혼탁제를 포함할 수 있다. 그러한 멸균된 주사가능한 제제는 예를 들어, 무독성 비경구로 허용되는 희석제 또는 용매, 예컨대 물 또는 1,3-부탄디올을 사용해 제조될 수 있다. 다른 허용되는 희석제 및 용매는 제한없이, 릴거액, 등장성 염화나트륨 용액, 및 고정유 예컨대 합성 모노글리세라이드 또는 다이글리세라이드를 포함한다. 유용한 다른 비경구로 투여되는 제제는 미정질 형태, 리포솜 조제물, 또는 생체분해성 중합체 시스템의 성분으로 활성 성분을 포함하는 것들을 포함한다. 지속 방출 또는 이식을 위한 조성물은 약학적으로 허용되는 중합성 또는 소수성 물질 예컨대 예멀션, 이온 교환 수지, 난용성 중합체, 또는 난용성 염을 포함할 수 있다.

[0207] 추가의 투여 형태

본 발명의 추가의 제형은 미국 특허 제6,340,475호, 제6,488,962호, 제6,451,808호, 제5,972,389호, 제5,582,837호, 및 제5,007,790호에 기술된 바와 같은 제형을 포함한다. 본 발명의 추가 제형은 또한 미국 특허 출원 제20030147952호, 제20030104062호, 제20030104053호, 제20030044466호, 제20030039688호, 및 제20020051820호에 기술된 바와 같은 제형을 포함한다. 본 발명의 추가 제형은 또한 PCT 특허 출원 WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755, 및 WO 90/11757에 기술된 제형을 포함한다.

[0209] 제어 방출 제제 및 약물 전달 시스템

본 발명의 약학 조성물의 제어 또는 지속 방출 제제는 통상의 기술을 사용해 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 사용되는 제형은 다양한 비율로 바람직한 방출 프로파일을 제공하기 위해 예를 들어, 하이드로프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 젤, 투과성 막, 시스템, 다층 코팅, 미세입자, 리포솜, 또는 미세구 또는 이의 조합을 사용하여, 그 안의 1 이상의 활성 성분의 선행 또는 제어 방출로서 제공될 수 있다. 본원에 기술된 것들을 포함하여, 당업자에게 알려진 적합한 제어 방출 제제는 본 발명의 약학 조성물과 사용하기 위해 쉽게 선택될 수 있다. 따라서, 제어 방출로 적합화시킨, 경구 투여에 적합한 단일 단위 제형, 예컨대 정제, 캡슐, 젤캡, 및 당의정이 본 발명에 포함된다.

대부분의 제어 방출 약학 제품은 그들의 비제어 대응물에 의해 획득되는 것보다 약물 용법을 개선시키는 공통 목표를 갖는다. 이상적으로, 의학적 치료에서 최적으로 디자인된 제어 방출 조제물의 사용은 최소 시간량 동안 병태를 치유하거나 또는 제어하기 위해 적용되는 최소의 약물 물질을 특징으로 한다. 제어 방출 제제의 장점은 약물의 연장된 활성, 감소된 투약 빈도, 및 증가된 환자 순응도를 포함한다. 또한, 제어 방출 제제는 작용 개시 시간 또는 다른 특징들, 예컨대 약물의 혈액 수준에 영향을 미치기 위해 사용될 수 있고, 따라서, 역효과의 발생에 영향을 미칠 수 있다.

- [0212] 대부분의 제어 방출 제제는 원하는 치료 효과를 신속하게 생성시키는 약물의 양을 초기에 방출하고, 장기간 동안 치료 효과의 이 수준을 유지하도록 약물의 다른 양을 점진적으로 계속적으로 방출하도록 디자인된다. 체내에서 약물의 이러한 일정 수준을 유지하기 위해서, 약물은 물질대사되어 몸에서 배출되는 약물의 양을 대체하게 되는 속도로 제형으로부터 방출되어야 한다.
- [0213] 활성 성분의 제어 방출은 다양한 유도인자, 예를 들어, pH, 온도, 효소, 물, 또는 다른 생리적 상태 또는 화합물에 의해 자극될 수 있다. 본 발명에서 용어 "제어 방출 성분"은 제한없이, 활성 성분의 제어 방출을 용이하게 하는 중합체, 중합체 매트릭스, 젤, 투과성 막, 리포솜, 또는 미세구 또는 이의 조합을 포함하는, 화합물 또는 화합물들로서 본원에서 정의된다.
- [0214] 일정 실시형태에서, 본 발명의 제제는 제한없이, 단기간, 신속-오프셋을 비롯하여, 제어, 예를 들어 지속 방출, 지연 방출 및 박동성 방출 제제일 수 있다.
- [0215] 용어 지속 방출은 장기간의 시간 기간 동안 약물의 점진적 방출을 제공하고, 필수적이지는 않지만, 장기간의 시간 기간 동안 약물의 실질적으로 일정한 혈액 수준을 유발시킬 수 있는 약물 제제를 의미하기 위해 이의 통상의 의미로 사용된다. 시간 기간은 한달 또는 그 이상으로 길 수 있고 볼러스 형태로 투여되는 동량의 작용제보다 더 길게 방출되어야 한다. 지속 방출의 경우, 화합물은 화합물에 지속 방출 특성을 제공하는 적합한 중합체 또는 소수성 물질과 제제화될 수 있다. 그와 같이, 본 발명의 방법에 사용을 위한 화합물은 예를 들어 주사에 의해 미세입자의 형태로 또는 이식에 의한 웨이퍼 또는 디스크의 형태로 투여될 수 있다. 본 발명의 일정 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 지속 방출 제제를 사용하여, 다른 약학제와 조합해서 또는 단독으로 환자에게 투여된다.
- [0216] 용어 지연 방출은 약물 투여 후 일부 지연 후 약물의 초기 방출을 제공하고, 필수적이지는 않지만, 약 10분 내지 최대 약 12시간의 지연을 포함하는 약물 제제를 의미하기 위해 이의 통상의 의미로 본원에서 사용된다. 용어 박동성 방출은 약물 투여 후 약물의 펄스식 혈장 프로파일을 생성시키는 방식으로 약물의 방출을 제공하는 약물 제제를 의미하기 위해 이의 통상의 의미로 사용된다. 용어 즉시 방출은 약물의 투여 직후 약물의 방출을 제공하는 약물 제제를 의미하기 위해 이의 통상의 의미로 사용된다.
- [0217] 본원에서 사용시, 단기간은 약물 투여 후 약물 투여 후 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분 및 이의 임의의 또는 모든 전체 또는 부분 증분량 까지 및 이들을 포함하는 임의의 시간 기간을 의미한다.
- [0218] 본원에서 사용시, 신속 오프셋은 약물 투여 후 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분, 및 이의 임의의 모든 전체 또는 부분 증분량까지 및 이들을 포함한 임의의 시간 기간을 의미한다.
- [0219] 당업자는 통상의 실험만을 사용해, 본원에 기술된 특정 과정, 실시형태, 청구항 및 실시예의 수많은 균등물을 인식하거나, 또는 확인할 수 있다. 그러한 균등물은 본 발명의 범주내로 간주되고, 본원에 첨부된 청구항에 의해 포함된다. 예를 들어, 당분야에서 인식되는 대체물 및 통상의 실험만을 사용한, 제한없이, 반응 시간, 반응 크기/부피, 및 실험 시약, 예컨대 용매, 촉매, 압력, 대기 조건, 예를 들어, 질소 분위기 및 산화/환원제를 포함한, 반응 조건의 변형은 본 출원의 범주에 속한다는 것을 이해해야 한다.
- [0220] 값 및 범위가 제공되는 본원의 어디서든, 이들 값 및 범위에 의해 포함되는 모든 값 및 범위는 본 발명의 범주 내에 포함시키려는 의미임을 이해해야 한다. 또한, 이들 범위에 속하는 모든 값을 비롯하여, 값의 범위의 상한치 또는 하한치가 역시 본 출원에서 고려된다.
- [0221] 하기 실시예는 본 발명의 측면들을 더욱 예시한다. 그러나, 그들은 본원에 기재된 바와 같이 본 발명의 교시 또는 개시를 임의 방식으로 제한하지 않는다.
- [0222] **실시예**
- [0223] 본 발명을 이제 하기 실시예를 참조하여 설명한다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명을 이들 실시예에 제한하는 것이 아니라 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백한 모든 변이를 포함한다.
- [0224] **방법 및 재료**
- [0225] **ENPP1-asj GACI 마우스 모델:**
- [0226] 이형접합 ENPP1-asj/+ 변식쌍은 전체 실험 전반에서 '촉진 식이'(TD00.442, Harlan Laboratories, Madison W

I)를 유지시켜서 자궁내 축진 식이에 노출시킨 ENPP1-WT 및 ENPP1-asj/asj 형제쌍을 발생시켰다. 한배 새끼들을 8일에 유전자형 분석을 하였고 21일에 이유를 시켰다. 이유 후, 형제쌍을 실험 코호트로 나누었고 모든 실험 동물은 실험 완료 동안 축진 식이를 유지시켰다.

[0227] **ENPP1-Fc 디자인:**

[0228] 가용성, 재조합 단백질을 발현하도록 변형된, 변형된, 인간 및 마우스 NPP1(인간: NCBI 수탁번호 NP_006199; 마우스: NCBI 수탁번호 NP_03839)을 각각 pFUSE-hIgG1-Fc1 또는 pFUSE-mIgG1-Fc1 플라스미드(InvivoGen, San Diego CA)에 서브클로닝하여 IgG1에 융합시켰다.

[0229] **단백질 생성:**

[0230] **진탕 플라스크:** ENPP1-Fc의 안정한 형질감염은 제오신 선별 하에 HEK293 세포에서 확립시켰고, 부착된 HEK293 세포를 혼탁 성장에 적합화시켰다. 적합화된 세포를 사용해 고습도에서 120rpm으로 교반시키면서, 37°C 및 5% CO₂의 진탕 플라스크 내 프리스타일 배지(Gibco #12338-018) 중에 액체 배양 성장물을 접종하였다. 배양물을 서서히 원하는 표적 부피로 확장시켰고 이후 추가 12일 동안 유지시켜서 세포의 단백질을 축적시켰다. 유지기 동안, 배양물은 단백질 생성을 강화시키도록 CD 이피션트피드(EfficientFeed) C AGT(Gibco #A13275-05)를 보충해주었다.

[0231] **생물반응기:** 세포를 용존 산소 및 pH 제어기가 장착된 10리터 생물반응기에서 증식시켰다. 용존 산소는 80 RPM의 교반 속도에서 분당 3리터를 넘지 않는 산소 및 공기의 혼합물을 배양물에 공급하여 40% 공기 포화도를 유지시켰다. pH는 pH가 7.4보다 높아졌을 때 CO₂를 살포하여 7.4로 제어하였다. 배양물 성장은 세포수, 세포 생존능, 포도당 및 락테이트 농도를 측정하는 것이 후속된다. 양쪽 생성 방법의 최종 수율은 배양 리터 당 대략 5 mg의 정제된 ENPP1-Fc였다.

[0232] **단백질 정제:**

[0233] 액체 배양물을 4300 x g에서 15분간 원심분리하였고 상등액을 0.2 μm 막을 통해 여과시켰고 펠리콘(Pellicon) (등록상표) 0.11 m² 울트라셀(Ultracell)(등록상표) 30 kD 카세트(Millipore, Billerica MA)를 사용한 접선 유동을 통해 농축시켰다. 다음으로, 농축된 상등액을 다단계 공정으로 크로마토그래피 기술의 조합을 통해 정제하였다. 이를 기술은 순차적으로 수행하였고 하기 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 단백질 A 또는 단백질 G를 사용한 친화성 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 교환 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 침전 단계, 추출 단계, 동결건조 단계, 및/또는 결정화 단계. 연속하여 이를 단계 중 어느 하나를 사용해서, 단백질 화학 분야의 숙련가는 은 염색 젤(비제한적인 예로서, 도 10) 상에 오염된 단백질 밴드가 존재하지 않도록 기술된 대상 조성물을 균질하게 정제할 수 있다. 다음으로 최종 단백질 샘플은 모두 내독소가 없다는 것을 입증하기 위해 피어스(Pierce) LAL 밀색성 내독소 정량 키트(cat. 88282)를 사용해 시험되었다.

[0234] **효소학:**

[0235] 인간 NPP1에 의한 ATP의 정상 상태 가수분해는 HPLC를 통해 결정하였다. 간략하게, 효소 반응은 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 14 μM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM CaCl₂를 포함하는 반응 완충액 중 다양한 농도의 ATP에 10 nM NPP1을 첨가하여 시작하였다. 다양한 시점에, 50 μl의 반응 용액을 제거하여 동일 부피의 3 M 포름산으로 켄칭하였다. 켄칭된 반응 용액을 15 mM 아세트산암모늄(pH 6.0)으로 평형화시킨 C-18(5 μm 250 X 4.6 mm) 컬럼(Higgins Analytical) 상에 적재시켰고 0% 내지 20%의 메탄올 농도구배로 용리하였다. 기질 및 생성물은 259 nm에서 UV 흡광도를 통해 모니터링하였고 그들의 상응하는 피크 및 표준 곡선의 통합에 따라 정량하였다.

[0236] **비히클:**

[0237] mENPP1-Fc는 전달되는 비히클의 부피가 체중 기준으로 16 μl 비히클/그램이 되도록 비히클에 제제화시켰다. 비히클은 내독수 무함유 물을 사용해 1x로 희석되고 14 μM CaCl₂ 및 14 μM ZnCl₂가 보충된 아메리칸바이오(americanBio) 10X PBS(Stock# AB11072)로 구성되었다.

[0238] **투약:**

[0239] 동물들에게 비히클 또는 비히클에 제제화된 마우스 ENPP1-Fc(mENPP1-Fc)를 투약하였다. 마우스들은 500 au/Kg

mENPP1-Fc의 용량 수준으로 14일에 시작하여 매일 피하 주사로 투약되었다.

[0240] **효소 활성:**

일정 실시형태에서, 본 발명에서 유용한 효소는 미카엘리스 멘톤(Michaelis Menton) 상수가 문헌 [Albright, et al., 2015, Nature Comm. 6:10006]에 기술된 바와 같은 효소 활성을 갖는다(ATP 가수분해에 대해 $K_m \sim 2 \mu M$; $3.46(\pm 0.44)s^{-1}$ 의 k_{cat}).

[0242] **혈장 PPi의 정량:**

ENPP1-WT 및 투약된 ENPP1-asj/asj 동물들은 혜파린 첨가된 마이크로파이펫을 사용해 안구뒤에서 말기에 채혈하였고, 그 혈액은 혜파린-처리된 에펜도르프 튜브에 즉시 분배되어 습윤 얼음 상에 위치시켰다. 샘플은 4°C로 사전 냉각된 미세원심분리기에서 4000 rpm으로 5분간 원심분리시켰고, 혈장을 모아서 1 부피의 50 mM Tris-아세테이트 pH=8.0으로 희석하여 -80°C에 냉동시켰다. 혈청 PPi의 정량은 이전에 기술된 바와 같이 사용하여 수행하였다(Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal Biochem 83:61-63).

[0244] **마이크로-CT 스캔:**

[0245] **생체 내 99m PYP 영상화:** 뼈 조영제 99m Tc-파이로포스페이트(Pharmalucence, Inc)를 이중 1 mm 침공 시준기가 구비된 전임상 마이크로SPECT/CT 하이브리드 영상화 시스템(X-SPECT, Gamma Medica-Ideas)을 사용해 동물 코호트에서 평가하였다. 각 동물은 2-5 mCi의 방사능표지된 추적자를 ip 주사받았고 주사 후 1-1.5시간에 영상화시켰다. CT 스캔(50 kVp, 800 uA 및 1.25의 배율 상수에서 512회 투사)은 PECT 영상과 해부학적 공동국재를 위해 획득하였다. SPECT 영상은 7.0 cm의 ROR, 8.95 cm의 FOV 및 140 keV ± 20의 에너지 창으로 투사 당 60초, 32회 투사, 시계반대 방향 회전으로 시준기 헤드에 대해 180°로 획득하였다. CT 영상은 여과된 역투사 알고리즘을 사용하여 FLEX X-0 CT 소프트웨어(Gamma Medica-Ideas)로 재구성하였다. SPECT 영상은 FLEX SPECT 소프트웨어(5회 반복, 4 서브셋)를 사용해 재구성하였고 후속하여 CT 영상과 융합시키고 AMIRA 소프트웨어 및 오프라인 인하우스 스크립트를 사용해 분석하였다. 데이터를 봉괴 및 주사된 용량에 대해 보정하여 %주사된 용량(%ID)을 획득하였다.

[0246] **99m PYP 흡수의 정량:** 99m PYP 마우스 스캔을 위해, 동물을 주사후 2시간에 영상화시켰다. 얻어진 SPECT 스캔을 NIH의 ImageJ 영상 처리 소프트웨어로 불러와서 ROI를 각 동물의 머리(표적 장기) 및 전신으로 모았다. 흔히 "주사된 용량 백분율(%ID)"이라고 하는 주사된 활성 백분율(Percent injected activity; PIA)은 전신의 계측치에 대한 머리 계측치의 비율을 비교하여 계산하였고, %ID로 표시하여 방사서추적자가 ROI(머리)에 의해 흡수되는 친화성의 측정치를 제공하였다. 각 스캔의 전체 계측치는 주사된 용량의 전신 측정치로서 취하였다.

[0247] **서열:**

NPP1 아미노산 서열 (NCBI 수탁번호 NP_006199) (서열번호 1)

```

MERDGCAGGGSRGGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARAR
TAKDPNTYKVLSLVLSCVVLTTILGCIFGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCL
DYQETCIEPEHIWTCNKFRGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEP
QCPAGFETPPTTLLFSLDGFRAYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLY
PESHGIIIDNKMYPDKMNASFSLKSEKFNPWEYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD
IYKMYNGSVPFEERILAVLQLWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGM
LMDGLKELNLHRCLNLLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLSPDVPDKYYSF
NYEGIARNLSCREPNQHFKPKYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKYCGSGFHG
SDNVFSNMQALFVGYGPFGFKHGIEADTFENIEVYNLMDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKNPVYTPK
HPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVILQKENT
ICLLSQHQFMMSGYSDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSY
GFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYD
GRCDSELENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHG
KHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED

```

[0248]

NPP2 아미노산 서열 (NCBI 수탁번호 NP_001124335) (서열번호 2)

MARRSSFQSCQIISLFTFAVGVNICLGFTHAHRIKRAEGWEEGPPTVLSDSPWVTNISGSCKGRCEFLQ
 EAGPPDCRCDNLCKSYTSCCHDFDELCLKTARGWECKDRGGEVRNEENACHCSEDCLARGDCCTNY
 QVVCKGESHWVDDCEEIKAAECPAGFVRPPLIIFSDGFRASYMKGSKVMMPNIEKLRCGTHSPY
 MRPVYPTKTFPNLYTATGLYPESHGIVGNSMYDPVFDATFHRLRGREKFNHRWWGGQPLWITATKQG
 VKAGTFFWSVVIPHERRILTILQWLTPDHERPSVYAFYSEQPDFSGHKYGPFGPEMTNPLREIDKI
 VGQLMDGLKQLKLHRCVNVIFVGHDHGMEDVTCDRTEFLSNYLTNVDDITLVPGTLGRIRSKFSNNAK
 YDPKAIIANLTCKKPQHFKPYLKQHLPKRLHYANNRRIEDIHLLVERRHVARPKPLDVKKPSGKC
 FFQGDHGFDNKVNSMQTVFVGYSTFKYKTKVPPFENIELYNVMCDLLGLKPAPEMNGTHGSLNHLLR
 TNTFRPTMPEEVTRPNYPGIMYLQSDFDLGCTCDDKVEPKNKLDELNKRHLTKGSTEATRKFRGSR
 NENKENINGNFEPRKERHLLYGRPAVLRYTRYDILYHTDFESGYSEIFLMPPLWTSYTVSKQAEVSSV
 PDHLTSCVRPDVRVSPSFSONCLAYKNDKQMSYGFLFPPYLSSSPEAKYDAFLVTNMVPMYPAFKRV
 WNYFQRVLVKKYASERNGVNVISGPIFYDYDGLHDTEDKIKQYVEGSSIPVPTHYYSIITSCLDFT
 QPADKCDGPLSVSSFILPHRPDNEESCNSEDESKWVEELMKMHTARVRDIEHTSLDFFRKTTSRKY
 PEILTLKTYLHTYESEI

[0249]

NPP4 아미노산 서열 (NCBI 수탁번호 AAH18054.1) (서열번호 3)

MKLLVILLFSGLITGFRSDSSSLPPKLLLVSDGFRADYLKNYEFPHLQNFKEGVVLVEHVKNVFI
 TKTFFPNHYSIVTGLYEESSHGIVANSMYDAVTKKHFSDSNDKDPFWWNEAVPIWVTNQLQENRSSAAA
 MWPGTDVPIHDTIISYFMMNNSSVSFEERLNNITMWLNNSNPPVTATLYWEEPDAAGHKYGPEDKE
 NMSRVLKKIDDLIGDLVQRLKMLGLWENLNVIITSDHGMTQCSQDRLINLDSCIDHSYYTLIDLSPV
 AAILPKINRTEVYNKLKNCSPHMNVYLKEDIPNRFYYQHNDRIQPIIILVADEGWTIVLNESSQKLG
 HGYDNSLPSMHPFLAAHGPFAFHKGYKHSTINIVDIYPMCHILGLKPHPNNGTFGHTKCLLVDQWCI
 NLPEATAIVIGSLLVLTMLTCLIIIMQNRLSVPRFFSRLQLQEDDDPLIG

[0250]

[0251] (DSS)_n(서열번호 4), 여기서 n은 1 내지 10 범위의 정수이다.

[0252]

(ESS)_n(서열번호 5), 여기서 n은 1 내지 10 범위의 정수이다.

[0253]

(RQQ)_n(서열번호 6), 여기서 n은 1 내지 10 범위의 정수이다.

[0254]

(KR)_n(서열번호 7), 여기서 n은 1 내지 10의 정수이다.

[0255]

R_m(서열번호 8), 여기서 m은 1 내지 15 범위의 정수이다.

[0256]

DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 9)

[0257]

EEEEEEPRGDT(서열번호 10)

[0258]

APWHLSSQYSRT(서열번호 11)

[0259]

STLPIPHEFSRE(서열번호 12)

[0260]

VTKHLNQISQSY(서열번호 13)

[0261] E_m(서열번호 14), 여기서 m은 1 내지 15 범위의 정수이다.

NPP121 아미노산 서열 (서열번호 15)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|----------|----------|----------|---|---|---|
| 1 | M | E | R | D | G | C | A | G | G | G | S | R | G | G | E | G | G | R | A | P |
| 21 | R | E | G | P | A | G | N | G | R | D | R | G | R | S | H | A | A | E | A | P |
| 41 | G | D | P | Q | A | A | A | S | L | L | A | P | M | D | V | G | E | E | P | L |
| 61 | E | K | A | A | R | A | R | T | A | K | D | P | N | T | Y | K | I | I | S | L |
| 81 | F | T | F | A | V | G | V | N | I | C | L | G**F | T | A | <u>G</u> | <u>L</u> | <u>K</u> | P | S | |
| 101 | C | A | K | E | V | K | S | C | K | G | R | C | F | E | R | T | F | G | N | C |
| 121 | R | C | D | A | A | C | V | E | L | G | N | C | C | L | D | Y | Q | E | T | C |
| 141 | I | E | P | E | H | I | W | T | C | N | K | F | R | C | G | E | K | R | L | T |
| 161 | R | S | L | C | A | C | S | D | D | C | K | D | K | G | D | C | C | I | N | Y |
| 181 | S | S | V | C | Q | G | E | K | S | W | V | E | E | P | C | E | S | I | N | E |
| 201 | P | Q | C | P | A | G | F | E | T | P | P | T | L | L | F | S | L | D | G | F |
| 221 | R | A | E | Y | L | H | T | W | G | G | L | L | P | V | I | S | K | L | K | K |
| 241 | C | G | T | Y | T | K | N | M | R | P | V | Y | P | T | K | T | F | P | N | H |
| 261 | Y | S | I | V | T | G | L | Y | P | E | S | H | G | I | I | D | N | K | M | Y |
| 281 | D | P | K | M | N | A | S | F | S | L | K | S | K | E | K | F | N | P | E | W |
| 301 | Y | K | G | E | P | I | W | V | T | A | K | Y | Q | G | L | K | S | G | T | F |
| 321 | F | W | P | G | S | D | V | E | I | N | G | I | F | P | D | I | Y | K | M | Y |
| 341 | N | G | S | V | P | F | E | E | R | I | L | A | V | L | Q | W | L | Q | L | P |
| 361 | K | D | E | R | P | H | F | Y | T | L | Y | L | E | E | P | D | S | S | G | H |
| 381 | S | Y | G | P | V | S | S | E | V | I | K | A | L | Q | R | V | D | G | M | V |
| 401 | G | M | L | M | D | G | L | K | E | L | N | L | H | R | C | L | N | L | I | L |
| 421 | I | S | D | H | G | M | E | Q | G | S | C | K | K | Y | I | Y | L | N | K | Y |
| 441 | L | G | D | V | K | N | I | K | V | I | Y | G | P | A | A | R | L | R | P | S |
| 461 | D | V | P | D | K | Y | Y | S | F | N | Y | E | G | I | A | R | N | L | S | C |
| 481 | R | E | P | N | Q | H | F | K | P | Y | L | K | H | F | L | P | K | R | L | H |
| 501 | F | A | K | S | D | R | I | E | P | L | T | F | Y | L | D | P | Q | W | Q | L |
| 521 | A | L | N | P | S | E | R | K | Y | C | G | S | G | F | H | G | S | D | N | V |
| 541 | F | S | N | M | Q | A | L | F | V | G | Y | G | P | G | F | K | H | G | I | E |
| 561 | A | D | T | F | E | N | I | E | V | Y | N | L | M | C | D | L | L | N | L | T |
| 581 | P | A | P | N | N | G | T | H | G | S | L | N | H | L | L | K | N | P | V | Y |
| 601 | T | P | K | H | P | K | E | V | H | P | L | V | Q | C | P | F | T | R | N | P |
| 621 | R | D | N | L | G | C | S | C | N | P | S | I | L | P | I | E | D | F | Q | T |

[0262]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|----------|----------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 641 | Q | F | N | L | T | V | A | E | E | K | I | I | K | H | E | T | L | P | Y | G |
| 661 | R | P | R | V | L | Q | K | E | N | T | I | C | L | L | S | Q | H | Q | F | M |
| 681 | S | G | Y | S | Q | D | I | L | M | P | L | W | T | S | Y | T | V | D | R | N |
| 701 | D | S | F | S | T | E | D | F | S | N | C | L | Y | Q | D | F | R | I | P | L |
| 721 | S | P | V | H | K | C | S | F | Y | K | N | N | T | K | V | S | Y | G | F | L |
| 741 | S | P | P | Q | L | N | K | N | S | S | G | I | Y | S | E | A | L | L | T | T |
| 761 | N | I | V | P | M | Y | Q | S | F | Q | V | I | W | R | Y | F | H | D | T | L |
| 781 | L | R | K | Y | A | E | E | R | N | G | V | N | V | V | S | G | P | V | F | D |
| 801 | F | D | Y | D | G | R | C | D | S | L | E | N | L | R | Q | K | R | R | V | I |
| 821 | R | N | Q | E | I | L | I | P | T | H | F | F | I | V | L | T | S | C | K | D |
| 841 | T | S | Q | T | P | L | H | C | E | N | L | D | T | L | A | F | I | L | P | H |
| 861 | R | T | D | N | S | E | S | C | V | H | G | K | H | D | S | S | W | V | E | E |
| 881 | L | L | M | L | H | R | A | R | I | T | D | V | E | H | I | T | G | L | S | F |
| 901 | Y | Q | Q | R | K | E | P | V | S | D | I | L | K | L | K | T | H | L | P | T |
| 921 | F | S | <u>Q</u> | <u>E</u> | <u>D</u> | | | | | | | | | | | | | | | |

단일 밀줄: 전이 위치 (**)에서 절단을 제공하도록 NPP2 잔기 1-27과 교환된 잔기; 이중 밀줄:

NPP1 단백질 (시작 및 종결).

[0263]

NPP121-Fc 아미노산 서열 (서열번호 16)

1 M E R D G C A G G G S R G G E G G R A P
 21 R E G P A G N G R D R G R S H A A E A P
 41 G D P Q A A A S L L A P M D V G E E P L
 61 E K A A R A R T A K D P N T Y K I I S L
 81 F T F A V G V N I C L G**F T A G L K P S
 101 C A K E V K S C K G R C F E R T F G N C
 121 R C D A A C V E L G N C C L D Y Q E T C
 141 I E P E H I W T C N K F R C G E K R L T
 161 R S L C A C S D D C K D K G D C C I N Y
 181 S S V C Q G E K S W V E E P C E S I N E
 201 P Q C P A G F E T P P T L L F S L D G F
 221 R A E Y L H T W G G L L P V I S K L K K
 241 C G T Y T K N M R P V Y P T K T F P N H
 261 Y S I V T G L Y P E S H G I I D N K M Y
 281 D P K M N A S F S L K S K E K F N P E W
 301 Y K G E P I W V T A K Y Q G L K S G T F
 321 F W P G S D V E I N G I F P D I Y K M Y
 341 N G S V P F E E R I L A V L Q W L Q L P
 361 K D E R P H F Y T L Y L E E P D S S G H
 381 S Y G P V S S E V I K A L Q R V D G M V
 401 G M L M D G L K E L N L H R C L N L I L
 421 I S D H G M E Q G S C K K Y I Y L N K Y
 441 L G D V K N I K V I Y G P A A R L R P S
 461 D V P D K Y Y S F N Y E G I A R N L S C
 481 R E P N Q H F K P Y L K H F L P K R L H
 501 F A K S D R I E P L T F Y L D P Q W Q L
 521 A L N P S E R K Y C G S G F H G S D N V
 541 F S N M Q A L F V G Y G P G F K H G I E
 561 A D T F E N I E V Y N L M C D L L N L T
 581 P A P N N G T H G S L N H L L K N P V Y
 601 T P K H P K E V H P L V Q C P F T R N P
 621 R D N L G C S C N P S I L P I E D F Q T

[0264]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|----------|----------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 641 | Q | F | N | L | T | V | A | E | E | K | I | I | K | H | E | T | L | P | Y | G |
| 661 | R | P | R | V | L | Q | K | E | N | T | I | C | L | L | S | Q | H | Q | F | M |
| 681 | S | G | Y | S | Q | D | I | L | M | P | L | W | T | S | Y | T | V | D | R | N |
| 701 | D | S | F | S | T | E | D | F | S | N | C | L | Y | Q | D | F | R | I | P | L |
| 721 | S | P | V | H | K | C | S | F | Y | K | N | N | T | K | V | S | Y | G | F | L |
| 741 | S | P | P | Q | L | N | K | N | S | S | G | I | Y | S | E | A | L | L | T | T |
| 761 | N | I | V | P | M | Y | Q | S | F | Q | V | I | W | R | Y | F | H | D | T | L |
| 781 | L | R | K | Y | A | E | E | R | N | G | V | N | V | V | S | G | P | V | F | D |
| 801 | F | D | Y | D | G | R | C | D | S | L | E | N | L | R | Q | K | R | R | V | I |
| 821 | R | N | Q | E | I | L | I | P | T | H | F | F | I | V | L | T | S | C | K | D |
| 841 | T | S | Q | T | P | L | H | C | E | N | L | D | T | L | A | F | I | L | P | H |
| 861 | R | T | D | N | S | E | S | C | V | H | G | K | H | D | S | S | W | V | E | E |
| 881 | L | L | M | L | H | R | A | R | I | T | D | V | E | H | I | T | G | L | S | F |
| 901 | Y | Q | Q | R | K | E | P | V | S | D | I | L | K | L | K | T | H | L | P | T |
| 921 | F | S | <u>Q</u> | <u>E</u> | <u>D</u> | L | I | N | D | K | T | H | T | C | P | P | C | P | A | P |
| 941 | E | L | L | G | G | P | S | V | F | L | F | P | P | K | P | K | D | T | L | M |
| 961 | I | S | R | T | P | E | V | T | C | V | V | V | D | V | S | H | E | D | P | E |
| 981 | V | K | F | N | W | Y | V | D | G | V | E | V | H | N | A | K | T | K | P | R |
| 1001 | E | E | Q | Y | N | S | T | Y | R | V | V | S | V | L | T | V | L | H | Q | D |
| 1021 | W | L | N | G | K | E | Y | K | C | K | V | S | N | K | A | L | P | A | P | I |
| 1041 | E | K | T | I | S | K | A | K | G | Q | P | R | E | P | Q | V | Y | T | L | P |
| 1061 | P | S | R | E | E | M | T | K | N | Q | V | S | L | T | C | L | V | K | G | F |
| 1081 | Y | P | S | D | I | A | V | E | W | E | S | N | G | Q | P | E | N | N | Y | K |
| 1101 | T | T | P | P | V | L | D | S | D | G | S | F | F | L | Y | S | K | L | T | V |
| 1121 | D | K | S | R | W | Q | Q | G | N | V | F | S | C | S | V | M | H | E | A | L |
| 1141 | H | N | H | Y | T | Q | K | S | L | S | L | S | P | G | K | | | | | |

단일 밑줄: 전이 위치 (***)에서 절단을 제공하도록 NPP2 잔기 1-27과 교환된 잔기; 이중 밑줄:

NPP1 단백질(시작 및 종결): 굵은체: hIgG1 (Fc)

[0265]

NPP71 아미노산 서열 (서열번호 17)

1 MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GAGLKPSCAK EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD
 51 AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR CGEKLTRSL CACSDDCDK
 101 GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC PAGFETPPTL LFSLDGFRAE
 151 YLHTWGGLLP VISKLKKCGT YTKNMRPVYP TKTFPNHSI VTGLYPESHG
 201 IIDNKMYPDK MNASFSLKSK EKFNPWYKG EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP
 251 GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV LQWLQLPKDE RPHFYTLYLE
 301 EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGL MDGLKELNH RCLNLILISD
 351 HGMEQGSCKK YYILNKNYLGD VKNIKVIYGP AARLRPSDVP DKYYSFNYEG
 401 IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK SDRIEPLTFY LDPOWQLALN
 451 PSERKYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYGP GFKHGIEADT FENIEVYNLM
 501 CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVPYTPK HPKEVHPLVQ CFPTRNPRDN
 551 LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEKKIIK HETLPYGRPR VLQKENTICL
 601 LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF STEDFSNCLY QDFRIPLSPV
 651 HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY SEALLTTNIV PMYQSFQVIW
 701 RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVFDFDY DGRCDSLENL RQKRRVIRNQ
 751 EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT LAFILPHRTD NSESCVHGKH
 801 DSSWVEELLM IHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ
 851 ED

단일 밀출: NPP7; 이중 밀출: NPP1 단백질 (시작 및 종결).

[0266]

NPP71-Fc 아미노산 서열 (서열번호 18)

1 MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GAGLKPSCAK EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD
 51 AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR CGEKLTRSL CACSDDCDK
 101 GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC PAGFETPPTL LFSLDGFRAE
 151 YLHTWGGLLP VISKLKKCGT YTKNMRPVYP TKTFPNHSI VTGLYPESHG
 201 IIDNKMYPDK MNASFSLKSK EKFNPWYKG EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP
 251 GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV LQWLQLPKDE RPHFYTLYLE
 301 EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGL MDGLKELNH RCLNLILISD
 351 HGMEQGSCKK YYILNKNYLGD VKNIKVIYGP AARLRPSDVP DKYYSFNYEG
 401 IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK SDRIEPLTFY LDPOWQLALN
 451 PSERKYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYGP GFKHGIEADT FENIEVYNLM
 501 CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVPYTPK HPKEVHPLVQ CFPTRNPRDN
 551 LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEKKIIK HETLPYGRPR VLQKENTICL
 601 LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF STEDFSNCLY QDFRIPLSPV
 651 HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY SEALLTTNIV PMYQSFQVIW
 701 RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVFDFDY DGRCDSLENL RQKRRVIRNQ
 751 EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT LAFILPHRTD NSESCVHGKH
 801 DSSWVEELLM IHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ
 851 EDLINDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 901 VSHEDPEVKF NWYVVGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 951 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 1001 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 1051 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

단일 밀출: NPP7; 이중 밀출: NPP1 단백질(시작 및 종결); 굽은체: hIgG1 (Fc).

[0267]

(NPP1 N-말단 GLK 결여된 NPP71) 아미노산 서열 (서열번호 19)

| | | | |
|-----|-----------------------------------|------------|-----------------------|
| 1 | MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GA | PSCAK | EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD |
| 51 | AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR | CGEKRLTRSL | CACSDDCDKD |
| 101 | GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC | PAGFETPPTL | LFSLDGFARE |
| 151 | YLHTWGGLP VISKLKCGT YTKNMRPVYP | TKTFPNHYSI | VTGLYPESHG |
| 201 | IIDNKMYPDK MNASFSLKSK EKFNPWEYKG | EPIWVTAKYQ | GLKSGTFFWP |
| 251 | GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV | LQWLQLPKDE | RPHFYTLYLE |
| 301 | EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGLM | MDGLKELNLH | RCLNLILISD |
| 351 | HGMEQGSCKK YIYLNLKYLGD VKNIKVIYGP | AARLRPSDVP | DKYYSFNYEG |
| 401 | IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK | SDRIEPLTFY | LDPQWQLALN |
| 451 | PSERKYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYGP | GFKHGIEADT | FENIEVYNLM |
| 501 | CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVTYTPK | HPKEVHPLVQ | CPFTRNPRDN |
| 551 | LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIIC | HETLPYGRPR | VLQKENTICL |
| 601 | LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF | STEDFSNCLY | QDFRIPLSPV |
| 651 | HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY | SEALLTTNIV | PMYQSFQVIW |
| 701 | RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVFDY | DGRCDSLENL | RQKRRVIRNQ |
| 751 | EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT | LAFILPHRTD | NSESCVHGKH |
| 801 | DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ | RKEPVSDILK | LKTHLPTFSQ |
| 851 | <u>ED</u> | | |

단일 밀줄: NPP7; 이중 밀줄: NPP1 단백질 (시작 및 종결) (NPP1의 N 말단의 처음 3개 아미노산, GLK는 생략됨).

[0268]

(NPP1 N-말단 GLK 결여된 NPP71)-Fc 아미노산 서열 (서열번호 20)

| | | | |
|------|--|------------|-----------------------|
| 1 | MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GA | PSCAK | EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD |
| 51 | AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR | CGEKRLTRSL | CACSDDCDKD |
| 101 | GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC | PAGFETPPTL | LFSLDGFARE |
| 151 | YLHTWGGLP VISKLKCGT YTKNMRPVYP | TKTFPNHYSI | VTGLYPESHG |
| 201 | IIDNKMYPDK MNASFSLKSK EKFNPWEYKG | EPIWVTAKYQ | GLKSGTFFWP |
| 251 | GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV | LQWLQLPKDE | RPHFYTLYLE |
| 301 | EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGLM | MDGLKELNLH | RCLNLILISD |
| 351 | HGMEQGSCKK YIYLNLKYLGD VKNIKVIYGP | AARLRPSDVP | DKYYSFNYEG |
| 401 | IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK | SDRIEPLTFY | LDPQWQLALN |
| 451 | PSERKYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYGP | GFKHGIEADT | FENIEVYNLM |
| 501 | CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVTYTPK | HPKEVHPLVQ | CPFTRNPRDN |
| 551 | LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIIC | HETLPYGRPR | VLQKENTICL |
| 601 | LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF | STEDFSNCLY | QDFRIPLSPV |
| 651 | HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY | SEALLTTNIV | PMYQSFQVIW |
| 701 | RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVFDY | DGRCDSLENL | RQKRRVIRNQ |
| 751 | EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT | LAFILPHRTD | NSESCVHGKH |
| 801 | DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ | RKEPVSDILK | LKTHLPTFSQ |
| 851 | <u>ED</u> <u>LINDKHT</u> CPPCPAPELL GGPSVFLFPP | KPKDTLMISR | TPEVTCVVVD |
| 901 | VSHEDPEVKF NWYVGDGVEVH NAKTKPREEQ | YNSTYRVVSV | LTVLHQDWLN |
| 951 | GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE | PQVYTLPPSR | EEMTKNQVSL |
| 1001 | TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP | PVLDSDGSFF | LYSKLTVDKS |
| 1051 | RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP | GK | |

단일 밀줄: NPP7; 이중 밀줄: NPP1 단백질 (시작 및 종결) (NPP1의 N 말단 처음 3개 아미노산은 생략됨); 굵은체: hIgG1 (Fc).

[0269]

NPP121-ALB 아미노산 서열 (서열번호 21)

MERDGCAGGGSRGGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEPELEKAARAR
 TAKDPNTYKIISLFTFAVGVNICLG**FTAGLKPSAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNC
 CLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINCINYSSVCQGEKSWEEPCESIN
 EPQCPAGFETPPTLFSLDGFRAEYLHTWGGLPVISKLLKGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTG
 LYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPWEYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIF
 PDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMV
 GMLMDGLKELNLHRCNLNLISDHGMEQGSCKKYIYLNLKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYY
 SFNYEGIARNLSCREPQNQHFKPYLKHFPLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPOWQLALNPSEKYCGSGF
 HGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGEADTFENIEVYNLCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYT
 PKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKE
 NTICLLSQHQFMMSGYSDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCILYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKV
 SYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFD
 YDGRCDLSLENLRQKRRVIRNQEILIPHTFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSECV
 HGKHDSWVEELMLHRAITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSGSGGSMKVV
 TFLLLLFVSGSAFSRGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVT
 DFAKTCVADESAANCDKSILHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPP
 FERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHLYHEARRHPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPK
 LDGVKEKALVSSVRQRMCKSSMOKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHG
 DLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCDCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV
 CKNYAEAKDVFGLTFLYEYSRRHPDYSVSLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVE
 EPKNLVTKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCCTLPEQRLPCV
 EDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTL
 PEKEKQIKKQTALAEVLVHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDAL
 ARSWSHPQFEK

굵은 이탤릭체: NPP1 세포질 및 경막; **단일 밑줄:** 전이 위치 (**)에서 절단을 제공하도록 Npp2

잔기 1-27 과 교환된 잔기; **이중 밑줄:** NPP1 경막; 평문: NPP1 세포외 도메인; **굵은 밑줄:** 링커;

굵은체: 알부민

[0270]

(NPP1 N-말단 GLK 결여된 NPP71)-ALB 아미노산 서열 (서열번호 22)

MRGPAVLLVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEP
EHIWTCNKFRGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETP
PTLLFSLDGFRAYLHTWGGLLPIVKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII
DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPENWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIIYKMYNGSV
PFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEPDSSGHSGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELN
LHRCCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNLKLGDVKNIVYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNL
SCREPQHFKPYLKHFPLKRLHFAKSRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSNDVFSNMQ
ALFVGYGPFGFKHGEADTFENIEVNLCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKNPVTPKHPKEVHPLV
QCPFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAEKKIHKETLPYGRPRVQLQKENTICLLSQHQF
MSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLN
KN88GIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEERNGNVVSGPVFDYDGRCDSENL
RQKRRVIRNQEILIPHTFFIVLTSCKDTSQPLHCENLDLAFILPHRTDNSECVHGKHDSSWVEE
LLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSGSGSMKWVTFLFFFVSGS
AFSRGVFRREAHKSEIAHYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLLQRCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES
AANCDSKSLHTLFGDKLCAIPNLRNEYGELADCCQKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCT
SFKENPTTFMGHYLHEVARRHYPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVS
SVRQRMKCSSMOKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLAIDLTKVNKECCHGDLLECADDRAE
LAKYMCENQATISSKLLQTCDCPKLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF
LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCD
LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV
CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSILVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQT
ALAEALVHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTCKDALARSWSHPQFEK

이중 밀줄: NPP7; 평문: NPP1; 굵은체: 스페이서 서열; 단일 밀줄: 알부민

[0271]

[0272]

IISLFTFAVGVNICLGFTA(서열번호 23)

NPP51 아미노산 서열 (서열번호 24)

MTSKFLLVSFILAALSLSTTFSLQPSAKEVKSCKGRCFERTFSNCRCDAACVSLGNCCLDQETCV
EPHTIWTCNKFRGEKRLSRFVCSACDDCKTHNDCCINYSSVCQDKKSWVEETCESIDTPECPAEFE
SPPTLLFSLDGFRAYLHTWGGLLPIVKLKNCGTYTKNMRPMYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII
DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPENWYKGEPIWVTANHQEVKSGTYFWPGSDVEIDGILPDIIYKVYNG
SVPFEERILAVLQWLQLPSHERPHFYTLYLEPDSSGHSGPVSSEVIKALQVDRLVGMLMDGLK
LGLDKCLNLILISDHGMEQGSCCKYVYLNKYLGDVNNVKVVYGPAAARLRPTDVPETYYSFNYEALAK
NLSCREPQHFRPYLKPKRLHFAKSRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSNDLFSN
MQALFIGYGPFKHGAEVDSFNIEVNLCDLLGLIPAPNNGSHGSLNHLKKPIYNPSHPKEEGF
LSQCPPIKSTSNDLGCTCDPWIPIKDFEKFQNLNTTEDVDDIYHMTVYGRPRILLKQHRVCLLQQQQ
FLTGYSLDLLMPLWASYTFLSNDQFSRDDFSNCYQDLRIPLSPVHKCSYYKSN SKLSYGFLLPPRL
NRVSNIHYSSEALLTSNIVPMYQSFQVIWYHLDTLLQRYAHERNGINVSGPVFDYDGRYDSLEI
LKQNSRVRIRSQEILIPHTFFIVLTSCKQLSETPLECSALESSAYILPHRPNIESCTHGRRESSWVE
ELLTLHRARVTDVELITGLSFYQDRQESVSELLRLKTHLPQFQED

밀줄: NPP5; 평문: NPP1

[0273]

NPP51-ALB 아미노산 서열 (서열번호 25)

MTSKFLLVSLAALSLSLSTFSLQPSCAKEVKSCRGRCFERTFSNCRCDAACVSLGNCLDFQETCV
EPHTHIWTCNKFRGEKRLSRFVSCADDCKTHNDCCINYSSVCQDKKSWVEETCESIDTPPECPAEFE
SPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLPVISKLKNCGTYTKNMRPMYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII
DNKMYDPKMNASFSLSKSKEKFNPLWYKGQPIWVTANHQEVKSGTYFWPGSDVEIDGILPDIYKVYNG
SVPFEERILAVLEWLQLPSHERPHFTYLLEEPDSSGHSHGPVSSEVIKALQKVDRLVGMLMDGLKD
LGLDKCLNLILISDHGMEQGSCKKYVYLNKYLGDVNNVKVVGPAARLRPTDVETYYSFNYEALAK
NLSCREPQNQHFRPYLKPKLHFAKSNDRIEPLTFYLDPOWQALANPNSERKYGCGSGFHGSNDLFSN
MQALFIGYGPFAFKHGAEVDSFENIEVYNLMCDLLGLIPAPNNNGSHGSLNHLLKKPIYNPSHPKEEGF
LSQCPPIKSTSNDLGCTCDPWIVPIKDFEKQLNLTTEDVDDIYHMTVPYGRPRILLKQHRVCLLQQQ
FLTGYSLDLMPLWASYTFLSNDQFSRDDFSNCLYQDLRIPLSVHKCSYYKSNKLSYGFLLPPRL
NRVSNHIYSEALLTSNIVPMYQSFQVIWHYLHDTLLQRYAHERNGINVVSGPVFDYDGRYDSLEI
LKQNSRVIIRSQEILIPHTFFIVLTSCKQLSETPLECSALESSAYILPHRPDNIESCTHGKRESSWVE
ELLTLHRARVTDVELITGLSFYQDRQESVSELLRLKTHLPFQSQEDGGSGGSMKWVTFLLLFVSGS
AFSRGVFRREAHKSEIAHYNDLGEQHFKGLVLIASFQYQLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES
AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCT
SFKENPTTFMGHYLHEVARRHPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVS
SVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECHGDLLECADDRAE
LAKYMCENQATISSKLQTCDCPKLLKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF
LGTFLYEYSRRHPDYSVSLRLAKKYEATLEKCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVTNCD
LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV
CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQT
ALAELVHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALARSWSHPQFEK

이중 밀줄: NPP5; 평문: NPP1; 굵은체: 스페이서; 단일 밀줄: 알부민

[0274]

인간 IgG Fc 도메인, Fc (서열번호 26)

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNA
KTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR

[0275]

ALB (서열번호 27)

MKWVTFLLLFVSGSAFSRGVFRREAHKSEIAHYNDLGEQHFKGLVLIASFQYQLQKCSYDEHAKLV
QEVTDFAKTCVADEAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPEPERNECFLQHKDDNP
SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESC
LTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKE
CCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCDCPKLLKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVE
DQEVCCKNYAEAKDVFGLTFLYEYSRRHPDYSVSLRLAKKYEATLEKCAEANPPACYGTVLAEFQ
PLVEEPKNLVTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQR
LPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSD
ICTLPEKEKQIKKQTALAELVHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRC
KDALARSWSHPQFEK

[0276]

LIN(서열번호 28)

[0277]

GGSGGS(서열번호 29)

[0278]

RSGSGGS(서열번호 30)

[0279]

실시예 1: ENPP1-asj PXE 마우스 모델

[0280]

본 발명의 일정 폴리펩타이드(예컨대 ENPP1-Fc)는 PXE 및 골관절염(OA)의 마우스 모델에서 시험하였다. PXE 마

우스는 PXE를 갖는 인간과 유사한 방식으로 다중 경로 막 수송체 ABCC6에 기능 상실 돌연변이를 나타낸다. ANK 마우스를 OA에 대한 포유동물 모델로서 사용하였다.

[0282] 이형접합 ENPP1-asj/+ 번식쌍을 전체 실험 전반에서 "촉진 식이"(TD00.442, Harlan Laboratories, Madison WI)로 유지시켜 자궁내 촉진 식이에 노출된 ENPP1-WT 및 ENPP1-asj/asj 형제쌍을 발생시켰다. 한배새끼들을 8일에 유전자형 분석하였고 21일에 이유를 시작하였다. 이유 시작 후, 형제쌍을 실험 코호트로 분류하였고 모든 실험 동물을 실험 완료 동안 촉진 식이로 유지시켰다. 본 발명의 선택된 폴리펩타이드는 본원에 기술된 대로 실험 동물에게 투여되었고, 뼈를 분석하였다.

[0283] 도 7에 예시된 바와 같이, PXE 및 ANK 마우스는 PXE의 발병의 이유라고 문헌에서 보고된 생체마커인 PPi가 초기에 낮았다(Jansen, et al., 2014, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:1985-1989).

[0284] 2마리의 PXE 마우스를 1주 동안 ENPP1-Fc를 투약하였고, 이를 동물에서 평균 혈장 PPi가 약 4 μ M까지 증가하였다. 이는 포유동물은 본 발명의 폴리펩타이드의 투여가 PPi의 그들 세포의 수준을 상승시켜서 PXE를 치료한다는 것을 의미한다.

[0285] PPi를 상승시키는 폴리펩타이드의 능력은 예상치 못한 것이었는데, 왜냐면 낮은 PPi의 생물학적 기전이 낮은 ATP 농도와 연관된다고 여겨졌기 때문이었다(Jansen, et al., 2013, *PNAS U S A* 110(50):20206-20211). 사실, PXE의 혈장 PPi의 상관성이 질환을 치료하는데 충분하다고 선행 기술에 제안되었었다(Jansen, et al., 2013, *PNAS U S A* 110(50):20206-20211). 본 발명의 시점에 선행 기술을 기반으로, 당업자는 ENPP1 효소는 세포의 공간 내 충분한 기질의 결여로 인하여 PXE 상황에서 PPi를 생성시킬 수 없을 것이라 간주하였다. 본원에서 입증한 바와 같이, 이것은 명확히 그러한 경우가 아니었다.

실시예 2:

[0287] 촉진 식이를 공급 시, ENPP1-asj/asj 마우스의 1일 체중은 ENPP1-asj/asj 마우스가 "성장 장애" 사건을 경험하고 체중이 감량되기 시작한, 26일에 WT 형제쌍에서 벗어났다(도 1A). 26일 이후, ENPP1-asj/asj 동물은 진행성 경직 및 신체 활동의 감소를 나타냈다. 모든 ENPP1-asj/asj 동물이 35일 내지 71일 사이에 폐사하였고, 중앙 수명은 58일이었다(도 1G). ENPP1-asj/asj 및 ENPP1-WT 마우스에서 석회화의 존재는 심장, 대동맥, 및 신장에서 채취한 조직학적 절개부 및 마이크로-CT 스캔을 통해 사후에 평가하였다. 마이크로-CT 영상화를 통해서, ENPP1-asj/asj 마우스의 대략 1/3이 그들의 심장에 가시적인 석회화를 가졌고, 2/3는 그들 대동맥에 가시적인 석회화를 가졌다(표 2). 이를 비율은 조직학적 검사 시에 100%로 증가되었는데, 역시 많은 동물들이 그들 대동맥 벽에 극적으로 거의 주변 석회화를 가졌음이 확인되었다(도 1D-1E). 조직학적 검사는 또한 100%의 관상 동맥이 동맥 벽 석회화를 보유하였고, 70%의 동물이 심근 경색과 일관되는 심근 괴사의 병소 또는 합류 영역을 가졌음을 밝혀주었다(도 1F-1G). 반대로, ENPP1-WT 마우스는 어떠한 이를 비정상성도 보이지 않았다. 이를 발견은 동물 모델이 거대 및 중간 크기 동맥의 두드러진 석회화 및 심장 사망을 특징으로 하는, 인간의 GACI를 재현함을 입증한다.

[0288] 생체 내 용도를 위해, 가용성, 재조합 ENPP1을 생성시키기 위해, ENPP1을 IgG1의 Fc 도메인에 융합시켰고(이하 본원에서 ENPP1-Fc라고 함, 도 2B), 융합 단백질을 안정한 포유동물(HEK293) 세포주에서 발현시켰다. 단백질 발현을 곤충 세포에서 포유동물 세포로 교환하고 ENPP1을 IgG1의 Fc 도메인에 융합시킨 조합 효과는 2자릿수 이상 만큼 ATP 기질에 대한 ENPP1의 친화성을 증가시켜 미카엘리스 멘톤 동역학을 변경시킨 한편, 3-4의 인자만큼 K_{cat} 을 감소시켰다(도 2C-2E). ENPP1-Fc의 활성은 4°C에서 저장시 30일 동안 감소된 것으로 확인되었지만 효소를 -80°C에 냉동시킬 수 있고 해동 시 거의 완전한 활성을 유지할 수 있었다(도 2C). 따라서, 효소는 필요할 때까지 정제 후 냉동 스톡 용액으로서 저장하였다.

[0289] 정제 후, ENPP1-Fc는 Zn 및 Mg(PBS_{plus})가 보충된 PBS에서 투석하여 5 내지 7 mg/mL로 농축시키고, 200-500 μ L의 분취액으로 -80°C에 냉동시켰다. 분취액을 사용 직전에 해동하였고 용액의 비활성은 PBS_{plus}에 희석하여 31.25 au/mL(또는 조제물에 따라서 약 0.7 mg/mL)로 조정하였다.

[0290] 투약은 상이한 단백질 조제물의 비활성의 편차를 설명하기 위한 동물 체중 Kg 당 활성 유닛(au)에 따라 수행하였다. 효소의 비활성은 각 단백질 조제물에 따라 가변적이었고, 임상 반응은 효소 비활성에 고도로 의존적인 것으로 확인되었기 때문에, 비활성이 40 au/mg 미만인 단백질 조제물은 거부하였다. 개념 증명 실험을 위한 초기 투약 수준을 확립하기 위해서, 용량 상승 실험을 제한된 수의 동물(용량 수준 당 1-2마리)에서 수행하였다. 인간과 마우스 버전 ENPP1 둘 모두를 용량 상승 실험에서 사용하였지만, 개념 증명 실험은 ENPP1-Fc의 마우스 이

소폼(*m*ENPP1-Fc)으로 수행하였다. ENPP1-asj/asj 마우스는 생애 14일에 날마다 *m*ENPP1-Fc의 피하 주사 및 매주 GK 1.5의 복강내(I.P.) 주사로 투약하였고, 후자는 재조합 단백질의 면역 거부를 최소화하기 위해 첨가되었다. 500 au/Kg qD인 피하 *m*ENPP1-Fc의 피하 용량은 관찰된 "성장 장애" 위기의 부재에서 체중의 강력한 초기 반응이 미투약된 ENPP1-asj/asj 동물에서 관찰되었음을 입증하였다.

[0291] 용량 상승 실험의 결과를 기반으로, 8마리 NPP1-asj/asj 동물의 코호트는 *m*NPP1-Fc를 500 au/Kg qD로 그리고 GK1.5를 매주 IP 주사로 투약받았다(도 3). 대조군(NPP1-WT + 비히클 및 NPP1-asj/asj + 비히클)은 투약된 코호트와 동일한 방식으로 매주 GK1.5 및 매일 비히클을 투약받았고, 실험 지속기간은 55일로 단축되었다. 모든 8마리의 처리된 ENPP1-asj/asj 동물은 전체 55일 실험에서 생존하였는데, 극적인 임상 반응이 처리에서 관찰된 한편, 미처리 NPP1 asj/asj 동물의 중간 수명이 요법 시도 동안 58일에서 37일로 감소되었는데, 아마도 GK1.5 면역억제의 매주 IP 주사로 인한 듯 하다. 미처리 ENPP1-asj/asj 동물은, 다음 30일 동안 마비 및 폐사까지 가변적으로 진행된 이동성 제한 및 체중 감량을 특징으로 하는, 성장 장애 위기를 26일에 모두 경험하였다. 한마리를 제외한 모든 미처리 ENPP1-asj/asj 동물은 55일 실험 동안 폐사하는 한편, 대조적으로 모든 처리 ENPP1-asj/asj 마우스는 ENPP1-WT 마우스와 비슷하게 체중이 증량되었고 감소된 이동성 또는 경직의 징후를 보이지 않았다.

[0292] 실험의 결론으로, 비히클을 처리한 100%의 ENPP1-asj/asj 마우스는 그들의 심장, 대동맥 및 관상 동맥에 석회화를 나타내었고, 77%의 동물은 심근 경색의 조직학적 증거를 보였다(표 1). 대부분의 경우에서, 이는 심근 세포괴사의 소영역 형태를 취하고 심장 석회화의 근처에 떨어져 나갔지만(도 3C-3D, 도 4C-4E), 2마리 동물(22%)에서, 우심실의 자유벽에 거대하고, 완전한 두께의 심근 경색이 존재하였다(도 4C-4D). 관상 동맥 석회화에 인접한 심근 조직의 심근 섬유화가 공통 발견(도 4E)으로서, 관상 동맥 석회화에 의한 허혈이 아마도 심근 질환의 이유라는 것을 예시한다. 대조적으로, ENPP1-Fc로 처리된 어떠한 ENPP1-asj/asj 동물도 조직학 또는 사후 마이크로-CT 상에서 심장, 동맥 또는 대동맥 석회화를 보이지 않았다(표 1, 및 도 3D 및 4D).

[0293] I생존, 1일 동물 체중, 및 말기 조직학이외에도, 처리 반응은 또한 혈관 석회화, 혈장 [PPi] 농도, 및 Tc99m PPi(^{99m}PYP) 흡수를 영상화하기 위해 사후 고해상 마이크로-CT 스캔을 통해 평가하였다(도 5 및 표 1). 생물학적 및 생리학적 반응은 이를 모든 매개변수로 측정시 완벽하였다. WT 또는 처리 ENPP1-asj/asj 동물은 미처리 ENPP1-asj/asj 코호트(도 5A)의 대동맥, 관상 동맥, 및 심장에서 보여진 극적인 석회화와 대조적으로, 마이크로-CT를 통해 어떠한 혈관 석회화도 보유하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 처리된 ENPP1-asj/asj 동물의 혈청 PPi 농도는 WT 동물보다 상승되었고(처리된 ENPP1-asj/asj에서 약 30 μ M 대 WT에서 약 10 μ M), 역시 미처리 ENPP1-asj/asj 수준(< 0.5 μ M)보다 상승되었다(도 5B). 또한, 처리된 ENPP1-asj/asj 동물의 혈청 PPi 농도(약 30 μ M)는 미처리 ENPP1-asj/asj 수준(< 0.5 μ M)보다 충분히 상승되었고, WT 동물(약 10 μ M)보다도 상승되었다(도 5B).

[0294] 심장 영상화 및 뼈 리모델링에 전형적으로 적용되는 조영제인, ^{99m}PYP를 치료 반응의 마커로서 사용하였는데, 기능성 ENPP1이 결여된 동물에서 ^{99m}PYP 흡수는, 그들이 혈장 [PPi]를 감소시키고 이소성 무기물화 부위에서 보다 '개방성' PPi 결합 부위를 가질 것으로 예상되므로, 증가할 것이라고 예상되었기 때문이다. 이러한 가설을 시험하기 위해서, 생체내 ^{99m}PYP 영상화를 ENPP1-WT 및 미투약된 ENPP1-asj/asj 동물에서 매주 수행하여 형제쌍 사이의 PYP의 차이를 검출하였다(도 5C-5D). ^{99m}PYP 흡수의 분석은 이 GACI의 마우스 모델에서 이소성 석회화의 기저부위인, 연골내뼈(두개골) 및 연조직(비모)으로 구성된, 머리로 제한하였다. 또한, 데이터 수집 동안 일어나는 180° 카메라 회전 동안 일시적인 ^{99m}PYP 흡수를 보이는 내부 장기(예컨대 방광, 심장, 및 횡경막)와 머리는 중복되지 않기 때문에, 데이터 수집을 단순화하기 위해 머리로 분석을 제한하였다.

[0295] ENPP1-WT 및 미처리 ENPP1-asj/asj 동물의 매주 연속 영상화는 두개골 내 ^{99m}PYP의 주사된 용량의 흡수율이 ENPP1-asj/asj 동물에서 ENPP1-WT 동물보다 더 컸고 실험군 내에서 ^{99m}PYP 흡수의 변화는 실험 과정동안 유의하게 변화되지 않았음을 입증해 주었다(도 5C-5D). 처리 및 미처리 ENPP1-asj/asj 동물에서 ^{99m}PYP 흡수는 2개 시점-30-35일 및 실험 종료(50-65일)에 비교하였다. 이를 실험군의 비교는 ENPP1-Fc 처리가 GACI 마우스의 ^{99m}PYP 흡수를 WT 수준으로 복귀시킬 수 있다는 것을 입증하여(도 5E-5F), ENPP1-Fc 처리가 아마도 요법제에 의해 유도된 높은 혈장 PPi 농도에서 유래하는, '콜드' PPi로 개방 PPi 결합 부위를 포화시켜 ENPP1-asj/asj 마우스에서 비조절된 조직 및 두개골 무기물화를 저지시킬 수 있다는 것을 시사한다.

표 1

| 표 1: 심혈관 병리학, 개념 증명 실험 | WT+비히클 | asj/asj+비히클 | asj/asj+mENPP1-Fc |
|------------------------|--------|-------------|-------------------|
| 석회화 심장(CT/조직학) | 0/0 | 55%/100% | 0/0 |
| 석회화 대동맥(CT/조직학) | 0/0 | 66%/100% | 0/0 |
| 관상 동맥의 석회화(CT/조직학) | 0/0 | 43%/100% | 0/0 |
| 심근 경색%(조직학) | 0/0 | 77% | 0 |

표 2

| 표 2: 심혈관 병리학, 자연사 실험 | WT | asj/asj |
|----------------------|-----|-----------|
| 심장의 석회화%(CT/조직학) | 0/0 | 37%/100% |
| 대동맥의 석회화(CT/조직학) | 0/0 | 62%/ 100% |
| 관상 동맥의 석회화(조직학) | 0/0 | 100% |
| 심근 경색%(조직학) | 0 | 70% |

0298] 실시예 3: 알부민 융합 단백질의 발현

585개 아미노산 단백질인, 인간 혈청 알부민(HSA)은 혈청의 삼투압의 상당 부분을 담당하고 또한 내생성 및 외생성 리간드의 담체로서 기능한다. 현재, 임상 용도를 위한 HSA가 인간 혈액으로부터 추출에 의해 생성된다. 미생물에서 재조합 HSA(rHSA)의 생성은 EP 0 330 451 및 EP 0 361 991에 개시되어 있다.

담체 분자로서 알부민의 역할 및 이의 불활성 성질은 폴리펩타이드의 수송체 및 안정화제로서 사용을 위한 바람직한 특성이다. 다른 단백질을 안정화시키기 위한 융합 단백질의 성분으로서 알부민의 용도는 WO 93/15199, WO 93/15200, 및 EP 0 413 622에 개시되어 있다. 폴리펩타이드에 융합을 위한 HSA의 N 말단 단편의 용도가 또한 개시되어 있다(EP 0 399 666). 폴리펩타이드와의 융합은 유전자 조작으로 획득되는데, HSA, 또는 이의 단편을 코딩하는 DNA를 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA에 연결시킨다. 다음으로 융합 폴리펩타이드를 발현하도록 적합한 플라스미드 상에 배열시킨, 융합된 뉴클레오파이드 서열로 적합한 숙주를 형질전환 또는 형질감염시킨다. 문헌 [Nomura, et al., 1995, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(3):532-4]은 분비를 지시하도록 HSA 프리-서열을 사용하여, HSA 또는 HSA의 단편과의 융합 단백질로서 인간 아포리포단백질 E를 에스. 세레비지아(*S. cerevisiae*)에서 발현시키고자 시도하였다. 전체 길이 HSA와의 융합은 배지로 낮은 수준의 단백질 분비를 유발하지만(리터 당 6.3 mg의 최대 수율), HSA(1-198) 또는 HSA(1-390)와의 융합은 배지로 분비를 유발시키지 않았다.

인간 혈청 알부민은 정상 HSA(이하 본원에서 "HSA"라고 함)의 변이체일 수 있다. 본원에서 사용시, "변이체"는 보존성이거나 또는 비보존성이, 치환, 결실 및 삽입을 포함할 수 있고, 여기서 그러한 변화는 알부민의 1 이상의 종양성의, 유용한 리간드-결합 및 비면역원성 특성을 실질적으로 변화시키지 않는다. 구체적으로, "변이체"는 인간 알부민 및 인간 알부민의 단편의 천연 발생 다형성 변이체, 예를 들어 EP 0 322 094에 개시된 단편들(즉 HA(1-n), 여기서 n은 369 내지 419임)를 포함한다. 알부민 또는 성장 호르몬(GH)은 임의의 척추동물, 특히 임의의 포유동물, 예를 들어 인간, 소, 양, 돼지, 닭 또는 연어에서 유래될 수 있다. 알부민 및 융합물의 GH 부분은 상이한 동물에서 유래될 수 있다.

"보존성 치환"은 Gly/Ala; Val/Ile/Leu; Asp/Glu; Asn/Gln; Ser/Thr; Lys/Arg; 및 Phe/Tyr와 같은 군 내에서 교환을 의도한다. 당분야에서 통상적인 결실 및 삽입이 허용되면, 변이체는 변이체와 동일한 길이이고 정상 HSA의 임의의 다른 길이보다 이와 더 동일한 정상 hSA의 길이와 적어도 75%(예컨대 적어도 80%, 90%, 95% or 99%) 서열 동일성을 갖는다. 일반적으로, HSA 변이체는 적어도 100개 아미노산 길이, 일부 실시형태에서 적어도 150개 아미노산 길이이다. HSA 변이체는 HSA의 적어도 하나의 전체 도메인, 예를 들어 도메인 1(1-194), 2(195-387), 3(388-585), 1+2(1-387), 2+3(195-585) 또는 1+3(1-194, +388-585)으로 이루어질 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 각각의 도메인은 그 자체가 2종의 상동성 서브도메인 즉 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 및 512-585로 구성될 수 있고, 잔기 Lys106 내지 Glu199, Glu292 내지 Val315 및 Glu492 내지 Ala511을 포함하는 탄성 서브도메인내 링커 영역을 갖는다. 일부 실시형태에서, NPP1 융합물의 HSA 부분은 HA 또는 이의 보존성 변형물의 적어도 하나의 서브도메인 또는 도메인을 포함한다.

- [0303] 박테리아(예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 사상 진균(예를 들어, 아스페질러스(*Aspergillus*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함해, 많은 발현 시스템이 공지되어 있다.
- [0304] 바람직한 단백질은 통상의 방식으로, 예를 들어 숙주 염색체 또는 자유 플라스미드에 삽입된 코딩 서열로부터 생성될 수 있다.
- [0305] 효모는 임의의 일반적인 방식, 예를 들어 전기천공으로 바람직한 서열에 대한 코딩 서열로 형질전환될 수 있다. 전기천공에 의해 효모의 형질전환을 위한 방법은 문헌 [Becker & Guarente, 1990, Methods Enzymol. 194:182]에 개시되어 있다. 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 구성체를 함유하는 세포는 잘 알려진 기술을 통해 동정될 수 있다. 예를 들어, 발현 구성체의 도입으로 생성된 세포는 바람직한 폴리펩타이드를 생성시키도록 성장될 수 있다. 세포를 회수하고 용해시켜 그들의 DNA 내용물을 예컨대 문헌 [Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503] 및/또는 문헌 [Berent, et al., 1985, Biotech 3:208]에 기술된 바와 같은, 방법을 사용해 DNA의 존재에 대해 조사할 수 있다. 대안적으로, 상등액에 단백질의 존재를 항체를 사용해 검출할 수 있다.
- [0306] 유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403-406 및 pRS413-416을 포함하고, 일반적으로 미국, 캘리포니아, 라 졸라 소재의 스트라타진 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems)에서 입수할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 통합 플라스미드(YIps)이고 효모 선별 마커 HIS3, TRP1, LEU2 및 URA3을 도입한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 동원체 플라스미드(YCps)이다.
- [0307] 다양한 방법이 상보적 결합성 말단을 통해 벡터에 DNA를 작동적으로 연결하도록 개발되었다. 예를 들어, 상보성 동종중합체 부분을 벡터 DNA에 삽입되도록 DNA 절편에 첨가할 수 있다. 이후 벡터와 DNA 절편은 상보성 동종중합체 꼬리부 사이의 수소 결합을 통해 연결되어 재조합 DNA 분자를 형성시킨다.
- [0308] 1 이상의 제한효소 부위를 함유하는 합성 링커는 벡터에 DNA 절편을 연결시키는 대안적인 방법을 제공한다. 엔도뉴클레아제 제한효소 분해에 의해 생성된 DNA 절편은, 그들의 3'-5'-외부핵산분해성 활성으로 돌출된, 3'-단일 가닥 말단을 제거하고, 그들의 중합반응 활성으로 오목한 3'-말단을 채우는 효소인, 박테리오파지 T4 DNA 중합효소 또는 이.콜라이 DNA 중합효소 I로 처리된다.
- [0309] 따라서, 이들 활성의 조합은 둥툭한 말단 DNA 절편을 생성시킨다. 둥툭한 말단 절편을 이어서 박테리오파지 T4 DNA 리가제와 같은, 둥툭한 말단 DNA 분자의 결찰을 촉매할 수 있는 효소 존재 하에서 대량의 과잉 몰량의 링커 분자와 항온반응시킨다. 따라서, 반응 생성물은 그들 말단에 중합성 링커 서열을 보유하는 DNA 절편이다. 이들 DNA 절편을 적절한 제한효소로 절단시키고 DNA 절편의 것과 상용성인 말단을 생성시키는 효소로 절단시킨 발현 벡터에 결찰시킨다.
- [0310] 다양한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 함유하는 합성 링커는 미국, 코네티컷주, 뉴 헤이븐 소재의 인터내셔널 바이오텍크놀로지스 인코포레이티드(International Biotechnologies Inc)를 포함한 많은 공급처에서 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0311] 본 발명에 따라 DNA를 변형시키는 다양한 방식은, 만약, 예를 들어 HA 변이체를 제조하고자 하면, 문헌 [Saiki, et al., 1988, Science 239:487-491]에 개시된 바와 같은 중합효소 연쇄 반응을 사용하는 것이다. 이 방법에서, 효소적으로 증폭되는 DNA는 그들 자신이 증폭된 DNA에 도입되는 2개의 특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 측정된다. 특이적 프라이머는 당분야에 공지된 방법을 사용해 발현 벡터에 클로닝을 위해 사용할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 함유할 수 있다.
- [0312] **ENPP1-ALB 디자인:**
- [0313] 가용성, 재조합 단백질을 발현하도록 변형된, 변형된, 인간 및 마우스 NPP1(인간: NCBI 수탁번호 NP_006199; 마우스: NCBI 수탁번호 NP_03839)는 각각 pFUSE 플라스미드(InvivoGen, San Diego CA)로 서브클로닝하여 인간 혈청 알부민(HSA)에 융합되었다.
- [0314] **단백질 생성:**
- [0315] 진탕 플라스크: ENPP1-ALB의 안정한 형질전환을 제오신 선별 하에 HEK293 세포에서 확립시키고, 부착된 HEK293 세포를 혼탁 성장에 적합화시킬 수 있었다. 적합화된 세포를 사용하여 고습도로 120 rpm에서 교반하면서, 37°C 및 5% CO₂에서, 진탕 플라스크 내 프리스타일 배지(Gibco #12338-018) 중에 액체 배양 성장물을 접종하였다. 배

양물을 서서히 원하는 표적 부피로 확장시킨 후 추가 12일 동안 유지시켜 세포와 단백질을 축적시켰다. 유지기 동안, 배양물은 단백질 생성을 강화시키기 위해 CD 이피션트피드 C AGT(Gibco #A13275-05)가 보충되었다.

[0316] **생물반응기:** 세포를 용존 산소 및 pH 제어기가 장착된 10 리터 생물반응기에서 증식시켰다. 용존 산소는 80 RPM의 고반 속도에서 분당 3리터를 넘지 않는 산소 및 공기의 혼합물을 배양물에 공급하여 40% 공기 포화도를 유지시켰다. pH는 pH가 7.4보다 높아졌을 때 CO_2 를 살포하여 7.4로 제어하였다. 배양물 성장을 세포 수, 세포 생존능, 포도당 및 락테이트 농도를 측정하는 것이 후속되었다.

단백질 정제:

[0318] 액체 배양물을 4300 x g에서 15분간 원심분리하였고 상등액을 $0.2 \mu\text{m}$ 막을 통해 여과시키고 펠리콘3 0.11 m^2 올트라셀 30 kD 카세트(Millipore, Billerica MA)를 사용한 접선 유동을 통해 농축시켰다. 농축된 상등액을 단백질-AG 컬럼 상에 적재하였고 50 mM 시트르산나트륨, 150 mM NaCl, 3 mM ZnCl₂, 3 mM CaCl₂, pH=3.5을 포함하는 완충액으로 용리시킬 수 있었다. 효소 활성을 함유하는 분획은 1X PBS 완충액 pH 7.4, 11 μM ZnCl₂, 20 μM CaCl₂, 에 대해 투석시킨 후 6 mg/mL로 농축시키고 소량의 분획액으로 분배하여 -80°C에 저장하였다.

[0319] 최종 단백질 샘플은 모두 내독소가 없는 것을 입증하기 위해 피어스 LAL 발색성 내독소 정량 키트(cat. 88282)로 시험하였다.

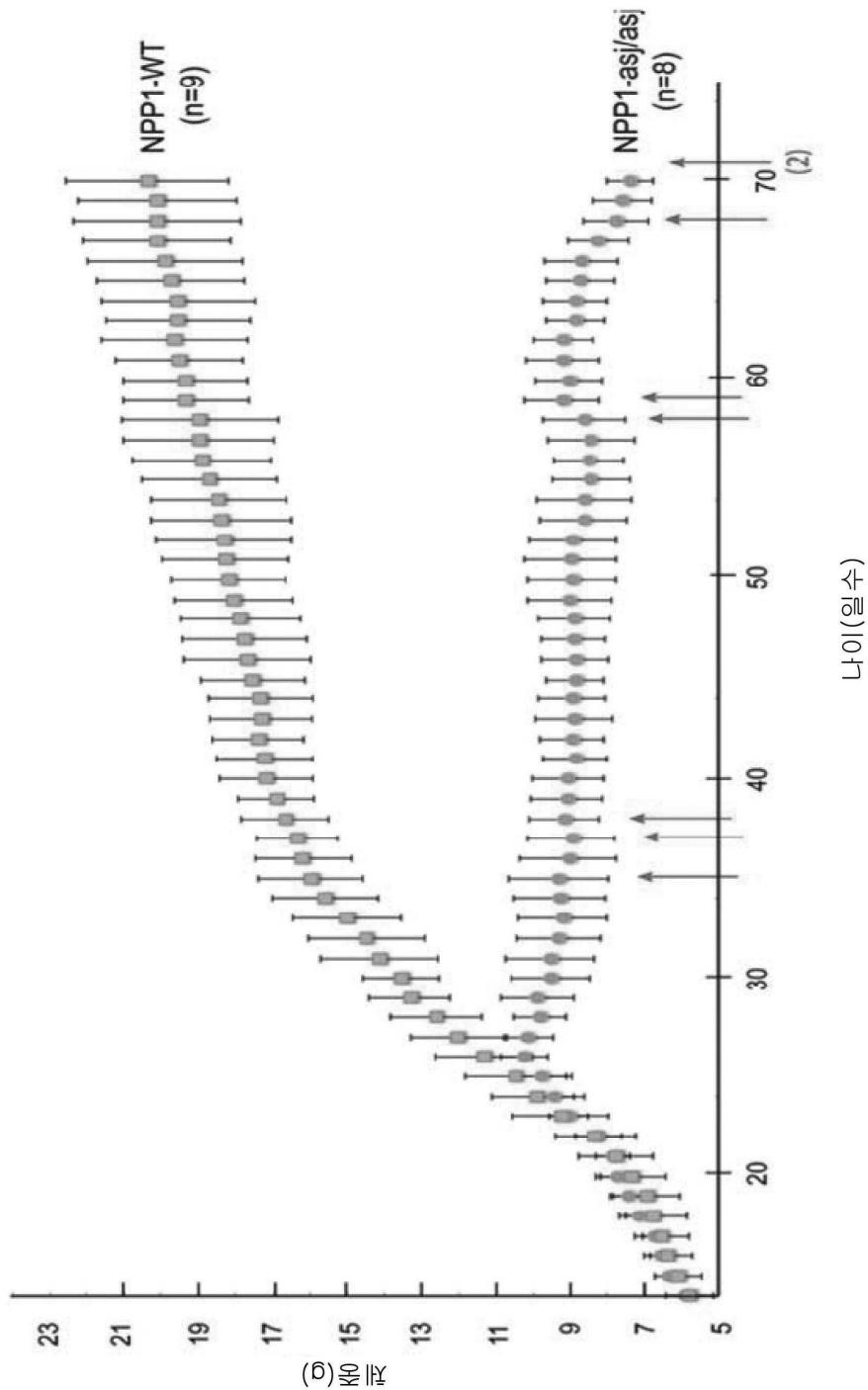
효소학

[0321] 정제 후 NPP1-알부민 융합 단백질은 본원의 다른 곳에 기술된, 실시예 1 및 2에 설명된 실험 프로토콜에 따라 특징규명되었다.

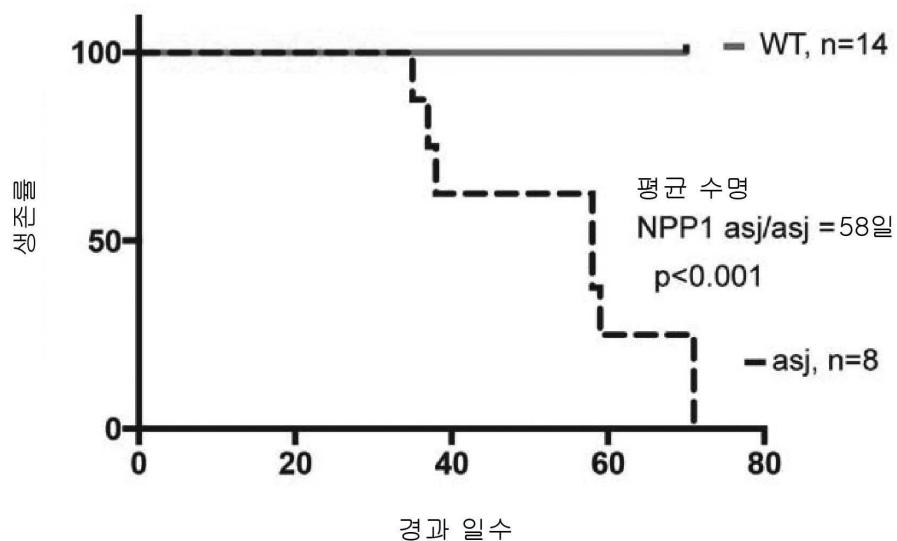
[0322] 본원에 인용된 각각의 모든 특허, 특히 출원, 및 출판물의 내용은 그들 전체로 참조로 본원에 편입된다. 본 발명의 특정 실시형태를 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 실시형태 및 변이가 본 발명의 진정한 정신 및 범주를 벗어나지 않고 당업자에 의해 고안될 수 있음을 분명하다. 첨부된 청구항은 그러한 모든 실시형태 및 가능한 변이를 포함하는 것으로 해석하고자 한다.

도면

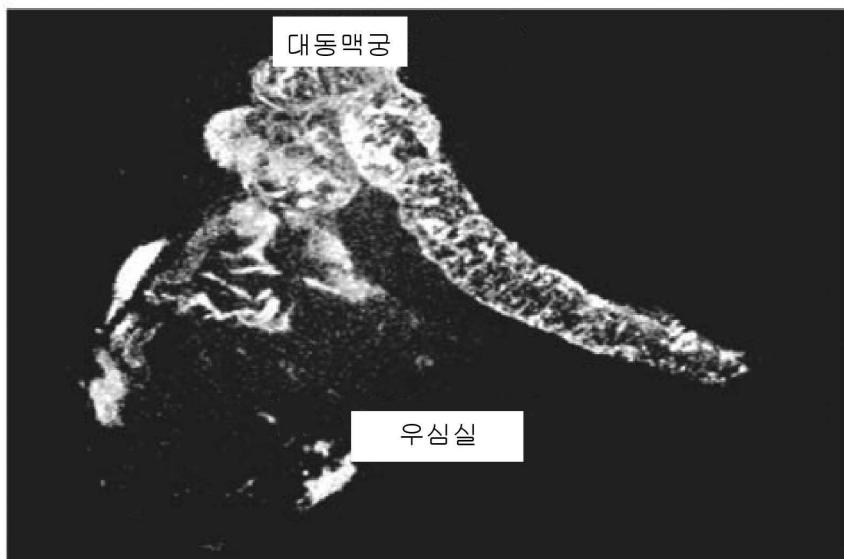
도면 1a



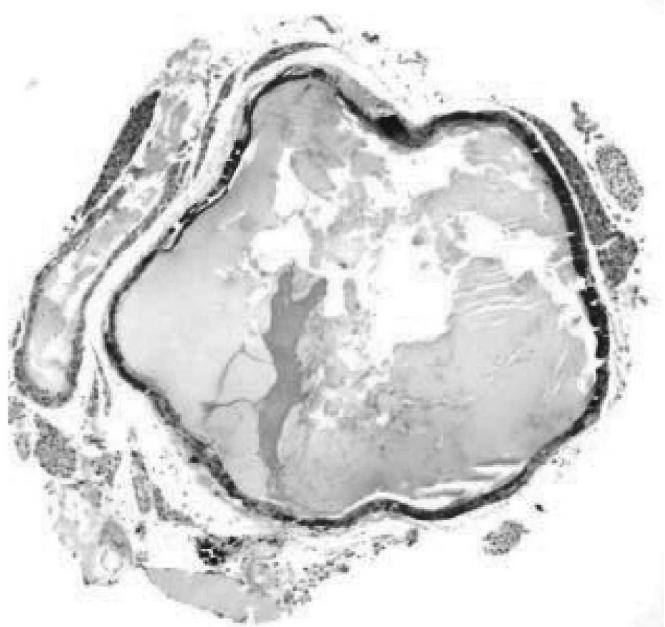
도면 1b



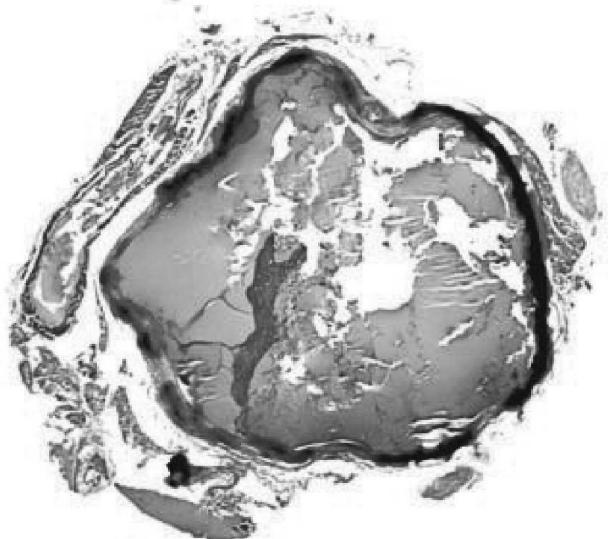
도면 1c



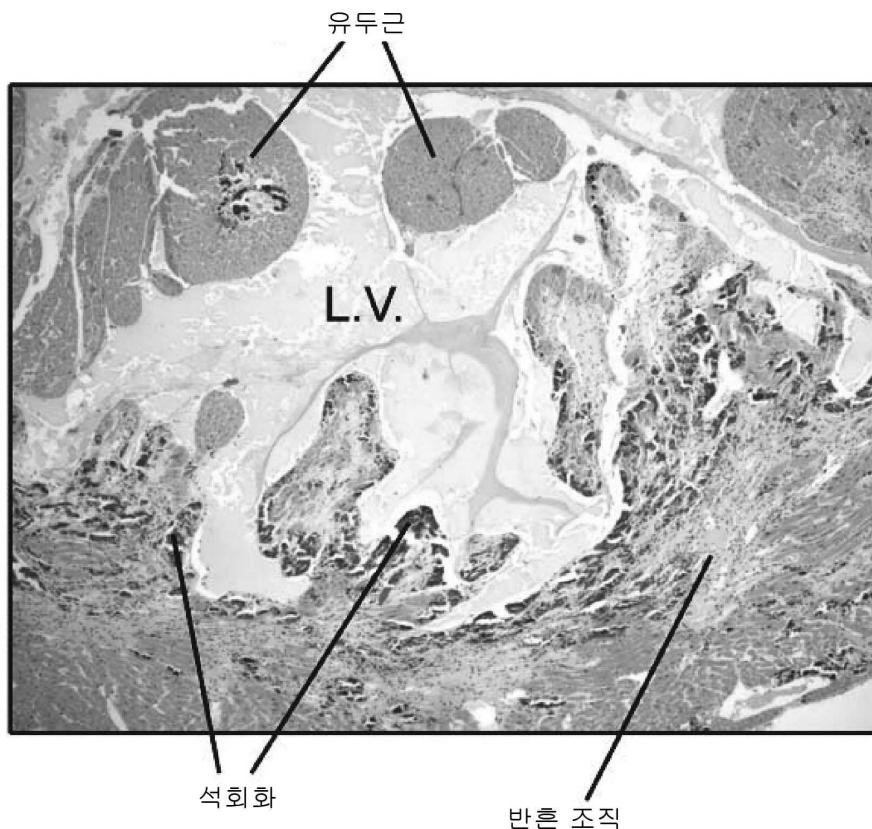
도면 1d



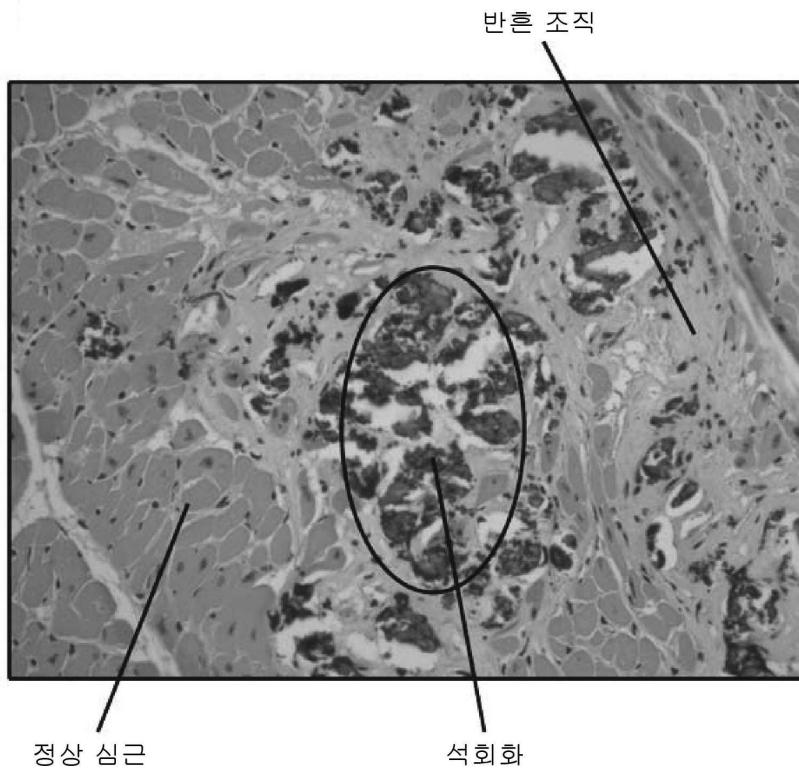
도면 1e



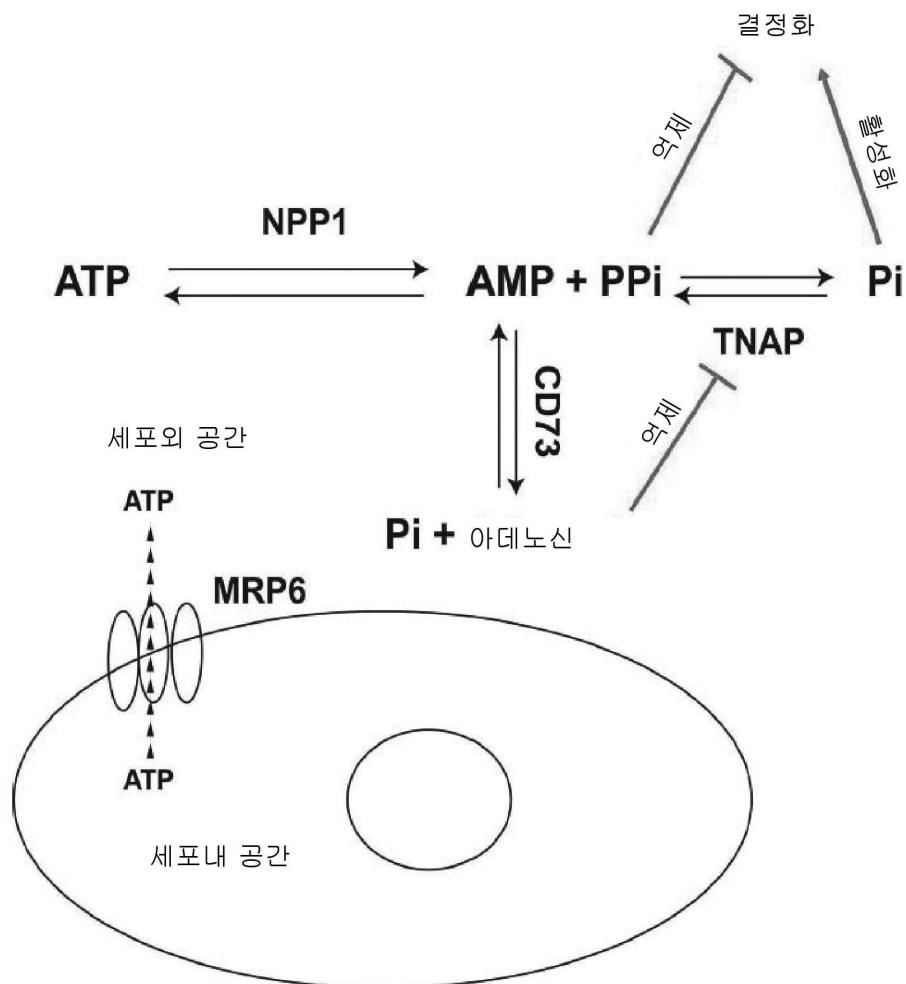
도면 1f



도면 1g



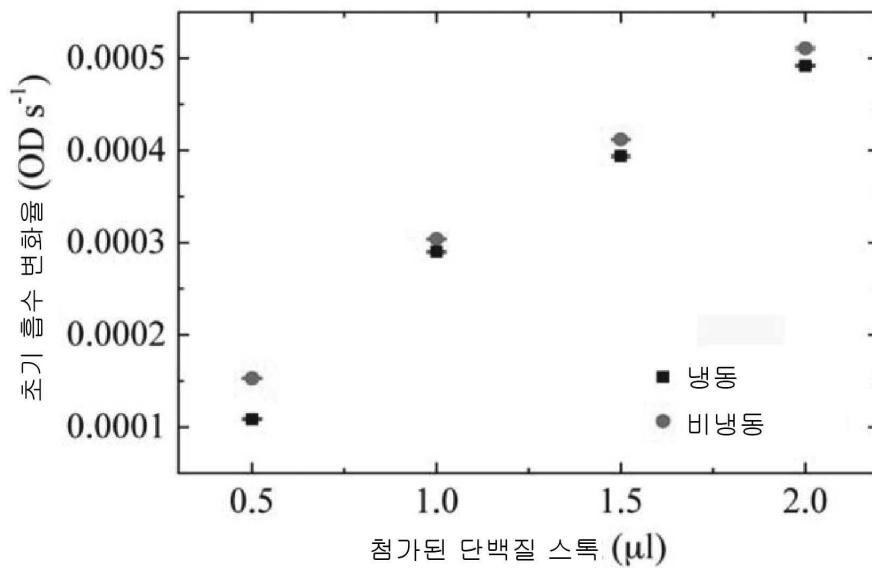
도면2a



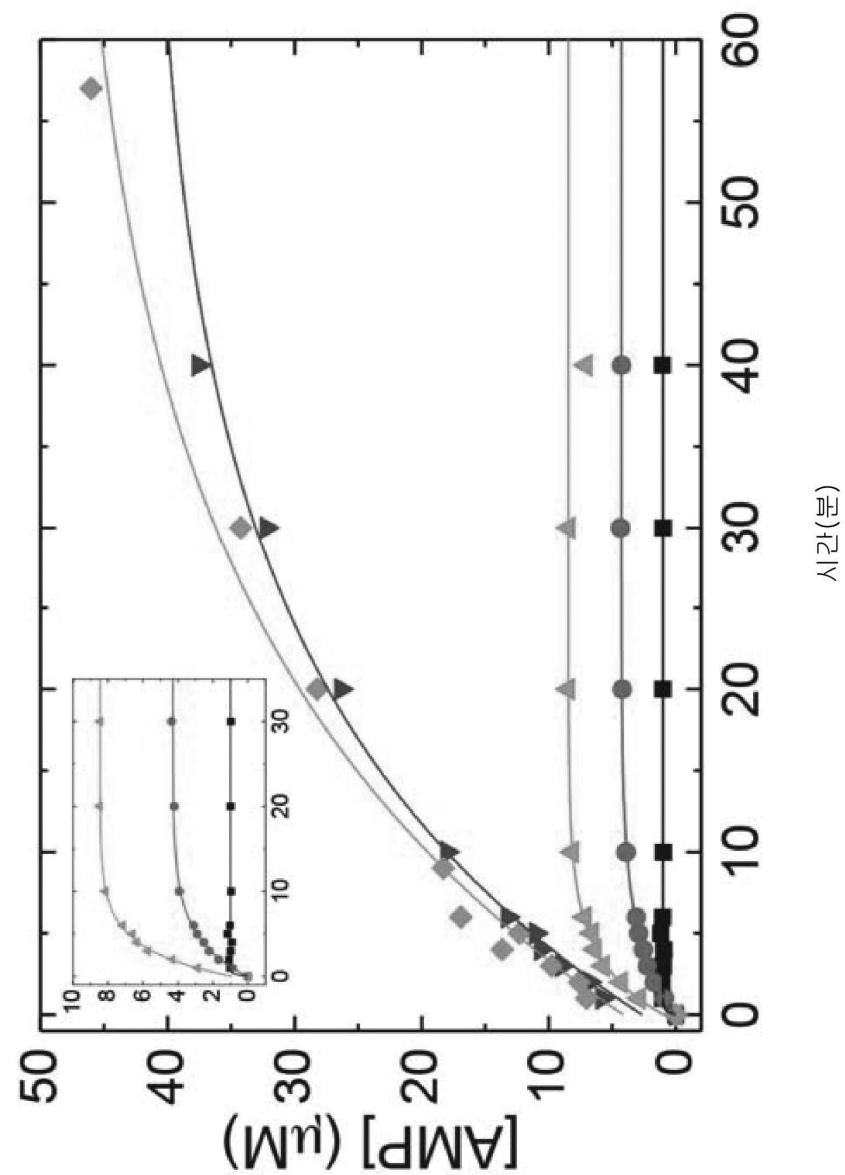
도면2b



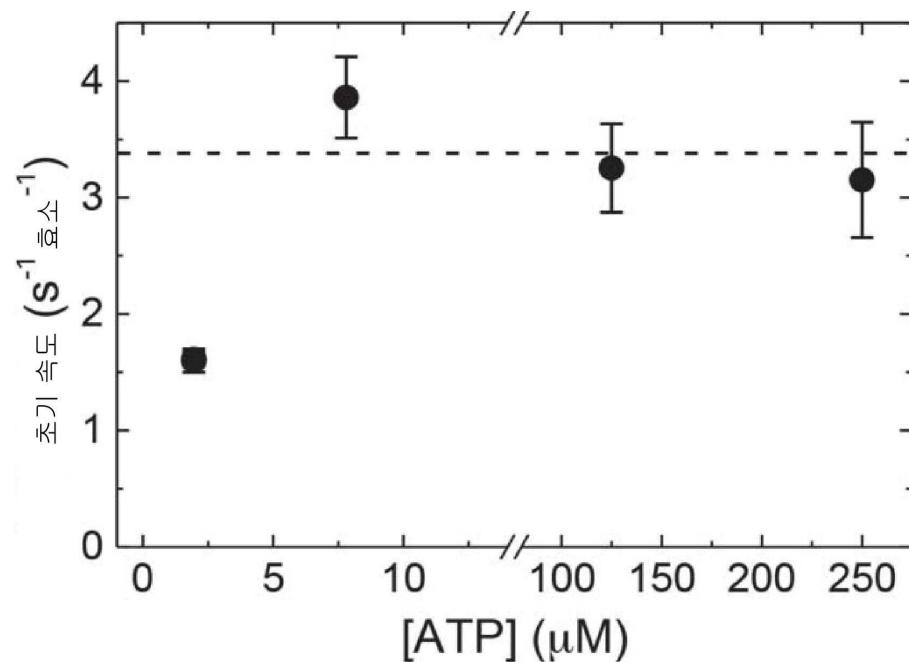
도면2c



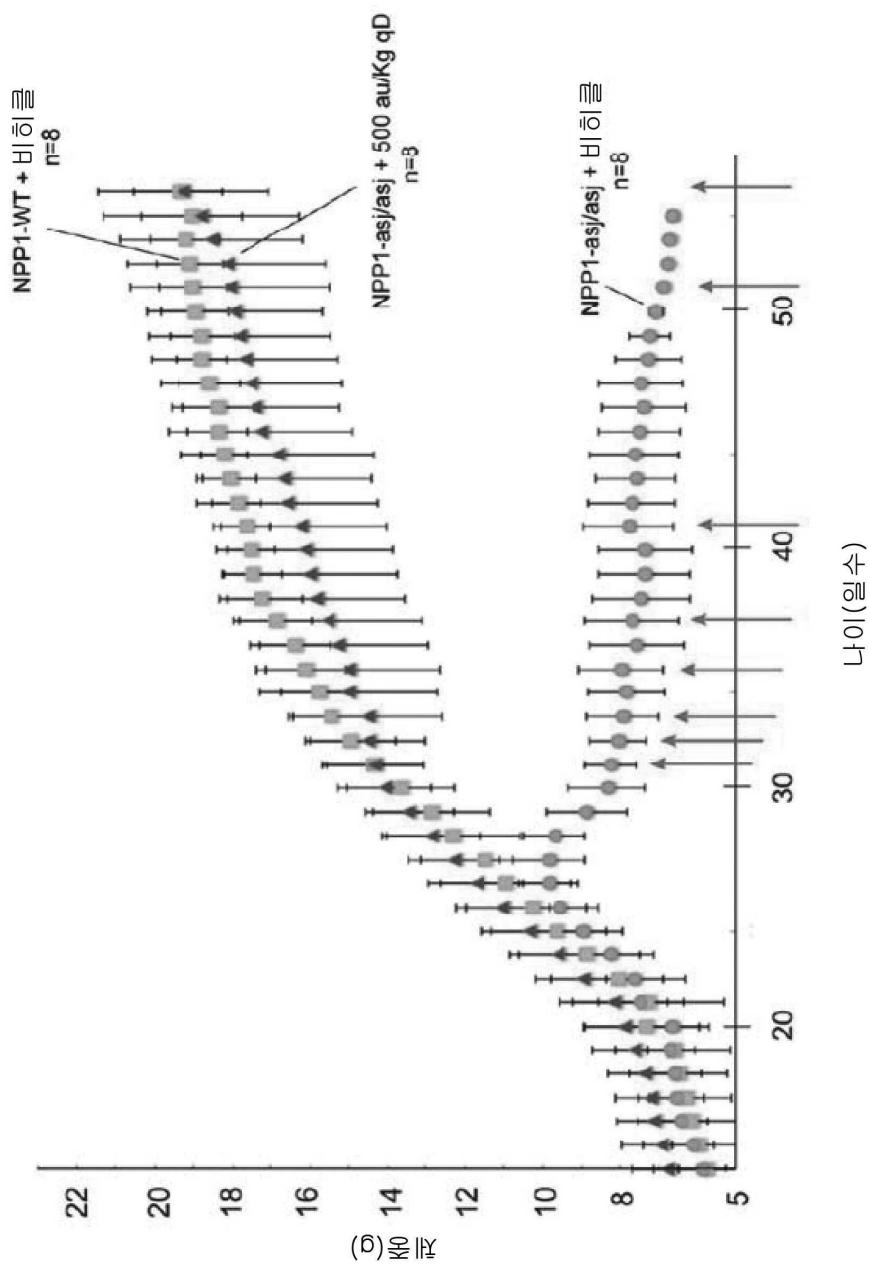
도면 2d



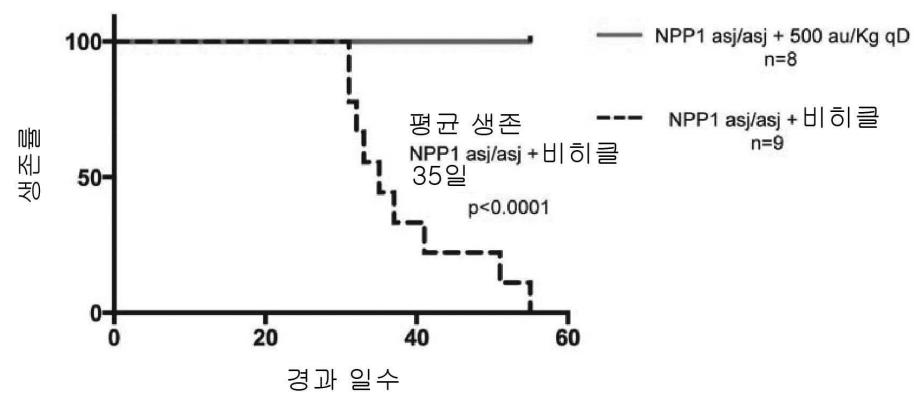
도면2e



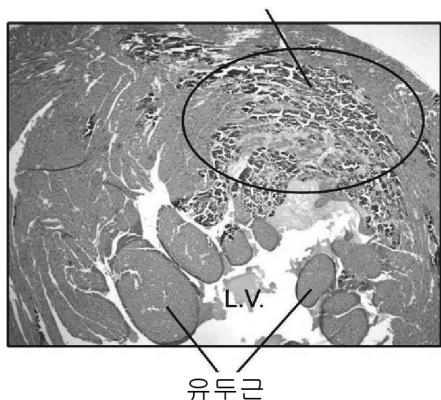
도면3a



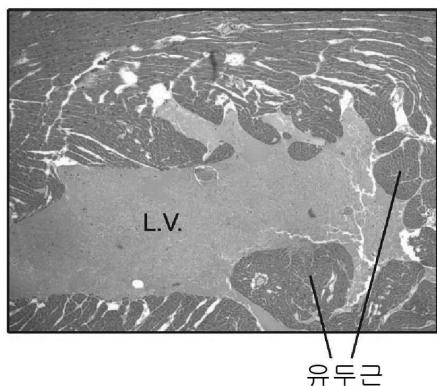
도면3b



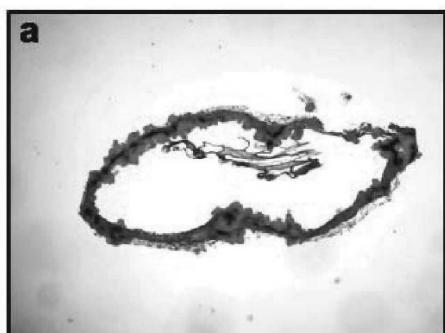
도면3c



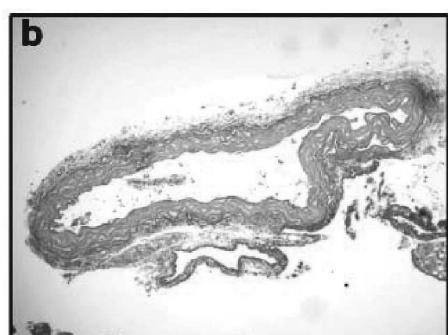
도면3d



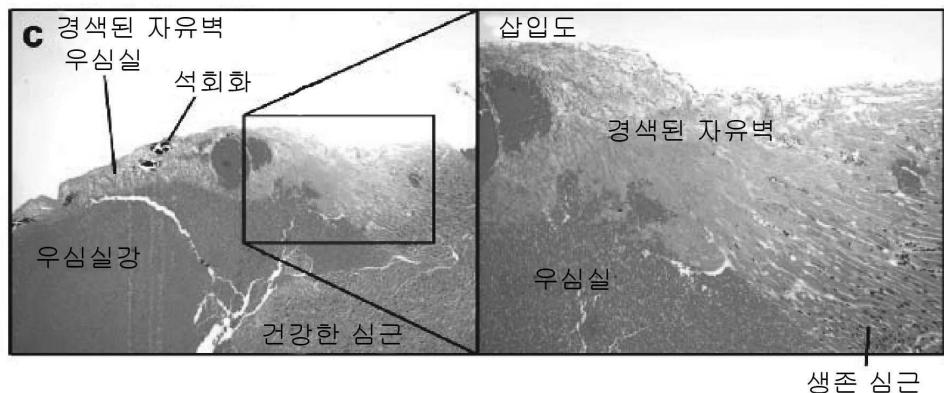
도면4a



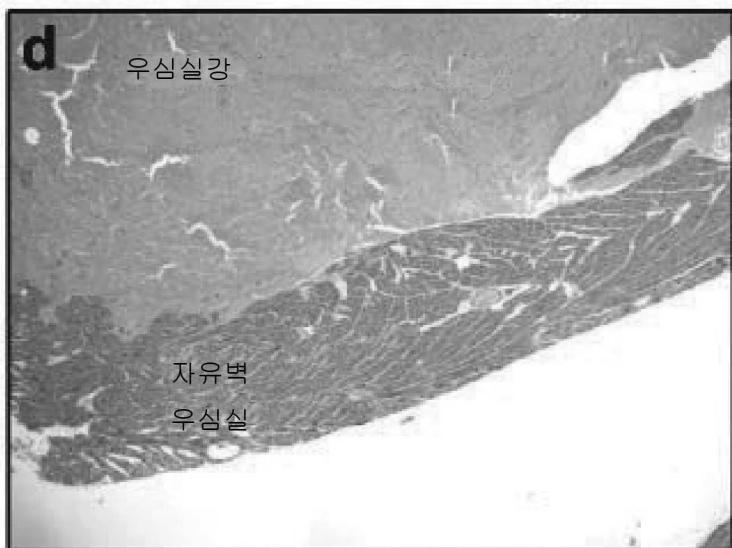
도면4b



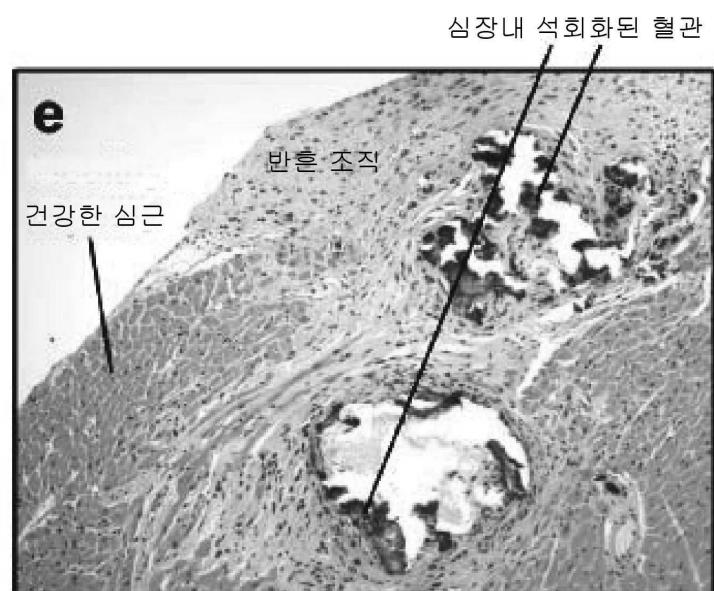
도면4c



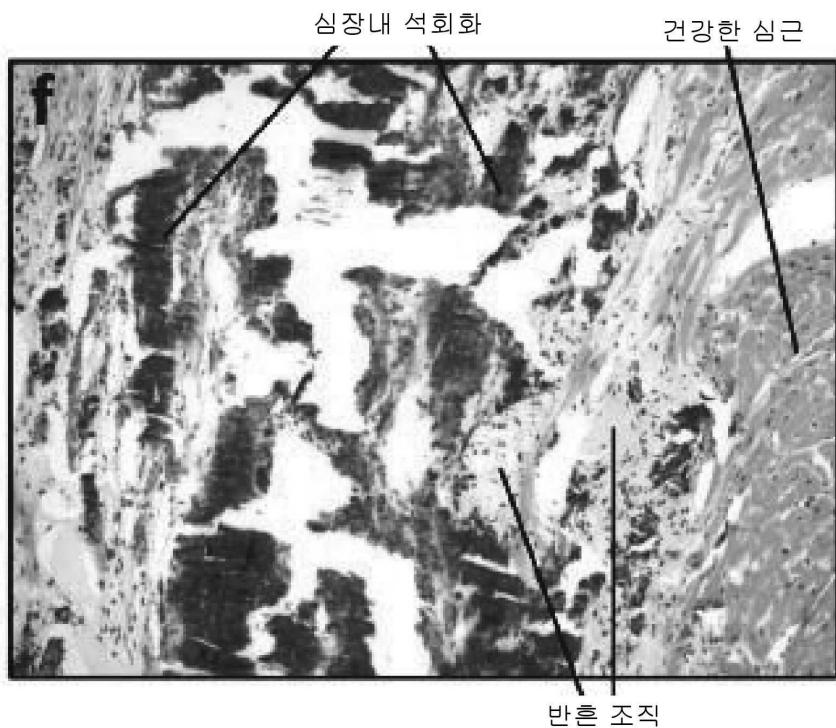
도면4d



도면4e

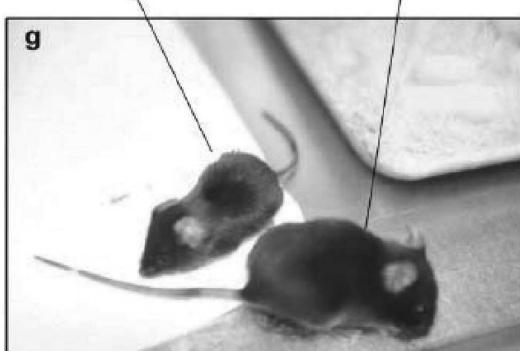


도면4f

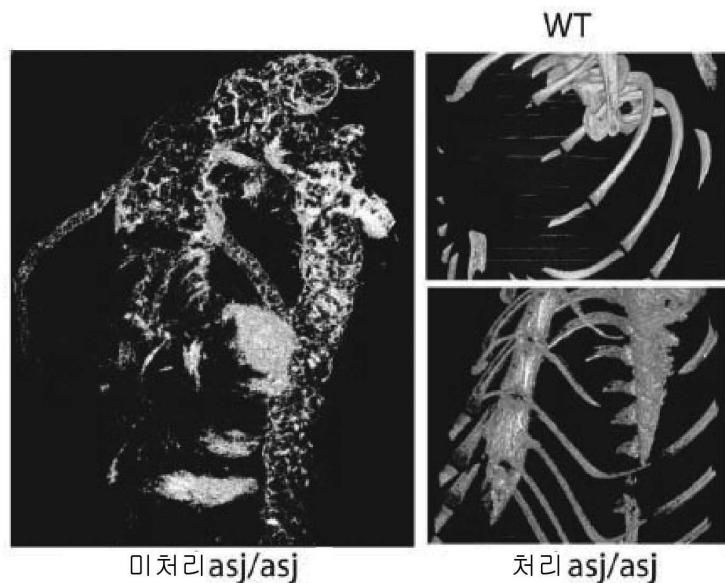


도면4g

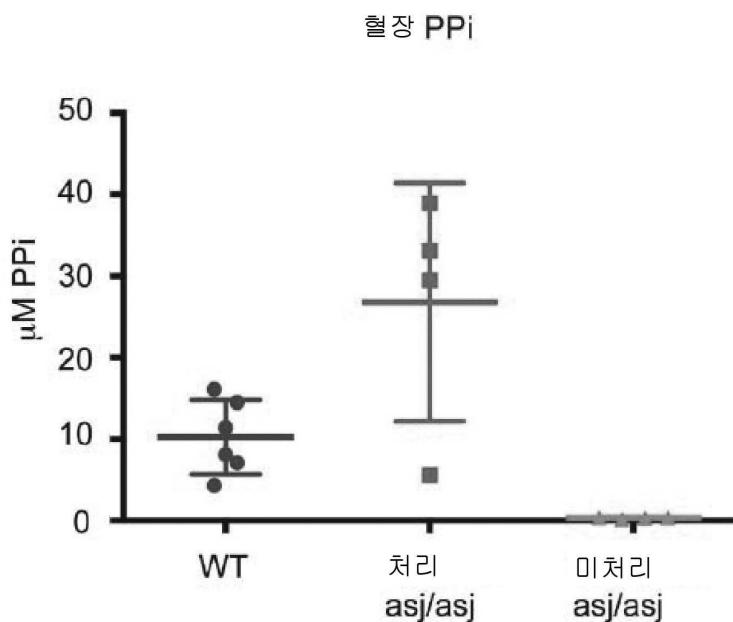
NPP1-asj/asj 미처리 NPP1-asj/asj 처리



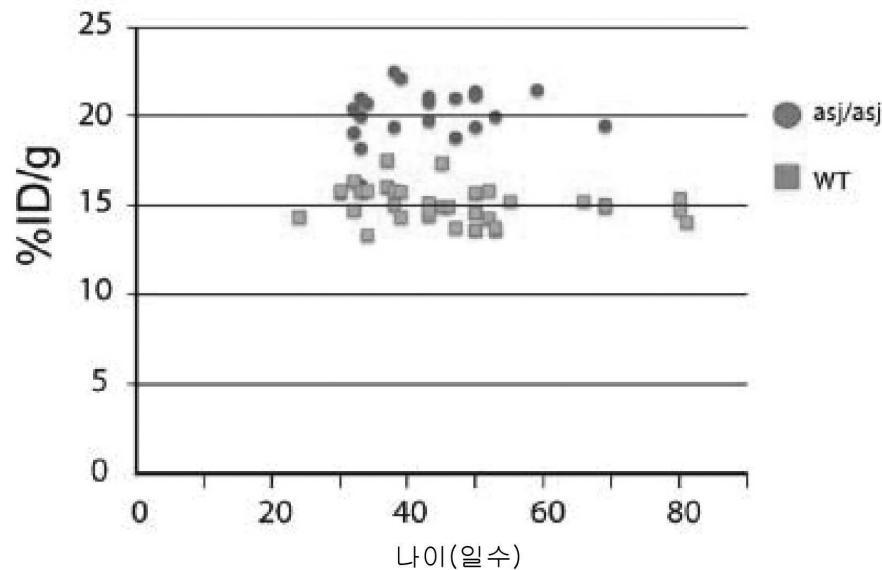
도면5a



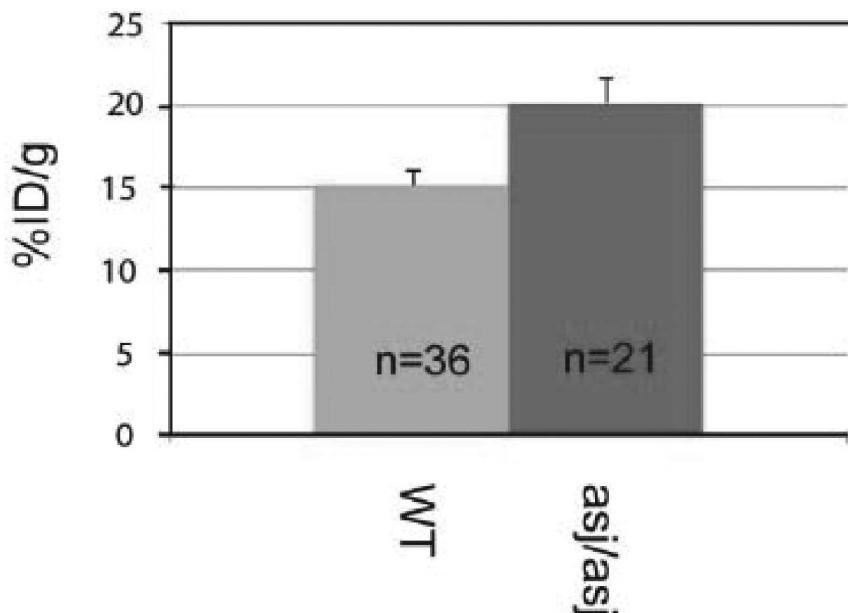
도면5b



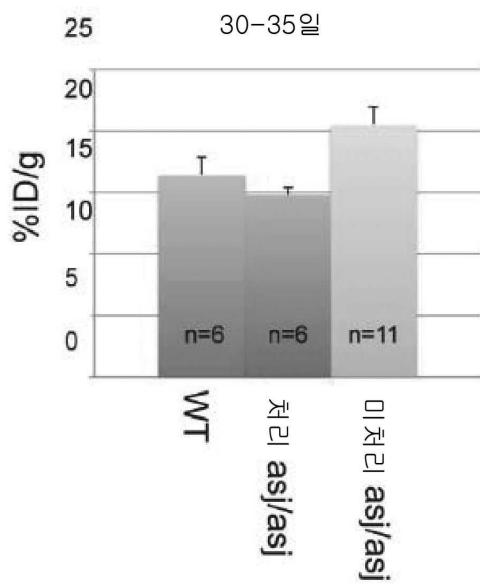
도면5c



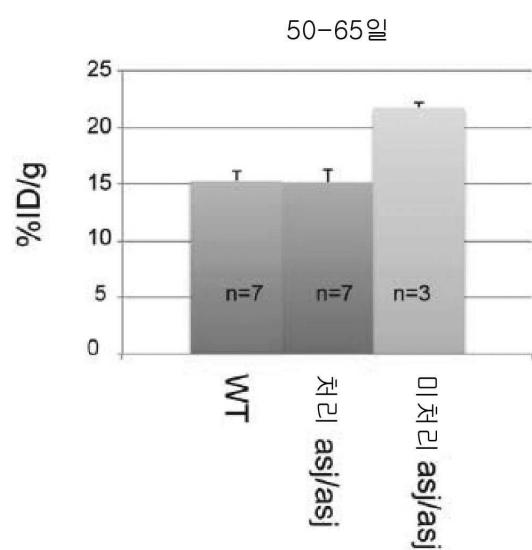
도면5d



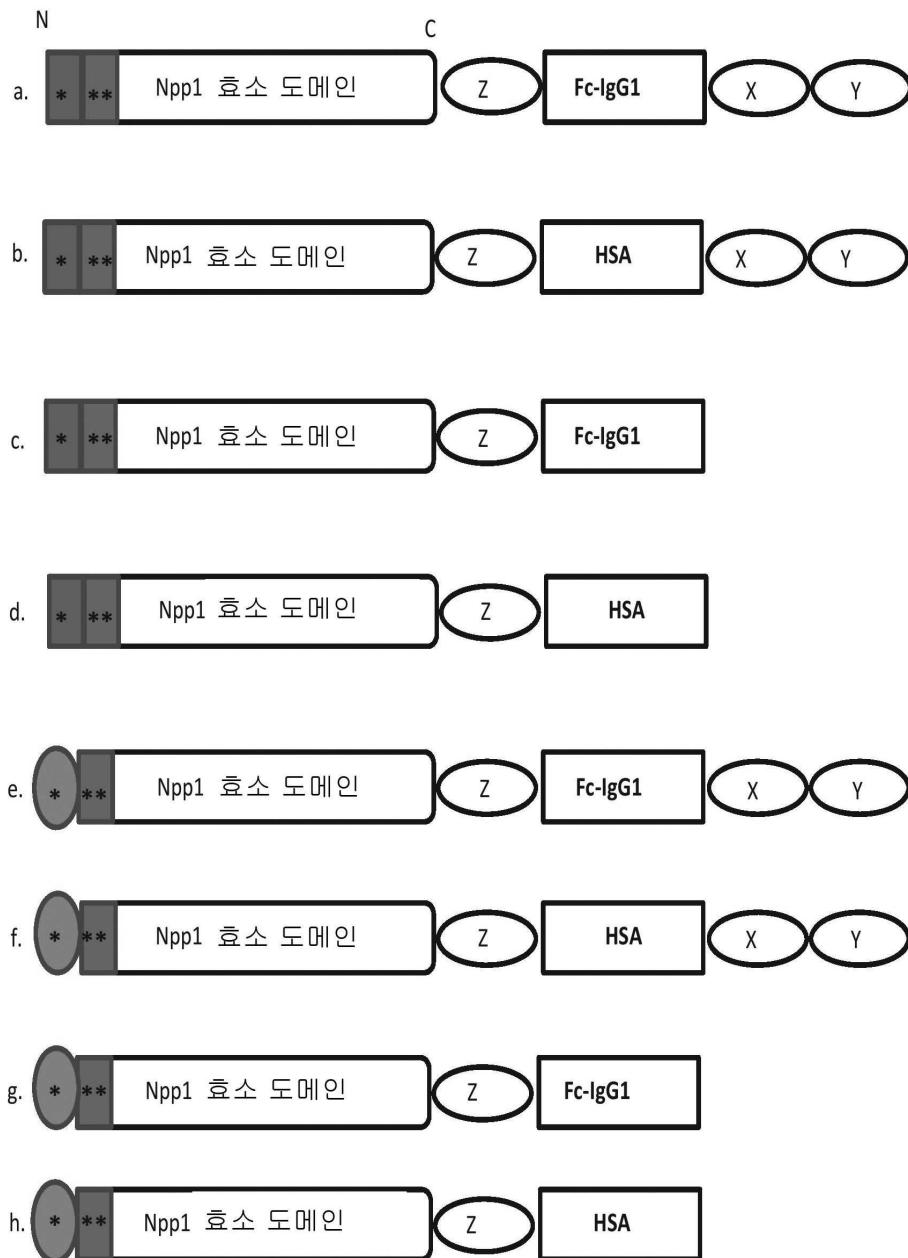
도면5e



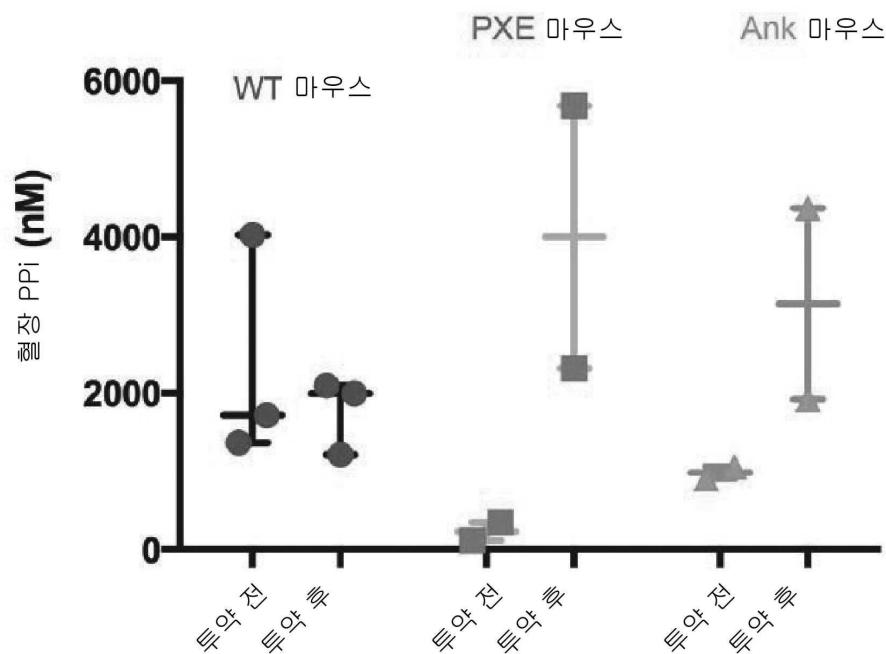
도면5f



도면6



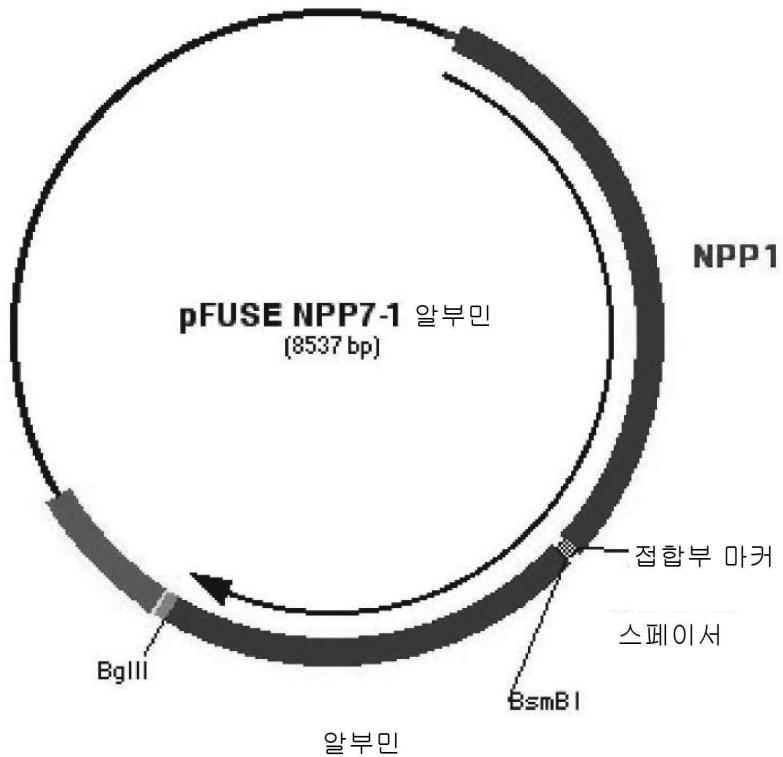
도면7



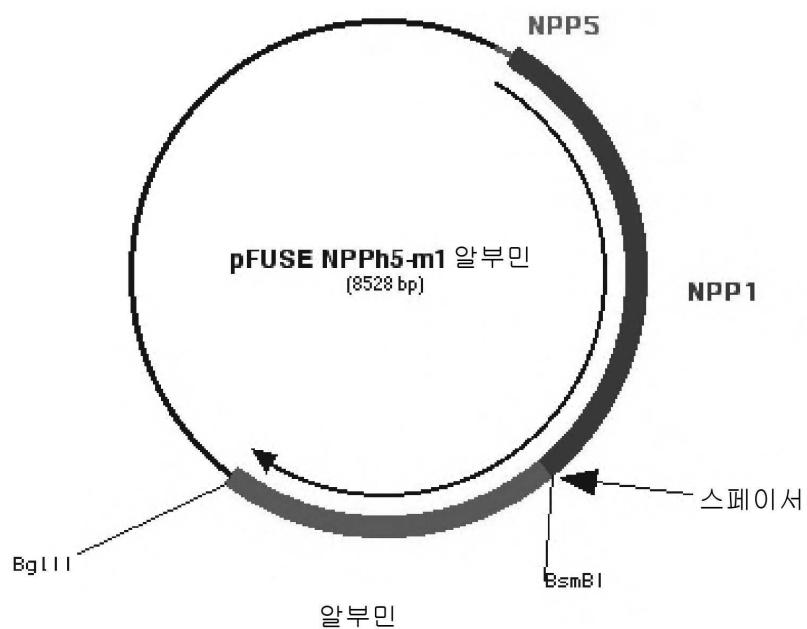
ENPP1-Fc: ENPP1-Fc 전 및 후
(8 mg/Kg qD)

- 야생형 마우스
- PXE 마우스
- Ank 마우스

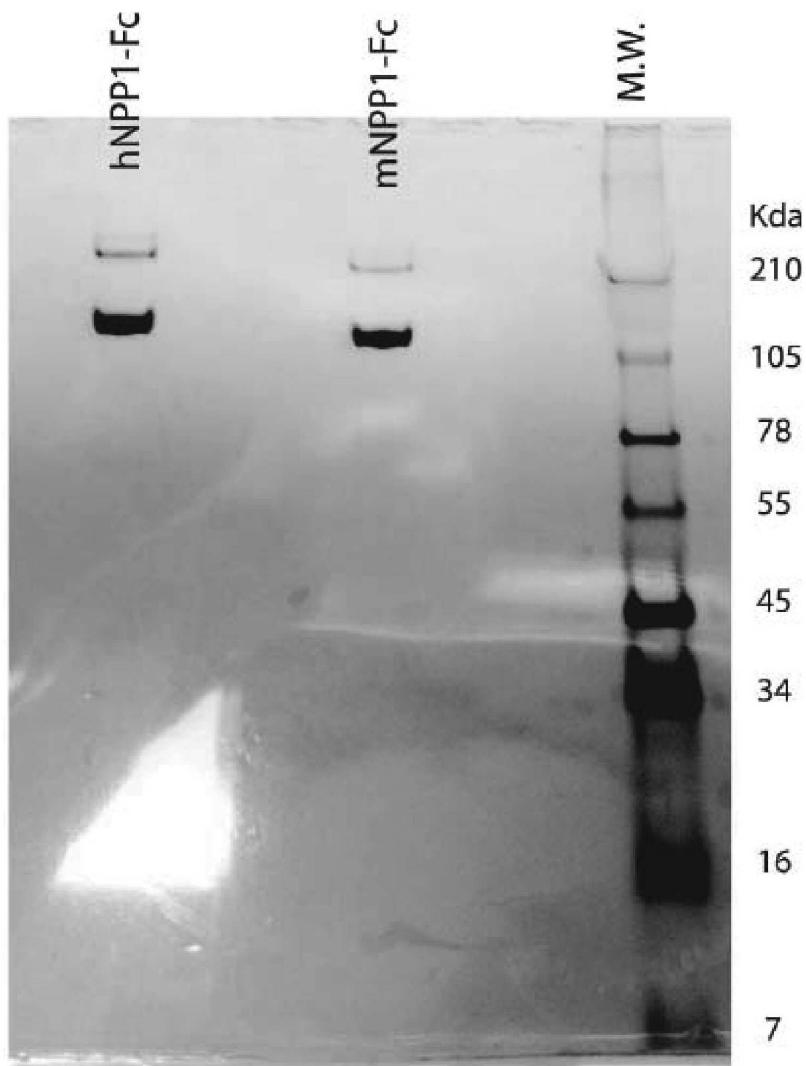
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Yale University

Braddock, Demetrios

Albright, Ronald

<120> Compositions for Treating Pathological Calcification Conditions,

and Methods Using Same

<130> 047162-7065W01(00401)

<150> US 62/163,500

<151> 2015-05-19

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 925

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Ser Arg Gly Glu Gly

1 5 10 15

Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly

20 25 30

Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Leu Ser Val Cys Val Leu Thr Thr Ile Leu Gly Cys Ile Phe Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu

130 135 140

His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu

180 185 190

Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu

195 200 205

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

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

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

Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu
 405 410 415
 Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys
 420 425 430
 Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys
 435 440 445
 Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp

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

Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu
 705 710 715 720

Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser
 725 730 735

Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile
 740 745 750

Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser
 755 760 765

Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr
 770 775 780

Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp
 785 790 795 800

Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys
 805 810 815

Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe
 820 825 830

Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys
 835 840 845

Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn
 850 855 860

Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu
 865 870 875 880

Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr
 885 890 895

Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu
 900 905 910

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

915 920 925

<210> 2

<211> 888

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Arg Ser Ser Phe Gln Ser Cys Gln Ile Ile Ser Leu Phe

1 5 10 15

Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly Phe Thr Ala His Arg

20 25 30

Ile Lys Arg Ala Glu Gly Trp Glu Glu Gly Pro Pro Thr Val Leu Ser

35 40 45

Asp Ser Pro Trp Thr Asn Ile Ser Gly Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe

50 55 60

Glu Leu Gln Glu Ala Gly Pro Pro Asp Cys Arg Cys Asp Asn Leu Cys

65 70 75 80

Lys Ser Tyr Thr Ser Cys Cys His Asp Phe Asp Glu Leu Cys Leu Lys

85 90 95

Thr Ala Arg Gly Trp Glu Cys Thr Lys Asp Arg Cys Gly Glu Val Arg

100 105 110

Asn Glu Glu Asn Ala Cys His Cys Ser Glu Asp Cys Leu Ala Arg Gly

115 120 125

Asp Cys Cys Thr Asn Tyr Gln Val Val Cys Lys Gly Glu Ser His Trp

130 135 140

Val Asp Asp Asp Cys Glu Glu Ile Lys Ala Ala Glu Cys Pro Ala Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Lys Lys Gly Ser Lys Val Met Pro Asn Ile Glu Lys Leu

180 185 190

Arg Ser Cys Gly Thr His Ser Pro Tyr Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr

195 200 205

Lys Thr Phe Pro Asn Leu Tyr Thr Leu Ala Thr Gly Leu Tyr Pro Glu

210 215 220

Ser His Gly Ile Val Gly Asn Ser Met Tyr Asp Pro Val Phe Asp Ala

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

Thr Phe His Leu Arg Gly Arg Glu Lys Phe Asn His Arg Trp Trp Gly

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

Gly Gln Pro Leu Trp Ile Thr Ala Thr Lys Gln Gly Val Lys Ala Gly

| | | |
|-----|-----|-----|
| 260 | 265 | 270 |
|-----|-----|-----|

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

| | | |
|-----|-----|-----|
| 275 | 280 | 285 |
|-----|-----|-----|

Ile Leu Gln Trp Leu Thr Leu Pro Asp His Glu Arg Pro Ser Val Tyr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
|-----|-----|-----|

Ala Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Asp Phe Ser Gly His Lys Tyr Gly Pro

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

Phe Gly Pro Glu Met Thr Asn Pro Leu Arg Glu Ile Asp Lys Ile Val

| | | |
|-----|-----|-----|
| 325 | 330 | 335 |
|-----|-----|-----|

Gly Gln Leu Met Asp Gly Leu Lys Gln Leu Lys Leu His Arg Cys Val

| | | |
|-----|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
|-----|-----|-----|

Asn Val Ile Phe Val Gly Asp His Gly Met Glu Asp Val Thr Cys Asp

| | | |
|-----|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
|-----|-----|-----|

Arg Thr Glu Phe Leu Ser Asn Tyr Leu Thr Asn Val Asp Asp Ile Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
|-----|-----|-----|

Leu Val Pro Gly Thr Leu Gly Arg Ile Arg Ser Lys Phe Ser Asn Asn

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 385 | 390 | 395 | 400 |
|-----|-----|-----|-----|

Ala Lys Tyr Asp Pro Lys Ala Ile Ile Ala Asn Leu Thr Cys Lys Lys

| | | |
|-----|-----|-----|
| 405 | 410 | 415 |
|-----|-----|-----|

Pro Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys Gln His Leu Pro Lys Arg

| | | |
|-----|-----|-----|
| 420 | 425 | 430 |
|-----|-----|-----|

Leu His Tyr Ala Asn Asn Arg Arg Ile Glu Asp Ile His Leu Leu Val

| | | |
|-----|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
|-----|-----|-----|

Glu Arg Arg Trp His Val Ala Arg Lys Pro Leu Asp Val Tyr Lys Lys

| | | |
|-----|-----|-----|
| 450 | 455 | 460 |
|-----|-----|-----|

Pro Ser Gly Lys Cys Phe Phe Gln Gly Asp His Gly Phe Asp Asn Lys

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
|-----|-----|-----|-----|

Val Asn Ser Met Gln Thr Val Phe Val Gly Tyr Gly Ser Thr Phe Lys

485 490 495

Tyr Lys Thr Lys Val Pro Pro Phe Glu Asn Ile Glu Leu Tyr Asn Val

500 505 510

Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Lys Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His

515 520 525

Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Arg Thr Asn Thr Phe Arg Pro Thr Met

530 535 540

Pro Glu Glu Val Thr Arg Pro Asn Tyr Pro Gly Ile Met Tyr Leu Gln

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Glu Ala Glu Thr Arg Lys Phe Arg Gly Ser Arg Asn Glu Asn Lys Glu

595 600 605

Asn Ile Asn Gly Asn Phe Glu Pro Arg Lys Glu Arg His Leu Leu Tyr

610 615 620

Gly Arg Pro Ala Val Leu Tyr Arg Thr Arg Tyr Asp Ile Leu Tyr His

625 630 635 640

Thr Asp Phe Glu Ser Gly Tyr Ser Glu Ile Phe Leu Met Pro Leu Trp

645 650 655

Thr Ser Tyr Thr Val Ser Lys Gln Ala Glu Val Ser Ser Val Pro Asp

660 665 670

His Leu Thr Ser Cys Val Arg Pro Asp Val Arg Val Ser Pro Ser Phe

675 680 685

Ser Gln Asn Cys Leu Ala Tyr Lys Asn Asp Lys Gln Met Ser Tyr Gly

690 695 700

Phe Leu Phe Pro Pro Tyr Leu Ser Ser Ser Pro Glu Ala Lys Tyr Asp

705 710 715 720

Ala Phe Leu Val Thr Asn Met Val Pro Met Tyr Pro Ala Phe Lys Arg

| | | |
|---|-----|-----|
| 725 | 730 | 735 |
| Val Trp Asn Tyr Phe Gln Arg Val Leu Val Lys Lys Tyr Ala Ser Glu | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Arg Asn Gly Val Asn Val Ile Ser Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asp Tyr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Asp Gly Leu His Asp Thr Glu Asp Lys Ile Lys Gln Tyr Val Glu Gly | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Ser Ser Ile Pro Val Pro Thr His Tyr Tyr Ser Ile Ile Thr Ser Cys | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Leu Asp Phe Thr Gln Pro Ala Asp Lys Cys Asp Gly Pro Leu Ser Val | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Ser Ser Phe Ile Leu Pro His Arg Pro Asp Asn Glu Glu Ser Cys Asn | | |
| 820 | 825 | 830 |
| Ser Ser Glu Asp Glu Ser Lys Trp Val Glu Glu Leu Met Lys Met His | | |
| 835 | 840 | 845 |
| Thr Ala Arg Val Arg Asp Ile Glu His Leu Thr Ser Leu Asp Phe Phe | | |
| 850 | 855 | 860 |
| Arg Lys Thr Ser Arg Ser Tyr Pro Glu Ile Leu Thr Leu Lys Thr Tyr | | |
| 865 | 870 | 875 |
| Leu His Thr Tyr Glu Ser Glu Ile | | |
| 885 | | |
| <210> 3 | | |
| <211> 453 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 3 | | |
| Met Lys Leu Leu Val Ile Leu Leu Phe Ser Gly Leu Ile Thr Gly Phe | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Arg Ser Asp Ser Ser Ser Leu Pro Pro Lys Leu Leu Leu Val Ser | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Phe Asp Gly Phe Arg Ala Asp Tyr Leu Lys Asn Tyr Glu Phe Pro His | | |

35 40 45

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

50 55 60

Val Phe Ile Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly

65 70 75 80

Leu Tyr Glu Glu Ser His Gly Ile Val Ala Asn Ser Met Tyr Asp Ala

85 90 95

Val Thr Lys Lys His Phe Ser Asp Ser Asn Asp Lys Asp Pro Phe Trp

100 105 110

Trp Asn Glu Ala Val Pro Ile Trp Val Thr Asn Gln Leu Gln Glu Asn

115 120 125

Arg Ser Ser Ala Ala Ala Met Trp Pro Gly Thr Asp Val Pro Ile His

130 135 140

Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Met Asn Tyr Asn Ser Ser Val Ser Phe

145 150 155 160

Glu Glu Arg Leu Asn Asn Ile Thr Met Trp Leu Asn Asn Ser Asn Pro

165 170 175

Pro Val Thr Phe Ala Thr Leu Tyr Trp Glu Glu Pro Asp Ala Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ile Asp Asp Leu Ile Gly Asp Leu Val Gln Arg Leu Lys Met Leu

210 215 220

Gly Leu Trp Glu Asn Leu Asn Val Ile Ile Thr Ser Asp His Gly Met

225 230 235 240

Thr Gln Cys Ser Gln Asp Arg Leu Ile Asn Leu Asp Ser Cys Ile Asp

245 250 255

His Ser Tyr Tyr Thr Leu Ile Asp Leu Ser Pro Val Ala Ala Ile Leu

260 265 270

Pro Lys Ile Asn Arg Thr Glu Val Tyr Asn Lys Leu Lys Asn Cys Ser

275 280 285

Pro His Met Asn Val Tyr Leu Lys Glu Asp Ile Pro Asn Arg Phe Tyr

290 295 300

Tyr Gln His Asn Asp Arg Ile Gln Pro Ile Ile Leu Val Ala Asp Glu

305 310 315 320

Gly Trp Thr Ile Val Leu Asn Glu Ser Ser Gln Lys Leu Gly Asp His

325 330 335

Gly Tyr Asp Asn Ser Leu Pro Ser Met His Pro Phe Leu Ala Ala His

340 345 350

Gly Pro Ala Phe His Lys Gly Tyr Lys His Ser Thr Ile Asn Ile Val

355 360 365

Asp Ile Tyr Pro Met Met Cys His Ile Leu Gly Leu Lys Pro His Pro

370 375 380

Asn Asn Gly Thr Phe Gly His Thr Lys Cys Leu Leu Val Asp Gln Trp

385 390 395 400

Cys Ile Asn Leu Pro Glu Ala Ile Ala Ile Val Ile Gly Ser Leu Leu

405 410 415

Val Leu Thr Met Leu Thr Cys Leu Ile Ile Ile Met Gln Asn Arg Leu

420 425 430

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

435 440 445

Asp Pro Leu Ile Gly

450

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(3)

<223> the tripeptide is present n times, wherein n is integer ranging

from 1 to 10

<400> 4

Asp Ser Ser

1

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(3)

<223> the tripeptide is present n times, wherein n is an integer
ranging from 1 to 10

<400> 5

Glu Ser Ser

1

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(3)

<223> the tripeptide is present n times, wherein n is integer ranging
from 1 to 10

<400> 6

Arg Gln Gln

1

<210> 7

<211> 2

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(2)

<223> the dipeptide is present n times, wherein n is integer ranging from 1 to 10

<400> 7

Lys Arg

1

<210> 8

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> the amino acid is present n times, wherein n is integer ranging from 1 to 10

<400> 8

Arg

1

<210> 9

<211

> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 9

Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly

1 5 10 15

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 10

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Pro Arg Gly Asp Thr

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 11

Ala Pro Trp His Leu Ser Ser Gln Tyr Ser Arg Thr

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 12

Ser Thr Leu Pro Ile Pro His Glu Phe Ser Arg Glu

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 13

Val Thr Lys His Leu Asn Gln Ile Ser Gln Ser Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 1

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically sysnthesized

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(1)

<223> the amino acid is present m times, wherein m is an integer
ranging from 1 to 15

<400> 14

Glu

1

<210> 15

<211> 925

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 15

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gly Glu Gly

1

5

10

15

Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly

20

25

30

Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser

35

40

45

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

50

55

60

Arg Ala Arg Thr Ala Lys Asp Pro Asn Thr Tyr Lys Ile Ile Ser Leu

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu

130

135

140

His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr

145

150

155

160

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

165

170

175

Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu

180

185

190

Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu

195 200 205

Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr

210 215 220

Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys

225 230 235 240

Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr

245 250 255

Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His

260 265 270

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

275 280 285

Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu

290 295 300

Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr

355 360 365

Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro

370 375 380

Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val

385 390 395 400

Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu

405 410 415

Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys

420 425 430

Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys

435 440 445

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

450 455 460

Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys

465 470 475 480

Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro

485 490 495

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

500 505 510

Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys

515 520 525

Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met

530 535 540

Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu

545 550 555 560

Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu

565 570 575

Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn

580 585 590

His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val

595 600 605

His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu

610 615 620

Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr

625 630 635 640

Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr

645 650 655

Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys

660 665 670

Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu

675 680 685

Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser

690 695 700

Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu

705 710 715 720

Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser

725 730 735

Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile

740 745 750

Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser

755 760 765

Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr

770 775 780

Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp

785 790 795 800

Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys

805 810 815

Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe

820 825 830

Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys

835 840 845

Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn

850 855 860

Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu

865 870 875 880

Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr

885 890 895

Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu

900 905 910

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

915 920 925

<210> 16

<211> 1155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 16

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Ser Arg Gly Glu Gly

1 5 10 15

Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly

20 25 30

Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ala Arg Thr Ala Lys Asp Pro Asn Thr Tyr Lys Ile Ile Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu

130 135 140

His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu

180 185 190

Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu

195 200 205

Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr

| | | |
|---|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
| Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp | | |
| 450 | 455 | 460 |

Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys
 465 470 475 480
 Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro
 485 490 495
 Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe
 500 505 510
 Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys
 515 520 525
 Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met
 530 535 540
 Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu
 545 550 555 560
 Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu
 565 570 575
 Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn
 580 585 590
 His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val
 595 600 605
 His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu
 610 615 620
 Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr
 625 630 635 640
 Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr
 645 650 655
 Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys
 660 665 670
 Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu
 675 680 685
 Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser
 690 695 700
 Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser | | | |
| 725 | 730 | 735 | |
| Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile | | | |
| 740 | 745 | 750 | |
| Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser | | | |
| 755 | 760 | 765 | |
| Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr | | | |
| 770 | 775 | 780 | |
| Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp | | | |
| 785 | 790 | 795 | 800 |
| Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys | | | |
| 805 | 810 | 815 | |
| Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe | | | |
| 820 | 825 | 830 | |
| Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys | | | |
| 835 | 840 | 845 | |
| Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn | | | |
| 850 | 855 | 860 | |
| Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu | | | |
| 865 | 870 | 875 | 880 |
| Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr | | | |
| 885 | 890 | 895 | |
| Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu | | | |
| 900 | 905 | 910 | |
| Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Leu Ile Asn | | | |
| 915 | 920 | 925 | |
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly | | | |
| 930 | 935 | 940 | |
| Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met | | | |
| 945 | 950 | 955 | 960 |

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 965 970 975
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 980 985 990
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 995 1000 1005
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 1010 1015 1020
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 1025 1030 1035
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 1040 1045 1050
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 1055 1060 1065
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 1070 1075 1080
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 1085 1090 1095
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 1100 1105 1110
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 1115 1120 1125
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 1130 1135 1140
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1145 1150 1155
 <210> 17
 <211> 852
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chemically synthesized
 <400> 17

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg

35 40 45

Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln

50 55 60

Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln

100 105 110

Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg

165 170 175

Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr

180 185 190

Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln

225 230 235 240

Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile

| | | |
|---|-----|-----|
| 245 | 250 | 255 |
| Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Pro Asp Ser | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val | | |
| 485 | 490 | 495 |

Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn

500 505 510

Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr

515 520 525

Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr

530 535 540

Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu

545 550 555 560

Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu

565 570 575

Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu

580 585 590

Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser

595 600 605

Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val

610 615 620

Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr

625 630 635 640

Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr

645 650 655

Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu

660 665 670

Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn

675 680 685

Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His

690 695 700

Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val

705 710 715 720

Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser

725 730 735

Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile

| | | |
|---|-----|-----|
| 740 | 745 | 750 |
| Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile | | |
| 770 | 775 | 780 |
| | | |
| Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys | | |
| 820 | 825 | 830 |
| Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe | | |
| 835 | 840 | 845 |
| | | |
| Ser Gln Glu Asp | | |
| 850 | | |
| <210> 18 | | |
| <211> 1082 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> chemically synthesized | | |
| <400> 18 | | |
| Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Pro Gly Ala Gly Ala Gly Leu Lys Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val | | |
| 20 | 25 | 30 |
| | | |
| Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg | | |
| 35 | 40 | 45 |
| | | |
| Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp | | |

85 90 95

Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln

100 105 110

Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg

165 170 175

Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr

180 185 190

Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp

195 200 205

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

210 215 220

Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln

225 230 235 240

Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile

245 250 255

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

260 265 270

Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys

275 280 285

Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser

290 295 300

Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu

305 310 315 320

Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu

325 330 335

Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly

340 345 350

Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu

355 360 365

Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu

370 375 380

Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly

385 390 395 400

Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro

405 410 415

Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp

420 425 430

Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala

435 440 445

Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser

450 455 460

Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro

465 470 475 480

Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val

485 490 495

Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn

500 505 510

Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr

515 520 525

Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr

530 535 540

Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu

545 550 555 560

Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu

565 570 575

Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu

| | | |
|---|-----|-----|
| 580 | 585 | 590 |
| Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His | | |
| 690 | 695 | 700 |
| Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val | | |
| 705 | 710 | 715 |
| 720 | | |
| Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His | | |
| 785 | 790 | 795 |
| 800 | | |
| Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys | | |
| 820 | 825 | 830 |

Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe
 835 840 845
 Ser Gln Glu Asp Leu Ile Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 850 855 860
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 865 870 875 880

 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 885 890 895
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 900 905 910
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 915 920 925
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 930 935 940

 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 945 950 955 960
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 965 970 975
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 980 985 990
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 995 1000 1005

 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 1010 1015 1020
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 1025 1030 1035
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 1040 1045 1050
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 1055 1060 1065

 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

| | | |
|---|------|------|
| 1070 | 1075 | 1080 |
| <210> 19 | | |
| <211> 849 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> chemically synthesized | | |
| <400> 19 | | |
| Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ala Pro Gly Ala Gly Ala Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys | | |
| | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His | | |
| | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu | | |
| 325 | 330 | 335 |
| His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val | | |
| | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys | | |
| 405 | 410 | 415 |
| His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu | | |
| | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro | | |
| 435 | 440 | 445 |

Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asn Val
 450 455 460
 Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
 465 470 475 480
 His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu
 485 490 495
 Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His
 500 505 510
 Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His
 515 520 525
 Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro
 530 535 540
 Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile
 565 570 575
 Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu
 580 585 590
 Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser
 595 600 605
 Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn
 610 615 620
 Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe
 625 630 635 640
 Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn
 645 650 655
 Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn
 660 665 670
 Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro
 675 680 685
 Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu

690 695 700
 Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly
 705 710 715 720
 Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn
 725 730 735
 Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro

740 745 750
 Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr
 755 760 765
 Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His
 770 775 780
 Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser
 785 790 795 800
 Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val

805 810 815
 Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val
 820 825 830
 Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu
 835 840 845
 Asp

<210> 20
 <211> 1079
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chemically synthesized
 <400> 20

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15
 Ala Pro Gly Ala Gly Ala Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys
 20 25 30
 Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala

| | | |
|---|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 |
| Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu | | |
| | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe | | |
| | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met | | |
| | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu | | |
| | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg | | |
| 275 | 280 | 285 |

Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His
 290 295 300
 Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu
 325 330 335
 His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln
 340 345 350
 Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val
 355 360 365
 Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser
 370 375 380
 Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg
 385 390 395 400
 Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys
 405 410 415
 His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu
 420 425 430
 Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro
 435 440 445
 Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly His Gly Ser Asp Asn Val
 450 455 460
 Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys
 465 470 475 480
 His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu
 485 490 495
 Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His
 500 505 510
 Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His
 515 520 525
 Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro

| | | |
|---|-----|-----|
| 530 | 535 | 540 |
| Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu | | |
| 690 | 695 | 700 |
| Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly | | |
| 705 | 710 | 715 |
| Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His | | |
| 770 | 775 | 780 |

Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser
 785 790 795 800
 Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val
 805 810 815
 Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val
 820 825 830
 Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu
 835 840 845
 Asp Leu Ile Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 850 855 860
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 865 870 875 880
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 885 890 895
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 900 905 910
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 915 920 925
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 930 935 940
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 945 950 955 960
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 965 970 975
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 980 985 990
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 995 1000 1005
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 1010 1015 1020
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

| | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| 1025 | 1030 | 1035 |
| Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp | Lys Ser Arg Trp Gln | Gln Gly Asn |
| 1040 | 1045 | 1050 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met | His Glu Ala Leu His | Asn His Tyr |
| 1055 | 1060 | 1065 |
| Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu | Ser Pro Gly Lys | |
| 1070 | 1075 | |

<210> 21

<211> 1550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 21

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gly Glu Gly

1 5 10 15

Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly

20 25 30

Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ala Arg Thr Ala Lys Asp Pro Asn Thr Tyr Lys Ile Ile Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu

130 135 140

His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Leu His Thr Trp Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |

Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu
 405 410 415

Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys
 420 425 430

Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys
 435 440 445

Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp
 450 455 460

Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys
 465 470 475 480

Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro
 485 490 495

Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe
 500 505 510

Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys
 515 520 525

Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met
 530 535 540

Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu
 545 550 555 560

Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu
 565 570 575

Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn
 580 585 590

His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val
 595 600 605

His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu
 610 615 620

Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr
 625 630 635 640

Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 645 | 650 | 655 |
| Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser | | |
| 690 | 695 | 700 |
| | | |
| Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu | | |
| 705 | 710 | 715 |
| Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser | | |
| 755 | 760 | 765 |
| | | |
| Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe | | |
| 820 | 825 | 830 |
| | | |
| Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys | | |
| 835 | 840 | 845 |
| Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn | | |
| 850 | 855 | 860 |
| Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu | | |
| 865 | 870 | 875 |
| Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr | | |
| 885 | 890 | 895 |

Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu
 900 905 910

Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Arg Ser Gly
 915 920 925

Ser Gly Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Phe Val
 930 935 940

Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys
 945 950 955 960

Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys
 965 970 975

Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr
 980 985 990

Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr
 995 1000 1005

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
 1010 1015 1020

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu
 1025 1030 1035

Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu
 1040 1045 1050

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
 1055 1060 1065

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe
 1070 1075 1080

Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val
 1085 1090 1095

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr
 1100 1105 1110

Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala
 1115 1120 1125

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

| | | |
|---|------|------|
| 1130 | 1135 | 1140 |
| Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser | | |
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |
| Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr | | |
| 1175 | 1180 | 1185 |
| Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His | | |
| 1190 | 1195 | 1200 |
| Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr | | |
| 1220 | 1225 | 1230 |
| Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu | | |
| 1235 | 1240 | 1245 |
| Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala | | |
| 1250 | 1255 | 1260 |
| Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala | | |
| 1265 | 1270 | 1275 |
| Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg | | |
| 1280 | 1285 | 1290 |
| His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys | | |
| 1295 | 1300 | 1305 |
| Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro | | |
| 1310 | 1315 | 1320 |
| Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu | | |
| 1325 | 1330 | 1335 |
| Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys | | |
| 1340 | 1345 | 1350 |
| Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr | | |
| 1355 | 1360 | 1365 |

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

1370 1375 1380

Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu

1385 1390 1395

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu

1400 1405 1410

Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His

1415 1420 1425

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

1430 1435 1440

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

1445 1450 1455

Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro

1460 1465 1470

Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu

1475 1480 1485

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val

1490 1495 1500

Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala

1505 1510 1515

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

1520 1525 1530

Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala Arg Ser Trp Ser His Pro Gln Phe

1535 1540 1545

Glu Lys

1550

<210> 22

<211> 1474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 22

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

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

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

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

245 250 255

Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu

260 265 270

Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg

275 280 285

Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His

290 295 300

Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val

305 310 315 320

Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu

325 330 335

His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln

340 345 350

Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val

355 360 365

Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser

370 375 380

Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg

385 390 395 400

Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys

405 410 415

His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu

420 425 430

Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro

435 440 445

Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val

450 455 460

Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys

465 470 475 480

His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu

485 490 495

Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His

500 505 510

Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His

515 520 525

Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile

565 570 575

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

580 585 590

Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser

595 600 605

Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn

610 615 620

Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe

625 630 635 640

Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn

645 650 655

Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn

660 665 670

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

675 680 685

Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu

690 695 700

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

705 710 715 720

Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn

725 730 735

Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro

| | | |
|---|-----|-----|
| 740 | 745 | 750 |
| Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr | | |
| 755 | 760 | 765 |
| | | |
| Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His | | |
| 770 | 775 | 780 |
| Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val | | |
| 820 | 825 | 830 |
| | | |
| Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu | | |
| 835 | 840 | 845 |
| Asp Arg Ser Gly Ser Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu | | |
| 850 | 855 | 860 |
| Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg | | |
| 865 | 870 | 875 |
| 880 | | |
| Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu | | |
| 885 | 890 | 895 |
| | | |
| Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln | | |
| 900 | 905 | 910 |
| Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp | | |
| 915 | 920 | 925 |
| Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys | | |
| 930 | 935 | 940 |
| Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu | | |
| 945 | 950 | 955 |
| 960 | | |
| | | |
| Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro | | |
| 965 | 970 | 975 |
| Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu | | |
| 980 | 985 | 990 |

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
 995 1000 1005
 Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala
 1010 1015 1020

 Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala
 1025 1030 1035
 Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp
 1040 1045 1050
 Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys
 1055 1060 1065
 Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met
 1070 1075 1080

 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 1085 1090 1095
 Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys
 1100 1105 1110
 Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
 1115 1120 1125
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr
 1130 1135 1140

 Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys
 1145 1150 1155
 Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val
 1160 1165 1170
 Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp
 1175 1180 1185
 Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 1190 1195 1200

 Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His
 1205 1210 1215
 Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr

| | | |
|---|------|------|
| 1220 | 1225 | 1230 |
| Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala | | |
| 1235 | 1240 | 1245 |
| Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu | | |
| 1250 | 1255 | 1260 |
| | | |
| Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu | | |
| 1265 | 1270 | 1275 |
| Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln | | |
| 1280 | 1285 | 1290 |
| Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg | | |
| 1295 | 1300 | 1305 |
| Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp | | |
| 1310 | 1315 | 1320 |
| | | |
| Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn | | |
| 1325 | 1330 | 1335 |
| Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val | | |
| 1340 | 1345 | 1350 |
| Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe | | |
| 1355 | 1360 | 1365 |
| Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys | | |
| 1370 | 1375 | 1380 |
| | | |
| Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu | | |
| 1385 | 1390 | 1395 |
| Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val | | |
| 1400 | 1405 | 1410 |
| Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met | | |
| 1415 | 1420 | 1425 |
| Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp | | |
| 1430 | 1435 | 1440 |
| | | |
| Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg | | |
| 1445 | 1450 | 1455 |

Cys Lys Asp Ala Leu Ala Arg Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

1460 1465 1470

Lys

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 23

Ile Ile Ser Leu Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly

1 5 10 15

Phe Thr Ala

<210> 24

<211> 850

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 24

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

1 5 10 15

Leu Ser Thr Thr Phe Ser Leu Gln Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys

20 25 30

Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Ser Asn Cys Arg Cys

35 40 45

Asp Ala Ala Cys Val Ser Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Phe Gln Glu

50 55 60

Thr Cys Val Glu Pro Thr His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys

65 70 75 80

Gly Glu Lys Arg Leu Ser Arg Phe Val Cys Ser Cys Ala Asp Asp Cys

85 90 95

Lys Thr His Asn Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Asp

| | | |
|---|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| Lys Lys Ser Trp Val Glu Glu Thr Cys Glu Ser Ile Asp Thr Pro Glu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Cys Pro Ala Glu Phe Glu Ser Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ile Ser Lys Leu Lys Asn Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Met Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Leu Trp Tyr Lys Gly Gln Pro Ile Trp Val Thr Ala Asn His Gln Glu | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Val Lys Ser Gly Thr Tyr Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asp | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Ile Leu Pro Asp Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu Glu Trp Leu Gln Leu Pro Ser His | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Gly His Ser His Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Lys Val Asp Arg Leu Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Asp Leu | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gly Leu Asp Lys Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met | | |
| 340 | 345 | 350 |

Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Val Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly

355 360 365

Asp Val Asn Asn Val Lys Val Val Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg

370 375 380

Pro Thr Asp Val Pro Glu Thr Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Ala Leu

385 390 395 400

Ala Lys Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Arg Pro Tyr

405 410 415

Leu Lys Pro Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg

420 425 430

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

435 440 445

Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp

450 455 460

Asn Leu Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Ile Gly Tyr Gly Pro Ala

465 470 475 480

Phe Lys His Gly Ala Glu Val Asp Ser Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr

485 490 495

Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Ile Pro Ala Pro Asn Asn Gly

500 505 510

Ser His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Lys Pro Ile Tyr Asn Pro

515 520 525

Ser His Pro Lys Glu Glu Gly Phe Leu Ser Gln Cys Pro Ile Lys Ser

530 535 540

Thr Ser Asn Asp Leu Gly Cys Thr Cys Asp Pro Trp Ile Val Pro Ile

545 550 555 560

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

565 570 575

Ile Tyr His Met Thr Val Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Ile Leu Leu Lys

580 585 590

Gln His Arg Val Cys Leu Leu Gln Gln Gln Phe Leu Thr Gly Tyr

| | | |
|---|-----|-----|
| 595 | 600 | 605 |
| Ser Leu Asp Leu Leu Met Pro Leu Trp Ala Ser Tyr Thr Phe Leu Ser | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Asn Asp Gln Phe Ser Arg Asp Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Leu Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Tyr Tyr Lys Ser | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Asn Ser Lys Leu Ser Tyr Gly Phe Leu Thr Pro Pro Arg Leu Asn Arg | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Val Ser Asn His Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Val | | |
| 675 | 680 | 685 |
| Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp His Tyr Leu His Asp Thr | | |
| 690 | 695 | 700 |
| Leu Leu Gln Arg Tyr Ala His Glu Arg Asn Gly Ile Asn Val Val Ser | | |
| 705 | 710 | 715 |
| Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asp Ser Leu Glu | | |
| 725 | 730 | 735 |
| Ile Leu Lys Gln Asn Ser Arg Val Ile Arg Ser Gln Glu Ile Leu Ile | | |
| 740 | 745 | 750 |
| Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Gln Leu Ser Glu | | |
| 755 | 760 | 765 |
| Thr Pro Leu Glu Cys Ser Ala Leu Glu Ser Ser Ala Tyr Ile Leu Pro | | |
| 770 | 775 | 780 |
| His Arg Pro Asp Asn Ile Glu Ser Cys Thr His Gly Lys Arg Glu Ser | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Thr Leu His Arg Ala Arg Val Thr Asp | | |
| 805 | 810 | 815 |
| Val Glu Leu Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Asp Arg Gln Glu Ser | | |
| 820 | 825 | 830 |
| Val Ser Glu Leu Leu Arg Leu Lys Thr His Leu Pro Ile Phe Ser Gln | | |
| 835 | 840 | 845 |

Glu Asp

850

<210> 25

<211> 1474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 25

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

1 5 10 15

Leu Ser Thr Thr Phe Ser Leu Gln Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys

20 25 30

Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Ser Asn Cys Arg Cys

35 40 45

Asp Ala Ala Cys Val Ser Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Phe Gln Glu

50 55 60

Thr Cys Val Glu Pro Thr His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys

65 70 75 80

Gly Glu Lys Arg Leu Ser Arg Phe Val Cys Ser Cys Ala Asp Asp Cys

85 90 95

Lys Thr His Asn Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Asp

100 105 110

Lys Lys Ser Trp Val Glu Glu Thr Cys Glu Ser Ile Asp Thr Pro Glu

115 120 125

Cys Pro Ala Glu Phe Glu Ser Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Ser Lys Leu Lys Asn Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro

165 170 175

Met Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly

180 185 190

Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro

195 200 205

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

210 215 220

Leu Trp Tyr Lys Gly Gln Pro Ile Trp Val Thr Ala Asn His Gln Glu

225 230 235 240

Val Lys Ser Gly Thr Tyr Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asp

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser

290 295 300

Gly His Ser His Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln

305 310 315 320

Lys Val Asp Arg Leu Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Asp Leu

325 330 335

Gly Leu Asp Lys Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met

340 345 350

Glu Gln Gly Ser Cys Lys Tyr Val Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly

355 360 365

Asp Val Asn Asn Val Lys Val Val Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg

370 375 380

Pro Thr Asp Val Pro Glu Thr Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Ala Leu

385 390 395 400

Ala Lys Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Arg Pro Tyr

405 410 415

Leu Lys Pro Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg

420 425 430

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
| Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Asn Leu Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Ile Gly Tyr Gly Pro Ala | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Phe Lys His Gly Ala Glu Val Asp Ser Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Ile Pro Ala Pro Asn Asn Gly | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ser His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Lys Pro Ile Tyr Asn Pro | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Ser His Pro Lys Glu Glu Gly Phe Leu Ser Gln Cys Pro Ile Lys Ser | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Thr Ser Asn Asp Leu Gly Cys Thr Cys Asp Pro Trp Ile Val Pro Ile | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Lys Asp Phe Glu Lys Gln Leu Asn Leu Thr Thr Glu Asp Val Asp Asp | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Ile Tyr His Met Thr Val Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Ile Leu Leu Lys | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Gln His Arg Val Cys Leu Leu Gln Gln Gln Phe Leu Thr Gly Tyr | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Ser Leu Asp Leu Leu Met Pro Leu Trp Ala Ser Tyr Thr Phe Leu Ser | | |
| 610 | 615 | 620 |
| Asn Asp Gln Phe Ser Arg Asp Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp | | |
| 625 | 630 | 635 |
| Leu Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Tyr Tyr Lys Ser | | |
| 645 | 650 | 655 |
| Asn Ser Lys Leu Ser Tyr Gly Phe Leu Thr Pro Pro Arg Leu Asn Arg | | |
| 660 | 665 | 670 |
| Val Ser Asn His Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Val | | |
| 675 | 680 | 685 |

Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp His Tyr Leu His Asp Thr

690 695 700

Leu Leu Gln Arg Tyr Ala His Glu Arg Asn Gly Ile Asn Val Val Ser

705 710 715 720

Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asp Ser Leu Glu

725 730 735

Ile Leu Lys Gln Asn Ser Arg Val Ile Arg Ser Gln Glu Ile Leu Ile

740 745 750

Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Gln Leu Ser Glu

755 760 765

Thr Pro Leu Glu Cys Ser Ala Leu Glu Ser Ser Ala Tyr Ile Leu Pro

770 775 780

His Arg Pro Asp Asn Ile Glu Ser Cys Thr His Gly Lys Arg Glu Ser

785 790 795 800

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

805 810 815

Val Glu Leu Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Asp Arg Gln Glu Ser

820 825 830

Val Ser Glu Leu Leu Arg Leu Lys Thr His Leu Pro Ile Phe Ser Gln

835 840 845

Glu Asp Gly Gly Ser Gly Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu

850 855 860

Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg

865 870 875 880

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu

885 890 895

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln

900 905 910

Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp

915 920 925

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

| | | |
|---|------|------|
| 930 | 935 | 940 |
| Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu | | |
| 945 | 950 | 955 |
| Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro | | |
| 965 | 970 | 975 |
| Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu | | |
| 980 | 985 | 990 |
| Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys | | |
| 995 | 1000 | 1005 |
| Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala | | |
| 1010 | 1015 | 1020 |
| Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala | | |
| 1025 | 1030 | 1035 |
| Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp | | |
| 1040 | 1045 | 1050 |
| Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys | | |
| 1055 | 1060 | 1065 |
| Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met | | |
| 1070 | 1075 | 1080 |
| Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg | | |
| 1085 | 1090 | 1095 |
| Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys | | |
| 1100 | 1105 | 1110 |
| Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly | | |
| 1115 | 1120 | 1125 |
| Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr | | |
| 1130 | 1135 | 1140 |
| Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys | | |
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |

Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp
 1175 1180 1185
 Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
 1190 1195 1200
 Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His
 1205 1210 1215

Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr
 1220 1225 1230
 Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala
 1235 1240 1245
 Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu
 1250 1255 1260
 Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu
 1265 1270 1275

Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln
 1280 1285 1290
 Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg
 1295 1300 1305
 Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp
 1310 1315 1320
 Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn
 1325 1330 1335

Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val
 1340 1345 1350
 Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 1355 1360 1365
 Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys
 1370 1375 1380
 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu
 1385 1390 1395

Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val

| | | |
|---|------|------|
| 1400 | 1405 | 1410 |
| Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met | | |
| 1415 | 1420 | 1425 |
| Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp | | |
| 1430 | 1435 | 1440 |
| Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg | | |
| 1445 | 1450 | 1455 |

| | | |
|---|------|------|
| Cys Lys Asp Ala Leu Ala Arg Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu | | |
| 1460 | 1465 | 1470 |
| Lys | | |

<210> 26

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 26

| | | | |
|---|----|----|----|
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val | | | |
| 50 | 55 | 60 | |

| | | | |
|---|----|----|----|
| His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly | | | |
| 85 | 90 | 95 | |

| | | | |
|---|-----|-----|--|
| Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 | |
| Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Pro Gly Lys | | | |
| 225 | | | |
| <210> 27 | | | |
| <211> 618 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220><223> chemically synthesized | | | |
| <400> 27 | | | |
| Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp | | | |

85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala

100 105 110

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

115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala

130 135 140

Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys

180 185 190

Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly

195 200 205

Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp

325 330 335

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

340 345 350

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

435 440 445

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

450 455 460

Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile

465 470 475 480

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His

485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe

500 505 510

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

515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu

530 535 540

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

545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala

565 570 575

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe

| | | |
|---|-----|-----|
| 580 | 585 | 590 |
| Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala | | |
| 595 | 600 | 605 |
| Arg Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys | | |
| 610 | 615 | |
| <210> 28 | | |
| <211> 3 | | |
| <212> PRT | | |

| | | |
|-----------------------------------|--|--|
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> chemically synthesized | | |
| <400> 28 | | |
| Leu Ile Asn | | |
| 1 | | |
| <210> 29 | | |
| <211> 6 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> chemically synthesized | | |
| <400> 29 | | |

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| Gly Gly Ser Gly Gly Ser | | |
| 1 | 5 | |
| <210> 30 | | |
| <211> 7 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> chemically synthesized | | |
| <400> 30 | | |
| Arg Ser Gly Ser Gly Gly Ser | | |

| | | |
|----------------|---|--|
| 1 | 5 | |
| 【심사관 직권보정사항】 | | |
| 【직권보정 1】 | | |
| 【보정항목】 청구범위 | | |
| 【보정세부항목】 청구항 9 | | |

【변경전】

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환은 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 특발성 소아 동맥 석회화(IIAC), 후종 인대의 골화(OPLL), 저인산혈 구루병, 골관절염, 및 동맥경화반의 석회화로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.

【변경후】

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환 또는 장애는 소아 전신 동맥 석회화(GACI), 특발성 소아 동맥 석회화(IIAC), 후종 인대의 골화(OPLL), 저인산혈 구루병, 골관절염, 및 동맥경화반의 석회화로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환은 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증 및 조로증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.

【변경후】

병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 조성물은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물의 치료 유효량을 포함하고, 상기 질환 또는 장애는 PXE, 골관절염의 유전성 및 비유전성 형태, 강직성 척추염, 노화로 발생된 동맥 경화증, 말기 신장 질환으로 인한 저항성 칼슘형성증 및 조로증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 것인 약학 조성물.