



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월19일

(11) 등록번호 10-2637699

(24) 등록일자 2024년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/50 (2024.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/50 (2024.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7013555

(22) 출원일자(국제) 2015년10월23일

심사청구일자 2020년10월23일

(85) 번역문제출일자 2017년05월19일

(65) 공개번호 10-2017-0070227

(43) 공개일자 2017년06월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/057228

(87) 국제공개번호 WO 2016/065326

국제공개일자 2016년04월28일

(30) 우선권주장

62/068,523 2014년10월24일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

AU2012268895 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김수진

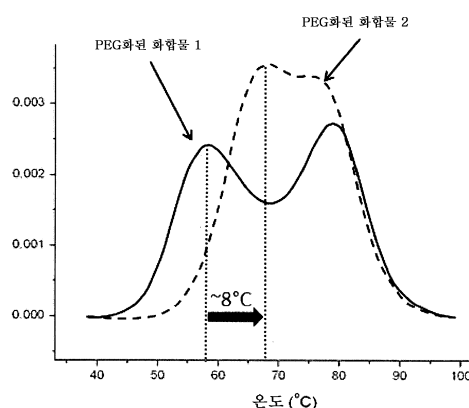
(54) 발명의 명칭 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 그의 용도

(57) 요약

변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 그의, 예를 들어 섬유증과 연관된 질환의 치료에 있어서의 용도가 제공된다. 내부 결실 및 임의로 대체 펩티드를 함유하고, 임의로 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산으로 변형되고/거나, 임의로 융합 파트너와 융합된 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 개시되어 있다.

대표도 - 도3

시차 주사 열량측정법(DSC)



(52) CPC특허분류

A61K 38/1825 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/60 (2017.08)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

무크헤르지, 란잔

미국 18966 펜실베이니아주 처치빌 브라운 드라이
브 40

레일리, 티모시 피.

미국 08543 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프로
빈스 라인 로드

크리스천, 로즈 씨.

미국 08543 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프로
빈스 라인 로드

리포브섹, 다사

미국 02453 매사추세츠주 월섬 비버 스트리트 100

캄프하우젠, 레이

미국 02453 매사추세츠주 월섬 비버 스트리트 100

크루핀스키, 존

미국 08534 뉴저지주 페닝턴 페닝턴-로키 힐 로드
311 빌딩 21

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130115305 A*

KR101476472 B1

KR1020150043505 A

WO2012066075 A1

WO2014037373 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

62/068,514 2014년10월24일 미국(US)

62/068,526 2014년10월24일 미국(US)

62/068,534 2014년10월24일 미국(US)

62/068,296 2014년10월24일 미국(US)

62/141,337 2015년04월01일 미국(US)

62/141,383 2015년04월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열식별번호: 201의 폴리펩티드로 이루어진 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 그의 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기가 10 kDa 내지 40 kDa의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 연결되어 있는 것인, 비알콜성 지방간염(NASH), 간 섬유증 또는 경변증으로부터 선택되는 섬유증과 연관된 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 섬유증과 연관된 질환이 비알콜성 지방간염(NASH)인 제약 조성물.

청구항 3

서열식별번호: 201의 폴리펩티드로 이루어진 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 그의 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기가 10 kDa 내지 40 kDa의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 연결되어 있는 것인, 비알콜성 지방간염(NASH)을 치료 또는 예방하기 위한 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 섬유증과 연관된 질환이 경변증인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 섬유증과 연관된 질환이 간 섬유증인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜이 30 kDa의 분자량을 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 간 지방 비율의 감소 및 아디포넥틴 수준의 증가 중 하나 이상을 초래하는 제약 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 전, (i) 적어도 60의 지방 간 지수를 나타내거나; (ii) 임의로 자기 공명 영상화에 의해 결정되는, 적어도 10%의 간 지방 비율 백분율을 나타내거나; (iii) 임의로 간 생검에 의해 결정되는, 비알콜성 지방간염 임상연구 네트워크(NASH CRN) 섬유증 1-3기를 나타내거나; 또는 (iv) 상기 중 하나 이상의 조합을 나타내는 환자를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 피하 주사로 투여하기 위한 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 1일 1회, 1주마다 1회, 1주마다 2회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 또는 4주마다 1회의 빈도로 투여되는 제약 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 환자 체중의 0.05 mg/kg 내지 1

mg/kg의 양으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 12

서열식별번호: 201의 폴리펩티드로 이루어진 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 그의 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기가 30 kDa의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 연결되어 있는 것인, 비알콜성 지방 간염(NASH)을 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 제약 조성물은 1주마다 1회의 빈도로 피하 주사로 투여되고,

상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 환자 체중의 0.05 mg/kg 내지 1 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 13

서열식별번호: 201의 폴리펩티드로 이루어진 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 그의 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기가 30 kDa의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 연결되어 있는 것인, 비알콜성 지방 간염(NASH)을 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 제약 조성물은 1주마다 1회의 빈도로 피하 주사로 투여되고,

상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 20 mg의 양으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제5항, 제12항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기가 옥심 연결에 의해 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 연결되며, 상기 옥심 연결은 카르보닐 기와 아미노옥시 기의 반응으로부터 생성된 구조를 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 펩티드에 의해 임의로 대체된 내부 결실을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 및 질환과 장애의 치료 또는 예방에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 섬유모세포 성장 인자는 다수의 생리적 기능에서 중요한 역할을 하는 (McKeehan et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59:135-176, 1998; Burgess, W. H. et al., Annu. Rev. Biochem. 58:575-606 (1989)), 발달 중인 조직과 성체 조직에서 많이 발현되는 폴리펩티드이다 (Baird et al., Cancer Cells, 3:239-243, 1991). 문헌에 따르면, FGF 패밀리는 적어도 22종의 구성원으로 이루어진다 (Reuss et al., Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003)).

[0003] 섬유모세포 성장 인자 21 (FGF-21)이 문헌에 기재되어 있다 (각각 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Nishimura et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206 (2000)]; WO 01/36640; 및 WO 01/18172, 및 미국 특허 공보 20040259780). 다른 FGF와 달리, FGF-21은 증식성 및 종양 형성성 효과를 갖지 않는 것으로 보고되었다 (Ornitz and Itoh, Genome Biology 2001, 2(3):reviews3005.1-3005.12).

[0004] 특정 FGF-21 폴리펩티드 및 그의 용도가 미국 특허 공보 20010012628, 미국 특허 6,716,626, 미국 특허 공보 2004/0259780, WO 03/011213, 문헌 [Kharitonov et al. J Clin Invest. 2005 Jun;115(6):1627-35], WO 03/059270, 미국 특허 공보 2005/0176631, WO 2005/091944, WO 2007/0293430, 미국 특허 공보 2007/0293430, WO/2008/121563, 미국 특허 4,904,584, WO 99/67291, WO 99/03887, WO 00/26354, 및 미국 특허 5,218,092에 기재되어 있으며, 이들은 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 인간 FGF-21은 생체내에서 단백질분해를 진행하고, 시험관내에서 응집체를 형성하고, 탈아미드화를 진행하는 경향을 가지므로 (Gimeno and Moller, Trends Endocrinol Metab. 2014 Jun;25(6):303-11; 미국 특허 8,361,963; Hecht et al., PLoS One. 2012;7(11):e49345; 미국 특허 공보 2007/0293430; WO 2006/0065582), 잠재적으로 FGF-21을 함유하는 제약 조성물의 저장 수명을 제한하는 것으로 보고되었다. 치료용 폴리펩티드의 응집체와 탈아미드화된 형태는 잠재적으로 면역원성을 증가시킬 수 있다 (문헌 [U.S. Department of Health and Human Services, "Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products," August 2014; Subramanyam (ed.), "Therapeutic Protein Immunogenicity Focus Group Newsletter," American Association of Pharmaceutical Scientists, Vol. 1, Issue 3 (December 2011)] 참조).

[0006] WO 2008/121563 및 미국 특허 공보 2008/0255045로서 공개된 선행기술은 특정된 위치에서 폴리(에틸렌 글리콜)에 연결된 비-자연 코딩 아미노산을 함유하도록 변형된 특정 인간 FGF-21 폴리펩티드가 증가한 생체내 반감기를 나타내고/거나 생물학적 활성을 보유함을 입증하였다. 그러나, 예시된 인간 FGF-21 폴리펩티드는 본원에 기재된 서열 결실 또는 치환을 포함하지 않았다.

[0007] 섬유증은 기관 또는 조직에 과도한 섬유성 결합 조직이 형성되는 것이다. 섬유성 조직의 과도한 침적은 병리학 적 병태와 연관있고, 이는 기관 또는 조직 기능의 손상을 유도할 수 있다. 영향을 받는 기관은 폐 (폐 또는 폐성 섬유증), 간 (간 또는 간성 섬유증), 신장 (신장 또는 신장성 섬유증), 및 심장 (심장성 섬유증)을 포함할 수 있다. 섬유증은 또한 관절, 피부, 장, 골수 등을 포함하는, 다른 조직과 기관에도 영향을 미칠 수 있다. 섬유증 병태 또는 질환의 예는 간에 영향을 미치는 비알콜성 지방간염 (NASH); 신장에 영향을 미치는 당뇨병성 신장 질환 및 당뇨병성 신증; 및 심장에 영향을 미치는 대사성 심부전증을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들어, NASH는 알코올을 거의 또는 전혀 마시지 않는 사람들의 간에서의 지방, 염증 및 손상으로 특

징화되며 간경변증을 유발할 수 있다. NASH는 상승한 혈중 지질 수준과 당뇨병 또는 당뇨병 전증을 흔히 갖는 과체중이거나 또는 비만인 중년의 사람들에게 진단되는 경향이 있다.

[0008] 본 발명의 실시양태는 특히 FGF-21 폴리펩티드의 활성 및 제조와 연관된 문제, 개선된 생물학적 또는 약리학적 특성, 예컨대 개선된 치료적 반감기를 갖는 FGF-21 폴리펩티드의 제조, 및 질환과 장애의 치료 또는 예방 방법을 다룬다.

발명의 내용

[0009] 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은: (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 0-12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; 및 (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0010] 또한, 본원에 기재된 임의의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.

[0011] 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은 (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 0-12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; 및 (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입; 및 (iii) 융합 파트너를 포함하는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0012] 또한, 글루코스 및 지질 항상성, 글루코스 흡수, GLUT 1 발현, 및/또는 글루코스, 트리글리세리드, 인슐린 또는 글루카곤의 혈청 농도 중 적어도 하나의 조절을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 글루코스 및 지질 항상성, 글루코스 흡수, GLUT 1 발현, 및/또는 글루코스, 트리글리세리드, 인슐린 또는 글루카곤의 혈청 농도 중 적어도 하나를 조절하는 방법이 본원에 제공된다.

[0013] 또한, 인슐린 감수성의 증가, 아디포넥틴 수준의 증가, 혈중 글루코스 수준의 감소, 글루카곤 수준의 감소, 트리글리세리드 수준의 감소, 프릭토사민 수준의 감소, 저밀도 콜레스테롤 수준의 감소, 또는 C-반응성 단백질 수준의 감소를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자 또는 상기 환자의 혈액 샘플, 혈청 샘플, 또는 또 다른 샘플에서의 인슐린 감수성의 증가, 아디포넥틴 수준의 증가, 혈중 글루코스 수준의 감소, 글루카곤 수준의 감소, 트리글리세리드 수준의 감소, 프릭토사민 수준의 감소, 저밀도 콜레스테롤 수준의 감소, 또는 C-반응성 단백질 수준의 감소 방법이 본원에 제공된다.

[0014] 또한, 비만, 당뇨병, 췌장염, 인슐린 저항성, 고인슐린혈증, 글루코스 불내성, 고혈당증, 대사 증후군, 글루코스 내성 장애, 부적절한 글루코스 클리어런스, 높은 혈중 글루코스, A형 인슐린 저항성, C형 인슐린 저항성 (HAIR-AN 증후군이라고도 함), 랍슨-멘덴할 증후군(Rabson-Mendenhall Syndrome), 도너휴 증후군(Donohue's Syndrome) 또는 레프리코니즘(Leprechaunism), 고안드로겐혈증, 다모증, 또는 흑색 가시세포증, 및 프라더-윌리 증후군(Prader-Willi syndrome)으로부터 선택된 병태 또는 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 상기 병태 또는 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0015] 또한, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병 또는 비만의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 1형 당뇨병, 2형 당뇨병 또는 비만의 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0016] 또한, 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0017] 또한, 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법이 본원에 제공된다.

- [0018] 또한, 간 섬유증 또는 경변증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 간 섬유증 또는 경변증의 치료 방법이 본원에 제공된다.
- [0019] 또한, NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공된다.
- [0020] 또한, NASH 및/또는 간 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제 약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, NASH 및/또는 간 섬유증의 치료 방법이 본원에 제공된다.
- [0021] 또한, 간 지방 비율의 감소를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 간 지방 비율의 감소 방법이 본원에 제공되고, 여기서 임의로 상기 환자는 NASH의 발병 위험이 있거나 또는 NASH 진단을 받았다.
- [0022] 또한, 아디포넥틴 수준 (예컨대, 혈장 총 아디포넥틴 및/또는 고분자량 아디포넥틴)의 증가를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 아디포넥틴 수준 (예컨대, 혈장 총 아디포넥틴 및/또는 고분자량 아디포넥틴)의 증가 방법이 본원에 제공되고, 여기서 임의로 상기 환자는 NASH의 발병 위험이 있거나 또는 NASH 진단을 받았다.
- [0023] 또한, 심부전증 또는 심장성 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 심부전증 또는 심장성 섬유증의 치료 방법이 본원에 제공된다.
- [0024] 또한, 신장 또는 신장성 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 신장 또는 신장성 섬유증의 치료 방법이 본원에 제공된다.
- [0025] 또한, 폐 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 폐 섬유증의 치료 방법이 본원에 제공된다.
- [0026] 또한, 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1-7 및 201로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 인간 FGF-21 폴리펩티드와 적어도 90%의 동일성을 가지며, 섬유증과 연관된 상기 질환은 NASH, 간 섬유증, 당뇨병성 신장 질환, 만성 신장 질환, 신장성 섬유증, 폐 섬유증, 심장성 섬유증, 심부전증, 및 대사성 심부전증으로부터 선택된 것인, 상기 환자에서의 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법이 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1a-b. 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열의 예. 지시된 배열은 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드에 대한 것이다. 전체 폴리펩티드는 각각 N-말단 서열 MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALPGVILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY, 108 위치에서의 지시된 아미노산, "아미노산 109-149"라 표시된 영역의 지시된 서열, 서열 PGILAPQPPDVGSSDPLSM, "아미노산 169-181"이라 표시된 영역의 지시된 서열을 순서대로 포함한다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열은 또한 실시예 4에서도 확인된다.
- 도 2. PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2에 대한 시험관내 FGF-21 활성 (세포-기반 분석법으로 세포의 신호-조절 키나제 (ERK) 1/2의 FGF21-의존성 포스포릴화에 의해 측정됨)의 용량 반응 곡선의 예.
- 도 3. 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 열 안정성 평가를 위해 수행된 시차 주사 열량측정법 (DSC)의 대표 결과. 이 예시에서, PEG화된 화합물 2는 PEG화된 화합물 1보다 대략 8°C 더 높은 전이 중간점 ("Tm") 온도를 갖는 것으로 확인되었다. 열 가역성은 >95%였다 (도시되지 않음).
- 도 4. 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 열 안정성 평가를 위해 수행된 열 주사 형광법 (TSF)의 대표 결과. 이 도면에서, 화합물 10은 화합물 1 (이. 콜라이(*E. coli*)에서의 발현일 경우에 포함되는 N-말단 메티오닌을 제외한 야생형 FGF-21 서열을 가짐)보다 대략 8°C 더 높은 전이 중간점 ("Tm") 온도를 갖는 것으로 확인되었다.
- 도 5. 좌측 패널: PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2에 대하여 25°C에서의 시간에 따른 탈아미드화 (전하

이질성에 의해 지시됨)의 측정. PEG화된 화합물 2는 감소한 전하 이질성 발생을 나타내고, 이는 현저히 느린 탈아미드화를 시사한다. 우측 패널: 각각 pH 7.0의 수크로스/히스티딘 완충액 및 7.5 mg/mL의 단백질 농도에서 PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2에 대하여 40°C에서의 시간에 따른 응집체 형성 (크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정됨)의 측정. PEG화된 화합물 2가 감소한 응집체 형성을 나타냈다. 종합하면, 이러한 결과는 PEG화된 화합물 1보다 PEG화된 화합물 2에 대하여 보다 증가한 저장 안정성 및 보다 고 농도로 제제화되는 능력이 예측되도록 한다.

도 6. pH 6.5의 수크로스/히스티딘 완충액 (상위 패널), pH 7.0의 수크로스/히스티딘 완충액 (중간 패널), 및 pH 8.3의 수크로스/트리스(TRIS) 완충액 (하위 패널)에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 시간에 따른 고분자량 (HMW) 응집체 형성의 측정. HMW 응집체 형성은 pH 8.3보다 pH 6.5 및 pH 7.0에서 더욱 확인하였다. 대부분의 FGF-21 변이체는 PEG화된 화합물 1보다 감소한 HMW 응집체 형성을 나타냈지만, 몇몇 화합물의 경우에는 HMW 응집체 형성이 화합물 1과 유사하거나 또는 그 보다 높았다.

도 7. pH 6.5의 수크로스/히스티딘 완충액 (상위 패널), pH 7.0의 수크로스/히스티딘 완충액 (중간 패널), 및 pH 8.3의 수크로스/트리스 완충액 (하위 패널)에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 탈아미드화 경향 (시간에 따른 산성 변이체의 형성에 의해 지시됨)의 측정. PEG화된 화합물 1과 비교하여, 확인된 모든 화합물이 감소한 하전 산성 변이체 형성을 나타냈고, 이는 감소한 탈아미드화를 시사한다.

도 8. 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대하여 용해도의 측정. 주어진 폴리펩티드 농도에서 고분자량 응집체의 상대적으로 감소한 형성이 보다 높은 용해도를 시사하고, 이는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 유도할 것이다. pH 7.2의 PBS 완충액에서 플러그 유동 여과 분석법을 통해 결정된 단백질 농도 vs. 시험 화합물의 고분자량 (HMW) 화학종의 퍼센트 분율이 관찰된다. 이러한 관찰값 각각에 대하여 선 맞춤처리한 직선 모양의 기울기가 단백질 응집 경향의 추정값으로서 사용되었다.

도 9. 7일의 단백질 및 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 인큐베이션 후에 CD4+ T 세포 증식 반응을 나타내는 공여자의 백분율. 대조군 단백질은 공여된 T 세포 활성화 특성을 갖는 이. 콜라이 발현 단백질이다. 비PEG화 변형된 FGF-21 화합물과 화합물 1 (이. 콜라이에서의 발현일 경우에 포함되는 N-말단 메티오닌을 제외한 야생형 FGF-21 서열을 가짐)을 비교한다. "ConA"는 공여된 면역원성 단백질인 콘카나발린 A의 약어이다.

도 10. ob/ob 마우스에 0.05 mg/kg을 단회 S.C. 투여한 후의 PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2의 약동학 분석. 변형된 FGF-21 화합물의 수준은 전체 및 C-말단 무손상 (활성) 폴리펩티드로서 둘 모두가 측정되었다. PEG화된 화합물 2가 PEG화된 화합물 1보다 C-말단 무손상 형태에 대하여 훨씬 증가한 총 AUC를 나타냈고, 이는 PEG화된 화합물 2의 현저히 감소한 생체내 단백질분해를 시사한다. 결과가 상위 패널에 그래프로 도시되어 있고 약동학 파라미터는 하위 좌측 패널 (PEG화된 화합물 1) 및 하위 우측 패널 (PEG화된 화합물 2)에 표로 나타나 있다.

도 11a-b. 시노몰구스 원숭이(cynomolgus monkey)에 투여한 후의 PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2의 약동학 분석. 변형된 FGF-21 화합물의 수준은 (a) 전체 및 (b) C-말단 무손상 (활성) 폴리펩티드로서 둘 모두가 측정되었다. PEG화된 화합물 2가 PEG화된 화합물 1보다 C-말단 무손상 형태에 대하여 훨씬 증가한 총 AUC를 나타냈고, 이는 PEG화된 화합물 2의 현저히 감소한 생체내 단백질분해를 시사한다.

도 12. ob/ob 마우스에 대한 반복 투여 연구에서 제21일의 비히클을 기준으로 한 당화 헤모글로빈 (HbA1c)의 변화.

도 13. ob/ob 마우스에 대한 반복 투여 연구에서 21일간의 체중.

도 14. ob/ob 마우스에 대한 반복 투여 연구에서 21일간의 체중 변화율 (%).

도 15. ob/ob 마우스에 대한 21일의 반복 투여 연구 동안의 혈장 인슐린 농도.

도 16. ob/ob 마우스에 대한 21일의 반복 투여 연구 동안의 혈장 글루코스 농도.

도 17. 비히클-처리 대조군과의 백분율 차이로서 표시된, ob/ob 마우스에 대한 21일의 반복 투여 연구 동안의 혈장 글루코스 농도 AUC의 변화.

도 18. ob/ob 마우스에 대한 21일의 반복 투여 연구 동안의 혈장 트리글리세리드 농도.

도 19. 스텔릭(Stelic) NASH 마우스 연구에서의 체중 변화.

- 도 20. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 총 사료 소비량.
- 도 21. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 체중.
- 도 22. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 간 중량.
- 도 23. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 간 중량 대 체중 비.
- 도 24. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 전혈 글루코스.
- 도 25. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈장 ALT.
- 도 26. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈장 트리글리세리드.
- 도 27. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈장 총 콜레스테롤.
- 도 28. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 간 트리글리세리드.
- 도 29. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 간 콜레스테롤.
- 도 30a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 HE-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.
- 도 31. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 NAFLD 활동성 점수.
- 도 32a. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 지방증 점수.
- 도 32b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 소염 염증 점수.
- 도 32c. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 간세포 풍선양 점수.
- 도 33a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 시리우스 레드(Sirius red)-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.
- 도 34. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 섬유증 부위.
- 도 35a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 F4/80-면역염색 간 절편의 대표 현미경 사진.
- 도 36. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 염증 부위.
- 도 37a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 오일 레드(Oil red)-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.
- 도 38. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 지방 침적 부위.
- 도 39a-d. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 상대적 유전자 발현. (a) 알파-SMA, (b) TIMP-1, (c) 제1형 콜라겐, 및 (d) TGF- β 의 발현 결과.
- 도 40a-d. Fc 도메인, PKE 어드넥틴(adnectin) 또는 인간 혈청 알부민 폴리펩티드와 융합된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열의 예. "융합 배열"은 N-말단부터 C-말단까지의 융합 단백질의 일반 배향을 기재하고, 이는 상응하는 폴리펩티드 서열을 예시하기 위한 것이며, 제한적이지 않다. HuSA(C34A): 서열식별번호: 321의 아미노산 서열을 갖는 변형된 인간 혈청 알부민; HuSA(C34A; des Leu-585): 서열식별번호: 322의 아미노산 서열을 갖는 변형된 인간 혈청 알부민; PKE(1): 서열식별번호: 319의 아미노산 서열을 갖는 PKE 어드넥틴; PKE(2): 서열식별번호: 320의 아미노산 서열을 갖는 PKE 어드넥틴. 숫자가 이어지는 L은 링커를 지시하고; FGF-21(Cmp. 2)는 내부 결실과 대체 펩티드 (구체적으로, 화합물 2)를 함유하는 FGF-21 서열을 지시하고, FGF-21(Cmp. 1)은 상기 결실과 대체 펩티드 (구체적으로, 화합물 1)가 없는 FGF-21 서열을 지시한다. FGF-21(Cmp. 1) 및 FGF-21(Cmp. 2)는 화합물 1 및 2에 함유된 N-말단 메티오닌을 포함하거나 또는 그러한 N-말단 메티오닌이 없을 수 있다. Fc 폴리펩티드 서열의 변이체 형태는 삽입구로서, 예를 들어 Fc(hIgG1a₁₉₁)로서 확인된다. FGF-21-1aa(Cmp. 2) 및 FGF-21-3aa(Cmp. 2)의 표기는 C-말단으로부터 언급된 숫자의 아미노산 (각각, 1 또는 3)이 결실되어 변형된 화합물 2 서열을 나타낸다.
- 도 41. 어드넥틴 융합 파트너와 융합된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도의 측정. 주어진 폴리펩티드 농도에서 고분자량 응집체의 상대적으로 감소한 형성이 보다 높은 용해도를 시사하고, 이는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 유도할 것이다. pH 7.2의 PBS 완충액에서 플러그 유동 여과 분석법을 통해 결정된 단백질 농도 vs. 시험 화합물의 고분자량 (HMW) 화학종의 퍼센트 분율이 관찰된다. 이러한 관찰값 각각에 대하여 선 맞춤처리한 직선 모양의 기울기가 단백질 응집 경향의 추정값으로서 사용되었다.
- 도 42a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 체중. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 ("PEG-

Cmpd") 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 43a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 간 중량. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 간 중량은 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$).

도 44a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 간 중량 대 체중 비. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 간 중량 대 체중 비는 9-12주 또는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 (각각, $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

도 45a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 우측 신장 중량. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 46a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 좌측 신장 중량. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 47a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 전혈 글루코스. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 전혈 글루코스는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).

도 48a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 혈장 ALT. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 혈장 ALT는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$).

도 49a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 혈장 트리글리세리드. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 50a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 혈장 총 콜레스테롤. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 51a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 간 트리글리세리드. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 간 트리글리세리드는 9-12주 또는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 (각각, $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

도 52a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 간 콜레스테롤. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 간 콜레스테롤은 9-12주 또는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 (각각, $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

도 53a-h. 비히클 (a-b) 또는 PEG-화합물 1 (c-d)로 9-12주 동안 처리된 마우스, 및 비히클 (e-f) 또는 PEG-화합물 1 (g-h)로 9-15주 동안 처리된 마우스의 HE-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.

도 54a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 NAFLD 활동성 점수. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. NAFLD 활동성 점수는 9-12주 또는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 (각각, $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

도 55a-h. 비히클 (a-b) 또는 PEG-화합물 1 (c-d)로 9-12주 동안 처리된 마우스, 및 비히클 (e-f) 또는 PEG-화합물 1 (g-h)로 9-15주 동안 처리된 마우스의 시리우스 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.

도 56a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 간 섬유증 부위의 요약. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 섬유증 부위는 9-15주 동안 PEG-화합물 1로 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).

도 57a-h. 비히클 (a-b) 또는 PEG-화합물 1 (c-d)로 9-12주 동안 처리된 마우스, 및 비히클 (e-f) 또는 PEG-화합물 1 (g-h)로 9-15주 동안 처리된 마우스의 F4/80-면역염색 간의 대표 현미경 사진.

도 58a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 염증 부위의 요약. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화

합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교.

도 59a-h. 비히클 (a-b) 또는 PEG-화합물 1 (c-d)로 9-12주 동안 처리된 마우스, 및 비히클 (e-f) 또는 PEG-화합물 1 (g-h)로 9-15주 동안 처리된 마우스의 오일 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진.

도 60a-b. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 처리 군의 지방 침적 부위의 요약. a. 9-12주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. b. 9-15주 동안 비히클 또는 PEG-화합물 1로 처리된 마우스의 비교. 지방 침적 부위는 9-12주 또는 9-15주에 걸쳐서 처리된 마우스에 대하여 유의하게 감소하였다 (양쪽 모두 $p < 0.001$).

도 61. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈청 총 아디포넥틴 측정. 혈청 총 아디포넥틴은 5-9주 또는 7-9주간 처리된 마우스로부터의 최종 혈장 샘플에서, 비히클-처리 마우스와 비교하여 3.0 mg/kg의 PEG-화합물 1로 처리된 마우스에서 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$, 던넛의 T 검정(Dunnett's TTEST)).

도 62. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈청 총 아디포넥틴 측정. 혈청 총 아디포넥틴은 12주 또는 15주의 마우스로부터의 최종 혈장 샘플에서, 비히클-처리 마우스와 비교하여 3.0 mg/kg의 PEG-화합물 1로 처리된 마우스에서 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$, 던넛의 T 검정).

도 63. 5 h Elk1-루시퍼라제 분석법에서 3종의 FGF21 변이체: N-말단 His-태그부착 화합물 1 (His-Cmpd 1), PEG-화합물 1 (PEG-Cmpd 1) 및 PEG-화합물 2 (PEG-Cmpd 2)에 대한 농도-반응 곡선. 값은 실험마다 3 또는 4개의 복제물을 갖는 6개의 독립 실험의 값이다. Z' 값은 0.6 내지 0.9에서 달라지는데, 이는 허용가능한 분석 품질을 시사한다 ($Z' > 0.5$).

도 64. 세포-기반 Elk1-루시퍼라제 분석법에서 측정된 FGF-21 변이체의 효능. 각각의 데이터 포인트가 개별 복제물을 지시하고 수평 바는 평균 값을 나타낸다. 값은 몰 단위의 측정된 EC_{50} 값의 밀수가 10인 로그값으로서 표시된다.

도 65. C57BL/6J 마우스의 체중 변화율 (%)에 대한 PEG-화합물 2의 단회 급성 투여의 영향. C57BL/6J 마우스를 비히클 (250 mM 수크로스/20 mM 트리스, pH 8.3), 또는 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 mg/kg의 PEG-화합물 2로 처리하였다 ($n = 10$ /군). SC 투여 후 기준선 (0), 24, 48, 72 및 144 h에서의 C57BL/6J 마우스의 체중 변화율 (%)을 결정하였다. 모든 값은 평균 $\pm$ SEM이며, 비히클을 기준으로 한 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 이다 (일원 ANOVA 후의 던넛 검정).

도 66a. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 PEG-화합물 2의 단회 급성 투여의 영향. SC 투여 후 기준선 (0), 24, 48, 72 및 144 h에서의 혈장 총 아디포넥틴 농도를 결정하였다. 비-공복 C57BL/6J 마우스를 비히클 (250 mM 수크로스/20 mM 트리스, pH 8.3), 또는 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 mg/kg의 PEG-화합물 2로 처리하였다 ($n = 10$ /군). 모든 값은 평균 $\pm$ SEM이며, 비히클을 기준으로 한 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 이다 (일원 ANOVA 후의 던넛법).

도 66b. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴 변화율 (%)에 대한 PEG-화합물 2의 단회 급성 투여의 영향. C57BL/6J 마우스를 비히클 (250 mM 수크로스/20 mM 트리스, pH 8.3), 또는 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 mg/kg의 PEG-화합물 2로 처리하였다 ($n = 10$ /군). 혈장 총 아디포넥틴 농도를 SC 투여 후 기준선, 24, 48, 72 및 144 h에서 결정하고, 기준선으로부터의 변화율 (%)을 결정하였다. 모든 값은 평균 $\pm$ SEM이며, 비히클을 기준으로 한 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 이다 (일원 ANOVA 후의 던넛 검정).

도 67a. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. PEG-화합물 2와 PEG-화합물 20 처리 모두는 0.3 및 1 mpk 용량 모두의 투여 후 6일에 총 혈장 아디포넥틴의 유의한 증가를 초래하였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 67b. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 54.3 nmol/kg 용량의 PEG-화합물 2, 화합물 105, 및 화합물 112는 제3일 및 제6일에 비히클-처리 대조군의 총 아디포넥틴 변화 백분율과 비교하여 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 유의하게 증가시켰다.

도 67c. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 18.1 및 54.3 nmol/kg 용량의 화합물 182는 모두 제3일 및 제6일에 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 유의하게 증가시켰다 (비히클 대조군에서 관찰된 변화 백분율과 비교).

도 67d. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 화합물 171과 화합물 181은 모

두 비히클-처리 대조군과 비교하여, 투여 후 3일 및 6일에 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율을 용량-의존성 방식으로 유의하게 증가시켰다.

도 67e. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율 (비히클과 비교)은 18.1 nmol/kg 및 54.3 nmol/kg의 화합물 170에 의해 제3일 및 제6일에 유의하게 증가하였다.

도 67f. C57BL/6J 마우스의 혈장 총 아디포넥틴에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 10 mg/kg 용량의 PEG-화합물 1은 비히클-처리 대조군과 비교하여 제3일 및 제6일에 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율을 유의하게 증가시켰다.

도 68. 알부민뇨 (요중 ACR)에 대한 PEG-화합물 2의 영향. # $P < 0.05$, 질환 (unix db/db, 비히클, $n = 9-10$) vs. 정상 (db/m 정상군(lean), $n = 10-12$). * $P < 0.05$, PEG-화합물 2 ($n = 13-14$) vs. 비히클. 각각의 쌍에 대하여 각각의 시점에서의 ANOVA와 던넛의 사후 검정. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M.으로서 표시된다.

도 69. 이소프로테레놀 및 PEG-화합물 2의 3주 처리에서의 심장의 히드록시프로틴 (HP) 함량이 도시되어 있다. 각각의 데이터 포인트는 단백질에 대하여 정규화된 개별 마우스의 전체 심장 HP 함량을 나타낸다. *: $P < 0.05$, vs 모의 대조군(Sham) + 비히클, **: $P < 0.05$, vs Iso + 비히클 (일원 ANOVA 후의 본페로니 검정(Bonferroni's test)).

도 70a-c. 스텔릭 NASH 마우스 연구에서의 혈청 총 아디포넥틴 (도 70a), 혈청 고분자량 (HMW) 아디포넥틴 (도 70b), 및 HMW 아디포넥틴 대 총 아디포넥틴의 비 (도 70c)에 대한 FGF-21 변이체의 영향. 모든 값은 평균 $\pm$ SEM이다.

도 71a-b. NASH 동물 모델에서의 간 중량 (도 71a) 및 간 중량 대 체중 (BW) 비 (도 71b).

도 72. NASH 동물 모델에서의 FGF-21 변이체의 영향. PEG화된 화합물 1 ("PEG-Cmpd 1"), PEG화된 화합물 2 ("PEG-Cmpd 2") 또는 화합물 170 ("Cmpd 170")의 처리 후에, 동물을 체중 (도 72a), 간 중량 (도 72b), 간 중량 대 체중 비 (도 72c), 간 트리글리세리드 (도 72d), 혈장 ALT (도 72e), 간 콜레스테롤 (도 72f), 및 혈장 트리글리세리드 (도 72g)에 대하여 평가하였다. 비히클-처리 대조군과의 통계적으로 유의한 차이는 도시된 바와 같다. n.s.: 통계적으로 유의하지 않은 차이가 검출됨 (즉, $P \geq 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본원과 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "하나의", "한" 및 "그"는, 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 언급 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "FGF-21", "FGF-21 폴리펩티드" 또는 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"를 언급하는 것은 1개 이상의 이러한 단백질을 언급하는 것이며 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 이들의 등가물 등을 포함한다.

달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

정상혈당증: 본 개시내용에서, 정상혈당증 또는 정상혈당농도라는 용어는 정상적인 혈중 글루코스 농도를 갖는 상태를 말한다. 인간에서의 정상적인 혈중 글루코스 농도의 예는 공복의 성인에서는 70 mg/dl 내지 99 mg/dl이고, 식후의 성인에서는 70 mg/dl 내지 140 mg/dl이다. 지속적인 정상혈당증은 광범위한 기간 동안, 예를 들어 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월 동안, 또는 그보다 길게, 예를 들어 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 이용하여 진행 중인 치료 동안에 정상혈당이 유지되는 것을 말한다.

용어 "반감기 연장 모이어티" (본원에서 "HLEM"이라고도 함)는, 임의로 비-자연 코딩 아미노산을 통해 직접적으로 또는 링커를 통해 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 공유 연결 ("접합" 또는 "융합")되는 제약상 허용되는 모이어티, 도메인 또는 분자를 말하고, 이들은 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 비접합 형태 또는 야생형 FGF-21 폴리펩티드와 같은 비교체와 비교하여, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생체내 단백질분해 열화 또는 다른 활성-약화 화학적 변형을 방지 또는 완화시키고/거나, 반감기를 증가시키고/거나, 흡수율 증가, 독성 감소, 용해도 개선, 단백질 응집 감소, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성 및/또는 표적 선택성 증가, 제조가능성 증가, 및/또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 면역원성 감소를 비제한적으로 포함하는 다른 약동학적 또는 생물물리학적 특성을 개선 또는 변경시킨다. 용어 "반감기 연장 모이어티"는 비-단백질성의 반감기 연장 모이어

티, 예컨대 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 불연속형 PEG, 히드록시에틸 전분 (HES), 지질, 분지형 또는 비분지형 아실 기, 분지형 또는 비분지형 C8-C30 아실 기, 분지형 또는 비분지형 알킬 기, 및 분지형 또는 비분지형 C8-C30 알킬 기; 및 단백질성의 반감기 연장 모이어티, 예컨대 혈청 알부민, 트랜스페린, 어드넥틴 (예를 들어, 알부민-결합 또는 약동학 연장 (PKE) 어드넥틴), Fc 도메인, 및 비구조화 폴리펩티드, 예컨대 XTEN 및 PAS 폴리펩티드 (예를 들어, 아미노산 Pro, Ala, 및/또는 Ser으로 구성된 입체구조적으로 무질서한 폴리펩티드 서열), 및 상기 중 임의의 것의 단편을 포함한다. FGF-21 또는 FGF 패밀리 구성원(들)의 결정 구조와 그의 FGF 수용체와의 상호작용에 관한 검사가 어떤 특정한 아미노산 잔기가 용매에 완전히 또는 부분적으로 접근가능한 측쇄를 갖는지를 지시할 수 있다. 이러한 위치에서의 비-자연 코딩 아미노산의 측쇄는 단백질 표면으로부터 떨어져 용매쪽으로 향하므로, 예를 들어 수용성 중합체와 연결될 수 있다.

[0033] 본원에 사용된 용어 "알부민 결합 모이어티"는 알부민과 결합할 수 있는 임의의 화학적 기를 말하는 것으로서, 즉 알부민 결합 친화도를 갖는, 예를 들어 알부민-결합 또는 PKE 어드넥틴이다.

[0034] "알부민 결합 친화도"는 관련 기술분야에서 공지된 여러 방법에 의해 결정될 수 있다. 하나의 방법에서, 측정되는 화합물은 예를 들어 125I 또는 3H로 방사성 표지되어 고정화된 알부민과 함께 인큐베이션된다 (Kurtzhals et al., Biochem.J., 312, 725-731 (1995)). 표준물과 비교하여 화합물의 결합을 계산한다. 또 다른 방법에서는 관련 화합물이 방사성 표지되고, 예를 들어 SPA 비드 (섬광 근접 측정 비드, 퍼킨엘머(PerkinElmer) cat no. RPNQ0001) 상에 고정화된 알부민과의 결합이 측정될 화합물의 연속 희석액에 의해 경쟁한다. 경쟁에 있어서의 EC50 값이 화합물의 친화도의 척도이다. 제3의 방법에서는, 화합물의 수용체 친화도 또는 효능이 상이한 농도의 알부민에서 측정되고, 알부민 농도의 함수로서 화합물의 상대 친화도 또는 효능에 있어서의 변동이 그의 알부민에 대한 친화도를 반영한다.

[0035] 용어 "열 안정성"은 가열되었을 때 폴립에 저항하는 폴리펩티드의 능력을 말한다. 일반적으로, 분자의 열 안정성이 클수록 폴리펩티드가 폴립에 필요한 온도가 높다. 폴리펩티드의 열 안정성을 결정하는 예시 방법은 본원에서 실시예 6에 기재되어 있는 시차 주사 열량측정법 (DSC) 및 열 주사 형광법이다. 열 안정성은 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 증가한 열 안정성을 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0036] 용어 "응집"은 다른 분자 (예컨대, 동일한 폴리펩티드의 다른 분자)와 비-공유 연결되어 복합체를 형성함으로써, 고분자량 복합체를 형성하는 폴리펩티드의 경향을 말한다. 응집체의 형성을 측정하는 예시 방법은 본원에서 실시예 7에 기재되어 있는 분석용 크기 배제 크로마토그래피를 포함한다. 상대적인 응집 양은 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 감소한 응집을 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0037] 용어 "탈아미드화"는 탈아미드화 반응을 자발적으로 진행함으로써, 아미노산의 화학적 구조가 변화하고, 또한 폴리펩티드의 기능에 잠재적으로 영향을 미치는 폴리펩티드 내 아미노산 잔기의 경향을 말한다. 탈아미드화를 측정하는 예시 방법은 본원에서 실시예 7에 기재되어 있는 영상화 모세관 등전점 측정법 (icIEF)을 포함한다. 상대적인 탈아미드화 양은 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 감소한 탈아미드화를 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0038] 용어 "생체내 단백질분해"는 생명 체계에 도입되었을 때 (예를 들어, 유기체에 주입되었을 때), 상기 유기체에서 발생하는 프로테아제로부터 기인할 수 있는 폴리펩티드의 절단을 말한다. 단백질분해는 폴리펩티드의 생물학적 활성 또는 반감기에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 야생형 FGF-21은 C-말단에서의 절단을 진행하여, 말단절단된 불활성 폴리펩티드를 초래할 수 있다. FGF-21의 생체내 단백질분해를 측정하는 예시 방법은 본원에서 실시예 10에 기재되어 있는 메조 스케일 디스커버리 (Meso Scale Discovery; MSD)-기반 전기화학 발광 면역흡착 분석법 (ECLIA)이다. 상대적인 생체내 단백질분해 양은 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 감소한 생체내 단백질분해를 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0039] 용어 "용해도"는 또 다른 물질에 용해될 수 있는 물질의 양, 예를 들어 수용액에 용해될 수 있는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 양을 말한다. 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도를 측정하는 예시 방법은 본원에서 실시예 8에 기재되어 있는 플러그 유동 용해도 시험이다. 상대 용해도는 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 증가한 용해도를 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0040] 용어 "생물학적 활성"은 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포손, 프리온, 곤충, 진균, 식물, 동물 및 인간을 비제한적으로 포함하는 유기체와 관련하여 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미치는 분자의 능력을 말한다. 예를 들어, 비변형 또는 변형된 FGF-21의 문맥에서, 생물학적 활성은 본원에 기재된 FGF-21에 의해 수행되는 임의의 기능을 포함한다. 분자가 야생형 FGF-21

(예컨대, 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드)의 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는지를 결정하는 예시 방법은 실시예 5에 기재되어 있는 시험관내 분석법 또는 실시예 17에 기재되어 있는 시험관내 분석법을 포함할 수 있다. 상대적인 생물학적 활성 수준은 비교체 화합물과 비교하여 결정되어, 예를 들어 생물학적 활성을 갖거나 또는 의도된 치료용 용도를 위해 충분히 높은 생물학적 활성을 갖는, 예를 들어 비교체의 EC50보다 5배 미만으로, 10배, 20배 미만으로, 50배 미만으로, 또는 100배 미만으로 더 높은 EC50을 갖는 폴리펩티드를 확인할 수 있다.

[0041] 본원에 기재된 비교체 화합물은 변형, 예컨대 본원에 기재된 변형이 없는 또 다른 서열일 수 있다. 예를 들어, 비교체 화합물은 내부 결실이 없거나, 대체 펩티드가 없거나, 또는 융합 파트너가 없는 동일한 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열일 수 있다. 비교체 화합물의 예는 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드, 서열식별번호: 201의 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비교체 화합물을 비제한적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 비교체 화합물은 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 반감기 연장 모이어티 (예를 들어, PEG)와 연결될 수 있는, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비교체 화합물은 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 반감기 연장 모이어티 (예를 들어, PEG)와 연결되지 않을 수 있는, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비교체 화합물은 추가의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 PEG화 또는 비PEG화 형태의 비교가 수행될 수 있고; 전자의 경우에는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하거나 또는 포함하지 않는 폴리펩티드의 비교가 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비교체 화합물은 융합 파트너 없이, 펩티드에 의해 임의로 대체되는 내부 결실 (예를 들어, 비교체가 비교되는 화합물에서의 동일한 내부 결실 및 대체 펩티드)을 함유할 수 있다.

[0042] 용어 "Fc", "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 Fc 도메인 또는 그의 단편을 말한다. Fc는 천연으로 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 천연 Fc 영역, 또는 적어도 1개의 아미노산이 천연 Fc 영역과 상이한 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc는 천연 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 1개의 아미노산 치환을 가지며, 예를 들어 천연 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 20개, 약 1 내지 약 10개, 또는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 갖는다. 본원에서 Fc 영역은 천연 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 천연 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 90%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 천연 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다. Fc 영역의 아미노산 서열의 예는 서열식별번호: 302 및 323-335를 포함한다. Fc 영역의 도메인 또는 단편의 예는 서열식별번호: 303-309의 폴리펩티드를 포함한다.

[0043] 본원에 사용된 "기능적 Fc 영역"은 FcRn을 결합시키는 능력을 보유하는 Fc 도메인 또는 그의 단편을 말한다.

[0044] 용어 "상응하는"은 기준 서열과의 비교에 의해 확인되는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 내의 위치 ("~에 상응하는 위치" 또는 "상응하는 위치") 또는 영역 ("~에 상응하는 영역" 또는 "상응하는 영역")을 말한다. 기준 서열은 야생형 또는 비변형 서열, 예컨대 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드일 수 있다. 상응하는 위치 또는 영역은 기준 서열과의 서열 정렬에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 서열에서의 "서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치"는, 상기 서열이 서열식별번호: 1과 정렬되었을 때 서열식별번호: 1에서의 아미노산 108과 동일한 정렬 컬럼에 있는 서열 내 위치를 말한다. 정렬시, 아미노산 또는 뉴클레오티드는 기준 서열에서의 상응하는 위치의 아미노산 또는 뉴클레오티드와 매칭되거나 또는 매칭되지 않을 수 있다. 상응하는 영역의 결실을 언급할 때 정렬은, 결실된 영역이 결실된 영역의 부분과 잠재적으로 정렬될 수 있는 대체 펩티드에 의해 대체되지 않았다면, 결실된 영역 내 각각의 위치에 상응하는 정렬 컬럼에서 공백을 함유할 수 있다. 따라서, 대체 펩티드에 의해 대체되는 결실의 경우에, 대체 펩티드는 정렬을 수행할 때 서열로부터 누락되어, 정렬이 결실된 영역에 걸쳐서 공백을 함유하여야 한다. 별법으로, 대체 펩티드는, 존재하는 경우에, 상응하는 영역을 확인할 때 무시할 수 있다.

[0045] 상응하는 위치 또는 상응하는 영역을 확인하는데 사용되는 정렬은 통상의 정렬 알고리즘, 예컨대 블래스트 (Blast) (Altschul et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10), 스미스-워터만 (Smith-Waterman) (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25;147(1):195-7), 또는 니들만-브니쉬 (Needleman-Wunsch) (Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53)를 사용하여 얻을 수 있다. 니들만-브니쉬 알고리즘은 최고-점수의 전역 정렬 (즉, 정렬이 공백에서 시작하고/거나 종료될 수 있지만, 양쪽 서열의 모든 잔기를 함유하는 정렬)을 얻기 위해 사용될 수 있다. 블래스트, 스미스-워터만 또는 니들만-브니쉬 중 어느 것이 이용되든지,

최고 점수의 정렬은 "디폴트" 파라미터, 예컨대 BLOSUM62 점수표, 공백 발생 벌점 11, 및 공백 확장 벌점 1과 (쌍별 정렬을 위해 블래스트를 사용할 경우) 워드 크기 3을 사용하여 확인될 수 있다.

[0046] "영역"은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 연속적인 부분을 말한다. 영역은 서열 내 영역의 시작 위치와 종료 위치를 특정하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 내의 2개의 위치에 의해 확인될 수 있다. 달리 특정되지 않는 한, 영역은 기준 서열 내의 영역을 한정하는 위치를 포괄하는데, 즉 주어진 시작 위치와 종료 위치를 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 1의 영역 119-130은 아미노산 119 및 130을 포함하여, 아미노산 119에서 시작되고 아미노산 130에서 종료되는 서열식별번호: 1의 부분을 말하고, 이것은 서열 PGNKSPHRDPAP (서열식별번호: 73)를 갖는다.

[0047] 용어 "결실"은 1개 이상의 (또는 특정된 개수의) 연속적인 아미노산 또는 뉴클레오티드가 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드로부터 제거된 것을 말한다. "내부 결실"은 폴리펩티드의 N- 또는 C-말단, 또는 폴리뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단을 포함하지 않는 결실을 말한다. 결실 또는 내부 결실은 기준 서열과 비교하여 결실의 시작 위치와 종료 위치를 특정함으로써 확인될 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 관련하여, 내부 결실의 언급은 일반적으로 기준 FGF-21 폴리펩티드와 비교한 영역의 결실, 예컨대 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드의 위치, 예를 들어 서열식별번호: 1의 아미노산 위치 119-130 (즉, PGNKSPHRDPAP (서열식별번호: 73))에 상응하는 영역의 결실을 특정한다.

[0048] "대체 펩티드"는 폴리펩티드 내의 내부 결실 또는 다른 결실 대신에 삽입되는 아미노산을 말한다. 대체 펩티드의 길이는 내부 결실의 길이와 상이할 수 있다. 대체 펩티드의 예는 1개 이상의 글리신, 세린 및 히스티딘 잔기와, 또한 일부 경우에는 추가의 아미노산 잔기, 예컨대 리신 및 프롤린을 포함할 수 있다. 그러나, 대체 펩티드가 이러한 특정 아미노산을 함유하는 서열로 제한되지 않으며, 오히려 임의의 천연 아미노산 또는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 대체 펩티드는 임의의 길이, 예를 들어 단일 아미노산 (즉, 1개 아미노산의 길이를 가짐), 2개 이상의 아미노산, 또는 3개 이상의 아미노산 길이일 수 있다. 0개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드는 대체 펩티드가 존재하지 않는다는 것을 지시한다. 일부 실시양태에서, 대체 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 대체 폴리펩티드는 1-10, 1-7, 1-5, 또는 1-3개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 대체 폴리펩티드는 2-7, 2-5 또는 2-3개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 대체 폴리펩티드는 3개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 대체 펩티드의 예는 서열 G, GG, SG, GSG, GGH, SGG, GSGH (서열식별번호: 343), HSG, HHS (서열식별번호: 344), HGSH (서열식별번호: 345), GSGP (서열식별번호: 346), HGG, HSGG (서열식별번호: 347), 및 HGSG (서열식별번호: 348)를 포함한다. 추가의 대체 펩티드의 예는 서열 K, DKS, HKS, D, Q, KDS 및 KDSQ (서열식별번호: 349)를 포함한다.

[0049] "융합 파트너"는 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 융합되는 펩티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 융합 파트너는 N- 및/또는 C-말단에서 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 융합될 수 있다. 융합 파트너의 예는 알부민, 트랜스페린, 어드넥틴 (예를 들어, 알부민-결합 또는 약동학 연장 (PKE) 어드넥틴), Fc 도메인, 및 비구조화 폴리펩티드, 예컨대 XTEN 및 PAS 폴리펩티드 (예를 들어, 아미노산 Pro, Ala, 및/또는 Ser으로 구성된 입체구조적으로 무질서한 폴리펩티드 서열), 또는 상기 중 임의의 것의 단편을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 융합 파트너는 정제, 제조가능성, 반감기 연장, 생물물리학적 특성 (예를 들어, 용해도 또는 안정성)의 향상, 면역원성 또는 독성의 감소 등을 비제한적으로 포함하는 임의의 목적을 위해 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 융합될 수 있다.

[0050] "연결 펩티드"는 다른 펩티드 또는 폴리펩티드와 융합되는 N- 및 C-말단을 둘다 모두 갖는 아미노산 서열을 말한다. 연결 펩티드는, 예를 들어 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 융합 파트너와 (어느 순서로든) 융합되는 말단을 가지면서, 융합 단백질에 존재할 수 있다. 연결 펩티드의 예는 0개 아미노산 (즉, 연결 펩티드가 존재하지 않음) 내지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 또는 100개 아미노산, 또는 그 초과인 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 1 내지 40개, 1 내지 30개, 1 내지 20개, 1 내지 10개, 1 내지 5개, 2 내지 40개, 2 내지 30개, 2 내지 20개, 2 내지 10개, 5 내지 40개, 5 내지 30개, 5 내지 20개, 또는 5 내지 10개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 5 내지 20개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 10 내지 20개의 아미노산을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 연결 펩티드의 특정 예는 세린 및 글리신 잔기가 풍부할 수 있으나, 연결 펩티드가 이러한 서열로 제한되지는 않는다는 것을 이해하여야 한다. 예시 연결 펩티드는 하기 서열을 포함한다: GAGGGGSG (서열식별번호: 74), EPKSSD (서열식별번호: 75), D, ESPKAQASSVPTAQPAEGLA (서열식별번호: 76), ELQLEESAAEAQDGELD (서열식별번호: 77), GQPDEPGGS

(서열식별번호: 78), GSGSGSGSGSGS (서열식별번호: 79), ELQLEESAAEAQEGELE (서열식별번호: 80), GSGSG (서열식별번호: 81), GSGC (서열식별번호: 82), AGGGGSG (서열식별번호: 83), GSGS (서열식별번호: 84), QPDEPGGS (서열식별번호: 85), GSGSGS (서열식별번호: 86), TVAAPS (서열식별번호: 87), KAGGGGSG (서열식별번호: 88), KSGSGSGSGSGS (서열식별번호: 89), KQPDEPGGS (서열식별번호: 90), KELQLEESAAEAQDGELD (서열식별번호: 91), KTVAAPS (서열식별번호: 92), KAGGGGSGG (서열식별번호: 93), KSGSGSGSGSGSG (서열식별번호: 94), KQPDEPGGS (서열식별번호: 95), KELQLEESAAEAQDGELDG (서열식별번호: 96), KTVAAPSG AGGGGSGG (서열식별번호: 97), AGGGGSG (서열식별번호: 98), GSGSGSGSGSGSG (서열식별번호: 99), QPDEPGSG (서열식별번호: 100), TVAAPSG (서열식별번호: 301), GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (서열식별번호: 350), PSPEPTPEPPSP (서열식별번호: 351), ELQLEESAAEAQEGELE (서열식별번호: 352), SSGGGSGGGSGGGSG (서열식별번호: 353), GS (서열식별번호: 354), GGGGS (서열식별번호: 355), EEEEEDEED (서열식별번호: 356), PSPEPTPEP (서열식별번호: 357), GSHHHHHHHHGS (서열식별번호: 358), GGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 359), GGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 360), GSGSGSGSGSGSGSGS (서열식별번호: 361), PSTPTPSPSTPTPSPS (서열식별번호: 362), RGEEKKKKEKEKEEERETKTP (서열식별번호: 363), GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 364), PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP (서열식별번호: 365), PSTPTPSPSTPTPSPSPSTPTPSPSTPTPSPS (서열식별번호: 366), PSPEP (서열식별번호: 367), PSPEPTPEPPSPPEPTPEP (서열식별번호: 368), PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP (서열식별번호: 369), PTPEPPSPPEPTPEPPSP (서열식별번호: 370), PSPEPGGSPTPEP (서열식별번호: 371), PSPEEEDPTPEP (서열식별번호: 372), PSPEPTPEEEDPSPEPTPEP (서열식별번호: 373), PTPEPPSPPEPTPEEEDPSPEPTPEPPSP (서열식별번호: 374), PTPEPPSPPEPTPEPGGSGSPPEPTPEPPSP (서열식별번호: 375), PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSP (서열식별번호: 376), GETGS (서열식별번호: 377), GGGGSGGGGS (서열식별번호: 378), GETGSSGEGT (서열식별번호: 379), GETGSSGEGTGSTGS (서열식별번호: 380), GGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 381), GETGSSGEGTGSTGSGAGES (서열식별번호: 382), 및 GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS (서열식별번호: 383), 즉 서열식별번호: 74-100, 301 및 350-383.

[0051] 용어 "섬유증과 연관된 질환"은 섬유증이 발생한 것으로 관찰되었거나 또는 섬유증이 질환의 원인, 진행 또는 증상과 연관있거나 또는 그에 기여하는 것으로 공지되었거나 또는 그렇게 생각되는, 또는 질환이 진행될수록 섬유증이 발생하는 것으로 공지되었거나 또는 그렇게 생각되는 질환, 장애 및 병태를 포함한다. 섬유증은 췌장, 폐, 심장, 신장, 간, 눈, 신경계, 골수, 림프절, 심근내막 또는 후복막과 같은 기관 또는 조직에 영향을 미칠 수 있다. 섬유증과 연관된 질환의 예는 비알콜성 지방간염 (NASH), 간 섬유증, 경변증 전증, 경변증, 미만성 실질성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 폐 또는 폐성 섬유증, 진행성 괴상 섬유증, 특발성 폐성 섬유증, 주입 섬유증, 신장 또는 신장성 섬유증, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 초점성 분절성 사구체경화증, 막성 신증, IgA 신증, 골수섬유증, 심부전증, 대사성 심부전증, 심장성 섬유증, 백내장 섬유증, 백내장, 안내 반흔, 췌장 섬유증, 피부 섬유증, 장 섬유증, 장 협착, 심근내막 섬유증, 심방 섬유증, 중격 섬유증, 크론병, 후복막 섬유증, 켈로이드, 신원성 전신 섬유증, 피부경화증, 전신 경화증, 관절섬유증, 페이로니 증후군(Peyronie's syndrome), 듀프이트렌 구축(Dupuytren's contracture), 당뇨병성 신경병증, 유착성 관절낭염, 알콜성 간 질환, 지방간, 바이러스성 간염, 담관 질환, 원발성 혈색소증, 약물-관련 경변증, 잠복성 경변증, 윌슨병(Wilson's disease), 및 알파 1-항트립신 결핍증, 간질성 폐 질환 (ILD), 인간 섬유증 폐 질환, 황반 변성, 망막병증, 유리체 망막병증, 심근 섬유증, 그레이브스 안병증(Grave's ophthalmopathy), 약물 유발성 맥각중독증, 심혈관 질환, 아테롬성 동맥경화증/재협착증, 비후성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 및 염증성 장 질환 (콜라겐성 결장염을 비제한적으로 포함함)을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 간 섬유증, 신장 또는 신장성 섬유증, 폐 또는 폐성 섬유증, 및 심장 또는 심장성 섬유증을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 간 섬유증일 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 NASH일 수 있다.

[0052] "의학적으로 합병된 비만" (때로는 "병적 비만"이라고도 함)이라는 어구는 일반적으로 비만과 관련있거나 또는 비만에 의해 유발되는 건강 합병증을 또한 갖는 비만 개체 부분집합의 병태를 말한다. 비만은 체질량 지수 (킬로그램 단위의 체중을 미터 단위의 신장의 제곱으로 나눈 값)를 결정함으로써 판단될 수 있고, 30 m/kg² 이상의 체질량 지수가 비만을 나타낸다. 의학적으로 합병된 비만에서 나타나는 건강 합병증의 예는 2형 진성 당뇨병, 고혈압, 폐쇄성 수면 무호흡증, 관상 동맥 질환 및 다른 심혈관 질환 (관상 동맥 질환, 졸중 및 율혈성 심부전증을 포함함), 및 이상지질혈증 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 나타날 수 있는 추가의 건강 합병증은 비알콜성 지방 간 질환 (예컨대, 지방증, 지방간염 또는 경변증), 호흡기 질환, 폐쇄성 수면 무호흡증, 비만-호흡저하 증후군, 천식, 구속성 폐 질환, 암, 골관절염, 당뇨병, 위식도 역류 질환, 부인과 장애, 불임, 비정상 월경, 정

맥 울혈, 피부 문제, 간질환, 봉와직염, 수술 또는 임신 중의 합병증 위험 증가, 요실금 및 특발성 두개내 고혈압을 포함한다. 의학적으로 합병된 비만은 또한 프라더-윌리 증후군과 연관있을 수 있다.

[0053] 용어 "실질적으로 정제된"은 자연 발생 환경에서, 즉 천연 세포에서, 또는 재조합 생산되는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 경우에는 숙주 세포에서 발견되는, 단백질과 보통 동반되거나 또는 상호작용하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않을 수 있는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 말한다. 세포내 물질이 실질적으로 존재하지 않을 수 있는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 (건조 중량 기준)의 오염 단백질을 갖는 단백질 제제를 포함한다. 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 그의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합 발생하는 경우에, 단백질은 세포 건조 중량의 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1%, 또는 그 미만으로 존재할 수 있다. 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 그의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합 발생하는 경우에, 단백질은 세포의 건조 중량을 기준으로 약 5 g/L, 약 4 g/L, 약 3 g/L, 약 2 g/L, 약 1 g/L, 약 750 mg/L, 약 500 mg/L, 약 250 mg/L, 약 100 mg/L, 약 50 mg/L, 약 10 mg/L 또는 약 1 mg/L 또는 그 미만으로 배양 배지에 존재할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법에 의해 발생된, "실질적으로 정제된" 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적절한 방법, 예컨대 SDS/PAGE 분석법, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동법에 의해 측정되었을 때, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로는 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 또한 보다 구체적으로는 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99%의 순도 수준, 또는 그 초과 순도 수준을 가질 수 있다.

[0054] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는 삽입을 위해 사용되는 방법, 예를 들어 직접적인 흡수, 형질도입, f-교배, 또는 관련 기술분야에서 재조합 숙주 세포를 형성하는 것으로 공지된 다른 방법에 상관없이, 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 말한다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 비통합 벡터, 예를 들어 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 또는 다르게는 숙주 게놈으로 통합될 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵생물 숙주 세포, 포유류 숙주 세포, CHO 세포, 원핵생물 숙주 세포, 이. 콜라이, 또는 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 숙주 세포를 포함하는 임의의 숙주 세포, 및 세포 내용물을 지지 또는 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반-고체 또는 경질 지지체를 포함한다. 따라서, 상기 용어는 숙주 세포가 성장한 배지, 예를 들어 증식 단계 전 또는 증식 단계 후의 배지를 포함하여, 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 분비된 배지를 포괄할 수 있다. 상기 용어는 또한, 예컨대 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 세포내에서 생산되고 숙주 세포가 용해 또는 파열되어 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 방출시키는 경우에는, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충액 또는 시약을 포괄할 수 있다.

[0056] 용어 "항당뇨병제"는 본원에 기재된 임의의 병태, 질환 또는 합병증을 비롯하여, 임의의 글루코스 대사 장애 또는 그의 임의의 합병증을 치료, 예방, 또는 다르게는 그 중증도를 감소시키는데 유용한 임의의 약물을 의미할 것이다. 항당뇨병제는 인슐린, 티아졸리딘디온, 술폰닐우레아, 벤조산 유도체, 알파-글루코시다제 억제제 등을 포함한다. 본 발명의 항당뇨병성 조성물은 HbA1c 수준을 기준선으로부터 적어도 10% 또는 적어도 50%의 변화율로 감소시킬 수 있다. 항당뇨병제는, 예컨대 소분자 인슐린 증강제, 타우린, 알파 리포산, 멀베리(*Mulberry*) 추출물, 크로뮴, 글루타민, 에니코스테마 리토랄 블루메(*Enicostemma littorale* Blume), 스코파리아 둘시스(*Scoparia dulcis*), 타라곤(*Tarragon*) 추출물, 안드로그라피스 파니쿨라타(*Andrographis paniculata*), 이소말트, 트레할로스 또는 D-만노스를 비제한적으로 포함하는 인슐린 증강제를 포함하고, 이들은 인슐린의 분비 또는 활성을 더욱 증강시킬 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 "변형된 FGF-21 폴리펩티드", "변형된 섬유모세포 성장 인자 21" 또는 "변형된 FGF-21"과 이들의 하이픈이 붙지 않은 형태는 상호교환하여 사용되며, 야생형 FGF-21 (예를 들어, 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 5의 야생형 인간 FGF-21)과 상이하며 섬유모세포 성장 인자 21의 적어도 하나의 생물학적 활성을 전형적으로 갖는 폴리펩티드 및 단백질 뿐만 아니라, 그의 생물학적 활성과 상관없이 FGF-21 유사체, FGF-21 이소형, FGF-21 모방체, FGF-21 단편, 혼성 FGF-21 단백질, 이들의 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 상동체, 당화 패턴 변이체, 변이체, 스플라이스 변이체 및 퓨테인을 포함할 것이다. 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드" 및 "변형된 FGF-21"은 1개 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 포괄한다. 예를 들어, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 도 1에 도시된 내부 결실을 비롯한 내부 결실 및 본원에 기재

된 다른 결실을 포함한다.

[0058] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 또한 다형체 (예를 들어, 자연 발생 FGF-21 서열 변이체)를 포괄한다. 예를 들어, FGF-21의 "P-형태"는 174 위치 (서열식별번호: 1의 성숙 폴리펩티드에서의 146 위치)에서 프롤린 (P)을 함유하고, "L-형태"는 174 위치 (서열식별번호: 5의 성숙 폴리펩티드에서의 146 위치)에서 류신 (L)을 함유한다. 예시 P-형태의 FGF-21 폴리펩티드 서열은 서열식별번호: 1-4에 함유되고, 예시 L-형태의 FGF-21 폴리펩티드 서열은 서열식별번호: 5-7에 함유된다.

[0059] 자연 발생 FGF-21의 매우 다양한 아미노산 위치에서의 치환이 기재되었다. 치환은 용해도 또는 안정성을 조정하고, 효능제 활성을 증가시키고, 생체내 또는 시험관내 반감기를 증가시키고, 프로테아제 저항성을 증가시키고, 폴리펩티드를 길항제로 변환시키고, 면역원성 또는 독성을 감소시키고, 정제 또는 제조가능성을 용이하게 하는 치환 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않으며, 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드" 또는 "변형된 FGF-21"에 의해 포괄된다. 일부 경우에, 비-자연 코딩 아미노산 치환(들)이 변형된 FGF-21 폴리펩티드 내의 다른 부가, 치환 또는 결실과 조합되어, 또 다른 FGF-21 폴리펩티드 (예를 들어, 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드, 서열식별번호: 201의 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 FGF-21 폴리펩티드, 예컨대 상기 부가, 치환 또는 결실이 없는 동일한 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21의 비변형 또는 변형된 폴리펩티드)와 관련하여 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 다른 생물학적 특질에 영향을 미칠 수 있다. 일부 경우에, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 안정성 (단백질분해 열화에 대한 저항성을 비제한적으로 포함함)을 증가시키거나 또는 그의 수용체에 대한 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 친화도를 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 제약 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도 (이. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현되는 경우를 비제한적으로 포함함)를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 부가, 치환 또는 결실은 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서의 발현 후에 폴리펩티드의 용해도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산의 혼입을 위한 또 다른 자리 이외에도, 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서의 발현 후에 폴리펩티드의 용해도 증가를 초래하는 천연 코딩 또는 비천연 아미노산으로의 치환을 위한 자리가 선택된다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 FGF-21 폴리펩티드 수용체, 결합 단백질 또는 연관된 리간드에 대한 친화도를 조정하거나, FGF-21 수용체와의 결합 후에 신호 전달을 조정하거나, 순환 반감기를 조정하거나, 방출 또는 생체이용률을 조정하거나, 정제를 용이하게 하거나, 또는 특정 투여 경로를 개선 또는 변경시키는 또 다른 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 그의 수용체에 대한 변형된 FGF-21의 친화도를 증가시키는 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 마찬가지로, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 검출 (GFP를 비제한적으로 포함함), 정제, 조직 또는 세포 막을 통한 수송, 전구약물 방출 또는 활성화, 변형된 FGF-21의 크기 감소, 또는 폴리펩티드의 다른 특질을 개선시키는 화학적 또는 효소 절단 서열, 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체-결합 도메인 (FLAG 또는 폴리-His를 비제한적으로 포함함) 또는 다른 친화성 기반 서열 (FLAG, 폴리-His, GST 등을 비제한적으로 포함함) 또는 연결 분자 (비오틴을 비제한적으로 포함함)를 포함할 수 있다.

[0060] 리더 서열이 없는 FGF-21 서열에 대해서는 본원의 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 2 및 서열식별번호: 5를 참조한다. 리더 서열을 갖는 FGF-21 서열에 대해서는 본원의 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 6 및 서열식별번호: 7을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1-7 또는 FGF-21 폴리펩티드의 임의의 다른 서열과 실질적으로 동일하다. FGF-21의 다수의 다형체가 확인되었다. 미국 특허 공보 20010012628 및 미국 특허 6,716,626에 동일한 위치에서의 류신 또는 프롤린이 기재되어 있다. 1개 아미노산 (류신)이 상이한 N-말단 리더 서열 또는 신호 서열이 미국 특허 6,716,626 및 미국 특허 공보 20040259780에서 확인된다. FGF-21 폴리펩티드 변이체 또는 돌연변이체는 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 6,716,626; 미국 특허 공보 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 및 2001/0012628; WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463; WO01/018172; WO09/149171; WO10/042747; WO12/066075; WO11/154349; WO13/052311; WO13/188181에 개시된 것들을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0061] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 또한 자연 발생 FGF-21의 생물학적 활성 단편, 생물학적 활성 변이체 및 입체이성질체 뿐만 아니라, 자연 발생 FGF-21의 효능제, 모방체 및 길항체 변이체, 및 이들의 폴리펩티드 융합체를 포함한다. 아미노 말단, 카르복실 말단, 또는 양쪽 모두에서 추가의 아미노산을 포함하는 융합체가 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"에 의해 포괄된다. 융합체의 예는 예를 들어 리더 펩티드 또는 신호 펩티드가 없는

FGF-21의 성숙 형태 또는 그의 부분의 재조합 발현으로부터 생성된 FGF-21의 N-말단에 메티오닌이 연결된 메티오닐 FGF-21 (메티오닌은, 예를 들어 이. 콜라이에서의 재조합 발현으로부터 생성되는 FGF-21의 N-말단에 연결됨), 정제를 목적으로 하는 융합체 (폴리-히스티딘 또는 친화성 에피토프를 비제한적으로 포함함), 혈청 알부민 결합 펩티드, 예컨대 PKE 어드넥틴을 갖는 융합체 및 혈청 단백질, 예컨대 혈청 알부민을 갖는 융합체, 및 FGF-21과 1개 이상의 다른 분자 ("융합 파트너"), 예를 들어 비제한적으로 혈청 알부민, Fc 도메인, 면역글로불린 불변 영역, 비구조화 폴리펩티드 및 어드넥틴을 포함하는 융합 단백질 및 그의 단편을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 임의의 이러한 단편은 단백질로부터 표준 생화학적 방법에 의해, 또는 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0062] 달리 지시되는 경우를 제외하고는, 일반적으로 본원에 사용된 용어 "FGF-21 폴리펩티드", "섬유모세포 성장 인자 21" 및 "FGF-21"은 비변형된 (즉, 야생형) FGF-21과 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 둘다 포괄한다.

[0063] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 중합체, 예컨대 PEG와 접합된 폴리펩티드를 포함하며, 시스테인, 리신 또는 다른 잔기의 1개 이상의 추가의 유도체를 임의로 포함할 수 있다. 또한, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 링커 또는 중합체를 포함할 수 있고, 여기서 링커 또는 중합체가 접합되는 아미노산은 본 개시내용에 따른 비천연 아미노산일 수 있거나, 또는 이들은 리신 또는 시스테인과의 커플링과 같은 관련 기술분야에서 공지된 기술을 이용하여 천연 코딩 아미노산에 접합될 수 있다.

[0064] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 또한 당화 변형된 FGF-21, 예컨대 비제한적으로 임의의 아미노산 위치에서 당화된 폴리펩티드, 폴리펩티드의 N-연결 또는 O-연결된 당화 형태를 포함한다. 단일 뉴클레오타이드 변화를 함유하는 변이체가 또한 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성 변이체로서 간주된다. 또한, 스플라이스 변이체 역시 포함된다. 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 또한 화학적 수단에 의해 연결되거나 또는 융합 단백질로서 발현되는, 임의의 1개 이상의 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 임의의 다른 폴리펩티드, 단백질, 탄수화물, 중합체, 소분자, 링커, 리간드, 또는 임의의 유형의 다른 생물학적 활성 분자의 FGF-21 폴리펩티드 이중량체, 동중량체, 이종다량체 또는 동중다량체 뿐만 아니라, 예를 들어 생물학적 활성은 유지한 채로 특정 결실 또는 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드 유사체를 포함한다.

[0065] 본원에 기재된 비변형 또는 변형된 FGF-21에서의 아미노산 위치에 대한 언급은 모두, 달리 특정 (즉, 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 다른 FGF-21 서열에 기반한 비교라 명시되는 경우)되지 않는 한, 서열식별번호: 1에서의 상응하는 위치에 기반한다. 예를 들어, 서열식별번호: 1의 77 위치에서의 아미노산은 아르기닌이며 상응하는 아르기닌이 서열식별번호: 2의 87 위치에 위치한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 서열식별번호: 1에서의 위치에 상응하는 아미노산 위치가 임의의 다른 FGF-21 분자, 예컨대 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6 및 7에서 용이하게 확인될 수 있음을 알 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 임의의 다른 FGF-21 서열에서의 위치에 상응하는 아미노산 위치가 임의의 다른 FGF-21 분자, 예컨대 FGF-21 융합체, 변이체, 단편 등에서 용이하게 확인될 수 있음을 알 것이다. 예를 들어, 블랙스트와 같은 서열 정렬 프로그램이 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 다른 FGF-21 서열에서의 위치에 상응하는 단백질에서의 특정 위치를 정렬 및 확인하는데 사용될 수 있다. 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 다른 FGF-21 서열과 관련하여 본원에 기재된 아미노산의 치환, 결실 또는 부가는 또한 본원에 기재되었거나 또는 관련 기술분야에서 공지된 FGF-21 융합체, 변이체, 단편 등의 상응하는 위치에서의 치환, 결실 또는 부가를 나타내기 위한 것이며, 이들은 본 개시내용에 명백하게 포괄된다.

[0066] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드" 또는 "변형된 FGF-21"은 1개 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 포괄한다. 예를 들어, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 임의로 1개 이상의 비천연 아미노산 변형과 함께, 1개 이상의 천연 아미노산 변형이 포함될 수 있다. FGF-21 폴리펩티드 (본원에 기재된 것 등을 포함함)의 매우 다양한 아미노산 위치에서의 치환, 삽입 또는 결실의 예는 제약 안정성을 조정하고, FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성 중 하나 이상을 조정하는, 예컨대 비제한적으로 효능제 활성을 증가시키거나, 폴리펩티드의 용해도를 증가시키거나, 프로테아제 민감성을 감소시키거나, 탈아미드화를 감소시키거나, 폴리펩티드를 길항제로 변환시키거나, 면역원성 또는 독성을 감소시키거나, 또는 정제 또는 제조가능성을 용이하게 하는 등의 치환을 포함하나, 이들로 제한되지는 않으며, 이들은 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"에 의해 포괄된다.

[0067] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조정하는 추가의 삽입, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 변형된 FGF-21의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조정할 수 있다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 대한 친화

도를 조정하거나, 순환 반감기를 조정하거나, 치료적 반감기를 조정하거나, 폴리펩티드의 안정성을 조정하거나, 프로테아제에 의한 절단을 조정하거나, 용량을 조정하거나, 방출 또는 생체이용률을 조정하거나, 정제를 용이하게 하거나, 탈아미드화를 감소시키거나, 저장 수명을 개선시키거나, 또는 특정 투여 경로를 개선 또는 변경시킬 수 있다. 마찬가지로, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 검출 (GFP를 비제한적으로 포함함), 정제 또는 폴리펩티드의 다른 특질을 개선시키는 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체-결합 도메인 (FLAG 또는 폴리-His를 비제한적으로 포함함) 또는 다른 친화성 기반 서열 (FLAG, 폴리-His, GST 등을 비제한적으로 포함함) 또는 연결 분자 (비오틴을 비제한적으로 포함함)를 포함할 수 있다.

[0068] 용어 "변형된 FGF-21 폴리펩티드"는 또한 융합 파트너, 예컨대 Fc 도메인을 통해 형성되거나 또는 연결되는, 예를 들어 비제한적으로 동일하거나 또는 상이한 비-자연 코딩 아미노산 측쇄, 천연 코딩 아미노산 측쇄에 비-자연 코딩 아미노산 측쇄를 통해 직접적으로 연결되거나, 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되는 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 및 이종다량체를 포괄한다. 링커의 예는 소형 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리테트라하이드로퓨란, 또는 다양한 길이의 폴리펩티드를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0069] "비-자연 코딩 아미노산"은 20종의 일반 아미노산 또는 피롤리신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 말한다. 용어 "비-자연 코딩 아미노산"과 동의어로 사용가능한 다른 용어는 "비천연 아미노산", "천연이 아닌 아미노산", "비-자연으로 발생하는 아미노산" 및 이들의 다양한 하이픈이 붙은 형태 및 하이픈이 붙지 않은 형태이다. 용어 "비-자연 코딩 아미노산"은 또한 천연 코딩 아미노산 (20종의 일반 아미노산 또는 피롤리신 및 셀레노시스테인을 비제한적으로 포함함)의 변형 (예를 들어, 번역 후 변형)에 의해 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장 중인 폴리펩티드 쇄 내로 천연으로 혼입되는 것은 아닌 아미노산을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 비-자연 코딩 아미노산의 예는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포티로신을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0070] "아미노 말단 변형 기"는 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 마찬가지로, "카르복시 말단 변형 기"는 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 말단 변형 기는 다양한 수용성 중합체, 펩티드 또는 단백질, 예컨대 혈청 알부민, Fc 도메인, 면역글로불린 불변 영역, 비구조화 폴리펩티드, 어드넥틴, 또는 그의 단편, 또는 펩티드의 혈청 (생체내) 반감기를 증가시키는 다른 모이어티를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0071] 용어 "관능기", "활성 모이어티", "활성화 기", "이탈기", "반응성 자리", "화학적 반응기" 및 "화학적 반응성 모이어티"는 관련 기술분야에서 사용되고 있으며, 본원에서는 분자의 별개의 한정가능한 부분 또는 단위를 말한다. 상기 용어는 화학 분야에서 어느 정도 동의어로서 사용되며, 본원에서는 일부 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와의 반응성을 갖는 분자의 부분을 지시하기 위해 사용된다.

[0072] 본원에서 용어 "연결" 또는 "링커"는 화학 반응의 결과로서 일반적으로 형성되며 전형적으로 공유 연결인 기 또는 결합을 나타내기 위해 사용된다. 가수분해에 안정한 연결은, 연결이 연장된 기간 동안, 아마도 심지어는 무기한으로 생리적 조건을 비제한적으로 포함하는 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않고 물에서 실질적으로 안정하다는 것을 의미한다. 가수분해에 불안정한 또는 가수분해에 의해 분해가능한 연결은, 연결이 물 또는 수용액, 예를 들어 혈액에서 분해가능하다는 것을 의미한다. 효소에 불안정한 또는 효소에 의해 분해가능한 연결은, 연결이 1종 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 관련 기술분야에서 이해되고 있는 바와 같이, PEG 및 관련 중합체는 중합체 백본에 또는 중합체 백본과 중합체 분자의 말단 관능기 중 하나 이상의 사이에 있는 링커 기에 분해가능한 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 생물학적 활성제 상의 알콜 기의 반응에 의해 형성된 에스테르 연결은 일반적으로 생리적 조건 하에 가수분해되어 작용제를 방출시킨다. 가수분해에 의해 분해가능한 다른 연결은 카르보네이트 연결; 아민과 알데히드의 반응으로부터 생성된 이민 연결; 알콜을 포스페이트 기와 반응시킴으로써 형성된 포스페이트 에스테르 연결; 히드라지드와 알데히드의 반응 생성물인 히드라존 연결; 알데히드와 알콜의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트와 알콜의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; 아민 기, 예를 들어 비제한적으로 PEG와 같은 중합체의 말단에 존재하는 것과 펩티드의 카르복실 기에 의해 형성된 펩티드 연결; 및 포스포라미디트 기, 예를 들어 비제한적으로 중합체의 말단에 존재하는 것과 올리고뉴클레오타이드의 5' 히드록실 기에 의해 형성된 올리고뉴클레오타이드 연결을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0073] 본원에서 사용될 때 용어 "생물학적 활성 분자", "생물학적 활성 모이어티" 또는 "생물학적 활성제"는 생물 유기체와 관련하여 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미

칠 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 특히, 본원에 사용된 바와 같이, 생물학적 활성 분자는 인간 또는 다른 동물에서의 질환의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방을 위해, 또는 다르게는 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 웰빙을 향상시키기 위해 의도된 임의의 물질을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 생물학적 활성 분자의 예는 바이러스, 박테리아, 곤충, 동물 또는 임의의 다른 세포 또는 세포 유형, 리포좀, 미세입자 및 미셀로부터 획득되거나 또는 유래되는, 펩티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 탄수화물, 무기 원자 또는 분자, 염료, 지질, 뉴클레오사이드, 방사성 핵종, 올리고뉴클레오타이드, 변성 독소, 독소, 다당류, 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 및 이들의 부분을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0074] 용어 "치환기"는 "비-간접 치환기"를 비제한적으로 포함한다. "비-간접 치환기"는 안정한 화합물을 제공하는 기이다. 적합한 비-간접 치환기 또는 라디칼은 할로, C₁-C₁₀ 알킬, C₂-C₁₀ 알케닐, C₂-C₁₀ 알킬닐, C₁-C₁₀ 알콕시, C₁-C₁₂ 아랄킬, C₁-C₁₂ 알카릴, C₃-C₁₂ 시클로알킬, C₃-C₁₂ 시클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루오일, 크실레닐, 비페닐, C₂-C₁₂ 알콕시알킬, C₂-C₁₂ 알콕시아릴, C₇-C₁₂ 아릴옥시알킬, C₇-C₁₂ 옥시아릴, C₁-C₆ 알킬술폰닐, C₁-C₁₀ 알킬술폰닐, m이 1 내지 8인 $-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오로알킬, 헤테로시클릭 라디칼, 치환된 헤테로시클릭 라디칼, 니트로알킬, $-NO_2$, $-CN$, $-NRC(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, C₂-C₁₀ 알킬 티오알킬, $-C(O)O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-OH$, $-SO_2$, $=S$, $-COOH$, $-NR_2$, 카르보닐, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})-CF_3$, $-C(O)-CF_3$, $-C(O)NR_2$, $-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})-S-(C_6-C_{10} \text{ 아릴})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})$, 각각의 m이 1 내지 8인 $-(CH_2)_m-O-(-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬}))$, $-C(O)NR_2$, $-C(S)NR_2$, $-SO_2NR_2$, $-NRC(O)NR_2$, $-NRC(S)NR_2$, 이들의 염 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 R은 각각 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 치환된 아릴, 아랄킬 또는 알카릴이다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "수용성 중합체"는 수성 용매에서 가용성인 임의의 중합체를 말한다. 수용성 중합체의 변형된 FGF-21 폴리펩티드와의 연결은 비변형 형태와 비교하여 혈청 (생체내) 반감기의 증가 또는 조정, 또는 치료적 반감기의 증가 또는 조정, 면역원성 또는 독성의 조정, 물리적 회합 특징, 예컨대 응집 및 다량체 형성의 조정, 수용체 결합의 조정, 1종 이상의 결합 파트너와의 결합 조정, 및 수용체 이량체화 또는 다량체화의 변경을 비제한적으로 포함하는 변화를 초래할 수 있다. 수용성 중합체는 그 자체의 생물학적 활성을 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있고, 변형된 FGF-21을 다른 물질, 예를 들어 비제한적으로 하나 이상의 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 생물학적 활성 분자에 부착시키기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적합한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 이들의 모노 C1-C10 알콕시 또는 아릴옥시 유도체 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 5,252,714에 기재되어 있음), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 불연속형 PEG, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말레산 무수물, N-(2-히드록시프로필)-메타크릴아미드, 텍스트란, 텍스트란 술페이트를 포함하는 텍스트란 유도체, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 다당류, 올리고당류, 글리칸, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 예를 들어 비제한적으로 메틸셀룰로스 및 카르복시 메틸 셀룰로스, 전분 및 전분 유도체, 폴리펩티드, 폴리알킬렌 글리콜 및 그의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 그의 유도체, 폴리비닐 에틸 에테르, 및 알파-메타-폴리[(2-히드록시에틸)-DL-아스파르트아미드 등, 또는 이들의 혼합물을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 수용성 중합체의 예는 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "폴리알킬렌 글리콜" (PEG) 또는 "폴리(알켄 글리콜)"은 폴리에틸렌 글리콜 (폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜, 및 이들의 유도체를 말한다. 용어 "폴리알킬렌 글리콜"은 선형 및 분지형 중합체를 둘다 포괄하고, 이들의 평균 분자량은 0.1 kDa 내지 100 kDa이다. 다른 예시 실시양태는 예를 들어, 상업적 공급업체의 카탈로그, 예컨대 셰어워터 코퍼레이션(Shearwater Corporation)의 카탈로그 ["Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)]에 나열되어 있다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "조정된 혈청 반감기" 또는 "조정된 생체내 반감기"와 유사한 용어들은 비교체, 예컨대 비변형 형태와 비교하여 변형된 FGF-21의 순환 반감기의 양의 또는 음의 변화를 말한다. 혈청 반감기는 변형된 FGF-21의 투여 후 다양한 시점에서 혈액 샘플을 수집하고, 각각의 샘플에서의 상기 분자의 농도를 결정함으로써 측정가능하다. 혈청 농도와 시간의 상관관계가 혈청 반감기의 계산을 가능하게 한다. 증가한 혈청 (생체내) 반감기는 바람직하게는 적어도 약 2배일 수 있지만, 보다 소폭의 증가가 유용할 수 있는데, 예를 들어 이러한 경우에는 만족스러운 투여 요법을 가능하게 하거나 또는 독성 효과를 피하게 한다. 일부 실시양태에서, 증가는

적어도 약 3배, 적어도 약 5배, 또는 적어도 약 10배일 수 있다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "조정된 치료적 반감기"는 비교체, 예컨대 비변형 형태 또는 야생형 FGF-21과 비교하여 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량의 혈청 또는 생체내 반감기의 양의 또는 음의 변화를 의미한다. 치료적 반감기는 투여 후 다양한 시점에서의 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 증가한 치료적 반감기는 바람직하게는 특히 유익한 투여 요법, 특히 유익한 총 용량을 가능하게 하거나, 또는 바람직하지 않은 효과를 피하게 한다. 일부 실시양태에서, 증가한 치료적 반감기는 증가한 효능, 변형된 분자의 그의 표적과의 결합 증가 또는 감소, 효소, 예컨대 프로테아제에 의한 분자의 증가 또는 감소한 파괴, 또는 비변형 분자의 또 다른 파라미터 또는 작용 메카니즘의 증가 또는 감소, 또는 분자의 수용체-매개 클리어런스의 증가 또는 감소로부터 초래된다.

[0079] 핵산 또는 단백질에 적용되는 "단리된"이라는 용어는, 자연 상태에서는 회합되어 있는 세포내 성분의 적어도 일부가 핵산 또는 단백질에서 제거되거나, 또는 핵산 또는 단백질이 생체내 또는 시험관내 생산 시의 농도보다 높은 수준으로 농축되는 것을 나타낸다. 이것은 균질 상태일 수 있다. 단리된 물질은 건조 또는 반-건조 상태이거나, 또는 용액, 예를 들어 비제한적으로 수용액으로 존재할 수 있다. 이것은 추가의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 제약 조성물의 성분일 수 있다. 순도 및 균질도는 전형적으로 분석 화학 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 제제 중에 존재하는 미세한 화학종의 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 특히, 단리된 유전자는 이 유전자의 측면에 위치하고 관심 유전자 이외의 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로부터 분리된다. 용어 "정제된"이란 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 실질적으로 1개의 밴드를 발생시키는 것을 나타낸다. 특히, 이것은 핵산 또는 단백질이 적어도 85%의 순도, 적어도 90%의 순도, 적어도 95%의 순도, 적어도 99% 또는 그 초과 순도를 갖는다는 것을 의미할 수 있다.

[0080] 용어 "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오타이드, 및 이들의 중합체를 말한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 자연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는, 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 구체적으로 달리 제한되지 않는 한, 상기 용어는 또한 PNA (펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체 (포스포로티오에이트, 포스포로아미테이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 말한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 암시적으로 이들의 보존적으로 변형된 변이체 (축퇴성 코돈 치환을 비제한적으로 포함함) 및 상보적 서열 뿐만 아니라, 명백하게 지시된 서열을 포괄한다.

[0081] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 나타내기 위해 본원에서 상호교환하여 사용된다. 즉, 폴리펩티드에 관한 설명이 펩티드에 관한 설명 및 단백질에 관한 설명에 대응하게 적용되며, 그 반대로 적용되기도 한다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 1개 이상의 아미노산 잔기가 비-자연 코딩 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에 사용된 상기 용어는 전장 단백질을 포함하는, 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포괄하고, 여기서 아미노산 잔기는 공유 펩티드 결합에 의해 연결된다.

[0082] "보존적으로 변형된 변이체"는 보존적 치환을 함유하는 아미노산 서열을 말한다. 보존적으로 변형된 변이체의 예는 폴리펩티드 서열 또는 코딩된 폴리펩티드 서열에서 단일 아미노산 또는 낮은 백분율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는, 예를 들어 폴리펩티드 서열 또는 코딩된 폴리펩티드 서열에서 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 최대 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 또는 3.5%의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 치환, 결실 또는 삽입을 포함하고, 이들은 임의로 아미노산(들)의 화학적으로 유사한 아미노산(들)에 의한 치환일 수 있거나 또는 그러한 치환을 포함할 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 개시된 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 다형성 변이체, 중간 동족체 및 대립유전자에 대하여 추가적인 것으로서, 이들을 배제하지 않는다.

[0083] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 하기 8개 군은 각각 서로에 대하여 보존적인 치환을 나타내는 아미노산을 함유한다:

[0084] 1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0085] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0086] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

- [0087] 4) 아르기닌 (R), 리신 (K);
- [0088] 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);
- [0089] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);
- [0090] 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및
- [0091] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M)
- [0092] (예를 들어, 문헌 [Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993))] 참조)
- [0093] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 퍼센트는 동일한 2개 이상의 서열 또는 부분서열을 말한다. 서열이 하기 서열 비교 알고리즘 (또는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이용 가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 이용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사로 측정하였을 때, 비교창 또는 지정된 영역에 대하여 최대 상응도로 비교 및 정렬되어 일정 백분율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 가지면 (즉, 특정된 영역에 대하여 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%의 동일성을 보임), 서열이 "실질적으로 동일하다". 동일성은 적어도 약 50개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이의 영역 또는 비교창에 대하여, 또는 75-100개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이의 영역에 대하여, 또는 특정되는 많은 경우에는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 전체 서열에 걸쳐서 존재할 수 있다. 본원에 사용된 "비교창"은 20 내지 600개, 일반적으로는 약 50 내지 약 200개, 보다 일반적으로는 약 100 내지 약 150개로 이루어진 군에서 선택되는 연속된 위치의 임의의 개수의 세그먼트를 지칭하여 포함하고, 여기서 두 서열이 최적으로 정렬된 후 동일한 개수의 연속된 위치를 갖는 기준 서열에 대하여 서열이 비교될 수 있다. 서열 동일성 및 서열 유사성의 퍼센트를 결정하는데 적합할 수 있는 알고리즘의 예는 문헌 [Altschul *et al.* (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402] 및 [Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]에 각각 기재되어 있는 블래스트 및 블래스트 2.0 알고리즘 뿐만 아니라, 스미스-워터만 (Smith and Waterman, *J Mol Biol.* 1981 Mar 25;147(1):195-7), 또는 니들만-브니쉬 (Needleman and Wunsch, *J Mol Biol.* 1970 Mar;48(3):443-53) 알고리즘이고, 이들은 예를 들어 각각의 문헌에 기재되어 있는 바와 같이 디폴트 파라미터를 이용하여 실행될 수 있다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 처리, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 동물, 일부 실시양태에서는 포유동물, 또한 다른 실시양태에서는 인간을 말한다. 동물은 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물 (예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험 동물 (예를 들어, 래트, 마우스, 기니 피그(guinea pig) 등)일 수 있다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 치료되는 질환, 병태 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 경감시킬 수 있는, 투여되는 화합물 (예를 들어, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드)의 양을 말한다. 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 예방적, 증진적 및/또는 치료적 처리를 위해 투여될 수 있다.
- [0096] 용어 "증진시키다" 또는 "증진적"이란 목적하는 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가 또는 연장시키는 것을 의미한다. 따라서, 치료제의 효과를 증진시키는 것과 관련하여, 용어 "증진적"이란 다른 치료제의 계에 대한 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가 또는 연장시키는 능력을 말한다.
- [0097] 본원에 사용된 용어 "변형된"은 주어진 폴리펩티드에 대하여 이루어지는 임의의 변화, 예컨대 폴리펩티드의 길이, 폴리펩티드의 아미노산 서열, 화학적 구조, 번역 동시 변형, 또는 번역 후 변형에 대한 변화를 말한다. "(변형된)" 형태의 용어는 논의되고 있는 폴리펩티드가 임의로 변형된다는 것, 즉 논의 중인 폴리펩티드가 변형될 수 있거나 또는 변형되지 않을 수 있다는 것을 의미한다.
- [0098] 용어 "번역 후 변형"은 천연 또는 비천연 아미노산이 폴리펩티드 쇠에 혼입된 후에 그러한 아미노산에 대하여 발생하는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 변형을 말한다. 상기 용어는 단지 예시적으로, 번역 동시 생체내 변형, 번역 동시 시험관내 변형 (예컨대, 무세포 번역 시스템에서의 변형), 번역 후 생체내 변형, 및 번역 후 시험관내 변형을 포괄한다.
- [0099] 예방적 적용에 있어서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 특정 질환, 장애 또는 병태에 민감하거나 또는 달리 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방 유효량"이라 정의된다.
- [0100] 치료적 적용에 있어서, 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 질환, 병태 또는 장애를 이미

않고 있는 환자에게, 상기 질환, 장애 또는 병태의 증상을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 저지 또는 진정시키는 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "치료 유효량"이라 정의되며, 질환, 장애 또는 병태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료하는 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다. 일상적인 실험 (예를 들어, 용량 증가 임상 시험)에 의해 이러한 치료 유효량을 결정하는 것은 관련 기술분야의 기술 범위 내에서 널리 고려되고 있다.

[0101] 용어 "처리"란 예방적 및/또는 치료적 처리를 나타내기 위해 사용된다.

[0102] 본원에 제시된 비-자연 코딩 아미노산 폴리펩티드는 1개 이상의 원자가 천연에서 보통 확인되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자에 의해 대체되는 동위원소-표지 화합물을 포함할 수 있다.

[0103] 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 및 이들의 혼합물을 비제한적으로 포함하는 모든 이성질체가 본원에 기재된 조성물의 일부로서 간주된다. 또 다른 또는 추가의 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산 폴리펩티드는 이를 필요로 하는 유기체에 투여시 대사되어 대사물질을 생성하고, 이 대사물질은 후속적으로 목적하는 치료 효과를 비롯하여 목적하는 효과를 발생시키기 위해 사용된다. 추가의 또는 또 다른 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산 폴리펩티드의 활성 대사물질이 제공된다.

[0104] I. 개요

[0105] 내부 결실을 포함하고, 또한 임의로 적어도 1개의 천연이 아닌 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 분자가 본 개시내용에서 제공된다. 내부 결실을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 예시 실시양태는 내부 결실이 없는 FGF-21 폴리펩티드와 유사한 생물학적 활성 수준을 보유하면서, 적어도 하나의 유리한 특성, 예를 들어 비제한적으로 열 안정성의 증가, 용해도의 개선, 탈아미노화의 감소, 제조가능성의 개선, 생물학적 활성 형태 전장의 생체내 반감기의 개선을 나타내는 것으로 입증된다.

[0106] 결실 영역을 함유하고, 또한 임의로 펩티드로 대체되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 (도 1 참조)에서 탈아미드화는 완화되고 저장 수명과 순도는 개선되었다. 변형된 서열의 예는 분자의 저장 중에 발생할 수 있는 탈아미드화 사건을 완화시키는 것으로 확인되었다. 탈아미드화의 완화 이외에도, 이러한 변형은 야생형 FGF-21 또는 이러한 결실이 없는 FGF-21 폴리펩티드와 비교하여 용액 중 단백질의 열 안정성 및/또는 용해도를 또한 증가시키고, 단백질의 응집 경향을 추가로 최소화하였다. 감소한 탈아미드화, 증가한 열 안정성, 증가한 용해도, 및/또는 감소한 응집은 우수한 제제 특징, 예컨대 연장된 저장 수명 및 증가한 순도 뿐만 아니라, 보다 고농도의 제제를 시사한다. 추가적으로, 탈아미드화 경향의 완화는 보다 넓은 범위의 제제화 옵션을 가능하게 하고; 그렇지 않으면, 제제화 조건이 탈아미드화를 감소시키도록 선택될 필요가 있을 것이고, 이는 잠재적으로 다른 바람직하지 않은 제제 특징을 초래한다. 게다가, 5 내지 19개의 연속 아미노산의 내부 결실 및 대체 펩티드를 포함하는, 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 FGF-21의 생물학적 기능을 보유하고 감소한 탈아미드화, 증가한 열 안정성, 증가한 용해도 및 감소한 응집 중 적어도 하나를 가질 수 있다는 것은 예측이 불가능하며 예상 밖이다.

[0107] 추가의 예시 변형은 단백질로부터 10개의 C-말단 아미노산의 생체내 단백질분해 클리핑을 완화시킨다. 이러한 변형은 무손상 활성 분자의 혈중 반감기를 연장시켜, 전체 용량의 감소 및 덜 빈번한 투여를 초래한다. 단백질분해 클리핑을 완화시키는 예시 변형은 G170E의 점 돌연변이지만, 다른 변형이 또한 이용될 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은: (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 0 내지 12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; 및 (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함할 수 있는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 또는 146에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 77, 91, 108 또는 131에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 72에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 77에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 86에 상응하는 위

치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 87에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 91에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 110에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 126에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 131에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 146에 상응하는 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 페닐알라닌 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 파라-치환, 오르토-치환, 또는 메타-치환된 페닐알라닌 유도체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌이다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 혼입된 파라-아세틸-L-페닐알라닌이다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은 (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 0 내지 12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입; (iii) 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에서의, 파라-치환, 오르토-치환, 또는 메타-치환된 페닐알라닌 유도체, 예컨대 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서 글리신의 글루탐산으로의 치환을 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 중합체, 수용성 중합체, 또는 폴리(에틸렌 글리콜), 예컨대 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 G, GG, SG, GSG, GGH 또는 SGG를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 GSG를 갖는다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1개, 또는 그 미만의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 8개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 7개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 6개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 5개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 4개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 3개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 2개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 1개의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 G170에 상응하는 아미노산의 치환 또는 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서 글리신의 글루탐산으로의 치환을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 추가의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유하지 않을 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 4 내지 19개, 4 내지 18개, 4 내지 17개, 4 내

지 16개, 4 내지 15개, 4 내지 14개, 4 내지 13개, 4 내지 12개, 4 내지 11개, 4 내지 10개, 4 내지 9개, 4 내지 8개, 4 내지 7개, 또는 4 내지 6개 아미노산의 내부 결실을 함유하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 4 내지 14개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 4 내지 12개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 4 내지 10개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 4 내지 8개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 4 내지 6개의 아미노산일 수 있다.

[0115] 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 5 내지 19개, 5 내지 18개, 5 내지 17개, 5 내지 16개, 5 내지 15개, 5 내지 14개, 5 내지 13개, 5 내지 12개, 5 내지 11개, 5 내지 10개, 5 내지 9개, 5 내지 8개, 5 내지 7개, 또는 5 내지 6개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 5 내지 14개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 5 내지 12개의 아미노산일 수 있다.

[0116] 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 6 내지 19개, 6 내지 18개, 6 내지 17개, 6 내지 16개, 6 내지 15개, 6 내지 14개, 6 내지 13개, 6 내지 12개, 6 내지 11개, 6 내지 10개, 6 내지 9개, 6 내지 8개, 또는 6 내지 7개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 6 내지 14개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 6 내지 12개의 아미노산일 수 있다.

[0117] 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 7 내지 19개, 7 내지 18개, 7 내지 17개, 7 내지 16개, 7 내지 15개, 7 내지 14개, 7 내지 13개, 7 내지 12개, 7 내지 11개, 7 내지 10개, 7 내지 9개, 또는 7 내지 8개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 7 내지 14개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 7 내지 12개의 아미노산일 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 8 내지 19개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 8 내지 14개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 내부 결실은 8 내지 12개의 아미노산일 수 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 12개 아미노산의 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 13개 아미노산의 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0120] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 121에 상응하는 위치를 포함할 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서:

[0122] i) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

[0123] ii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 117 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

[0124] iii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 118 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

[0125] iv) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

[0126] v) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 120 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나; 또는

[0127] vi) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 121 내지 아미노산 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어진다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서:

[0129] i) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 122 내지 아미노산 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133

또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

- [0130] ii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 123 내지 아미노산 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0131] iii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 124 내지 아미노산 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0132] iv) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 125 내지 아미노산 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0133] v) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 126 내지 아미노산 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0134] vi) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 127 내지 아미노산 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0135] vii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 128 내지 아미노산 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0136] viii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 129 내지 아미노산 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나; 또는
- [0137] ix) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 130 내지 아미노산 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어진다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서:
- [0139] i) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 아미노산 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0140] ii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 117 내지 아미노산 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0141] iii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 118 내지 아미노산 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0142] iv) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119 내지 아미노산 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0143] v) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 120 내지 아미노산 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0144] vi) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 121 내지 아미노산 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0145] vii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 122 내지 아미노산 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0146] viii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 123 내지 아미노산 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0147] ix) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 124 내지 아미노산 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0148] x) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 125 내지 아미노산 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;

- [0149] xi) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 126 내지 아미노산 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0150] xii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 127 내지 아미노산 128, 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0151] xiii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 128 내지 아미노산 129, 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0152] xiv) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 129 내지 아미노산 130, 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0153] xv) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 130 내지 아미노산 131, 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0154] xvi) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 131 내지 아미노산 132, 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나;
- [0155] xvii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 132 내지 아미노산 133 또는 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어지거나; 또는
- [0156] xviii) 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 133 내지 아미노산 134에 상응하는 영역 내에 포함되거나 또는 이러한 영역으로 이루어진다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 내부 결실을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은 (i) 0 내지 12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역의 내부 결실; (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입; 및 (iii) 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에서의, 파라-치환, 오르토-치환, 또는 메타-치환된 페닐알라닌 유도체, 예컨대 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서 글리신의 글루탐산으로의 치환을 포함할 수 있다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 중합체, 수용성 중합체, 또는 폴리(에틸렌 글리콜), 예컨대 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 G, GG, SG, GSG, GGH 또는 SGG를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 GSG를 갖는다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 대체 폴리펩티드를 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 2-8개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 2-5개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 3개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 세린, 히스티딘, 및/또는 글리신 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 세린 및/또는 글리신 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 G, GG, SG, GSG, GGH 또는 SGG를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 GSG를 갖는다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역 내의 내부 결실 및 서열 GSG를 갖는 대체 펩티드를 포함할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은 (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 서열 G, GG, SG, GSG, GGH 또는 SGG를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입; (iii) 서열식별번호

호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에서의, 파라-치환, 오르토-치환, 또는 메타-치환된 페닐알라닌 유도체, 예컨대 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서 글리신의 글루탐산으로의 치환을 포함할 수 있다. 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 중합체, 수용성 중합체, 또는 폴리(에틸렌 글리콜), 예컨대 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 GSG를 갖는다.

[0162] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역을 포함하는 내부 결실, 서열 GSG를 갖는 대체 펩티드, 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서의 글리신의 글루탐산으로의 치환, 및 임의로, 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에서의, 파라-치환, 오르토-치환, 또는 메타-치환된 페닐알라닌 유도체, 예컨대 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있는 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0163] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 가질 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 97%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 98%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 99%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌의 부재 하에, 서열식별번호: 202의 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

[0164] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 가질 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드와 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드와 적어도 97%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드와 적어도 98%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드와 적어도 99%의 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 서열식별번호: 102의 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 N-말단 메티오닌의 부재 하에, 서열식별번호: 102의 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

[0165] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 융합 파트너를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 아미노산 서열과 융합 파트너 사이에 0-50개 아미노산의 길이를 갖는 연결 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 서열식별번호: 74-100, 301 및 350-383으로부터 선택된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 아미노산 서열 GGGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 360)를 가질 수 있다.

[0166] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 아미노산 서열과 상기 융합 파트너를 연결시키는 연결 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 0 내지 100개, 2 내지 80개, 2 내지 60개, 2 내지 50개, 2 내지 40개, 2 내지 30개, 2 내지 20개, 2 내지 10개, 2 내지 8개, 2 내지 6개, 또는 2 내지 4개 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 서열식별번호: 74-100, 301 및 350-383으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

- [0167] 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 아미노산 서열 GGGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 360)를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 혈청 알부민, Fc 도메인, 면역글로불린 불변 영역, 비구조화 폴리펩티드, 및 어드넥틴 및 그의 단편으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 면역글로불린 불변 영역 또는 변형된 면역글로불린 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 비구조화 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 상기 비구조화 폴리펩티드는 XTEN 또는 PAS 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, PAS 폴리펩티드는 서열식별번호: 310-316으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이들과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 Fc 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302 및 323-335로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그의 단편, 예컨대 서열식별번호: 303-309로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 서열식별번호: 302 및 323-335로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인 또는 Fc 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302 및 323-335로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 단편과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475-487로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 96% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 97% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 98% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475와 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475의 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 어드넥틴을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 알부민-결합 또는 PKE 어드넥틴을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 320과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 320과 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 320의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 401-423으로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 401-423으로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 401-423으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.
- [0172] 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 319와 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 319와 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PKE 어드넥틴은 서열식별번호: 319의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 452-474로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 452-474로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 452-474로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 혈청 알부민 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 인간 혈청 알부민 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 서열식별번호: 321 또는

322와 적어도 90% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너는 서열식별번호: 321 또는 322의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 424-432, 434-437, 440-443, 및 446-451로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 424-432, 434-437, 440-443, 및 446-451로부터 선택된 폴리펩티드와 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 424-432, 434-437, 440-443, 및 446-451로부터 선택된 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-7로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 단 상기 아미노산 서열은 (i) 서열식별번호: 1의 아미노산 116 내지 134에 상응하는 영역 내에 포함되고, 0 내지 12개 아미노산의 길이를 갖는 대체 펩티드에 의해 대체되는, 2 내지 19개 아미노산 (예컨대, 5 내지 19개 아미노산)의 내부 결실; 및 (ii) 9개 이하의 추가 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함할 수 있는 것인, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 제공하고; 여기서 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 융합 파트너를 추가로 포함한다. 상기 융합 파트너는 Fc 도메인 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 170에 상응하는 위치에서 글리신의 글루탐산으로의 치환을 포함할 수 있다. 상기 내부 결실은 서열식별번호: 1의 아미노산 119-130에 상응하는 영역을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 G, GG, SG, GSG, GGH 또는 SGG를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 대체 펩티드는 서열 GSG를 갖는다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 아미노산 서열과 융합 파트너 사이에 연결 펩티드를 포함하고, 여기서 상기 연결 펩티드는 아미노산 서열 GGGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 360)를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0175] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 펩티드, 폴리펩티드 또는 반감기 연장 모이어티와 연결가능한 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 반감기 연장 모이어티와 연결가능한 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 모노메톡시 PEG (mPEG), 비구조화 폴리펩티드, 어드베크틴, 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, Fc 도메인, 면역글로불린 불변 영역, 상기 중 임의의 것의 단편, 지질, 분지형 또는 비분지형 아실 기, 분지형 또는 비분지형 C8-C30 아실 기, 분지형 또는 비분지형 알킬 기, 및 분지형 또는 비분지형 C8-C30 알킬 기로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 XTEN 또는 PAS 폴리펩티드로부터 선택된 비구조화 폴리펩티드와 연결가능한 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 또는 모노메톡시 PEG (mPEG) 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 분지형 또는 멀티아암형(multiarmed) 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 또는 다른 분지형 또는 멀티아암형 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 또는 모노메톡시 PEG (mPEG) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 하기의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 모노메톡시 PEG (mPEG) 모이어티를 포함한다:

[0176] i) 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa;

[0177] ii) 약 1 kDa 내지 50 kDa;

[0178] iii) 약 10 kDa 내지 40 kDa;

[0179] iv) 약 20 kDa 내지 30 kDa;

[0180] v) 약 0.050 kDa 내지 약 100 kDa; 또는

[0181] vi) 약 100 kDa, 95 kDa, 90 kDa, 85 kDa, 80 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa, 9 kDa, 8 kDa, 7 kDa, 6 kDa, 5 kDa, 4 kDa, 3 kDa, 2 kDa, 1 kDa, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 또는 100 Da.

[0182] 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 비-폴리(에틸렌 글리콜) 수용성 중합체 또는 올리고당류를 포함한다.

- [0183] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 상기 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 모이어티를 포함하며, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함하는 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 아미드 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되는, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 아지드 모이어티를 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되는 알킨 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 알킨 모이어티를 포함하는 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되는 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 아미드 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되는, 아지드 또는 알킨 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 옥심 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 옥심 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되고, 여기서 상기 옥심 연결은 카르보닐 기와 아미노옥시 기의 반응으로부터 유래된 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 옥심 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결되고, 여기서 상기 옥심 연결은 상기 비-자연 코딩 아미노산에 함유된 카르보닐 기와 상기 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티에 함유된 아미노옥시 기의 반응으로부터 유래된 구조를 갖는다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 인간 FGF-21 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 내부 결실이 없는 FGF-21 폴리펩티드 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 201의 아미노산 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드와 비교하여, 또는 상기 내부 결실 및 대체 펩티드가 없는 동일한 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하여, 증가한 열 안정성, 감소한 응집, 감소한 생체내 단백질분해, 감소한 탈아미드화, 및 증가한 용해도 중 적어도 하나를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 내부 결실이 없는 PEG화된 FGF-21 폴리펩티드, 상기 내부 결실이 없는 비-PEG화된 FGF-21 폴리펩티드, 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드, 서열식별번호: 201의 아미노산 서열을 포함하는 비-PEG화된 FGF-21 폴리펩티드, PEG화된 서열식별번호: 201과 비교하여, 또는 상기 내부 결실 및 대체 펩티드가 없는 동일한 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하여, 증가한 열 안정성, 감소한 응집, 감소한 생체내 단백질분해, 감소한 탈아미드화, 및 증가한 용해도 중 적어도 하나를 갖는다.
- [0185] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 내부 결실이 없는 PEG화된 FGF-21 폴리펩티드와 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 내부 결실이 없는 비-PEG화된 FGF-21 폴리펩티드와 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드와 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 201과 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 PEG화된 서열식별번호: 201과 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기 내부 결실 및 대체 펩티드가 없는 동일한 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교될 수 있다.
- [0186] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 201의 아미노산 서열을 포함하는 비변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 상기 내부 결실이 없는 FGF-21 폴리펩티드와 비교하여, 2℃ 내지 12℃, 2℃ 내지 10℃, 2℃ 내지 8℃, 4℃ 내지 8℃, 4℃ 내지 10℃, 4℃ 내지 12℃, 또는 6℃ 내지 8℃의 전이 중간점 (용융 온도, T_m)에 있어서의 증가를 나타낸다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 또는 223의 폴리펩티드와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 또는 223의 폴리펩티드와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에

서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 또는 223의 폴리펩티드와 적어도 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102 또는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102 또는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102 또는 서열식별번호: 202의 폴리펩티드와 적어도 98%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 202의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 202의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 서열식별번호: 202의 pAF가 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 약 30 kDa의 평균 분자량을 가질 수 있다.

[0188] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌 (이. 콜라이와 같은 일부 시스템에서의 발현 후에 존재할 수 있음)을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 포유류 세포-기반 발현 시스템에서의, 예를 들어 N-말단 메티오닌을 함유하는 신호 펩티드를 제거하는 프로세싱의 결과로서, N-말단 메티오닌을 갖지 않는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌이 누락된, 본원에 개시된 임의의 서열 또는 그의 변이체, 예를 들어 N-말단 메티오닌이 누락되었거나 또는 존재하지 않는, 본원에 기재된 서열식별번호: 101-132, 201-202, 205-206, 210-212, 219-223 중 어느 하나, 또는 그의 변이체, 변형 또는 융합 형태 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 본원에 개시된 임의의 서열 또는 그의 변이체, 예를 들어 N-말단 메티오닌이 부가되었거나 또는 존재하는, 본원에 기재된 서열식별번호: 401-487 중 어느 하나 또는 그의 변이체, 변형 또는 융합 형태 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌의 부재 하에, 서열식별번호: 202의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 202의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있고 (임의로, N-말단 메티오닌의 부재 하에), 여기서 서열식별번호: 202의 pAF가 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌의 부재 하에, 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌의 부재 하에, 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 Fc 도메인 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 및 Fc 도메인 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 475를 포함할 수 있다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 단리 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유류 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 박테리아, 예컨대 이. 콜라이이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 효모, 예컨대 사카로미세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 숙주 세포를 배양시키고 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 단리시키는 것을 포함하는, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생산 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생산 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 선택적 코돈에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 숙주 세포를 배양시키고 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 단리시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 숙주 세포는 상기 선택적 코돈을 인식하고 상기 비-자연 코딩 아미노산을 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 도입하는 직교 tRNA를 포함한다.

- [0191] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 202의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 서열식별번호: 202의 pAF가 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 N-말단 메티오닌 없이, Fc 도메인 또는 그의 단편과 융합된, 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 475를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 및 적어도 1종의 다른 활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 항당뇨병제, 콜레스테롤 조절제, 항염증제, 항비만제, 항고혈압제, 또는 항섬유증제이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 GLP-1 효능제 또는 인슐린이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 초속효성(rapid acting), 단기지속성(short acting), 속효성(regular acting), 중시간형(intermediate acting), 또는 장기지속성(long acting) 인슐린, 휴마로그(Humalog), 리스프로(Lispro), 노보로그(Novolog), 애피드라(Apidra), 휴물린(Humulin), 아스파트(Aspart), 인간 인슐린, NPH, 런트(Lente), 울트라 런트(Ultralente), 란투스(Lantus), 글라진(Glargin), 레버미어(Levemir), 디터머(Detemir); 엑세나티드(exenatide) (바이에타(Byetta)/바이듀리언(Bydureon)), 리라글루티드(liraglutide) (빅토자(Victoza)), 릭시 세나티드(lixisenatide) (릭수미아(Lyxumia)), 알비글루티드(albiglutide) (탄제움(Tanzeum)), 엑세나티드 장기지속 방출형 (LAR), 타스포글루티드(taspoglutide), 알비글루티드, LY2189265 (둘라글루티드(Dulaglutide)); 오를리스타트(ormlistat) (제니칼(Xenical)), 췌장 리파제 억제제, 날트렉손(naltrexone), 펜터민(phentermine), 토피라메이트(topiramate) (큐시미아(Qsymia)), 로카세린(lorcaserin) (벨빅(Belviq)), 날트렉손 및 부프로피온(bupropion) (콘트라빈(Contravene)), 리모나반트(rimonabant) (아콕플리아(Acomplia)), 칸나비노이드 수용체 길항제, 시부트라민(sibutramine) (메리디아(Meridia)), 로카세린, 리모나반트, 프람린티드(pramlintide), 펜터민, 토피라메이트, 부프로피온, 또는 글루코만난(glucomannan)이다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 글루코스 및 지질 항상성, 글루코스 흡수, GLUT 1 발현, 및/또는 글루코스, 트리글리세리드, 인슐린 또는 글루카곤의 혈청 농도 중 적어도 하나의 조절을 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 글루코스 및 지질 항상성, 글루코스 흡수, GLUT 1 발현, 및/또는 글루코스, 트리글리세리드, 인슐린 또는 글루카곤의 혈청 농도 중 적어도 하나를 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인슐린 감수성의 증가, 아디포넥틴 수준의 증가, 혈중 글루코스 수준의 감소, 글루카곤 수준의 감소, 트리글리세리드 수준의 감소, 프럭토사민 수준의 감소, 저밀도 콜레스테롤 수준의 감소, 또는 C-반응성 단백질 수준의 감소를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 인슐린 감수성의 증가, 아디포넥틴 수준의 증가, 혈중 글루코스 수준의 감소, 글루카곤 수준의 감소, 트리글리세리드 수준의 감소, 프럭토사민 수준의 감소, 저밀도 콜레스테롤 수준의 감소, 또는 C-반응성 단백질 수준의 감소 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 비만, 당뇨병, 췌장염, 인슐린 저항성, 고인슐린혈증, 글루코스 불내성, 고혈당증, 대사 증후군, 글루코스 내성 장애, 부적절한 글루코스 클리어런스, 높은 혈중 글루코스, 및 프라더-윌리 증후군으로부터 선택된 병태 또는 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 상기 병태 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 A형 인슐린 저항성, C형 인슐린 저항성 (HAIR-AN 증후군이라고도 함), 랍슨-멘덴할 증후군, 도너휴 증후군 또는 레프리카니즘, 고안드로겐혈증, 다모증, 또는 흑색 가시세포증으로부터 선택된 인슐린 관련 병태 또는 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 상기 병태 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1형 당뇨병 또는 2형 당뇨병의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 1형 당뇨병 또는 2형 당뇨병의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 비만의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 비만의 치료 방법을 제공한다.

[0195] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 췌장, 폐, 심장, 신장, 간, 눈, 신경계, 골수, 림프절, 심근내막, 및/또는 후복막과 같은 기관 또는 조직에 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 간 섬유증 또는 경변증 전증일 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 비알콜성 지방간염 (NASH), 경변증, 미만성 실질성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 폐성 섬유증, 진행성 괴상 섬유증, 특발성 폐성 섬유증, 주입 섬유증, 신장성 섬유증, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 초점성 분절성 사구체경화증, 막성 신증, IgA 신증, 골수섬유증, 심부전증, 대사성 심부전증, 심장성 섬유증, 백내장 섬유증, 백내장, 안내 반흔, 췌장 섬유증, 피부 섬유증, 장 섬유증, 장 협착, 심근내막 섬유증, 심방 섬유증, 종격 섬유증, 크론병, 후복막 섬유증, 켈로이드, 신원성 전신 섬유증, 피부경화증, 전신 경화증, 관절섬유증, 페이로니 증후군, 듀프이트렌 구축, 당뇨병성 신경병증, 유착성 관절낭염, 알콜성 간 질환, 지방간, 바이러스성 간염, 담관 질환, 원발성 혈색소증, 약물-관련 경변증, 잠복성 경변증, 윌슨병, 및 알파 1-항트립신 결핍증, 간질성 폐 질환 (ILD), 인간 섬유증 폐 질환, 간 섬유증, 황반 변성, 망막병증, 유리체 망막병증, 심근 섬유증, 그레이브스 안병증, 약물 유발성 맥각중독증, 심혈관 질환, 아테롬성 동맥경화증/재협착증, 비후성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 및 염증성 장 질환 (콜라겐성 결장염을 비제한적으로 포함함)으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 폐성 질환, 폐암, 약물 요법, 화학요법, 또는 방사선 요법 중 하나 이상으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 노화, 심장 마비, 졸중, 심근 손상, 또는 좌심실 부전 중 하나 이상으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 신장성 섬유증, 사구체 신염, 만성 신장 질환, 만성 신부전, 및 전신 루푸스, 암, 신체 장애, 독소, 대사 질환, 면역 질환, 또는 당뇨병성 신증과 연관된 신염으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 외상, 척수 손상, 감염, 수술, 허혈성 손상, 심장 마비, 화상, 환경 오염물 노출, 폐렴, 결핵, 또는 급성 호흡 곤란 증후군 중 하나 이상으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 폐성 섬유증, 간질성 폐 질환, 인간 섬유증 폐 질환, 특발성 폐성 섬유증, 간 섬유증, 심장성 섬유증, 심근 섬유증, 황반 변성, 망막병증, 유리체 망막병증, 그레이브스 안병증, 약물 유발성 맥각중독증, 심혈관 질환, 아테롬성 동맥경화증/재협착증, 켈로이드 및 비후성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 염증성 장 질환, 콜라겐성 결장염, 안내 반흔 및 백내장 섬유증으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 NASH, 간 섬유증, 및 경변증으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 NASH일 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 당뇨병성 신장 질환, 만성 신장 질환, 및 신장성 섬유증으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 대사성 심부전증 및 심장성 섬유증으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 폐 섬유증일 수 있다.

[0196] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 간 섬유증 또는 경변증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 간 섬유증 또는 경변증의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0197] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 간 지방 비율의 감소를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 간 지방 비율의 감소 방법을 제공하고, 여기서 임의로 상기 환자는 NASH의 발병 위험이 있거나 또는 NASH 진단을 받았다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 간 경직도의 감소, 체지방률의 감소, 체중의 감소, 간 중량 대 체중 비의 감소, 간 지질 함량의 감소, 간 섬유증 부위의 감소, 공복 혈중 글루코스 수준의 감소, 공복 트리글리세리드의 감소, LDL 콜레스테롤의 감소, ApoB의 감소, ApoC의 감소, 및/또는 HDL 콜레스테롤의 증가를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 간 경직도의 감소, 체지방률의 감소, 체중의 감소, 간 중량 대 체중 비의 감소, 간 지질 함량의 감소, 간 섬유증 부위의 감소, 공복 혈중 글루코스 수준의 감소, 공복 트리글리세리드의 감소, LDL 콜레스테롤의 감소, ApoB의 감소, ApoC의 감소, 및/또는 HDL 콜레스테롤의 증가 방법을 제공하고, 여기서 임의로 상기 환자는 NASH의 발병 위험이 있거나 또는 NASH 진단을 받았다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 아디포넥틴 수준의 증가를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 아디포넥틴 수준의 증가 방법을 제공하고, 여기서 임의로 상기 환자는 NASH의 발병 위험이 있거나 또는 NASH 진단을 받았다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 NASH와 연관된 하나 이상의 증상의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된

조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH와 연관된 하나 이상의 증상의 치료 방법을 제공한다.

- [0198] NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 202와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 202와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 또한, NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 202를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공되고, 여기서 pAF 잔기가 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티와 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)은 약 0.1 kDa 내지 100 kDa, 또는 약 20 kDa 내지 약 40 kDa, 또는 약 30 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)은 약 30 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0199] NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 102와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 102와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 또한, NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 (a) N-말단 Met이 없는 서열식별번호: 102, 또는 (b) 서열식별번호: 102를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공된다.
- [0200] NASH의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 475와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 NASH의 치료 또는 예방 방법이 본원에 제공된다.
- [0201] 일부 실시양태에서, 환자는 NASH CRN 섬유증 1-3기를 나타낼 수 있으며, 이는 임의로 간 생검에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 치료 전에 환자는 적어도 약 60의 지방 간 지수를 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 전에 환자는 적어도 10%의 간 지방 비율 백분율을 나타낼 수 있으며, 이는 임의로 자기 공명 영상화에 의해 결정된다.
- [0202] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 심부전증 또는 심장성 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 심부전증 또는 심장성 섬유증의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 신장 또는 신장성 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 신장 또는 신장성 섬유증의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 폐 섬유증의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 폐 섬유증의 치료 방법을 제공한다.
- [0203] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서의 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법을 제공하고, 여기서 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1-7 및 201로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 인간 FGF-21 폴리펩티드와 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖고, 섬유증과 연관된 상기 질환은 NASH, 간 섬유증, 당뇨병성 신장 질환, 만성 신장 질환, 신장성 섬유증, 폐 섬유증, 심장성 섬유증, 심부전증, 및 대사성 심부전증으로부터 선택된다.
- [0204] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1-7 및 201로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 인간 FGF-21 폴리펩티드와 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는다.
- [0205] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 1 내지 100 kDa 또는 약 30 kDa의 분자량을 임의로 갖는, 폴리(에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있는 중합체 또는 수용성 중합체와 임의

로 연결된, 서열식별번호: 201의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법을 제공하고, 여기서 섬유증과 연관된 상기 질환은 NASH, 간 섬유증, 당뇨병성 신장 질환, 만성 신장 질환 및 대사성 심부전증으로부터 선택될 수 있다.

[0206] 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 또는 146에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 77, 91 또는 131에 상응하는 위치에 존재할 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 페닐알라닌 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있고 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 존재할 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 또는 모노메톡시 PEG (mPEG) 모이어티와 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 하기 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 모노메톡시 PEG (mPEG) 모이어티와 연결될 수 있다: i) 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa; ii) 약 1 kDa 내지 50 kDa; iii) 약 10 kDa 내지 40 kDa; iv) 약 20 kDa 내지 30 kDa; v) 약 0.050 kDa 내지 약 100 kDa; 또는 vi) 약 100 kDa, 95 kDa, 90 kDa, 85 kDa, 80 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa, 9 kDa, 8 kDa, 7 kDa, 6 kDa, 5 kDa, 4 kDa, 3 kDa, 2 kDa, 1 kDa, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 또는 100 Da. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결될 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 옥심 연결을 통해 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 또는 반감기 연장 모이어티와 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 옥심 연결은 카르보닐 기와 아미노옥시기의 반응으로부터 유래되는 구조를 갖는다.

[0210] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF 21 폴리펩티드는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 인간 FGF 21 폴리펩티드 또는 또 다른 FGF-21 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 가질 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 1종의 다른 활성제를 상기 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 상기 추가의 활성제는 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 동일한 조성물에 함유될 수 있거나 또는 별도로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 항섬유증제, N-카데린 길항제, 항-N 카데린 항체, 소분자 N-카데린 길항제, 길항성 N-카데린 단편, 항염증제, 레닌-안지오텐신 시스템 (RAS)을 억제하는 간보호제, 프로바이오틱, 및 다중불포화 지방산 (PUFA)으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항섬유증제는 닌테다닙(nintedanib), 피르페니돈(Pirfenidone), LPA1 길항제, LPA1 수용체 길항제, GLP1 유사체, 트랄로키누맙(tralokinumab) (IL-13, 아스트라제네카(AstraZeneca)), 비스모데깁(vismodegib) (헤지호그 길항제, 로슈(Roche)), PRM-151 (펜트락신-2, TGF 베타-1, 프로메디올(Promedior)), SAR-156597 (이중특이적 Mab IL-4&IL-13, 사노피(사노피)), 심투주맙(simtuzumab) (항-리실 옥시다제-유사체 2 (항-LOXL2) 항체, 길리드(Gilead)), CKD-942, PTL-202 (PDE inh./펜톡시필린/NAC 경구용 제어 방출형, 퍼시픽 테르.(Pacific Ther.)), 오미팔리십(omipalisib) (경구용 PI3K/mTOR 억제제, GSK), IW-001 (경구용 sol. 소 체V형 콜라겐 mod., 이뮤웍스(ImmuneWorks)), STX-100 (인테그린 알파 V/베타-6 ant, 스트로메덱스/바이오젠(Stromedix/Biogen)), 액티뮌(Actimmune) (IFN 감마), PC-SOD (미디스마제; 흡입형, LTT 바이오-파르마 / CKD 팜(Bio-Pharma / CKD Pharm)), 레브리키주맙(lebrikizumab) (항-IL-13 SC 인간화 mAb, 로슈), AQX-1125 (SHIP1 활성화제, 아퀴녹스(Aquinox)), CC-539 (JNK 억제제, 셀젠(Celgene)), FG-3019 (피브로젠(FibroGen)), 및 SAR-100842 (사노피)로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 간보호제는 우르소데옥시콜산 (UDCA) 또는 오베티콜산 (OCA 또는 INT-747, 인터셉트(Intercept))일 수 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 섬유증과 연관된 질환의 치료 방법에 사용하기에 적합한 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 1종의 다른 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 항섬유증제, 피르페니돈, N-카데린 길항제, 항-N 카데린 항체, 소분자 N-카데린 길항제, 길항성 N-카데린 단편, 항염증제, 레닌-안지오텐신 시스템 (RAS)을 억제하는 간보호제, 예컨대 우르소데옥시콜산 (UDCA), 오

베타콜산 (OCA 또는 INT-747, 인터셉트), 프로바이오틱 및 다중불포화 지방산 (PUFA)으로부터 선택될 수 있다.

- [0213] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 의학적으로 합병된 비만의 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 의학적으로 합병된 비만의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 의학적으로 합병된 비만은 프라다-윌리 증후군과 연관있을 수 있다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물은 경구로, 국소로, 또는 주사를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 피하 주사, IV 주사, 복강내 주사, 근육내 주사를 통해 투여될 수 있다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1일 1회의 빈도로, 또는 대략 1일 1회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1주마다 2회의 빈도로, 또는 대략 1주마다 2회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1주마다 1회의 빈도로, 또는 대략 1주마다 2회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 2주마다 1회의 빈도로, 또는 대략 1주마다 2회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 3주마다 1회의 빈도로, 또는 대략 1주마다 2회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1개월마다 1회의 빈도로, 또는 대략 1개월마다 1회보다 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 4주마다 1회의 빈도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1일 1회의 빈도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 조성물은 대략 1주마다 1회의 빈도로 투여된다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 투여당 약 0.01 mg 내지 약 500 mg, 투여당 약 0.1 mg 내지 약 200 mg, 투여당 약 0.2 mg 내지 약 100 mg, 투여당 약 0.5 mg 내지 약 80 mg, 투여당 약 1 mg 내지 약 60 mg, 투여당 약 5 mg 내지 약 40 mg, 투여당 약 10 mg 내지 약 30 mg, 투여당 약 10 mg 내지 약 20 mg, 투여당 약 0.2 mg 내지 약 1 mg, 투여당 약 1 mg 내지 약 2 mg, 투여당 약 2 mg 내지 약 4 mg, 투여당 약 4 mg 내지 약 6 mg, 투여당 약 6 mg 내지 약 10 mg, 투여당 약 10 mg 내지 약 20 mg, 투여당 약 20 mg 내지 약 40 mg, 투여당 약 40 mg 내지 약 60 mg, 투여당 약 60 mg 내지 약 80 mg, 투여당 약 80 mg 내지 약 100 mg, 투여당 약 100 mg 내지 약 120 mg, 투여당 약 120 mg 내지 약 140 mg, 투여당 약 140 mg 내지 약 160 mg, 투여당 약 160 mg 내지 약 180 mg, 투여당 약 180 mg 내지 약 200 mg, 또는 투여당 약 200 mg 내지 약 240 mg의 양으로 투여될 수 있다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 투여당 약 0.2 mg, 약 0.6 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 4 mg, 약 6 mg, 약 8 mg, 약 10 mg, 약 20 mg, 약 40 mg, 약 60 mg, 약 80 mg, 약 100 mg, 약 120 mg, 약 140 mg, 약 160 mg, 약 180 mg, 및 약 200 mg의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 투여당 약 0.2 mg, 약 0.6 mg, 약 2 mg, 약 6 mg, 약 20 mg, 약 40 mg, 및 약 60 mg의 양으로 투여될 수 있다.
- [0218] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 본원에 개시된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물은 적어도 1종의 다른 활성제와 공동-투여되거나 또는 별도로 (동시에 또는 순차적으로) 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 항당뇨병제, 항비만제, 콜레스테롤 조절제, 항염증제, 및 항고혈압제로부터 선택된다.
- [0219] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 스타틴(statin), GLP-1 효능제, 및 인슐린으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 다른 활성제는 아밀린, 아밀린 유사체, 알파-글루코시다제 억제제, 예컨대 미그리톨(miglitol), 아카보즈(acarbose), 보글리보즈(voglibose), 메트포르민(metformin), 비구아니드(biguanide), 글리타존(glitazone), 예컨대 로시글리타존(rosiglitazone), 피오글리타존(pioglitazone), 트로글리타존(troglitazone), 분비촉진제, 예컨대 엑세나티드, 리라글루티드, 타스포글루티드 또는 리시세나티드, 당뇨약, 디펩티딜 펩티다제-4 억제제, 인슐린, 초속효성, 단기지속성, 속효성, 중시간형, 또는 장기지속성 인슐린, 휴마로그, 리스프로, 노보로그, 애피드라, 휴물린, 아스파트, 인간 인슐린, NPH, 린트, 울트라린트, 란투스, 글라진, 레버미어, 디터머, 아토르바스타틴(Atorvastatin), 세리바스타틴(Cerivastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 메바스타틴(Mevastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin), 프라바스타틴

(Pravastatin), 로수바스타틴(Rosuvastatin), 심바스타틴 바이토린(Simvastatin Vytorin), 애드비콜(Advicor), 베실레이트 카듀엣(Besylate Caduet), 심코(Simcor), 올리스타트 (제니칼), 췌장 리파제 억제제, 날트렉손, 펜터민 및 토피라메이트 (큐시미아), 로카세린 (벨빅), 날트렉손, 부프로피온 (콘트라빈), 리모나반트 (아콕플리아), 칸나비노이드 수용체 길항제, 시부트라민 (메리디아), 로카세린, 리모나반트, 엑세나티드, 프람린티드, 펜터민, 토피라메이트, 기분 안정제, 부프로피온, 글루코만난, 구아 검(guar gum), 텍세드린(Dexedrine), 디곡신(digoxin), 식욕억제제 약물, 항비만 약물, 엑세나티드 (바이에타/바이두리언), 리라글루티드 (빅토자), 릭시세나티드 (릭수미아), 알비글루티드 (탄제움), 엑세나티드 장기지속 방출형 (LAR), 타스포글루티드, 알비글루티드, 및 LY2189265 (둘라글루티드)로부터 선택된다.

- [0220] 유리하게는, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 화합물은 이러한 요법을 필요로 하는 대상체에게 편의성과 투여 요건에 대한 대상체의 순응 가능성을 둘다 증가시키면서, 보다 적은 용량을 요구하는 연장된 순환 반감기를 허용함으로써 효력을 증가시킬 수 있다.
- [0221] 대사 증후군은 전형적으로 하기 징후 중 적어도 3개를 나타내는 환자에게 진단된다: 복부 지방 - 대부분의 남성의 경우, 40 인치 이상의 허리; 높은 혈당 - 공복시 1 데시리터 당 적어도 110 밀리그램 (mg/dL); 높은 트리글리세리드 - 혈류 중 적어도 150 mg/dL; 낮은 HDL - 40 mg/dL 미만; 및 130/85 이상의 혈압.
- [0222] 본 발명의 방법은 그럴 필요가 있는 환자에서 II형 당뇨병 및/또는 비만을 치료하거나 또는 그의 발병을 지연시키는 데 효과적일 수 있다. 상기 환자는 당뇨병 전증 진단을 받았을 수 있거나 또는 II형 당뇨병의 하나 이상의 발병 위험 인자, 예컨대 II형 당뇨병의 가족력; II형 당뇨병을 이전에 진단받은 1명 이상의 부모 또는 형제자매; 이상지질혈증; 적어도 200 mg/dL의 총 혈중 트리글리세리드 수준; 35 mg/dL 미만의 혈중 고밀도 지단백질 수준; 비만; 25 kg/m² 초과 체질량 지수; 임신 당뇨병의 병력; 9 lb 초과 출생시 체중을 갖는 유아 출산 경험; 고혈압; 적어도 140 mmHg의 수축기 혈압; 적어도 90 mmHg의 확장기 혈압; 사전 측정시 적어도 99 mg/dL의 공복 혈중 글루코스; 혈관 질환; 다낭성 난소 증후군; 또는 흑색 가시세포증을 보일 수 있다.
- [0223] 환자는 당뇨병 전증의 하나 이상의 증상, 예컨대 100 mg/dL 내지 125 mg/dL의 공복 혈중 글루코스 수준; 75 그램의 글루코스 용액 또는 체중 1 킬로그램 당 1.75 그램의 글루코스를 갖는 글루코스 용액 (75 그램의 최대 용량)을 섭취한지 2시간 후 140 mg/dL 내지 199 mg/dL의 혈당 수준; 및/또는 5.7% 내지 6.4%의 당화 헤모글로빈을 보일 수 있다.
- [0224] 환자는 당뇨병의 하나 이상의 증상, 예컨대 125 mg/dL 초과 공복 혈중 글루코스 수준; 75 그램의 글루코스 용액 또는 체중 1 킬로그램 당 1.75 그램의 글루코스를 갖는 글루코스 용액 (75 그램의 최대 용량)을 섭취한지 2시간 후 적어도 200 mg/dL의 혈당 수준; 및/또는 적어도 6.5%의 당화 헤모글로빈을 보일 수 있다.
- [0225] 환자는 II형 당뇨병을 진단받았을 수 있다.
- [0226] 환자는 GLP-1, 엑세나티드-1, 엑센딘(exendin), 엑센딘 유사체, 엑센딘 효능제, 리라글루티드, 릭시세나티드, 알비글루티드, 엑세나티드 LAR, DPP-4 억제제, GLP-1 수용체 효능제, 및 또 다른 GLP-1 효능제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화합물을 이용한 치료에 대하여 무반응성일 수 있거나; 또는 이러한 화합물은 환자에게 투여하는 것이 금지된 것일 수 있다.
- [0227] 방법은 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드 이외에도, 항당뇨병제 또는 항비만제를 상기 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 항당뇨병제 또는 항비만제는 아밀린, 아밀린 효능제, 술폰닐우레아, 칼시토닌, 글루카곤, PPAR-감마 효능제, GPL-1 수용체 효능제, 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제, 아밀린 유사체, 비구아니드, 도파민 D2 수용체 효능제, 메글리티니드(meglitinide), 알파-글루코시다제 억제제, 항이상지질혈증 담즙산 제거제, 엑센딘, 엑센딘 유사체, 엑센딘 효능제, 위 억제 펩티드 (GIP), 인크레틴 펩티드, 인슐린, SGLT2 억제제, 글루코스 재흡수 억제제, 페노피브레이트(fenofibrate), 피브레이트(fibrate), 항-그렐린 항체 또는 항체 단편, 섬유모세포 성장 인자 수용체 (FGFR)-1(IIIb), FGFR-1(IIIc), 항체 또는 항체 단편, 및/또는 FGFR-4(IIIc), 항-CD38 항체 또는 항체 단편, 항-MIC-1 항체, 또는 MIC-1 결합 단편, 메트포르민 또는 상기 중 임의의 것의 조합 중 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0228] 예시 실시양태에서, 상기 항당뇨병제는 메트포르민, 인슐린 글라진, 예컨대 란투스 (사노피), 시타글립틴(sitagliptin), 예컨대 자누비아(Januvia), 인슐린 아스파트, 예컨대 노보로그 및 노보라피드(NovoRapid) (노보 노르디스크(Novo Nordisk)), 인슐린 리스프로, 예컨대 휴마로그 (일라이 릴리(Eli Lilly)), 리라글루티드, 예컨대 빅토자 (노보 노르디스크), 인슐린 디터머, 예컨대 레버미어 (노보 노르디스크), 메트포르민과 조합된 시타글립틴, 예컨대 자누메트(Janumet) (머크(Merck)), 가용성 인슐린 아스파트 및 30/70 비율의 프로타민-결정

화 인슐린 아스파트, 예컨대 노보 믹스(Novo Mix) 30 (노보 노르디스크), 또는 피오글리타존, 예컨대 액토스(Actos) (타케다(Takeda))일 수 있다.

[0229] 방법은 체중 감소를 유도하는데 효과적일 수 있다.

[0230] 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 조합되어 사용되는 항당뇨병제는 인슐린 분비촉진제 또는 인슐린 감작제, MGAT2 억제제, 또는 다른 항당뇨병제를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 작용제는 디펩티딜 펩티다제 IV (DP4) 억제제 (예를 들어, 시타글립틴, 삭사글립틴(saxagliptin), 알로글립틴(alogliptin), 빌다글립틴(vildagliptin) 등), 비구아니드 (예를 들어, 메트포르민, 펜포르민(phenformin) 등), 술폰일 우레아 (예를 들어, 글리부리드(glyburide), 글리메프리드(glimepiride), 글리피지드(glipizide) 등), 글루코시다제 억제제 (예를 들어, 아카보즈, 미그리톨 등), PPAR γ 효능제, 예컨대 티아졸리딘디온 (예를 들어, 로시글리타존, 피오글리타존 등), PPAR α/γ 이중 효능제 (예를 들어, 무라글리타자르(muraglitazar), 테사글리타자르(tesaglitazar), 알레글리타자르(aleglitazar) 등), 글루코키나제 활성화제 (본원에 참조로 포함되는 문헌 [Fyfe, M.C.T. et al., *Drugs of the Future*, 34(8):641-653 (2009)]에 기재된 것), GPR40 수용체 조정제, GPR119 수용체 조정제 (MBX-2952, PSN821, APD597 등), SGLT2 억제제 (다파글리플로진(dapagliflozin), 카나글리플로진(canagliflozin), 레마글리플로진(remagliflozin) 등), 아밀린 유사체, 예컨대 프람린티드, 및/또는 인슐린을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 임의로 당뇨병의 합병증을 치료하는 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 이러한 작용제는 PKC 억제제 및/또는 AGE 억제제를 포함한다.

[0231] 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 임의로 1종 이상의 식욕억제제, 예컨대 디에틸프로피온(diethylpropion), 펜디메트라진(phendimetrazine), 펜터민, 올리스타트, 시부트라민, 로카세린, 프람린티드, 토피라메이트, MCHR1 수용체 길항제, 옥신토모둘린, 날트렉손, 아밀린 펩티드, NPY Y5 수용체 조정제, NPY Y2 수용체 조정제, NPY Y4 수용체 조정제, 세틸리스타트(cetilistat), 5HT2c 수용체 조정제 등과 조합되어 사용될 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 글루카곤-유사 펩티드-1 수용체 (GLP-1 R)의 효능제, 예컨대 엑세나티드, 리라글루티드, GPR-1(1-36) 아미드, GLP-1(7-36) 아미드, GLP-1(7-37) (그의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 5,614,492 (Habener)에 개시된 것)과 조합되어 사용될 수 있고, 이들은 주사를 통해, 비내로, 또는 경피 또는 협측 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0232] 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 임의로 1종 이상의 다른 유형의 치료제, 예컨대 DGAT 억제제, LDL 강하 약물, 예컨대 스타틴 (HMG CoA 리덕타제의 억제제) 또는 콜레스테롤 흡수 억제제, PCSK9 조정제, HDL 증가 약물, 예컨대 CETP 억제제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0233] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 수용성 중합체와 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 링커에 의해 수용성 중합체와 연결되거나 또는 수용성 중합체와 결합된다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 이관능성 중합체이다. 일부 실시양태에서, 이관능성 중합체는 제2의 폴리펩티드와 연결된다. 일부 실시양태에서, 제2의 폴리펩티드는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드이다.

[0234] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함하는 수용성 중합체와 연결된 적어도 2개의 비-자연 코딩 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산은 변형된 FGF-21 내의 하기 위치 중 하나 이상에 혼입된다: 1 위치의 앞쪽 (즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (즉, 단백질의 카르복실 말단) (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7에서의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산은 변형된 FGF-21 내의 하기 위치 중 하나 이상에 혼입된다: 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연 코딩 아미

노산은 변형된 FGF-21 내의 하기 위치 중 하나 이상에 혼입된다: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산은 변형된 FGF-21 내의 하기 위치 중 하나 이상에 혼입된다: 87, 77, 83, 72 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산은 변형된 FGF-21 내의 하기 위치 중 하나 이상에 혼입된다: 69, 79, 91, 96, 108 및 110 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비천연 아미노산은 서열식별번호: 3, 4, 6, 7, 또는 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 서열의 리더 서열 또는 신호 서열에 혼입된다. 일부 실시양태에서, 리더 서열은 서열식별번호: 39, 40, 41, 42, 43 또는 44로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 분비 구축물은 서열식별번호: 39, 40, 41, 42, 43 또는 44로부터 선택된 리더 서열과 함께 pVK7ara (Nde/Eco)로 클로닝된다.

[0235]

일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 하기 위치를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 이들 위치 중 하나 이상에서 수용성 중합체와 연결된다: 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (즉, 단백질의 카르복실 말단) (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 서열식별번호: 34-36의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단)부터 C 말단에 이르기까지 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체와 연결된다. 일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 하기 위치를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 이들 위치 중 하나 이상에서 수용성 중합체와 연결된다: 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 하기 위치를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는 이들 위치 중 하나 이상에서 수용성 중합체와 연결된다: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 하기 위치 중 하나 이상에서 수용성 중합체와 연결된다: 87, 77, 83, 72 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 하기 위치 중 하나 이상에서 수용성 중합체와 연결된다: 69, 79, 91, 96, 108 및 110 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연으로 발생하는 아미노산은 서열식별번호: 3, 4, 6, 7, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 다른 변형된 FGF-21 서열의 리더 서열 또는 신호 서열에서 수용성 중합체와 연결된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-자연으로 발생하는 아미노산은 서열식별번호: 3, 4, 6, 7, 또는 다른 변형된 FGF-21 서열의 리더 서열 또는 신호 서열에서 수용성 중합체와 연결된다.

[0236]

일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 FGF-21 폴리펩티드 수용체 또는 결합 파트너, 예를 들어 비제한적으로 단백질, 폴리펩티드, 소분자, 또는 핵산에 대한 친화도를 조정하는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 안정성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 면역원성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 면역원성을 감소시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 혈청 반감기 또는 순환 시간과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0237]

일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 탈아미드화와 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 탈아미드화를 감소시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 수성 용해도와 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 수성 용해도를 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 용해도와 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 숙주 세포에서 생산되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도를 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 발현 또는 합성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 숙주 세포에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 발현을 증가시키거나 또는 시험관내 합성을 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 치환을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 효능제 활성을 보유할 수 있고 숙주 세포에서의 발현 수준을 유지하거나 또는 개선한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 프로테아제 저항성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 프로테아제 저항성을 증가시키거나 또는 프로테아제 절단 (예컨대, C-말단 아미노산의 절단)을 감소시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 미국 특허 6,716,626에서는, 치환되어 프로테아제 절단을 변경시킬 수 있는 잠재적인 자리가 프롤린의 2개 잔기 내의 일염기성 자리를 비제한적으로 포함한다는 것이 나타나 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21 폴리펩티드와의 상호작용시의 수용체 활성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 수용체의 신호 전달 활성을 조정하는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21 폴리펩티드의 결합과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 또 다른 분자, 예컨대 수용체와의 결합을 조정하는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0238]

일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 상용성과 비교하였을 때, 또는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 201의 FGF-21 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 비교하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 제약 보존제 (예를 들어, m-크레졸, 페놀, 벤질 알콜)와의 상용성을 증가시키는 적어도 1개의 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 증가한 상용성은 저장 중에 단백질의 생리화학적 특성 및 생물학적 활성을 유지하는 보존 제약 체제의 제조를 가능하게 할 것이다. 그 전문이 참조로 포함되는 WO 2005/091944에서는 향상된 제약 안정성을 갖는 FGF-21 뮤테인의 하기 예가 논의되었다: 하기 중 어느 하나를 대신하는 하전된 아미노산 및/또는 극성이지만 비하전된 아미노산의 치환: WO 05/091944의 서열식별번호: 1의 글리신 42, 글루타민 54, 아르기닌 77, 알라닌 81, 류신 86, 페닐알라닌 88, 리신 122, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 프롤린 130, 아르기닌 131, 류신 139, 알라닌 145, 류신 146, 이소류신 152, 알라닌 154, 글루타민 156, 글리신 161, 세린 163, 글리신 170, 또는 세린 172. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리펩티드의 상응하는 위치에서 이들 치환 중 적어도 하나를 포함할 수 있고/거나 1개 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치 중 하나 이상에서 치환된다: 글리신 42, 글루타민 54, 아르기닌 77, 알라닌 81, 류신 86, 페닐알라닌 88, 리신 122, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 프롤린 130, 아르기닌 131, 류신 139, 알라닌 145, 프롤린/류신 146, 이소류신 152, 알라닌 154, 글루타민 156, 글리신 161, 세린 163, 글리신 170, 세린 172 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치 중 하나 이상에서 치환된다: 글루타메이트 91, 아르기닌 131, 글루타민 108, 아르기닌 77, 아르기닌 72, 히스티딘 87, 류신 86, 아르기닌 126, 글루타메이트 110, 티로신 83, 프롤린 146, 아르기닌 135, 아르기닌 96, 아르기닌 36, (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치).

- [0239] WO 05/091944에 향상된 제약 안정성을 갖는 FGF-21의 추가 뮤테인이 기재되어 있다. 이러한 뮤테인은 FGF-21의 하기 위치 중 2개 이상에서 시스테인의 치환을 포함한다 (WO 05/091944의 서열식별번호: 1 참조): 아르기닌 19, 티로신 20, 류신 21, 티로신 22, 트레오닌 23, 아스파르테이트 24, 아스파르테이트 25, 알라닌 26, 글루타민 27, 글루타민 28, 알라닌 31, 류신 33, 이소류신 35, 류신 37, 발린 41, 글리신 42, 글리신 43, 글루타메이트 50, 글루타민 54, 류신 58, 발린 62, 류신 66, 글리신 67, 리신 69, 아르기닌 72, 페닐알라닌 73, 글루타민 76, 아르기닌 77, 아스파르테이트 79, 글리신 80, 알라닌 81, 류신 82, 글리신 84, 세린 85, 프롤린 90, 알라닌 92, 세린 94, 페닐알라닌 95, 류신 100, 아스파르테이트 102, 티로신 104, 티로신 107, 세린 109, 글루타메이트 110, 프롤린 115, 히스티딘 117, 류신 118, 프롤린 119, 아스파라긴 121, 리신 122, 세린 123, 프롤린 124, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 아스파르테이트 127, 알라닌 129, 프롤린 130, 글리신 132, 알라닌 134, 아르기닌 135, 류신 137, 프롤린 138, 또는 류신 139. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리펩티드의 상응하는 위치에서 이들 치환 중 적어도 1개를 포함할 수 있고/거나 1개 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다.
- [0240] WO 05/091944에는 또한 Cys75-Cys93에서 자연 발생의 것 이외에도, 조작된 디설피드 결합 (시스테인으로 치환된 아미노산)을 갖는 FGF-21의 특정 뮤테인이 기재되어 있으며, 하기와 같다: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Asp127Cys-Gly132Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19Cys-Pro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys, 또는 Arg77Cys-Ala81Cys, 여기서 넘버링은 WO 05/091944의 서열식별번호: 1을 기준으로 한다. 조작된 디설피드 결합을 갖는 추가의 뮤테인은 Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; 또는 Asp25Cys-Lys122Cys이며, 여기서 넘버링은 WO 05/091944의 서열식별번호: 1을 기준으로 한다. 조작된 디설피드 결합을 갖는 추가의 뮤테인은 Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys이며, 여기서 넘버링은 WO 05/091944의 서열식별번호: 1을 기준으로 한다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리펩티드의 상응하는 위치(들)에서 이들 치환 중 1개 이상을 포함할 수 있고/거나 1개 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다.
- [0241] WO 05/091944에 PEG화된 FGF-21의 추가 뮤테인이 기재되어 있다. 이들 뮤테인은 하기 치환 중 하나를 갖는다: D25C, D38C, L58C, K59C, P60C, K69C, D79C, H87C, E91C, E101C, D102C, L114C, L116C, K122C, R126C, P130C, P133C, P140C. WO 05/091944에는 하기 위치에서의 시스테인 치환이 기재되어 있다: 19, 21, 26, 28, 29, 30, 36, 39, 42, 50, 56, 61, 64, 65, 68, 70, 71, 77, 81, 85, 86, 90, 92, 94, 98, 107, 108, 112, 113, 123 및 124. WO 05/091944에는 하기 위치에서의 시스테인 치환이 나타나 있다: 24, 27, 37, 40, 44, 46, 49, 57, 88, 89, 106, 110, 111, 115, 120 및 139. WO 05/091944에는 또한 하기 위치에서의 시스테인 치환도 기재되어 있다: 18, 45, 47, 48, 78, 83, 99, 103, 125, 128, 131, 132 및 138. WO 05/091944에는 또한 하기 위치에서의 시스테인 치환도 기재되어 있다: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133 및 140.
- [0242] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리펩티드의 상응하는 위치에서 상기에 언급된 치환 중 1개 이상을 포함할 수 있고/거나 1개 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합한 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다.
- [0243] 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 적어도 1개의 천연이 아닌 아미노산을 갖는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 적어도 1개의 번역 후 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 번역 후 변형은 시험관내에서 이루어진다. 특정 실시양태에서, 번역 후 변형은 생체내에서 진핵생물 세포 또는 비-진핵생물 세포에서 이루어진다.
- [0244] 특정 실시양태에서, 단백질은 어느 하나의 숙주 세포에 의해 생체내에서 이루어지는 적어도 1개의 번역 후 변형을 포함하고, 여기서 번역 후 변형은 보통 또 다른 숙주 세포 유형에 의해서는 이루어지지 않는다. 특정 실시양태에서, 단백질은 진핵생물 세포에 의해 생체내에서 이루어지는 적어도 1개의 번역 후 변형을 포함하고, 여기서 번역 후 변형은 보통 비-진핵생물 세포에 의해서는 이루어지지 않는다. 번역 후 변형의 예는 당화, 아세틸

화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미네이트 부가, 포스포틸화, 당지질-연결 변형 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질 또는 폴리펩티드는 분비 또는 국소화 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함할 수 있다.

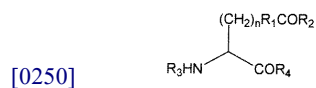
[0245] 본 개시내용은 또한 1개 이상의 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 PEG 유도체 및 관련된 친수성 중합체의 수용성 및 가수분해에 안정한 유도체를 제공한다. 아세틸렌 모이어티를 함유하는 PEG 중합체 유도체는 선택터 코돈에 대한 반응으로 단백질에 선택적으로 도입되었던 아지드 모이어티와의 커플링에 대하여 매우 선택적이다. 마찬가지로, 아지드 모이어티를 함유하는 PEG 중합체 유도체도 선택터 코돈에 대한 반응으로 단백질에 선택적으로 도입되었던 아세틸렌 모이어티와의 커플링에 대하여 매우 선택적이다.

[0246] 보다 구체적으로, 아지드 모이어티는 알킬 아지드, 아릴 아지드 및 이들 아지드의 유도체를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 알킬 및 아릴 아지드의 유도체는, 아세틸렌-특이적 반응성이 유지되는 한, 다른 치환기를 포함할 수 있다. 아세틸렌 모이어티는 알킬 및 아릴 아세틸렌 및 이들 각각의 유도체를 포함한다. 알킬 및 아릴 아세틸렌의 유도체는, 아지드-특이적 반응성이 유지되는 한, 다른 치환기를 포함할 수 있다.

[0247] 본 개시내용은 매우 다양한 관능기, 치환기 또는 모이어티를 갖는 물질의, 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광가교제; 방사성 핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2의 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 길레이터; 보조인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 텐드리머; 시클로덱스트린; 억제성 리보핵산; 생체적합물질; 나노입자; 스핀 표지; 형광단, 금속-함유 모이어티; 방사성 모이어티; 신규 관능기; 다른 분자와 공유 또는 비공유 상호작용하는 기; 광케이지(photocaged) 모이어티; 화학선에 의해 여기가능한 모이어티; 광이성질체화 모이어티; 비오틴; 비오틴의 유도체; 비오틴 유사체; 중원자를 혼입하는 모이어티; 화학적으로 절단가능한 기; 광으로 절단가능한 기; 연장된 측쇄; 탄소-결합된 당; 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 동위원소 표지된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 기; 화학발광성 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 개재 기(intercalating group); 발색단; 에너지 전달제; 생물학적 활성제; 검출가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오티드; 래디오투랜스미터; 중성자 포획제; 또는 이들의 임의의 조합을 비제한적으로 포함하는 다른 물질, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질과의 접합체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 갖는 물질의, 상응하는 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 PEG 중합체 유도체와의 접합체를 포함한다. 예를 들어, 아지드 모이어티를 함유하는 PEG 중합체는 아세틸렌 관능기를 갖는 비-유전적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 단백질 내의 위치에서 생물학적 활성 분자와 커플링될 수 있다. PEG와 생물학적 활성 분자가 커플링되는 연결은 휘스겐(Huisgen) [3+2] 고리화첨가 생성물을 비제한적으로 포함한다.

[0248] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기, 아세틸 기, 아미노옥시 기, 히드라진 기, 히드라지드 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함한다.

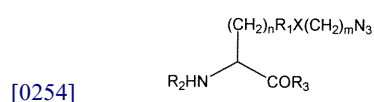
[0249] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 하기 구조를 포함한다:



[0251] 상기 식에서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 및 치환된 아릴이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 기이고, R₄는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 기이다.

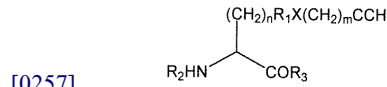
[0252] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 아미노옥시 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 히드라지드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 히드라진 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 세미카르바지드 기를 포함한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 아지드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 하기 구조를 갖는다:



[0255] 상기 식에서, n 은 0-10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재하지 않으며; X 는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않으며; m 은 0-10이고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 기이고, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 기이다.

[0256] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 알킨 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 하기 구조를 갖는다:



[0258] 상기 식에서, n 은 0-10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; X 는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않으며; m 은 0-10이고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 기이고, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 기이다.

[0259] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 효능제, 부분 효능제, 길항제, 부분 길항제, 또는 역 효능제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 수용성 중합체와 연결된 비-자연 코딩 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다.

[0260] 본 개시내용은 또한 엄격한 조건 하에 서열식별번호: 8-14와 혼성화되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 개시내용은 또한 엄격한 조건 하에 서열식별번호: 8-14와 혼성화되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 선택터 코돈을 포함한다. 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 1-7로서 나타난 폴리펩티드 또는 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 단리된 폴리뉴클레오티드는 적어도 1개의 선택터 코돈, 예를 들어 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 함유된 비-자연 코딩 아미노산을 코딩하는 선택터 코돈을 포함한다.

[0261] 일부 실시양태에서, 선택터 코돈은 앰버 코돈, 오키 코돈, 오팔 코돈, 특이 코돈, 회귀 코돈, 5-염기 코돈, 및 4-염기 코돈으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0262] 본 개시내용은 또한 수용성 중합체와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 단리된 변형된 FGF-21 폴리펩티드를, 비-자연 코딩 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 수용성 중합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산은 20종의 일반 아미노산 중 어느 것에 대해서도 비반응성인 수용성 중합체에 대하여 반응성이다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산은 20종의 일반 아미노산 중 어느 것에 대해서도 비반응성인 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자에 대하여 반응성이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 카르보닐-함유 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 기를 포함하는 링커, 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 분자, 또는 생물학적 활성 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 기는 아마이드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 연결된다.

[0264] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 카르보닐 기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 기를 포함하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 폴리펩티드와 반응시킴으로써 제조된다.

[0265] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 알킨-함유 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를, 아지드 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아지드 또는 알킨 기는 아마이드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 연결된다.

[0266] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 아지드-함유 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를, 알킨 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아지드 또는 알킨 기는 아마이드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 연결된다.

[0267] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결되는 수용성 중합체는 폴리알킬렌 글리콜 모이어티를 포함

한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 카르보닐 모이어티를 포함하고 수용성 중합체는 아미노옥시, 히드라지드, 히드라진, 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 알킨 모이어티를 포함하고 수용성 중합체는 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산 잔기는 아지드 모이어티를 포함하고 수용성 중합체는 알킨 모이어티를 포함한다.

[0268] 본 개시내용은 또한 셀렉터 코돈을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 비-자연 코딩 아미노산을 치환시키기 위한 직교 RNA 신테타제 및/또는 직교 tRNA를 포함한다.

[0269] 본 개시내용은 또한 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들, 직교 RNA 신테타제 및/또는 직교 tRNA를 포함하는 세포를 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 발현을 허용하는 조건 하에 배양시키고; 세포 및/또는 배양 배지로부터 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 정제시키는 것을 포함한다.

[0270] 변형된 FGF-21 코딩 영역과 연결된 FGF-21 리더 또는 신호 서열 뿐만 아니라, 변형된 FGF-21 코딩 영역과 연결된 이중성 신호 서열은 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 선택되는 이중성 리더 또는 신호 서열은 숙주 세포에 의해, 예를 들어 숙주 세포 분비 시스템에 의해 인식되고 프로세싱되어 분비되고, 또한 가능하게는 신호 펩티다제에 의해 절단되기도 하는 것이어야 한다. 본 개시내용의 리더 서열은 하기로부터 선택될 수 있다: 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 6으로부터의 3 류신 리더 (아미노산 위치 1-28), 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 7로부터의 2 류신 리더 (아미노산 위치 1-27), 서열식별번호: 2로부터의 His 태그 (아미노산 위치 1-10), 서열식별번호: 39, 서열식별번호: 40, 서열식별번호: 41, 서열식별번호: 42, 서열식별번호: 43, 서열식별번호: 44. 본 개시내용의 변형된 FGF-21을 이용하여 병태 또는 장애를 치료하는 방법은 신호 또는 리더 펩티드를 갖는 또는 갖지 않는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 이용하는 치료를 내포하고자 한다.

[0271] 본 개시내용은 또한 지방세포에서의 글루코스 흡수 증가를 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 변형된 FGF-21을, 글루코스 흡수 증가를 유도하는 유효량으로 상기 세포에 투여하는 것을 포함한다. 상기 글루코스 흡수 증가는 보다 신속하고 보다 효율적인 글리코스 이용을 통해 에너지 소비 증가를 초래할 수 있다.

[0272] II. 개시된 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 함께 사용하기 위한 일반적인 제조법 핵산 및 방법

[0273] 본 개시내용의 수많은 실시양태에서, 관심있는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 단리되고, 클로닝되며, 종종 제조법 방법을 이용하여 변경될 수 있다. 이러한 실시양태는 비제한적으로 단백질 발현을 위해 또는 변이체, 유도체, 발현 카세트, 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드로부터 유래되는 다른 서열을 생산하는 과정에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 이중성 프로모터와 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 DNA 코돈을 사용하는 것은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 기술을 사용하는 이. 콜라이 또는 포유류 세포 (예를 들어, CHO) 발현에 대하여 최적화될 수 있다.

[0274] 리더 서열을 갖지 않는 FGF-21의 P-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 8로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 1로서 나타나 있다.

[0275] 리더 서열을 갖지 않는 FGF-21의 His 태그부착된 P-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 9로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 2로서 나타나 있다.

[0276] 3개의 류신을 함께 함유하는 리더 서열을 갖는 FGF-21의 P-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 10로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 3로서 나타나 있다.

[0277] 2개의 류신을 함께 함유하는 리더 서열을 갖는 FGF-21의 P-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 11로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 4로서 나타나 있다.

[0278] 리더 서열을 갖지 않는 FGF-21의 L-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 12로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 5로서 나타나 있다.

[0279] 3개의 류신을 함께 함유하는 리더 서열을 갖는 FGF-21의 L-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 13으로

서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 6으로서 나타나 있다.

[0280] 2개의 류신을 함께 함유하는 리더 서열을 갖는 FGF-21의 L-형태를 코딩하는 cDNA의 예는 서열식별번호: 14로서 나타나 있다. 이 폴리펩티드는 서열식별번호: 7로서 나타나 있다.

[0281] 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 모 폴리펩티드의 아미노산 서열, 예를 들어 비제한적으로 서열식별번호: 1-7로서 나타나 있는 아미노산 서열을 기준으로 합성되고, 그 후에 적절한 아미노산 잔기(들)의 도입 (즉, 혼입 또는 치환) 또는 제거 (즉, 결실 또는 치환)가 일어나도록 뉴클레오티드 서열이 변화할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 통상의 방법에 따라 자리-지정 돌연변이에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 별법으로, 뉴클레오티드 서열은 화학적 합성에 의해, 예를 들어 비제한적으로 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 목적하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 기반하여, 또한 바람직하게는 재조합 폴리펩티드가 생산될 숙주 세포에서 바람직한 코돈을 선택하여 디자인된다. 예를 들어, 목적하는 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 다수의 소형 올리고뉴클레오티드가 합성되고 PCR, 라이게이션 또는 라이게이션 연쇄 반응에 의해 어셈블리될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Barany, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193 (1991)]; 미국 특허 6,521,427을 참조한다.

[0282] 본 개시내용은 또한 천연이 아닌 아미노산을 직교 tRNA/RS 쌍을 통해 생체내 혼입하기 위한 진핵생물 숙주 세포, 비-진핵생물 숙주 세포, 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 또는 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 구축물, 예를 들어 비제한적으로 본 개시내용의 벡터로 유전자 조작되고 (형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 비제한적으로 포함함), 상기 벡터는 예를 들어 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있다. 예를 들어, 직교 tRNA, 직교 tRNA 신테타제, 및 유도체화될 단백질에 대한 코딩 영역은 목적하는 숙주 세포에서 기능적인 유전자 발현 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 파지, 박테리아, 바이러스, 네이키드 폴리뉴클레오티드, 또는 접합된 폴리뉴클레오티드의 형태일 수 있다. 벡터는 표준 방법에 의해 세포 및/또는 미생물에 도입될 수 있다.

[0283] 선택터 코돈

[0284] 본 개시내용의 선택터 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 프레임워크를 확장시킨다. 예를 들어, 선택터 코돈은 특이한 3-염기 코돈, 넌센스 코돈, 예전대 정지 코돈, 예를 들어 비제한적으로 앰버 코돈 (UAG), 오키 코돈, 또는 오팔 코돈 (UGA), 비천연 코돈, 4개 이상-염기 코돈, 회귀 코돈 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 매우 다양한 개수의 선택터 코돈이 목적하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드에 도입될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 매우 자명하며, 예를 들어 비제한적으로 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 초과와 선택터 코돈이 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 적어도 부분을 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드에 도입될 수 있다.

[0285] 한 실시양태에서, 방법은 생체내에서 1개 이상의 비천연 (즉, 비-자연 코딩) 아미노산을 혼입하기 위해 정지 코돈인 선택터 코돈을 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, UAG를 비제한적으로 포함하는 정지 코돈을 인식하는 O-tRNA가 생산되고, O-RS에 의해 목적하는 천연이 아닌 아미노산으로 아미노아실화된다. 이러한 O-tRNA는 자연 발생 숙주의 아미노아실-tRNA 신테타제에 의해서는 인식되지 않는다. 통상의 자리-지정 돌연변이가 관심 폴리펩티드의 관심 자리에 TAG를 비제한적으로 포함하는 정지 코돈을 도입하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sayers, J.R., *et al.* (1988), *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucleic Acids Res.* 16:791-802]을 참조한다. O-RS, O-tRNA 및 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 생체내에서 조합되면, UAG 코돈에 대한 반응으로 천연이 아닌 아미노산이 혼입되어 특정된 위치에서 천연이 아닌 아미노산을 함유하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0286] 천연이 아닌 아미노산의 생체내 혼입은 진핵생물 숙주 세포의 유의한 교란 없이 수행될 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효율은 앰버 억제 tRNA를 비제한적으로 포함하는 O-tRNA와 진핵생물 방출 인자 (eRF를 비제한적으로 포함함) (정지 코돈과 결합하여 리보솜으로부터 성장하는 펩티드의 방출을 개시함) 사이의 경쟁에 좌우되기 때문에, 억제 효율이, 예를 들어 비제한적으로 O-tRNA 및/또는 억제 tRNA의 발현 수준 증가에 의해 조정될 수 있다.

[0287] 천연이 아닌 아미노산은 또한 회귀 코돈으로 코딩될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 단백질 합성 반응에서의 아르기닌 농도가 감소할 때, 회귀 아르기닌 코돈 AGG는 알라닌으로 아실화된 합성 tRNA에 의한 Ala의 삽입을 위해 효율적인 것으로 입증되었다. 예를 들어, 문헌 [Ma *et al.*, *Biochemistry*, 32:7939 (1993)]을 참조한다. 이러한 경우에, 합성 tRNA는 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*)에서 소수 화학종으로서 존재하는, 자연 발생

tRNAArg과 경쟁한다. 일부 유기체는 모든 3-염기 코돈을 사용하지는 않는다. 마이크로코커스 루테우스 (*Micrococcus luteus*)에서의 미지정 코돈 AGA는 시험관내 전사/번역 추출물에서의 아미노산의 삽입을 위해 이용되었다. 예를 들어, 문헌[Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997)]을 참조한다. 본 개시내용의 성분은 생체내에서 이러한 희귀 코돈을 사용하여 생산될 수 있다.

[0288] 셀렉터 코돈은 또한 연장된 코돈, 예를 들어 비제한적으로 4개 이상의 염기로 된 코돈, 예컨대 4-염기, 5-염기, 6-염기 또는 그 초과 염기로 된 코돈을 포함한다. 4-염기 코돈의 예는 AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 5-염기 코돈의 예는 AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 특징은 프레임시프트 억제에 기반하여 연장된 코돈을 사용하는 것을 포함한다. 4개 이상의 염기로 된 코돈은, 예를 들어 비제한적으로 1개 또는 다수의 천연이 아닌 아미노산을 동일한 단백질에 삽입할 수 있다. 예를 들어, 안티코돈 루프, 예를 들어 적어도 8-10 nt 안티코돈 루프를 갖는 특수 프레임시프트 억제 tRNA를 비제한적으로 포함하는 돌연변이된 O-tRNA의 존재 하에, 4개 이상의 염기로 된 코돈은 단일 아미노산으로서 판독된다. 다른 실시양태에서, 안티코돈 루프는, 예를 들어 비제한적으로 적어도 4-염기 코돈, 적어도 5-염기 코돈, 또는 적어도 6-염기 코돈 또는 그 초과 염기로 된 코돈을 해독할 수 있다. 256종의 가능한 4-염기 코돈이 존재하므로, 다수의 천연이 아닌 아미노산이 4개 이상의 염기로 된 코돈을 사용하여 동일한 세포에서 코딩될 수 있다.

[0289] 한 실시양태에서, 희귀 코돈 또는 넌센스 코돈에 기반한 연장된 코돈이 본 개시내용에서 사용될 수 있고, 이는 다른 원치않는 자리에서의 미스센스 번역초과 및 프레임시프트 억제를 감소시킬 수 있다.

[0290] 주어진 시스템에 대하여, 셀렉터 코돈은 또한 천연 3-염기 코돈 중 어느 하나를 포함할 수 있고, 여기서 내생성 시스템은 천연 염기 코돈을 사용하지 않는다 (또는 거의 사용하지 않음). 예를 들어, 여기에는 천연 3-염기 코돈을 인식하는 tRNA가 없는 시스템, 및/또는 3-염기 코돈이 희귀 코돈인 시스템이 포함된다.

[0291] 셀렉터 코돈은 임의로 비천연 염기 쌍을 포함한다. 이러한 비천연 염기 쌍은 기존의 유전자 알파벳을 추가로 확장시킨다. 1개의 추가 염기 쌍이 3-염기 코돈의 개수를 64개에서 125개로 증가시킨다. 세번째 염기 쌍의 특성은 안정하고 선택적인 염기 쌍 형성, 높은 정확도로 폴리머라제에 의한 DNA 내로의 효율적인 효소적 혼입, 및 초기 비천연 염기 쌍의 합성 후 효율적인 연속 프라이머 연장을 포함한다. 방법 및 조성물을 위해 적합화될 수 있는 비천연 염기 쌍에 관한 설명은 예를 들어, 문헌 [Hirao, et al., (2002), *Nature Biotechnology*, 20:177-182]을 포함한다. 또한, 문헌 [Wu, Y., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124:14626-14630]을 참조한다.

[0292] 관심 단백질 또는 폴리펩티드, 예컨대 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고 본원에 기재된 방법을 사용하여, 예를 들어 천연이 아닌 아미노산의 혼입을 위한 1개 이상의 셀렉터 코돈을 포함하도록 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 관심 단백질에 대한 핵산이 1개 이상의 셀렉터 코돈을 포함하도록 돌연변이되어, 1개 이상의 천연이 아닌 아미노산의 혼입을 제공한다. 본 개시내용은, 예를 들어 적어도 1개의 천연이 아닌 아미노산을 포함하는 임의의 단백질의 돌연변이체, 변형체를 비제한적으로 포함하는 임의의 이러한 변이체를 포함한다.

[0293] 관심 단백질, 예컨대 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 폴리펩티드의 임의의 목적하는 위치에 시스테인을 도입하도록 용이하게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 중합체, 단백질, 또는 매우 다양한 다른 분자를 관심 단백질에 도입하기 위해 널리 사용된다.

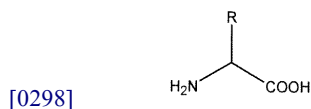
[0294] *III. 비-자연 코딩 아미노산*

[0295] 매우 다양한 비-자연 코딩 아미노산이 본 개시내용에서 사용하기에 적합하다. 임의의 개수의 비-자연 코딩 아미노산이 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입된 비-자연 코딩 아미노산은 실질적으로 유전적으로-코딩된 20종의 일반 아미노산 (즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린)에 대하여 화학적으로 비활성이다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 20종의 일반 아미노산에서는 발견되지 않는 관능기와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응하여 안정한 접합체를 형성하는 측쇄 관능기 (아지도, 케톤, 알데히드 및 아미노옥시 기를 비제한적으로 포함함)를 포함한다. 예를 들어, 아지도 관능기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 중합체 (폴리(에틸렌 글리콜))를 비제한적으로 포함함)와 반응하거나, 또는 다르게는 알킨 모이어티를 함유하는 제2의 폴리펩티드와 반응하여, 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 생성물을 형성하는 아지도 관능기와 알킨 반응기의 선택적 반응으로

부터 초래되는 안정한 접합체를 형성할 수 있다.

[0296] 알파-아미노산의 일반 구조식은 하기와 같이 예시된다 (화학식 I):

[0297] <화학식 I>

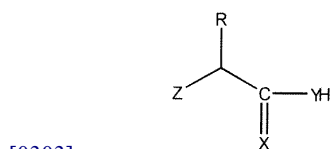


[0299] 비-자연 코딩 아미노산은 전형적으로 상기에 예시된 화학식을 가지나, 여기서 R 기가 20종의 천연 아미노산에 사용되는 것을 제외한 임의의 치환기인 임의의 구조이고, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 사용하기에 적합할 수 있다. 본 개시내용의 비-자연 코딩 아미노산은 전형적으로 측쇄의 구조만이 천연 아미노산과 상이하므로, 비-자연 코딩 아미노산은 자연 발생 폴리펩티드에서 형성되는 것과 동일한 방식으로, 예를 들어 비제한적으로 천연 또는 비-자연으로 코딩된 다른 아미노산과 아미드 결합을 형성한다. 그러나, 비-자연 코딩 아미노산은 이들을 천연 아미노산과 구분하는 측쇄 기를 갖는다. 예를 들어, R은 임의로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 히드록실-, 히드라진, 시아노-, 할로-, 히드라지드, 알케닐, 알킬닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 술폰-, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로시클릭, 에논, 이민, 알데히드, 에스테르, 티오산, 히드록실아민, 아미노 기 등 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

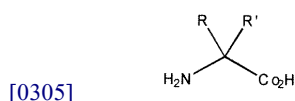
[0300] 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있고 수용성 중합체와의 반응에 유용한 비-자연 코딩 아미노산의 예는 카르보닐, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드, 세미카르바지드, 아지드 및 알킨 반응기를 갖는 것을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린을 포함한다.

[0301] 본원에 제공된 비-자연 코딩 아미노산 중 대다수가 예를 들어, 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich; 미국 미주리주 세인트루이스 소재), 노바바이오켄 (Novabiochem; 독일 다름슈타트에 소재하는 이엠디 바이오사이언시즈(EMD Biosciences)의 지사), 또는 펩테크 (Peptech; 미국 매사추세츠주 버링턴 소재)로부터 시판되고 있다. 시판되지 않는 것들은 본원에 제공된 바와 같이 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 임의로 합성된다. 유기 합성 기술에 관해서는, 예를 들어 문헌 [[Organic Chemistry](#) by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.)]; [[Advanced Organic Chemistry](#) by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]; 및 [[Advanced Organic Chemistry](#) by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 7,045,337 및 7,083,970을 참조한다. 신규한 측쇄를 함유하는 천연이 아닌 아미노산 이외에도, 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 천연이 아닌 아미노산은 또한, 예를 들어 비제한적으로 화학식 II 및 III의 구조식에 의해 예시되는 바와 같은 변형된 백본 구조를 임의로 포함한다:

[0302] <화학식 II>



[0304] <화학식 III>



[0306] 상기 식에서, Z는 전형적으로 OH, NH₂, SH, NH-R', 또는 S-R'를 포함하고; 동일하거나 또는 상이할 수 있는 X 및 Y는 전형적으로 S 또는 O를 포함하고, 임의로 동일하거나 또는 상이한 R 및 R'는 전형적으로, 화학식 I을 갖는 천연이 아닌 아미노산에 대하여 상기에 기재된 R 기의 구성요소와 동일한 목록과 수소로부터 선택된다. 예를 들어, 본 개시내용의 천연이 아닌 아미노산은 화학식 II 및 III에 의해 예시되는 바와 같이 아미노 또는 카르복실 기에서 치환을 임의로 포함한다. 이러한 유형의 천연이 아닌 아미노산은, 예를 들어 비제한적으로 20종

의 일반 천연 아미노산에 상응하는 측쇄 또는 천연이 아닌 측쇄를 갖는 α -히드록시산, α -티오산, α -아미노티오카르복실레이트를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, α -탄소에서의 치환은 임의로 L, D, 또는 α - α -이치환 아미노산, 예컨대 D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-티로신, 아미노부티르산 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 구조적 대안물은 시클릭 아미노산, 예컨대 프롤린 유사체 뿐만 아니라, 3, 4, 6, 7, 8 및 9원의 고리 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산, 예컨대 치환된 β -알라닌 및 γ -아미노 부티르산을 포함한다.

[0307] 수많은 천연이 아닌 아미노산은 천연 아미노산, 예컨대 티로신, 글루타민, 페닐알라닌 등에 기반하는 것으로서, 본 개시내용에서 사용하기에 적합하다. 티로신 유사체는 파라-치환된 티로신, 오르토-치환된 티로신, 및 메타-치환된 티로신을 포함하나, 이들로 제한되지는 않고, 여기서 치환된 티로신은, 예를 들어 비제한적으로 케토 기 (아세틸 기를 비제한적으로 포함함), 벤조일 기, 아미노 기, 히드라진, 히드록시아민, 티올 기, 카르복시 기, 이소프로필 기, 메틸 기, $C_6 - C_{20}$ 직쇄 또는 분지형 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸 기, 폴리에테르 기, 니트로 기, 알킬닐 기 등을 포함한다. 또한, 다중 치환된 아릴 고리도 고려된다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 글루타민 유사체는 α -히드록시 유도체, γ -치환된 유도체, 시클릭 유도체, 및 아미드 치환된 글루타민 유도체를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 페닐알라닌 유사체의 예는 파라-치환된 페닐알라닌, 오르토-치환된 페닐알라닌, 및 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하나, 이들로 제한되지는 않고, 여기서 치환기는 예를 들어 비제한적으로 히드록시 기, 메톡시 기, 메틸 기, 알킬 기, 알데히드, 아지도, 아이오도, 브로모, 케토 기 (아세틸 기를 비제한적으로 포함함), 벤조일, 알킬닐 기 등을 포함한다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 천연이 아닌 아미노산의 구체적인 예는 p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알킬-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAc β -세린, 엘-도파(L-Dopa), 플루오린화된 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-아이오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, 및 p-프로파르길옥시-페닐알라닌 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0308] 한 실시양태에서, 천연이 아닌 아미노산 (예컨대, p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌)을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 조성물이 제공된다. p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌 및 예를 들어 비제한적으로 단백질 및/또는 세포를 포함하는 다양한 조성물이 또한 제공된다. 한 측면에서, p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌으로서 천연이 아닌 아미노산을 포함하는 조성물은 직교 tRNA를 추가로 포함한다. 천연이 아닌 아미노산은 직교 tRNA와 결합할 수 있고 (공유 결합을 비제한적으로 포함함), 예를 들어 비제한적으로 아미노-아실 결합을 통해 직교 tRNA와 공유 결합할 수 있고, 직교 tRNA의 말단 리보스 당의 3'OH 또는 2'OH와 공유 결합할 수 있는 등의 방식이다.

[0309] 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,012,931에 기재되어 있는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다.

[0310] 비천연 아미노산의 구조 및 합성: 카르보닐, 카르보닐-유사형, 마스킹된 카르보닐, 보호된 카르보닐 기, 및 히드록실아민 기

[0311] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 옥심 결합에 의해 수용성 중합체, 예를 들어 PEG와 연결된 변형된 FGF-21을 제공한다. 수많은 유형의 비-자연 코딩 아미노산이 옥심 결합의 형성에 적합하다. 이들은 카르보닐, 디카르보닐, 카르보닐-유사형, 마스킹된 카르보닐, 보호된 카르보닐, 또는 히드록실아민 기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산을 비제한적으로 포함한다. 이러한 아미노산, 그의 구조 및 합성이, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,012,931에 기재되어 있다.

[0312] *IV. 비천연 아미노산의 구조 및 합성: 히드록실아민-함유 아미노산*

[0313] 미국 특허 가출원 60/638,418은 그 전문이 참조로 포함된다. 따라서, 미국 특허 가출원 60/638,418의 섹션 V (제목: "비천연 아미노산"), 파트 B (제목: "비천연 아미노산의 구조 및 합성: 히드록실아민-함유 아미노산")에 제공된 개시내용은, 그러한 개시내용이 본원에 전체가 제공된 것처럼, 본원에 기재된 비천연 아미노산, 비천연 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드를 제조하고, 정제하고, 특징화하고, 사용하기 위한 방법, 조성물, 기술 및 전략에 충분히 적용된다. 미국 특허 공보 2006/0194256, 2006/0217532, 및 2006/0217289 및 WO 2006/069246 (발명의 명칭: "비천연 아미노산 및 폴리펩티드를 함유하는 조성물, 이들을 포함하는 방법, 및 이들의 용도") 역시 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0314] 천연이 아닌 아미노산의 화학적 합성

- [0315] 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 천연이 아닌 아미노산 중 대다수가 예를 들어, 시그마 (Sigma; 미국 소재) 또는 알드리치 (Aldrich; 미국 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 시판되고 있다. 시판되지 않는 것들은 본원에 제공된 바와 같이 또는 다양한 공개물에 제공된 바와 같이 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 임의로 합성된다. 유기 합성 기술에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.)]; [Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]; 및 [Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조한다. 천연이 아닌 아미노산의 합성이 기재되어 있는 또 다른 공개물은 예를 들어, WO 2002/085923 (발명의 명칭: "천연이 아닌 아미노산의 생체내 혼입"); 문헌 [Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669]; [King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) *A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates.* J. Chem. Soc., 3315-3319]; [Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) *Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents.* J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752]; [Craig, J.C. et al. (1988) *Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [(4-(diethylamino)-1-methylbutyl)amino]quinoline (Chloroquine).* J. Org. Chem. 53, 1167-1170]; [Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) *Glutamine analogues as Potential Antimalarials,* Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5]; [Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) *Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues.* J. Org. Chem. 54, 1859-1866]; [Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) *Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization.* J. Org. Chem. 50:1239-1246]; [Barton et al., (1987) *Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives.* Tetrahedron 43:4297-4308]; 및 [Subasinghe et al., (1992) *Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site.* J. Med. Chem. 35:4602-7]을 포함한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공보 U.S. 2004/0198637 (발명의 명칭: "단백질 어레이")을 참조한다.
- [0316] A. 카르보닐 반응기
- [0317] 카르보닐 반응기를 갖는 아미노산은, 특히 친핵성 첨가 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자 (PEG 또는 다른 수용성 분자를 비제한적으로 포함함)를 연결시키는 다양한 반응을 가능하게 한다.
- [0318] p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Zhang, Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카르보닐-함유 아미노산도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 유사하게 제조가능하다.
- [0319] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 반응성 카르보닐 관능기를 생성하도록 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응에 유용한 알데히드 관능기는 인접해 있는 아미노기와 히드록실기를 갖는 관능기로부터 생성될 수 있다. 생물학적 활성 분자가 폴리펩티드인 경우에는, 예를 들어, N-말단 세린 또는 트레오닌 (정상적으로 존재할 수 있거나 또는 화학적 또는 효소적 소화를 통해 노출될 수 있음)이 온화한 산화적 절단 조건 하에 펩타이드를 사용하여 알데히드 관능기를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gaertner, et al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992)]; [Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992)]; [Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994)]을 참조한다. 그러나, 관련 기술분야에 공지되어 있는 방법은 펩티드 또는 단백질의 N-말단의 아미노산으로 국한된다.
- [0320] 본 개시내용에서, 인접해 있는 히드록실기와 아미노기를 갖는 비-자연 코딩 아미노산은 "마스킹된" 알데히드 관능기로서 폴리펩티드에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 5-히드록시리신은 엡실론 아민에 인접해 있는 히드록실기를 갖는다. 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 전형적으로 폴리펩티드 내의 다른 자리에서의 산화를 피하기 위해 온화한 조건 하에서의 물 과량의 소듐 메타퍼아이오테이트의 첨가를 포함한다. 산화 반응의 pH는 전형적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 약 1.5배 물 과량의 소듐 메타퍼아이오테이트를 폴리펩티드의 완충 용액에 첨가한 후에, 암실에서 약 10분 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 6,423,685를 참조한다.
- [0321] 카르보닐 관능기는 수용액 중 온화한 조건 하에 히드라진-, 히드라지드-, 히드록실아민-, 또는 세미카르바지드-

함유 시약과 선택적으로 반응하여, 각각 상응하는 히드라존, 옥심, 또는 세미카르바존 연결을 형성할 수 있고, 이들은 생리적 조건 하에서 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959)]; [Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 또한, 카르보닐기의 특이한 반응성은 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에서의 선택적 변형을 가능하게 한다. 예를 들어, 문헌 [Cornish, V. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996)]; [Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992)]; [Mahal, L. K., *et al.*, *Science* 276:1125-1128 (1997)]을 참조한다.

[0322] B. 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 반응기

[0323] 친핵성 기, 예컨대 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산은 접합체를 형성하는 다양한 친전자성 기 (PEG 또는 다른 수용성 중합체를 비제한적으로 포함함)와의 반응을 가능하게 한다.

[0324] 히드라지드-, 히드라진-, 및 세미카르바지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 예를 들어, L-글루타메이트- γ -히드라지드는 시그마 케미칼 (Sigma Chemical; 미국 미주리주 세인트루이스 소재)로부터 입수가능하다. 시판되지 않는 다른 아미노산은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조가능하다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 6,281,211을 참조한다.

[0325] 히드라지드, 히드라진 또는 세미카르바지드 관능기를 갖는 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 관능기를 함유하는 다양한 분자와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 히드라지드, 히드라진 및 세미카르바지드 관능기의 특이한 반응성은 20종의 일반 아미노산에 존재하는 친핵성 기 (세린 또는 트레오닌의 히드록실 기 또는 리신 및 N-말단의 아미노 기를 비제한적으로 포함함)와 비교하여, 알데히드, 케톤 및 다른 친전자성 기에 대하여 유의하게 더욱 반응성이도록 한다.

[0326] C. 아미노옥시-함유 아미노산

[0327] 아미노옥시 (히드록시아민이라고도 함) 기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산은 접합체를 형성하는 다양한 친전자성 기 (PEG 또는 다른 수용성 중합체를 비제한적으로 포함함)와의 반응을 가능하게 한다. 히드라진, 히드라지드 및 세미카르바지드와 마찬가지로, 아미노옥시 기의 향상된 친핵성이 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 관능기를 함유하는 다양한 분자와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응하도록 한다. 예를 들어, 문헌 [Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)]; [H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001)]을 참조한다. 히드라진 기와의 반응 결과가 상응하는 히드라존인 반면에, 아미노옥시 기와 카르보닐-함유 기, 예컨대 케톤의 반응으로부터는 일반적으로 옥심이 생성된다.

[0328] 아미노옥시-함유 아미노산은 용이하게 입수가능한 아미노산 전구체 (호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003)]을 참조한다. 특정 아미노옥시-함유 아미노산, 예컨대 L-2-아미노-4-(아미노옥시)부티르산은 천연 공급원으로부터 분리되었다 (Rosenthal, G., *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997)). 다른 아미노옥시-함유 아미노산도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조가능하다.

[0329] D. 아지드 및 알킨 반응기

[0330] 아지드 및 알킨 관능기의 특이한 반응성은, 이들이 폴리펩티드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 매우 유용하도록 한다. 유기 아지드, 특히 지방족 아지드, 및 알킨은 일반적으로 통상의 반응성 화학 조건에 대하여 안정하다. 특히, 아지드 및 알킨 관능기는 둘다 자연 발생 폴리펩티드에서 발견되는 20종의 일반 아미노산의 측쇄 (즉, R 기)에 대하여 비활성이다. 그러나, 근접해지면 아지드 및 알킨 기의 "스프링-로딩(spring-loaded)" 특성이 나타나고, 이들이 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 선택적으로 그리고 효율적으로 반응하여 상응하는 트리아졸을 생성한다. 예를 들어, 문헌 [Chin J., *et al.*, *Science* 301:964-7 (2003)]; [Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003)]; [Chin, J. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002)]을 참조한다.

[0331] 휘스겐 고리화첨가 반응이 친핵성 치환이 아닌 선택적 고리화첨가 반응을 포함하므로 (예를 들어, 문헌 [Padwa, A., in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109]; [Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176] 참조), 아지드 및 알킨-함유 측쇄를 갖는 비-자연 코딩 아미노산의 혼입은 생성 폴리펩티드가 비-자연 코딩 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형되도록 한다. 아지드 또는 알킨-함유 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 고리화첨가 반응은 동일 반응

계에서 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키는 촉매량의 환원제의 존재 하에, Cu(II) (촉매량의 CuSO₄의 형태를 비제한적으로 포함함)의 첨가에 의해, 수성 조건 하의 실온에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003)]; [Tornøe, C. W., *et al.*, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002)]; [Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002)]을 참조한다. 환원제의 예는 아스코르베이트, 금속성 구리, 퀴닌, 히드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe²⁺, Co²⁺, 및 인가되는 전기 전위를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0332] 아지드와 알킨 사이의 휘스젠 [3+2] 고리화첨가 반응이 바람직한 일부 경우에, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 알킨 모이어티를 포함하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있고 아미노산에 부착될 수용성 중합체는 아지드 모이어티를 포함할 수 있다. 별법으로, 반대 반응 (즉, 아미노산에 아지드 모이어티를 갖고 수용성 중합체에 알킨 모이어티가 존재함)이 또한 수행될 수 있다.

[0333] 아지드 관능기는 또한 아릴 에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 또한 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화되어 아미드 연결을 생성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 동일 반응계에서 아지드를 환원시키고 생성되는 아민은 후속적으로 근접한 에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 예를 들어, 문헌 [E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000)]을 참조한다. 아지드-함유 아미노산은 알킬 아지드 (2-아미노-6-아지도-1-헥산을 비제한적으로 포함함) 또는 아릴 아지드 (p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

[0334] 아지드 관능기는 또한 티오에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 또한 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화되어 아미드 연결을 생성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 동일 반응계에서 아지드를 환원시키고 생성되는 아민은 후속적으로 티오에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다.

[0335] 알킨-함유 아미노산은 시판되고 있다. 예를 들어, 프로파르길글리신은 펩테크 (미국 매사추세츠주 버링턴 소재)로부터 시판되고 있다. 그렇지 않으면, 알킨-함유 아미노산은 표준 방법에 따라 제조가능하다. 예를 들어, p-프로파르길옥시페닐알라닌은 예를 들어 문헌 [Deiters, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003)]에 기재되어 있는 바와 같이 합성될 수 있고, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 문헌 [Kayser, B., *et al.*, *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997)]에 기재되어 있는 바와 같이 합성될 수 있다. 다른 알킨-함유 아미노산도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조가능하다.

[0336] 아지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌은 켐-임팩스 인터내셔널, 인크. (Chem-Impex International, Inc.; 미국 일리노이주 우드 데일 소재)로부터 입수될 수 있다. 시판되지 않는 아지드-함유 아미노산의 경우에는, 아지드 기가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여, 예를 들어 비제한적으로 적합한 이탈기 (할라이드, 메실레이트, 토실레이트를 비제한적으로 포함함)의 대체를 통해 또는 적합하게 보호된 락톤의 고리열림을 통해 비교적 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [*Advanced Organic Chemistry* by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조한다.

[0337] [3+2] 고리화첨가를 통해 본 개시내용의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 아지드 또는 알키닐 유도체를 갖는 실질적으로 임의의 분자를 포함한다. 이러한 분자는 염료, 형광단, 가교제, 사카라이드 유도체, 중합체 (폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 중합체를 비제한적으로 포함함), 광가교제, 세포독성 화합물, 친화성 표지, 비오틴의 유도체, 수지, 비드, 제2의 단백질 또는 폴리펩티드 (또는 추가의 단백질 또는 폴리펩티드), 폴리뉴클레오티드 (들) (DNA, RNA 등을 비제한적으로 포함함), 금속 킬레이터, 보조인자, 지방산, 탄수화물 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 분자는 알키닐 기를 갖는 천연이 아닌 아미노산, 예를 들어 비제한적으로 p-프로파르길옥시페닐알라닌, 또는 아지도 기를 갖는 천연이 아닌 아미노산, 예를 들어 비제한적으로 p-아지도-페닐알라닌에 첨가될 수 있다.

[0338] E. 아미노티올 반응기

[0339] 베타-치환된 아미노티올 관능기의 특이한 반응성은, 이들이 티아졸리딘의 형성을 통해 알데히드 기를 함유하는 폴리펩티드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 매우 유용하도록 한다. 예를 들어, 문헌 [J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 베타-치환된 아미노티올 아미노산은 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입되고, 후속적으로 알데히드 관능기를 포함하는 수용성 중합체와 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체, 약물 접합체 또는 다른 탑재물(payload)이 베타-치환된 아미노티올 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 티아졸리딘의 형성을 통해 커플링될 수 있다.

- [0340] F. 추가의 반응기
- [0341] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입될 수 있는 추가의 반응기 및 비-자연 코딩 아미노산이, 그 본문이 모두 본원에 참조로 포함되는 하기 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 공보 2006/0194256, 미국 특허 공보 2006/0217532, 미국 특허 공보 2006/0217289, 미국 특허 가출원 60/755,338; 미국 특허 가출원 60/755,711; 미국 특허 가출원 60/755,018; 국제 특허 출원 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; 미국 특허 가출원 60/743,041; 미국 특허 가출원 60/743,040; 국제 특허 출원 PCT/US06/47822; 미국 특허 가출원 60/882,819; 미국 특허 가출원 60/882,500; 및 미국 특허 가출원 60/870,594.
- [0342] 천연이 아닌 아미노산의 세포내 흡수
- [0343] 천연이 아닌 아미노산의 세포에 의한 흡수는, 예를 들어 비제한적으로 단백질로의 혼입을 위해 천연이 아닌 아미노산을 디자인하고 선택할 때 전형적으로 고려되는 하나의 문제이다. 예를 들어, α -아미노산의 높은 전하 밀도는 이들 화합물이 세포를 잘 투과하지 못할 수 있다는 것을 시사한다. 천연 아미노산은 단백질-기반 수송 시스템의 집합을 통해 진핵생물 세포 내로 흡수된다. 흡수되었다면, 어떤 천연이 아닌 아미노산이 세포에 의해 흡수되는지를 평가하는 신속한 스크리닝이 수행될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공보 2004/0198637 (발명의 명칭: "단백질 어레이"); 및 문헌 [Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) *Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code*. PNAS United States 96:4780-4785]에 서의, 예를 들어 독성 분석법을 참조한다. 흡수가 다양한 분석법으로 용이하게 분석되지만, 세포내 흡수 경로에 알맞은 천연이 아닌 아미노산을 디자인하는 것에 대한 대안은 생체내에서 아미노산을 생성하는 생합성 경로를 제공하는 것이다.
- [0344] 천연이 아닌 아미노산의 생합성
- [0345] 세포에는 아미노산 및 다른 화합물의 생산을 위한 수많은 생합성 경로가 이미 존재한다. 특정한 천연이 아닌 아미노산의 생합성 방법이 천연으로, 예를 들어 비제한적으로 세포에 존재하지 않을 수도 있지만, 본 개시내용이 이러한 방법을 제공한다. 예를 들어, 천연이 아닌 아미노산의 생합성 경로는 임의로 새로운 효소를 첨가함으로써 또는 기존의 숙주 세포 경로를 변화시킴으로써 숙주 세포에서 발생한다. 추가의 새로운 효소는 임의로 자연 발생 효소 또는 인위적으로 발생된 효소이다. 예를 들어, p-아미노페닐알라닌의 생합성 (WO 2002/085923 (발명의 명칭: "천연이 아닌 아미노산의 생체내 혼입")에서 실시예로 제공되었음)은 다른 유기체로부터의 공지된 효소의 조합을 첨가하는 것에 의존한다. 이들 효소에 대한 유전자는 이 유전자를 포함하는 플라스미드로 세포를 형질전환시킴으로써 진핵생물 세포에 도입될 수 있다. 유전자가 세포 내에서 발현될 경우, 이것은 목적 화합물을 합성하는 효소 경로를 제공한다. 임의로 첨가되는 효소 유형의 예는 하기 실시예에 제공된다. 추가의 효소 서열은, 예를 들어 진뱅크(GenBank)에서 찾아볼 수 있다. 인위적으로 발생된 효소도 동일한 방식으로 세포에 임의로 첨가된다. 이러한 방식으로, 세포내 기관 및 세포의 자원을 조작하여 천연이 아닌 아미노산을 생산한다.
- [0346] 생합성 경로에서의 사용 또는 기존 경로의 진화를 위해 새로운 효소를 생산하는 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 막시젠, 인크.(Maxygen, Inc.)(www.maxygen.com으로 접속가능함)에 의해 개발된 것을 비제한적으로 포함하는 반복적 재조합법이 새로운 효소 및 경로를 개발하는데 임의로 이용된다. 예를 들어, 문헌[Stemmer (1994), *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, Nature 370(4):389-391; 및 [Stemmer, (1994), *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751]을 참조한다. 유사하게, 제넨코 (Genencor)(www.genencor.com으로 접속가능함)에 의해 개발된 디자인패쓰(DesignPath)TM는 임의로 대사 경로 조작을 위해, 예를 들어 비제한적으로 세포에서 O-메틸-L-티로신을 생성하는 경로를 조작하기 위해 사용된다. 이러한 기술은 기능 유전체학 및 분자의 진화 및 디자인을 통해 확인된 것을 비제한적으로 포함하는 새로운 유전자의 조합을 사용하여 숙주 유기체에서의 기존의 경로를 재구축한다. 또한, 다이버사 코퍼레이션(Diversa Corporation)(www.diversa.com으로 접속가능함)은, 예를 들어 비제한적으로 새로운 경로를 형성하기 위해 유전자 라이브러리 및 유전자 경로의 신속한 스크리닝 기술을 제공한다.
- [0347] 전형적으로, 본 개시내용의 조작된 생합성 경로로 생산된 천연이 아닌 아미노산은 효율적인 단백질 생합성을 위해 충분한 농도로, 예를 들어 비제한적으로 천연 세포 내의 양이나, 다른 아미노산의 농도에 영향을 미치거나 또는 세포내 자원을 고갈시키는 정도가 아니도록 생산된다. 이러한 방식으로 생체내에서 생산되는 전형적인 농도는 약 10 mM 내지 약 0.05 mM이다. 특정 경로에 바람직한 효소를 생산하는데 사용되는 유전자를 포함하는 플라스미드로 세포가 형질전환되고 천연이 아닌 아미노산이 생성되면, 리보솜의 단백질 합성 및 세포 성장 둘 모

두를 위한 천연이 아닌 아미노산의 생산을 더욱 최적화하기 위해 생체내 선택이 임의로 사용된다.

[0348] V. 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생체내 생산

[0349] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 자연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 부가하거나 또는 이것으로 치환하기 위해 변형된 tRNA 및 tRNA 신테타제를 사용하여 생체내에서 생산될 수 있다. 이러한 방법은, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,012,931에 기재되어 있다.

[0350] 자연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 사용하는 tRNA 및 tRNA 신테타제의 생산 방법은 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 7,045,337 및 7,083,970에 기재되어 있다. 이러한 방법은 번역 시스템에 대하여 내생적인 신테타제 및 tRNA와 독립적으로 기능하는 번역 기구를 발생시키는 것을 포함한다 (그러므로 때로는 "직교"라 불림). 전형적으로, 번역 시스템은 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)를 포함한다. 전형적으로, O-RS는 번역 시스템에서 적어도 1개의 비-자연으로 발생하는 아미노산으로 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하고 O-tRNA는 시스템 내의 다른 tRNA에 의해서는 인식되지 않는 적어도 1개의 셀렉터 코돈을 인식한다. 그에 따라 번역 시스템은 코딩된 셀렉터 코돈에 대한 반응으로 시스템에서 생산되는 단백질에 비-자연으로-코딩된 아미노산을 삽입함으로써, 코딩된 폴리펩티드의 위치에 아미노산을 "치환"시킨다.

[0351] O-tRNA/아미노아실-tRNA 신테타제의 사용은 비-자연 코딩 아미노산을 코딩하는 특정 코돈을 선택하는 것을 포함한다. 임의의 코돈이 사용될 수 있지만, O-tRNA/아미노아실-tRNA 신테타제가 발현되는 세포에서 거의 사용되지 않거나 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 일반적으로 바람직하다. 예를 들어, 코돈의 예는 넌센스 코돈, 예컨대 정지 코돈 (옴버, 오버 및 오판), 4개 이상의 염기로 된 코돈 및 거의 사용되지 않거나 또는 사용되지 않는 다른 천연 3-염기 코돈을 포함한다.

[0352] 특정 셀렉터 코돈(들)은 관련 기술분야에 공지된 돌연변이유발 방법 (자리-특이적 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 제한 선택 돌연변이유발 등을 비제한적으로 포함함)을 사용하여, 변형된 FGF-21 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 서열의 적절한 위치에 도입될 수 있다.

[0353] VI. 변형된 FGF-21 폴리펩티드에서의 비-자연 코딩 아미노산의 위치

[0354] 본 개시내용은 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입하는 것을 고려한다. 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산은 폴리펩티드의 작용을 방해하지 않는 특정 위치에 혼입될 수 있다. 이는 "보존적" 치환을 일으킴으로써, 예를 들어 비제한적으로 소수성 아미노산을 소수성 아미노산으로, 벌키 아미노산을 벌키 아미노산으로, 친수성 아미노산을 친수성 아미노산으로 치환함으로써 또한/또는 작용을 위해 필수적이지 않은 위치에 비-자연으로 발생하는 아미노산을 삽입함으로써 달성가능하다.

[0355] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 폴리펩티드의 구조를 방해하지 않는 단백질의 영역에 위치하는 1개 이상의 비-자연으로 발생하는 아미노산을 포함한다.

[0356] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다. 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 아미노산 서열의 임의의 위치에, 예를 들어 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산에 상응하는 위치에 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 또는 110에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 또는 146에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연으로 발생하는 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 페닐알라닌 유도체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치는 페닐알라닌 유도체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌일 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치는 파라-아세틸-L-페닐알라닌일 수 있다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 91 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 131 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 108 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 77 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-

7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 72 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 87 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 86 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 126 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 110 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 83 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 146 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 135 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 96 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 한 실시양태에서, 비-자연으로 발생하는 아미노산은 FGF-21의 36 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산)에 존재한다.

[0357] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 비-자연 코딩 아미노산을 포함하고, 또한 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 중 어느 다른 것에 상응하는 위치에 적어도 1개의 다른 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 1개의 다른 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 또는 110에 상응하는 위치에 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 1개의 다른 비-자연 코딩 아미노산은 서열식별번호: 1의 아미노산 91 또는 131에 상응하는 위치에 존재할 수 있다.

[0358] 또 다른 실시양태에서, 91에 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 중 어느 다른 것에 상응하는 위치 중 하나 이상에서 1개 이상의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 91에 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상에서 1개 이상의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다.

[0359] 또 다른 실시양태에서, 131에 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 중 어느 다른 것에 상응하는 위치 중 하나 이상에서 1개의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 131에 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산에 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상에서 1개의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다.

[0360] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1의 잔기 108에 상응하는 위치에 비-자연 코딩 아미노산을 포함하고, 또한 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 중 어느 다른 것에 상응하는 서열식별번호: 1의 아미노산 중 적어도 2개에 상응하는 위치에서 적어도 2개의 다른 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1의 아미노산 108에 상응하는 위치에 비-자연 코딩 아미노산을 포함하고, 또한 서열식별번호: 1의 하기 아미노산 중 적어도 2개에 상응하는 위치에서 적어도 2개의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 1의 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 또는 110.

[0361] 또 다른 실시양태에서, 77에 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 서열식별번호: 1의 아미노산 1-181 또는 그의 1 위치 앞쪽 (즉, N-말단) 또는 182 위치 (즉, 단백질의 카르복실 말단) 또는 서열식별번호: 2-7 또는 본 개시내용의 또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 중 어느 다른 것에 상응하는 위치 중 하나 이상에 1개의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 77에 비-자연

으로 발생하는 아미노산이 존재하고, 또한 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36 위치 (서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2-7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 1개의 다른 비-자연으로 발생하는 아미노산이 존재한다 .

[0362] VII. 비-진핵생물 및 진핵생물에서의 발현

[0363] I. 발현 시스템, 배양 및 단리

[0364] 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 효모, 곤충 세포, 포유류 세포, 및 박테리아를 포함하는 다수의 적합한 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 예시 발현 시스템에 관한 설명이 하기에 제공된다.

[0365] 효모: 본원에 사용된 용어 "효모"는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 발현시킬 수 있는 다양한 효모 중 어느 하나를 포함한다.

[0366] 피키아(*Pichia*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 사카로미세스, 스키향사카로미세스(*Schizosaccharomyces*), 한센룰라(*Hansenula*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 및 칸디다(*Candida*) 속에 속하는 종, 예를 들어 비제한적으로 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 피. 구일러리몬디이(*P. guilliermondii*), 에스. 세레비시아(*S. cerevisiae*), 에스. 칼스베르겐시스(*S. carlsbergensis*), 에스. 디아스타티쿠스(*S. diastaticus*), 에스. 더글라시이(*S. douglasii*), 에스. 클루이베리(*S. kluyveri*), 에스. 노르벤시스(*S. norbensis*), 에스. 오비포르미스(*S. oviformis*), 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*), 씨. 알비칸스(*C. albicans*), 씨. 말토사(*C. maltosa*) 및 에이치. 폴리몰파(*H. polymorpha*)가 본 개시내용과의 사용을 위해 특별히 관심이 있다. 본원에 참조로 포함되는 WO 2005/091944에 효모에서의 FGF-21의 발현이 기재되어 있다.

[0367] 바큘로바이러스(Baculovirus)-감염 곤충 세포: 용어 "곤충 숙주" 또는 "곤충 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA를 위한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용된 곤충을 말한다. 상기 용어는 형질감염된 기원이 되는 곤충 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모 세포의 자손은 우발적인 또는 의도된 돌연변이로 인하여, 기원이 되는 모체와 형태 또는 게놈 DNA 또는 총 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성에 의해 특징화되는 모체와 충분히 유사한 모 세포의 자손이 상기 정의가 의도하는 자손에 포함된다.

[0368] 이. 콜라이, 슈도모나스 종, 및 다른 원핵생물:

[0369] 용어 "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA를 위한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용된 박테리아를 말한다. 상기 용어는 형질감염된 기원이 되는 박테리아 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모 세포의 자손은 우발적인 또는 의도된 돌연변이로 인하여, 기원이 되는 모체와 형태 또는 게놈 DNA 또는 총 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성에 의해 특징화되는 모체와 충분히 유사한 모 세포의 자손이 상기 정의가 의도하는 자손에 포함된다.

[0370] 발현용 박테리아 숙주를 선택함에 있어서, 적합한 숙주는, 특히 우수한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질분해 활성 및 전반적인 견실성을 갖는 것으로 확인된 것들을 포함할 수 있다. 산업적/계약적 발효는 일반적으로 K 균주 (예를 들어, W3110)로부터 유래된 박테리아 또는 B 균주 (예를 들어, BL21)로부터 유래된 박테리아를 사용한다. 적합한 이. 콜라이 숙주의 다른 예는 BL21 균주, DH10B 균주, 또는 이들의 유도체를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 방법의 또 다른 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주는 OMP- 및 LON-을 비제한적으로 포함하는 프로테아제가 없는 균주이다. 숙주 세포 균주는 슈도모나스 종, 예를 들어 비제한적으로 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)일 수 있다. MB101 균주라 명명되는, 슈도모나스 플루오레센스 바이오바(*Pseudomonas fluorescens* biovar) 1이 재조합체 생산에 유용한 것으로 공지되어 있으며 치료용 단백질의 생산 공정을 위해 이용가능하다.

[0371] 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면 (즉, 발현 구축물이 숙주 세포에 도입되고 적절한 발현 구축물을 갖는 숙주 세포가 단리됨), 재조합 숙주 세포 균주는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생산에 적절한 조건 하에 배양된다.

[0372] 재조합 숙주 세포는 배치식 또는 연속식 포맷으로 세포가 회수되거나 (변형된 FGF-21 폴리펩티드가 세포 내에 축적되는 경우) 또는 배양 상청액이 회수되면서, 배치식 또는 연속식 포맷으로 배양될 수 있다.

[0373] 박테리아 숙주 세포에서 생산되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 난용성 또는 불용성 (봉입체의 형태)일 수 있다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 재조합에 의해 생산된 단백질의 용해도를 증가시키기 위한 목적으로 선택된 변

형된 FGF-21 폴리펩티드에서 아미노산 치환이 용이하게 이루어질 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 예를 들어, 우레아 또는 구아니딘 히드로클로라이드로 가용화될 수 있다.

[0374] 가용성의 변형된 FGF-21 단백질 경우에, FGF-21은 주변세포질 공간 또는 배양 배지로 분비될 수 있다. 예를 들어, 변형된 FGF-21은 서열식별번호: 39-44에 나열된 것들을 포함하는, 8개의 상이한 리더 서열을 포함하는 플라즈미드 코딩 구축물을 사용하여 이들을 W3110-B2 세포로 형질전환시킴으로써 W3110-B2 세포의 주변세포질 공간으로 분비되고, 후속적으로 세포를 OD가 약 0.8이 될 때까지 37°C에서 성장시키는데, 이때 발현은 0.01% 아라비노스로 유도된다. 5시간 후에 주변세포질 방출 샘플이 배양물로부터 제조될 수 있다. 또한, 가용성의 변형된 FGF-21은 숙주 세포의 세포질에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 전에 가용성의 변형된 FGF-21을 농축시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0375] 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 융합 단백질로서 생산되는 경우에, 융합 서열은 제거될 수 있다. 융합 서열의 제거는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 달성될 수 있다. 융합 서열의 효소적 제거는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 융합 서열의 제거를 위한 효소의 선택은 융합의 정체성에 의해 결정될 수 있으며 반응 조건은 효소의 선택에 의해 특정될 수 있고, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 화학적 절단은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 시약, 예를 들어 비제한적으로 시아노겐 브로마이드, TEV 프로테아제, 및 다른 시약을 사용하여 달성될 수 있다. 절단된 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 절단된 융합 서열로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0376] 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변성 및 환원시킨 다음, 폴리펩티드를 바람직한 입체구조로 리폴딩(refold)시키는 것이 종종 바람직하다. 예를 들어, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE, 및/또는 샤페로닌이 관심 번역산물에 첨가될 수 있다. 단백질은, 예를 들어 비제한적으로 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 함유하는 산화환원 완충액 중에서 리폴딩될 수 있다. 리폴딩 시약이 유동하거나 또는 다르게 이동하여 1개 이상의 폴리펩티드 또는 다른 발현 산물과 접촉할 수 있거나, 또는 그 반대로 가능하다.

[0377] 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 원핵생물 생산의 경우에, 그렇게 생산된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 미스폴딩(misfolded)될 수 있으므로, 생물학적 활성을 갖지 않거나 또는 감소한 생물학적 활성을 갖는다. 단백질의 생물학적 활성은 "리폴딩"에 의해 복구될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 1종 이상의 카오트로픽제(chaotropic agent) (예를 들어, 우레아 및/또는 구아니딘) 및 디설피드 결합을 환원시킬 수 있는 환원제 (예를 들어, 디티오프레이톨 (DTT) 또는 2-머캅토에탄올 (2-ME))를 사용하는 폴리펩티드 쉼의 가용화 (변형된 FGF-21 폴리펩티드가 또한 불용성인 경우), 폴립 및 환원에 의해 리폴딩된다. 중간 농도의 카오트로프(chaotrope)에서, 산화제 (예를 들어, 산소, 시스테인 또는 시스테인)가 후속적으로 첨가되고, 이는 디설피드 결합의 재형성을 가능하게 한다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지되어 있는 표준 방법, 예컨대 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 4,511,502, 4,511,503 및 4,512,922에 기재된 방법을 사용하여 리폴딩될 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 다른 단백질과 함께 코폴딩(cofolded)되어 이중이량체 또는 이중다량체를 형성할 수 있다.

[0378] 리폴딩 후에, 변형된 FGF-21은 추가로 정제될 수 있다. 변형된 FGF-21의 정제는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고 성능 액체 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 추가의 정제는 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 또한 포함할 수 있다.

[0379] 정제 후에, 변형된 FGF-21은 상이한 완충액과 교환될 수 있고/거나 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법 중 어느 하나, 예를 들어 비제한적으로 투석여과 및 투석에 의해 농축될 수 있다. 단일 정제 단백질로서 제공되는 변형된 FGF-21은 응집 및 침전에 적용될 수 있다.

[0380] 정제된 변형된 FGF-21은 적어도 90%의 순도 (역상 고 성능 액체 크로마토그래피, RP-HPLC, 또는 소듐 도데실 술파이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, SDS-PAGE에 의해 측정됨), 또는 적어도 95%의 순도, 또는 적어도 98%의 순도, 또는 적어도 99%의 순도 또는 그 초과 순도를 가질 수 있다. 변형된 FGF-21 순도의 정확한 수치 값과 상관없이, 변형된 FGF-21은 제약 제품으로서 또는 추가 프로세싱, 예컨대 PEG와 같은 수용성 중합체와의 접합을 위해 사용되기에 충분히 순수하다.

[0381] 특정한 변형된 FGF-21 분자는 다른 활성 성분 또는 단백질 (부형제, 담체, 및 안정화제, 혈청 알부민 등은 제외)의 부재 하에도 치료제로서 사용될 수 있거나, 또는 또 다른 단백질 또는 중합체와 복합체를 형성할 수 있다.

[0382] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 각각의 정제 단계 후의 변형된 FGF-21의 수율은 각각의 정제 단계를 위한 출발 물질 중 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 적어도 약 99.9% 또는 적어도 약 99.99%의 비변형 또는 변형된 FGF-21일 수 있다.

[0383] *VIII. 대안의 시스템에서의 발현*

[0384] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 무세포 (예를 들어, 시험관내) 번역 시스템을 사용하여 발현될 수 있다. 번역 시스템은 세포성 또는 무세포성일 수 있고, 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있다. 세포성 번역 시스템은 전세포 제제, 예컨대 투과성 세포 또는 세포 배양물을 포함하나, 이들로 제한되지는 않고, 여기서 목적하는 핵산 서열이 mRNA로 전사되고 mRNA는 번역된다. 무세포 번역 시스템은 시판되고 있으며 다수의 상이한 유형 및 시스템이 널리 공지되어 있다. 무세포 시스템의 예는 원핵생물 용해물, 예컨대 에스케리치아 콜라이 용해물, 및 진핵생물 용해물, 예컨대 맥아 추출물, 곤충 세포 용해물, 토끼 망상적혈구 용해물, 토끼 난모세포 용해물 및 인간 세포 용해물을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 막 추출물, 예컨대 마이크로솜막을 함유하는 개 체장 추출물이 또한 이용가능하며, 이는 분비 단백질의 번역에 유용하다.

[0385] *IX. 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 커플링되는 거대분자 중합체*

[0386] 본원에 기재된 비천연 아미노산 폴리펩티드에 대한 다양한 변형이 본원에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략을 사용하여 실시될 수 있다. 이러한 변형은 폴리펩티드의 비천연 아미노산 성분에 추가의 관능기, 예를 들어 비제한적으로 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광가교제; 방사성 핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2의 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이터; 보조인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 덴드리머; 시클로덱스트린; 억제성 리보핵산; 생체적합물질; 나노입자; 스핀 표지; 형광단, 금속-함유 모이어티; 방사성 모이어티; 신규 관능기; 다른 분자와 공유 또는 비공유 상호작용하는 기; 광케이지 모이어티; 화학선에 의해 여기가능한 모이어티; 광이성질체화 모이어티; 비오틴; 비오틴의 유도체; 비오틴 유사체; 증원자를 혼입하는 모이어티; 화학적으로 절단가능한 기; 광으로 절단가능한 기; 연장된 측쇄; 탄소-결합된 당; 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 동위원소 표지된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 기; 화학발광성 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 개재 기; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적 활성제; 검출가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오티드; 라디오트랜스미터; 중성자 포획체; 또는 이들의 임의의 조합, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질을 혼입하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략의 예시적이며 비제한적인 예로서, 하기 설명은, 여기에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략이 또한 상기에 나열된 것을 비제한적으로 포함하는 다른 관능기를 부가하기 위해 적용될 수 있다는 전제하에 (필요에 따라, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 본원의 개시내용으로 실시할 수 있는, 적절한 변형이 가해짐), 비천연 아미노산 폴리펩티드에 거대분자 중합체를 부가하는 것에 초점을 맞출 것이다.

[0387] 매우 다양한 거대분자 중합체 및 다른 분자가 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결되어 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 특성을 조정하고/거나 변형된 FGF-21 분자에 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이러한 거대분자 중합체는 천연 코딩 아미노산, 비-자연 코딩 아미노산, 또는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 관능성 치환기, 또는 천연 또는 비천연 아미노산에 부가된 임의의 치환기 또는 관능기를 통해 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결될 수 있다. 중합체의 분자량은 광범위할 수 있고, 예를 들어 비제한적으로 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 또는 이보다 클 수 있다. 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da, 예를 들어 비제한적으로 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체의 분자량은 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다.

- [0388] 선택되는 중합체는, 이것이 부착된 단백질이 수성 환경, 예컨대 생리적 환경에서 침전되지 않도록 수용성일 수 있다. 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 최종 생성물 제제의 치료 용도를 위해, 중합체는 제약상 허용되는 것일 수 있다.
- [0389] 중합체의 예는 폴리알킬 에테르 및 그의 알콕시-캡핑 유사체 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌/프로필렌 글리콜, 및 이들의 메톡시 또는 에톡시-캡핑 유사체, 특히 폴리옥시에틸렌 글리콜, 후자는 또한 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG로서 공지되었음); 불연속형 PEG (dPEG); 폴리비닐피롤리돈; 폴리비닐알킬 에테르; 폴리옥사졸린, 폴리알킬 옥사졸린 및 폴리히드록시알킬 옥사졸린; 폴리아크릴아미드, 폴리알킬 아크릴아미드, 및 폴리히드록시알킬 아크릴아미드 (예를 들어, 폴리히드록시프로필메타크릴아미드 및 그의 유도체); 폴리히드록시알킬 아크릴레이트; 폴리시알산 및 그의 유사체; 친수성 펩티드 서열; 다당류 및 그의 유도체, 예를 들어 텍스트란 및 텍스트란 유도체, 예를 들어 카르복시메틸텍스트란, 텍스트란 술포이트, 아미노텍스트란; 셀룰로스 및 그의 유도체, 예를 들어 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시알킬 셀룰로스; 키틴 및 그의 유도체, 예를 들어 키토산, 숙시닐 키토산, 카르복시메틸키틴, 카르복시메틸키토산; 히알루론산 및 그의 유도체; 전분; 알기네이트; 콘드로이틴 술포이트; 알부민; 폴루란 및 카르복시메틸 폴루란; 폴리아미노산 및 그의 유도체, 예를 들어 폴리글루탐산, 폴리리신, 폴리아스파르트산, 폴리아스파르트아미드; 말레산 무수물 공중합체, 예컨대: 스티렌 말레산 무수물 공중합체, 디비닐에틸 에테르 말레산 무수물 공중합체; 폴리비닐 알콜; 이들의 공중합체; 이들의 삼원공중합체; 이들의 혼합물; 및 이들의 유도체를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0390] 본원에 사용되는 바와 같이, PEG:변형된 FGF-21 폴리펩티드 접합체를 고려할 때, 용어 "치료 유효량"은 환자에게 목적하는 이점을 제공하는 양을 말한다. 이러한 양은 개체 별로 달라질 수 있고 다수의 인자, 예를 들어 환자의 전반적인 신체 조건 및 치료할 병태의 기본 원인에 좌우될 수 있다. 요법을 위해 사용되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 양은 허용되는 변화율을 제공하고 목적하는 반응을 유익한 수준으로 유지한다.
- [0391] 수용성 중합체는 선형, 갈래형(forked) 또는 분지형을 비제한적으로 포함하는 임의의 구조적 형태일 수 있다. 전형적으로, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이지만, 다른 수용성 중합체가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG는 본 개시내용의 특정 실시양태를 기재하기 위해 사용된다.
- [0392] 용어 "PEG"는 PEG의 크기 또는 말단 변형에 관계없이 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포괄하도록 넓은 의미로 사용되며, 하기 화학식에 의해 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 연결된 것으로 나타낼 수 있다:
- [0393]
$$XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$$
- [0394] 상기 식에서, n은 2 내지 10,000이고, X는 H 또는 말단 변형, 예를 들어 비제한적으로 C₁₋₄ 알킬, 보호기, 또는 말단 관능기이다.
- [0395] 일부 경우에, 본 개시내용의 폴리펩티드에 사용되는 PEG는 한쪽 말단에 히드록시 또는 메톡시를 갖도록 종결되는데, 즉 X가 H 또는 CH₃ ("메톡시 PEG")이다. 다르게는, PEG가 반응기를 갖도록 종결되어, 이관능성 중합체를 형성할 수 있다. 전형적인 반응기는 20종의 일반 아미노산에서 발견되는 관능기와 반응하는데 일반적으로 사용되는 반응기 (말레이미드 기, 활성화된 카르보네이트 (p-니트로페닐 에스테르를 비제한적으로 포함함), 활성화된 에스테르 (N-히드록시숙신이미드, p-니트로페닐 에스테르를 비제한적으로 포함함) 및 알데히드를 비제한적으로 포함함) 뿐만 아니라, 20종의 일반 아미노산에 대하여는 비활성이나 비-자연 코딩 아미노산에 존재하는 상보적 관능기 (아지드 기, 알킨 기를 비제한적으로 포함함)와 특이적으로 반응하는 관능기를 포함할 수 있다. 상기 화학식에서 Y로 나타낸 PEG의 다른쪽 말단은 자연 발생 아미노산 또는 비-자연 코딩 아미노산을 통해 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있다는 것을 주목한다. 예를 들어, Y는 폴리펩티드의 아민 기 (리신의 엡실론 아민 또는 N-말단을 비제한적으로 포함함)와의 아미드, 카르바메이트 또는 우레아 연결일 수 있다. 다르게는, Y가 티올 기 (시스테인의 티올 기를 비제한적으로 포함함)와의 말레이미드 연결일 수 있다. 다르게는, Y가 20종의 일반 아미노산을 통해서는 일반적으로 접근가능하지 않은 잔기와의 연결일 수 있다. 예를 들어, PEG 상의 아지드 기는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 상의 알킨 기와 반응하여 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 생성물을 형성할 수 있다. 다르게는, PEG 상의 알킨 기가 비-자연 코딩 아미노산에 존재하는 아지드 기와 반응하여 유사한 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 강력한 친핵체 (히드라진, 히드라지드, 히드록실아민, 세미카르바지드를 비제한적으로 포함함)는 비-자연 코딩 아미노산에 존재하는 알데히드 또는 케톤 기와 반응하여 경우에 따라 히드라존, 옥심 또는 세미카르바존을 형성할 수 있고, 이들은 일부 경우에 적절한 환원제로 처리되어 추가로 환원될 수 있다. 다르게는, 강력한 친핵체가 비-자연 코딩 아미노산을 통해 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입되어 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데히드 기와 우선적으로 반응하는데

사용될 수 있다.

[0396] PEG에 대하여 임의의 분자 질량이 실제적인 필요에 따라 사용될 수 있고, 예를 들어 비제한적으로 약 100 달톤 (Da) 내지 100,000 Da 또는 필요에 따라 이보다 클 수 있다 (때로는 0.1-50 kDa 또는 10-40 kDa을 비제한적으로 포함함). PEG의 분자량은 광범위할 수 있으며, 예를 들어 비제한적으로 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 또는 이보다 클 수 있다. PEG는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da, 예를 들어 비제한적으로 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da일 수 있다. 분지쇄 PEG, 예를 들어 비제한적으로 MW가 1-100 kDa (1-50 kDa 또는 5-20 kDa을 비제한적으로 포함함)의 범위인 각각의 쇠를 갖는 PEG 분자가 또한 사용될 수 있다. 분지쇄 PEG의 각각의 쇠의 분자량은 예를 들어 비제한적으로 약 1,000 Da 내지 약 100,000 Da 또는 이보다 클 수 있다. 분지쇄 PEG의 각각의 쇠의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 100,000 Da, 예를 들어 비제한적으로 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da 및 1,000 Da일 수 있다. 일반적으로, PEG 분자의 적어도 한쪽 말단은 비-자연 코딩 아미노산과의 반응을 위해 이용가능하다. 예를 들어, 아미노산 측쇄와의 반응을 위해 알킨 및 아지드 모이어티를 갖는 PEG 유도체는 본원에 기재된 바와 같이 PEG를 비-자연 코딩 아미노산에 부착시키는데 사용될 수 있다. 비-자연 코딩 아미노산이 아지드를 포함한다면, PEG는 전형적으로 [3+2] 고리화첨가 생성물의 형성이 실시되도록 알킨 모이어티를 함유할 수 있거나 또는 활성화된 PEG 화학종 (즉, 에스테르, 카르보네이트)은 아미드 연결의 형성이 실시되도록 포스포닐기를 함유할 수 있다. 이와 달리, 비-자연 코딩 아미노산이 알킨을 포함한다면, PEG는 전형적으로 [3+2] 휘스겐 고리화첨가 생성물의 형성이 실시되도록 아지드 모이어티를 함유할 수 있다. 비-자연 코딩 아미노산이 카르보닐기를 포함한다면, PEG는 전형적으로 각각 상응하는 히드라존, 옥심 및 세미카르바존 연결의 형성이 실시되도록 강력한 친핵체 (히드라지드, 히드라진, 히드록실아민, 또는 세미카르바지드 관능기를 비제한적으로 포함함)를 포함할 수 있다. 다른 대안으로, 상기에 기재된 반응기 배향의 역전이 사용될 수 있는데, 즉 비-자연 코딩 아미노산의 아지드 모이어티가 알킨을 함유하는 PEG 유도체와 반응할 수 있다.

[0397] 일부 실시양태에서, PEG 유도체를 갖는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비-자연 코딩 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 화학적 관능기에 대하여 반응성인 화학적 관능기를 함유한다.

[0398] 본 개시내용은 일부 실시양태에서 약 800 Da 내지 약 100,000 Da의 평균 분자량을 갖는 수용성 중합체 백본을 포함하는 아지드- 및 아세틸렌-함유 중합체 유도체를 제공한다. 수용성 중합체의 중합체 백본은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 매우 다양한 수용성 중합체, 예를 들어 비제한적으로 폴리(에틸렌)글리콜 및 다른 관련된 중합체, 예를 들어 폴리(텍스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)이 또한 본원에 개시된 폴리펩티드에 사용하기에 적합하고, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)이라는 용어의 사용은 이러한 모든 분자를 포괄하고 포함하도록 의도되는 것으로 이해되어야 한다.

[0399] 중합체 백본은 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 중합체 백본은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 분지형 중합체는 중심 분지 코어 모이어티 및 중심 분지 코어에 연결된 복수 개의 선형 중합체 쇠를 갖는다. 분지형 PEG는 또한 $PEG(-YCH_2)_n$ 으로 나타내는 갈래형 PEG의 형태일 수 있고, 상기 식에서 Y는 연결기이고 Z는 한정된 길이의 원자 쇠에 의해 CH에 연결되는 활성화된 말단 기이다. 또 다른 분지형 형태인 펜던트형(pendant) PEG는 PEG 쇠의 말단보다는 PEG 백본을 따라서 반응기, 예컨대 카르복실을 갖는다.

[0400] 수많은 다른 중합체가 또한 본 개시내용의 폴리펩티드에 사용하기에 적합하다. 적합한 중합체의 예는 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 이들의 공중합체 (에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체를 비제한적으로 포함함), 이들의 삼원공중합체, 이들의 혼합물 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 달라질 수 있지만, 전형적으로는 약 800 Da 내지 약 100,000 Da, 종종 약 6,000 Da 내지 약 80,000 Da의 범위이다. 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da, 예를 들어 비제한적으로 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및

100 Da일 수 있다.

- [0401] 수용성 중합체는 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결될 수 있다. 수용성 중합체는 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 혼입된 비-자연 코딩 아미노산, 또는 비-자연 코딩 아미노산 또는 천연 코딩 아미노산의 임의의 관능기 또는 치환기, 또는 비-자연 코딩 아미노산 또는 천연 코딩 아미노산에 부가된 임의의 관능기 또는 치환기를 통해 연결될 수 있다. 다르게는, 수용성 중합체는 자연 발생 아미노산 (시스테인, 리신 또는 N-말단 잔기의 아민 기를 비제한적으로 포함함)을 통해 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결된다. 일부 경우에, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 비천연 아미노산을 포함하고, 여기서 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산(들)은 수용성 중합체(들) (PEG 및/또는 올리고당류를 비제한적으로 포함함)와 연결된다. 일부 경우에, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 수용성 중합체와 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과와 천연 코딩 아미노산(들)을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 수용성 중합체와 연결된 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산(들) 및 수용성 중합체와 연결된 1개 이상의 자연 발생 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에서 사용되는 수용성 중합체는 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 201의 FGF-21 폴리펩티드, 상기 수용성 중합체를 갖지 않는 동일한 FGF-21 폴리펩티드, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 또 다른 비교체 화합물과 비교하여, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 혈청 반감기를 향상시킨다.
- [0402] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결되는 수용성 중합체의 개수 (즉, PEG화 또는 당화 정도)는 변경된 (증가 또는 감소를 비제한적으로 포함함) 약리학적, 약동학적 또는 약력학적 특징, 예컨대 생체내 반감기를 제공하도록 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21의 반감기는 비변형 폴리펩티드보다 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 50배, 또는 적어도 약 100배 증가한다.
- [0403] 강력한 친핵성 기 (즉, 히드라지드, 히드라진, 히드록실아민 또는 세미카르바지드)를 함유하는 PEG 유도체
- [0404] 본 개시내용의 한 실시양태에서, 카르보닐-함유 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 PEG 백본과 직접적으로 연결된 말단 히드라진, 히드록실아민, 히드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형될 수 있다.
- [0405] 수용성 중합체(들)가 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 연결되는 정도 및 자리는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 FGF-21 폴리펩티드 수용체의 결합을 조정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결은 변형된 FGF-21에 대하여 평형 결합 분석법, 예컨대 문헌 [Spencer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867 (1988)]에 기재된 것에 의해 측정하였을 때, 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 약 400 nM 이하의 K_d , 150 nM 이하의 K_d , 또한 일부 경우에는 100 nM 이하의 K_d 로 FGF-21 폴리펩티드 수용체와 결합하도록 배열될 수 있다.
- [0406] 중합체의 활성화 뿐만 아니라, 펩티드의 접합을 위한 방법 및 화학은 문헌에 기재되어 있으며 관련 기술분야에 공지되어 있다. 중합체의 활성화를 위해 일반적으로 사용되는 방법은 시아노젠 브로마이드, 피아이오테이트, 글루타르알데히드, 비에폭시드, 에피클로로히드린, 디비닐술폰, 카르보디이미드, 술폰 할라이드, 트리클로로 트리아진 등에 의한 관능기의 활성화를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 비-자연 코딩 아미노산, 예컨대 p-아지도-L-페닐알라닌을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 PEG화 (즉, 임의의 수용성 중합체의 첨가)는 임의의 적합한 방법, 예컨대 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,012,931에 기재된 것에 의해 수행될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산과 연결된 수용성 중합체는 비제한적으로 추가로 유도체화 또는 치환될 수 있다.
- [0407] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비-자연 코딩 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 알킨 모이어티와 반응할 수 있는 아지드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형될 수 있다. 일반적으로, PEG 유도체는 1-100 kDa, 또한 일부 실시양태에서는 10-40 kDa 범위의 평균 분자량을 가질 수 있다.
- [0408] 일부 실시양태에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 하기 구조식을 가질 수 있다:
- [0409] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$
- [0410] 상기 식에서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0411] 또 다른 실시양태에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 하기 구조식을 가질 수 있다:

- [0412] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$
- [0413] 상기 식에서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0414] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 알킨-함유 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 말단 아지드 모이어티를 함유하는 분지형 PEG 유도체로 추가로 변형될 수 있고, 이때 분지형 PEG의 각각의 쇄는 10-40 kDa 범위의 MW를 가지며, 또한 5-20 kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 하기 구조식을 가질 수 있다:
- [0415] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$
- [0416] 상기 식에서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 임의로 존재할 수 있는 각각의 경우에는 O, N, S 또는 카르보닐 기 (C=O)이거나, 또는 존재하지 않을 수 있다.
- [0417] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비-자연 코딩 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응할 수 있는 알킨 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형될 수 있다. 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비-자연 코딩 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응할 수 있는 아릴 포스핀 기를 추가로 포함하는 활성화된 관능기 (에스테르, 카르보네이트를 비제한적으로 포함함)를 함유하는 PEG 유도체로 변형될 수 있다.
- [0418] 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 하기의 예시 방법에 의해 히드라지드-함유 PEG와 접합될 수 있다. 카르보닐-함유 아미노산 (예컨대, pAcF)이 혼입된 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 상기에 기재된 절차에 따라 제조될 수 있다. 변형되면, 하기 구조식을 갖는 히드라지드-함유 PEG가 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 접합될 수 있다:
- [0419] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$
- [0420] 상기 식에서, 예를 들어, R은 메틸이고, n은 2이고, N은 10,000 MW이고, X는 카르보닐 (C=O) 기이다. p-아세틸 페닐알라닌을 함유하는 정제된 변형된 FGF-21은 pH 6.0의 25 mM MES (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재), pH 7.0의 25 mM Hepes (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재), 또는 pH 4.5의 10 mM 소듐 아세테이트 (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 중에서 0.1-10 mg/mL로 용해되어, 1 내지 100배 과량의 히드라지드-함유 PEG와 반응하고, 상응하는 히드라존은 H₂O 중에 용해된 스탁 1 M NaCNBH₃ (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 10-50 mM의 최종 농도까지 첨가함으로써 동일 반응계에서 환원된다. 반응은 암실에서, 4℃ 내지 RT에서, 18-24시간 동안 수행된다. 반응은 약 pH 7.6의 1 M 트리스 (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 50 mM의 최종 트리스 농도까지 첨가함으로써 정지되거나 또는 즉각적인 정제를 위해 적절한 완충액으로 희석된다.
- [0421] 알킨-함유 아미노산의 변형된 FGF-21 폴리펩티드로의 도입 및 Mpeg-아지드에 의한 유도체화
- [0422] 하기 예시 방법에 의해 알킨-함유 아미노산을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 제조되고 mPEG-아지드로 유도체화될 수 있다. 선택된 위치는 하기의 비-자연 코딩 아미노산으로 치환될 수 있다:
-
- [0423]
- [0424] p-프로파르길-티로신의 변형된 FGF-21로의 자리-특이적 혼입을 위해 이용되는 서열은 상기에 기재된 서열식별번호: 1 (FGF-21), 서열식별번호: 16 또는 17 (muttRNA, 엠. 잔나쉬이(*M. jannaschii*) mtRNA ^{Tyr}CUA), 22, 23 또는 24일 수 있다. 프로파르길 티로신을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 이. 콜라이에서 발현되어 카르보닐-함유 아미노산을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 정제에 대하여 상기에 기재된 조건을 사용하여 정제될 수 있다.
- [0425] PB 완충액 (100 mM 소듐 포스페이트, 0.15 M NaCl, pH = 8) 중에 0.1-10 mg/mL로 용해된 프로파르길-티로신을

함유하는 정제된 변형된 FGF-21 및 10 내지 1000배 과량의 아지드-함유 PEG가 반응 혼합물에 첨가된다. 그 후에, 촉매량의 CuSO_4 및 Cu 와이어가 반응 혼합물에 첨가된다. 혼합물을 인큐베이션 (실온 또는 37°C 에서 약 4 시간 동안, 또는 4°C 에서 밤새 인큐베이션하는 것을 비제한적으로 포함함)한 후에, H_2O 가 첨가되고 혼합물을 투석 막을 통해 여과한다. 샘플을 분석하여 수율을 확인할 수 있다.

[0426] X. 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 함유하는 융합 단백질

[0427] 본 개시내용은 또한 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열 및 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 그의 단편을 제공한다. 융합 파트너는 반감기 연장, 단백질 정제 및/또는 제조를 용이하게 하는 것, 향상된 생물물리학적 특성, 예컨대 용해도 또는 안정성의 증가, 및 면역원성 또는 독성의 감소, 또는 임의의 다른 목적을 비제한적으로 포함하는 기능적 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 연장된 생체내 반감기를 나타내므로, 치료 요법에서 덜 빈번한 투여 (예컨대, 1주마다 2회, 1주마다 1회, 또는 2주마다 1회 투여 등)를 가능하게 할 수 있다. 예시 융합 단백질은 융합 파트너, 예컨대 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), PK 연장 (PKE) 어드넥틴, XTEN, Fc 도메인, 또는 상기 중 임의의 것의 단편, 또는 상기 중 임의의 것의 조합에 융합된 변형된 FGF-21을 포함한다. 융합 단백질은 연결 펩티드를 코딩하는 서열에 의해 임의로 분리된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열 및 융합 파트너 서열을 코딩하는 핵산을 동일한 리딩 프레임에서 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 융합 단백질은 임의의 순서로, 예를 들어 1개 이상의 융합 파트너가 변형된 FGF-21 폴리펩티드 서열의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결되는 순서, 또는 1개 이상의 융합 파트너가 N-말단과 C-말단 양쪽 모두에 연결되는 순서로 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 융합 파트너를 포함할 수 있다.

[0428] 융합체는 융합 파트너를 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 말단 (즉, N- 또는 C-말단)에 부착시킴으로써, 즉 융합 파트너-변형된 FGF-21 또는 변형된 FGF-21-융합 파트너의 배열로 부착시킴으로써 형성될 수 있다. 추가로, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 어느 한쪽의 말단에서 또는 양쪽 말단에서 임의로 연결 펩티드에 의해, 양쪽 말단에서 1개 이상의 융합 파트너와 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 파트너와 변형된 FGF-21은 연결 펩티드를 통해 융합된다. 예시 연결 펩티드는 서열식별번호: 74-100, 301 및 350-383으로부터 선택된 서열, 또는 이들의 조합 (예를 들어, 상기 서열 중 2개, 3개, 또는 그 초과 서열)을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 예시 연결 펩티드는 0 (즉, 연결 펩티드가 존재하지 않음) 내지 100개 또는 그 초과 아미노산, 예컨대 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 내지 60, 50, 40, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 또는 11개 이하의 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 연결 펩티드의 비제한적 예시 길이는 1 내지 100개 아미노산, 1 내지 40개 아미노산, 1 내지 20개 아미노산, 1 내지 10개 아미노산, 또는 3 내지 5개 아미노산의 길이를 포함한다.

[0429] 변형된 FGF-21 폴리펩티드 또는 그의 단편은 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 그의 부분을 포함하는 융합 단백질로서 생산될 수 있다. 이러한 융합 구축물은 진핵생물 숙주 세포, 예컨대 CHO, 또는 박테리아, 예컨대 이. 콜라이에서의 변형된 FGF-21 또는 그의 단편의 발현을 향상시키는데 적합할 수 있다. HSA 부분의 예는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 5,766,883 및 PCT 공보 WO 97/24445에 개시된 바와 같이, N-말단 폴리펩티드 (아미노산 1-369, 1-419, 및 아미노산 1부터 시작되는 중간 길이)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질은 HSA 단백질을, HSA의 C-말단 및 N-말단 각각에 부착된 변형된 FGF-21 또는 그의 단편과 함께 포함할 수 있다. HSA 구축물의 예는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 5,876,969에 개시되어 있다. FGF-21을 포유류 세포에서 발현시키는 예시 방법은 본원에 참조로 포함되는 WO 2005/091944에 개시되어 있다.

[0430] 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 XTEN 분자와 융합될 수 있다. XTEN 분자는 또한 비구조화 재조합 중합체, 비구조화 재조합 폴리펩티드 (URP)라고도 하며, 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Schellenberger et al., Nat Biotechnol., 2009 Dec;27(12):1186-90], 미국 공보 2012/0220011, 미국 특허 7,846,445 및 WO/2012/162542에 개관적으로 기재되어 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 반감기가 XTEN 분자의 구성을 달리 함으로써, 예를 들어 크기를 달리 함으로써 달라질 수 있다. 예를 들어, XTEN 분자는 바람직한 반감기, 예컨대 1 내지 50시간의 범위, 예컨대 적어도 1, 2, 5, 10, 12, 15, 20 또는 25시간, 또는 그 보다 연장된 반감기를 달성하도록 선택될 수 있다.

[0431] 예시 XTEN 분자는 적어도 40개의 연속 아미노산을 포함하는 URP를 포함하고, 여기서 (a) URP는 글리신 (G), 아스파르테이트 (D), 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 글루타메이트 (E) 및 프롤린 (P) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 3가지 유형의 상이한 아미노산을 포함하고, 이때 URP에 함유된 상기 군 아미노산의 총 함은 URP의 전체 아미노산의 약 80%를 초과하여 차지하고, 상기 URP는 1개 초과 프롤린 잔기를 포함하며, 상기 URP는 상기 1개 초과 프롤린 잔기가 없는 상응하는 URP보다 단백질분해 열화에 대하여 감소한 감소성을 갖

고; (b) 상기 URP의 아미노산의 적어도 50%가 초우-파스만(Chou-Fasman) 알고리즘에 의해 결정하였을 때 2차 구조가 존재하지 않고; (c) 상기 URP의 테피토프(Tepitope) 점수는 -5 미만이다. 추가의 예시 XTEN 분자는 적어도 약 40개의 연속 아미노산을 포함하는 비구조화 재조합 중합체 (URP)를 포함하고, 여기서 (a) URP에 함유된 글리신 (G), 아스파르테이트 (D), 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 글루타메이트 (E) 및 프롤린 (P) 잔기의 총합은 URP의 전체 아미노산의 적어도 80%를 차지하고, 그 나머지는 존재하는 경우 아르기닌 또는 리신으로 이루어지며, 그러한 나머지는 메티오닌, 시스테인, 아스파라긴 및 글루타민을 함유하지 않고, 이때 상기 URP는 글리신 (G), 아스파르테이트 (D), 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 글루타메이트 (E) 및 프롤린 (P)으로부터 선택된 적어도 3가지 유형의 상이한 아미노산을 포함하고; (b) 상기 URP의 적어도 40개의 연속 아미노산 중 적어도 50%가 초우-파스만 알고리즘에 의해 결정하였을 때 2차 구조가 존재하지 않고; (c) URP는 -4 미만의 테피토프 점수를 갖는다.

[0432] 추가의 예시 XTEN 분자는 rPEG 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, rPEG 분자는 소수성 잔기 (예를 들어, F, I, L, M, V, W 또는 Y), 측쇄 아미드-함유 잔기 (예를 들어, N 또는 Q) 또는 양으로 하전된 측쇄 잔기 (예를 들어, H, K 또는 R)를 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 증진적 모이어티는 A, E, G, P, S 또는 T를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, rPEG는 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-99%, 또는 심지어 100%의 글리신을 포함할 수 있다.

[0433] 상기 XTEN 분자는 폴리에틸렌 글리콜과 추가로 연결될 수 있다.

[0434] 용어 "PAS" 및/또는 "PAS화(PASylation)"은 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 같은 관심 생물제약 단백질의, 아미노산 Pro, Ala 및 Ser으로 구성된 (이에 따라 "PAS 폴리펩티드" 및 "PAS화"이라는 용어가 유래됨), 입체구조적으로 무질서한 폴리펩티드 서열과의 유전자 융합을 말한다. PAS화는 관심 단백질, 예를 들어 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시키고/거나, 용해도, 안정성 및/또는 프로테아제 저항성을 증가시키고/거나, 면역원성을 감소시킬 수 있다 (참고용으로, 본원에 참조로 포함되는 WO2008155134 A1 및 US20140073563 참조). PAS 서열은 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 양쪽 말단에 유전자 융합을 통해 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, PAS 폴리펩티드는 적어도 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 초과인 아미노산 잔기로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 적어도 2개의 도메인을 포함하여 랜덤 코일 입체구조를 형성할 수 있고, 여기서 상기 제2의 도메인은 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기를 포함하고, 이로써 상기 랜덤 코일 입체구조는 PAS 폴리펩티드가 융합된 생물제약 단백질의 생체내 및/또는 시험관내 안정성의 증가를 매개한다. 일부 실시양태에서, 알라닌, 세린 및 프롤린 잔기를 포함하는 제2의 도메인은 ASPAAPAPASPAAPSAPA (서열식별번호: 310); AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (서열식별번호: 311); APSSPSPASPSSPASPS (서열식별번호: 312), SAPSSPSPASPSSPASPS (서열식별번호: 313), SSPSPSPSPSPSPSPA (서열식별번호: 314), AASPAAPSAPPAASPAAPSAPPA (서열식별번호: 315) 및 ASAAAPAAASAAASPSAAA (서열식별번호: 316)로부터 선택될 수 있다. PAS 폴리펩티드는 공유적 변형을 위한 1개 이상의 자리(들)를 함유할 수 있다.

[0435] 예시 실시양태에서, 변형된 FGF-21은 어드넥틴, 예를 들어 알부민-결합 또는 PKE 어드넥틴과 융합된다. 어드넥틴의 예는, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 공보 2011/0305663에 개시되어 있다. 상기 어드넥틴은 10 피브로넥틴 III형 도메인에 기반할 수 있으며 혈청 알부민과 결합할 수 있다. 상기 어드넥틴은 서열식별번호: 45로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 BC 루프, 서열식별번호: 46으로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 DE 루프, 및 서열식별번호: 47로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 FG 루프 중 하나 이상을 포함할 수 있거나, 또는 서열식별번호: 48, 49, 50, 51 및 52-72로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나, 또는 서열식별번호: 48, 49, 50, 51 또는 52-72와 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 폴리펩티드를 포함하고, 이들은 각각 U.S. 공보 2011/0305663의 서열식별번호 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20 및 24-44에 상응한다.

[0436] 일부 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 도메인 ("Fc 도메인"), 또는 그의 단편 또는 변이체, 예컨대 기능적 Fc 영역과 융합될 수 있다. 기능적 Fc 영역은 FcRn과 결합하지만, 이펙터 기능은 갖지 않는다. Fc 영역 또는 그의 단편이 FcRn과 결합하는 능력은 관련 기술분야에 공지되어 있는 표준 결합 분석법에 의해 결정될 수 있다. "이펙터 기능"의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 이러한 항체 이펙터 기능을 평가하기 위한 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 분석법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0437] 예시 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG1 서브클래스로부터 유래되나, 다른 서브클래스 (예를 들어, IgG2, IgG3 및 IgG4)도 또한 사용될 수 있다. 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인의 예시 서열이 하기에 나타나 있다:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:302)

[0438]

[0439] 일부 실시양태에서, 융합 단백질에 사용되는 Fc 영역은 Fc 분자의 힌지 영역을 포함할 수 있다. 예시 힌지 영역은 상기에 제공된 예시 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인 서열의 위치 1-16 (즉, DKTHTCPPCPAPELLG (서열식별번호: 303))에 걸쳐 있는 코어 힌지 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 다량체 구조 (예를 들어, 이량체)를 채택할 수 있는데, 이는 부분적으로 상기에 제공된 예시 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인 서열의 힌지 영역 내 6 및 9 위치의 시스테인 잔기 때문이다. 다른 실시양태에서, 본원에 사용된 힌지 영역은 상기에 제공된 예시 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인 서열의 코어 힌지 서열의 측면에 위치하는 CH1 및 CH2 영역으로부터 유래된 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 힌지 서열은 GSTHTCPPCPAPELLG (서열식별번호: 304)를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

[0440]

일부 실시양태에서, 힌지 서열은 바람직한 약동학적, 생물물리학적 및/또는 생물학적 특성을 부여하는 1개 이상의 치환을 포함할 수 있다. 일부 예시 힌지 서열은 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (서열식별번호: 305), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 306), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 307), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (서열식별번호: 308), 및 DKTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 309)를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기에 제공된 예시 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인 서열의 18 위치에서의 잔기 P는 S로 대체되어 Fc 이펙터 기능을 제거할 수 있고; 이러한 대체는 서열 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 306), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 307), 및 DKTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 309)를 갖는 힌지에서 예시된다. 또 다른 실시양태에서, 상기에 제공된 예시 인간 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인 서열의 1-2 위치에 서의 잔기 DK는 GS로 대체되어 잠재적인 클립핑 자리를 제거할 수 있고; 이러한 대체는 서열 EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 307)에서 예시된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역 (즉, 도메인 CH₁--CH₃)의 103 위치에서의 C는 S로 대체되어 경쇄 부재 하에서의 부적절한 시스테인 결합 형성을 방지할 수 있고; 이러한 대체는 서열 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (서열식별번호: 305), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 306), 및 EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (서열식별번호: 307)에서 예시된다.

[0441]

추가 예시 Fc 서열은 하기를 포함한다:

[0442]

hIgG1a₁₉₁ [A 서브타입]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0443]

(SEQ ID NO:323)

[0444]

hIgG1a₁₈₉ [hIgG1a₁₉₁ C 말단의 "GK" 탈락; A 서브타입]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP

[0445]

(SEQ ID NO:324)

- [0446] hIgG1a_{191b} [A/F 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:325)
- [0447]
- [0448] hIgG1f_{1.1_191} [ADCC 기능을 변경시키는 5점 돌연변이 함유, F 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:326)
- [0449]
- [0450] hIgG1f_{1.1_186} [ADCC 기능을 변경시키는 5점 돌연변이 및 C225S 함유 (에드레멘 넘버링(Edlemen numbering)); F 서브타입]
- EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:327)
- [0451]
- [0452] hIgG1a_(N297G)₁₉₁ [A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:328)
- [0453]
- [0454] hIgG1a₁₉₀ [hIgG1a₁₉₀ C 말단의 "K" 탈락; A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:329)
- [0455]
- [0456] hIgG1a_(N297Q)₁₉₁ [A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:330)
- [0457]
- [0458] hIgG1a_(N297S)₁₉₁ [A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:331)
- [0459]
- [0460] hIgG1a_(N297A)₁₉₁ [A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:332)
- [0461]

- [0462] hIgG1a_(N297H)_191 [A 서브타입]
- DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYHSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:333)
- [0463]
- [0464] hIgG4
- DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:334)
- [0465]
- [0466] hIgG4_(S241P)
- DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:335)
- [0467]
- [0468] 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302 및 323-335로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. Fc 도메인의 C-말단 리신은 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 임의적 성분이라는 것을 이해하여야 한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302 및 323-335로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 단 그의 C-말단 리신이 누락된다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열식별번호: 302의 아미노산 서열을 포함하며, 단 그의 C-말단 리신이 누락된다.
- [0469] 일부 실시양태에서, 알부민 결합 서열을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 제조된다. 예시 알부민 결합 서열은 연쇄상 구균의 단백질 G로부터의 알부민 결합 도메인 (예를 들어, 문헌 [Makrides *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996)] 및 [Sjolander *et al.*, *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)] 참조), 또는 알부민-결합 펩티드, 예컨대 문헌 [Dennis, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002)]에 기재된 것을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0470] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 지방산으로 아실화된다. 일부 경우에, 지방산은 혈청 알부민과의 결합을 촉진시킨다. 예를 들어, 문헌 [Kurtzhals, *et al.*, *Biochem. J.* 312:725-731 (1995)]을 참조한다.
- [0471] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 혈청 알부민 (인간 혈청 알부민을 비제한적으로 포함함)과 직접적으로 융합된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면, 매우 다양한 다른 분자가 또한 본 개시내용의 변형된 FGF-21과 연결되어 혈청 알부민 또는 다른 혈청 성분과의 결합을 조정할 수 있음을 알 것이다.
- [0472] XI. 변형 및 비변형된 FGF-21 폴리펩티드의 당화
- [0473] 본 개시내용은 사카라이드 잔기를 갖는 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 포함한다. 사카라이드 잔기는 천연성 (N-아세틸글루코사민을 비제한적으로 포함함) 또는 비천연성 (3-플루오로갈락토스를 비제한적으로 포함함)일 수 있다. 사카라이드는 N- 또는 O-연결 글리코시드 연결 (N-아세틸갈락토스-L-세린을 비제한적으로 포함함) 또는 비-자연 연결 (옥심 또는 상응하는 C- 또는 S-연결 글리코시드를 비제한적으로 포함함)에 의해 비-자연 코딩 아미노산에 연결될 수 있다.
- [0474] 사카라이드 (글리코실을 비제한적으로 포함함) 모이어티는 생체내 또는 시험관내에서 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 카르보닐-함유 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 아미노옥시 기로 유도체화된 사카라이드로 변형되어, 옥심 연결을 통해 연결된 상응하는 당화된 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 비-자연 코딩 아미노산에 부착되면, 사카라이드는 글리코실트랜스퍼라제 및 다른 효소에 의한 처리로 추가로 가공되어, 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 결합된 올리고당류를 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [H. Liu, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003)]을 참조한다.

- [0475] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 카르보닐-함유 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 아미노옥시 유도체로서 제조된 한정된 구조를 갖는 글리칸으로 직접적으로 변형될 수 있다. 아지드, 알킨, 히드라지드, 히드라진 및 세미카르바미드를 포함하는 다른 관능기도 사카라이드를 비-자연 코딩 아미노산에 연결시키는데 사용될 수 있다.
- [0476] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 아지드 또는 알킬닐-함유 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 후속적으로, 예를 들어 비제한적으로 각각 알킬닐 또는 아지드 유도체와의, 예를 들어 비제한적으로 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 반응에 의해 변형될 수 있다.
- [0477] *XII. FGF-21 이량체 및 다량*
- [0478] 본 개시내용은 또한 FGF-21 및 변형된 FGF-21의 조합체, 예컨대 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체 (즉, 삼량체, 사량체 등)를 제공하고, 여기서 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 변형된 FGF-21은 또 다른 FGF-21 또는 변형된 FGF-21 또는 이들의 변이체, 또는 FGF-21 또는 변형된 FGF-21 또는 이들의 변이체가 아닌 임의의 다른 폴리펩티드와, 폴리펩티드 백본에 직접적으로 또는 링커를 통해 결합된다. 단량체와 비교하여 분자량이 증가하였기 때문에, FGF-21 이량체 또는 다량체 접합체는 단량체 FGF-21과 비교하여, 새로운 또는 바람직한 특성, 예를 들어 비제한적으로 상이한 약리학, 약동학, 약력학, 조정된 치료적 반감기, 또는 조정된 혈장 반감기를 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 이량체는 FGF-21 수용체의 신호 전달을 조정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 이량체 또는 다량체는 FGF-21 수용체 길항제, 효능제, 또는 조정제로서 작용할 수 있다.
- [0479] *XIII. FGF-21 폴리펩티드의 활성 및 FGF-21 폴리펩티드의 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 대한 친화도의 측정*
- [0480] FGF-21은 그 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 공보 20040259780의 실시예 3에서 제시된 지방 조직 대사 연구를 위해 이용된 시험관내 모델인, 3T3-L1 지방세포에서 글루코스 흡수를 자극시키고 인슐린 감수성을 향상시키는 것으로 확인되었다. 2형 당뇨병의 특징은 지방세포 조직을 포함하는 다양한 조직 유형에서 글루코스 흡수가 결핍되는 것이다. 따라서, 변형된 FGF-21은 혈중 글루코스 수준을 강하시킴으로써 2형 당뇨병의 치료에 유용할 수 있다. 게다가, 변형된 FGF-21은 보다 신속하고 보다 효율적인 글루코스 이용에 의해 에너지 소비를 증가시킴으로써 비만의 치료에 유용할 수 있다. 추가적으로, FGF-21은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 비의존성 방식으로 글루코스 흡수를 자극시키는 것으로 확인되었는데, 이는 1형 당뇨병의 치료에도 또한 유용하다는 것을 시사한다. 미국 특허 공보 20040259780을 참조한다. 미국 특허 공보 20040259780에서 FGF-21은 3T3-L1 지방세포에서 농도 의존성 방식으로 인슐린의 최적 이하의 농도 (5 nM)에서, 또한 인슐린의 부재 하에 글루코스 흡수를 자극시키는 것으로 확인되었다. 추가로, FGF-21은 미국 특허 공보 20040259780에서 개시된 생체의 조직 모델에서 글루코스 흡수를 유도한다.
- [0481] 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 생물학적 활성 분석에 적용될 수 있다. 일반적으로, 생물학적 활성 시험은 비변형된 FGF-21 또는 본원의 다른 곳에 기재된 또 다른 비교체 화합물과 비교하여, 목적하는 결과를 위한 분석, 예컨대 생물학적 활성의 증가 또는 감소, 상이한 생물학적 활성, 수용체 또는 결합 파트너에 대한 친화도 분석, 변형된 FGF-21 자체 또는 그의 수용체의 입체구조적 또는 구조적 변화, 또는 혈청 반감기 분석을 제공할 것이다.
- [0482] 3T3-L1의 지방세포로의 예시 분화 방법 및 글루코스 흡수 분석법은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,012,931에 기재되어 있다.
- [0483] *XIV. 효능, 기능적 생체내 반감기, 및 약동학 파라미터의 측정*
- [0484] 본 개시내용의 측면은 수용성 중합체 모이어티와 접합되거나 또는 융합 파트너와 융합될 수 있는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 구축에 의해 달성가능한 연장된 생물학적 반감기이다. FGF-21 폴리펩티드 혈청 농도의 투여 후 급속 감소는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 처리에 대한 생물학적 반응의 평가를 치료학적으로 유의하게 만들었다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 피하 또는 i.v. 투여를 통한 투여 후에도 연장된 혈청 반감기를 가질 수 있고, 이는 예를 들어 ELISA 방법 또는 1차 스크리닝 분석법에 의한 측정을 가능하게 한다. 생체내 생물학적 반감기의 측정은 본원에 기재된 바와 같이 수행된다.
- [0485] 내부 결실 및/또는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 효능 및 기능적 생체내 반감기는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 프로토콜에 따라 그리고 본원에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.
- [0486] 예시 분석법에서, 본원에 기재된 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대한 약동학 파라미터는 정상 스프레

그-돌리(Sprague-Dawley) 수컷 래트 (처리 군 당 N = 5마리의 동물)에서 평가될 수 있다. 동물은 25 ug/래트 iv 또는 50 ug/래트 sc의 단회 용량을 투여받을 수 있고, 미리 한정된 시간 경로에 따라, 일반적으로 수용성 중합체와 접합되지 않은 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대해서는 약 6시간, 그리고 비-자연 코딩 아미노산을 포함하고 수용성 중합체와 접합된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 에 대해서는 약 4일에 걸쳐서 대략 5-7개의 혈액 샘플을 수집할 수 있다. 변형된 FGF-21에 대한 약동학 데이터를 비교체 화합물, 예컨대 서열식별번호: 1의 야생형 FGF-21 폴리펩티드, 서열식별번호: 201의 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 내부 결실이 없는 동일한 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 또 다른 비교체 화합물과 비교할 수 있다.

[0487] 약동학 파라미터는 또한 영양류, 예를 들어 시노물구스 원숭이에서 평가할 수 있다. 전형적으로, 단회 주사가 피하로 또는 정맥내로 투여될 수 있고, 혈청 FGF-21 수준이 시간에 따라 모니터링된다.

[0488] 본 개시내용의 폴리펩티드는 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병 (NIDDM: 2형), 인슐린 의존성 당뇨병 (1형) 뿐만 아니라, 비만, 부적절한 글루코스 클리어런스, 고혈당증, 고인슐린혈증 등을 앓고 있는 포유동물의 치료에 사용될 수 있다. FGF-21은, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공보 20040259780에서 확인된 바와 같이 당뇨병 및 비만의 동물 모델에서 효과적이다. 대사 프로파일은 비만 및 당뇨병의 다양한 동물 모델에서 상이하기 때문에, 고인슐린혈증, 고혈당증 및 비만의 효과를 구별하기 위해 복수의 모델이 분석되었다. 당뇨병 (db/db) 및 비만 (ob/ob) 마우스는 고도 비만, 과식증, 각종 고혈당증, 인슐린 저항성, 고인슐린혈증 및 열발생 이상을 특징으로 한다 (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). 그러나, 당뇨병은 db/db 모델에서 훨씬 더 중증이다 (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). Zucker(Zucker) (fa/fa) 래트는 고도 비만, 고인슐린혈증, 및 인슐린 저항성이 있고 (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299- 340), fa/fa 돌연변이는 래트에 있어서 뮤린의 db 돌연변이에 상당하는 것일 수 있다 (Friedman et al., Cell 69:217-220, 1992; Truett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7806, 1991). 투비(Tubby) (tub/tub) 마우스는 유의한 고혈당증을 동반하지 않으면서 비만, 중등도의 인슐린 저항성 및 고인슐린혈증을 특징으로 한다 (Coleman et al., J. Heredity 81:424, 1990).

[0489] 비만이 유전적 모델에서보다 덜 심각하며 과식증, 고인슐린혈증 및 인슐린 저항성을 동반하지 않으면서 발생하는, 화학적으로 유도된 비만에 대한 모노소름 글루타메이트 (MSG) 모델 (Olney, Science 164:719, 1969; Cameron et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 5:41, 1978)을 또한 조사할 수 있다. 마지막으로, 화학적으로 유도된 당뇨병에 대한 스트렙토조토신 (STZ) 모델을 비만이 아닐 때의 고혈당증의 영향을 조사하기 위해 시험할 수 있다. STZ 처리 동물은 인슐린이 부족하며, 고혈당증이 중증이다 (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340).

[0490] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 ob/ob 마우스의 생체내 패혈성 쇼크 모델에서 평가될 수 있다. 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공보 20050176631을 참조한다.

[0491] FGF-21에 의해 유도된 ERK1/2 포스포틸화의 분석 방법

[0492] FGF-21 (야생형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 예를 들어 PEG 또는 다른 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자와 연결된 것들)에 의해 유도된 ERK1/2 포스포틸화는 하기의 예시 방법에 의해 수행될 수 있다:

[0493] 인간 클로토 베타(Klotho beta)로 안정하게 형질감염된 293 세포를 100,000개 세포/웰 (DMEM + 10% FBS)로 폴리-Lys 코팅 플레이트에 시딩한다. 다음 날에 세포가 100% 컨플루언시가 되면, 배지를 흡인시켜 새로운 배지로 대체하고, 밤새 인큐베이션한다. 24시간 후에 세포를 선택된 비변형 또는 변형된 FGF-21 또는 FGF-21 유사체로, 표준물로서 FGF21WT를 사용하여 자극한다. 각각의 개별 화합물은 이들 화합물을 PBS/1% BSA로 희석시켜 준비한다. 세포를 37℃의 인큐베이터에서 10분 동안 삼중으로 처리한다. 10분 후에 인큐베이션 배지를 각각의 웰로부터 주의하여 흡인시키고, 프로테아제/포스파타제 억제제 (PI 각테일, Na3VN4 및 PMSF)를 함유하는 냉각 1x 세포 신호전달 용해 완충액 40 ul를 각각의 웰에 첨가하여 세포 용해물을 생산한다. 96 웰/플레이트를 20분 동안 얼음 상에 둔 다음, 10분 동안 4000 rpm으로 회전시킨다. 세포 용해물을 -80℃에서 냉동시킨다. 그 후에 각각의 샘플을 해동시키고, 세포 용해물 10 ul를 ERK1/2의 비포스포틸화 형태 및 포스포틸화된 형태를 둘 다 포획하는 항체로 코팅된 MSD 처리 플레이트에 첨가한다. 1차 항체와의 인큐베이션을 2시간 동안 수행하고,

그 후에 플레이트를 특정 완충액으로 수회 세척한 다음, 2차 항체를 첨가한다. 1시간 후에 인큐베이션 플레이트를 다시 수회 세척한다. 판독을 위해 완충액을 각각의 웰에 첨가한다. 플레이트를 MSD 판독기로 옮긴다. 생성된 곡선은 항-포스포릴화 ERK1/2 판독 단위에 기반하는 것이고 EC50을 시그마 플롯(Sigma Plot)을 사용하여 계산한다. 시험 화합물의 EC50을 WT의 EC50으로 나누어 활성 손실 배수를 계산한다.

[0494] 랫에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 약동학적 특성 결정

[0495] 하기 예시 방법은 카테터 삽입 랫에서의 천연 및 변형된 FGF-21 화합물의 약동학적 특성을 측정하는데 사용될 수 있다. 시험물의 약동학은 약물 투여 후 특정한 시점에 수득된 혈청 샘플로부터의 인간 FGF-21에 대하여 특이적인 ELISA에 의해 분석된다.

[0496] 연구가 개시될 때 대략 250-275 그램의 체중을 갖는 열두 마리 (12)의 수컷 스프래그-돌리 (SD) 랫에 경정맥 카테터를 수술로 삽입하였을 수 있다. 동물은 양호한 상태에 있으며 연구가 시작되기 전 적어도 3일 동안 연구 장소에 순응시킬 수 있다. 랫는 시험물 투여 당일에 체중을 측정할 수 있다. 동물은 사료와 물이 자유롭게 제공되는 표준 무병원체 조건에서 수용될 수 있다.

[0497] 화합물은, 예를 들어 0.25 mg/kg이 피하로 투여된다.

[0498] 시험물의 투여 전에 동물의 체중을 측정한다. 화합물은 μL 단위로 1X BW 투여되도록 체제화된다. 시험물의 피하 투여는 견갑 배측 영역에 주입된다. 동물은 시험물의 단위 주사 (시간 = 0)를 투여받을 수 있다. 선택된 시점에서, 전혈을 동물로부터 채혈하여, SST 마이크로테이너 채혈 튜브에 수집할 수 있다. 혈청을 원심분리 전 30분 동안 응고시킬 수 있다. 혈청을 폴리프로필렌 적정 튜브로 옮기고, 마이크로스트립으로 밀봉하여, 비변형 또는 변형된 FGF-21 혈청 농도를 결정하기 위해 ELISA에 의해 분석할 때까지 -80°C 에서 저장할 수 있다.

[0499] 각각의 동물이 전체 PK 시간 경로 동안 사용될 수 있다. 대략 0.25 mL의 전혈을 경정맥 카테터로부터 채혈할 수 있다. 혈액 수집 직후에, 카테터를 0.1 mL의 식염수로 플러싱할 수 있다. 시험물 물질을 투여받은 동물에 대하여 하기의 수집 시점이 선택될 필요가 있지만, 이는 시험물의 예상되는 약동학 프로파일에 기초하여 변화될 수 있다:

[0500] 채혈 전, 투여 후 1, 2, 4, 8, 24, 32 48, 56, 72 및 96시간. 약동학 파라미터가 각각의 시험 화합물에 대하여 결정되고, 이는 Lambda_z , Lambda_{z_lower} , Lambda_{z_upper} , HL_Lambda_z , Tmax , Cmax , CO , AUCINF_obs , Vz_obs , Cl_obs , MRTINF_obs , 및/또는 Vss_obs 를 포함할 수 있다.

[0501] ZDF 랫에서의 변형된 FGF-21의 생체내 연구

[0502] 변형된 FGF-21, 비변형된 FGF-21, 및 완충액을 마우스 또는 랫에 투여한다. 결과는 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 활성 및 반감기를, 비변형된 FGF-21과 비교하여 보여준다.

[0503] WO 2005/091944에 FGF-21 화합물, 예컨대 본 개시내용의 화합물을 이용하여 수행될 수 있는 약동학 연구가 기재되어 있다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 정맥내 또는 피하 경로에 의해 마우스에 투여한다. 동물을 투여 전 및 투여 후 일정 시점에서 채혈한다. 혈장을 각각의 샘플로부터 수집하고 방사면역분석법에 의해 분석한다. 제거 반감기를 계산하여, 내부 결실 및/또는 비-자연 코딩 아미노산 또는 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드와, 야생형 FGF-21 또는 본 개시내용의 FGF-21 폴리펩티드의 다양한 형태 사이에 비교할 수 있다. 유사하게, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 시노몰구스 원숭이에 투여할 수 있다. 동물을 투여 전 및 투여 후 일정 시점에서 채혈한다. 혈장을 각각의 샘플로부터 수집하고 방사면역분석법에 의해 분석한다.

[0504] 본 개시내용의 폴리펩티드를 ZDF 수컷 랫 (당뇨병, 비만 랫; 연구가 시작될 때 8주령, 찰스 리버-지엠아이 (Charles River-GMI))에 투여할 수 있다. 랫에게 퓨리나(Purina) 5008 사료를 자유롭게 공급한다. 하기 시험 군을 설정한다: 식염수; 인슐린 4 U/일; 비변형 또는 변형된 FGF-21, 500 ug/일 급성 (급성 투여 군은 1회 투여되고 투여 후 $T = 0, 2, 4, 8$ 및 24시간에 채혈됨); 비변형 또는 변형된 FGF-21, 100 ug/일; 비변형 또는 변형된 FGF-21, 250 ug/일; 비변형 또는 변형된 FGF-21, 500 ug/일; 비변형 또는 변형된 FGF-21 (1회/일) 500 ug/ml; 정상군 식염수; 정상군 인슐린 4U/일; 정상군 비변형 또는 변형된 FGF-21 500 ug/일. 정상군 군은 비-당뇨병성의 정상군 ZDF 랫를 나타낸다.

[0505] 화합물을 s.c. 주사하나 (b.i.d.), 단 제2의 500 ug/일 군은 연구 기간 (7일) 동안 매일 1회 주사를 투여받는다. 대조군 랫는 비히클 (PBS; 0.1 ml)을 주사한다. 7일의 투여 후에, 동물을 경구 글루코스 내성 시험에 적용한다. 글루코스 및 트리글리세리드를 위해 혈액을 마취제 없이 꼬리 클립 채혈에 의해 수집한다.

변형된 FGF-21 폴리펩티드는 혈장 글루코스 수준을 용량-의존성 방식으로 감소시킬 수 있다. 또한, 정상군 ZDF 래트는 인슐린을 투여한 래트와 비교하였을 때, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 노출된 후 저혈당이 되지 않을 수 있다.

[0506] ob/ob 비만 모델에서의 변형된 FGF-21의 생체내 연구

[0507] ob/ob 마우스 모델은 고혈당증, 인슐린 저항성 및 비만에 대한 동물 모델이다. 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 처리 후의 혈장 글루코스 수준을, 비히클 및 인슐린 대조군 군과 비교하여 ob/ob 마우스에서 측정할 수 있다. 이 비만 모델에서, 수컷 ob/ob 마우스 (7주령)의 시험 군에 단독의 비히클 (PBS), 인슐린 (4 U/일), 또는 비변형 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드 (5 μ g/일 및 25 μ g/일)를 피하로 (0.1 ml, b.i.d) 7일 동안 주사한다. 화합물의 첫번째 주사 후 혈액을 제1일, 제3일 및 제7일, 1시간에 꼬리 클립 채혈에 의해 수집하고, 혈장 글루코스 수준을 표준 프로토콜을 사용하여 측정한다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드가 비히클 대조군 군과 비교하여 혈장 글루코스 수준을 감소시킨다면, 이것은 글루코스 흡수를 자극시킨다. 다른 분자와 비교하여 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 처리 후에 트리글리세리드 수준을 비교할 수 있다. 폴리펩티드를 다회 투여, 연속 주입, 또는 단회 투여 등으로 마우스에 투여할 수 있다.

[0508] 변형된 FGF21 폴리펩티드의 약동학 평가:

[0509] PEG의 다양한 접합 자리를 갖는 변형된 FGF-21의 약동학 특성을 래트에서 평가한다. 연구되는 다른 파라미터는 PEG MW 뿐만 아니라, 투여되는 화합물의 용량이다. 생체이용률 (%)을 결정한다.

[0510] 모든 동물 실험은 실험 동물 사용 관리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 프로토콜 하에 수행한다. 수컷 (175-300 g) 스프래그-돌리 래트를 찰스 리버 래보러토리즈(Charles River Laboratories)로부터 입수한다. 래트를 12-h 명기/암기 사이클을 갖는 실내의 우리에 개별적으로 수용하고 실험 전 적어도 3일 동안 사육장에 순응시킨다. 동물에게 품질인증된 퓨리나 설치류 사료 5001과 물을 자유롭게 제공한다.

[0511] 혈액 수집을 위해 카테터를 경정맥에 수술로 설치한다. 성공적인 카테터 개방 후, 동물을 투여 전에 처리 군으로 배정한다. 화합물의 단회 투여가 1 mL/kg의 용량 부피로 정맥내로 또는 피하로 투여된다. 허가 증명서(Certificate of Release)에 지정된 스톱 농도를 사용하여 PBS로 희석시킴으로써 화합물 투여 농도를 유도한다. 유치 카테터를 통해 다양한 시점에서 혈액 샘플을 수집하여 SST 마이크로퓨지 튜브에 넣는다. 혈청을 원심분리 후에 수집하고, 분석 전까지 -80°C에서 저장한다.

[0512] 스프래그-돌리 래트 혈청 중의 변형된 FGF-21의 정량화 분석법을 하기와 같이 수행한다. 마이크로플레이트 웰을 포획 시약으로서 사용되는 염소 항-인간 FGF-21 IgG 폴리클로날 항체 (PAb; 알렌디 시스템즈(RnD Systems), 클론 AF2539)로 코팅한다. 이들 둘다 비변형 또는 변형된 FGF-21을 100% 스프래그-돌리 래트 혈청에 스파이킹하여 제조하는, 표준 (STD) 및 품질 관리 (QC) 샘플과 연구 샘플을 아이-블록(I-Block) 완충액으로 1:100 전처리한 후에 웰에 로딩한다. STD, QC 및 연구 샘플 중의 비변형 또는 변형된 FGF-21은 고정화된 PAb에 의해 포획된다. 웰을 세척하여 비결합 물질을 제거한다. 비오틴 염소 항-인간 FGF-21 IgG PAb (알렌디 시스템즈, 클론 BAF2539)를 웰에 첨가한 다음, 세척 단계가 이어지고, 포획된 비변형 또는 변형된 FGF-21의 검출을 위해 스트렙타비딘 호스래디쉬 퍼옥시다제 (SA-HRP; 알렌디 시스템즈, 카탈로그 # DY998)를 첨가한다. 또 다른 세척 단계 후에, 테트라메틸벤지딘 (TMB, 커크가드 페리 래보러토리즈(Kirkegaard Perry Laboratories)) 기질 용액을 웰에 첨가한다. TMB는 HRP의 존재 하에 퍼옥시드와 반응하여, 초기 단계에서 포획 시약에 의해 결합된 FGF-21 (야생형 또는 변형된 FGF-21)의 양에 비례하는 색측정 신호를 발생시킨다. 색 발현은 2 N 황산의 첨가에 의해 정지되고, 색 강도 (광학 밀도, OD)를 450 nm에서 측정한다. 연구 샘플 및 QC에 대한 OD 단위의 농도로의 변환은 동일한 플레이트에서의 표준 곡선에 대한 컴퓨터 소프트웨어 매개 비교를 통해 달성되고, 이는 SOFTmax Pro v5 데이터 정리 패키지를 사용하여 5-파라미터 로지스틱 회귀분석 모델에 따라 회귀분석된다. 결과는 ng/mL의 농도 단위로 기록된다.

[0513] 농도는 또한 이중 항체 샌드위치 분석법 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 방법에 의해 측정할 수 있다. 상응하는 투여 화합물로부터 생성된 표준 곡선을 사용하여 농도를 계산한다. 약동학 파라미터는 모델링 프로그램 WinNonlin (파사이트(Pharsight), 버전 4.1)을 사용하여 추정된다. 리니어 업/로그 다운(linear-up/log-down) 사다리꼴 적분을 이용한 개별 동물 데이터에 대한 비구획 분석을 사용하고, 농도 데이터에는 균일한 가중치를 둔다.

[0514] XV. 투여 및 제약 조성물

- [0515] 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다. 이러한 담체 또는 부형제는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및/또는 이들의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 제제는 투여 모드에 적합하도록 제조된다. 일반적으로 단백질의 투여 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 이들이 본 개시내용의 폴리펩티드의 투여에 적용가능하다.
- [0516] 예를 들어, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 수용 환자 체중 1 kg 당 약 0.1 내지 100 mg의 농도로 환자에게 투여될 수 있다. 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 수용 환자 체중 1 kg 당 약 0.5-5 mg의 농도로 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 1일 1회 내지 2주마다 1회의 빈도로, 예컨대 대략 1주마다 1회 또는 2회의 빈도로, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 또는 6일마다 1회 수용 환자에게 투여될 수 있다.
- [0517] 주어진 환자에게 투여되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 농도는 상기에 나타난 예시 투여 농도보다 높거나 또는 낮을 수 있다는 것을 이해하여야 한다.
- [0518] 본 개시내용에 제공된 정보에 기초하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 일상적인 실험을 통해 유효 투여량 및 투여 빈도를 결정할 수 있을 것이고, 예를 들어 본원의 개시내용 및 문헌 [Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill]; [Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins]; 및 [Golan, D. E. (2008). Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., (etc.): Lippincott Williams & Wilkins]의 교시내용의 안내를 받을 수 있다.
- [0519] 변형된 FGF-21의 평균 양은 달라질 수 있고, 특히 자격을 갖춘 의사의 권고와 처방에 기초하여야 한다. 변형된 FGF-21의 정확한 양은 치료되는 병태의 정확한 유형, 치료되는 환자의 상태 뿐만 아니라, 조성물 중의 다른 성분과 같은 인자를 조건으로 하는 선호도의 문제이다. 본 개시내용은 또한 또 다른 활성제의 치료 유효량의 투여를 제공한다. 제공되는 양은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0520] "제약 조성물"은 포유동물에 투여하기에 적합한 화학적 또는 생물학적 조성물을 말한다. 이러한 조성물은 협측, 표피, 경막외, 흡입, 동맥내, 심장내, 뇌실내, 피내, 근육내, 비내, 안내, 복강내, 척수내, 척수강내, 정맥내, 경구, 비경구, 관장 또는 좌제를 통한 직장내, 피하, 진피하, 설하, 경피 및 점막흡수를 비제한적으로 포함하는 다수의 경로 중 하나 이상을 통한 투여에 대하여 특이적으로 제제화될 수 있다. 또한, 투여는 주사제, 분말제, 액상제, 겔제, 적제, 또는 다른 투여 수단에 의해 발생할 수 있다.
- [0521] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체" 또는 "부형제"는 생리적으로 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매체, 코팅물, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제를 포함한다. 한 실시양태에서, 담체는 비경구 투여에 적합하다. 다르게는, 담체는 정맥내, 복강내, 근육내 또는 설하 투여에 적합할 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 수성 용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다.
- [0522] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 동결건조된 형태로 존재할 수 있다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙 구조로서 제제화될 수 있다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 본 발명은 추가로 안정화제를 제약 조성물에 포함시키는 것을 고려한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 또한 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.
- [0523] 다수의 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 소듐 클로라이드를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 작용제를 포함시킴으로써, 주사 조성물의 흡수가 연장될 수 있다. 게다가, 폴리펩티드는 서방형 방출 제제, 예를 들어 지연 방출 중합체를 포함하는 조성물로 제제화될 수 있다. 활성 화합물은 이식물 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제제와 같이, 급속 방출에 대하여 화합물을 보호할 수 있는 담체를 이용하여 제조될 수 있다. 생분해성, 생체 적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리산 무수물, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락트산 폴리글리콜산 공중합체 (PLG)가 사용될 수 있다. 이러한 제제의 다수의 제조 방법이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0524] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 조성물은 단백질 또는 펩티드에 적합한 임의의 통상의 경로에

의해, 예를 들어 비제한적으로 비경구로, 예를 들어 피하 또는 정맥내를 비제한적으로 포함하는 주사 또는 주사 또는 주입의 임의의 다른 형태에 의해 투여될 수 있다. 폴리펩티드 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국부, 설하 또는 직장 수단을 비제한적으로 포함하는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다. 변형된 FGF-21을 포함하는 조성물은 또한 리포솜을 통해 투여될 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 단독으로 또는 다른 적합한 성분, 예컨대 제약 담체와 조합되어 사용될 수 있다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 경구용 항당뇨병제를 비제한적으로 포함하는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0525] 용어 "항당뇨병제"는 본원에 기재된 병태, 질환 또는 합병증 중 어느 하나를 비롯하여, 임의의 글루코스 대사 장애 또는 그의 임의의 합병증을 치료, 예방 또는 다르게는 중증도를 감소시키는데 있어서 유용한 임의의 약물을 의미할 것이다. 항당뇨병제는 인슐린, 티아졸리딘디온, 술폰일우레아, 벤조산 유도체, 알파-글루코시다제 억제제 등을 포함한다.

[0526] 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는, 당뇨병 및 그의 전조 증상, 예컨대 인슐린 저항성을 관리하기 위해 사용되는 통용 약물 또는 항당뇨병제는 5개 클래스의 화합물: 비구아니드, 예를 들어 메트포르민; 티아졸리딘디온, 예를 들어 트로글리타존; 술폰일우레아, 예를 들어 톨부타미드 및 글리부리드; 벤조산 유도체, 예를 들어 레파글리니드; 및 글루코시다제 억제제를 포함한다. 이들 작용제 이외에도, 글루코스 조절을 개선하기 위해 다수의 다른 요법제, 예를 들어 비제한적으로 DPP-4 억제제가 본 개시내용의 FGF-21 폴리펩티드와 조합되어 사용될 수 있다. 임상 시험에서 시험되는 선도 DPP-4 화합물은 빌다글립틴 (갈버스(Galvus)) (LAF237), 시타글립틴 (자누비아), 삭사글립틴 및 알로글립틴, 노바티스(Novartis) 화합물 1-[[[2-[(5-시아노피리딘-2-일)아미노]에틸]아미노]아세틸]-2-시아노-(S)-피롤리딘 (NVP DPP728)을 포함한다.

[0527] 항당뇨병제의 또 다른 카테고리는 카르니틴 팔미토일-트랜스퍼라제 I (CPT-I)의 억제제, 예컨대 에토목시르(etomoxir)이다.

[0528] 다른 공지된 항당뇨병제는 인슐린 제제 (예를 들어, 소 및 돼지의 췌장으로부터 추출된 동물 인슐린 제제; 에스 케리치아 콜라이, 효모를 사용하여 유전적으로 합성된 인간 인슐린 제제; 아연 인슐린; 프로타민 아연 인슐린; 인슐린의 단편 또는 유도체 (예를 들어, INS-1), 경구용 인슐린 제제), 인슐린 감작제 (예를 들어, 피오글리타존 또는 그의 염 (바람직하게는 히드로클로라이드), 로시글리타존 또는 그의 염 (바람직하게는 말리에이트), 네토글리타존(Netoglitazone), 리보글리타존(Rivoglitazone) (CS-011), FK-614, W001/38325에 기재된 화합물, 테사글리타자르 (AZ-242), 라가글리타자르(Ragaglitazar) (N,N-622), 뮌라글리타자르 (BMS-298585), 에다글리타존(Edaglitazone) (BM-13-1258), 메타글리다센(Metaglidasen) (MBX-102), 나베글리타자르(Naveglitazar) (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), α -글루코시다제 억제제 (예를 들어, 보글리보즈, 아카보즈, 미그리톨, 에미글리테이트(emiglitate) 등), 비구아니드 (예를 들어, 펜포르민, 메트포르민, 부포르민(buformin) 또는 이들의 염 (예를 들어, 히드로클로라이드, 푸마레이트, 숙시네이트)), 인슐린 분비촉진제 [술폰일우레아 (예를 들어, 톨부타미드, 글리벤클라미드(glibenclamide), 글리클라지드(gliclazide), 클로르프로파미드, 톨라자미드, 아세토헥사미드, 글리코피라미드, 글리메프리드, 글리피지드, 글리부졸), 레파글리니드, 나테글리니드(nateglinide), 미티글리니드(mitiglinide) 또는 이들의 칼슘 염 수화물], 디펩티드 펩티다제 IV 억제제 (예를 들어, 비다글립틴(Vidagliptin) (LAF237), P32/98, 시타글립틴 (MK-431), P93/01, PT-100, 삭사글립틴 (BMS-477118), T-6666, TS-021), β 3 효능제 (예를 들어, AJ-9677), GPR40 효능제, 글루카곤-유사 폴리펩티드 (I) (glp I), (glp2), 또는 다른 당뇨병유발성 펩티드 호르몬, GLP-1 수용체 효능제 [예를 들어, GLP-1, GLP-1MR 작용제, N,N-2211, AC-2993 (엑센딘-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH₂, CJC-[131], 아밀린 효능제 (예를 들어, 프람린티드), 포스포티로신 포스파타제 억제제 (예를 들어, 소듐 바나테이트), 글루코스 신합성 억제제 (예를 들어, 글리코젠 포스포릴라제 억제제, 글루코스-6-포스파타제 억제제, 글루카곤 길항제), SGLT2 (소듐-글루코스 공동수송체) 억제제 (예를 들어, T-1095), 11 β -히드록시스테로이드 탈수소효소 억제제 (예를 들어, BVT-3498), 아디포넥틴 또는 그의 효능제, IKK 억제제 (예를 들어, AS-2868), 랩틴 저항성 개선 약물, 소마토스타틴 수용체 효능제 (W001/25228, W003/42204, W098/44921, W098/45285, W099/2273.5 등에 기재된 화합물), 글루코키나제 활성화제 (예를 들어, Ro-28-1675), GIP (글루코스-의존성 인슐린분비자극 펩티드) 등을 포함한다.

[0529] 변형된 FGF-21은 또한 흡입을 통해 투여되는 에어로졸 제제 (즉, "분무"될 수 있음)로 제조될 수 있다. 에어로졸 제제는 가압되는 허용가능한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등 중에 위치할 수 있다.

[0530] 예를 들어 관절내 (관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 및 피하 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 제제

는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제를 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의, 등장성 멸균 주사 용액제, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성의 멸균 현탁액제를 포함한다. 변형된 FGF-21의 제제는 단위-용량 또는 다회-용량이 밀봉된 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 존재할 수 있다.

[0531] 본 개시내용의 문맥에서 환자에게 투여되는 용량은 환자에게서 시간에 따라 유의한 치료적 반응, 또는 용도에 따라 다른 적절한 활성을 갖기에 충분한다. 용량은 제제의 효력, 및 이용되는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기, 및 환자의 병태 뿐만 아니라, 치료되는 환자의 체중 또는 체표면적에 의해 결정된다.

[0532] 예를 들어 70 킬로그램인 환자에게 투여되는 용량은 전형적으로 현재 사용되는 치료용 단백질의 투여량과 동가의 범위에 있고, 이는 관련된 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 따라 조정된다.

[0533] 투여에 있어서, 본 개시내용의 제제는 관련된 제제의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 예를 들어 비제한적으로 환자의 체중 및 전반적인 건강 상태에 맞게 적용되는 다양한 농도에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 임의의 부작용의 관찰에 의해 결정된 속도로 투여된다. 투여는 단회 투여 또는 분할 투여를 통해 달성될 수 있다.

[0534] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 포유류 대상체에 직접 투여될 수 있다. 투여는 FGF-21 폴리펩티드를 대상체에게 도입하기 위해 보통 사용되는 임의의 경로에 의한 것이다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 제약상 허용되는 담체와 함께 단위 투여량의 주사가 가능한 형태 (용액제, 현탁액제, 또는 에멀전제를 비제한적으로 포함함)의 혼합물로 제조될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 연속적 주입 (예를 들어 비제한적으로 미니펌프, 예컨대 삼투압 펌프를 사용함), 단일 볼루스 또는 지연 방출 데포 제제에 의해 투여될 수 있다.

[0535] 투여에 적합한 제제는 수성 및 비-수성 용액제, 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제를 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 등장성 멸균 용액제, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액제를 포함한다. 용액제 및 현탁액제는 이미 기재된 종류의 멸균 분말제, 과립제 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0536] 본 개시내용의 제약 조성물 및 제제는 제약상 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함할 수 있다.

[0537] 적합한 담체는 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 비카르보네이트, 및 다른 유기산을 함유하는 완충제; 항산화제, 예를 들어 비제한적으로 아스코르브산; 저분자량 폴리펩티드, 예를 들어 비제한적으로 약 10개 미만의 잔기를 갖는 것; 단백질, 예를 들어 비제한적으로 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 비제한적으로 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 비제한적으로 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 히스티딘 또는 히스티딘 유도체, 메티오닌, 글루타메이트, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 비제한적으로 트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예를 들어 비제한적으로 EDTA 및 에텐테이트 디소듐; 2가 금속 이온, 예를 들어 비제한적으로 아연, 코발트, 또는 구리; 당 알콜, 예를 들어 비제한적으로 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 비제한적으로 소듐 및 소듐 클로라이드; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 비제한적으로 트윈(Tween)TM (트윈 80 (폴리소르베이트 80) 및 트윈 20 (폴리소르베이트 20)을 비제한적으로 포함함), 플루로닉스(Pluronic)TM 및 다른 플루론산, 예를 들어 비제한적으로 플루론산 F68 (폴록사머 188)을 비제한적으로 포함하는 다른 플루론산, 또는 PEG를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 적합한 계면활성제는 예를 들어, 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드), 즉 (PEO-PPO-PEO), 또는 폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드), 즉 (PPO-PEO-PPO), 또는 이들의 조합을 기재로 하는 폴리에테르를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. PEO-PPO-PEO 및 PPO-PEO-PPO는 플루로닉스TM, R-플루로닉스TM, 테트로닉스(Tetronics)TM 및 R-테트로닉스TM라는 상표명으로 시판되고 있으며 (바스프 와이언도트 코퍼레이션(BASF Wyandotte Corp.), 미국 미시간주 와이언도트 소재), 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 4,820,352에 추가로 기재되어 있다. 다른 에틸렌/폴리프로필렌 블록 중합체도 적합한 계면활성제일 수 있다. 계면활성제 또는 계면활성제의 조합이 PEG화된 변형된 FGF-21을 하나 이상의 스트레스, 예를 들어 비제한적으로 교반으로부터 초래된 스트레스에 대하여 안정화시키는데 사용될 수 있다. 상기 중 일부는 "벌킹제(bulking agent)"라고 할 수 있다. 일부는 또한 "장성 조절제"라고도 할 수 있다. 향미생물성 보존제가 또한 제품 안정성 및 향미생물성 효과를 위해 적용될 수 있고; 적합한 보존제는 벤질 알콜, 벤즈알코늄 클로라이드, 메타크레졸, 메틸/프로필 파라벤, 크레졸, 및 페놀, 또는 이들의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0538] 수용성 중합체, 예컨대 PEG와 연결된 것을 비롯하여, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또한 지효성 방출 시스템에 의해 또는 그의 일부로서 투여될 수 있다. 지효성 방출 조성물은 성형체, 예를 들어 비제한적으로 필름 또는 마이크로캡슐의 형태로 반투과성 중합체 매트릭스를 예를 들어 비제한적으로 포함한다. 지효성 방출 매트릭스는 생체적합성 물질, 예컨대 폴리(2-히드록시에틸 메타크릴레이트), 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산, 폴리락티드 (폴리락트산), 폴리글리콜리드 (글리콜산의 중합체), 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리산 무수물, L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 술페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 이소류신, 폴리뉴클레오타이드, 폴리비닐 프로피렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 지효성 방출 조성물은 또한 리포솜에 봉입된 화합물을 포함한다. 화합물을 함유하는 리포솜은 공지된 방법에 의해 제조된다.
- [0539] 본 개시내용의 문맥에서 환자에게 투여되는 용량은 대상체에게서 시간에 따라 유익한 반응을 초래하기에 충분해야 한다. 일반적으로, 투여당 비경구로 투여되는 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 총 제약 유효량은 환자 체중을 기준으로 약 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 약 100 $\mu\text{g/kg}$, 또는 약 0.05 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위이지만, 이는 치료적으로 재량에 맡겨진다.
- [0540] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항당뇨병제의 효과를 조정한다. 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항당뇨병제와 공동투여될 수 있다. 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항당뇨병제 치료 전에 투여될 수 있다. 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항당뇨병제 치료 후에 투여될 수 있다. 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 메트포르민과 공동투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 공동투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 클로토 베타와 공동투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타 및 항당뇨병제와 공동투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항당뇨병제와 공동투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 하기 중 하나 이상과 조합되어 사용된다: 타우린, 알파 리포산, 멀베리 추출물, 크로뮴, 글루타민, 에니코스테마 리토랄 블루메, 스코파리아 둘시스, 타라곤 추출물 및 안드로그라피스 파니쿨라타. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 하기 중 하나 이상과 조합되어 사용된다: 인슐린 제제 (예를 들어, 소 및 돼지의 췌장으로부터 추출된 동물 인슐린 제제; 에스케리치아 콜라이, 효모를 사용하여 유전적으로 합성된 인간 인슐린 제제; 아연 인슐린; 프로타민 아연 인슐린; 인슐린의 단편 또는 유도체 (예를 들어, INS-1), 경구용 인슐린 제제), 인슐린 감작제 (예를 들어, 피오글리타존 또는 그의 염 (바람직하게는 히드로클로라이드), 로시글리타존 또는 그의 염 (바람직하게는 말리에이트), 네토글리타존, 리보글리타존 (CS-011), FK-614, W001/38325에 기재된 화합물, 테사글리타자르 (AZ-242), 라가글리타자르 (N,N-622), 류라글리타자르 (BMS-298585), 에다글리타존 (BM-13-1258), 메타글리타센 (MBX-102), 나베글리타자르 (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), α -글루코시다제 억제제 (예를 들어, 보글리보즈, 아카보즈, 미그리톨, 에미글리테이트 등), 비구아니드 (예를 들어, 펜포르민, 메트포르민, 부포르민 또는 이들의 염 (예를 들어, 히드로클로라이드, 푸마레이트, 숙시네이트)), 인슐린 분비촉진제 [술폰닐우레아 (예를 들어, 톨부타미드, 글리벤클라미드, 글리클라지드, 클로르프로파미드, 톨라자미드, 아세토헥사미드, 글리코피라미드, 글리메프리드, 글리피지드, 글리부졸), 레파글리니드, 나테글리니드, 미티글리니드 또는 이들의 칼슘 염 수화물], 디펩티드 펩티다제 IV 억제제 (예를 들어, 비다글립틴 (LAF237), P32/98, 시타글립틴 (MK-431), P93/01, PT-100, 삭사글립틴 (BMS-477118), T-6666, TS-021), β 3 효능제 (예를 들어, AJ-9677), GPR40 효능제, 글루카곤-유사 폴리펩티드 (I) (glp I), (glp2), 또는 다른 당뇨병유발성 펩티드 호르몬, GLP-1 수용체 효능제 [예를 들어, GLP-1, GLP-1MR 작용제, N,N-2211, AC-2993 (엑센딘-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH₂, CJC-[131], 아밀린 효능제 (예를 들어, 프람린티드), 포스포티로신 포스포타제 억제제 (예를 들어, 소듐 바나데이트), 글루코신합성 억제제 (예를 들어, 글리코겐 포스포릴라제 억제제, 글루코스-6-포스포타제 억제제, 글루카곤 길항제), SGLUT (소듐-글루코스 공동수송체) 억제제 (예를 들어, T-1095), 11 β -히드록시스테로이드 탈수소효소 억제제 (예를 들어, BVT-3498), 아디포넥틴 또는 그의 효능제, IKK 억제제 (예를 들어, AS-2868), 렙틴 저항성 개선 약물, 소마토스타틴 수용체 효능제 (W001/25228, W003/42204, W098/44921, W098/45285, W099/22735 등에 기재된 화합물), 글루코키나제 활성화제 (예를 들어, Ro-28-1675), GIP (글루코스-의존성 인슐린분비자극 펩티드).
- [0541] 본 개시내용의 폴리펩티드 및 그를 포함하는 조합 요법의 치료 효력이 결정될 수 있는 하나의 방법은 환자에서

의 HbA1c 수준의 감소를 통해서이다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리펩티드는 HbA1c 수준을, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 요법을 시작하기 2개월 전, 변형된 FGF-21 폴리펩티드 요법을 시작하기 3개월 전의 HbA1c 수준으로부터 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 만큼 또는 적어도 50%의 변화율로 강하시키거나, 또는 기준선으로부터의 변화율 (%)에 의해 강하시킨다. 또 다른 실시양태에서, 항당뇨병제 치료를 또한 받고 있는 환자에게 투여되는 본 개시내용의 폴리펩티드는 혈중 글루코스를 강하시키는 항당뇨병제의 능력을 조정한다.

[0542] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 인슐린 요구량을 감소시키는 트로글리타존의 능력을 조정한다. 본 개시내용의 폴리펩티드와 조합되어 사용되는 트로글리타존은 본 개시내용의 특정 실시양태에서 2형 당뇨병을 지연 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0543] 본 개시내용의 한 실시양태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 술폰닐우레아와 공동투여되거나, 또는 술폰닐우레아 치료 전 또는 치료 후에 투여된다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 치료 용량의 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 의한 치료는 혈청 글루코스를 조정한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 함께 투여되어, 혈중 글루코스에 대한 폴리펩티드의 영향을 조정한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 함께 투여되어, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 단독으로 사용하는 것보다 혈중 글루코스를 큰폭으로 감소시킨다.

[0544] XVI. 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 용도

[0545] 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병 (NIDDM: 2형), 인슐린 의존성 당뇨병 (1형) 뿐만 아니라, 비만, 부적절한 글루코스 클리어런스, 고혈당증, 고인슐린혈증, 및 FGF-21에 의해 매개될 수 있는 임의의 다른 질환 또는 병태를 앓고 있는 포유동물의 치료에 사용될 수 있다.

[0546] 프라더-윌리 증후군 (P.W.S. 또는 PWS)은 15번 염색체 (q 11-13) 상의 7개 유전자 (또는 그의 일부 부분집합)가 부계 염색체 상에서 결실되었거나 또는 발현되지 않은 (염색체 15q 부분 결실) 희귀 유전병이다. PWS의 특징은 근육 저긴장, 저신장, 불완전한 성적 발달, 인지 장애, 문제 행동, 및 만성적인 허기감이며, 이는 과식을 유발하여 생명을 위협하는 비만에 이를 수 있다.

[0547] 본 개시내용은 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 비만, 인슐린 저항성, 고인슐린혈증, 글루코스 불내성, 또는 고혈당증 중 하나 이상을 나타내는, 치료를 필요로 하는 포유동물에게 본 개시내용의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물의 치료 방법을 제공한다.

[0548] 치료 방법은 상기 포유동물에서 하기 변화 중 적어도 하나를 달성하는데 충분할 수 있다: 체지방 축적의 감소, 인슐린 저항성의 감소, 고인슐린혈증의 경감, 글루코스 내성의 증가, 및 고혈당증의 경감.

[0549] 본 개시내용은 또한 감염성 공격, 예컨대 패혈증, 패혈성 쇼크, 다발성 외상 및 조직 손상, 출혈성 쇼크, 면역 매개 장기 손상, 호흡 곤란, 쇼크, 신부전증 및 다발성 장기 부전 증후군 (MODS) 뿐만 아니라, 비-감염성 병인과 연관된 전신 염증 반응 증후군 (SIRS)을 앓고 있는 위독한 환자에게 변형된 FGF-21의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자의 사망률 및 이환율을 감소시키는 방법을 포괄한다.

[0550] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 글루코스 대사 장애, 예컨대 인슐린 저항성, 인슐린 분비 장애 또는 고혈당증을 치료하는 또 다른 작용제와 조합하여 이용하는 조성물 및 방법을 제공한다. 이러한 다른 작용제는 예를 들어, 술폰닐우레아, PPAR-감마 효능제, GPL-1 수용체 효능제, 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제, 아밀린 유사체, 비구아니드, 도파민 D2 수용체 효능제, 메글리티니드, 알파-글루코시다제 억제제, 항이상지질혈증 담즙산 제거제, 인슐린, 시토카인 요법제, 유전자 요법제, 및 항체 요법제 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 또 다른 치료제의 투여, 예를 들어 메트포르민, 피오글리타존, 술폰닐우레아, 글리니드, 경구용 티아졸리딘디온 (TZD), 예컨대 피오글리타존, 글루카곤-유사 펩티드 1 (GLP-1) 수용체 효능제, 예컨대 엑세나티드, DPP4 억제제, 예컨대 시타글립틴, 빌다글립틴, 삭사글립틴, 알로글립틴, 리나글립틴 (linagliptin), 또는 테넬리글립틴 (teneligliptin), 또는 조합 요법제, 예컨대 메트포르민과 피오글리타존, 메트포르민과 술폰닐우레아, 메트포르민과 글리니드, 메트포르민과 TZD, 메트포르민과 피오글리타존, 메트포르민과 GLP-1 수용체 효능제, 메트포르민과 엑세나티드, 시타글립틴과 메트포르민, 시타글립틴과 심바스타틴, 빌다글립틴과 메트포르민, 삭사글립틴과 메트포르민, 알로글립틴과 피오글리타존, 또는 리나글립틴과 메트포르민, 또는 SGLT2 억제제, 예컨대 다파글리플로진, 카나글리플로진, 엠파글리플로진 (empagliflozin), 이프라글리플로진 (ipragliflozin) 또는 토포글리플로진 (tofogliflozin)에 의한 치료로 정상혈당을 달성하지 못한 환자에게 투여될 수 있다.

- [0551] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 비만 (예를 들어, 적어도 25의 체질량 지수)의 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다. 상기 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 항비만제, 예컨대 오를리스타트, 리모나반트, 시부트라민, 펩티드 YY (PYY, 식욕을 감소시키는 36개 아미노산 펩티드), PYY 유사체, CB-1 길항제, 리모나반트, 랩틴, 랩틴 유사체, 또는 펜터민과 조합되어 투여될 수 있다.
- [0552] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 프라더-윌리 증후군의 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다.
- [0553] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시하기 위한 것이며, 본원에 비추어서 다양한 수정 또는 변화가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 시사될 것이고 이들은 본 출원의 취지 및 범위 내에 그리고 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되어야 한다는 것이 이해된다. 또한, 본원에 사용된 용어들은 단지 예시 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 첨부된 청구범위에 의해서만 제한되는 본 개시내용의 범주를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 출원에 인용된 모든 공보, 특허, 특허 출원, 및/또는 다른 문헌은 각각의 개별 공보, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌이 개별적으로 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 지시된 것처럼 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0554] 실시예
- [0555] 하기 실시예는 청구된 발명을 설명하기 위해 제공된 것으로, 발명을 제한하지 않는다.
- [0556] 실시예 1
- [0557] 이. 콜라이에서의 FGF-21의 발현 및 정제
- [0558] T7 프로모터의 조절 하에 비변형 또는 변형된 FGF-21 발현 구축물을 함유하는 플라스미드를 이. 콜라이 균주, 예컨대 T7 폴리머라제의 발현이 아라비노스-유도성 프로모터의 조절 하에 있는 이. 콜라이 W3110 B2 균주로 형질전환시켰다. 배양 배양한 박테리아 배양물을 2X YT 배양 배지를 함유하는 진탕 플라스크에서 1:100 희석시키고 약 0.8의 OD₆₀₀까지 37℃에서 성장시켰다. 단백질 발현은 아라비노스 (최종 농도: 0.2%)와 4 mM의 최종 농도까지 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF)을 첨가함으로써 유도될 수 있었다. 배양물을 적합한 기간 및 온도로, 예를 들어 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션할 수 있었다. 세포를 펠렛화하고, B-PER 용해 완충액 (피어스 (Pierce)) 100 ul/OD/ml + 10 ug/ml DNase에 재현탁시키고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션할 수 있었다. 세포 물질을 원심분리에 의해 제거할 수 있고 상청액을 제거할 수 있었다. 펠렛을 동일한 양의 SDS-PAGE 단백질 로딩 완충액에 재현탁시킬 수 있었다. 샘플을 MES 및 DTT가 함유된 4-12% PAGE 겔 상에 로딩할 수 있었다. FGF-21의 정제 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 정제는 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯팅 (Western Blot) 분석, 전자분무-이온화 이온 포집 질량 분광분석법 등에 의해 확인될 수 있었다.
- [0559] 4℃의 붕입체 (IB) 완충액 I (pH 8.0의 50 mM 트리스; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% 트리톤(Triton) X-100; 4℃)에 10%의 최종 고체함량까지 혼합함으로써 세포 페이스트를 재현탁시켰다. 재현탁된 물질을 미세 유동화기를 통해 총 2회 통과시킴으로써 세포를 용해시키고, 그 후에 원심분리하고 (10,000 g; 15분; 4℃) 상청액을 따라내었다. 추가 부피의 IB 완충액 I (pH 8.0의 50 mM 트리스; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% 트리톤 X-100; 4℃)에 재현탁시켜 IB 펠렛을 세척하고, 재현탁된 물질을 미세 유동화기를 통해 총 2회 통과시킨 다음, 원심분리하고 (10,000 g; 15분; 4℃) 상청액을 따라내었다. IB 펠렛을 1배 부피의 완충액 II (pH 8.0의 50 mM 트리스; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁시키고, 이어서 원심분리하고 (10,000 g; 15분; 4℃) 상청액을 따라내었다. 그 후에 IB 펠렛을 1/2배 부피의 완충액 II (pH 8.0의 50 mM 트리스; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁시켰다. IB를 적절한 용기에 분취하여 넣은 다음, 원심분리하고 (10,000 g; 15분; 4℃) 상청액을 따라내었다. 붕입체를 가용화하였다 (이때가 추가 사용 시까지 -80℃에서 저장할 수 있는 시점임).
- [0560] 붕입체를 가용화 완충액 (pH 8.0의 20 mM 트리스; 8 M 우레아; 10 mM β-ME) 중에서 10-15 mg/mL의 최종 농도까지 가용화하고, 가용화된 IB를 실온에서 일정한 혼합 하에 1시간 동안 인큐베이션하였다. 불용성 물질을 여과 (0.45 μm PES 필터)에 의해 제거하고, 추가 가용화 완충액으로 희석시킴으로써 (단백질 농도가 높은 경우) 단백질 농도를 조정하였다 (항상 필수적인 것은 아님).
- [0561] pH 8.0; 4℃의 20 mM 트리스 중에서 0.5 mg/mL의 최종 단백질 농도까지 희석시킴으로써 리폴딩을 실행할 수 있었다. 18 내지 24시간 동안 4℃에서 리폴딩을 진행시켰다.
- [0562] 정제를 위해, 여과된 리폴딩 반응물을 0.45 μm PES 필터를 통해 통과시켰다. 완충액 A (pH 7.5의 20 mM 트리스)로 평형화된 Q HP 컬럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에 물질을 로딩하였다. 20CV → 100% 완충액 B

(pH 7.5의 20 mM 트리스; 250 mM NaCl)의 선형 구배로 비변형 또는 변형된 FGF-21을 용리시켰다. 용리된 분획을 폴딩하여 단량체 FGF-21을 생산할 수 있었다. Q HP 풀을 취하여 완충액을 pH 8.0의 20 mM 트리스; 2 M 우레아; 1 mM EDTA로 교환하였다. 50% 빙초산으로 pH를 4.0으로 낮추었다. 샘플을 4.0 ± 1.0 mg/mL로 농축시켰다. 샘플에 12:1 물 과량의 PEG와 1%의 최종 농도까지 pH 4.0의 아세트산 히드라지드를 첨가하였다. 샘플을 28°C에서 48-72시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, PEG 반응물에 50 mM의 최종 농도까지 트리스 염기를 첨가하고, RO 수로 10배 희석시켰다. 전도도는 <1 mS/cm인 것으로 확인되었고 pH는 8.0-9.0이었다. 완충액 A (pH 8.0의 20 mM 트리스)로 평형화된 소스(Source) 30Q 컬럼 (지이 헬스케어) 상에 물질을 로딩하였다. PEG-FGF-21을 20CV $\rightarrow$ 100% B (pH 8.0의 20 mM 트리스; 100 mM NaCl)의 선형 구배로 용리시켰다. PEG-FGF-21을 폴딩하고, 완충액을 pH 7.4의 20 mM 트리스; 150 mM NaCl로 교환하였다. PEG 물질을 1-2 mg/mL까지 농축시키고, 0.22 μ m PES 필터를 사용하여 여과 멸균시켰다. 물질을 4°C에서 저장하였다. 장기 저장을 위해, 급속 냉동시켜 -80°C에서 저장하였다.

[0563] 실시예 2

[0564] 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생산 방법

[0565] 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템을 사용하여, 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 변형된 FGF-21을 발현시킬 수 있었다. O-RS는 O-tRNA를 비-자연 코딩 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화하였다. 결국에는 번역 시스템이 코딩된 셀렉터 코돈에 대한 반응으로 비-자연 코딩 아미노산을 FGF-21에 삽입하였다. 적합한 O-RS 및 O-tRNA 서열은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO 2006/068802 (발명의 명칭: "아미노아실-tRNA 신테타제의 조성물 및 그의 용도") (E9; 서열식별번호: 15) 및 WO 2007/021297 (발명의 명칭: "tRNA의 조성물 및 그의 용도") (F13; 서열식별번호: 16)에 기재되어 있다. 예시 O-RS 및 O-tRNA 서열이 하기 표 2에 포함된다.

[0566] <표 2>

[0567] 예시 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열의 서열 식별자

서열식별번호 :17	엠펙. 잔나쉬이 mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
서열식별번호 :18	HLAD03; 최적화된 엠버 억제자 tRNA	tRNA
서열식별번호 :19	HL325A; 최적화된 AGGA 프레임시프트 억제자 tRNA	tRNA
서열식별번호 :20	p-아지도-L-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(6)	RS
서열식별번호 :21	p-벤조일-L-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-BpaRS(1)	RS
서열식별번호 :22	프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS	RS
서열식별번호 :23	프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS	RS
서열식별번호 :24	프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS	RS
서열식별번호 :25	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(1)	RS
서열식별번호 :26	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(3)	RS
서열식별번호 :27	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(4)	RS
서열식별번호 :28	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(2)	RS
서열식별번호 :29	p-아세트-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW1)	RS
서열식별번호 :30	p-아세트-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW5)	RS

[0568]

서열식별번호 :31	p-아세트-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW6)	RS
서열식별번호 :32	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (AzPheRS-5)	RS
서열식별번호 :33	p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (AzPheRS-6)	RS

[0569]

[0570]

<표 3>

[0571]

예시 FGF-21, 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열

SEQ ID #	서열 명칭
1	리더를 갖지 않는 FGF-21 (P-형태)의 아미노산 서열 HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
2	리더를 갖지 않고 His 태그부착된 FGF-21 (P-형태)의 아미노산 서열 MHHHHHHSGGHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
3	리더를 갖는 FGF-21 (P-형태)의 아미노산 서열 - 리더는 3 개의 류신을 가짐 ("209 개 아미노산 P-형태" 또는 "P-형태") MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
4	리더를 갖는 FGF-21 (P-형태)의 아미노산 서열 - 리더는 2 개의 류신을 가짐 MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
5	리더를 갖지 않는 FGF-21 (L-형태)의 아미노산 서열 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
6	리더를 갖는 FGF-21 (L-형태) 의 아미노산 서열 - 리더는 3 개의 류신을 가짐 (209 개 아미노산 L-형태) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly

[0572]

	Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
7	리더를 갖는 FGF-21 (L-형태)의 아미노산 서열 -리더는 2 개의 류신을 가짐 (208 개 아미노산 L-형태) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
8	리더를 갖지 않는 FGF-21 (P-형태)의 뉴클레오티드 서열 CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCA GCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATC AGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTC CTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGA CATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGTCCA CTTTGACCTTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATAC AATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACA AGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACT ACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAG CCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGG GCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCCTGA
9	리더를 갖지 않고 His 태그부착된 FGF-21 (P-형태)의 뉴클레오티드 서열 ATGCATCATCATCATCATCATAGCGGCGGCCACCCATCCCTGACTCCAGTCC TCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGAT GCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGG GCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGC CGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCG GCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGC TTCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCC ACGGCCTCCCGTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGC ACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCC CCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGG

[0573]

	ACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCCTGA
10	리더를 갖는 FGF-21 (P-형태)의 뉴클레오티드 서열 - 리더는 3 개의 류신을 가짐 ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCTGTGC TGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCTGACTCCAGT CCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACAGATG ATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGG GGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAA GCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAG CGGCCAGATGGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCA GCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGC CCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCT GCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCAC CCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTC GGACCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT TCCTGA
11	리더를 갖는 FGF-21 (P-형태)의 뉴클레오티드 서열 - 리더는 2 개의 류신을 가짐 ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCTGTGC TGGCTGGTCTTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCTGACTCCAGTCTC CTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATG CCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGG GCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCC GGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGG CCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTT CCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCAC GGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCTGCAC CCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCC GGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCCT GA
12	리더를 갖지 않는 FGF-21 (L-형태)의 뉴클레오티드 서열 CACCCCATCCCTGACTCCAGTCTCCTGCAATTCGGGGCCAAGTCCGGCAG CGGTACCTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCA GGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCC TGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGAC ATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCAC TTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACA ATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAA GTCCCCACACCGGGACCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTA CCAGGCCTGCCCCCGCACTCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGC CCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGG CCGAAGCCCAGCTACGCTTCCTGA
13	리더를 갖는 FGF-21 (L-형태)의 뉴클레오티드 서열 - 리더는 3 개의 류신을

[0574]

	가짐 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
14	리더를 갖는 FGF-21 (L-형태)의 뉴클레오티드 서열 - 리더는 2 개의 류신을 가짐 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
34	FGF-21 의 아미노산 서열 (라투스 노르베기쿠스 - ref[NP_570108.1][18543365]) Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
35	FGF-21 의 아미노산 서열 (무스 무스쿨루스 - ref[NP_064397.1][9910218])

[0575]

	Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
36	FGF-21 의 아미노산 서열 (다니오 레리오 -ref NP_001038789.1 113671792) Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr Lys Lys
37	클로토 베타의 아미노산 서열 (호모 사피엔스 -ref NP_783864.1 28376633) MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTGFSG DGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGGKGPSI WDHFIHTLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTV ANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDY ATYCFQMFGDRVKYWITIHPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNL IKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKQQSMVSVL GWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPFSEAEEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPL NTMAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILAEANGWFTDSRVKTEDTTAIYM MKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKE RKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQF SDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHY RFALDWASVLP TGNSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLG LPEPLLHADGWLNPNSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSG NDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSH WRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERR LLKGTVD FCA LNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPW GVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLI DKVRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCS QTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQH IPLKKGKRVS
38	클로토 베타의 아미노산 서열 (무스 무스쿨루스 -ref NP_112457.1 GI:13626032) MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSVLSAFVLLRAVTGFS GDGKAIWDDKKQYVSPVNPNSQLFLYDTFKNFSGWVGTFGAFQVEGSWKTDGRGP

[0576]

	SIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGT VAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPPLTLQEEYGGWKNATMIDL FNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTV GHNLIKAHASKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHS MSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIEFSEAEKEEVRGADFFAFSFGPNNF RPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIY MMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQ KERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSS PQFTDPHLYVWNVGTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVT HYQFALDWTSLPTGNLSKVNQRQVLRYYRCVVSEGLKLGVPMTLYHPTHSHL GLPLPLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVLKWLITINEPNRLSDMYNR TSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VSLSLHCDWAEPANPFVD SHWKA AERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRLSSSVLPRFTAKE SRLVKGTVDYFALNHFTTRFVIHKQLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVT PWGVRKLLAWIRRNRYRDRDIYITANGIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKAYL IDKVKIKGYYAFKLTEESKPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPAC GQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQ NIPLKKGHSRVFS
39	OmpA 뉴클레오티드 리더 서열 atgaaaaaaactgctatcgcgatcgctgtagctctggctggttcgacgtagctaacgct
40	OmpA 아미노산 리더 서열 M K K T A I A I A V A L A G F A T V A N A
41	MalE 뉴클레오티드 리더 서열 atgaaaataaaaaacaggtgcacgcatcctcgattatccgcattaacgacgatgatgtttccgcctcggtctcgcc
42	MalE 아미노산 리더 서열 M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A
43	StII 뉴클레오티드 리더 서열 atgaaaaagaatatcgctttcttcttgcatctatgttcggtttttctattgctacaaatgcctatgca
44	StII 아미노산 리더 서열 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A

[0577]

[0578]

변형된 FGF-21 유전자 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제/tRNA 쌍 (목적하는 비-자연 코딩 아미노산에 대하여 특이적임)을 함유하는 플라스미드에 의한 이. 콜라이의 형질전환은 비-자연 코딩 아미노산의 변형된 FGF-21 폴리펩티드로의 자리-특이적 혼입을 가능하게 한다.

[0579]

표준 프로토콜을 사용하여, 예를 들어 건강한 인간 간 폴리A+ mRNA (바이오체인(Biochain))로부터 유래된 cDNA 합성 반응으로부터 PCR에 의해 야생형 성숙 FGF-21을 증폭시키고 벡터, 예컨대 pET30 (예를 들어, NcoI-BamHI 절단 자리를 이용함)으로 클로닝하였다. 임의로 서열 확인 후에, FGF-21 (정제 태그, 예컨대 N-말단 HHHHHHSGG 서열을 포함할 수 있음)을 서브클로닝할 수 있었다. 예를 들어, FGF-21을 적합한 프로모터와 연결되어, 예를 들어 이. 콜라이 지단백질 프로모터 서열로부터 유래된 합성 프로모터의 구성적 조절 하에 있는 (Miller, J.H., Gene, 1986) 메타노코쿠스 잔나쉬이(*Methanococcus jannaschii*)의 앰버 억제자 티로실 tRNA^{Tyr/CUA} (*Mj* tRNA^{Tyr/CUA}) 뿐만 아니라, 이. 콜라이 GlnRS 프로모터의 조절 하에 있는 직교 티로실-tRNA-신테타제 (*Mj*TyrRS)를 함유하는 억제 벡터로 서브클로닝할 수 있었다. 비변형 또는 변형된 FGF-21의 발현은 T7 프로모터의 조절 하에 있을 수 있다. 앰버 돌연변이는 표준 급변 돌연변이 프로토콜 (스트라타진(Stratagene); 미국 캘리포니아주 라 호야 소재)을 사용하여 도입할 수 있었다. 구축물의 서열을 확인할 수 있었다.

[0580]

핵산 내의 2개의 별개의 자리에서 셀렉터 코돈을 도입함으로써, 2개의 별개의 비-자연 코딩 아미노산을 변형된

FGF-21 폴리펩티드에 도입할 수 있었다.

[0581] 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF) 억제

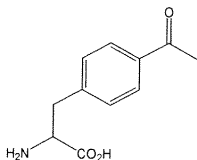
[0582] 변형된 FGF-21 발현 구축물, 및 O-tRNA 및 O-RS 발현 구축물 (동일하거나 또는 상이한 플라스미드에서 발생하거나, 또는 균주로 안정하게 형질감염되는 것일 수 있음)을 함유하는 플라스미드를, T7 폴리머라제의 발현이 아라비노스-유도성 프로모터의 조절 하에 있는 이. 콜라이 W3110 B2 균주로 형질전환시켰다. 밤새 배양한 박테리아 배양물을 2X YT 배양 배지를 함유하는 진탕 플라스크에서 1:100 희석시키고 약 0.8의 OD₆₀₀까지 37℃에서 성장시킬 수 있었다. 단백질 발현은 아라비노스 (최종 농도: 0.2%)와 4 mM의 최종 농도까지 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF)을 첨가함으로써 유도될 수 있었다. 배양물을 적합한 기간 및 온도로, 예를 들어 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션할 수 있었다. 세포를 펠렛화하고, B-PER 용해 완충액 (피어스) 100 ul/OD/ml + 10 ug/ml DNase에 재현탁시키고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션할 수 있었다. 세포 물질을 원심분리에 의해 제거할 수 있고 상청액을 제거할 수 있었다. 펠렛을 동일한 양의 SDS-PAGE 단백질 로딩 완충액에 재현탁시킬 수 있었다. 샘플을 MES 및 DTT가 함유된 4-12% PAGE 겔 상에 로딩할 수 있었다. FGF-21의 정제 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 정제는 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯팅 분석, 전자분무-이온화 이온 포집 질량 분광분석법에 의해 확인될 수 있었다.

[0583] His-태그부착 또는 비-His-태그부착 돌연변이체 FGF-21 단백질을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 정제할 수 있었다. 예를 들어, 프로본드(ProBond) 니켈-킬레이트화 수지 (인비트로젠 (Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼즈버드 소재)를 제조사에 의해 제공된 표준 His-태그부착 단백질 정제 절차를 통해 사용할 수 있었다.

[0584] 실시예 3

[0585] 카르보닐-함유 아미노산의 변형된 FGF-21 폴리펩티드로의 도입 및 아미노옥시-함유 PEG와의 후속 반응

[0586] 반감기 연장 모이어티와 연결된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 의 생성을 위해 하기 예시 방법을 사용할 수 있었다. 방법은 반감기 연장 모이어티, 예컨대 대략 30,000 Da의 분자량을 갖는 아미노옥시-함유 PEG와 후속적으로 반응하는 케톤-함유 비-자연 코딩 아미노산을 혼입하였다. FGF-21의 선택된 잔기를 하기 구조식을 갖는 비-자연 코딩 아미노산으로 치환하였다:



[0587]

[0588] p-아세틸-페닐알라닌의 FGF-21로의 자리-특이적 혼입을 위해 이용되는 서열은 서열식별번호: 1 (FGF-21), 서열식별번호: 16 또는 17 (muttRNA, 엠. 잔나쉬이 mtRNA^{Tyr}_{CUA}), 15, 29, 30 또는 31 (TyrRS LW1, 5, 또는 6), 또는 본원에 기재된 임의의 변형된 FGF-21 폴리펩티드일 수 있다.

[0589] 변형되면, 카르보닐-함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응시켰다:

[0590] R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

[0591] 상기 식에서, R은 메틸이고, n은 3이고, N은 선택된 분자량, 예를 들어 대략 30,000 Da이다.

[0592] 별법으로, 케톤-함유 비-자연 코딩 아미노산을 하기 구조식을 갖는 PEG 시약과 연결시킬 수 있었다:

[0593] R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-O-NH₂

[0594] 상기 식에서, R은 메틸이고, n은 4이고, N은 선택된 분자량, 예를 들어 대략 30,000 Da이다.

[0595] p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 변형된 FGF-21을 pH 6.0의 25 mM MES (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재), pH 7.0의 25 mM Hepes (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재), 또는 pH 4.5의 10 mM 소듐 아세테이트 (시그마 케미칼, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 중에서 10 mg/mL로 용해시켜, 10 내지 100배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시키고, 그 후에 실온에서 10 - 16시간 동안 교반하였다 (Jencks,

W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 후에, PEG-FGF-21을 즉각적인 정제 및 분석을 위해 적절한 완충액으로 희석시켰다.

[0596] 실시예 4

[0597] 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생산

[0598] 도 1a-b에 도시되어 있는, 각각의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 생산하였다. 폴리뉴클레오티드 서열에 DNA 코돈을 사용하는 것은 관련 기술분야에 공지되어 있는 표준 방법을 사용하는 이. 콜라이 발현에 대하여 최적화되었다 (서열식별번호: 317 및 318은 각각 화합물 2 및 PEG화된 화합물 2를 코딩하는 예시 폴리뉴클레오티드 서열임). 연결 펩티드가 존재한다면, 그의 코딩 서열을 표준 유전자 코드에 기반하여 선택하였고, 예를 들면 GGU, GGC, GGA, 또는 GGG는 글리신이 되고, UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, 또는 AGC는 세린이 되고, CAU 또는 CAC는 히스티딘이 되는 등의 방식이다. 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 이. 콜라이에서 발현시키고 정제하였다 (예시 방법이 본원에 기재되어 있음). 비-자연 코딩 아미노산으로서 파라-아세틸-페닐알라닌 (약어: pACF 또는 pAF)을 함유하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 생산하였다 (예시 방법이 실시예 2에서 제공됨). 간략하게 설명하면, pACF를 코딩하기 위해 폴리뉴클레오티드 서열 내의 상응하는 위치에 셀렉터 코돈이 혼입되도록 코딩 폴리뉴클레오티드를 추가로 변형시키고, 셀렉터 코돈이 선택된 위치에서의 pACF의 포함을 지시하도록 하기 위해 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)를 발현하도록 조작된 세포에서 발현시켰다. 그 후에, pACF를 약 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)과 연결시켰다 (예시 방법이 실시예 3에서 제공됨).

[0599] 화합물 2 코딩 서열 (서열식별번호: 317)

```

      M   H   P   I   P   D   S   S   P   L   L   Q   F   G   G   Q   V   R   Q
      R
1  ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA
      CGT
      Y   L   Y   T   D   D   A   Q   Q   T   E   A   H   L   E   I   R   E   D
      G
61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC
      GGG
      T   V   G   G   A   A   D   Q   S   P   E   S   L   L   Q   L   K   A   L
      K
121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG
      AAG
      P   G   V   I   Q   I   L   G   V   K   T   S   R   F   L   C   Q   R   P
      D
181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT
      GAC
      G   A   L   Y   G   S   L   H   F   D   P   E   A   C   S   F   R   E   L
      L
241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG
      CTG
      L   E   D   G   Y   N   V   Y   Q   S   E   A   H   G   L   P   L   H   L
      G
301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT CAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAC CTG
      GGT
      S   G   R   G   P   A   R   F   L   P   L   P   G   L   P   P   A   P   P
      E
361 TCT GGT CGT GGT CCG GCG CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT
      GAA
      P   P   G   I   L   A   P   Q   P   P   D   V   G   S   S   D   P   L   S
      M
421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG
      ATG
      V   E   P   S   Q   G   R   S   P   S   Y   A   S
481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA
    
```

[0600]

[0601] PEG화된 화합물 2 코딩 서열 (서열식별번호: 318)

```

      M   H   P   I   P   D   S   S   P   L   L   Q   F   G   G   Q   V   R   Q
      R
1  ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA
      CGT
      Y   L   Y   T   D   D   A   Q   Q   T   E   A   H   L   E   I   R   E   D
      G
61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC
      GGG
      T   V   G   G   A   A   D   Q   S   P   E   S   L   L   Q   L   K   A   L
      K

121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG
      AAG
      P   G   V   I   Q   I   L   G   V   K   T   S   R   F   L   C   Q   R   P
      D
181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT
      GAC
      G   A   L   Y   G   S   L   H   F   D   P   E   A   C   S   F   R   E   L
      L
241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG
      CTG
      L   E   D   G   Y   N   V   Y   pAF S   E   A   H   G   L   P   L   H   L
      G
301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT TAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAT CTG
      GGC
      S   G   R   G   P   A   R   F   L   P   L   P   G   L   P   P   A   P   P
      E
361 TCC GGC CGC GGT CCG GCC CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT
      GAA
      P   P   G   I   L   A   P   Q   P   P   D   V   G   S   S   D   P   L   S
      M
421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG
      ATG
      V   E   P   S   Q   G   R   S   P   S   Y   A   S
481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA

```

[0602]

[0603] 하기 실시예에 상세히 설명된 바와 같이, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 추가로 특징화되는데, 예를 들어 당뇨병 모델에서 시험관내 생물학적 활성, 안정성, 탈아미드화 및 응집체 형성의 경향, 생체내 단백질분해에 대한 저항성, 면역원성, 약동학, 및 생체내 생물학적 활성이 시험되었다.

[0604] 생산된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 의 전장 폴리펩티드 서열 (그의 부분 서열이 도 1a-b에 도시되어 있음)은 하기와 같다:

```

화합물 1
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:101)
화합물 2
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFL
PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:102)
화합물 3
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:103)
화합물 4
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:104)
화합물 5
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:105)
화합물 6
MHFIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVILGV

```

[0605]

KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:106)

화합물 7

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:107)

화합물 8

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLGSGARFLPLPGLPPAPPEP
PGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:108)

화합물 9

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:109)

화합물 10

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPP
EPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:110)

화합물 11

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLGSGHRDPAPRGPARFLPLP
GLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:111)

화합물 12

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:112)

화합물 13

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGKDSQDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:113)

화합물 14

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:114)

화합물 15

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGREPSYAS (SEQ ID NO:115)

화합물 16

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:116)

화합물 17

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVGSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:117)

화합물 18

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEP (SEQ ID NO:118)

화합물 19

MHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT₂EAHLEIREDGT₂VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPD₂GALY₂SLHFD₂PEACSFRELLLED₂GYNVYQSEAHGLPLHLGSGPHRDPAPRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDV₂GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:119)

[0606]

화합물 20

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGHRDPAPRGPARFLPLPG
LPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:120)

화합물 21

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGGRDPAPRGPARFLPLPG
LPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:121)

화합물 22

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGGPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:122)

화합물 23

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGGPAPRGPARFLPLPGLP
PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:123)

화합물 24

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGGRFLPLPGLPPAPPEPP
GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:124)

화합물 25

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPSGGRFLPLPGLPPAPPEPP
PGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:125)

화합물 26

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHSGGPAPRGPARFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:126)

화합물 27

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHSGGPAPRGPARFLPLPGLPP
PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:127)

화합물 28

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHGGRFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:128)

화합물 29

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHSGGRFLPLPGLPPAPPEPPGI
LAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:129)

화합물 30

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPHGGRFLPLPGLPPAPPEPPGI
LAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:130)

화합물 31

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGGGPAPRGPARFLPLPGLPP
EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVTPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:131)

화합물 32

MHHHHHMHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRG
PARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:132)

PEG화 화합물 1

MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV

[0607]

KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGNKSPhRDPAPRGP
ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGSPQGRSPSYAS (SEQ ID NO:201)
PEG화 화합물 2
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGRGPAPRFLPLPGL
PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:202)
PEG화 화합물 5
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGDKSRDPAPRGPAPR
FLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:205)
PEG화 화합물 6
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPGHKS RDPAPRGPAPR
FLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:206)
PEG화 화합물 10
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGGPAPRFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:210)
PEG화 화합물 11
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGHRDPAPRGPAPR
LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:211)
PEG화 화합물 12
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPAPR
FLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:212)
PEG화 화합물 19
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGPhRDPAPRGPAPR
FLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:219)
PEG화 화합물 20
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGGHRDPAPRGPAPRFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:220)
PEG화 화합물 21
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGRDPAPRGPAPRFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:221)
PEG화 화합물 22
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGSGGPAPRGPAPRFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:222)
PEG화 화합물 23
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY (pAF) SEAHGLPLHLGGGPAPRFLPLPGLP
APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:223)

[0608]

[0609]

또 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 융합 단백질로서 생산하였다. N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않는 화합물 2의 서열 (서열식별번호: 102)에 함유된 변형된 FGF-21 폴리펩티드 중 일부는 하나 이상의 융합 파트너, 예컨대 Fc 도메인 또는 그의 단편, PKE 어드벡틴 ("PKE), 또는 변형 또는 비변형된 인간 혈청 알부민 ("HSA") 서열 및 임의로 연결 펩티드와 융합되었다. 다른 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 화합물 1의 야생형 서열 (N-말단 메티오닌을 갖거나 또는 갖지 않음)에 기반하는 것이었다. 상이한 PKE 어드벡틴 서열 형태가 포함되었다. 이들은 "PKE(1)" 또는 "PKEI" 및 "PKE(2)" 또는 "PKEII"라 지칭되었다. PKE(1)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0610]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWHSYEQNSYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYPISINRYTEIEKPSQ (서열식별번호: 319).

[0611]

PKE(2)의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0612]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINRYTP (서열식별번호: 320).

[0613]

PKE(1) 또는 PKE(2)가 융합 단백질의 N-말단에 포함되는 경우에, 이. 콜라이에서 발현되는 서열은 N-말단 메티오닌을 포함하였고, 이것은 이. 콜라이에서 발현될 때 met-엑소펩티다제에 의해 절단되어, N-말단 메티오닌을 갖지 않는 성숙 서열을 생성할 것이라 예상되었고; N-말단 메티오닌을 갖지 않는 PKE 융합 단백질의 예상되는 성숙 형태가 하기 목록에 나타나 있다.

[0614]

일부 융합 단백질에 함유된 인간 혈청 알부민 서열은 HuSA(C34A)였다. 그의 아미노산 서열은 하기와 같다:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQYLLQAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKQKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE
GKKLVAAASQAALGL (SEQ ID NO:321)

[0615]

[0616]

일부 융합 단백질에 함유된 또 다른 인간 혈청 알부민 서열은 HSA (C34A, des Leu-585)였다. 그의 아미노산 서열은 하기와 같다:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQYLLQAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKQKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE
GKKLVAAASQAALG (SEQ ID NO:322)

[0617]

[0618]

G4Sx3은 서열 GGGGS가 3회 반복된 것, 즉 GGGSGGGSGGGGS를 나타낸다.

[0619]

예시 융합 단백질은 1개 초과인 변형된 FGF-21 폴리펩티드, 예를 들어 화합물 141-146을 함유하였다.

[0620] 융합 단백질 화합물의 서열이 하기에 나타나 있고, 이들 융합 단백질의 특징은 도 40a-c에 요약되어 있다.

화합물 101: PKE(2)-L1-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ
QTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:401)

화합물 102: PKE(2)-L2-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTD
DAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFD
PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD
PLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:402)

화합물 103: PKE(2)-L3-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPEEEEDEEEDHPIPDSSPLLQFGGQVRQR
YLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY
GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPP
DVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:403)

화합물 104: PKE(2)-L4-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQR
LYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS
LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:404)

화합물 105: PKE(2)-L5-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGSHHHHHHHHSHPIPDSSPLLQFGGQVR
QRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
LYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ

[0621]

PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:405)

화합물 106: PKE(2)-L6-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGG
QVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRP
DGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:406)

화합물 107: PKE(2)-L7-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGG
QVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRP
DGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:407)

화합물 108: PKE(2)-L8-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGGSGSGSGSGSGSGSHPIPDSSPLLQFGG
QVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRP
DGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:408)

화합물 109: PKE(2)-L9-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSTPPTSPSHPIPDSSPLLQFGG
QVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRP
DGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGIL
APQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:409)

화합물 110: PKE(2)-L10-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPHIPDS
SPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKT
SRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPP
APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:410)

화합물 111: PKE(2)-L11-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPI
PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL

PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:411)

화합물 112: PKE(2)-L12-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPI
PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:412)

화합물 113: PKE(2)-L13-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTP
SPSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV
IQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPF
LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:413)

화합물 114: PKE(2)-L14-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDD
AQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGLHFD
EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD
PLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:414)

화합물 115: PKE(2)-L15-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQF
GGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
RPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPP
GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:415)

화합물 116: PKE(2)-L16-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSP
EPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL
KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRG
PARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:416)

화합물 117: PKE(2)-L17-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTSGGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQF
GGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
RPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPP

GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:417)

화합물 118: PKE(2)-L18-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPGGGSPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQV
RQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDG
ALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
QPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:418)

화합물 119: PKE(2)-L19-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPEEEDPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVR
QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
LYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:419)

화합물 120: PKE(2)-L20-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPHPIPDSSP
LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR
FLCQRPDGAALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAP
PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:420)

화합물 121: PKE(2)-L21-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSP
EPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDGAALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:421)

화합물 122: PKE(2)-L22-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSEPPTPEPPS
PEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV
IQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPF
LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:422)

화합물 123: PKE(2)-L23-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEPHPIPDS
SPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKT
SRFLCQRPDGAALYGLSHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPP

[0624]

APPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:423)

화합물 124: HuSA(C34A)-L201-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE
GKKLVAAASQAALGLGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQS
PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHG
LPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID
NO:424)

화합물 125: HuSA(C34A)-L202-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE
GKKLVAAASQAALGLGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS
EAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ
ID NO:425)

화합물 126: HuSA(C34A)-L203-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL

[0625]

VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGLGETGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAA
DQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ
ID NO:426)

화합물 127: HuSA(C34A)-L204-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLEDGYN
VYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYA
S (SEQ ID NO:427)

화합물 128: HuSA(C34A)-L205-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLEDGYN
VYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYA
S (SEQ ID NO:428)

화합물 129: HuSA(C34A)-L206-FGF21 (화합물 2)

[0626]

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFYLLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQATLVELVHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKADDKETCFEAE
GKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGSGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLE
IREDTGVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGSFHDFPEACSFRELL
EDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQER
SPSYAS (SEQ ID NO:429)

화합물 130: HuSA(C34A)-L207-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFYLLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQATLVELVHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKADDKETCFEAE
GKKLVAASQAALGLGETGSGEGTGSGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTGVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGSFHDFPEACSFRELL
EDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQER
SPSYAS (SEQ ID NO:430)

화합물 131: HuSA(C34A)-L208-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFYLLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT

[0627]

FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACS
FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:431)

화합물 132: HuSA(C34A)-L209-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKCSALQKQGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTGSTGSGAGESHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACSF
RELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVE
PSQERSPSYAS (SEQ ID NO:432)

화합물 133: HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKCSALQKQGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEE
GKKLVAASQAALGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTGVGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQER
SPSYAS (SEQ ID NO:434)

화합물 134: HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21 (화합물 2)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTA

[0628]

FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE
GKKLV AASQAALGGETGSSGEGTGSTGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT EAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERS
PSYAS (SEQ ID NO:435)

화합물 135: HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21 (화합물 1)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE
GKKLV AASQAALGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT EAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDP EACSFRELLL
EDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:436)

화합물 136: HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21 (화합물 1)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGK
ASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK
NYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAK
RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE
GKKLV AASQAALGGETGSSGEGTGSTGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT EAHLEIR

[0629]

EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGYSLHFDPEACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:437)

화합물 137: FGF21 (화합물 2)-L205-HuSA(C34A)-

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGKTSRFLCQRPDGYSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTDAHKSEVAHRFKDL
GEENFKALVLIIFAQYLQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA
TLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCAASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ
DSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFE
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQ
LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK
QTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
(SEQ ID NO:440)

화합물 138: FGF21 (화합물 2)-L209-HuSA(C34A)-

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGKTSRFLCQRPDGYSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHK
SEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAK
QRLKCAASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR
DLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT
LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGL (SEQ ID NO:441)

화합물 139: FGF21 (화합물 2)-L210-HuSA(C34A)-

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGKTSRFLCQRPDGYSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARGFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGES
GEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADES

[0630]

AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVD
 VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL
 RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHG
 DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
 DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFD
 EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCK
 HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN
 AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKET
 CFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:442)

화합물 140: FGF21 (화합물 1)-L209-HuSA(C34A)-

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
 LGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPhRDP
 PRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGS
 GAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADES
 AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVD
 VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL
 RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHG
 DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
 DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFD
 EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCK
 HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN
 AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKET
 CFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:443)

화합물 141: FGF21 (화합물 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (화합물 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
 LGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
 PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHK
 SEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT
 LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAK
 QRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDR
 ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
 DVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFD
 EFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCA
 EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT

[0631]

LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFEEGKKLVA
ASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDDGT
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNV
YQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS
(SEQ ID NO:446)

화합물 142: FGF21 (화합물 1)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (화합물 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDQALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA
PRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGS
GAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQYLLQAPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADES
AENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRLVRPEVD
VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDEL
RDEGKASSAKQRLKQKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCK
HPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN
AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET
CFEEGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGSLLHFDPEACS
FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:447)

화합물 143: FGF21 (화합물 2)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-

FGF21 (화합물 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDQALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHK
SEVAHRFKDLGEENFKALVLIQYLLQAPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADES AENCDSLHT
LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAK
QRLKQKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDR
ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNL
KQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT

[0632]

LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGGGGSGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS�HFDPEACSFRELLLEDGYNV
YQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS
(SEQ ID NO:448)

화합물 144: FGF21 (화합물 1)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-

FGF21 (화합물 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGKTSRFLCQRPDQALYGS�HFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA
PRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGS
GAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFQYLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVD
VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL
RDEGKASSAKQRLKQSLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCK
HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN
AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKET
CFAEEGKKLVAASQAALGGGGSGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTE
AHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS�HFDPEACSF
RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA PRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
SSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:449)

화합물 145: FGF21 (화합물 2)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (화합물 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGKTSRFLCQRPDQALYGS�HFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGES
GEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFQYLQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVD
VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL
RDEGKASSAKQRLKQSLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHG
DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCK
HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFN

[0633]

AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET
CFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACS
FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:450)

화합물 146: FGF21 (화합물 1)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (화합물 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA
PRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGS
GAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQAPFEDHVKLVNEVTEF
AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPPL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAA
CLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT
KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADP
HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL
GKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV
DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEK
CCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRY
LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS
LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA PRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPG
ILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:451)

화합물 147: PKE(1)-L1-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYQEYNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
GVDYTITVYAVYGSKYYPISINRYTEIEKPSQGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA
HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSF
RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQGRSPSYAS (SEQ ID NO:452)

화합물 148: PKE(1)-L2-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYQEYNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
GVDYTITVYAVYGSKYYPISINRYTEIEKPSQGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ
QTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:453)

화합물 149: PKE(1)-L3-FGF21 (화합물 2)

[0634]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQEEEEDEEEDHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYT
 DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFD
 DPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSS
 DPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:454)

화합물 150: PKE(1)-L4-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPPEPTPEPHIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTD
 DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFD
 PEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD
 PLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:455)

화합물 151: PKE(1)-L5-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSHHHHHHHHSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRY
 LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS
 LHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
 GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:456)

화합물 152: PKE(1)-L6-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVR
 QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 LYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
 PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:457)

화합물 153: PKE(1)-L7-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVR
 QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 LYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
 PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:458)

화합물 154: PKE(1)-L8-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSGSGSGSGSGSGSHPIPDSSPLLQFGGQVR
 QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 LYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
 PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:459)

화합물 155: PKE(1)-L9-FGF21 (화합물 2)

[0635]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTPSPSTPPTPSPSHPIPDSSPLLQFGGQVR
 QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 LYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
 PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:460)

화합물 156: PKE(1)-L10-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPHPIPDSSPLL
 QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFL
 CQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPE
 PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:461)

화합물 157: PKE(1)-L11-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSS
 PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS
 RFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPA
 PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:462)

화합물 158: PKE(1)-L12-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPPTPEPPSEPPTPEPPSEPPTPEPHPIPDSS
 PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS
 RFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPA
 PPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:463)

화합물 159: PKE(1)-L13-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSH
 PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
 GVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLP
 GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:464)

화합물 160: PKE(1)-L14-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
 TEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEAC
 SFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM
 VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:465)

화합물 161: PKE(1)-L15-FGF21 (화합물 2)

[0636]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPPTPEPPSEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQV
 RQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQ
 ALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
 QPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:466)

화합물 162: PKE(1)-L16-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPPTPEPPSEPPTPEPPSEPPTPEPPSEPPT
 PEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV
 IQILGVKTSRFLCQRPDQALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPF
 LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:467)

화합물 163: PKE(1)-L17-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSEPPTPEPPSEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQV
 RQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQ
 ALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
 QPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:468)

화합물 164: PKE(1)-L18-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPGGSTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRY
 LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS
 LLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
 GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:469)

화합물 165: PKE(1)-L19-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPEEDPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRY
 LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGS
 LLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
 GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:470)

화합물 166: PKE(1)-L20-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
 GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQSPSEPPTPEPEEDPSSEPPTPEPHPIPDSSPLLQF
 GGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
 RPDQALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPP
 GILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:471)

화합물 167: PKE(1)-L21-FGF21 (화합물 2)

[0637]

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPTPEPEEEDPSPEPTPEPPSPEPHPI
PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV
KTSRFLCQRPDQALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
PPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:472)

화합물 168: PKE(1)-L22-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPTPEPGGGGSPSPEPTPEPPSPEPH
PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
GVKTSRFLCQRPDQALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLP
GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:473)

화합물 169: PKE(1)-L23-FGF21 (화합물 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTATISGLKP
GVDYTITVYAVYGSKYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPSPEPTPEPSPEPTPEPHPIPDSSPLLQ
FGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLC
QRPDQALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEP
PGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:474)

화합물 170 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L7-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGHP
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDQALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPGL
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:475)

화합물 171 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L250-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGSG
GGSGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL
LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:476)

화합물 172 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L12-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPSPEPTPEPPSPEPTPEP
 PSPEPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLK
 ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSG
 RGPAPFLPLPLGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:477)

화합물 173 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L251-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPSPEPTPEPPSPEPHPIPD
 SSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK
 TSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPLP
 PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:478)

화합물 174 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L5-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSHHHHHHHHSHPIPD
 SSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK
 TSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPLP
 PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:479)

화합물 175 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L252-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKELQLEESAAEAQEGELEH
 PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
 GVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLP
 GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:480)

화합물 176 [Fc(hIgG1a₁₉₀)-L253-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSGGGGSGGGSGGGGGSH
 PIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL

[0639]

GVKTSRFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLP
GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:481)

화합물 177 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L6-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSH
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLP
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:482)

화합물 178 [Fc(hIgG1a₁₈₉)-L6-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSH
SPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLP
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:483)

화합물 179 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L7-FGF21-1aa(C-말단 아미노산이 결실된 화합물
2)]

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSH
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLP
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYA (SEQ ID NO:484)

화합물 180 [Fc(hIgG1a₁₉₁)-L7-FGF21-3aa(3개의 C-말단 아미노산이 결실된
화합물 2)]

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSH
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPD GALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLP
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS (SEQ ID NO:485)

[0640]

화합물 181 [Fc(hlgG1f_1.1_186)-L7-FGF21 (화합물 2)]

EPKSSDKTHTCPPCAPEAEGAPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGG
GSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:486)

화합물 182 [Fc(hlgG1a_191b)-L7-FGF21(화합물 2)]

DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGSH
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAPFLPLPG
LPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:487)

[0641]

[0642]

실시예 5

[0643]

FGF-21 결실 분자의 시험관내 효능

[0644]

이 실시예에서는, 다수의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 의 효능을 세포-기반 시험관내 수용체 활성화 분석법으로 시험하여 PEG화된 화합물 1의 효능과 비교하였다. PEG화된 화합물 2를 비롯하여, 다수의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 가 PEG화된 화합물 1과 유사한 효능을 갖는 것으로 확인되었다.

[0645]

방법

[0646]

1차 시험관내 분석법으로 FGF21 변이체를 특징화하기 위해, 인간 β -클로토를 안정하게 발현하는 클로날 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포주를 생산하였다. HEK-293 세포를 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠) 형 질감염 시약에 대한 제조사의 프로토콜에 따라, C-말단 FLAG 태그 (1레터 아미노산 코드로 N-DYKDDDDK-C)를 갖는 인간 β -클로토를 코딩하는 선형 플라스미드를 사용하여 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 프로모터의 조절 하에 형질감염시켰다. 선택 배지 [4.5 g/l의 D-글루코스 함유 L-글루타민, Hepes (인비트로젠) 및 10% 소 태아 혈청 (FBS)이 포함된 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) 중의 600 μ g /mL의 제네티신 (인비트로젠)]에서 14일간 성장시킨 후 양성 클론을 단리시켰다.

[0647]

1차 분석법은 인간 β -클로토를 안정하게 발현하는 클로날 HEK-293 세포주에서의 세포외 신호-조절 키나제 1/2 (pERK1/2)의 FGF21 변이체-의존성 포스포릴화를 측정하였다. 분석을 위해, 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트 (팔콘(Falcon))에서 40,000개 세포/웰로 200 μ L의 선택 배지 중에 시딩하고, 37°C의 가습된 5% CO₂ 분위기에서 유지하였다. 48시간 후에, 전체 선택 배지를 무혈청 배지 (4.5 g/l의 D-글루코스 및 0.1% 무지방산 소 혈청 알 부민이 포함된 DMEM)로 대체하고, 세포를 6시간 동안 37°C의 가습된 5% CO₂ 분위기에서 유지하였다. 시험할 화 합물을 무혈청 배지로 연속 희석시켰다. 세포 상의 무혈청 배지를 희석된 화합물로 대체함으로써 분석을 개시 하고, 7분 동안 실온에서 인큐베이션을 진행하였고, 화합물을 제거하여 각각의 웰에 100 μ L의 용해 완충액 (퍼 킨 엘머 알파스크린 키트)을 첨가함으로써 반응이 종결되었다. 플레이트를 실온에서 대략 10분 동안 약 80 rpm 으로 진탕시키고 -80°C에서 냉동 저장하였다. 해동된 세포 용해물의 각각의 웰로부터의 분취물 (4 μ L)을 슈어 파이어(Surefire) 알파스크린 pERK1/2 키트 및 알파스크린 IgG 검출 키트, 단백질 A (퍼킨 엘머)에 대한 제조사 의 프로토콜에 따라 384 웰 화이트 프로크시플레이트(Proxiplate) (퍼킨 엘머)를 사용하여 pERK1/2에 대하여 분석 하였다. 플레이트를 실온의 암실에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음, 엔비전(Envision) 2103 멀티플레이트 판 독기 (퍼킨 엘머)로 알파스크린 프로토콜에 따라 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 5 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀분석에 의해 4 파라미터 log(효능제) vs. 반응 방정식에 맞춤처리하였다.

[0648]

결과

[0649]

인간 β -클로토가 안정하게 도입되어 내생 발현된 FGFR 스플라이스 변이체와 보조-수용체로서 기능하는 인간 배 아 신장 (HEK) 293 세포주에서의 세포외 신호-조절 키나제 (ERK) 1/2의 FGF21-의존성 포스포릴화를 측정함으로 써 시험관내 효능을 결정하였다. 각각의 시험 화합물에 대하여 평균 EC₅₀ 또는 pEC₅₀ (리터 당 몰 단위로 표시

되는 EC₅₀ 농도의 10 log의 음의 값) 값을 결정함으로써 효능이 평가되었다. PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2에 대한 예시 용량-반응 곡선이 도 2에 도시되어 있다. 추가의 시험 화합물에 대한 결과가 표 4 및 5에 나타나 있다.

<표 4>

pERK 분석법에서의 변형된 FGF-21의 시험관내 활성에 대한 EC50 값.

화합물 명칭	pERK EC50 (nM) n=3
PEG 화 화합물 1	6.7
화합물 2	4.6
화합물 3	28
화합물 5	69.2
화합물 6	39.1
화합물 7	28.4
화합물 10	21.9
화합물 11	28.2
화합물 12	31.9
화합물 19	5.1
화합물 20	3.9
화합물 22	4.1
화합물 23	30

<표 5>

pERK 분석법에서의 변형된 FGF-21의 시험관내 활성에 대한 EC50 값.

화합물 명칭	EC50 (nM)
PEG 화 화합물 1	14
PEG 화 화합물 2	28
PEG 화 화합물 5	24
PEG 화 화합물 6	20
PEG 화 화합물 10	28
PEG 화 화합물 11	30
PEG 화 화합물 12	39
PEG 화 화합물 19	30
PEG 화 화합물 20	42
PEG 화 화합물 21	30
PEG 화 화합물 22	36
화합물 32 (비-PEG 화 대조군)	8

실시예 6

변형된 FGF-21 폴리펩티드의 열 안정성 시험

이 실시예에서는, 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 열 안정성을 열 주사 형광법 (TSF) 및 시차 주사 열량측정법 (DSC)을 사용하여 측정하였다. 열 안정성은 문헌에서 응집체를 형성하는 경향을 결정하기 위한 예측값을 갖는 것으로 알려졌다 (예를 들어, 문헌 [Webster, "Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins," Pharmaceutical Technology, Volume 37, Issue 11, pp. 42-48, Nov 2, 2013] 참조).

방법

변성의 열 중간점을 마이크로칼(MicroCal) (말vern 인스트루먼트(Malvern Instruments)) 오토 VP-DSC로 시차 주사 열량측정법에 의해 측정하였다. DSC 분석을 위해, 단백질 샘플을 pH 7.0의 250 mM 수크로스, 20 mM 히스티딘 중에서 대략 2 mg/mL가 되도록 시간 당 90℃의 주사율로 제제화하였다. 기준 세포를 단백질이 없는 동일한

완충액으로 충전하였다. 적용된 용액 조건 및 주사율 하에 폴링된 단백질 도메인과 열적으로 풀린 단백질 도메인 사이의 상 변화에 관한 전이 중간점 (T_m)이 온도기록도 추적 (화살표)에서 확인되는 최대 피크로부터 결정되었다.

[0661] 열 주사 형광법 (TSF)을 위해, 단백질을 관심 완충액으로 0.2 mg/mL까지 희석시키고, 소량의 형광성 형광단 아닐리노나프탈렌 술폰산 (ANS)을 첨가하였다. 샘플을 96 웰 PCR 박막 플레이트에 위치시키고, 샘플의 형광을 바이오-라드(Bio-Rad) CT1000-RT PCR 기구에서 모니터링하는 동안, 외재성 형광단의 존재 하에 단백질 샘플의 온도는 증가하였다. 단백질의 열에 의한 폴링 중간점은 열 변성 단백질의 새로 노출된 소수성 코어와 상호작용할수록 프로브의 형광 신호에서의 증가를 모니터링함으로써 결정되었다. 조사하는 완충액 및 주사율 조건 하의 폴링 중간점 온도 (T_m)는 형광 신호 상승 곡선의 온도 변곡점으로서 정의된다.

[0662] 결과

[0663] 대표 DSC 주사 결과가 도 3에 도시되어 있다. PEG화된 화합물 2는 PEG화된 화합물 1보다 대략 8°C 더 높은 전이 중간점 (" T_m ") 온도를 갖는 것으로 관찰되었다. 열 가역성은 >95%였다 (데이터 도시되지 않음).

[0664] 도 4는 TSF의 대표 결과를 도시한다. 화합물 10은 화합물 1 (야생형 FGF-21 서열을 가지나, 단 N-말단 메티오닌이 이. 콜라이에에서의 발현을 위해 포함되었음)보다 대략 8°C 증가한 T_m 을 나타냈다. 추가 화합물에 대한 결과가 하기 표 6에 나타나 있다.

[0665] 이러한 결과를 종합하면, 예시 화합물이, 예를 들어 화합물 2, 10 및 16의 경우에 응집체를 형성하는 경향이 감소할 것이라고 타당하게 예상될 것임을 시사한다. 응집체를 형성하는 경향이 감소한 것은 연장된 저장 수명 및 /또는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 제공할 것이라고 예상된다.

[0666] <표 6>

[0667] 화합물 1과 비교하여 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대하여 열 주사 형광법에 의해 결정된 열 안정성 결과. 증가한 열 안정성이 일부 화합물의 경우에 대략 7-8°C 이하에서 관찰되었음.

화합물	T_m (°C)	화합물 1 과의 차이
화합물 1	46.63	0
화합물 2	53.2	6.57
화합물 3	46.92	0.29
화합물 5	47.46	0.83
화합물 6	43.2	-3.43
화합물 7	42.78	-3.85
화합물 10	54.5	7.87
화합물 11	43.9	-2.73
화합물 12	45.4	-1.23
화합물 14	42.97	-3.66
화합물 16	50.8	4.17
화합물 18	47.96	1.33

[0668]

[0669] 실시예 7

[0670] 탈아미드화 및 응집체 형성

[0671] 이 실시예는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 탈아미드화 및 응집체 형성에 대한 평가를 기재한다.

[0672] 방법

- [0673] 열 응력 시험:
- [0674] 관심 단백질 샘플을 시험 완충액 (250 mM 수크로스, 20 mM 히스티딘, pH 6.5 및 pH 7, 또는 20 mM 트리스 pH 7.5)으로 7.5 mg의 단백질/mL의 농도가 되도록 제조하였다. 샘플을 분석용 크기 배제 크로마토그래피 (aSEC) 및 영상화 모세관 등전점 측정 (icIEF)에 의한 전하 변이 분석에 의해 시간 = 0에서 조사하였다. 그 후에, 샘플을 인큐베이터에 25℃에서 1주 동안, 이어서 40℃에서 5주 동안 두어 응력 시험하였다. 분취물을 수집하여, 그 후의 4 내지 5주에 걸쳐서 다양한 시점에서 icIEF 및 aSEC에 의해 조사하고, 안정성을 모니터링하기 위해 aSEC 및 icIEF에 의해 추가로 조사하였다.
- [0675] aSEC
- [0676] 크기 배제 크로마토그래피 (aSEC)를 아길런트(Agilent) 1100 HPLC 시스템 (아길런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재)을 사용하여 300 x 4.6 mm의 치수를 갖는 제닉스(Zenix)-C 300 SEC 컬럼 (세팍스 테크놀로지스(Sepax Technologies), 미국 델라웨어주 뉴워크 소재) 상에서 수행하였다. 사용되는 이동상은 pH 6.9로 조정된 200 mM 포타슘 포스페이트 및 150 mM 소듐 클로라이드이고, 유량은 0.35 mL/분이었다. 대략 20 μ g의 샘플을 각각의 분석을 위해 주입하였다. UV 280 nm에서 분리를 모니터링하였다. 각각의 화학종에 상응하는 체류 시간에서의 곡선 아래 면적을 적분하여 단량체 vs HMW 화학종의 정량화를 수행하였다.
- [0677] icIEF
- [0678] 탈아미드화는 영상화 모세관 등전점 측정법 (icIEF)에 의해 수행되는 전하 변이 분석 (탈아미드화는 단백질의 순 음전하와 산성 변이체의 형성을 증가시킴)에 의해 검출되고, 이는 100 μ m x 50 mm의 플루오로카본 코팅 모세관을 사용하는 iCE280 기구 (프로틴심플(ProteinSimple), 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재)에서 수행하였다. 샘플을 0.35% 메틸 셀룰로스, 4% pH 3-10 파르말리트(Pharmalyte), 4 M 우레아, 및 2% pI 마커를 함유하는 용액을 사용하여 0.3 mg/mL까지 희석시켰다. 양극액과 음극액은 각각 0.08 M 인산 및 0.1 M 소듐 히드록시드였다. 2분 동안 1.5 kV를 인가한 다음, 11분 동안 3.0 kV를 인가함으로써 포커싱을 달성하였다. 상응하는 곡선 아래 면적의 적분에 의해 모 화학종과 비교하여 (-) 전하 변형 화학종의 정량화를 수행하였다.
- [0679] 결과
- [0680] PEG화된 화합물 2의 생물물리학적 특성은 PEG화된 화합물 1보다 우수성이 입증되었다. PEG화된 화합물 1과 비교하여, 2-8℃에서의 5주간에 걸쳐서는 열화가 관찰되지 않았고, 이와 함께 40℃ 조건에서의 가속시에도 낮은 열화율이 관찰되었다 (도 5). 8주 가속 연구는, 시험 제제 (히스티딘/수크로스 pH 7.0) 중에서 PEG화된 화합물 2가 PEG화된 화합물 1보다 우수함을 시사하였다. 이러한 부형제 조건 하에, 탈아미드화는 제거되고 PEG화된 화합물 2의 가용성 고분자량 (HMW) 응집체를 형성하는 경향이 감소하였다. 이러한 결과는, PEG화된 화합물 2가 PEG화된 화합물 1에 비해 감소한 응집 경향을 가지면서 보다 넓은 pH 창 의 제제화 옵션을 갖는다는 것을 시사한다.
- [0681] HMW 응집체 형성을 또한 평가하였다. 주어진 농도에서 HMW 응집체 형성이 감소할수록 보다 높은 용해도를 나타내고, 이는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 유도할 것이다. 도 6은 다수의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 화합물 1에 대한 HMW 응집체 형성을 도해한다. 대부분의 시험 화합물의 경우에, 응집체 형성이 PEG화된 화합물 1보다 감소하였다 (예를 들어, PEG화된 화합물 2 및 PEG화된 화합물 10). 소수의 화합물은, HMW 응집체 형성이 PEG화된 화합물 1과 유사하거나 또는 그 보다 높았다.
- [0682] 탈아미드화를 또한 평가하였다. 도 7은 다수의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 PEG화된 화합물 1에 대한 탈아미드화의 검출 수준 (시간에 따른 산성 변이체의 형성에 의해 지시됨)을 도해한다. 확인된 모든 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대하여, 탈아미드화의 검출 수준이 PEG화된 화합물 1보다 감소하였다.
- [0683] 실시예 8
- [0684] 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도 평가
- [0685] 이 실시예는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상대 용해도의 측정을 기재한다. 결과는 상대적으로 보다 고농도로 제제화되는 화합물의 능력을 시사하고, 이러한 능력은 유효 투여량의 보다 용이한 투여를 가능하게 할 것이다.
- [0686] 방법
- [0687] 순차적인 플러그 유동 농축 사이클 후에 이어지는 크기 배제 크로마토그래피 분석에 의해 상대 용해도 평가를

수행하였다. pH 7.2의 PBS로 유사하지만, 동일하지는 않는 출발 농도로 제제화된 샘플을 3 kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기에 피펫팅하여 넣고, 4,750 RPM으로 10분, 15분 및 30분 사이클로 4℃에서 회전시켰다. 회전 사이클 사이에, 분취물을 농축 장치로부터 제거하고 분석용 크기 배제 크로마토그래피 분석 (aSEC) (pH 7.2의 PBS 완충액으로 평형화된 지이 헬스케어 슈퍼덱스(Superdex) S-75 10/300 GL 컬럼)을 수행하여 용액 중의 HMW 및 단량체 화학종의 농도를 결정하였다.

[0688] 나노드롭(NanoDrop) 분광광도계에 의한 280 nm에서의 흡광도로 총 농도를 결정하였다. SEC 크로마토그램 추적에서 단량체 피크와 비교하여 고분자량 피크의 곡선 아래 면적을 계산함으로써 고분자량의 wt%를 결정하였다. 그에 따른 데이터 포인트를 플롯팅하여 시험 조건 하에 구축물의 가용성이 가능 작은 것부터 가장 큰 것까지의 순위를 시각화하고, 데이터 포인트에 의해 만들어진 기울기가 작을수록 시험 조건 하에서 단백질 변이체가 더욱 안정하다.

[0689] 결과

[0690] 단백질 농도의 함수로서 고분자량 (HMW) 응집체의 형성을 측정함으로써 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상대 용해도를 결정하였다. 주어진 농도에서 HMW 응집체 형성이 감소할수록 보다 높은 용해도를 나타내고, 이는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 유도할 것이다.

[0691] 시험 화합물에 대한 플러그 유동 용해도 곡선의 기울기가 하기 표 7에 나타나 있다 (낮은 값은 응집체 형성이 감소하였음을 나타내고, 따라서 보다 고농도로 제제화되는 능력을 시사함). 대다수의 화합물 (예를 들어, 화합물 2 및 화합물 10)에 대하여 상대적으로 낮은 응집체 형성 수준이 관찰되었고, 이는 감소한 응집체 형성 및 증가한 용해도를 시사한다 (도 8 및 표 7). 최고 플러그 유동 용해도 기울기는 화합물 1에서 관찰되었다.

[0692] <표 7>

[0693] 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 대한 플러그 유동 용해도 결과.

화합물	플러그 유동 용해도 기울기
화합물 1	1.863
화합물 2	0.3171
화합물 3	1.2219
화합물 5	0.8548
화합물 6	1.1353
화합물 7	1.4318
화합물 10	0.3647
화합물 11	1.1156
화합물 12	1.0317
화합물 19	0.9743
화합물 20	1.1545
화합물 22	0.1997
화합물 23	0.771

[0694]

[0695] 실시예 9

[0696] FGF-21 결실 분자의 면역원성 시험

[0697] T-세포 활성화 반응 연구를 수행하였고, 이는 대부분의 화합물에 사용된 단백질 서열이 PEG화된 화합물 1에 사용된 단백질 서열에 대한 것과 대등한 반응을 제공하였다는 것을 나타낸다.

[0698] 방법

- [0699] CD4+ T 세포 증식 분석법에 의해 면역원성을 평가하였다. 다양한 집합의 인간 혈액 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 피콜 구배(Ficoll gradient)를 이용하여 분리시켰다. 공여자는 인간 집합에 존재하는 MHC 클래스 II 대립유전자에 있어서의 다양성 커버리지를 보장하기 위해 HLA 유형이었다. 표지 후에, 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)를 갖는 PBMC를 96 웰 포맷에 200,000개 세포/웰이 되도록 표준 세포 배양 배지 중에 시험 화합물의 존재 하에 7일 동안 플레이팅하였다. CD4+ T 세포의 증식을 항 CD4 항체로 표지하여 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 단백질의 항원성 백분율을 배지 대조군에 비하여 유의한 CD4+ T 세포 증식 반응을 보인 공여자의 백분율로서 계산하였다.
- [0700] 결과
- [0701] 인간 T 세포 증식 분석법을 이용한 시험관내 면역원성 위험 평가에서, 화합물 2에 대한 7일간의 노출 후에 40명의 공여자 중 13명 (32.5%)이 CD4+ 증식성 반응을 보였고, 그에 반해 40명의 공여자 중 15명이 화합물 1 (야생형 FGF-21 서열을 가지나, 단 이. 콜라이에서의 발현을 위해 N-말단 메티오닌이 포함되었음)로부터 양성 신호를 보였다 (도 9). 이러한 세포 기반 실험이 실제 상황에서의 인간 면역 반응 관찰 결과를 대체하지는 못하지만, 이 분석은 야생형 FGF21과 비교하여 화합물 2도 인간 면역원성 위험의 증가가 일어나지 않음을 시사한다.
- [0702] 추가의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 CD4+ 증식 분석법에서 화합물 1과 비교하여 시험하였다 (도 9). 면역원성은 일반적으로 대조군 FGF21 서열 (화합물 1)로 관찰되는 것과 유사하였으나, 단 상대적으로 증가한 면역 반응을 나타내는 화합물 10은 제외되는데, 이는 화합물이 인간 환자에게 투여되는 경우 바람직하지 않게 면역원성을 발휘할 수 있음을 시사한다.
- [0703] 실시예 10
- [0704] C-말단 무손상 (활성) 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생체내 안정성
- [0705] 이 연구는 C-말단 무손상 (즉, 활성) 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생체내 수준을 평가하였다. PEG화된 화합물 2는 PEG화된 화합물 1과 비교하여 현저히 증가한 비율의 C-말단 무손상, 활성 폴리펩티드를 나타내고, 이는 생체내 활성의 연장된 지속 기간을 포함하였다.
- [0706] 방법
- [0707] PEG화된 화합물 2 및 PEG화된 화합물 1의 약동학을 시노몰구스 원숭이에서 각각 0.25 mg/Kg 및 0.225 mg/kg의 피하 (SC) 투여 후에 평가하였다. 혈액 샘플 (0.2 mL)을 약물 투여 후 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 7, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간에 수집하여, 생분석하기 전까지 -80℃에서 저장하였다.
- [0708] 전체 및 C-말단 무손상 PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2의 PK 파라미터를 혈청 또는 혈장 농도 vs 시간 데이터의 비구획 분석에 의해 수집하였다 (피닉스(Phoenix)TM WinNonlin®, 6.3, 파사이트 코퍼레이션, 미국 미주리주 세인트루이스 소재). 0 시간부터 무한대까지의 곡선 아래 면적 [AUC(tot)]을 선형 및 로그 사다리꼴 가중의 조합을 이용하여 계산하였다. 정량화가 가능한 농도를 갖는 최소 3개의 시점을 사용하여 AUC 및 반감기 ($t_{1/2}$)를 추정하였다.
- [0709] 단회 투여 PK 연구에서 PEG화된 화합물 1의 전체 농도를 비검증 메조 스케일 디스커버리 (MSD)-기반 전기화학발광 면역흡착 분석법 (ECLIA)을 이용하여 측정하였다. PEG-특이적 모노클로날 항체 (mAb)를 사용하여 PEG화된 화합물 1을 포획한 다음, 토끼 항-FGF21 폴리클로날 항체 (pAb)를 사용하여 전체 PEG화된 화합물 1을 검출하였다.
- [0710] PEG화된 화합물 2 및 PEG화된 화합물 1의 피하 (SC) 약동학 (PK)을 또한 수컷 Ob/Ob 마우스에서 평가하였다. PEG화된 화합물 2를 0.1 mg/kg의 단회 SC 주사로서 마우스 ($n = 3$ /시점/경로)에 투여하였다. PEG화된 화합물 1을 0.05 mg/kg의 단회 SC 투여로서 투여하였다. 혈액 샘플을 약물 투여 후 다양한 시점에서 수집하였고, 본질적으로 시노몰구스 원숭이에 대하여 기재된 바와 같이 프로세싱하였다.
- [0711] 관독은 포획 및 검출 시약에 의해 결합된 전체 PEG화된 화합물 1의 양에 비례하는, 상대적 발광 단위 (RLU)의 전기화학발광을 통해 이루어졌다. 표준 곡선은 0.2 내지 154 ng/mL에 있었다. 시험 샘플을 4-파라미터 로지스틱 맞춤 회귀분석 모델을 이용하여 1/Y의 가중 인자로 정량화하였다. 동일한 분석법을 사용하여 ZDF 래트 및 시노몰구스 원숭이 혈청에서의 C-말단 무손상 PEG화된 화합물 1의 농도를 측정하나, 단 PEG화된 화합물 1의 C-말단에 대하여 특이적인 토끼 항-FGF21 pAb를 검출을 위해 사용하였다. 표준 곡선은 0.2 내지 154 ng/mL에 있었다. 시험 샘플을 4-파라미터 로지스틱 맞춤 회귀분석 모델을 이용하여 1/Y의 가중 인자로 정량화하였다.

- [0712] 결과
- [0713] PEG화된 화합물 1은 생체내에서 단백질분해를 진행하여, 시간에 따라 대부분의 화합물이 말단절단된, 불활성 형태가 되었다. PEG화된 화합물 1 및 2의 생체내 단백질분해 안정성을 ob/ob 마우스 (도 10) 및 시노물구스 원숭이 (도 11)에서 직접(head-to-head) 비교하였다. 이러한 결과는 활성 C-말단 무손상 형태의 AUC가 PEG화된 화합물 1과 비교하여, 결실을 함유하는 변형된 FGF-21 화합물 (PEG화된 화합물 2)의 경우에 7배 내지 8배 증가하였다는 것을 보여주고, 이는 PEG화된 화합물 2가 증가한 생체내 단백질분해 안정성을 갖는다는 것을 시사한다.
- [0714] 실시예 11
- [0715] 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 약동학 연구
- [0716] 이 실시예는 마우스, 래트, 및 시노물구스 원숭이에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 약동학 연구 결과를 제시한다 (하기 표 8 참조).
- [0717] 간략하게 설명하면, PEG화된 화합물 2의 클리어런스는 마우스, 래트, 및 원숭이에서 낮았다 (범위: 0.94 - 2.6 mL/h/kg). 약 0.04 - 0.05 L/kg의 분배 부피 (V_{ss})는 혈장 부피와 유사하였고, 이는 혈관의 공간으로의 최소한의 분배를 시사한다. 피하 (SC) 생체이용률은 마우스 (40%)와 원숭이 (58%)에서는 허용가능하였지만, 래트에서는 상대적으로 낮았다 (16%). 이러한 낮은 SC 생체이용률은 래트에 특이적인 것일 수 있는데, 그 이유는 다른 PEG화 분자도 유사한 현상을 갖는 것으로 관찰되었기 때문이다 (래트에서는 낮은 SC 생체이용률을 가지며 마우스, 원숭이 및 인간에서는 양호한 생체이용률을 가짐). 보다 중요하게는, 이들 중 (래트 포함)에서의 PEG화된 화합물 2에 대한 SC 생체이용률이 PEG화된 화합물 1보다 2 - 3.4배 더 높았다.
- [0718] PEG화된 화합물 2를 마우스, 래트, 및 원숭이에게 SC 투여한 후에, PEG화된 화합물 1과 비교하여 무손상 단백질의 용량 정규화 노출 (AUC)이 일관되게 (7-8배) 증가하였다. 피하 투여 후에 무손상 PEG화된 화합물 2의 증가한 노출은 PEG화된 화합물 1과 비교하였을 때, 이들 3종 모두에게서 피하 생체이용률의 개선 (2 - 3.4배)과 함께 낮은 전신 클리어런스 (2 - 5배)를 갖기 때문일 수 있다.
- [0719] 단백질분해 단편과 무손상 PEG화된 화합물 2의 혼합물로 구성된 전체 PEG화된 화합물 2를 또한 이러한 약동학 연구에서 측정하였다. IV 투여 후에 마우스 및 래트에서의 무손상 PEG화된 화합물 2 대 전체 PEG화된 화합물 2의 AUC 비는 1에 근접하고, 이는 최소의 전신 단백질분해를 시사한다. 그러나, SC 투여 후에는, 이들 중에서의 상기 비가 0.6 - 0.86이고, 이는 SC 자리에서의 약간의 단백질분해를 시사한다. 원숭이에서도 유사한 경향이 주목되었는데, 여기서 무손상 PEG화된 화합물 2 대 전체 PEG화된 화합물 2의 AUC 비는 IV와 비교하여 SC 투여 후에 약간 낮았다 (SC 투여 후의 0.7 vs. IV 투여 후의 0.8).
- [0720] 종합하면, PEG화된 화합물 2는 증가한 생체이용률, 감소한 클리어런스 및 증가한 AUC (혈장 농도-시간 곡선 아래 면적)를 비롯하여, 유리한 시험관내 및 생체내 약동학적 특성이 입증되었다.
- [0721] <표 8>
- [0722] 마우스, 래트 및 원숭이에서의 무손상 변형된 FGF-21 단백질의 IV & SC 약동학

종	마우스		래트		원숭이	
	PEG 화 화합물 1	PEG 화 화합물 2	PEG 화 화합물 1	PEG 화 화합물 2	PEG 화 화합물 1	PEG 화 화합물 2
CL (mL/h/kg)	6.1	2.5	6.2 ± 0.7	2.6 ± 0.4	4.4 ± 1	0.94 ± 0.05
V_{ss} (L/kg)	0.043	0.044	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.005	0.04 ± 0.003
반감기 (h)	47	26	35 ± 1	24 ± 3.9	13 ± 2	57 ± 4.2
MRT (h)	7.1	20	8.4 ± 0.3	20 ± 1.3	16 ± 2.5	47 ± 1.5
SC BA (%)	15	40	4.8	16.3	30	58
SC AUC ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	1.2	8.1	0.39 ± 0.07	3.1 ± 0.2	20 ± 2.2	154 ± 63

[0723]

[0724] 약어: CL: 약물의 혈장으로부터의 걸보기 전신 클리어런스; Vss: 정상 상태일 때의 걸포기 분배 부피; MRT: 평균 체류 시간; SC BA: 피하 생체이용률; SC AUC: 피하의 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적.

[0725] 실시예 12

[0726] 당뇨병 마우스 모델에서의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 반복 투여 생체내 연구

[0727] PEG화된 화합물 2 및 PEG화된 화합물 1을 21일간의 반복 투여 연구에서 직접 평가하였다. 결과는 이들 2종의 화합물이 대사성 증상의 개선에 효과적이지만, 활성 PEG화된 화합물 2의 연장된 생체내 반감기는, 특히 매주 투여 효과를 비교하였을 때 보다 큰 치료 효과를 초래하였음을 입증한다.

[0728] 방법

[0729] 수컷 ob/ob 마우스 (잭슨 래보러토리즈(Jackson Laboratories), 미국 메인주 바 하버 소재)는 연구를 시작할 때 8주령이었다. 마우스를 체중 및 글루코스 수준에 기초하여 처리 군으로 랜덤 배정하였다. 모든 군을 1 ml/kg의 투여 용액을 피하 (s.c.) 투여함으로써 처리하였다. 처리 군은 하기와 같았다: 1) 비히클 (250 mM 수크로스/20 mM 트리스, pH 8.3), 1주마다 2회 (BIW), 2) PEG화된 화합물 1, 0.15 mg/kg BIW, 3) PEG화된 화합물 2, 0.15 mg/kg BIW, 4) PEG화된 화합물 1, 0.3 mg/kg 1주마다 1회 (QW), 또는 5) PEG화된 화합물 2, 0.3 mg/kg QW. 화합물이 1주마다 1회만 투여되는 마우스는, BIW 군이 매주 화합물의 두번째 주사를 투여받는 날에 비히클을 투여받았다. 체중, 혈장 글루코스, 트리글리세리드 (올림푸스 임상 화학 분석기(Olympus clinical chemistry analyzer), AU680), 및 인슐린 (ELISA, 머코디아 인크.(Mercodia Inc.))을 21일의 투여 기간에 걸쳐서 식후 상태일 때 결정하였다. 연구가 시작되고 종료될 때 전혈 중의 당화 헤모글로빈 (HbA1c)을 결정하였고, 이 또한 올림푸스 분석기를 이용하였다.

[0730] 결과

[0731] PEG화된 화합물 1과 PEG화된 화합물 2를 둘다 0.15 mg/kg 1주마다 2회 (BIW) 및 0.3 mg/kg QW의 용량으로 피하 투여하였다. 제21일에 최저로(trough) 측정된 혈장 농도는, 전체 (무손상과 단백질분해형) FGF21의 노출이 두 변이형 모두에서 유사하지만, 활성 C-말단 무손상 PEG화된 화합물 2의 노출은 각각 QW 또는 BIW 투여 후에 PEG화된 화합물 1보다 12배 내지 25배 더 높았다는 것을 보여준다 (표 9).

[0732] <표 9>

[0733] ob/ob 마우스에서 21일의 반복 투여 후 최저 농도에서의 C-말단 무손상 PEG화된 화합물 1 및 PEG화된 화합물 2의 노출 (평균 $\pm$ s.e.m.)

파라미터	PEG 화 화합물 2 BIW (0.15 mg/kg)	PEG 화 화합물 1 BIW (0.15 mg/kg)	PEG 화 화합물 2 QW (0.3 mg/kg)	PEG 화 화합물 1 QW (0.3 mg/kg)
최저 농도 (ng/mL)	175 $\pm$ 43	7 $\pm$ 0.7	38 $\pm$ 3	3 $\pm$ 0.1
예상 Cmax (ng/mL)*	1064	313	2149	633
예상 AUC (μ g/mL*h)*	107	18	107	18

[0734]

[0735] * ob/ob 마우스에서의 단위 용량 약동학 데이터에 기초하여 예상됨

[0736] 당화 헤모글로빈 (HbA1c)은 생체내에서 이 단백질 내의 특정 아미노산에 글루코스가 비효소적으로 첨가되어 생성되고, 측정된 HbA1c의 퍼센트는 순환 적혈구의 일생에 걸쳐서 통합되는 평균 혈중 글루코스에 상응한다. 6.5% 초과 HbA1c 값은 당뇨병에 대한 진단 기준이다. 반복 투여 연구의 제21일째의 HbA1c의 비히클-보정 변화가 도 12에 도시되어 있다. 어느 FGF21 폴리펩티드든지 0.15 mg/kg의 BIW 투여는 21일의 투여 후에 HbA1c를 5% 미만의 값으로 정상화하였다. 그러나, 0.3 mg/kg의 QW 투여에서는 PEG화된 화합물 2만이 비히클에 대하여 Δ HbA1c를 통계적으로 유의하게 감소시켰고, 이는 활성 C-말단 무손상 단백질의 기능적 노출에서의 유의한 증가와 일관된다. 이러한 결과는 표적 최저 농도 ($C_{최저}$)의 유지로 효력 발생에 충분할 수 있다는 것을 시사한다

(표 9).

- [0737] 감소한 HbA1c의 결과와 일관되게, 혈장 글루코스 수준 또한 연구 동안에 유의하게 감소하였다 (제2일 내지 제21일 동안 비히클과 비교하여 모든 군의 $p < 0.01$, 하지만 제14일의 QW 투여에서는 PEG화된 화합물 2는 통계적 유의성 ($p < 0.05$)을 달성하고 PEG화된 화합물 1은 유의하지 않았음) (도 16). 종합하면, 글루코스 AUC의 변화 (비히클과의 차이 백분율)는 연구 과정 동안에 모든 처리에 의해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$ vs 비히클) (도 17).
- [0738] 추가적으로, 혈장 트리글리세리드 수준도 PEG화된 화합물 2 군 중 BIW 군의 제2일 및 제4일 ($p < 0.01$)에, QW 군의 제2일, 제4일 및 제10일 및 제17일 ($p < 0.01$)에, 또한 PEG화된 화합물 1의 QW 군의 제2일 및 제17일 ($p < 0.05$)에 비히클과 비교하여 유의하게 감소하였다 (도 18).
- [0739] PEG화된 화합물 2는 ob/ob 마우스에서 21일의 연구 과정 동안에 비히클 또는 PEG화된 화합물 1과 비교하여 체중 증가의 퍼센트를 유의하게 감소시켰다 (도 13 및 도 14). 0.3 mg/kg의 PEG화된 화합물 2의 QW 투여는 체중이 측정되는 제7일, 제14일, 및 제21일에 최저 농도에서 감소한 효력을 나타내며, 이 역시 표적 최저 농도 ($C_{\text{최저}}$)의 유지로 효력 발생에 충분할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0740] 0.15 mg/kg의 PEG화된 화합물 2의 BIW 투여는 ob/ob 마우스에서 21일의 반복 투여 연구 동안에 혈장 인슐린 수준을 통계적으로 유의하게 감소시켰고 (도 15); PEG화된 화합물 1의 BIW는 제10일 후에 혈장 인슐린을 유의하게 감소시키지 못했다. 0.3 mg/kg의 PEG화된 화합물 2의 QW 투여는 "톱니형(saw-toothed)" 결보기 프로파일을 발생시키는데, 화합물 최저 농도에서 인슐린이 측정될 때 제14일 및 제21일에 비히클 군의 값을 초과하는 경향을 나타낸다. 이러한 패턴은 PEG화된 화합물 2가 만성적인 투여로 체중에서의 인슐린 함량을 보전할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0741] 이러한 결과는 0.15 mg/kg BIW 군에서 PEG화된 화합물 2에 대하여 175 ng/ml의 최저 농도 (표 9)를 유지하는 것으로 혈당증과 체중 변화의 척도에 있어서 유의한 개선을 유도하였다는 것을 보여준다.
- [0742] ob/ob 마우스 모델에서 QW 투여의 경우에 PEG화된 화합물 1과 비교하여, 활성 C-말단 무손상 PEG화된 화합물 2에 대한 증가한 노출은 용량에 기반하여 향상된 생체내 효능 및 연장된 작용 기간을 초래하여, HbA1c, 중량 증가 및 혈장 인슐린에 있어서의 뛰어난 감소를 유도한다.
- [0743] 실시예 13
- [0744] 지방간에서 비알콜성 지방간염 (NASH)으로 진행되면 결국에는 간 섬유증이 될 수 있다. 이 실시예는 108 위치에서 글루타민의 파라-아세틸-L-페닐알라닌으로의 치환을 함유하도록 변형되고 30 kDa 폴리(에틸렌 글리콜)과 연결된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 (PEG화된 화합물 1 또는 "PEG-화합물 1", 서열식 별번호: 201)를 섬유증 모델에 사용한 것을 기재한다. 구체적으로, PEG-화합물 1을 스텔릭 인스티튜트의 2-히트(hit) NASH 모델에서 시험하였는데, 여기서 C57BL6 마우스에 스트렙토조신을 출생 직후에 처리하여 당뇨병을 유발한 다음, 4주령이 되면 고지방식을 제공하였다. 이들 마우스는 재현가능한 시간 경로에 따라 지방간 (5주), NASH (7주), 간 섬유증 (9주), 및 최종적으로 간세포 암종 (16주)이 발생하였다. PEG-화합물 1은 마우스를 5주령부터 9주령까지 처리하거나 (예방 모델) 또는 7주령부터 9주령까지 처리하였을 때 (치료 모델), 스텔릭 모델에서 NASH의 발생을 예방하거나 또는 효과적으로 반전시켰다. PEG-화합물 1은 또한 이 연구에서 9주 시점에서 간 섬유증을 감소시켰다.
- [0745] PEG-화합물 1의 서열은 하기와 같다:
- MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
 QILGVKTSRFLCQRPDGLYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF)SEAHGLPLHLPGNKSPH
 RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:
 201)
- [0746] , 여기서 pAF가 30 kDa PEG와 연결됨.
- [0747] 물질 및 방법
- [0748] C57BL/6 마우스 (임신 15일차의 암컷)를 찰스 리버 래보러토리즈 제팬, 인크. (일본 가나가와 소재)로부터 입수하였다. 연구에 사용된 모든 동물은 동물 사용에 관한 일본 약리학회 지침(Japanese Pharmacological Society Guidelines for Animal Use)에 따라 수용 관리하였다.
- [0749] 동물을 SPF 시설에서 온도 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 습도 ($45 \pm 10\%$), 조명 (12시간 사이클의 인공 명기 및 암기; 8:00부

터 20:00까지가 명기) 및 공기 교환이 통제되는 조건 하에 유지하였다. 시설 오염을 방지하기 위해 실험실에 고압 (20 ± 4 Pa)을 유지하였다. 동물을 폴리카르보네이트 우리 KN-600 (나즈메 세이사꾸쇼, 일본 소재)에 우리마다 최대 4마리의 마우스를 수용시켰다. 베딩을 위해서는 멸균 펄마스(PULMAS)_μ (머티리얼 리서치 센터 (Material Research Center), 일본 소재)를 사용하였고 1주마다 1회 교체해 주었다.

[0750] 멸균 고형 고지방식 (HFD)을 자유롭게 제공하였고, 우리 상단에 금속제 뚜껑을 두었다. 순수는 고무 마개와 시퍼 튜브(sipper tube)가 설치된 물통으로 자유롭게 제공하였다. 물통은 1주마다 1회 교체하였고, 오토클레이브에서 세척하고 멸균시킨 다음, 재사용하였다.

[0751] NASH를 40마리의 수컷 마우스에서 출생 후 2일에 스트랩토조신 (STZ, 시그마-알드리치 캄파니 엘엘씨., 미국 소재) 용액 200 μ g을 단회 피하 주사하여 유발하였고, 4주령 이후부터 고지방식 (HFD, 57 kcal% 지방, cat#: HFD32, 씨엘이에이 재팬, 인크.(CLEA Japan, Inc.), 일본 소재)을 먹였다 ("STAM 마우스"). 사료 소비량을 처리 기간 동안 1주에 매일 측정하였다.

[0752] PEG-화합물 1 및 비히클 (20 mM 트리스/250 mM 수크로스, pH 8.3)을 1 mL/kg의 부피로 피하 경로를 통해 투여하였다. PEG-화합물 1은 1 및 3 mg/kg의 용량으로 1주마다 2회 투여하였다.

[0753] 전혈 중에서의 비-공복 혈중 글루코스를 라이프 체크(LIFE CHECK) (에디아 캄파니, 리미티드(EIDIA Co. Ltd.), 일본 소재)를 사용하여 측정하였다. 혈장 생화학을 위해, 혈액을 항응고제 (노보-헤파린(Novo-Heparin), 모치다 파마슈티컬 캄파니, 리미티드(Mochida Pharmaceutical Co. Ltd.), 일본 소재)가 들어있는 폴리프로필렌 튜브에 수집하여, 15분 동안 4°C에서 1,000xg로 원심분리하였다. 상청액을 수집하고 사용하기 전까지 -80°C에서 저장하였다. 혈장 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 트리글리세리드 및 총 콜레스테롤 수준을 후지 드라이-켄 (FUJI DRI-CHEM) 7000 (후지필름 코포레이션(Fujifilm Corporation), 일본 소재)에 의해 측정하였다.

[0754] 간의 총 지질-추출물을 폴츠법(Folch's method) (Folch J. et al., J. Biol. Chem. 1957;226: 497)에 의해 수득하였다. 간 샘플을 클로로포름-메탄올 (2:1, v/v) 중에서 균질화하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 클로로포름-메탄올-물 (8:4:3, v/v/v)로 세척한 후에, 추출물을 증발 건조시키고 이소프로판올에 용해시켰다. 간의 트리글리세리드 및 콜레스테롤 함량을 각각 트리글리세리드 E-테스트 및 콜레스테롤 E-테스트에 의해 측정하였다 (와코 퓨어 케미칼 인터스트리즈, 리미티드(와코 퓨어 케미칼 인터스트리즈, Ltd.), 일본 소재).

[0755] 헤마톡실린-에오신 (HE) 염색을 위해, 절편을 부양 용액(Bouin's solution) 중에 예비고정된 간 조직의 파라핀 블록으로부터 절단하고, 릴리-마이어 헤마톡실린(Lillie-Mayer's Hematoxylin) (무토 퓨어 케미칼즈 캄파니, 리미티드(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.), 일본 소재)과 에오신 용액 (와코 퓨어 케미칼 인터스트리즈)으로 염색하였다. 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 활동성 점수 (NAS)를 클레이너의 기준에 따라 계산하였다 (Kleiner DE. et al., Hepatology, 2005;41:1313). 대수포성 및 소수포성 지방을 시각화하기 위해, 동결절편을 냉동된 간 조직으로부터 절단하고, 10% 중성 완충 포르말린 중에서 예비고정하고, 티슈-테크(Tissue-Tek) O.C.T. 화합물 (사쿠라 파인테크 재팬 캄파니, 리미티드(Sakura Finetek Japan Co. Ltd.), 일본 소재)로 포매하고, 오일 레드 O (시그마-알드리치)로 염색하였다. 면역조직화학을 위해, 절편을 티슈-테크 O.C.T. 화합물로 포매되고 아세톤으로 고정된 냉동 간 조직으로부터 절단하였다. 내생성 퍼옥시다제 활성을 5분 동안 0.03% H2O2를 사용하여 차단한 다음, 블록 에이스(Block Ace) (다이니폰 스미토모 파마 캄파니, 리미티드(Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd.), 일본 소재)와 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. 절편을 항-F4/80 항체 (비엠에이 바이오메디칼즈 (BMA Biomedicals), 스위스 소재)의 200배 희석액과 함께 밤새 실온에서 인큐베이션하였다. 2차 항체 (HRP-염소 항-래트 항체, 인비트로젠, 미국 소재)와 함께 인큐베이션한 후에, 3,3'-디아미노벤지딘/H2O2 용액 (니치레이 바이오사이언스 인크.(Nichirei Bioscience Inc.), 일본 소재)를 사용하여 효소-기질 반응을 수행하였다.

[0756] 섬유증, 지방 침적 및 염증 부위의 정량적 분석을 위해, 시리우스 레드-염색, 오일 레드-염색 및 F4/80-면역염색 절편의 명시야 영상을 디지털 카메라 (DFC280; 라이카(Leica), 독일 소재)를 사용하여 200배 배율로 중심 정맥 주위에서 촬영하고, 5 필드/절편에서의 양성 부위를 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어 (미국 국립보건원 (National Institute of Health), 미국 소재)를 사용하여 측정하였다.

[0757] 정량적 PCR을 위해, 총 RNA를 RNAiso (다카라 바이오 인크.(다카라 바이오 Inc.), 일본 소재)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 간 샘플로부터 추출하였다. RNA 1 μ g을 20 μ L의 최종 부피로 4.4 mM MgCl2 (에프. 호프만-라 로슈 리미티드(F. Hoffmann-La Roche Ltd.), 스위스 소재), 40 U RNase 억제제 (도요보 캄파니, 리미티드 (Toyobo Co., Ltd.), 일본 소재), 0.5 mM dNTP (프로메가 코포레이션(Promega Corporation), 미국 소재), 6.28 μ M 랜덤 헥사머 (프로메가 코포레이션), 5x 제1 가닥 완충액 (프로메가), 10 mM 디티오프레이톨 (인비트로젠)

및 200 U MMLV-RT (인비트로젠)를 함유하는 반응 혼합물을 사용하여 역전사시켰다. 반응을 1시간 동안 37℃에서, 이어서 5분 동안 99℃에서 수행시켰다. 실시간 PCR을 실시간 PCR DICE 및 SYBR 프리믹스 Taq (다카라 바이오(Takara Bio))를 사용하여 수행하였다. 상대적 mRNA 발현 수준을 계산하기 위해, 각 유전자의 발현을 기준 유전자 36B4 (유전자 기호: Rplp0)에 대하여 정규화하였다. PCR-프라이머 서열은 하기와 같다: 36B4: 정방향 5'-TTCCAGGCTTTGGGCATCA-3'; 역방향 5'-ATGTTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG-3'; 알파-SMA: 정방향 5'-AAGAGCATCCGACACTGCTGAC-3'; 역방향 5'-AGCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3'; TIMP-1: 정방향 5'-TGAGCCCTGCTCAGCAAAGA-3'; 역방향 5'-GAGGACCTGATCCGTCACAA-3'; 제1형 콜라겐: 정방향 5'-CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG-3'; 역방향 5'-GCAATGTGTTCTTGCAGTGGTA-3'; TGF-베타: MA030397 정방향 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTA-3'; 역방향 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'. 유전자 식별은 하기와 같다: 36B4 : 리보솜 단백질, 거대, P0, 알파-SMA: 근육 액틴, 알파 2, 평활근, 대동맥 (Acta2), Timp-1: 메탈로프로테이나제의 근육 조직 억제제 1 (Timp1), 전사 변이체 1, 제1형 콜라겐: 근육 콜라겐, 제I형, 알파 2 (Col1a2), TGF-베타: 변환 성장 인자 베타.

- [0758] 5-9주 처리 기간에 대해서는, 그래프패드 프리즘 4 (그래프패드 소프트웨어 인크.(GraphPad Software Inc.), 미국 소재)를 사용하는 본페로니 다중 비교 검정에 의해 통계 분석을 수행하였다. 7-9주 처리 기간에 대해서는, 그래프패드 프리즘 4를 사용하는 스튜던트(Student) t-검정에 의해 t 통계 분석을 수행하였다. < 0.05의 P 값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 통계적 유의성에 근접한 추세 또는 경향은 단측 꼬리 t-검정이 < 0.10의 P 값을 나타낼 때 확인되었다. 결과는 평균 ± 표준 편차 (SD)로 표시되었다.
- [0759] 각각의 연구 군은 비히클 또는 PEG-화합물 1이 1주마다 2회 1 mL/kg의 부피로 피하 처리된 8마리의 STAM 마우스를 함유하였다. 동물을 9주째에 희생시켰다. 연구 군은 하기와 같았다:
- [0760] 군 1: 비히클. 8마리의 NASH 마우스에 비히클을 1 mL/kg의 부피로 5주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.
- [0761] 군 2: PEG-화합물 1-저용량. 8마리의 NASH 마우스에 PEG-화합물 1이 보충된 비히클을 1 mg/kg의 용량으로 5주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.
- [0762] 군 3: PEG-화합물 1-고용량. 8마리의 NASH 마우스에 PEG-화합물 1이 보충된 비히클을 3 mg/kg의 용량으로 5주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.
- [0763] 군 4: 비히클. 8마리의 NASH 마우스에 비히클을 1 mL/kg의 부피로 7주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.
- [0764] 군 5: PEG-화합물 1-고용량. 8마리의 NASH 마우스에 PEG-화합물 1이 보충된 비히클을 3 mg/kg의 용량으로 7주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.
- [0765] 생존능, 임상적 징후 및 거동을 매일 모니터링하였다. 체중을 처리 전에 기록하였다. 마우스를 각각의 투여 후 대략 60분에 독성, 빈사 및 사망의 유의한 임상적 징후에 대하여 관찰하였다. 연구가 종료될 때, 동물을 에테르 마취 상태에서 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈) 직접적인 심장 천자를 통한 사혈에 의해 희생시켰다.
- [0766] 결과
- [0767] 체중 변화가 도 19에 도시되어 있다.
- [0768] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 처리 기간 동안에 체중이 서서히 증가하였다. PEG-화합물 1-저용량 군의 평균 체중은 제11일, 제13일, 제15일, 제16일, 제18일, 제19일, 제20일과 제22일부터 제28일까지 비히클 군보다 유의하게 적었다. PEG-화합물 1-고용량 군의 평균 체중은 제10일부터 제28일까지 비히클 군보다 유의하게 적었다. 어떤 동물도 전반적인 상태에 있어서 쇠퇴를 보이지 않았다.
- [0769] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 처리 기간 동안에 체중이 서서히 증가하였다. PEG-화합물 1-고용량 군의 평균 체중은 제5일, 제6일, 제9일과 제11일부터 제14일까지 비히클 군보다 유의하게 적었다. 어떤 동물도 전반적인 상태에 있어서 쇠퇴를 보이지 않았다.
- [0770] 총 사료 소비량이 도 20에 도시되어 있다.
- [0771] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 총 사료 소비량에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 처리 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 130 ± 4 g/마우스, PEG-화합물 1-저용량: 130 ± 3 g/마우스, PEG-화합물 1-고용량: 131 ± 3 g/마우스).

[0772] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 총 사료 소비량이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 증가하는 경향이 있었다 (비히클: 62 ± 3 g/마우스, PEG-화합물 1-고용량: 68 ± 2 g/마우스).

[0773] 희생될 때의 체중이 도 21 및 표 10에 나타나 있다.

[0774] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 희생될 때 PEG-화합물 1 처리 군이 비히클 군과 비교하여 평균 체중의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 21.7 ± 1.4 g, PEG-화합물 1-저용량: 19.5 ± 1.4 g, PEG-화합물 1-고용량: 18.9 ± 1.6 g).

[0775] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 희생될 때 PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 평균 체중의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 21.5 ± 1.4 g, PEG-화합물 1-고용량: 19.8 ± 1.0 g).

[0776] 간 중량 및 간 중량 대 체중 비가 도 22 및 도 23과 표 10에 나타나 있다.

[0777] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), PEG-화합물 1 처리 군이 비히클 군과 비교하여 평균 간 중량에 있어서 유의한 감소를 보였다 (비히클: 1511 ± 66 mg, PEG-화합물 1-저용량: 1163 ± 117 mg, PEG-화합물 1-고용량: 970 ± 237 mg). PEG-화합물 1 처리 군은 비히클 군과 비교하여 평균 간 중량 대 체중 비의 유의한 감소를 보였다 (비히클: $7.0 \pm 0.4\%$, PEG-화합물 1-저용량: $6.0 \pm 0.5\%$, PEG-화합물 1-고용량: $5.1 \pm 0.9\%$).

[0778] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 평균 간 중량의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 1364 ± 126 mg, PEG-화합물 1-고용량: 1008 ± 135 mg). PEG-화합물 1-고용량 군은 비히클 군과 비교하여 평균 간 중량 대 체중 비의 유의한 감소를 보였다 (비히클: $6.4 \pm 0.5\%$, PEG-화합물 1-고용량: $5.1 \pm 0.8\%$).

[0779] <표 10>

[0780] 체중 및 간 중량.

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	비히클 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-저용량 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (5-9주 처리) (n=8)	비히클 (7-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (7-9주 처리) (n=8)
체중 (g)	21.7 ± 1.4	19.5 ± 1.4	18.9 ± 1.6	21.5 ± 1.4	19.8 ± 1.0
간 중량 (mg)	1511 ± 66	1163 ± 117	970 ± 237	1364 ± 126	1008 ± 135
간 중량 대 체중 비 (%)	7.0 ± 0.4	6.0 ± 0.5	5.1 ± 0.9	6.4 ± 0.5	5.1 ± 0.8

[0781]

[0782] 전혈 글루코스가 도 24 및 표 11에 나타나 있다.

[0783] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 평균 전혈 글루코스의 유의한 감소를 보였다. 혈중 글루코스 수준은 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-저용량 군에서 감소하는 경향이 있었다 (비히클: 691 ± 114 mg/dL, PEG-화합물 1-저용량: 566 ± 119 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 493 ± 136 mg/dL).

[0784] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 평균 전혈 글루코스의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 656 ± 85 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 454 ± 104 mg/dL).

[0785] 혈장 ALT가 도 25 및 표 11에 나타나 있다.

[0786] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 혈장 ALT 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 처리 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 82 ± 66 U/L, PEG-화합물 1-저용량: 64 ± 36 U/L, PEG-화합물 1-고용량: 108 ± 78 U/L).

[0787] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 혈장 ALT 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 감소하는 경향이 있었다 (비히클: 229 ± 285 U/L, PEG-화합물 1-고용량: 36 ± 8 U/L).

[0788] 혈장 트리글리세리드 수준이 도 26 및 표 11에 나타나 있다.

[0789] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), PEG-화합물 1 처리 군이 비히클 군과 비교하여 혈장 트리글리세리드 수준의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 322 ± 341 mg/dL, PEG-화합물 1-저용량: 75 ± 39 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 45 ± 39 mg/dL).

물 1-고용량: 64 ± 22 mg/dL).

[0790] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 혈장 트리글리세리드 수준의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 139 ± 39 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 59 ± 51 mg/dL).

[0791] 혈장 총 콜레스테롤 수준이 도 27 및 표 11에 나타나 있다.

[0792] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 혈장 총 콜레스테롤 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 감소하는 경향이 있었다. 혈장 총 콜레스테롤 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-저용량 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (비히클: 121 ± 20 mg/dL, PEG-화합물 1-저용량: 114 ± 19 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 98 ± 31 mg/dL).

[0793] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 혈장 총 콜레스테롤 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-고용량 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 121 ± 19 mg/dL, PEG-화합물 1-고용량: 115 ± 29 mg/dL).

[0794] 간 트리글리세리드 함량이 도 28 및 표 11에 나타나 있다.

[0795] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), PEG-화합물 1 처리 군이 비히클 군과 비교하여 간 트리글리세리드 함량의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 54 ± 13 mg/간의 g, PEG-화합물 1-저용량: 25 ± 7 mg/간의 g, PEG-화합물 1-고용량: 22 ± 9 mg/간의 g).

[0796] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), PEG-화합물 1-고용량 군이 비히클 군과 비교하여 간 트리글리세리드 함량의 유의한 감소를 보였다 (비히클: 53 ± 11 mg/간의 g, PEG-화합물 1-고용량: 17 ± 6 mg/간의 g).

[0797] 간 콜레스테롤 함량이 도 29 및 표 11에 나타나 있다.

[0798] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 간 콜레스테롤 함량에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 처리 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 2.9 ± 0.7 mg/간의 g, PEG-화합물 1-저용량: 2.9 ± 0.6 mg/간의 g, PEG-화합물 1-고용량: 3.1 ± 0.4 mg/간의 g).

[0799] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 간 콜레스테롤 함량에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 처리 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 3.1 ± 0.8 mg/간의 g, PEG-화합물 1-고용량: 3.6 ± 1.5 mg/간의 g).

[0800] <표 11>

[0801] 혈액 및 간 생화학.

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	비히클 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-저용량 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (5-9주 처리) (n=8)	비히클 (7-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (7-9주 처리) (n=8)
전혈 글루코스 (mg/dL)	691 ± 114	566 ± 119	493 ± 136	656 ± 85	454 ± 104
혈장 ALT (U/L)	82 ± 66	64 ± 36	108 ± 78	229 ± 285	36 ± 8
혈장 트리글리세리드 (mg/dL)	322 ± 341	75 ± 39	64 ± 22	139 ± 39	59 ± 51
혈장 총 콜레스테롤 (mg/dL)	121 ± 20	114 ± 19	98 ± 31	121 ± 19	115 ± 29
간 트리글리세리드 (mg/간의 g)	54 ± 13	25 ± 7	22 ± 9	53 ± 11	17 ± 6
간 콜레스테롤 (mg/간의 g)	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.6	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.8	3.6 ± 1.5

[0802]

[0803] 조직학 분석: HE 염색 및 NAFLD 활동성 점수

[0804] HE-염색 절편의 대표 현미경 사진이 도 30a-b에서 제시되고, NAFLD 활동성 점수의 결과가 도 31, 도 32a-c 및 표 12에 나타나 있다. (NAFLD 활동성 점수 (도 31)는 지방증, 간세포 풍선양, 및 소염 염증 점수를 합친 것임). 표 12에 나타나 있는 결과는 표 13에 나타나 있는 점수 기준에 따른 것이다.

[0805] <표 12>

[0806] NAFLD 활동성 점수.

군	n	점수											NAS (평균 ± SD)
		지방증				소엽 염증				간세포 풍선양			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	
비히클 (5-9주 처리)	8	-	6	2	-	-	-	5	3	-	-	8	5.6 ± 0.7
PEG- 화합물 1- 저용량 (5-9주 처리)	8	3	5	-	-	-	4	4	-	-	1	7	4.0 ± 1.2
PEG- 화합물 1- 고용량 (5-9주 처리)	8	4	4	-	-	-	5	3	-	2	4	2	2.9 ± 1.2
비히클 (7-9주 처리)	8	-	5	3	-	-	-	6	2	-	-	8	5.6 ± 0.7
PEG- 화합물 1- 고용량 (7-9주 처리)	8	5	3	-	-	-	6	2	-	3	4	1	2.4 ± 1.3

[0807]

[0808] <표 13>

[0809] NAS 요소의 정의

항목	점수	정도
지방증	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
간세포 풍선양	0	없음
	1	풍선 세포가 거의 없음
	2	다수 세포/두드러진 풍선양
소엽 염증	0	병소 없음
	1	<2 병소 /200x
	2	2-4 병소 /200x
	3	>4 병소 /200x

[0810]

[0811] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 비히클 군의 간 절편이 극심한 소수포성 및 대수포성 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤을 나타냈다. PEG-화합물 1 처리 군은 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤의 현저한 개선 (감소)를 보였으며, NAFLD 활동성 점수 (NAS)가 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 (비히클: 5.6 ± 0.7, PEG-화합물 1-저용량: 4.0 ± 1.2, PEG-화합물 1-고용량: 2.9 ± 1.2).

[0812] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), PEG-화합물 1-고용량 군이 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤의 현저한 개선 (감소)을 보였으며, NAS가 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 (비히클: 5.6 ± 0.7, PEG-화합물 1-고용량: 2.4 ± 1.3).

[0813] 조직학 분석: 시리우스 레드 염색

[0814] 시리우스 레드 염색의 결과가 도 33a-b, 도 34 (대표 염색을 나타냄) 및 표 14에 제시되어 있다.

[0815] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 비히클 군의 간 절편이 간 소엽 중심주위 영역에서 콜라겐 침적을 나타냈다. 섬유증 부위 (시리우스 레드-양성 부위)가 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1 처리 군에서 유의하게 감소하였다 (비히클: $1.10 \pm 0.24\%$, PEG-화합물 1-저용량: $0.71 \pm 0.17\%$, PEG-화합물 1-고용량: $0.71 \pm 0.19\%$).

[0816] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 섬유증 부위가 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 유의하게 감소하였다 (비히클: $1.25 \pm 0.29\%$, PEG-화합물 1-고용량: $0.75 \pm 0.21\%$).

[0817] 조직학 분석: F4/80 면역조직화학

[0818] F4/80 면역조직화학의 결과가 도 35a-b, 도 36 (대표 염색을 나타냄) 및 표 14에 제시되어 있다.

[0819] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 비히클 군 간 절편의 F4/80 면역염색이 간 소엽에서의 F4/80+ 세포의 축적을 입증하였다. F4/80+ 세포의 개수 및 크기 뿐만 아니라, 염증 부위 (F4/80-양성 부위)의 백분율에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 처리 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: $6.9 \pm 0.9\%$, PEG-화합물 1-저용량: $7.6 \pm 1.5\%$, PEG-화합물 1-고용량: $7.1 \pm 0.7\%$).

[0820] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), F4/80+ 세포의 개수 및 크기 뿐만 아니라, 염증 부위의 백분율에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-고용량 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: $7.1 \pm 0.7\%$, PEG-화합물 1-고용량: $6.3 \pm 1.1\%$).

[0821] 조직학 분석: 오일 레드 염색

[0822] 오일 레드 염색의 결과가 도 37a-b (대표 염색을 나타냄), 도 38 및 표 14에 제시되어 있다.

[0823] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 비히클 군의 간 절편이 간세포에서의 소세포성 및 대세포성 지방 침적을 나타냈다. 지방 침적 부위 (오일 레드-양성 부위)의 백분율이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1 처리 군에서 유의하게 감소하였다 (비히클: $30.4 \pm 4.8\%$, PEG-화합물 1-저용량: $20.5 \pm 8.8\%$, PEG-화합물 1-고용량: $16.2 \pm 6.1\%$).

[0824] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 지방 침적 부위의 백분율이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 유의하게 감소하였다 (비히클: $30.7 \pm 5.6\%$, PEG-화합물 1-고용량: $13.9 \pm 7.7\%$).

[0825] <표 14>

[0826] 조직학 분석

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	비히클 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-저용량 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (5-9주 처리) (n=8)	비히클 (7-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (7-9주 처리) (n=8)
시리우스 레드-양성 부위 (%)	1.10 ± 0.24	0.71 ± 0.17	0.71 ± 0.19	1.25 ± 0.29	0.75 ± 0.21
F4/80-양성 부위 (%)	6.9 ± 0.9	7.6 ± 1.5	7.1 ± 0.7	7.1 ± 0.7	6.3 ± 1.1
오일 레드- 양성 부위 (%)	30.4 ± 4.8	20.5 ± 8.8	16.2 ± 6.1	30.7 ± 5.6	13.9 ± 7.7

[0827]

[0828] 유전자 발현 분석

[0829] 알파-SMA, TIMP-1, 제1형 콜라겐, 및 TGF-베타에 대한 유전자 발현 분석의 결과가 도 39a-d 및 표 15에 나타나 있다.

[0830] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 알파-SMA mRNA 발현 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 하향 조절되는 경향이 있었다. α -SMA mRNA 발현 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-저용량 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (비히클: 1.00 ± 1.14 , PEG-화합물 1-저용량: 0.52 ± 0.60 , PEG-화합물 1-고용량: 0.52 ± 0.60).

물 1-고용량: 0.39 ± 0.30).

[0831] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), α -SMA mRNA 발현 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-고용량 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 1.00 ± 0.88 , PEG-화합물 1-고용량: 1.14 ± 1.01).

[0832] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), TIMP-1 mRNA 발현 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-저용량 군에서 하향 조절되는 경향이 있었다. TIMP-1 mRNA 발현 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-고용량 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (비히클: 1.00 ± 0.39 , PEG-화합물 1-저용량: 0.73 ± 0.28 , PEG-화합물 1-고용량: 0.88 ± 0.31).

[0833] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), TIMP-1 mRNA 발현 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 하향 조절되는 경향이 있었다 (비히클: 1.00 ± 0.57 , PEG-화합물 1-고용량: 0.65 ± 0.34).

[0834] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), 콜라겐 제1형 mRNA 발현 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-저용량 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (비히클: 1.00 ± 0.22 , PEG-화합물 1-저용량: 0.88 ± 0.24 , PEG-화합물 1-고용량: 0.89 ± 0.34).

[0835] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), 콜라겐 제1형 mRNA 발현이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 유의하게 감소하였다 (비히클: 1.00 ± 0.29 , PEG-화합물 1-고용량: 0.69 ± 0.20).

[0836] 5-9주 처리 기간의 경우에는 (군 1, 2 및 3), TGF- β mRNA 발현 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-저용량 군에서 하향 조절되는 경향이 있었다. TGF- β mRNA 발현 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1-고용량 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (비히클: 1.00 ± 0.24 , PEG-화합물 1-저용량: 1.07 ± 0.60 , PEG-화합물 1-고용량: 0.90 ± 0.26).

[0837] 7-9주 처리 기간의 경우에는 (군 4 및 5), TGF- β mRNA 발현 수준이 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1-고용량 군에서 하향 조절되는 경향이 있었다 (비히클: 1.00 ± 0.45 , PEG-화합물 1-고용량: 0.77 ± 0.22).

[0838] <표 15>

유전자 발현 분석

과파미터 (평균 $\pm$ SD)	비히클 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-저용량 (5-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (5-9주 처리) (n=8)	비히클 (7-9주 처리) (n=8)	PEG-화합물 1-고용량 (7-9주 처리) (n=8)
알파-SMA	1.00 ± 1.14	0.52 ± 0.60	0.39 ± 0.30	1.00 ± 0.88	1.14 ± 1.01
TIMP-1	1.00 ± 0.39	0.73 ± 0.28	0.88 ± 0.31	1.00 ± 0.57	0.65 ± 0.34
제 1 형 콜라겐	1.00 ± 0.22	0.88 ± 0.24	0.89 ± 0.34	1.00 ± 0.29	0.69 ± 0.20
TGF- β	1.00 ± 0.24	1.07 ± 0.60	0.90 ± 0.26	1.00 ± 0.45	0.77 ± 0.22

[0839]

[0840] 상기에 언급한 바와 같이, PEG-화합물 1은 간 트리글리세리드 함량을 측정하는 생화학 분석법 및 간 절편의 헤마톡실린-에오신 또는 오일 레드 O 염색 후의 조직학에 의해 평가된 바와 같이 간 지방 축적을 감소시켰다. 천연 FGF21의 이러한 항지방증 활성은 마우스에서 아디포넥틴에 좌우되는 것으로 문헌에 보고되었다 (각각 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Lin et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013)]; [Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013)] 참조). 따라서, 총 아디포넥틴의 농도를 처리 마우스로부터 제조한 종점 혈청 샘플에서 측정하였다. 혈청 아디포넥틴을 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다 (Alpco 카탈로그 번호 47-ADPMS-E01).

[0841] 3 mg/kg의 PEG-화합물 1의 1주마다 2회 투여는 상응하는 비히클 군과 비교하여, 시험한 모든 종점 시점에서 혈청 총 아디포넥틴을 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (도 61). 이러한 결과는 아디포넥틴이 스텔릭 NASH 모델에서 PEG-화합물 1의 효력에 기여한다는 가설과 일관된다.

[0842] 고찰

[0843] 이 실시예는 NASH의 예방 모델과 치료 모델 양쪽 모두에서의 PEG-화합물 1의 효력을 시험한 실험의 결과를 보여준다. 예방 모델에서는, 그 모델에서 지방간이 분명할 때 처리를 개시하였다 (5주째부터 시작, 즉 5-9주 군). 치료 모델에서는, 그 모델에서 NASH가 분명할 때 처리를 개시하였다 (7주째부터 시작, 즉 7-9주 군). 그에 따라, PEG-화합물 1의 치료 효력이 예방 모델과 치료 모델 양쪽 모두에서 입증되었다.

- [0844] PEG-화합물 1의 처리는 두 처리 모델에서 섬유증 부위를 유의하게 감소시켰고 (시리우스 레드 염색에 의한 검출), 이는 PEG-화합물 1의 항섬유증 효과를 입증해준다. PEG-화합물 1의 처리는 또한 α -SMA, TIMP-1 및 제1형 콜라겐의 mRNA 발현 수준을 감소시켰고, 이는 PEG-화합물 1의 항섬유증 특성을 추가로 지지한다. PEG-화합물 1의 처리는 또한 체중 및 간 중량, 간 중량 대 체중 비, 혈중 글루코스, 혈장 및 간 트리글리세리드, NAFLD 활동성 점수, 지방 침적 부위에 있어서 통계적으로 유의한 감소를 초래하였다 (오일 레드 염색에 의한 검출).
- [0845] 모든 PEG-화합물 1 처리 군은 NASH의 활동성을 평가하기 위한 임상적 평가변수 중 하나인 NAS의 유의한 감소를 보였다 (Sanyal AJ. et al., Hepatology, 2011:54:344).
- [0846] 추가적으로, PEG-화합물 1의 처리는 전혈 글루코스 수준, 혈장 트리글리세리드 수준 및 간 트리글리세리드 함량의 감소에 의해 입증되는 바와 같이 지질 및 글루코스 대사를 개선시켰다.
- [0847] 결론적으로, PEG-화합물 1은 본 연구에서 개선된 지질 및 글루코스 대사와 연관된 항-NASH, 항섬유증 효과를 보였다.
- [0848] 실시예 14
- [0849] 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도 평가
- [0850] 이 실시예는 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상대 용해도의 측정을 기재한다. 결과는 상대적으로 보다 고농도로 제제화되는 화합물의 능력을 시사하며, 이는 유효 투여량의 보다 용이한 투여를 가능하게 한다.
- [0851] 방법
- [0852] 순차적인 플러그 유동 농축 사이클 후에 이어지는 크기 배제 크로마토그래피 분석에 의해 상대 용해도 평가를 수행하였다. 동일한 출발 농도는 아니지만, pH 7.0의 20 mM 히스티딘 완충액 중에 제제화된 샘플을 3 kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기에 피펫팅하여 넣고, 4°C에서 15분, 15분 및 40분 사이클로 4,750 RPM으로 회전시켰다. 회전 사이클 사이에, 분취물을 농축 장치로부터 제거하고 분석용 크기 배제 크로마토그래피 분석 (aSEC) (pH 7.2의 PBS 완충액으로 평형화된 지이 헬쓰케어 슈퍼텍스 S-75 10/300 GL 컬럼)을 수행하여 용액 중의 HMW 및 단량체 화학종의 농도를 결정하였다.
- [0853] 나노드롭 분광광도계에 의한 280 nm에서의 흡광도로 총 농도를 결정하였다. SEC 크로마토그램 추적에서 단량체 피크와 비교하여 고분자량 피크의 곡선 아래 면적을 계산함으로써 고분자량의 wt%를 결정하였다. 그에 따른 데이터 포인트를 플롯팅하여 시험 조건 하에 구축물의 가용성이 가능 작은 것부터 가장 큰 것까지의 순위를 시각화하고, 데이터 포인트에 의해 만들어진 기울기가 작을수록 시험 조건 하에서 단백질 변이체가 더욱 안정하다.
- [0854] 결과
- [0855] 단백질 농도의 함수로서 고분자량 (HMW) 응집체의 형성을 측정함으로써 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 상대 용해도를 결정하였다. 주어진 농도에서 HMW 응집체 형성이 감소할수록 보다 높은 용해도를 나타내고, 이는 보다 고농도로 제제화되는 능력을 유도할 것이다.
- [0856] 결과가 도 41에 그래프로 도시되어 있다. 시험 화합물에 대한 플러그 유동 용해도 곡선의 기울기가 하기 표 16에 나타나 있다 (낮은 값은 응집체 형성이 감소하였음을 나타내고, 따라서 보다 고농도로 제제화되는 능력을 시사함).
- [0857] <표 16>

[0858] 융합 파트너를 포함하는 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 플러그 유동 용해도 결과

FGF21- PKE 어드넥틴(2) 융합 화합물	플러그 유동 용해도 기울기
화합물 101	2.72
화합물 102	0.31
화합물 103	측정 안됨
화합물 104	0.36
화합물 105	0.88
화합물 106	0.83
화합물 107	0.37
화합물 108	0.68
화합물 109	0.76
화합물 110	0.25
화합물 111	0.65
화합물 112	0.05
화합물 113	0.47

[0859]

[0860] 실시예 15 비알콜성 지방간염을 갖는 성인에서의 PEG-화합물 1의 안전성, 약동학 및 약력학 효과를 평가하는 랜덤 배정, 이중 맹검, 위약 대조, 병행 군, 다회 투여 연구

[0861] 미국에서는 NASH가 성인 경변증의 주요 원인 중 하나이고; NASH를 갖는 성인의 20% 이하에서 경변증이 발생한다. NASH의 조직학 연구 결과는 간에서의 세포주위 섬유증이 다양한 정도로 동반되는 지방증, 염증 및 풍선양 변성을 포함하고, 유의한 알콜 섭취 없이 발생한다. NASH 환자는 심혈관-, 간- 및 암-관련 사망으로 인한 증가한 사망률을 나타낸다. 특별한 의학 치료 옵션이 이용가능하지 않다.

[0862] 이 실시예는 안전성, 내성 및 MRI에 의한 간 지방 비율 (%) 변화의 평가를 비롯하여, NASH를 갖는 성인에서의 PEG-화합물 1 (서열식별번호: 201의 폴리펩티드, 여기서 pAF가 30 kDa PEG와 연결됨)의 안전성, 약동학 및 약력학 효과를 평가하는 랜덤 배정, 이중 맹검 및 위약 대조 인간 임상 시험을 기재한다.

[0863] 연구 집단: 21세 내지 75세이면서 하기 기준을 모두 충족시키는 대략 90명의 남성 및 여성 대상체를 등록시켰다: 1년간의 스크리닝에서 수행된 간 생검으로 상이한 점수 시스템; BMI ≥ 30 (체중 (kg) / [신장 (m)]²); 지방간 지수 ≥ 60 ; 스크리닝 기간 동안에 수행된 MRI에 의한 간 지방 비율 (%) $\geq 10\%$ 를 사용하여 NASH CRN 섬유증 1-3기 또는 그 등가의 NASH의 보고 결과. 대상체에 대해서 스크리닝 평가를 진행하여 랜덤 배정하기 전 42일 이내에 적격성을 결정하였다.

[0864] 만성 간 질환 (NASH 제외), 경변증, 비대칭성 간 질환, 조절되지 않는 당뇨병, 및 특정한 다른 의학적 병태 또는 병력을 비롯한 동반 질환의 증거가 있다면 대상체를 연구에서 배제시켰다.

[0865] 자기 공명 영상화 (MRI)에 의한 간 지방 함량, 자기 공명 탄성초음파 (MRE)에 의한 간 경직도, 및 이중 에너지 X선 흡수계측법 (DXA)에 의한 신체 조성을 포함하여, 기준선 스캐닝을 활성 약물 또는 위약의 제1일 투여 전 대략 14 내지 35일에 수행하였다. 추가의 기준선 환자 평가는 체중, BMI 및 허리 둘레를 결정하는 것을 포함하였다.

[0866] 처리 방법: PEG-화합물 1을 NASH를 갖는 성인에게 16주 동안 매일 또는 매주 투여하였다. 치료제는 위약 주사기를 적절히 사용하는 7일의 환자 훈련 이후에 피하로 자가-투여하였다. 적극적인 대략 90명의 대상체를 제1일에 3개의 처리 군 (군 당 30명) 중 하나로 랜덤 배정하였고, 그 후에 이들에게 하기와 같이 처리하였다 (제1일부터 시작): 처리 A: 매일 10 mg의 PEG-화합물 1; 처리 B: 매주 20 mg의 PEG-화합물 1; 처리 C: 매일 위약. 대상체를 미국 당뇨병 협회(American Diabetes Association)의 현 기준에 기초한 2형 진성 당뇨병의 진단 (진단 vs

무진단)에 따라 증화하였다.

- [0867] 모든 대상체에게 PEG-화합물 1 또는 위약을 1일 1회 자가-투여하였다. PEG-화합물 1은 10 mg/mL 용액으로 제공하였다. 처리 B (20 mg/wk) 군의 경우에는, 제1일 (D 1)에 각각 1 mL씩 2회 주사를 동시에 제공하였고 제2일-제7일에는 위약을 주사하였다. 맹검을 유지하기 위해 다른 2개 군에도 역시 2회의 제1일 주사가 있었으며, 이 주사 중 1회 또는 2회 모두 위약을 함유하였다. 제2일-제7일에, 주사는 1 mL의 PEG-화합물 1 (처리 A 군) 또는 1 mL의 위약 (처리 C 군)이었다. 처리를 제112일 (D 112) (즉, 16주)까지 계속하였다.
- [0868] 환자 평가: 환자 평가를 D -7 (위약만을 시작하는 도입 기간(lead-in)), D 1, D 15, D 29, D 43, D 57, D 86, 및 D 112에 수행하였다. 신체 검사, 활력 징후 측정, 12-유도 심전도 (ECG), 임상 실험실 평가, 및 MRI, MRE 및 DXA 스캐닝을 수행하였다. MRI, MRE 및 DXA 처리-종료 스캐닝을 제112일 (+/- 1주)에 수행하였다. 후속 평가 방문을 대략 D 142 및 D 292에 수행하고, DXA 후속 평가 스캐닝을 최종 투여 후 6개월째에 (+/- 2주) 수행하였다. 약동학 (PK) 및 약력학 (PD) 분석을 위해 혈액을 수집하였다. PEG-화합물 1 (전체 및 C-말단 무손상)의 혈청 농도를 인증받은 분석법으로 측정하였다. 이 연구에서 수집된 모든 PK 데이터를 모델-기반 파라미터, 예컨대 CL/F, Vc/F, Ka 등을 추정하기 위해 발달 집단 PK 모델에 의해 평가하였다. 추가로, 개별 노출 파라미터 (예컨대, 정상 상태에서의 Cavg, Cmin, Cmax 및 AUC)의 추정값을 모델-기반 파라미터로부터 유도하였다. 대상체는 연구 동안에 이상 반응에 대하여 근접 모니터링하였다.
- [0869] 1차 평가변수: 1차 목적은 PEG-화합물 1의 매일 또는 매주 투여가, 생검으로 NASH가 증명된 환자에서의 안전성, 내성 및 MRI에 의한 간 지방 비율 (%)에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 이는 양성자 밀도 지방 분획 간 MRI에 의해 결정된, 기준선부터 제16주까지의 간 지방 비율의 변화율 (%)의 1차 평가변수에 의해 평가될 것이다. 기준선은 모든 평가변수에 대하여 최종 비결측 투여 전 측정값으로서 정의된다. NASH 환자에게 16주 동안 매일 또는 매주 투여된 PEG-화합물 1은 간 지방 비율 (%)을 위약보다 큰폭으로 낮출 것이라 예상된다. 1차 평가변수는 또한 AE, 심각한 AE, 및 주사 부위의 평가를 비롯한 특별한 관심 사건, 중단 및 사망으로 이어지는 AE의 발생 뿐만 아니라, 임상 실험실 시험, 활력 징후 측정, ECG, 신체 검사 및 특정된 시점에서의 DXA 스캐닝에 의해 수집된 골밀도 검사 (BMD)에서의 현저한 이상 발생을 포함하는 안전성 평가변수를 포함한다.
- [0870] 2차 평가변수: 2차 평가변수는 약동학 평가변수 및 면역원성 평가변수를 포함한다. 약동학 평가변수는 PEG-화합물 1 (전체 및 C-말단 무손상) 혈청 농도의 모델-기반 약동학 파라미터: 선택된 시점에 수행된 측정으로부터 결정된 Cavg, Cmin, Cmax 및 AUC(TAU)에 의해 평가될 것이다. 면역원성 평가변수는 항-PEG-화합물 1 항체 및 항-FGF21 항체의 환자 수준에 의해 평가된다. PEG-화합물 1 (전체 및 C-말단 무손상) 혈청 농도의 모델-기반 약동학 파라미터가 결정된다. 1차 PK 파라미터는 하기를 포함한다: CL/F (정맥외 투여 후의 겔보기 클리어런스); V/F (정맥외 투여 후의 겔보기 분배 부피); 및 Ka (주사 부위에서 혈액 순환으로의 흡수 속도 상수). 1차 PK 파라미터로부터, Cmax (최대 혈청 농도 계산치); T1/2 (제거 반감기); AUC(TAU) (어느 하나의 투여 구간에서의 농도-시간 곡선 아래 면적); Cmin (투여 구간 내의 최소 농도); 및 Cavg (투여 구간 내의 평균 농도)를 비롯한 2차 PK 파라미터가 유도된다.
- [0871] 분석: 경시적 반복 측정 분석을 이용하여, 기준선 및 적어도 하나의 기준선 결정 후의 측정값을 둘다 갖는 처리 집단에서 제16주째의 기준선으로부터의 간 지방 비율 변화율 (%)을 분석하였다. 모델은 주효과로서의 처리 군, 주수 및 처리-주수의 상호작용, 및 공변량으로서의 기준선 간 지방 비율 (%) 및 기준선 당뇨병 상태를 포함하였다. 비구조화 공분산 행렬을 이용하여, 각각의 대상체에서의 반복 측정의 상관관계를 나타냈다. 모델은 하나의 처리 내에서 그리고 처리 사이에 기준선으로부터의 평균 변화에 대하여 점 추정값, 표준 오차 및 양측 90% 신뢰 구간을 제공하였다. 제16주째에 2개의 PEG-화합물 1 처리 군 (매일 10 mg 및 매주 20 mg) 각각에서의 처리 효과를 위약 처리 군과 비교하기 위해 P값을 계산하였다. 각각의 처리 군 비교는 단측 0.05 유의성 수준에서 수행하였다. 다중성을 위해 보정하지 않았다.
- [0872] PEG-화합물 1 (전체 및 C-말단 무손상) 노출과 다른 생체지표 또는 평가변수 사이의 관계를 분석하여, 용량-반응 관계를 확인하였다. 또한 이러한 측정을 분석하여, 이들의 간 지방 비율 변화율과의 관계와 그러한 생체지표가 그 변화를 어떻게 예측 또는 관련시키는지 확인하였다. 이러한 평가변수 및 생체지표는 MRE에 의한 간 경직도, 체중, BMI, 허리 둘레, DXA에 의한 신체 조성, 글루코스 항상성, 인슐린 감수성, 공복 지질, 뼈의 항상성, ALT 및 AST 뿐만 아니라, 질환의 진행 및 합병증 위험과 연관된 생체지표를 포함하였다. NASH는 전형적으로 아디포넥틴의 감소한 수준 (저아디포넥틴혈증)과 연관있고, 이러한 감소한 수준은 보다 광범위한 과사염증과 연관있다. 아디포넥틴은 지방 산화를 향상시키고 간의 지질 저장을 감소시킴으로써 인슐린 감수성을 증가시키는 것으로 생각된다. 혈청 총 아디포넥틴 수준은 PEG-화합물 1의 처리에 의해 증가할 것이라 예상되었다.

PEG-화합물 1의 처리는 또한 NASH 환자에서 공복 트리글리세리드, LDL, ApoB, ApoC3을 감소시키고 HDL을 증가시킬 것이라 예상되었다.

- [0873] 상기에 기재된 비구조화 공분산 행렬을 이용하는 연구 결과의 분석을 수행하여, PEG-화합물 1로 처리된 환자에서의 (매일 투여 및 매주 투여 연구 군 둘 모두) 간 지방 비율이 위약 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였음을 확인하였다.
- [0874] 실시예 16
- [0875] 이 실시예는 비알콜성 지방간염 (NASH)의 STAM 모델에서의 PEG-화합물 1의 효력을 추가로 분석한다. 마우스를 9주령부터 12주령까지 또는 15주령까지 처리하였다.
- [0876] 방법
- [0877] PEG-화합물 1 및 비히클 (20 mM 트리스/250 mM 수크로스, pH 8.3)을 제공하였다. 투여 용액을 제조하기 위해, 제공된 비히클로 적절히 희석하여 PEG-화합물 1 용액을 제조하였다.
- [0878] C57BL/6 마우스 (임신 15일차 암컷)를 제팬 에스엘씨, 인크. (Japan SLC, Inc.; 일본 시즈오카 소재)로부터 입수하였다. 연구에 사용된 모든 동물은 동물 사용에 대한 일본 약리학회 지침에 따라 수용 관리하였다. NASH를 60마리의 수컷 마우스에서 출생 후 2일에 스트렙토조신 (STZ, 시그마-알드리치, 미국 소재) 용액 200 μ g을 단회 피하 주사하여 유발하였고, 4주령 이후부터 고지방식 (HFD, 57 kcal% 지방, cat#: HFD32, 씨엘이에이 제팬, 인크., 일본 소재)을 먹였다.
- [0879] PEG-화합물 1 및 비히클을 3 mg/kg의 용량을 갖는 1 mL/kg의 부피로 1주마다 2회 피하 경로를 통해 투여하였다. 동물을 SPF 시설에서 온도 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도 ($45 \pm 10\%$), 조명 (12시간 사이클의 인공 명기 및 암기; 8:00부터 20:00까지가 명기) 및 공기 교환이 통제되는 조건 하에 유지하였다. 시설 오염을 방지하기 위해 실험실에 고압 (20 ± 4 Pa)을 유지하였다. 동물을 폴리카르보네이트 우리 KN-600 (나츠메 세이사쿠쇼, 일본 소재)에 우리마다 최대 4마리의 마우스를 수용시켰다. 베딩을 위해서는 멸균 페이퍼-클린(Paper-Clean) (제팬 에스엘씨)을 사용하였고 1주마다 1회 교체해 주었다. 멸균 고형 HFD를 자유롭게 제공하였고, 우리 상단에 금속제 뚜껑을 두었다. 순수는 고무 마개와 시퍼 튜브가 설치된 물통으로 자유롭게 제공하였다. 물통은 1주마다 1회 교체하였고, 오토클레이브에서 세척하고 멸균시킨 다음, 재사용하였다. 마우스는 이어링에 새긴 번호로 식별하였다. 각각의 우리에 특정 식별 코드를 표시하였다.
- [0880] 전혈 중에서의 비-공복 혈중 글루코스를 라이프 체크 (에디아 캄파니, 리미티드, 일본 소재)를 사용하여 측정하였다. 혈장 생화학을 위해, 혈액을 항응고제 (노보-헤파린, 모치다 파마슈티컬 캄파니, 리미티드, 일본 소재)가 들어있는 폴리프로필렌 튜브에 수집하여, 15분 동안 4°C 에서 1,000xg로 원심분리하였다. 상청액을 수집하고 사용하기 전까지 -80°C 에서 저장하였다. 혈장 ALT, 트리글리세리드 및 총 콜레스테롤 수준을 후지 드라이-켄 7000 (후지필름 코포레이션, 일본 소재)에 의해 측정하였다.
- [0881] 간의 총 지질-추출물을 폴츠법 (Folch J. et al., J. Biol. Chem. 1957;226: 497)에 의해 수득하였다. 간 샘플을 클로로포름-메탄올 (2:1, v/v) 중에서 균질화하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 클로로포름-메탄올-물 (8:4:3, v/v/v)로 세척한 후에, 추출물을 증발 건조시키고 이소프로판올에 용해시켰다. 간의 트리글리세리드 및 콜레스테롤 함량을 각각 트리글리세리드 E-테스트 및 콜레스테롤 E-테스트에 의해 측정하였다 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈, 리미티드, 일본 소재).
- [0882] HE 염색을 위해, 절편을 부양 용액 중에 예비고정된 간 조직의 파라핀 블록으로부터 절단하고, 릴리-마이어 헤마톡실린 (무토 퓨어 케미칼즈 캄파니, 리미티드, 일본 소재)과 에오신 용액 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈)으로 염색하였다. NAFLD 활동성 점수 (NAS)를 클레이너의 기준에 따라 계산하였다 (Kleiner DE. et al., Hepatology, 2005;41:1313). 콜라겐 침적을 시각화하기 위해, 부양 용액으로 고정된 간 절편을 피크로-시리어스 레드 용액 (발데크(Waldeck), 독일 소재)을 사용하여 염색하였다. 대수포성 및 소수포성 지방을 시각화하기 위해, 동결절편을 냉동된 간 조직으로부터 절단하고, 10% 중성 완충 포르말린 중에서 예비고정하고, 티슈-테크 0.C.T. 화합물 (사쿠라 파인테크 제팬 캄파니, 리미티드, 일본 소재)로 포매하고, 오일 레드 0 (시그마-알드리치)로 염색하였다. 면역조직화학을 위해, 절편을 티슈-테크 0.C.T. 화합물로 포매되고 아세톤으로 고정된 냉동 간 조직으로부터 절단하였다. 내생성 퍼옥시다제 활성을 5분 동안 0.03% H2O2를 사용하여 차단한 다음, 블록에이스 (다이니쁜 스미토모 파마 캄파니, 리미티드, 일본 소재)와 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. 절편을 항-F4/80 항체 (비엠에이 바이오메디칼즈, 스위스 소재)의 200배 희석액과 함께 밤새 4°C 에서 인큐베이션하였다. 2차 항체 (HRP-염소 항-라트 항체, 인비트로젠, 미국 소재)와 함께 인큐베이션한 후에,

3,3'-디아미노벤지딘/H2O2 용액 (니치레이 바이오사이언스 인크., 일본 소재)을 사용하여 효소-기질 반응을 수행하였다.

[0883] 신장을 부양 용액으로 고정시켰다. 사구체의 아키텍처를 0.5% 피아이오딘산으로 산화되고 시프 시약(Schiff's reagent)으로 염색된 (두 시약 모두 와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈 제품) 절편으로 PAS 염색을 이용하여 관찰하였다. 콜라겐 침적을 시각화하기 위해, 신장 절편을 피크로-시리어스 레드 용액 (발테크)으로 염색하였다.

[0884] 섬유증, 지방 침적 및 염증 부위의 정량적 분석을 위해, 시리어스 레드-염색, 오일 레드-염색 및 F4/80-면역염색 절편의 명시야 영상을 디지털 카메라 (DFC280; 라이카, 독일 소재)를 사용하여 200배 배율로 간의 중심 정맥 또는 신장의 간질 영역에서 촬영하고, 5 필드/절편에서의 양성 부위를 이미지제이 소프트웨어 (미국 국립보건원, 미국 소재)를 사용하여 측정하였다.

[0885] 그래프패드 프리즘 4 (그래프패드 소프트웨어 인크., 미국 소재)를 사용하는 본페로니 다중 비교 검정에 의해 통계 분석을 수행하였다. < 0.05의 P 값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 단측 꼬리 t-검정이 < 0.05의 P 값을 나타낼 때 추세 또는 경향이 가정되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로 표시되었다.

[0886] 결과

[0887] 연구 군은 하기와 같았다 (하기 표 17에 요약되었음).

[0888] 군 1: 비히클. 20마리의 NASH 마우스에 비히클을 1 mL/kg의 부피로 9주령부터 12주령까지 또는 15주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.

[0889] 군 2: PEG-화합물 1. 20마리의 NASH 마우스에 PEG-화합물 1이 보충된 비히클을 3 mg/kg의 용량으로 9주령부터 12주령까지 또는 15주령까지 1주마다 2회 피하 투여하였다.

[0890] <표 17>

[0891] 처리 요약.

군	마우스의 마리수	마우스	시험 물질	용량 (mg/kg)	부피 (mL/kg)	방법	희생 (주)
1	20	STAM	비히클	-	1	SC, 주 2 회, 9 주 - 12 주 또는 15 주	12, 15
2	20	STAM	PEG-화합물 1	3	1	SC, 주 2 회, 9 주 - 12 주 또는 15 주	12, 15

[0892]

[0893] 생존능, 임상적 징후 및 거동을 매일 모니터링하였다. 체중을 처리 전에 기록하였다. 마우스를 각각의 투여 후 대략 60분에 독성, 빈사 및 사망의 유의한 임상적 징후에 대하여 관찰하였다. 동물을 에테르 마취 상태에서 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈) 직접적인 심장 천자를 통한 사혈에 의해 희생시켰다. 모든 군에서 6마리의 동물은 후속 분석을 위해 12주령째에 희생시켰고, 나머지 동물은 15주령일 때 희생시키는 날까지 유지하였다.

[0894] 모든 군에서 체중은 처리 기간 동안에 확연하게 변화하지 않았다. 평균 체중에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

[0895] 처리 기간 동안에, 제40일이 되기 전에 마우스가 하기와 같이 사망하였다: 비히클 군에서 20마리의 마우스 중 8마리가 사망하였다. PEG-화합물 1 군은 사망한 동물이 없었다. 사망 원인은 불분명하게 남아있으며 비히클 군에서 관련된 질환이 진행된 것일 수 있다. 각 마우스의 사망일은 제7일, 제17일 (2마리 마우스), 제20일 (2마리 마우스), 제34일, 제38일 및 제40일이었다. 비히클 군에서 5마리의 마우스가 사망한 후에, 원래의 연구 프로토콜을 변경하여, 각각의 군에서 적어도 6마리의 마우스가 제15주까지 생존하도록 보장하기 위한 시도로 제12주에 희생시키는 마우스 수를 군 당 8마리에서 6마리로 줄이는 것으로 결정하였다.

[0896] 9-12주에 처리한 동물에서는, 희생 당일의 평균 체중에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 42a). 마찬가지로, 9-15주에 처리한 동물에서도, 희생 당일의 평균 체중에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 42b).

[0897] 장기 중량 및 간 중량 대 체중 비가 도 43-46에 도시되어 있으며 표 18에서 요약되었다.

[0898] 9-12주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군이 비히클 군과 비교하여 평균 간 중량이 감소하는 경향을 보였다

(도 43a). 평균 간 중량 대 체중 비는 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1 군에서 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$) (도 44a). 평균 우측 신장 중량에 있어서는 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 45a). 평균 좌측 신장 중량은 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1 군에서 감소하는 경향이 있었다 (도 46a).

[0899] 9-15주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군이 평균 간 중량 ($p<0.001$) (도 43b) 및 평균 간 중량 대 체중 비 ($p<0.001$) (도 44b)를 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소시켰다. 평균 우측 신장 중량 (도 45b) 및 평균 좌측 신장 중량 (도 46b)에 있어서는 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

[0900] <표 18>

[0901] 체중 및 장기 중량 결과.

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	12 주 비히클 (n=6)	12 주 PEG-화합물 1 (n=6)
체중 (g)	18.0 $\pm$ 4.7	16.0 $\pm$ 3.9
간 중량 (mg)	1389 $\pm$ 374	973 $\pm$ 226
간 중량 대 체중 비 (%)	7.7 $\pm$ 1.1	6.1 $\pm$ 0.7
우측 신장 중량 (mg)	143 $\pm$ 40	110 $\pm$ 25
좌측 신장 중량 (mg)	148 $\pm$ 37	98 $\pm$ 26
파라미터 (평균 $\pm$ SD)	15 주 비히클 (n=6)	15 주 PEG-화합물 1 (n=14)
체중 (g)	16.5 $\pm$ 4.8	15.2 $\pm$ 2.5
간 중량 (mg)	1341 $\pm$ 374	746 $\pm$ 161
간 중량 대 체중 비 (%)	8.2 $\pm$ 1.5	5.0 $\pm$ 1.1
우측 신장 중량 (mg)	111 $\pm$ 26	97 $\pm$ 24
좌측 신장 중량 (mg)	101 $\pm$ 22	90 $\pm$ 20

[0902]

[0903] 생화학적 측정 결과가 도 47-52에 도시되어 있으며 하기 표 19에서 요약되었다.

[0904] 9-12주에 처리한 동물에서는, 전혈 글루코스 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 47a).

[0905] 9-15주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 전혈 글루코스 수준이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$) (도 47b).

[0906] 9-12주에 처리한 동물에서는, 혈장 ALT 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 48a).

[0907] 9-15주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 혈장 ALT 수준이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$) (도 48b).

[0908] 9-12주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군이 비히클 군과 비교하여 혈장 트리글리세리드 수준이 감소하는 경향을 보였다 (도 49a).

[0909] 9-15주에 처리한 동물에서는, 혈장 트리글리세리드 수준에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 49b).

[0910] 9-12주에 처리한 동물에서는, 혈장 총 콜레스테롤에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 50a).

[0911] 9-15주에 처리한 동물에서는, 혈장 총 콜레스테롤에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 50b).

[0912] 9-12주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 간 트리글리세리드 함량이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감

소하였다 ($p<0.01$) (도 51a).

[0913] 9-15주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 간 트리글리세리드 함량이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$) (도 51b).

[0914] 9-12주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 간 콜레스테롤 함량이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$) (도 52a).

[0915] 9-15주에 처리한 동물에서는, PEG-화합물 1 군의 간 콜레스테롤 함량이 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$) (도 52b).

[0916] <표 19>

[0917] 생화학 시험 결과.

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	12 주 비히클 (n=6)	12 주 PEG-화합물 1 (n=6)
전혈 글루코스 (mg/dL)	628 $\pm$ 268	505 $\pm$ 231
혈장 ALT (U/L)	55 $\pm$ 30	39 $\pm$ 21
혈장 트리글리세리드 (mg/dL)	498 $\pm$ 368	167 $\pm$ 214
혈장 총 콜레스테롤 (mg/dL)	195 $\pm$ 115	162 $\pm$ 62
간 트리글리세리드 (mg/간의 g)	98 $\pm$ 38	42 $\pm$ 13
간 콜레스테롤 (mg/간의 g)	36 $\pm$ 15	18 $\pm$ 4
파라미터 (평균 $\pm$ SD)	15 주 비히클 (n=6)	15 주 PEG-화합물 1 (n=14)
전혈 글루코스 (mg/dL)	594 $\pm$ 182	350 $\pm$ 174
혈장 ALT (U/L)	48 $\pm$ 15	23 $\pm$ 15
혈장 트리글리세리드 (mg/dL)	117 $\pm$ 24	102 $\pm$ 57
혈장 총 콜레스테롤 (mg/dL)	176 $\pm$ 72	141 $\pm$ 45
간 트리글리세리드 (mg/간의 g)	98 $\pm$ 31	49 $\pm$ 19
간 콜레스테롤 (mg/간의 g)	39 $\pm$ 10	19 $\pm$ 9

[0918]

[0919] 간 샘플의 조직학 분석을 보여주는 대표 현미경 사진이 도 53, 55, 57 및 59에 제시되어 있다. 조직학 결과가 요약되어 도 54, 56, 58 및 60에 그래프로 도시되어 있으며 하기 표 22에 표로 나타나 있다.

[0920] 9-12주에 처리한 동물에서, 비히클 군의 HE 염색 간 절편은 극심한 소수포성 및 대수포성 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤을 나타냈다 (도 53a-b). PEG-화합물 1 군은 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤에 있어서 현저한 개선을 보이면서, 비히클 군과 비교하여 NAS의 유의한 감소를 나타냈다(도 53c-d).

[0921] 9-15주에 처리한 동물에서, PEG-화합물 1 군은 지방 침적, 간세포 풍선양 및 염증 세포 침윤에 있어서 현저한 개선을 보이면서 (도 53e-f), 비히클 군과 비교하여 NAS의 유의한 감소를 나타냈다 (도 53g-h).

[0922] NAFLD 활동성 점수 결과가 9-12주 및 9-13주에 처리한 동물에 대하여 각각 도 54a-b에 그래프로 도시되어 있으며, 표 20에서 요약되었다. NAFLD 활동성 점수는 두 처리 군 모두에서 유의하게 감소하였다 (9-12주 및 9-15주에 처리한 동물에 대하여 각각 $p<0.01$ 및 $p<0.001$).

[0923] <표 20>

[0924] NAFLD 활동성 점수 결과의 요약. 점수 요소는 하기 표 21에 나타나 있음.

군	N	지방증				소엽 염증				간세포 풍선양			NAS (평균±SD)
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	
12 주 비히클	6	1	4	-	1	-	2	4	-	-	-	6	4.8 ± 1.2
12 주 PEG-화합물 1	6	6	-	-	-	1	2	2	1	2	4	-	2.2 ± 0.8
15 주 비히클	6	1	3	1	1	-	1	5	-	-	-	6	5.2 ± 1.2
15 주 PEG-화합물 1	14	11	3	-	-	6	6	2	-	7	5	2	1.6 ± 1.2

[0925]

[0926] <표 21>

[0927] NAFLD 활동성 점수 요소.

항목	점수	정도
지방증	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
간세포 풍선양	0	없음
	1	풍선 세포가 거의 없음
	2	다수 세포/두드러진 풍선양
소엽 염증	0	병소 없음
	1	<2 병소 /200x
	2	2-4 병소 /200x
	3	>4 병소 /200x

[0928]

[0929] 9-12주에 처리한 동물에서, 비히클 군의 시리우스 레드 염색 간 절편은 간 소엽의 중심주위 영역에서 콜라겐 침적을 나타냈다 (도 55a-b). 섬유증 부위에 있어서는 도 56a에 요약된 바와 같이, 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 55c-d).

[0930] 9-15주에 처리한 동물에서는, 섬유증 부위가 도 56b에 요약된 바와 같이, 비히클 군 (도 55g-h)과 비교하여 PEG-화합물 1 군 (도 55e-f)에서 유의하게 감소하였다 (p<0.05).

[0931] F4/80-면역염색 절편의 대표 현미경 사진이 도 57에 제시되어 있다.

[0932] 9-12주에 처리한 동물에서는, 비히클 군 간 절편의 F4/80 면역염색이 간 소엽에서의 F4/80+ 세포의 축적을 입증해 주었다 (도 57a-b). 도 58a에 요약된 바와 같이, F4/80+ 세포의 개수 및 크기에 있어서 비히클 군과 PEG-화합물 1 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (도 57c-d).

[0933] 9-15주에 처리한 동물에서는, 도 58b에 요약된 바와 같이, F4/80+ 세포의 개수 및 크기에 있어서 비히클 군 (도 57e-f)과 PEG-화합물 1 군 (도 57g-h) 사이에 유의한 차이가 없었다.

[0934] 오일 레드-염색 절편의 대표 현미경 사진이 도 59a-h에 제시되어 있다.

[0935] 9-12주에 처리한 동물에서, 비히클 군의 오일 레드-염색 간 절편은 간세포에서의 소세포성 및 대세포성 지방 침

적을 나타냈다 (도 59a-b). 지방 침적 부위 (오일 레드-양성 부위)의 백분율은 도 60a에 요약된 바와 같이, 비히클 군과 비교하여 PEG-화합물 1 군 (도 59c-d)에서 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$).

[0936] 9-15주에 처리한 동물에서, 지방 침적 부위의 백분율은 도 60b에 요약된 바와 같이, 비히클 군 (도 59g-h)과 비교하여 PEG-화합물 1 군 (도 59e-f)에서 유의하게 감소하였다 ($p<0.001$).

[0937] <표 22>

[0938] 조직학 연구 결과의 요약

파라미터 (평균 $\pm$ SD)	12 주 비히클 (n=6)	12 주 PEG-화합물 1 (n=6)
간 섬유증 부위 (%)	1.17 $\pm$ 0.33	0.97 $\pm$ 0.51
염증 부위 (%)	3.38 $\pm$ 0.70	3.47 $\pm$ 1.40
지방 침적 부위 (%)	40.1 $\pm$ 4.8	16.2 $\pm$ 7.9
신장 섬유증 부위 (%)	1.70 $\pm$ 0.49	1.67 $\pm$ 0.92
파라미터 (평균 $\pm$ SD)	15 주 비히클 (n=6)	15 주 PEG-화합물 1 (n=14)
간 섬유증 부위 (%)	2.18 $\pm$ 0.14	1.44 $\pm$ 0.53
염증 부위 (%)	3.983 $\pm$ 1.966	4.511 $\pm$ 1.597
지방 침적 부위 (%)	32.0 $\pm$ 9.6	12.5 $\pm$ 10.1
신장 섬유증 부위 (%)	1.58 $\pm$ 0.41	1.77 $\pm$ 0.69

[0939]

[0940] 상기에 언급한 바와 같이, PEG-화합물 1은 간 트리글리세리드 함량을 측정하는 생화학 분석법 및 간 절편의 헤마톡실린-에오신 또는 오일 레드 O 염색 후의 조직학에 의해 평가된 바와 같이 간 지방 축적을 감소시켰다. 천연 FGF21의 이러한 항지방증 활성은 마우스에서 아디포넥틴에 좌우되는 것으로 문헌에 보고되었다 (각각 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Lin et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013)]; [Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013)] 참조). 따라서, 총 아디포넥틴의 농도를 처리 마우스로부터 제조한 종점 혈청 샘플에서 측정하였다. 혈청 아디포넥틴을 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다 (Alpco 카탈로그 번호 47-ADPMS-E01).

[0941] 3 mg/kg의 PEG-화합물 1의 1주마다 2회 투여는 상응하는 비히클 군과 비교하여, 시험한 모든 종점 시점에서 혈청 총 아디포넥틴을 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (도 62). 이러한 결과는 아디포넥틴이 스텔릭 NASH 모델에서 PEG-화합물 1의 효력에 기여한다는 가설과 일관된다.

[0942] 요약하면, PEG-화합물 1의 3주간의 처리는 간 중량 대 체중 비, 간 지질 함량 (트리글리세리드 및 콜레스테롤), 지방 침적 부위 및 NAS를 유의하게 감소시켰다. 상기 효과 이외에도, PEG-화합물 1의 6주간의 처리는 전혈 글루코스, 혈장 ALT 및 섬유증 부위를 유의하게 감소시켰다. 게다가, PEG-화합물 1의 처리는 비히클 군과 비교하여 생존율을 개선시켰다.

[0943] 결론적으로, PEG-화합물 1은 개선된 지질 및 글루코스 대사를 비롯한 항-NASH 및 항섬유증 효과를 보였다.

[0944] 실시예 17

[0945] 베타-클로토를 안정하게 발현하는 인간 배아 신장 세포에서의 PEG화된 화합물 2의 시험관내 특징화

[0946] FGF21은 그의 조직-특이적 신호전달 활성을 위해 FGF 수용체와 함께 보조수용체로서 β -클로토를 이용한다 (예를 들어, 각각 그 전문이 참조로 포함되는 문헌 [Kurosu et al., 2007, J. Biol. Chem. 282:26687-26695]; [Ogawa et al., 2007, Proc. Natl. Acad. of Sci., USA 104:7432-7437] 참조). FGF21은 먼저 β -클로토와 결합하고, 그 후에 복합체가 FGF 수용체를 활성화시켜, 수분에 걸쳐서 세포의 신호-조절 키나제 1/2 (ERK1/2)를 신속히 활성화시키는 세포내 신호전달 캐스케이드를 개시할 수 있다. 좀더 시간이 지나면, 활성화되고 포스포릴화된 ERK (pERK)가 세포 핵으로 전위될 수 있고 Elk1 (E Twenty-Six (ETS) like protein 1)이라고도 하는 삼중 복합 인자를 비롯한 수많은 전사 조절인자를 포스포릴화하고 활성화시킬 수 있다. 활성화된 Elk1은 특정 DNA 서열과 결합하는 혈청 반응 인자와 복합체를 형성하여 특정 유전자의 발현을 조절한다.

- [0947] 인간 β -클로토 및 Elk1-루시퍼라제 트랜스-리포터 구축물을 안정하게 공동-발현하는 세포주의 생산
- [0948] Elk1-루시퍼라제 트랜스-리포팅 세포주를 아길런트 테크놀로지스의 패쓰디텍트(PathDetect) Elk1 트랜스-리포팅 시스템을 이용하여 HEK293 세포에서 생산하였다. 이 시스템은 효모 전사 활성화제 단백질 Gal4로부터의 DNA 결합 도메인, 이어서 Elk1의 활성화 도메인의 융합 단백질을 발현하는 트랜스활성화제 융합 플라스미드를 갖는다. 전사 활성화제 Elk1이 FGF21에 의한 자극시 세포외 신호-조절 키나제 (ERK)에 의해 포스포릴화되고 활성화되면, 융합-활성화제 단백질이 이량체로서 GAL4 상류 활성화 서열과 결합하고 루시퍼라제 리포터 효소의 전사를 활성화시킨다. 리포터 플라스미드로부터의 루시퍼라제 발현은 융합 트랜스-활성화제 단백질의 활성화 및 그에 따라 내생성 단백질 키나제의 존재를 시사한다. 따라서, 루시퍼라제 활성화는 세포에서의 ERK의 활성화 및 상응하는 신호 전달 경로, 이 경우에는 Elk1의 활성화를 반영한다.
- [0949] HEK293 세포를 융합 트랜스-활성화제 플라스미드, 리포터 플라스미드, 및 인간 β -클로토를 코딩하는 플라스미드로 공동형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 G-418 (500 $\mu\text{g/ml}$) 및 블라스티시딘 (10 $\mu\text{g/ml}$)의 선별 하에 두었다. 이중 항생제 선별을 견뎌 낸 클론을 FGF21 구축물에 의한 자극 및 이어지는 Elk1-루시퍼라제 활성화에 의해 분석하였다. HEK Luc 클론2를 모든 추가의 분석법을 위한 세포주로서 선별하였다.
- [0950] 세포-기반 Elk1-루시퍼라제 분석법
- [0951] HEK293 Luc 클론2 세포를 96-웰 플레이트에 25,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 플레이트를 37°C의 조직 배양 인큐베이터에서 5% CO₂ 하에 2일 동안 인큐베이션하였다. 분석 당일에, FGF21 단백질의 3배 연속 희석액을 1x L-글루타민, pH 7.2 - 7.5의 10 mM Hepes, 및 10% FBS가 보충된 페놀 레드-부재 DMEM 배지로 제조하였다. 사용한 세포 배양 성장 배지를 제거하였다. 처리를 시작하기 위해, 시험 화합물이 포함된 페놀 레드-부재 DMEM 배지 50 μl 를 각각의 웰에 첨가하고 플레이트를 다시 세포 배양 인큐베이터에 넣었다. 5시간의 인큐베이션이 종료될 때, 동일한 부피의 루시퍼라제 기질 시약 혼합물을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트에 덮개를 씌워서 600 rpm의 회전 진탕기에 3분 동안 두었다. 발광을 퍼킨 엘머의 엔비전 2103 멀티플레이트 판독기에서 측정하였다.
- [0952] 데이터 분석
- [0953] 모든 개별 복제물 데이터 포인트로부터의 미가공 데이터를 그래프패드 프리즘 5 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어 인크., 미국 캘리포니아주 소재)를 이용하여 비선형 회귀 분석에 의해 분석하였다. 4 파라미터를 갖는 log(효능) vs. 반응 방정식을 사용하여 데이터를 맞추처리하였다: 최저 (최소), 최고 (최대), log EC50 (효능의 척도), 및 가변적 힐(Hill) 기울기. 효능 (EC50)은 기준선을 초과한 반응에서 절반-최대 증가를 초래하는 농도로서 정의되며, 곡선-맞춤 프로그램에 의해 계산되었다.
- [0954] 결과
- [0955] 5시간의 Elk1-루시퍼라제 분석법에서의 3종의 FGF21 변이체 (N-말단 His-태그부착된 화합물 1 (His-화합물 1), PEG-화합물 1 및 PEG-화합물 2)에 대한 대표 농도-반응 곡선과 계산된 효능 및 효력 값이 도 63 및 표 23에 나타나 있다. 5시간의 Elk1-루시퍼라제 분석법에서 3종의 변이체의 효능은 유사하였다 (표 23).
- [0956] <표 23>
- [0957] 5시간의 Elk1-루시퍼라제 분석법에서의 FGF21 변이체의 효능 및 효력

화합물	효능		효력	
	pEC50 ^a (log M)	EC50 ^b (nM)	E _{max} ^a (RLU)	% 대조군 ^c
His-화합물 1	8.99 ± 0.10	1.0 (0.8 - 1.3)	1.90E06 ± 3.9E05	100
PEG-화합물 1	8.44 ± 0.05 ^d	3.6 (3.2 - 4.1) ^d	1.60E06 ± 3.7E05	84.5 ± 19.8
PEG- 화합물 2	8.27 ± 0.16 ^d	5.4 (3.7 - 8.0) ^d	1.66E06 ± 4.5E05	87.8 ± 23.9

[0958]

[0959] ^a 평균 ± S.D.

[0960] ^b 기하 평균 (95% 신뢰 구간)

[0961] ^c 대조군은 His-화합물 1이 한정됨

^d His-화합물 1과 비교하여 $P < 0.05$, ANOVA와 터키-크레이머(Tukey-Kramer) 사후 검정.

다양한 Fc-FGF-21 융합 분자를 세포-기반 ELk1-루시퍼라제 분석법에서 비교하였다. 화합물 180 및 화합물 175를 제외한 모든 분자가 한 자릿수의 nM 효능 이하를 나타냈으며, PEG-화합물 2의 측정 효능과 유사하거나 또는 그보다 낮았다 (도 64 및 하기 표 24).

<표 24>

95% 신뢰 구간을 갖는 기하 평균 EC50 값.

	Cmpd 170	Cmpd 171	Cmpd 172	Cmpd 173	Cmpd 174	Cmpd 175	Cmpd 176	Cmpd 177	Cmpd 178	Cmpd 179	Cmpd 180	Cmpd 181	PEG-Cmpd 2
기하 평균 (nM)	3.8	1.7	1.5	1.5	3.3	14.6	1.2	1.8	1.3	2.5	164.8	0.8	5.9
평균의 95% CI 최하위값	2.8	1.0	0.6	1.2	1.3	6.1	1.0	1.4	1.0	1.2	92.9	0.6	4.9
평균의 95% CI 최상위값	5.2	2.9	3.6	1.7	8.4	34.8	1.5	2.4	1.6	5.0	291.7	1.1	7.1

실시에 18: C57BL/6J 마우스에서의 FGF-21 변이체 화합물의 아디포넥틴 수준에 대한 영향

FGF21은 지방세포로부터의 아디포넥틴 분비를 자극시키고, 아디포넥틴 수용체의 광범위한 분포가 FGF21 작용이 다른 조직으로 확장될 수 있는 잠재적인 방안을 제공하였다. 그의 항지방증 활성을 비롯하여, 천연 FGF21의 대사성 효과 대다수는 마우스에서 아디포넥틴을 필요로 하는 것으로 보고되었다 (각각 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Lin, Z. et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013)]; [Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013)]). 본 실시예는 정상인, 비당뇨병성 C57BL/6J 마우스에서 PEG-화합물 2의 단회 상승 용량이 FGF21 활성의 선택된 약력학 지표에 미치는 영향을 보고한다.

8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 하기 처리 군 (샘플 크기 $n = 10$ 마리/군): 1) 비히클, 2) PEG-화합물 2, 0.03 mg/kg, 3) PEG-화합물 2, 0.1 mg/kg, 4) PEG-화합물 2, 0.3 mg/kg, 또는 5) PEG-화합물 2, 1.0 mg/kg으로 랜덤 배정하고, 각각의 처리를 5 ml/kg으로 피하 투여하였다. 비-공복 상태에서의 투여 후에, 전체 및 고분자량 (HMW) 아디포넥틴의 정량적 측정을 위해 혈액 샘플을 원심분리하고 혈장 20 μ l를 분취하였다 (알프코 다이애그노스틱스(Alpco Diagnostics), 미국 뉴햄프셔주 세일럼 소재, cat # 47-ADPMS-E01). 혈장 글루코스 및 아디포넥틴 분석을 위해 마우스에게서 단회 급성 투여 후 24, 48, 72 및 144시간에 비-공복 상태에서 다시 채혈하였고, 체중을 각각의 채혈 전에 측정하였다.

전체 및 고분자량 (HMW) 아디포넥틴의 혈장 농도를 마우스 전체 및 HMW ELISA(Mouse Total and HMW ELISA) 키트 (알프코 다이애그노스틱스, 미국 뉴햄프셔주 세일럼 소재)에 대한 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. PEG-화합물 2의 혈장 노출을 ELISA에 의해 결정하였다. 비히클 군을 대조군으로 하여 모든 데이터의 통계 분석을 일원 ANOVA 후의 던넛 t-검정을 이용하여 수행하였다 (미국 노스캐롤라이나주 캐리에 소재하는 SAS의 JMP). 통계적 유의성은 확률 (P) < 0.05 일 때 결정되었다.

체중을 처리 후 기준선 (0), 24, 48, 72 및 144시간에 측정하였다. 기준선 (제0일)으로부터의 체중 변화의 퍼센트로 변환시키면, PEG-화합물 2의 단회 SC 투여에 대한 반응으로 유의한 용량-의존성 감소가 관찰되었다 (도 65). 체중 감소 효과의 퍼센트는 투여 후 72시간에 최대였고 6일째에 기준선 값으로 복구되기 시작하였고, 1.0 mg/kg 용량의 PEG-화합물 2에 대한 반응은 비히클 군과 비교하여 유의하게 감소하는 상태로 남아있었다. 체중은 비히클 처리 군과 비교하여, 0.3 mg/kg 처리 군에 대하여는 72시간에 ($P < 0.001$), 또한 1.0 mg/kg 처리 군에 대하여는 48시간 ($P < 0.05$), 72시간 ($P < 0.0001$) 및 144시간에 ($P < 0.001$) 유의하게 감소하였다.

혈장 총 아디포넥틴 농도는 0.1, 0.3 및 1.0 mg/kg 용량의 PEG-화합물 2 처리에 의해 투여 후 72 및 144시간에 비히클과 비교하여 유의하게 증가하였다 (도 66a). 시험한 PEG-화합물 2의 0.03 mg/kg 용량은 어떤 측정 시점에서 비히클과 비교하여 총 아디포넥틴 효과를 유의하게 증가시키지 않았다. 혈장 총 아디포넥틴은 0.1 mg/kg 처리 군에서는 72시간 ($P < 0.001$) 및 144시간에 ($P < 0.01$), 0.3 mg/kg 처리 군에서는 72시간 ($P < 0.01$) 및 144시간에 ($P < 0.01$), 또한 1 mg/kg 처리 군에서는 72시간 ($P < 0.0001$) 및 144시간에 ($P < 0.0001$) 유의하게 증가하였다.

기준선으로부터의 변화의 퍼센트로 표시하였을 때, 혈장 총 아디포넥틴 농도는 모든 용량의 PEG-화합물 2 처리에 의해 일부 시점에서 비히클과 비교하여 유의하게 증가하였다 (도 66b). 임의의 용량의 PEG-화합물 2 처리 후 24시간에는 비히클과 비교하여 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화의 퍼센트에 있어서 유의한 차이가 없었으며, 투여 후 72시간에 모든 용량의 PEG-화합물 2가 비히클과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 유발하였다. 관찰된 최대 변화는 1 mg/kg의 PEG-화합물 2 투여 후 144시간에 기준선 아디포넥틴으로부터의 변화가 75% 증가한 것이었다. 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율은 0.03 mg/kg 처리 군에서는 72시간에 ($P < 0.01$), 0.1

mg/kg 처리 군에서는 48시간 ($P<0.01$), 72시간 ($P<0.0001$) 및 144시간에 ($P<0.001$), 0.3 mg/kg 처리 군에서는 72시간 ($P<0.0001$) 및 144시간에 ($P<0.0001$), 또한 1.0 mg/kg 처리 군에서는 48시간 ($P<0.01$), 72시간 ($P<0.0001$) 및 144시간에 ($P<0.0001$) 유의하게 증가하였다.

[0974] 혈장 HMW 아디포넥틴 농도는 0.1 및 1.0 mg/kg 용량의 PEG-화합물 2 처리에 의해 비히클과 비교하여 유의하게 증가하였지만, 0.03 및 0.3 mg/kg 용량의 PEG-화합물 2는 어떤 측정 시점에서도 HMW 아디포넥틴을 비히클과 비교하여 유의하게 증가시키지 않았다 (데이터 도시되지 않음).

[0975] 처리 후 144시간에 연구가 종료될 때 측정하면, PEG-화합물 2의 혈장 농도는 활성의, 카르복시 (C)-말단 무손상 형태와 분자의 전체 형태 (무손상 및 단백질분해형) 모두에서 용량-의존적으로 증가하였다 (표 25).

[0976] <표 25>

[0977] 단회 SC 투여 후의 전체 및 C-말단 무손상 PEG-화합물 2의 혈장 농도

PEG-화합물 2의 형태	용량 (mg/kg)			
	0.03	0.1	0.3	1.0
전체 (ng/ml)	1.5 ± 0.21	12 ± 0.89	39 ± 3.2	222 ± 15
C-말단 무손상 (ng/ml)	0.40 ± 0.11	5.2 ± 0.38	19 ± 1.4	135 ± 8.6

[0978]

[0979] SC 투여 후 144시간에 C57BL/6J 마우스 혈장 중의 전체 및 C-말단 무손상 PEG-화합물 2.

[0980] 모든 값은 평균 $\pm$ S.E.M이다.

[0981] PEG-화합물 20, 화합물 105, 화합물 112, 화합물 182, 화합물 171, 화합물 170, 화합물 181, 및 PEG-화합물 1 분자에 대해서도 9-11주령의 C58BL/6J 마우스에서 유사한 프로토콜을 따랐으나, 단 총 아디포넥틴을 투여 후 기준선, 제3일 (72시간) 및 제6일 (144시간)에만 측정하였다. 화합물을 이. 콜라이에서 발현시키나, 단 화합물 181은 HEK 세포에서 발현시켰다. 모든 화합물은 시험한 특정 용량으로 제3일 및/또는 제6일에 혈장 총 아디포넥틴을 비히클과 비교하여 유의하게 증가시켰다 (도 67a-e 참조).

[0982] 0.3 mg/kg 및 1 mg/kg의 투여량에서, PEG-화합물 2 및 PEG-화합물 20은 각각 투여 후 6일에 혈장 총 아디포넥틴의 유의한 증가를 초래하였다 (1 mg/kg의 어느 한 화합물의 $P<0.001$, 0.3 mg/kg의 PEG-화합물 2의 $P<0.01$, 및 0.3 mg/kg의 PEG-화합물 20의 $P<0.05$) (도 67a).

[0983] 54.3 nmol/kg의 투여량에서, 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율은 제3일 및 제6일에 PEG-화합물 2, 화합물 105 및 화합물 112에 의해 (비히클-처리 대조군과 비교하여) 유의하게 증가하였다 (모든 데이터 포인트의 $P<0.001$ 이나, 단 제3일에 PEG-화합물 2의 $P<0.05$) (도 67b). 추가적으로, 5.43 nmol/kg 용량의 화합물 112는 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 제3일에만 비히클-처리 대조군과 하여 유의하게 증가시켰다 ($P<0.05$) (도 67b).

[0984] 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율은 18.1 nmol/kg 용량 (제3일 및 제6일 모두 $P<0.01$) 및 54.3 nmol/kg 용량 (제3일 및 제6일에 각각 $P<0.001$ 및 $P<0.05$)의 화합물 182에 의해 유의하게 증가하였다 (도 67c). 5.43 nmol/kg 용량의 화합물 182에 의한 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율의 증가는 제6일에만 유의하였다 ($P<0.05$). 추가적으로, PEG-화합물 2 (54.3 nmol/kg의 용량)는 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 제3일 및 제6일 양일 모두에만 유의하게 증가시켰다 (양일 모두 $P<0.001$) (도 67c).

[0985] 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율은 화합물 171과 화합물 181 둘다에 의해 제3일과 제6일 양일 모두에서 비히클-처리 대조군과 비교하여 용량-의존성 방식으로 유의하게 증가하였다 (모든 데이터 포인트의 $P<0.001$ 이나, 단 5.43 nmol/kg 용량의 화합물 181의 제6일의 $P<0.01$) (도 67d). 추가적으로, PEG-화합물 2 (54.3 nmol/kg의 용량)는 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 제3일과 제6일 양일 모두에 유의하게 증가시켰다 (양일 모두 $P<0.001$) (도 67d).

[0986] 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율은 18.1 nmol/kg (제3일과 제6일 양일 모두 $P<0.01$) 및 54.3 nmol/kg (제3일 $P<0.05$ 및 제6일 $P<0.001$)의 화합물 170에 의해 제3일 및 제6일에 유의하게 증가하였고; 5.43 nmol/kg의 용량에 대한 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율의 증가는 제6일에만 유의하였다 ($P<0.05$) (도 67e). 추가적으로, PEG-화합물 2 (54.3 nmol/kg의 용량)는 제3일과 제6일 양일 모두에 혈장 총 아디포넥틴의

변화 백분율을 유의하게 증가시켰다 (양일 모두 $P < 0.001$) (도 67e).

[0987] 혈장 총 아디포넥틴의 기준선으로부터의 변화 백분율은 10 mg/kg 용량의 화합물 1에 의해 제3일 및 제6일에 유의하게 증가하였다 (양일 모두 $P < 0.001$). 추가적으로, PEG-화합물 2 (1 mg/kg)는 혈장 총 아디포넥틴의 변화 백분율을 제6일에 유의하게 증가시켰다 ($P < 0.001$) (도 67f).

[0988] 실시예 19: db/db 마우스에서의 당뇨병성 신장 질환에 대한 영향

[0989] 신장절제 (unix) db/db 마우스는 당뇨병성 신장 질환 (DKD)의 설치류 모델로서, 한쪽 신장의 제거 수술이 2형 당뇨병으로 인한 신장 손상 및 기능장애를 악화시키고 가속시킨다 (그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Ninichuk et al., Eur J Med Res 12:351-355 (2007)]).

[0990] 4주 연구

[0991] 이 연구에서는, 8주령의 db/db 마우스를 5% 이소플루란으로 마취시켜 좌측 신장절제술을 실시하여 당뇨병성 신증의 발병이 빨라지게 하였다. 한쪽의 신장절제술 후 3주에, 14마리의 신장절제 마우스 군을 요중 알부민 대 크레아티닌 비 (uACR), 혈중 글루코스, 및 체중에 이 순서대로 기반한 랜덤 배정으로, PEG-화합물 2 또는 비히클 처리에 분배하였다. db/m 정상군 마우스 군 ($n=12$)은 비당뇨병성 정상 대조군으로서 배정하였다. 신장절제 db/db 마우스에서 PEG-화합물 2 또는 비히클의 처리는 수술 후 3주에 시작하였다. 0.15 mg/kg의 PEG-화합물 2를 250 mM 수크로스, 20 mM 트리스 (pH 8.3)를 함유하는 비히클 중에 피하 (SC) 주사에 의해 1주마다 2회 (BIW) 투여하였다. 기준선 혈액 샘플을 5% 이소플루란으로 마취시켜 후안와 채혈을 통해 수집하였다. 요중 글루코스, 알부민 및 크레아티닌의 측정을 위해 3시간의 다회 수시뇨 수집물을 각각의 마우스로부터 기준선에서, 그리고 2, 3 및 4주의 처리 후에 획득하였다.

[0992] 마우스를 4주의 처리 후에 이소플루란 마취시켜 희생시켰다. 달리 지시되지 않는 한, 데이터의 통계 분석을 일원 분산분석법 (ANOVA) 후의 던넛 검정에 의해 수행하였다 (JMP 통계 분석 소프트웨어, SAS, 미국 노스캐롤라이나주 캐리 소재). 통계적 유의성은 확률 (P) < 0.05 일 때 결정되었다. unix db/db 비히클 군 중에서 4마리의 마우스가 중증의 신우신염을 나타냈기 때문에, 이들 마우스는 데이터 분석에서 배제시켰다 (사료 및 물 소비량은 예외로 함).

[0993] PEG-화합물 2 및 비히클 군은 처리 전 기준선에서 유사한 수준의 혈장 글루코스를 나타냈다 (765 ± 42 vs 815 ± 46 , $P > 0.05$). 4주의 처리 후에 연구가 종료될 때는, PEG-화합물 2 군의 혈장 글루코스가 비히클 군보다 23% 더 낮았다 (485 ± 39 vs 629 ± 43 , $P < 0.05$) (표 26 참조).

[0994] <표 26>

[0995] PEG-화합물 2의 처리는 혈중 글루코스 (mg/dL)^a를 낮춤.

군	기준선 혈중 글루코스	종점 혈중 글루코스
정상군	194.9 ± 6.4	181.0 ± 19.5
Unix db/db, 비히클	814.8 ± 45.6^b	628.6 ± 39.0^b
Unix db/db, PEG-화합물 2	628.6 ± 39.0^b	485.2 ± 42.5^c

[0996]

[0997] a. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M.으로서 표시됨.

[0998] b. $P < 0.05$, 질환 (unix db/db, 비히클, $n = 9$) vs. 정상 (db/m 정상군, $n = 10$).

[0999] c. $P < 0.05$, PEG-화합물 2 ($n = 14$) vs. 비히클 ($n = 9$).

[1000] PEG-화합물 2의 처리를 개시한 후에, 요중 글루코스 수준은 점차적으로 감소하였다. PEG-화합물 2 군의 요중 글루코스 수준은 2, 3 및 4주의 처리로 비히클 군과 비교하여 각각 71%, 73% 및 84%의 유의한 감소를 보였다 (모두 $P < 0.05$; 표 5).

[1001] <표 27>

[1002] PEG-화합물 2는 요중 글루코스 (mg/dL)^a를 감소시킴.

군	2 주 투여	3 주 투여	4 주 투여
정상군	17 ± 3	12 ± 1	40 ± 5
Unix db/db, 비히클	8719 ± 694 ^b	8550 ± 204 ^b	9796 ± 378 ^b
Unix db/db, PEG-화합물 2	2537 ± 818 ^c	2284 ± 715 ^c	1565 ± 410 ^c
% 감소	71%	73%	84%

[1003]

[1004] a 데이터는 평균 ± S.E.M으로서 표시됨.

[1005] b P < 0.05, 질환 (unix db/db, 비히클, n = 9-10) vs. 정상 (db/m 정상군, n = 10-12).

[1006] c P < 0.05, PEG-화합물 2 (n = 13-14) vs. 비히클 (n = 9-10).

[1007] 미세알부민뇨 (요중 알부민 대 크레아티닌 비 (uACR) > 30 µg/mg)는 당뇨병 환자에서 초기 신증의 가장 민감하고 특이적인 지표 중 하나인 것으로 문헌에서 보고되었다 (그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Chae et al., J Korean Med Sci. 2012; 27: 784-787] 참조). 미세알부민을 3시간의 수시뇨 수집물로부터 측정하고, 그 값을 요중 크레아티닌에 대하여 정규화하였다. 비당뇨병성 db/m 정상군 마우스는 연구 과정 동안에 21 내지 37 µg/mg 범위의 평균 uACR 값을 가졌다 (도 68 및 표 28).

[1008] 연구 동안에, unix db/db 마우스의 uACR은 비당뇨병성 정상군 db/m 마우스와 비교하여 23배 내지 62배로 유의하게 증가하였다 (모두 P < 0.05) (도 68 및 표 28). 비히클-처리 군의 uACR은 기준선에서의 838 ± 159 µg/mg에서 4주 후의 1341 ± 284 µg/mg으로 진행되었고 (표 28), 이는 점진적인 신장 손상과 일관된다.

[1009] 비히클 군과 비교하여, PEG-화합물 2-처리 unix db/db 마우스는 uACR 값이 2, 3 및 4주의 처리로 각각 49%, 53% 및 66%의 유의한 감소를 보였다 (모두 P < 0.05; 도 68). PEG-화합물 2 처리 후의 uACR 값은 처리 전 기준선에서 측정된 값보다 낮았다 (표 28).

[1010] <표 28>

[1011] PEG-화합물 2는 uACR (µg/mg)^a을 감소시킴.

군	기준선	2 주 투여	3 주 투여	4 주 투여
정상군	36.7 ± 2.6	26.3 ± 4.3	21.4 ± 2.7	30.1 ± 2.8
Unix db/db, 비히클	838.2 ± 159.4 ^b	1060.2 ± 256.9 ^b	1319.9 ± 282.3 ^b	1341.3 ± 283.5 ^b
Unix db/db, PEG-화합물 2	865.8 ± 170.8	538.5 ± 107.5 ^c	616.1 ± 145.2 ^c	460.6 ± 92.7 ^c

[1012]

[1013] 신장 습윤 중량은 진성 당뇨병에서의 과여과로 인한 신장 비대 상태를 반영한다. 평균 신장 중량은 비당뇨병성 정상군 마우스와 비교하여 unix db/db 마우스에서 유의하게 크고, 비히클로 처리한 unix db/db 마우스의 신장 중량이 59%의 증가를 나타냈다. 4주간의 PEG-화합물 2의 처리는 당뇨병 마우스에서 신장 중량 증가를 유의하게 억제하였다 (286 ± 6.3 vs. 253 ± 7.4, 비히클 vs. PEG-화합물 2, P < 0.05).

[1014] 8주 연구

[1015] 8주령의 db/db 마우스를 산소 중 3% 이소플루란 하에 좌측 신장절제술을 실시하여 당뇨병성 신증의 발병을 가속시켰다. 한쪽 신장절제술 후 3주에, 14마리의 신장절제 마우스 군을 요중 알부민 대 크레아티닌 비 (uACR), 혈중 글루코스, 및 체중에 이 순서로 기반하여 블록화 랜덤 배정하여, 0.15 mg/kg 또는 0.015 mg/kg의 PEG-화합물 2 또는 비히클 처리에 분배하였다. db/m 정상군 마우스 군 (n=11)은 비당뇨병성 정상 대조군으로서 배정하였다. unix db/db 마우스에서 0.15 또는 0.015 mg/kg의 PEG-화합물 2 또는 비히클의 1주마다 2회 피하 처리를 수술 후 3주에 시작하였다. 마우스를 8주의 처리 후에 산소 중 3% 이소플루란 하에 경추 파열법에 의해 희생시켰다. 신장을 적출하여, 탈캡슐화한 다음, 중량을 측정하였다.

[1016] 0.015 mg/kg 용량 군은 유의한 혈중 글루코스 강하 또는 신장 파라미터의 개선을 보이지 않았다. 0.15 mg/kg 용량의 PEG-화합물 2는 비히클-처리 마우스와 비교하여, 혈중 및 요중 글루코스 수준을 유의하게 강하시켰고 알부민뇨를 약 50% 감소시켰다 (모두 P < 0.05). 염증 및 섬유증 유전자 군은 정상군 마우스에 비해 신장절제

db/db 마우스의 신장에서 유의하게 상향 조절되지만, 0.15 mg/kg의 PEG-화합물 2의 처리가 이들 유전자의 발현을 정상군 db/m 대조군 마우스에서 관찰되는 수준으로 유의하게 감소시켰다. 평균 신장 습윤 중량 역시 정상군 마우스와 비교하여 신장절제 db/db 마우스에서 유의하게 크지만, 57일간의 0.15 mg/kg의 PEG-화합물 2 처리가 비히클과 비교하여 평균 신장 습윤 중량을 유의하게 감소시켰다.

[1017] 신장의 중간에 있는 1/3로부터의 절편을 조직학 분석을 위해 헤마톡실린-에오신으로 염색하였다. 신장 병변을 표 29의 주석에서 한정된 기준에 따라 등급을 나누었다. 모든 unix db/db 마우스는 이 모델의 예상 표현형인 메산지움 사구체병증을 나타냈다 (표 29). 0.15 mg/kg의 PEG-화합물 2의 처리는 메산지움 사구체병증의 중증도를 감소시키는 것으로 보였지만, 0.015 mg/kg에서는 그렇지 않았다. 소수의 unix db/db 마우스는 사구체병증에 대하여 이차적인 관상-간질성 병변을 나타내고, 이는 이 모델의 기본이 되는 발병기전과 연관된다.

[1018] 이러한 관찰 결과는 0.15 mg/kg의 PEG-화합물 2가 만성 2형 당뇨병의 환경에서 신장보호성임을 나타내는 증거를 제공한다.

[1019] <표 29>

[1020] PEG-화합물 2: 신장 병변의 발생 및 등급.

	처리 (mg/kg)	0 (비히클 대조군)	0.015	0.15
	마우스의 마리수	9	8	9
위치	등급			
사구체 ^a		9	8	9
	1	1	1	6
	2	5	2	3
	3	3	5	-
관 / 간질 ^b		3	3	4
	1	2	2	4
	2	1	1	-
신우 ^c		2	1	2
	1	2	-	1
	2	-	1	1

[1021]

[1022] a 사구체 메산지움 팽창은 초점성 또는 미만성이고, 또한 분절성 또는 구형성이다. 등급 2는 메산지움 팽창을 갖는 사구체가 >50%의 추정값을 갖고/거나 적어도 1개의 사구체에서 추가적 메산지움, 모세혈관, 상피, 또는 사구체낭 병변을 갖는 것에 기반하고; 등급 3은 이들 추가적 사구체 병변 중에서 하나를 초과하여 갖는 것에 기반한다.

[1023] b 관상 병변은 확장, 위축 및/또는 과형성을 포함하고; 간질성 병변은 전형적으로 사구체 병변과 연관있으며 최소 염증 또는 국부적인 관주위 섬유증에 의해 특징화된다. 등급 1은 초점성이고; 등급 2는 2 내지 4개의 병소를 갖는 다초점성이다.

[1024] c 화농성 염증; 등급 1은 신우 상피로 한정된 염증에 기반하고; 등급 2는 수질 또는 신우주위 피질로 확장된 것에 기반한다.

[1025] 실시예 20. 이소프로테레놀 주입 Balb/C 마우스에서의 심장 비대 및 심장성 섬유증에 대한 영향

[1026] 이소프로테레놀 (Iso)-주입 Balb/c 마우스는 심장성 섬유증 및 비대의 설치류 모델이다.

[1027] 10 내지 12주령의 수컷 Balb/c 마우스를 약물 투여 전 체중에 기반하여 랜덤 배정하였다. Iso 또는 비히클 (식염수 중의 0.02% 아스코르브산)을 삼투압 미니펌프를 통해 3주 동안 피하 투여하였다. 마우스에 0.5 mg/kg의 PEG-화합물 2 또는 비히클을 3주에 걸쳐서 1주마다 2회 (BIW) 동시에 투여하였다. 그 후에, 동물을 안락사시키고, 심장을 거대 혈관에서 적출하여 심실 내 혈액을 제거하기 위해 가볍게 블롯팅한 다음, 중량을 측정하였다. 각 군에서 남아있는 24마리의 마우스로부터, 히드록시프롤린 (HP) 분석을 위해 전체 심장을 드라이 아이스 상에서 냉동시키고 ≤ -70℃에서 저장하였다.

[1028] 심장 HP 함량 (심장성 섬유증 평가변수) 분석을 총 콜라겐 분석 키트를 사용하여 제조사 (퀵자임 바이오사이언시즈(Quickzyme Biosciences), 네덜란드 소재)의 지시에 따라 수행하였다 .

[1029] 3주의 생존기가 종료될 때, 전체 심장 HP 함량을 측정하였다. 정규화된 HP 함량은 모의 대조군 + 비히클 군 ($9.96 \pm 0.38 \mu\text{g}/\text{mg}$)과 비교하여 Iso + 비히클 군 ($21.35 \pm 0.81 \mu\text{g}/\text{mg}$)에서 114% 증가하였다 ($P < 0.05$). 이는 심장성 섬유증이 Balb/c 마우스에서 Iso 주입에 대한 반응으로 확립되었다는 것을 시사한다. Iso + PEG-화합물 2 ($0.5 \text{ mg}/\text{kg}$)를 투여받은 마우스의 심장 HP 함량 ($15.91 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{mg}$)은 Iso + 비히클 동물보다 유의하게 적었다 (도 69 및 표 30). 따라서, 예방 모드에서 투여되었을 때, PEG-화합물 2 ($0.5 \text{ mg}/\text{kg}$)는 심장 비대 및 섬유증의 정도를 감소시켰다.

[1030] <표 30>

[1031] 이소프로테레놀 및 PEG-화합물 2의 3주 처리에서의 심장 HP 함량. 데이터는 단백질에 대하여 정규화된 전체 심장 HP 함량을 나타냄. 모든 값은 평균 $\pm$ S.E.M임. *: $P < 0.05$, vs 모의 대조군 + 비히클, **: $P < 0.05$, vs Iso + 비히클 (일원 ANOVA 후의 본페로니 검정).

	모의 대조군 + 비히클 (n)	Iso + 비히클 (n)	Iso + PEG-Cmpd 2 (n)
히드록시프로린/단백질 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	9.96 ± 0.38 (20)	21.35 ± 0.81 (19)*	15.91 ± 0.49 (20)**

[1032]

[1033] PEG-FGF21 변이체의 3주 처리를 개시하기 전에 1주 동안 Iso를 이미 주입하였던 Balb/c 마우스에서 $0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 PEG-화합물 2가 예비-확립된 심장 비대 및 섬유증을 지연 진행 또는 반전시킬 수 있는지를 결정하기 위해 개입 연구를 수행하였다. PEG-화합물 2 ($0.5 \text{ mg}/\text{kg}$)의 개입은 좌심실 (LV) 질량 (심장 초음파에 의해 평가되는 심장 비대 평가변수)의 24% 감소를 초래하였다. 이러한 관찰 결과는 유의한, 체중의 14% 감소 및 아디포넥틴 순환 수준의 23% 상승과 연관있다. 심장성 섬유증 (HP 함량) 또는 수축기 심장 기능 (심장 초음파에 의해 측정됨)에 있어서 Iso + 비히클과 Iso + PEG-화합물 2 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

[1034] 실시예 21: 건강한 대상체에서의 PEG-화합물 2의 안전성, 내성, 약동학 및 약력학을 평가하는 랜덤 배정, 위약 대조, 단회 및 반복 상승 용량 연구

[1035] 연구는 3개 부분으로 이루어진다: 파트 A: 단회 상승 용량 (SAD); 파트 B: 다회 상승 용량 (MAD); 및 파트 C: 일본인 대상체에서의 다회 상승 용량 (J-MAD). PEG-화합물 2 또는 위약을 맹검 처리로서 피하 주사에 의해 투여하였다. 파트 A의 대상체는 맹검 처리의 단회 용량을 투여받고, 파트 B 및 C의 대상체는 맹검 처리의 다회 용량을 받는다.

[1036] SAD에서는 PEG-화합물 2의 출발 용량으로 0.6 mg 이 선택되었다. 예상 유효 용량 범위의 상한값을 분석하기 위해 SAD에서는 60 mg 의 최고 용량을, 그리고 MAD에서는 60 mg 의 매주 투여를 또한 선택하였다. SAD 군의 대상체는 PEG-화합물 2를 0.6 mg , 2 mg , 6 mg , 20 mg , 40 mg 또는 최대 60 mg 의 용량으로 투여받을 수 있었다. MAD 군의 대상체는 2 mg , 6 mg , 20 mg , 40 mg 또는 60 mg 의 용량을 매주 투여받을 수 있었다 (QW 또는 BIW).

[1037] 30 내지 40 (파트 A 및 B) 또는 20 내지 35 (파트 C)의 BMI를 가지며 21-55세인 건강한 남성 및 여성 대상체가 포함될 수 있었다.

[1038] 1차 평가변수:

[1039] 목적 (건강한 대상체에서의 PEG-화합물 2의 단회 및 다회 피하 투여의 안전성 및 내성 평가)이 하기 안전성 평가변수에 의해 판단될 것이다: AE, 심각한 AE, 및 주사 부위의 평가를 비롯한 특별한 관심 사건, 중단 및 사망으로 이어지는 AE의 발생 뿐만 아니라, 임상 실험실 시험, 활력 징후 측정, ECG, 연구 의약의 최종 투여 후 30일까지 진행되는 신체 검사에서의 현저한 이상 발생.

[1040] 2차 평가변수:

[1041] 파트 A: 단회 용량 처리 당일과 단회 투여 후 최대 4주의 워시아웃(washout) 동안의 C-말단 무손상 PEG-화합물 2의 혈청 농도 vs. 시간 데이터로부터 유래된 단회 용량 약동학 파라미터 (C_{max} , T_{max} , $\text{AUC}(0-T)$, $\text{AUC}(\text{INF})$, T_{HALF} , 및 CLT/F).

[1042] 파트 B 및 C: 첫번째 투여와 최종 투여 후의 PEG-화합물 2의 혈청 농도 vs. 시간 데이터로부터 유래된 다회 용

량 약동학 파라미터 (C_{max} , T_{max} , AUC(TAU) 및 축적 지수 (AI)). T_{-HALF} 는 최종 투여에 대해서만 계산될 것이다. PEG-화합물 2의 최저 혈청 농도 ($C_{최저}$)는 22일의 처리 과정 및 최종 투여 후 최대 4주 동안 선택된 날에 얻어질 것이다.

[1043] 실시예 22. NASH 마우스 모델에서의 PEG-화합물 1, PEG-화합물 2 및 화합물 170의 평가

[1044] 3종의 FGF-21 변이체로서, PEG-화합물 1, PEG-화합물 2 및 화합물 170을 상기 실시예 13에 기재된 바와 같이, 스텔릭 인스티튜트의 2-히트 NASH 모델에서 시험하였다. NASH를 40마리의 수컷 마우스에서 출생 후 2일에 스트렙토조신 용액 200 μ g을 단회 피하 주사하여 유발하였고, 4주령 이후부터 고지방식 (HFD, kcal 기준 57% 지방)을 먹였다 ("STAM 마우스"). 마우스에 3 mg/kg의 PEG-화합물 1 (n=8), 0.5 mg/kg의 PEG-화합물 2 (n=8), 2.5 mg/kg의 화합물 170 (n=8), 또는 비히클 (20 mM 트리스/250 mM 수크로스, pH 8.3) (n=8)을 7주령부터 9주령까지 1주마다 2회 피하 경로에 의해 투여하였다. 이들 마우스를 다양한 분석을 위해 9주령이 되면 희생시켰다. 8마리 마우스의 또 다른 군은 기준선 대조군으로서 기능하였고, 이들 마우스는 7주령일 때 희생시켰다.

[1045] 전체 및 고분자량 (HMW) 아디포넥틴의 농도를 마우스로부터 제조한 종점 혈청 샘플 중에서 시판되는 ELISA 키트 (Alpco 카탈로그 번호 47-ADPMS-E01)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 비히클 군과 비교하여, 3종의 FGF21 변이체는 모두 혈청 총 아디포넥틴 (도 70a) (PEG-화합물 1, PEG-화합물 2 및 화합물 170의 $p<0.0001$), 혈청 HMW 아디포넥틴 (도 70b) (PEG-화합물 1의 $p<0.005$; 및 PEG-화합물 2 및 화합물 170의 $p<0.0001$), 및 HMW/총 아디포넥틴 비 (도 70c) (PEG-화합물 1의 $p<0.05$; 및 PEG-화합물 2 및 화합물 170의 $p<0.01$)를 유의하게 증가시켰다.

[1046] 체중, 간 중량, 간 트리글리세리드, 간 콜레스테롤, 및 혈장 글루코스, 트리글리세리드 및 ALT 수준을 결정하였다. 3종의 FGF21 변이체는 모두 체중 (도 72a), 간 중량 (도 72b), 간 중량 대 체중 비 (도 72c), 간 트리글리세리드 (도 72d), 및 혈장 ALT (도 72e)를 유의하게 감소시켰다. PEG-화합물 2 및 화합물 170은 간 콜레스테롤 (도 72f)을 유의하게 감소시켰고, PEG-화합물 2는 혈장 트리글리세리드 (도 72g)를 유의하게 감소시켰다. 이 연구에서 화합물은 혈장 콜레스테롤 또는 글루코스를 유의하게 감소시키지 않았다 (데이터 도시되지 않음).

[1047] 실시예 23. ob/ob 마우스에서의 PEG-화합물 2 및 화합물 170의 3주간의 BIW 투여 평가

[1048] PEG화된 화합물 2 및 화합물 170을 21일의 반복 투여 연구에서 평가하였다. 결과는 두 화합물이 모두 비히클과 비교하여 간 중량의 감소 및 좌측 간엽에서의 간세포 지방증의 용량-의존성 감소를 유발한다는 것을 입증하였다.

[1049] 8주령의 수컷 ob/ob 마우스 (잭슨 래보러토리즈, 미국 메인주 바 하버 소재)를 실시예 12에 기재된 바와 같이 5개 군으로 랜덤 배정하였다. 마우스에 비히클, PEG화된 화합물 2 및 화합물 170을 하기와 같이 1주마다 2회 (BIW) 피하 투여하였다 (각 군의 n=12): 1) 비히클 (250 mM 수크로스/20 mM 트리스, pH 8.3); 2) PEG화된 화합물 2, 8.14 nmol/kg (0.15 mg/kg); 3) 화합물 170, 8.14 nmol/kg; 4) PEG화된 화합물 2, 81.45 nmol/kg (1.5 mg/kg); 및 5) 화합물 170, 81.45 nmol/kg. 체중, 혈장 글루코스, 트리글리세리드, 인슐린, 비에스테르화 지방산 (NEFA), β -OH-부티레이트, 총 아디포넥틴, 및 고분자량 (HMW) 아디포넥틴을 식후 상태에서 21일의 투여 기간 동안에 결정하였다. 전혈 중의 당화 헤모글로빈 (HbA1c)을 연구 시작점 및 종말점에서 결정하였다. 간 중량 및 간 트리글리세리드를 연구 종말점에서 결정하였다. 간 조직화법을 좌측 간엽에 대하여 수행하여 간세포 지방증을 평가하였다. 조직을 10% 완충 포르말린으로 고정시키고 조직화법을 위해 프로세싱하였다. 파라핀-포매 조직의 절편을 표준 방법을 사용하여 헤마톡실린-에오신으로 염색하였다. 각 처리 군에서 6마리의 마우스를 먼저 평가하였다 (총 = 30마리 마우스). 간세포 지방증 (소수포성 및 대수포성 지방 변화)은 대부분이 대조군 마우스에서는 II/III 구역으로 한정되며; 이러한 지방증 크기를 임의로 등급 (점수) 2로 지정하였다. 다른 샘플을 맹검 방식으로 등급을 나누었다 (등급 0은 관찰된 지방증이 최저 수준일 때 지정됨). 또한, 지질-함유 동양혈관주위 세포, 가능하게는 정상 (이토(Ito)) 세포가 PEG-화합물 2 또는 화합물 170으로 처리한 마우스에서 관찰되었지만, 비히클에서는 그렇지 않았고, 여기서는 이토 세포가 간세포 지방증에 의해 불분명해졌다. 이토 세포의 존재비를 맹검 방식으로 평가하였고 (카운팅 없이), 각각의 샘플을 임의로 등급을 나누어 반-정량적 평가를 제공하였다 (점수 3은 최고 존재비를 나타냄).

[1050] 두 화합물의 두 용량은 모두 식후 글루코스를 정상혈당 수준으로 유의하게 감소시켰고 (데이터 도시되지 않음), 혈장 인슐린 및 HbA1c를 유의하게 감소시켰다 (데이터 도시되지 않음). 비히클과 비교하여 고분자량 (HMW) 아디포넥틴의 유의한 증가가 용량-의존성 추세로 제8일부터 제21일까지 관찰되었고, 반면에 혈장 총 아디포넥틴은 비히클과 비교하여 약간의, 그러나 일관적이지 않은 증가를 나타냈다 (데이터 도시되지 않음). 혈장 NEFA 및

β -OH-부티레이트는 둘다 비히클과 비교하여 두 화합물 (특히 고용량일 때)에 의해 증가하였고 (데이터 도시되지 않음), 이는 증가한 지방산 산화를 시사한다. 절대 간 중량과 체중에 대하여 보정된 간 중량 둘다에 있어서 유의한 감소가 모든 처리 군에서 제21일에 관찰되었다 (도 71a 및 71b). 구체적으로, FGF-21 변이체로 처리한 4개 군 모두에서, 절대 간 중량은 비히클 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였고 ($p<0.0001$), 보다 고용량의 PEG-화합물 2가 보다 저용량의 화합물과 비교하여 절대 간 중량을 유의하게 감소시켰다 ($p<0.05$) (도 71a). 추가적으로, FGF-21 변이체로 처리한 4개 군 모두에서, 간 중량 대 체중 비는 비히클 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p<0.0001$) (도 71b). 간세포 지방증의 중증도에 있어서는 용량-의존성 감소가 비히클과 비교하여 PEG-화합물 2 또는 화합물 170으로 처리한 마우스에서 관찰되었다 (표 31). 지질-함유 동양혈관주위 세포 (가능하게는 이토 또는 간 정상 세포)는 PEG-화합물 2 및 화합물 170 처리 마우스로부터의 절편에서 관찰되었지만 (표 32), 이들 세포는 비히클-처리 마우스로부터의 절편에서는 간세포 지방증의 간섭 때문에 보이지 않을 수 있었다. 이토 세포의 두드러짐 정도가 용량-의존성으로 감소하는 것이 PEG-Cmpd 2 또는 화합물 170으로 처리한 마우스로부터의 절편에서 관찰되었다.

<표 31>

ob/ob 마우스에서의 간세포 지방증 (지방 변화) 발생 및 조직학 점수

		비히클	PEG-Cmpd 2 (8.14 nmol/kg)	Cmpd 170 (8.14 nmol/kg)	PEG-Cmpd 2 (81.45 nmol/kg)	Cmpd 170 (81.45 nmol/kg)
점수	No.	6	6	6	6	6
0		-	-	1	6	6
1		-	6	5	-	-
2		6	-	-	-	-

<표 32>

ob/ob 마우스에서의 지질-함유 동양혈관주위 세포 발생 및 조직학 점수

		비히클	PEG-Cmpd 2 (8.14 nmol/kg)	Cmpd 170 (8.14 nmol/kg)	PEG-Cmpd 2 (81.45 nmol/kg)	Cmpd 170 (81.45 nmol/kg)
점수	No.	6	6	6	6	6
0		ND	-	-	1	-
1		ND	-	1	4	1
2		ND	-	-	1	5
3		ND	6	5	-	-

도면

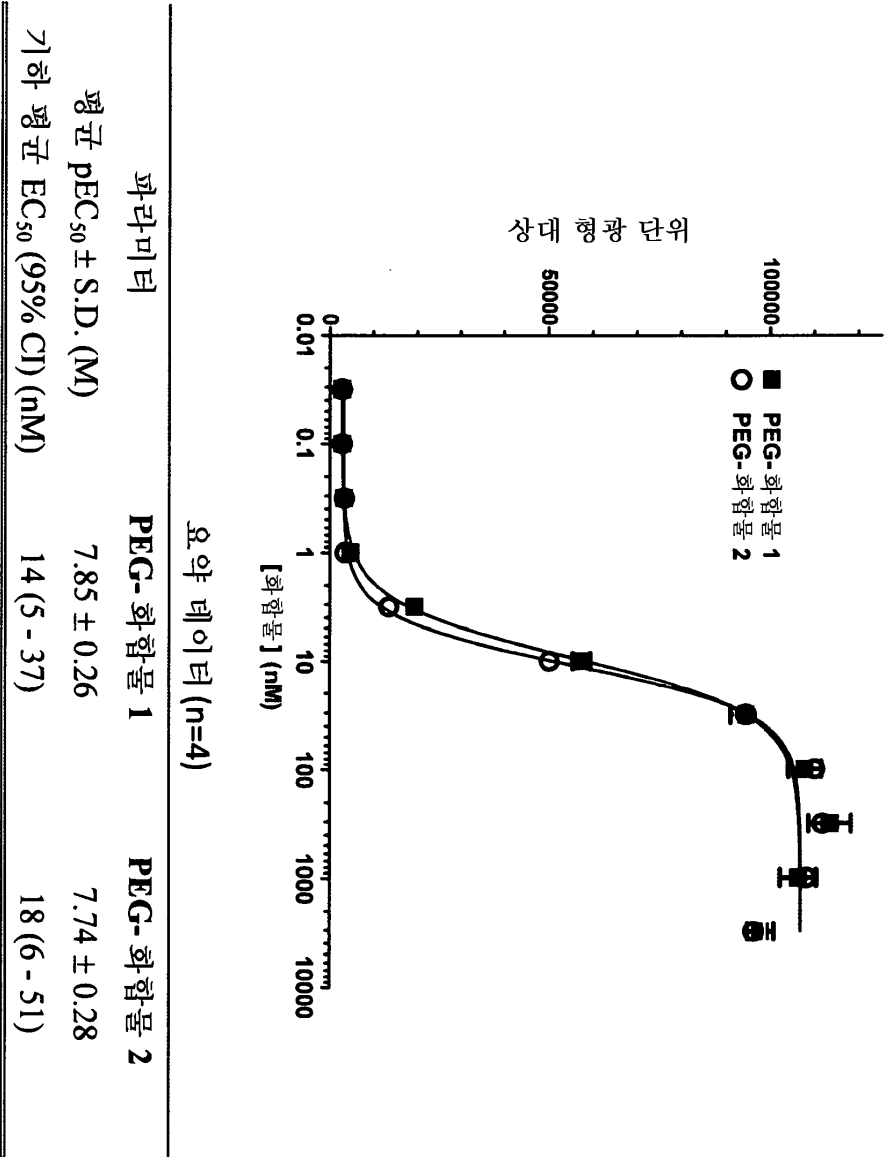
도면1a

화합물명	SEQ ID NO:	아미노산	PEG Mol. Wt.	아미노산 109-149	아미노산 169-181
화합물 1	101	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
화합물 2	102	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 3	103	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 4	104	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKKS PHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 5	105	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 6	106	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS PHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 7	107	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS PHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 8	108	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----ARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 9	109	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGQKS PHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 10	110	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG-----GPARFTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 11	111	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSGH--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 12	112	Q	n/a	SEAHGLPLHLPHHSG--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 13	113	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKDS--QDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 14	114	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 15	115	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 16	116	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 17	117	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 18	118	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKS PHRDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEP-----
화합물 19	119	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSGP-HRDP A RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 20	120	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GGH--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 21	121	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG--RDPA RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 22	122	Q	n/a	SEAHGLPLHLGSG-----PAP RGPARTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 23	123	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GG-----GPAR FTLPLPGI PPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

도면1b

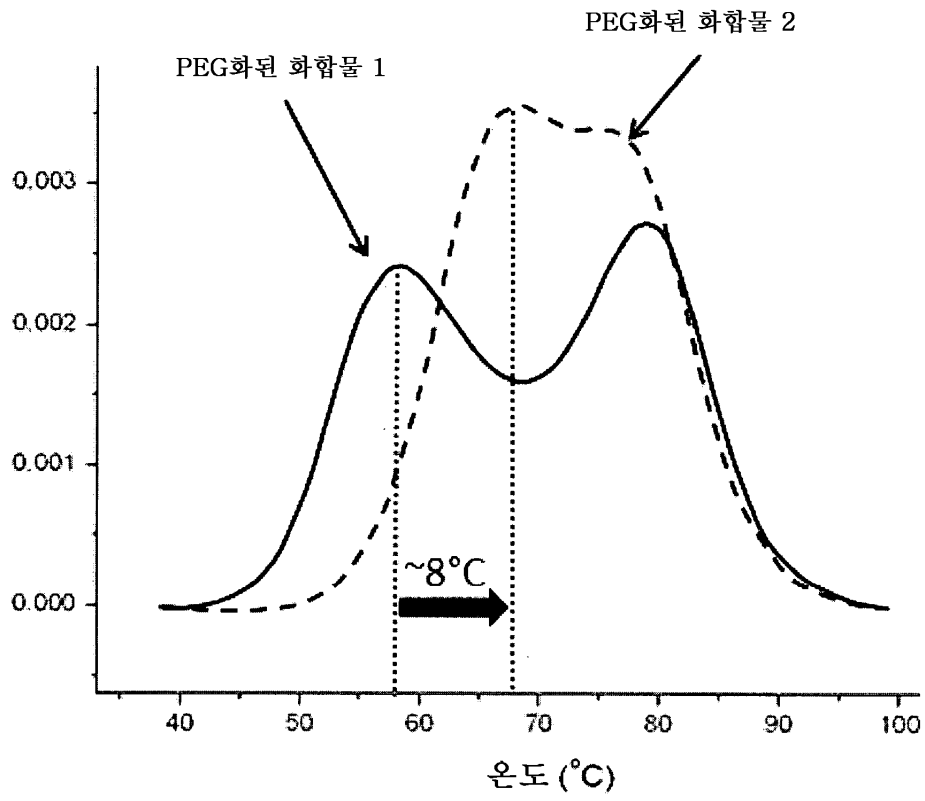
화합물명	SEQ ID NO:	아미노산	PEG Mol. Wt.	아미노산 109-149	아미노산 169-181
화합물 24	124	Q	n/a	SEAHGULPLHLPG-----G--RFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 25	125	Q	n/a	SEAHGULPLHLPG-----G--RFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 26	126	Q	n/a	SEAHGULPLH--SGG-----PARPGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 27	127	Q	n/a	SEAHGULPLH--GSG-----GPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 28	128	Q	n/a	SEAHGULP-H--CG-----RFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 29	129	Q	n/a	SEAHGULP-H--SGG-----RFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 30	130	Q	n/a	SEAHGULP-H--GSG-----RFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 31	131	Q	n/a	SEAHGULPLHL--GSG-----GPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
화합물 32	132	Q	n/a	SEAHGULPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 1	201	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 2	202	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSG-----RGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 5	205	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHLPGDKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 6	206	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 10	210	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSG-----GPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 11	211	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSGH--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 12	212	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHLPHSG--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 19	219	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSGP--HRDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 20	220	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSGH--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 21	221	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--GSG--RDPAPRGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 22	222	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHLISG-----PARPGPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
PEG화린 화합물 23	223	PAF	30 kDa	SEAHGULPLHL--G--GPARFLPLPGLPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

도면2

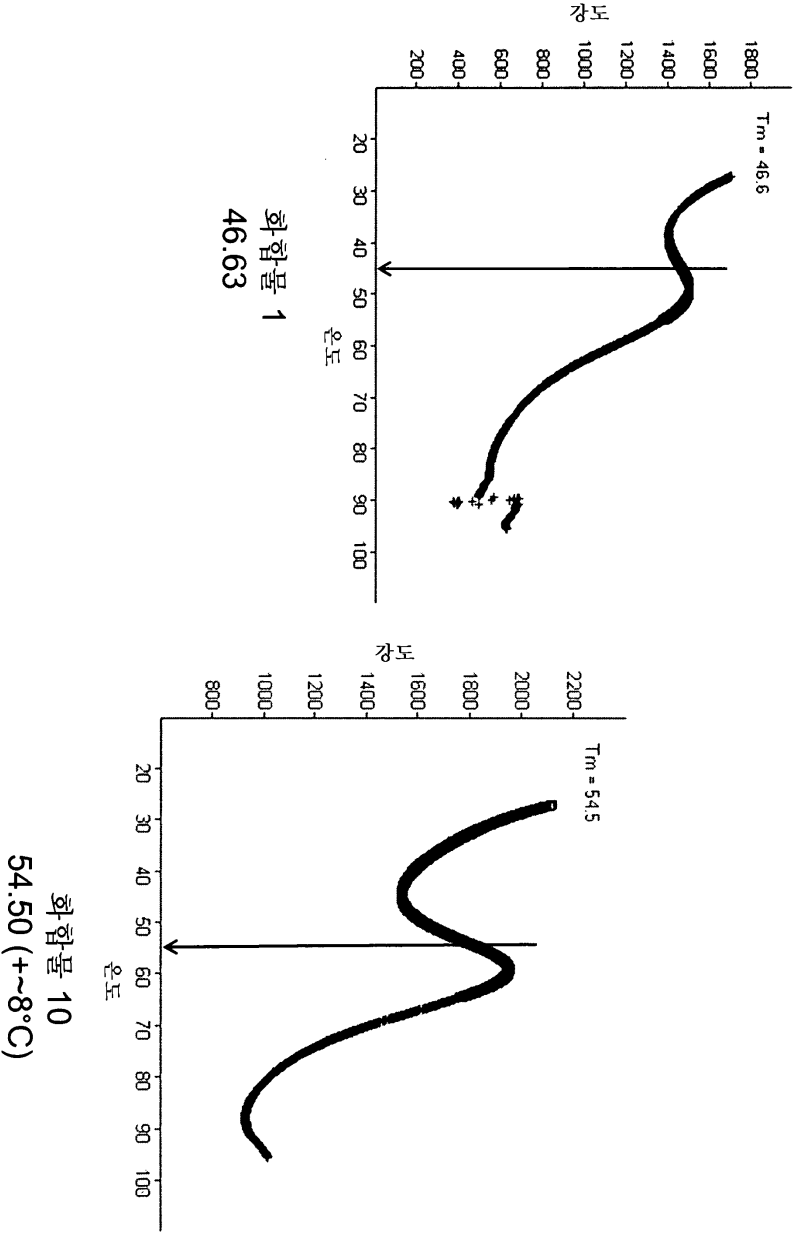


도면3

시차 주사 열량측정법 (DSC)

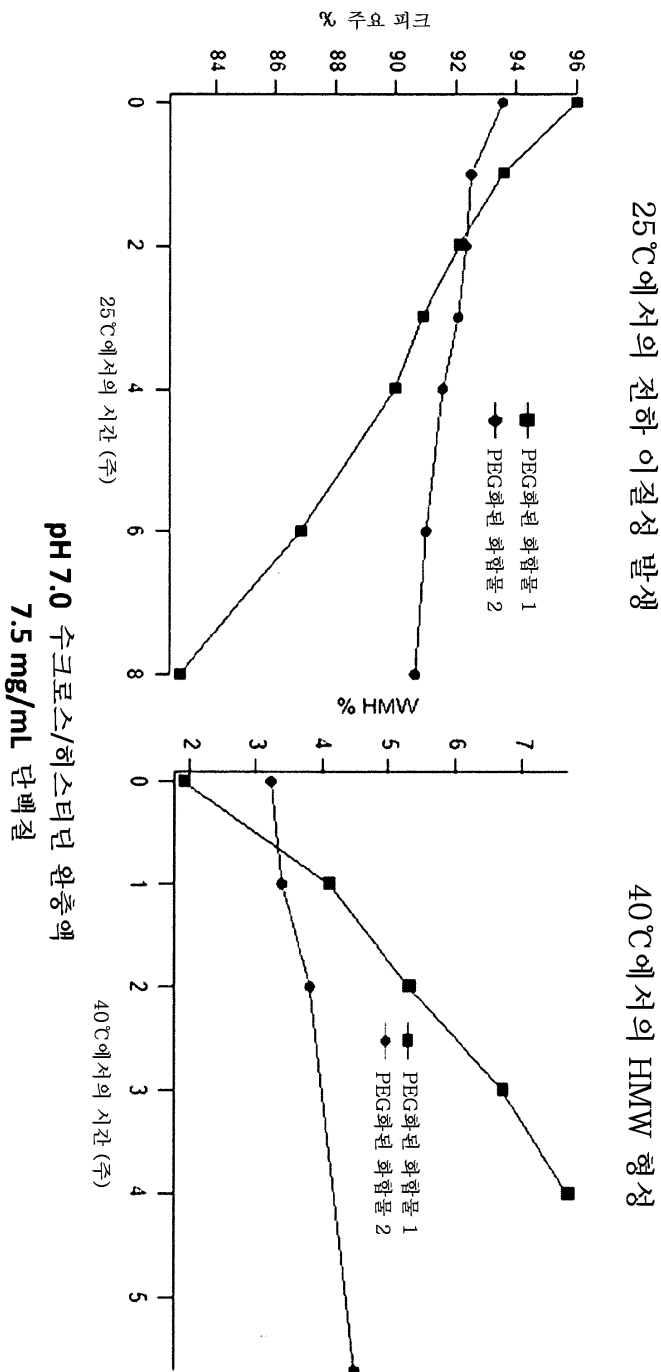


열 주사 열광법 (TSP)에 의한 열 안정성

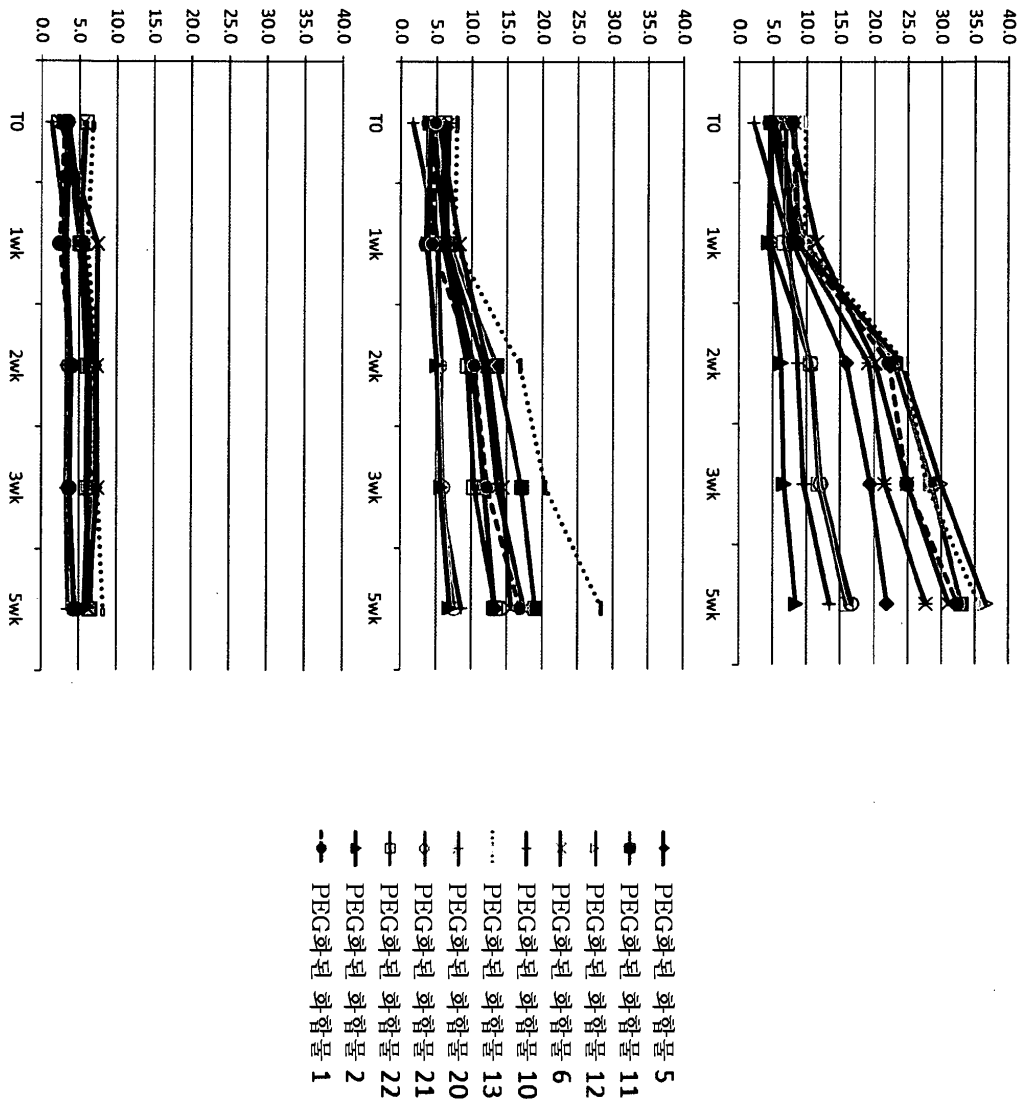


도면4

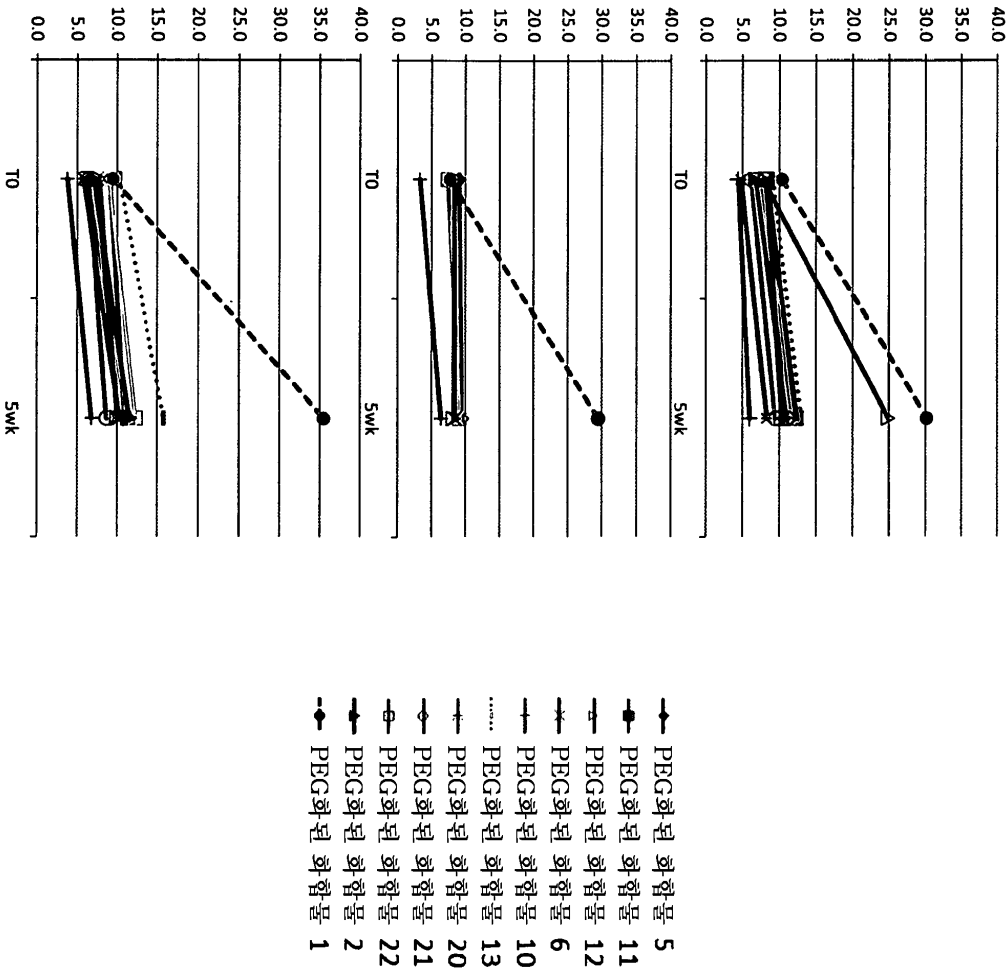
도면5



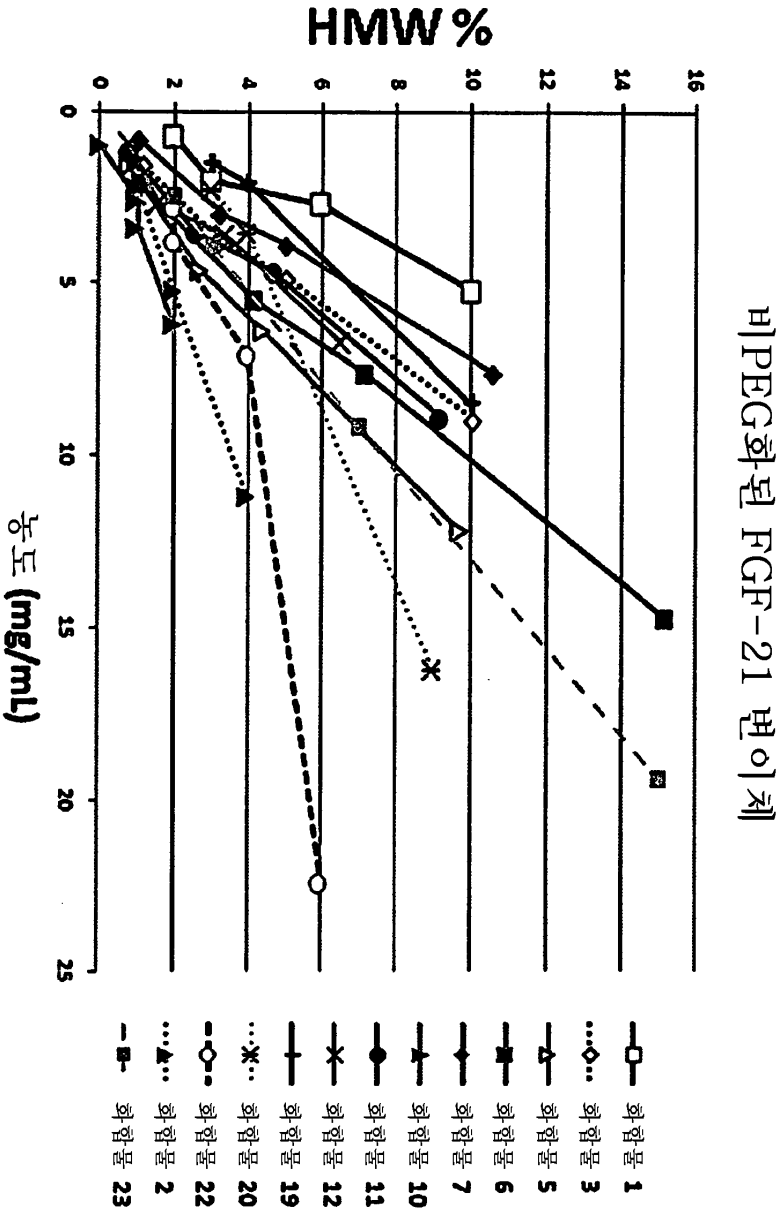
도면6



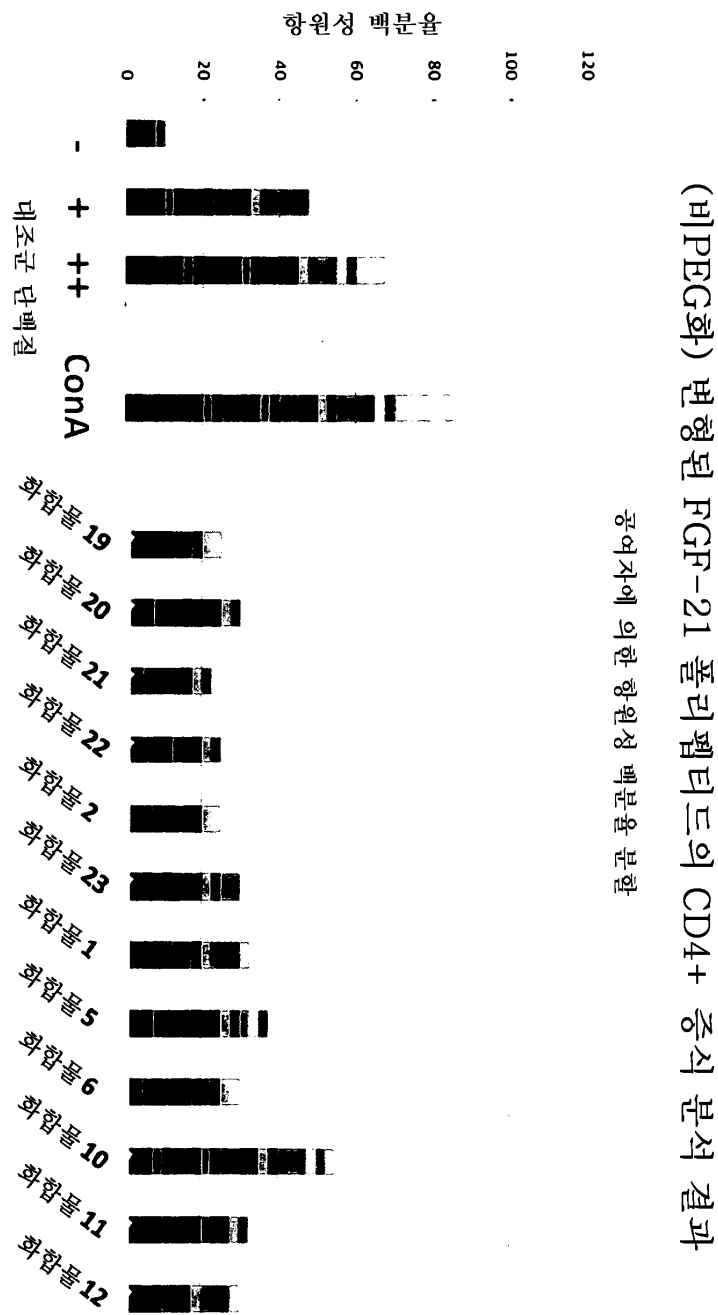
도면7



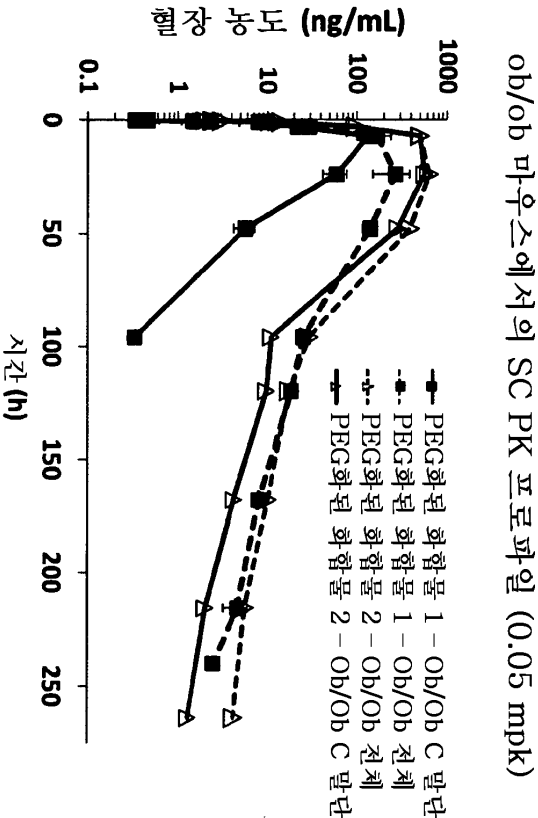
도면8



도면9



향상된 생체내
(무린 Ob/Ob) 효능은
활성 단백질에 의 증가한
노출을 반영함

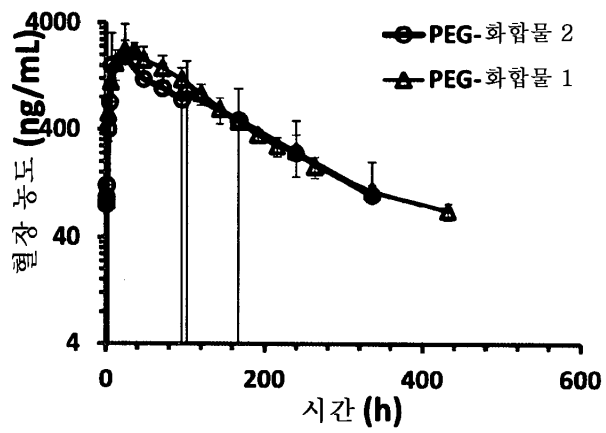


PEG화된 화합물 1 SC PK 파라미터 ob/ob 마우스			
PK 파라미터	단위	C 말단 (활성)	전체
Cmax	ng/mL	133	267.9
Tmax	h	7	24
AUCtot	µg/mL*h	2.6	13.8
AUC 비	활성/전체	0.18	

PEG화된 화합물 2 SC PK 파라미터 ob/ob 마우스			
PK 파라미터	단위	C 말단 (활성)	전체
Cmax	ng/mL	560.5	629
Tmax	h	24	24
AUCtot	µg/mL*h	24.9	31.8
thalf	h	46.1	51.7
AUC 비	활성/전체	0.78	

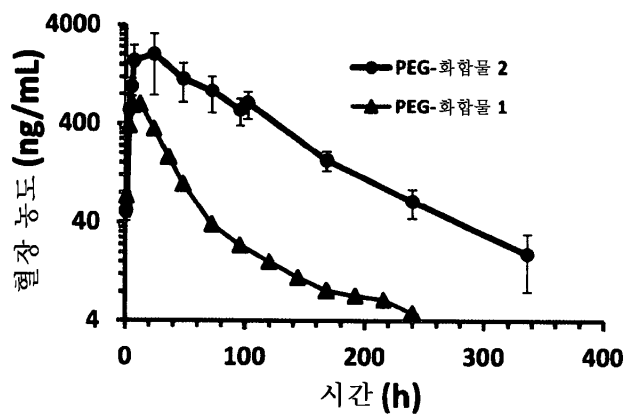
도면11a

“전체” 단백질 PK

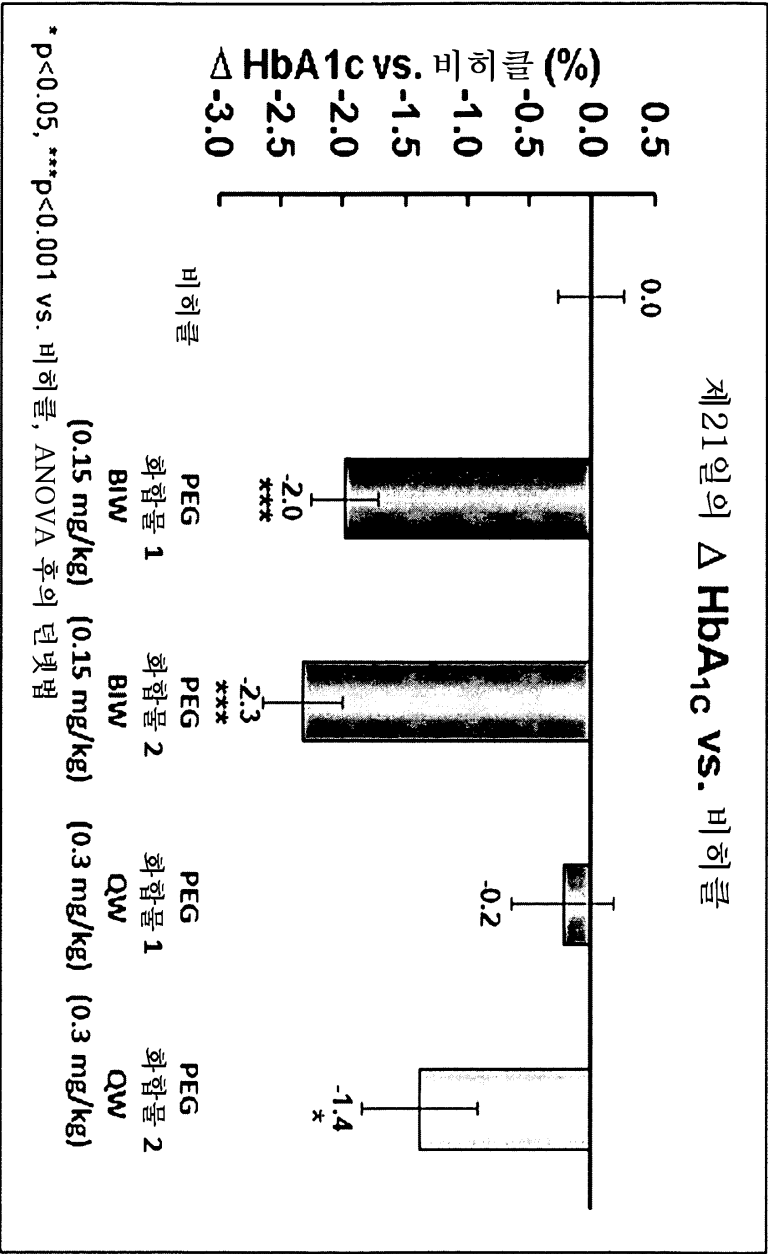


도면11b

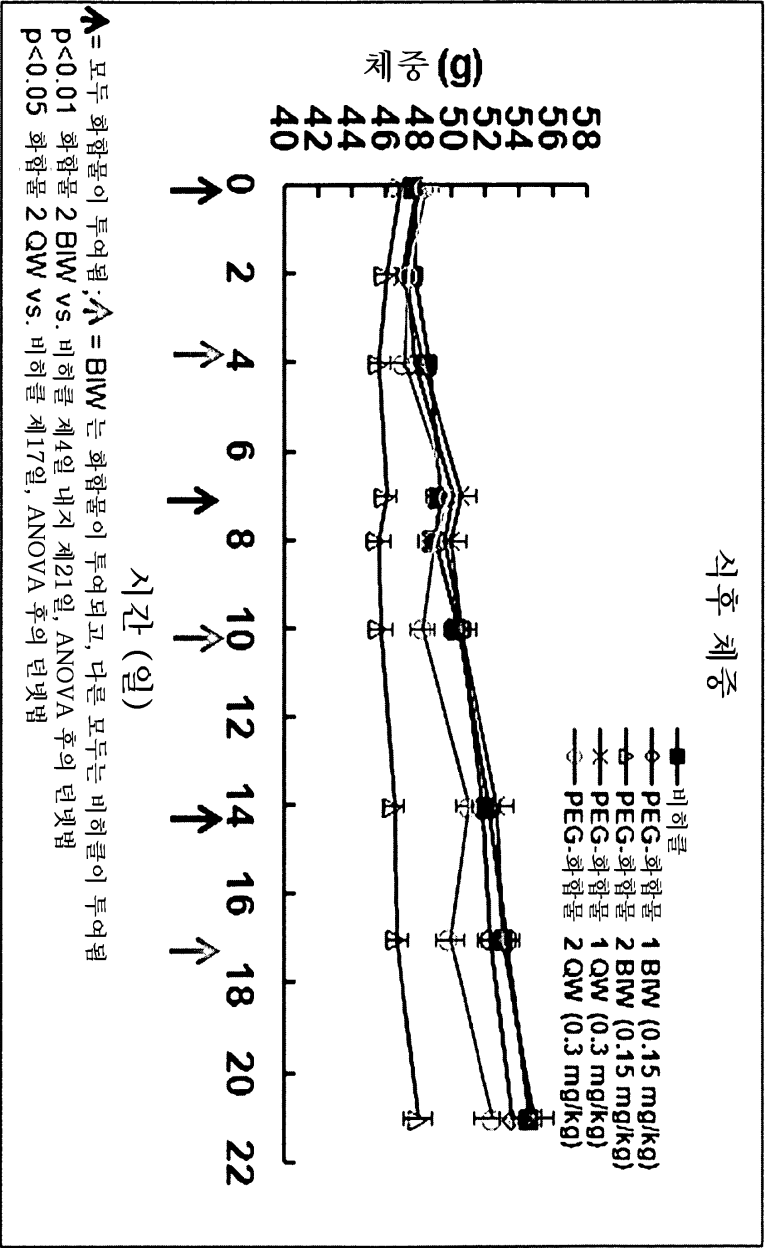
C-말단 무손상 PK



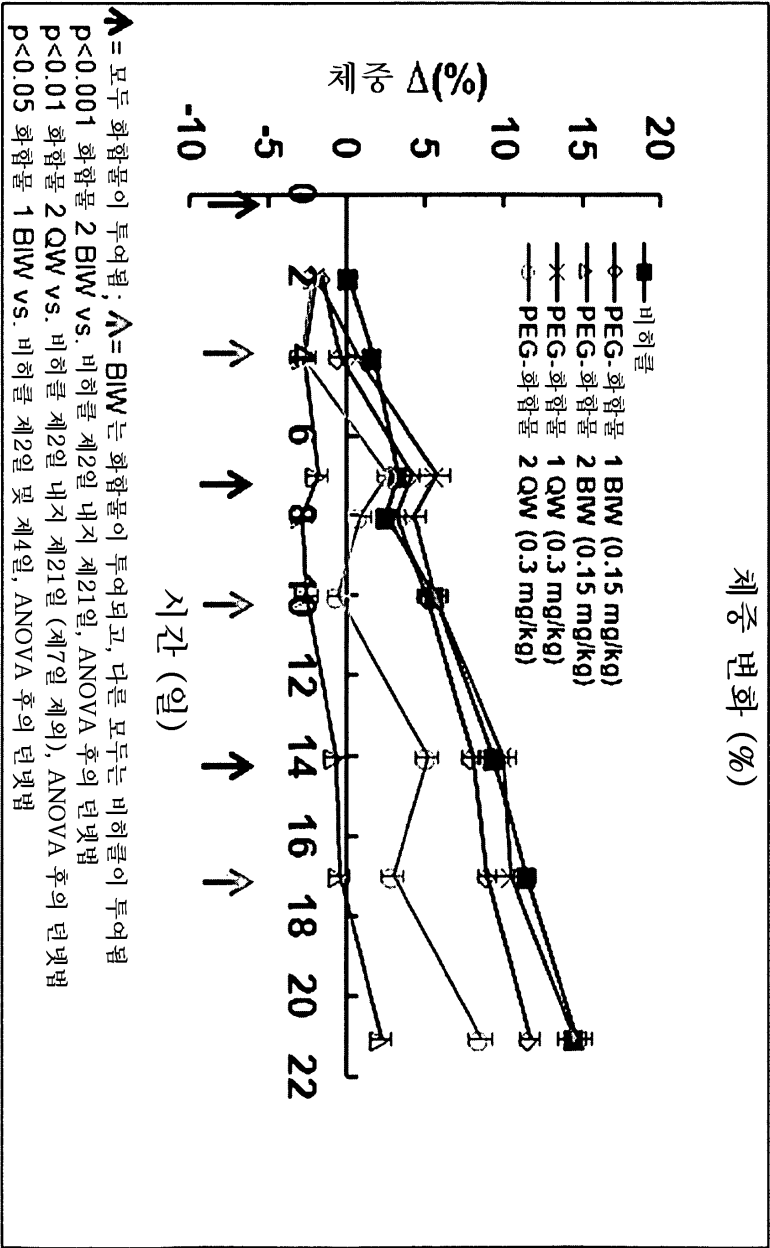
도면12



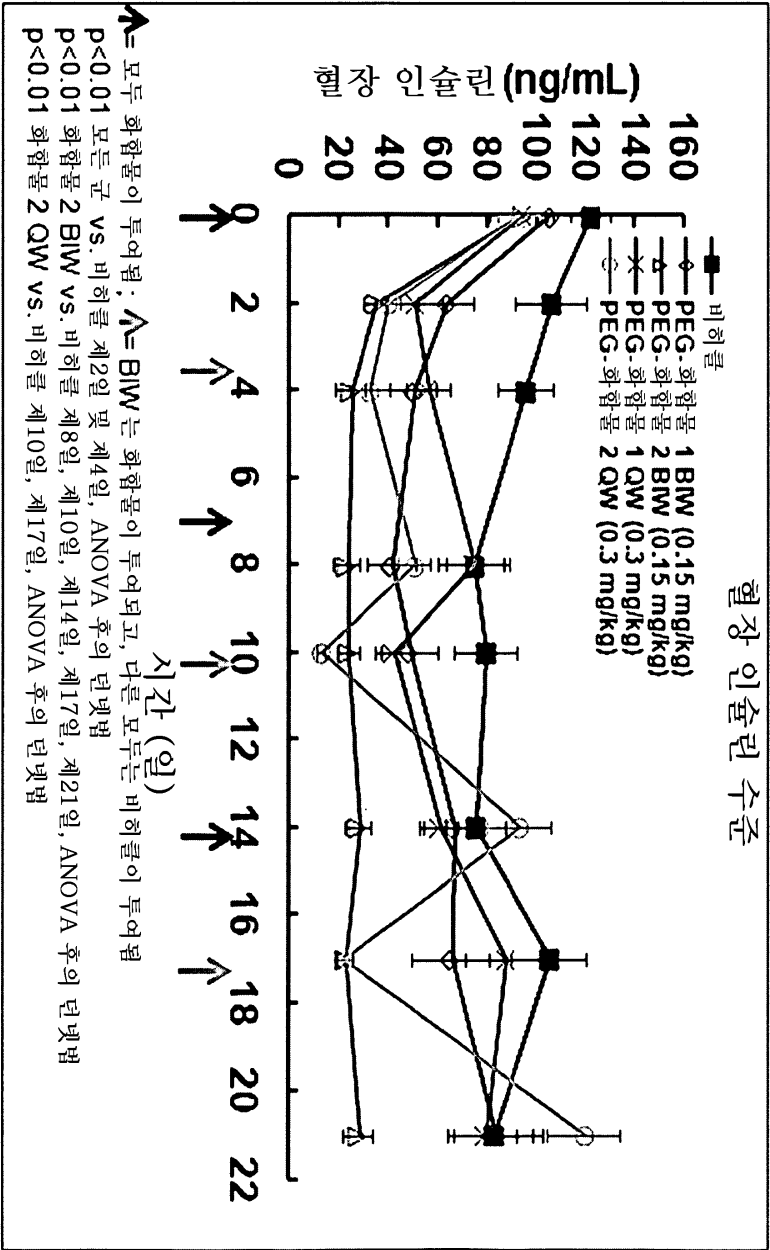
도면13



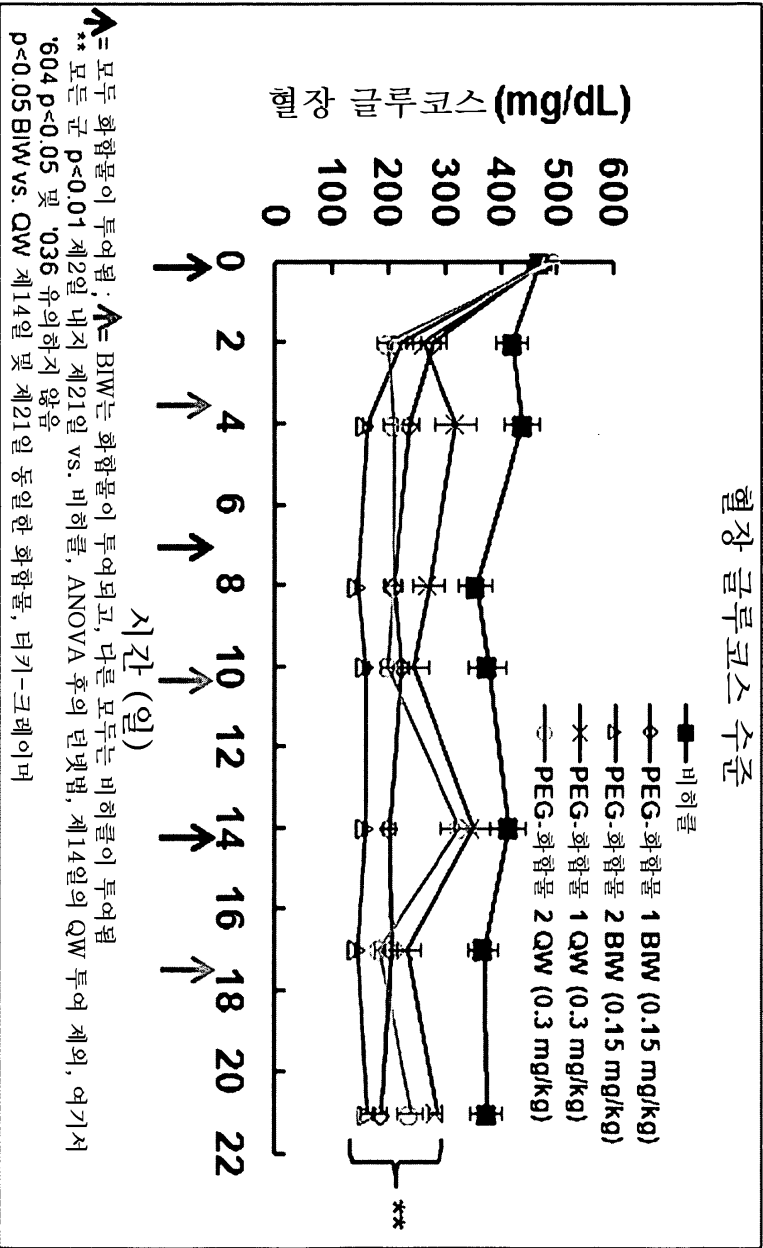
도면14



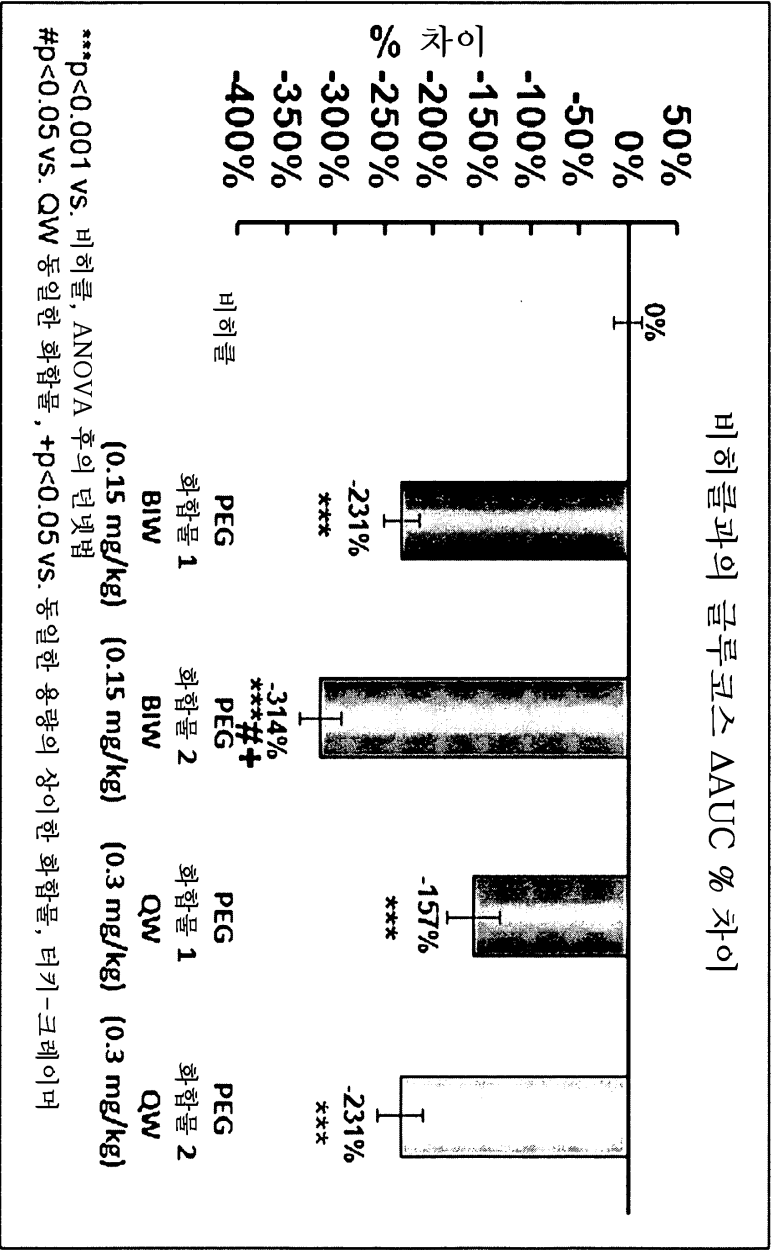
도면15



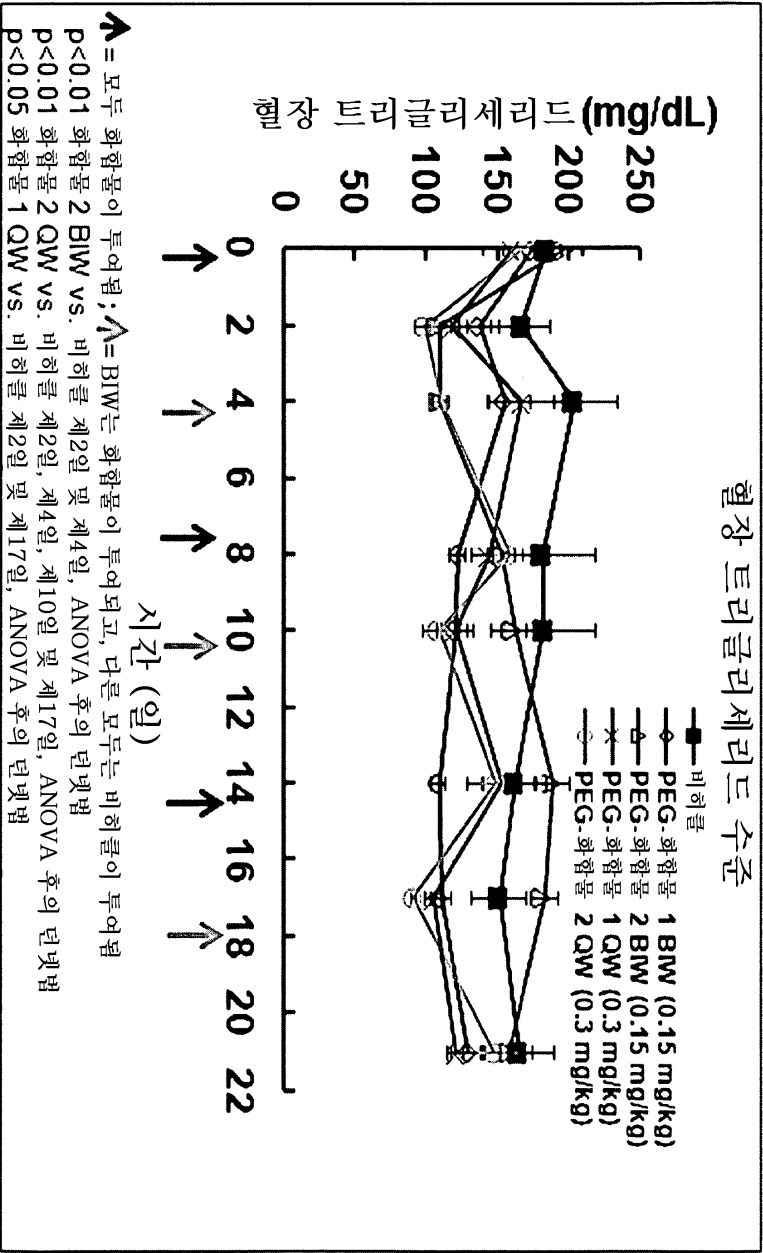
도면16



도면17

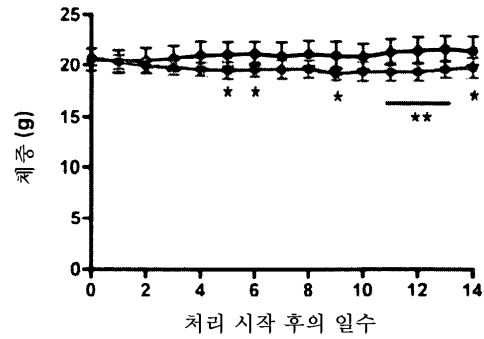
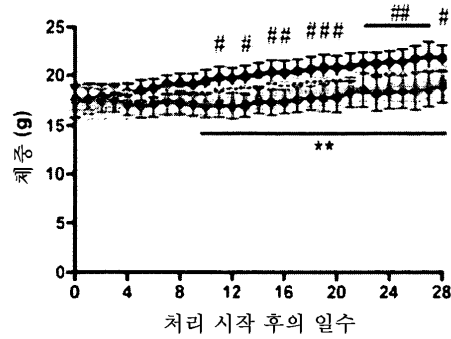


도면18



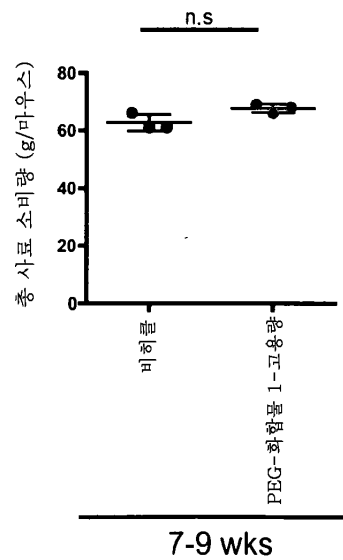
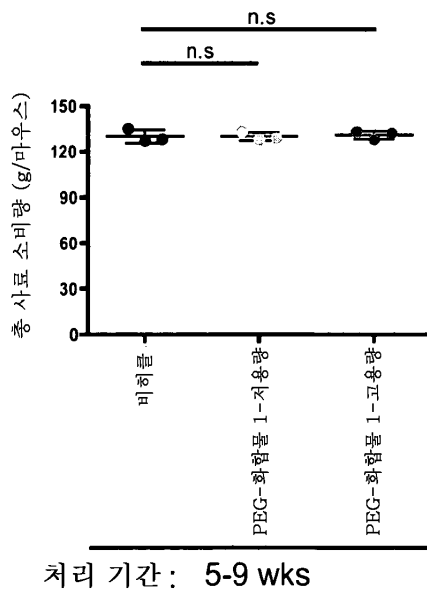
도면19

체중 변화



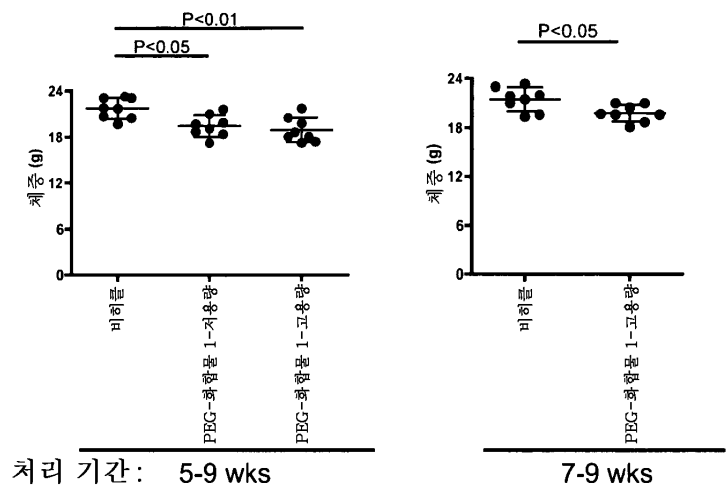
도면20

총 사료 소비량



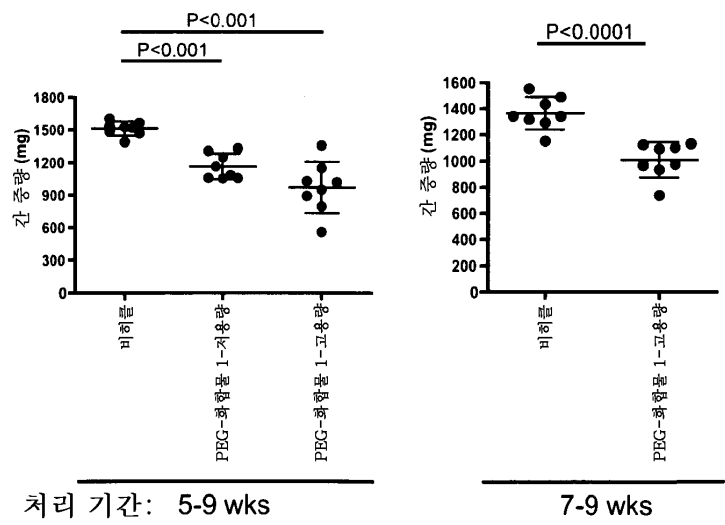
도면21

체중



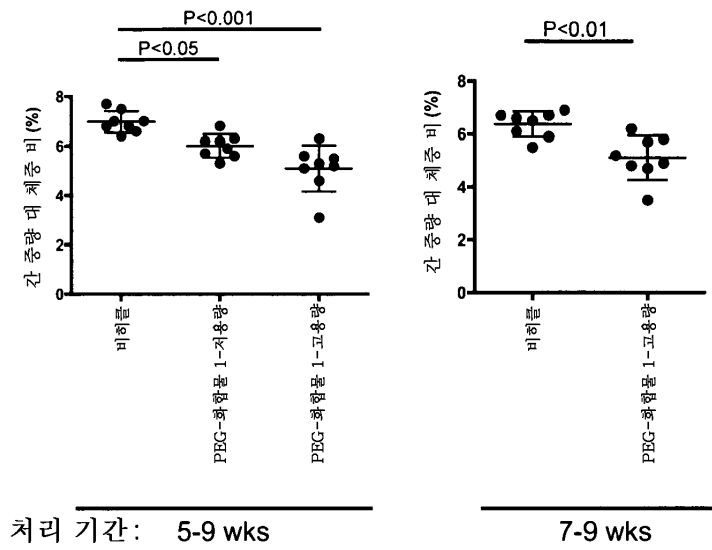
도면22

간 중량



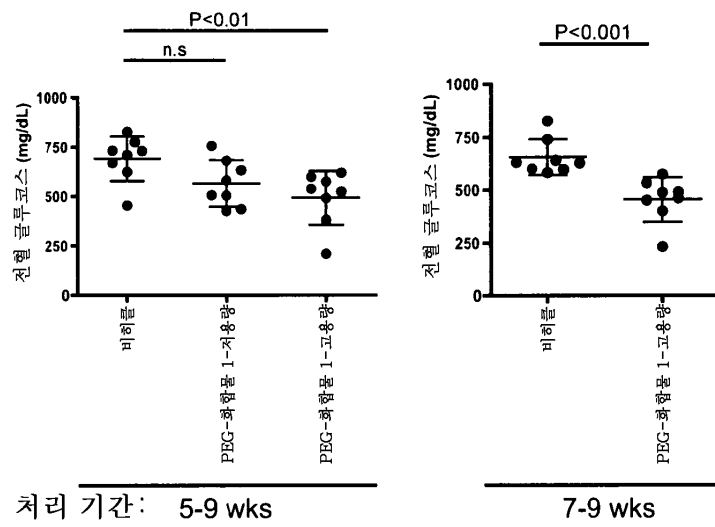
도면23

간 중량 대 체중 비



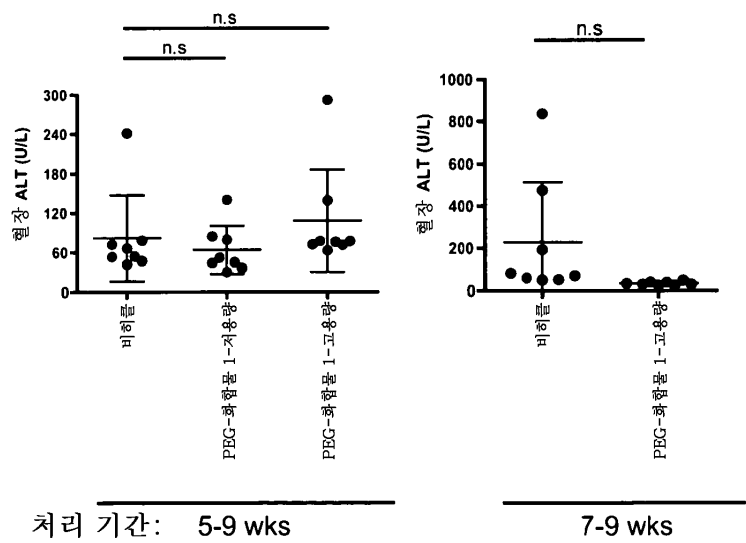
도면24

전혈 글루코스



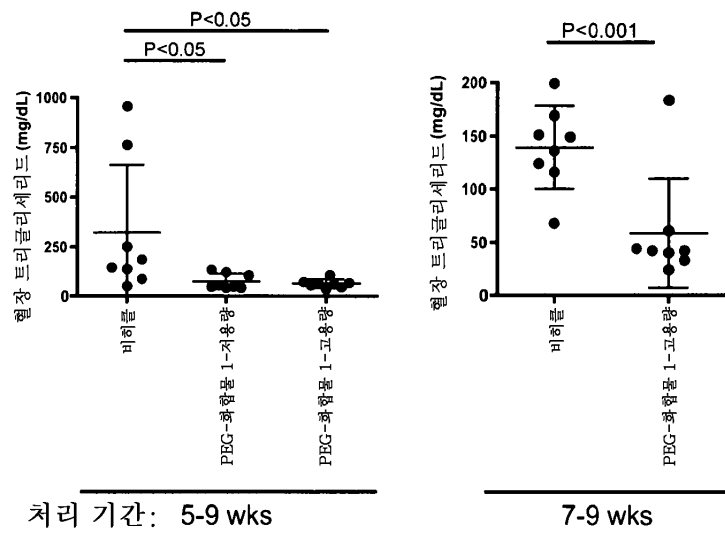
도면25

혈장 ALT



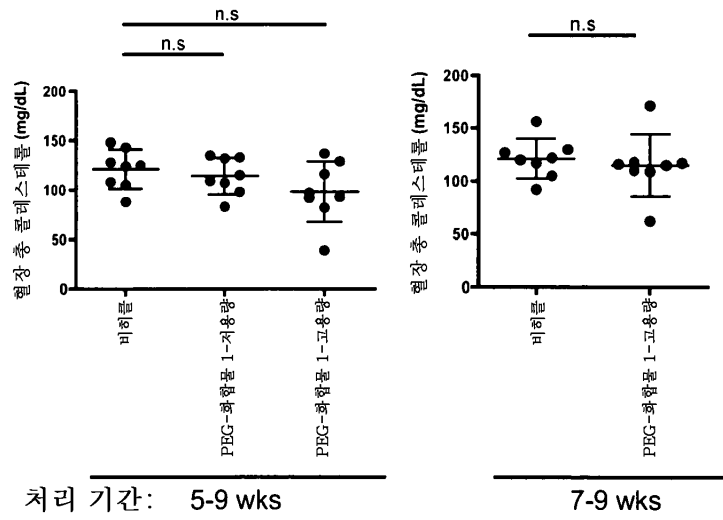
도면26

혈장 트리글리세리드



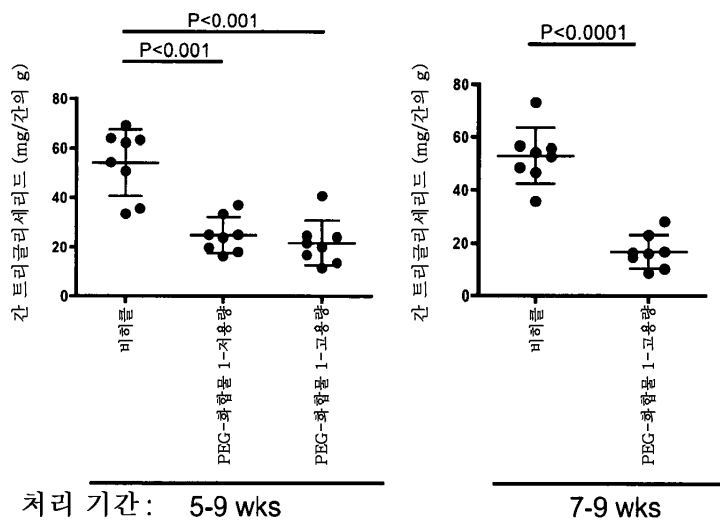
도면27

혈장 총 콜레스테롤



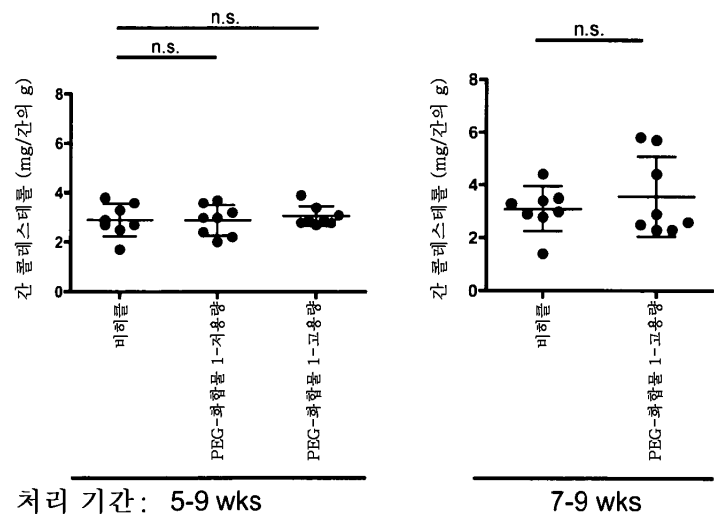
도면28

간 트리글리세리드



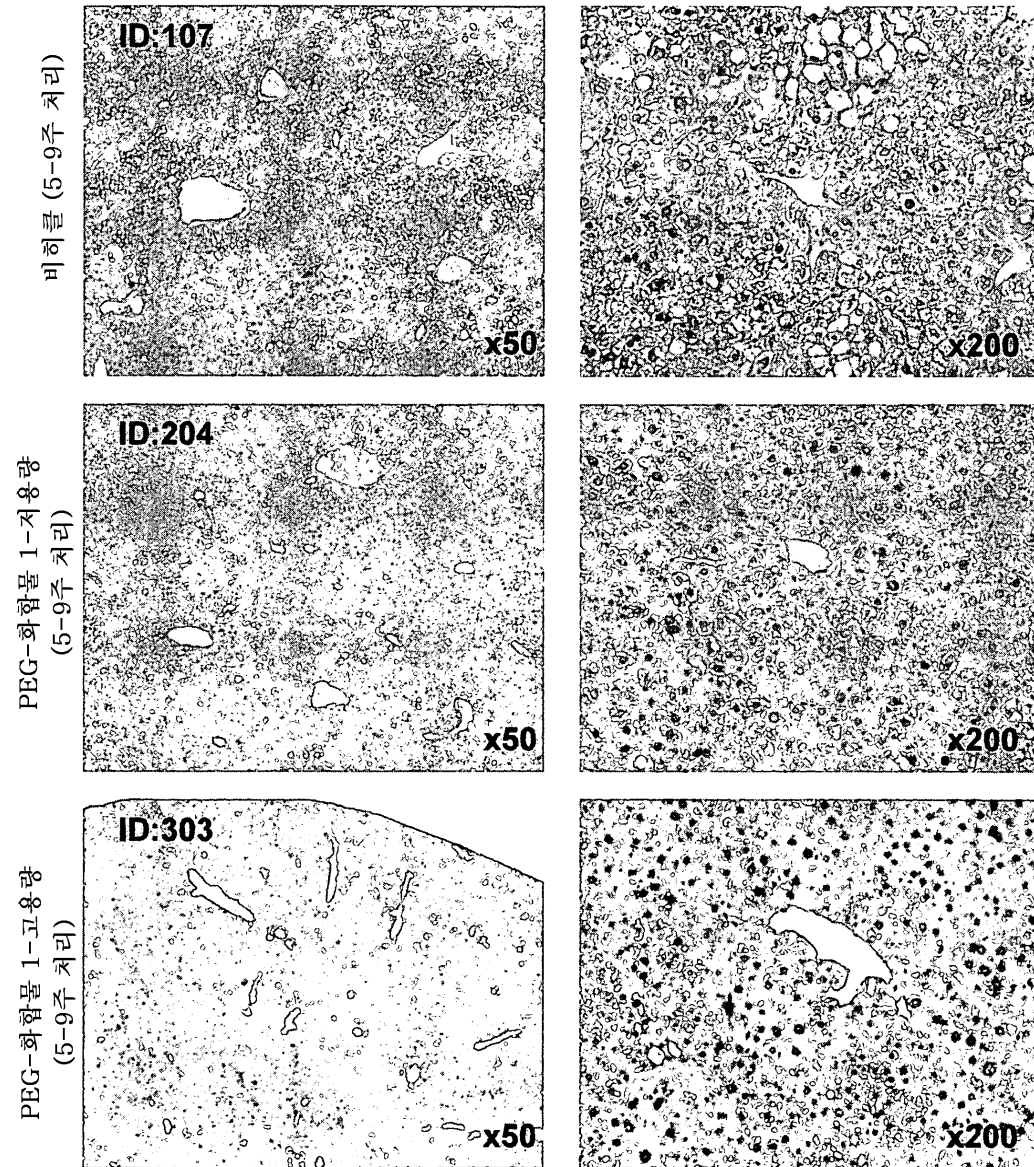
도면29

간 콜레스테롤



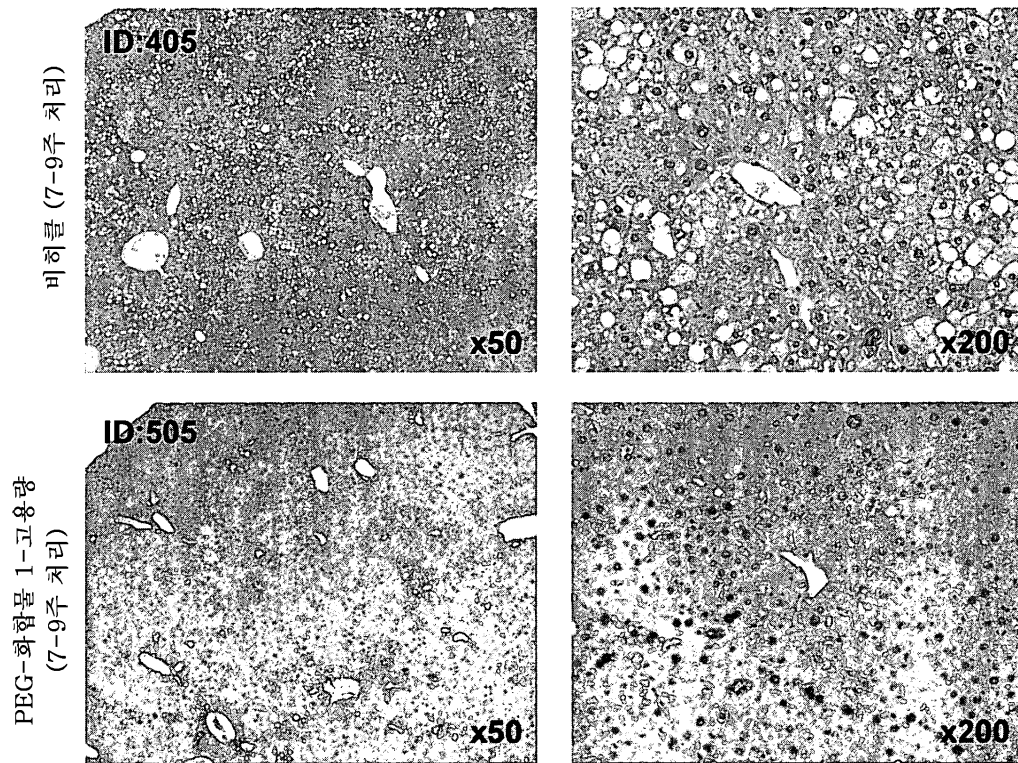
도면30a

HE-염색 간 절편의 대표 현미경 사진



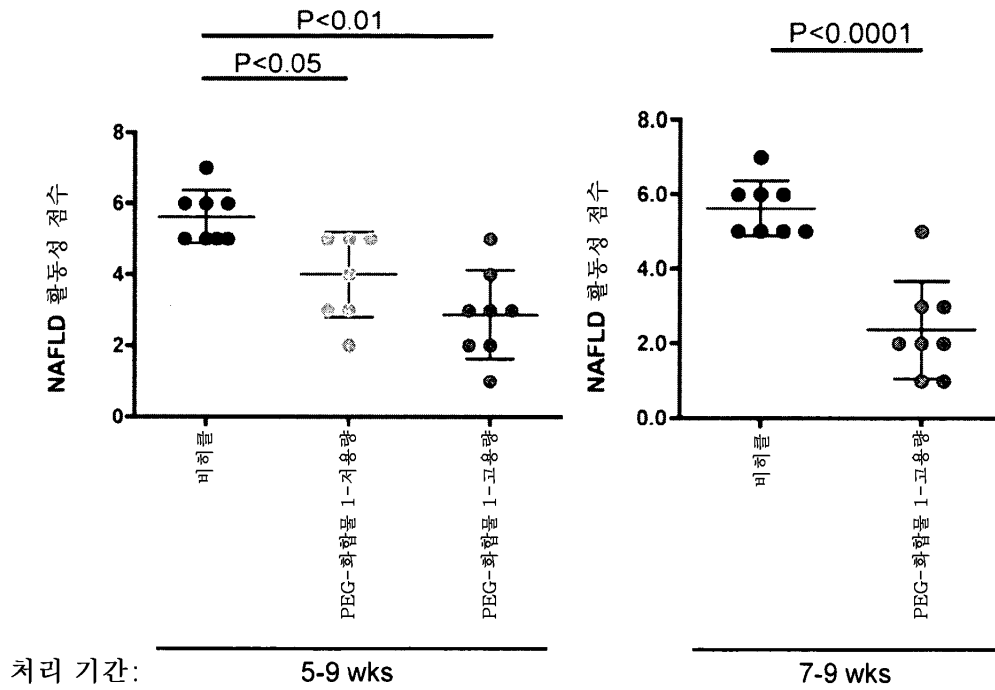
도면30b

HE-염색 간 절편의 대표 현미경 사진 (계속)



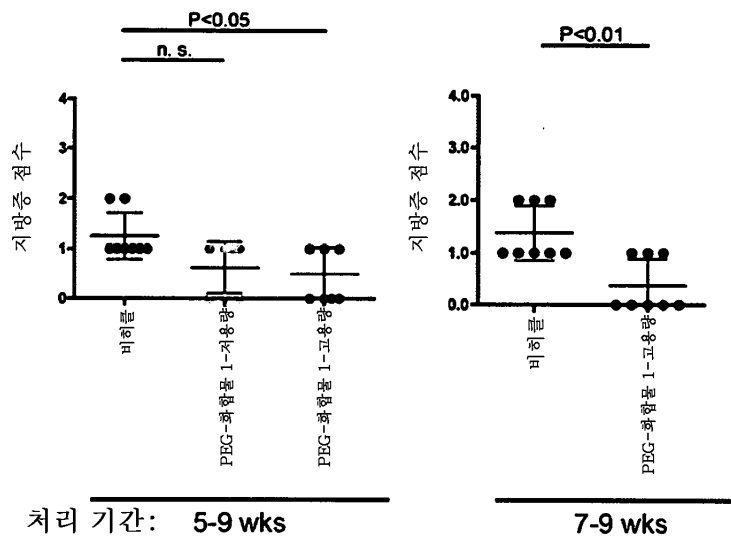
도면31

NAFLD 활동성 점수



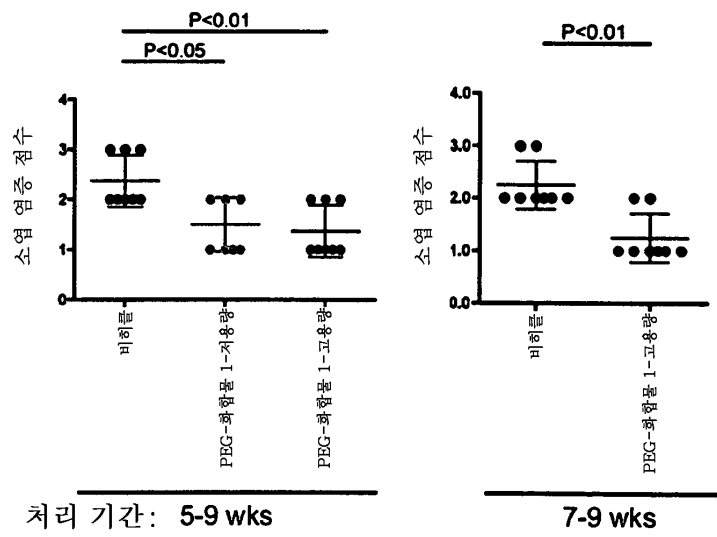
도면32a

지방증 점수



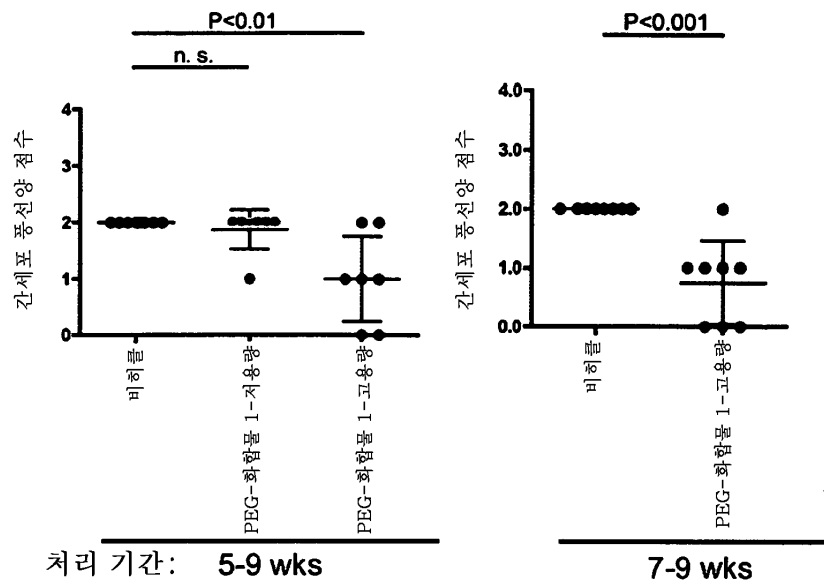
도면32b

소엽 염증 점수



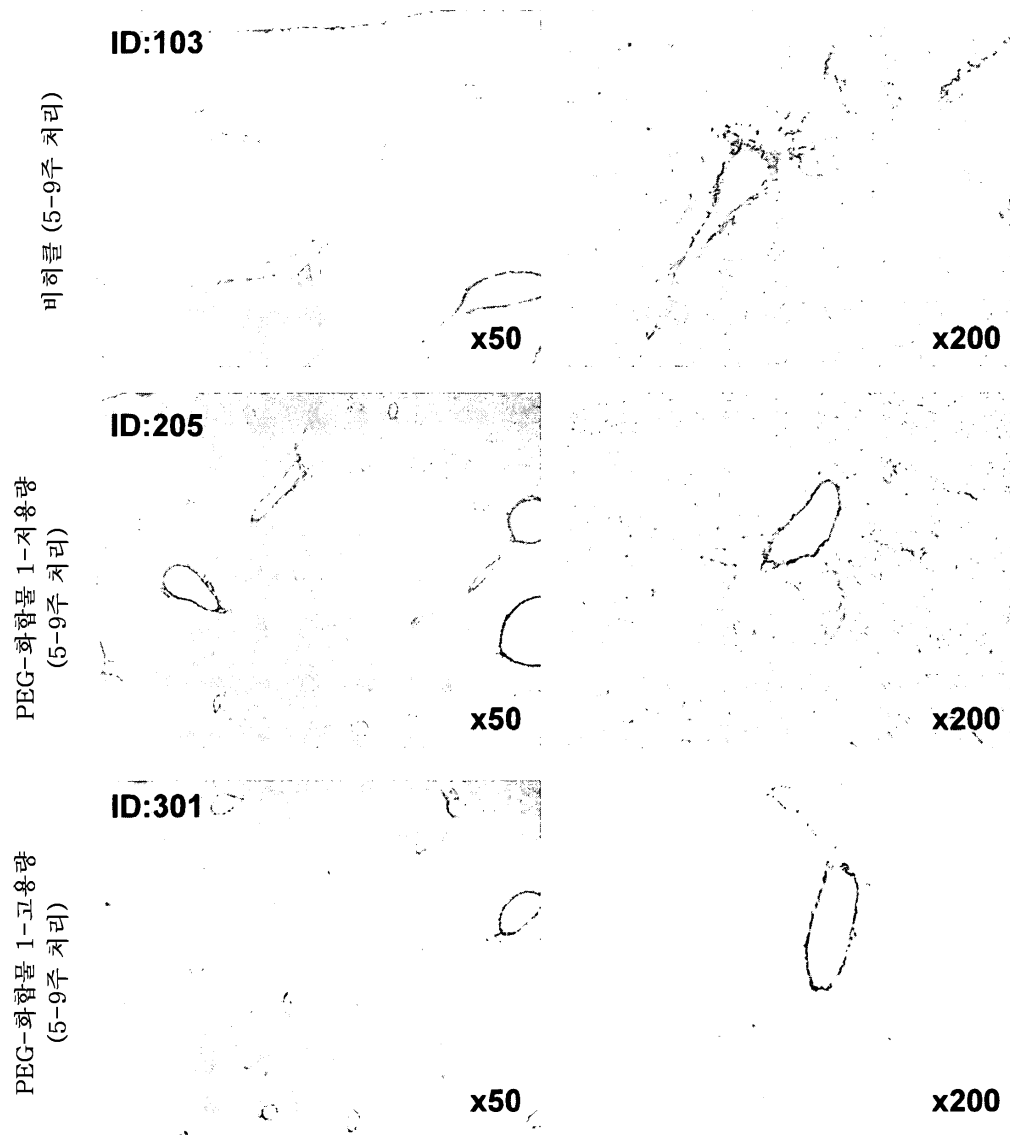
도면32c

간세포 풍선양 점수



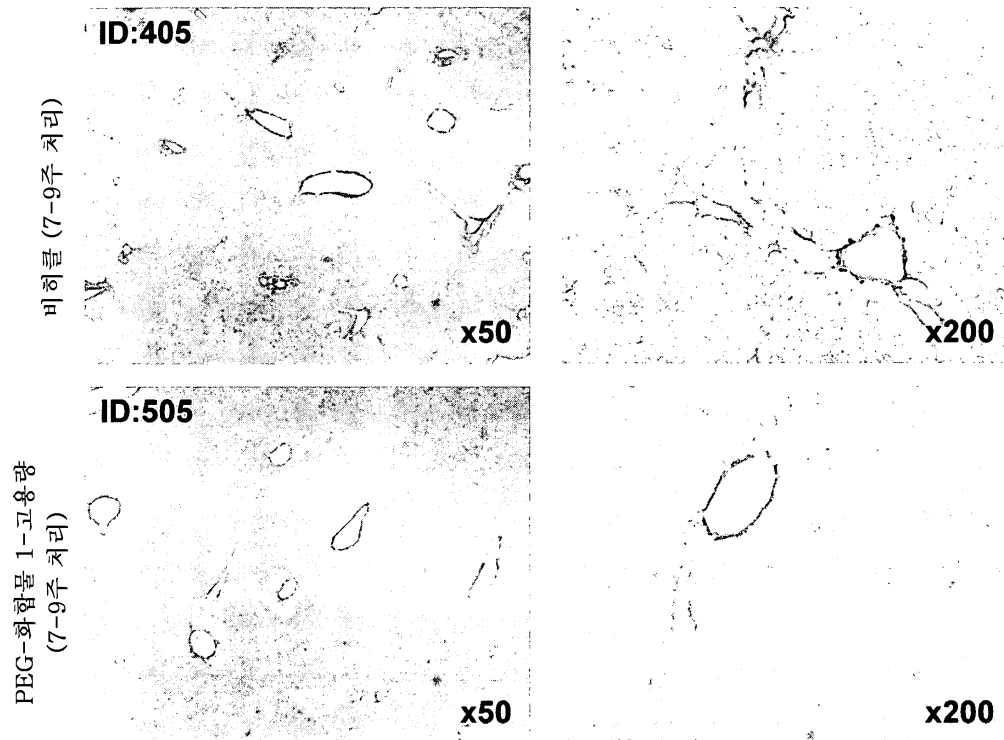
도면33a

시리아스 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진



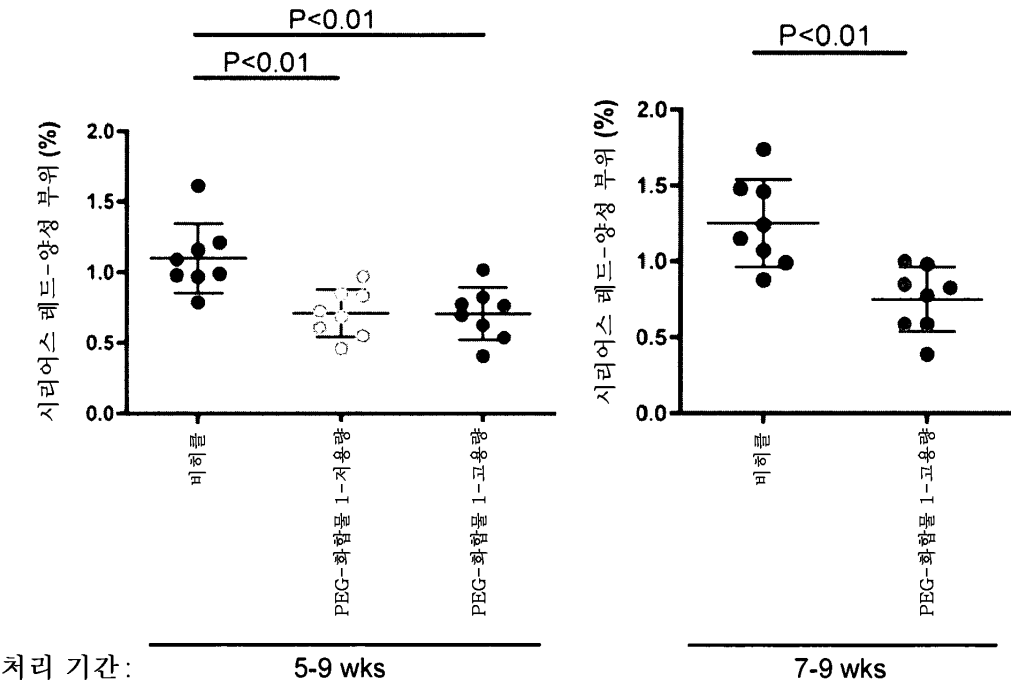
도면33b

시리우스 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진 (계속)



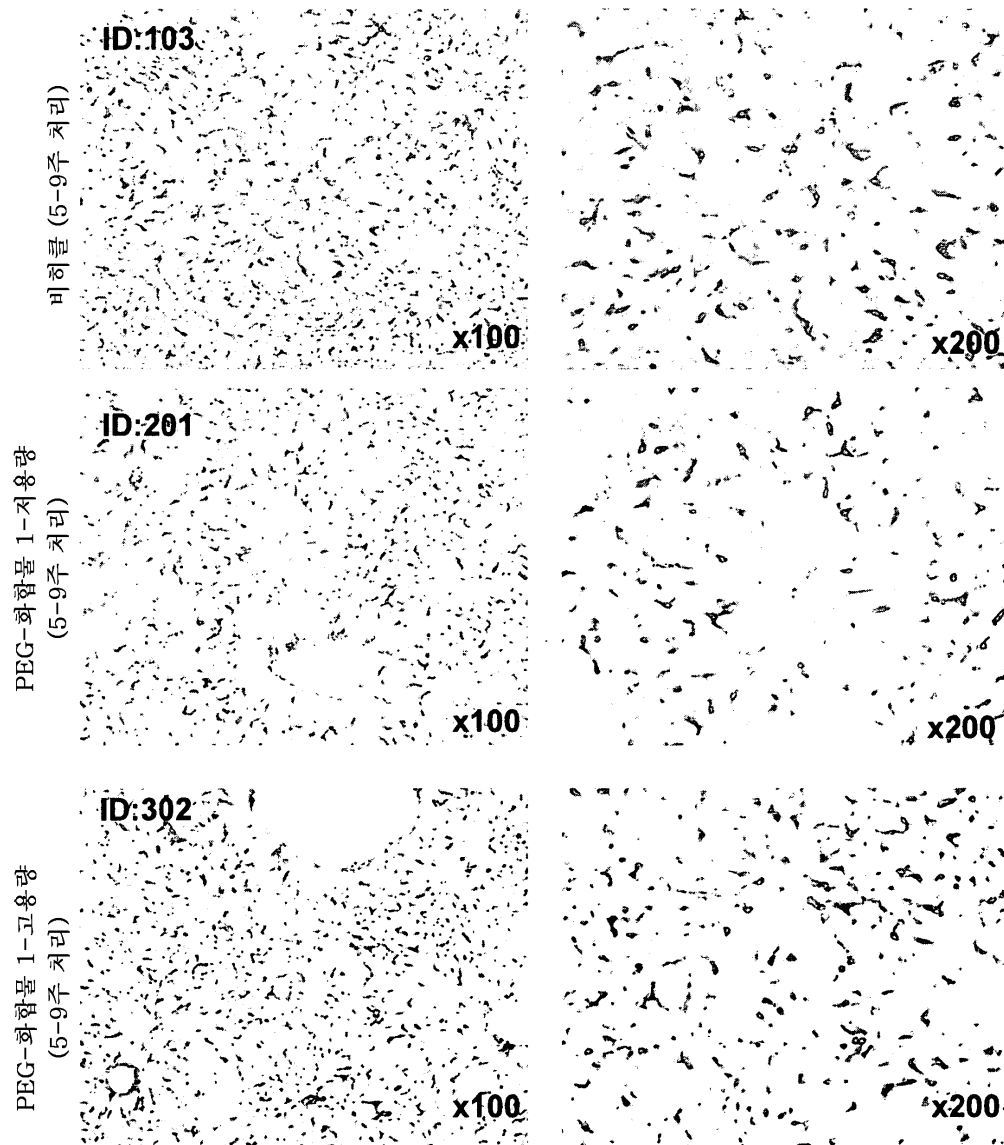
도면34

섬유증 부위



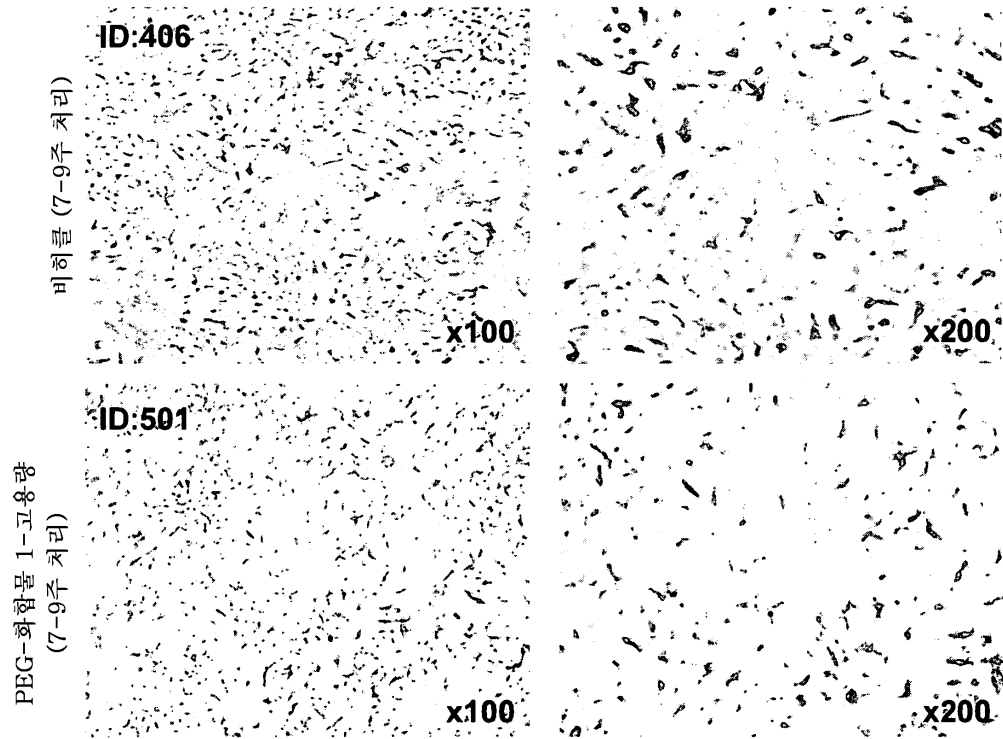
도면35a

F4/80-면역염색 간 절편의 대표 현미경 사진



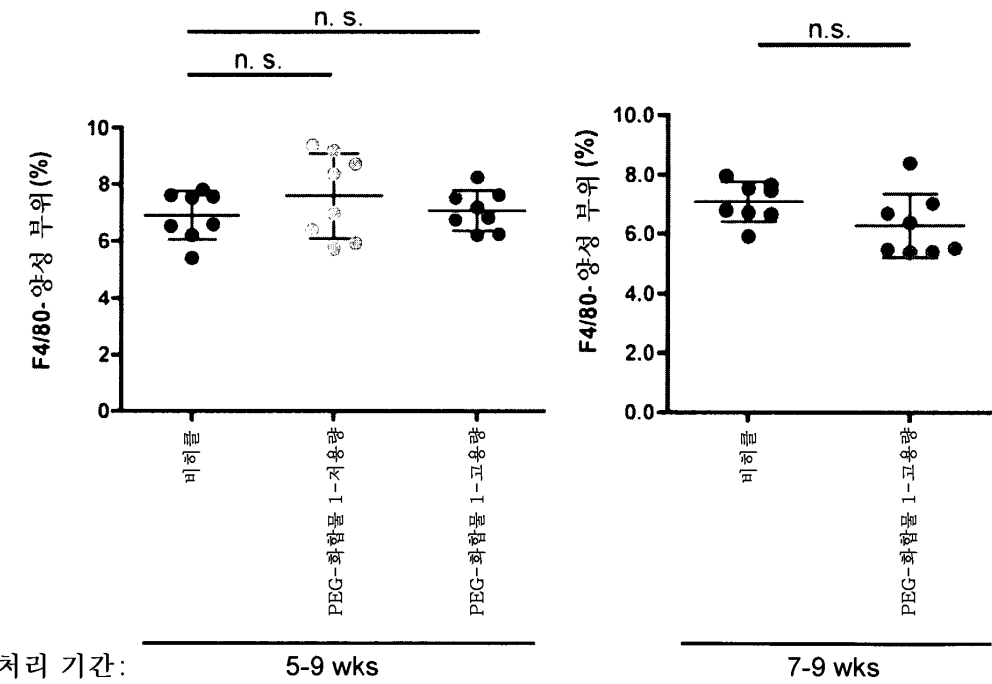
도면35b

F4/80-면역염색 간 절편의 대표 현미경 사진 (계속)



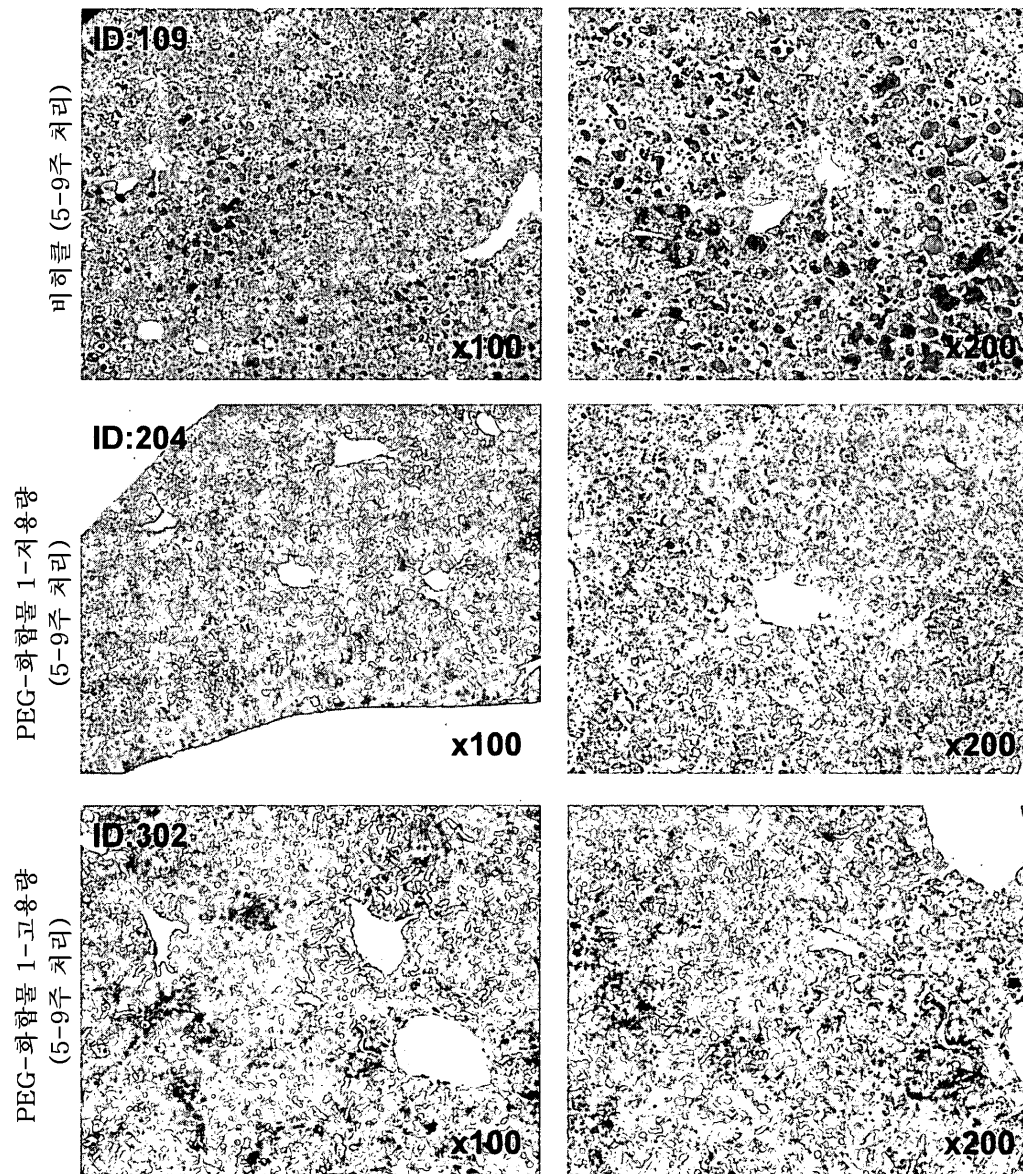
도면36

염증 부위



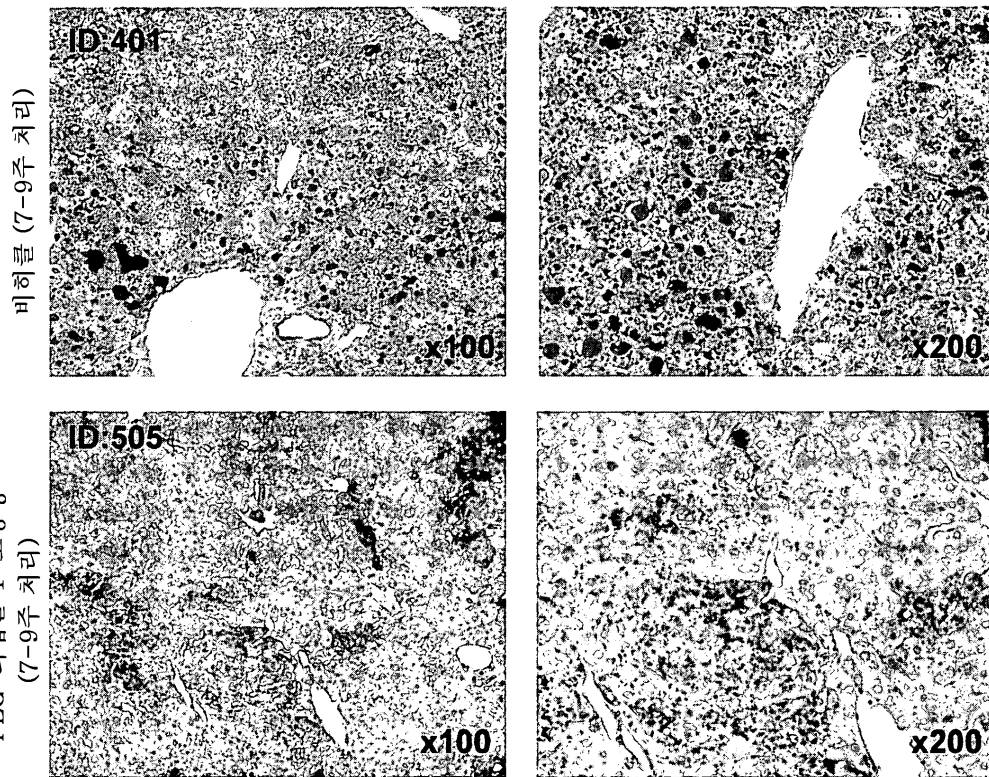
도면37a

오일 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진



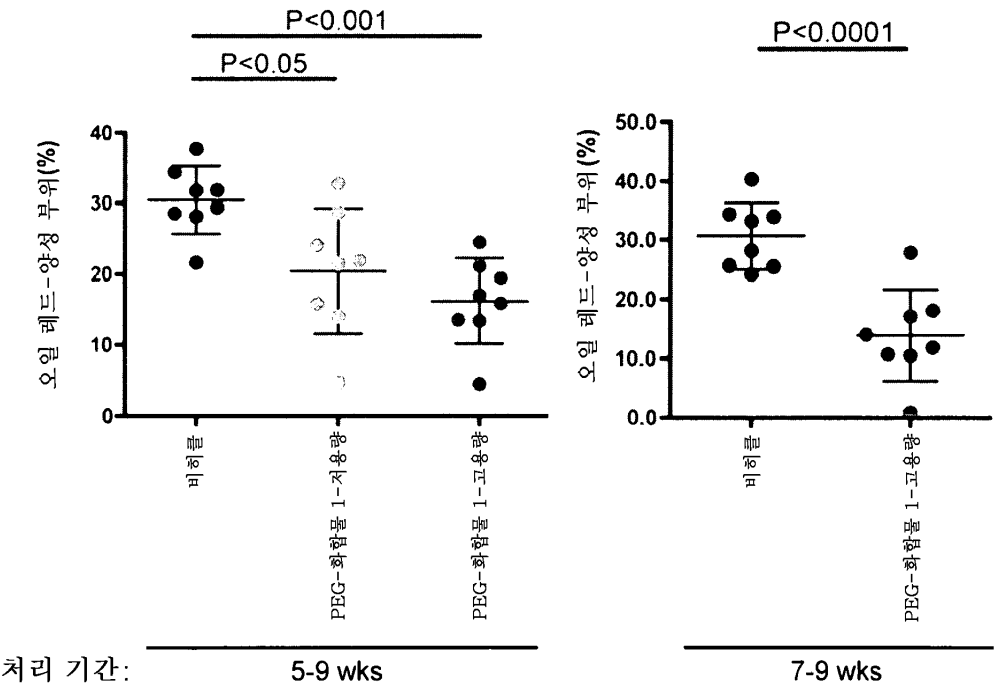
도면37b

오일 레드-염색 간 절편의 대표 현미경 사진 (계속)



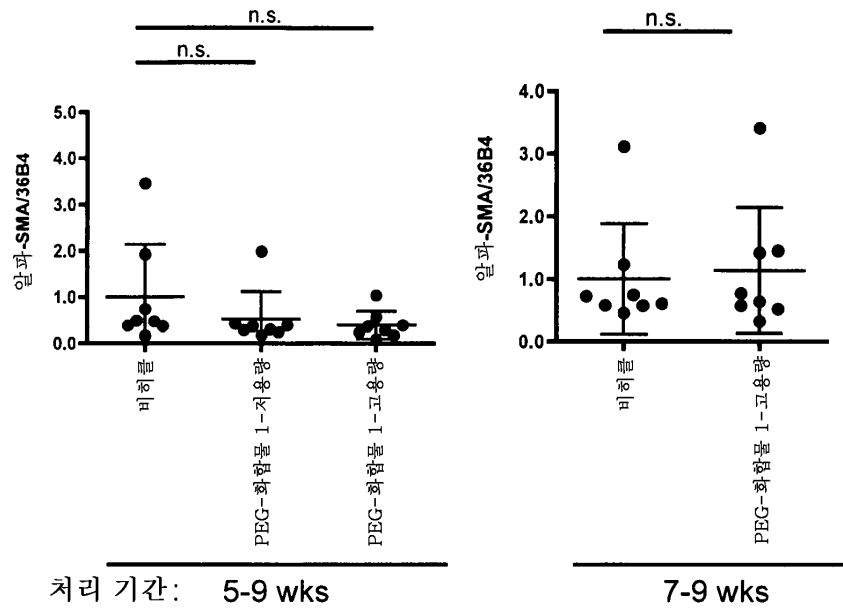
도면38

지방 침적 부위



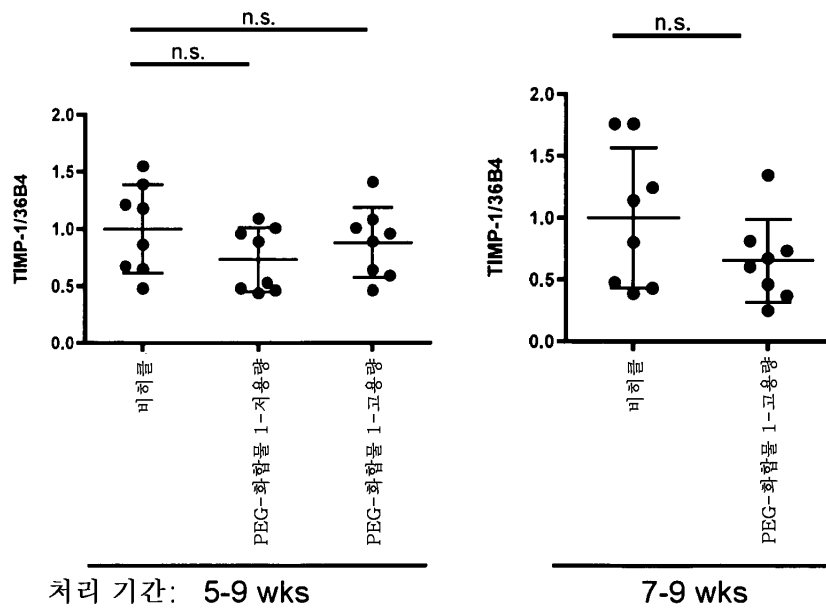
도면39a

알파-SMA



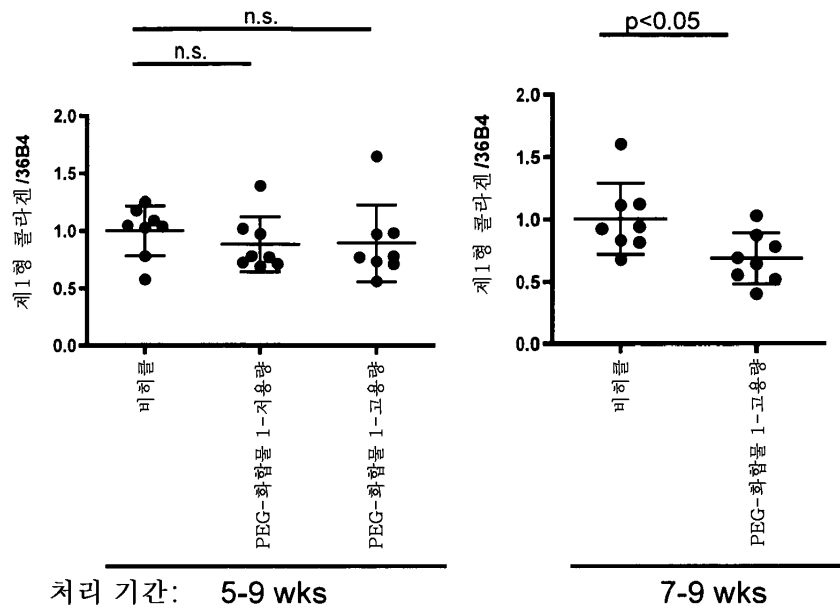
도면39b

TIMP-1



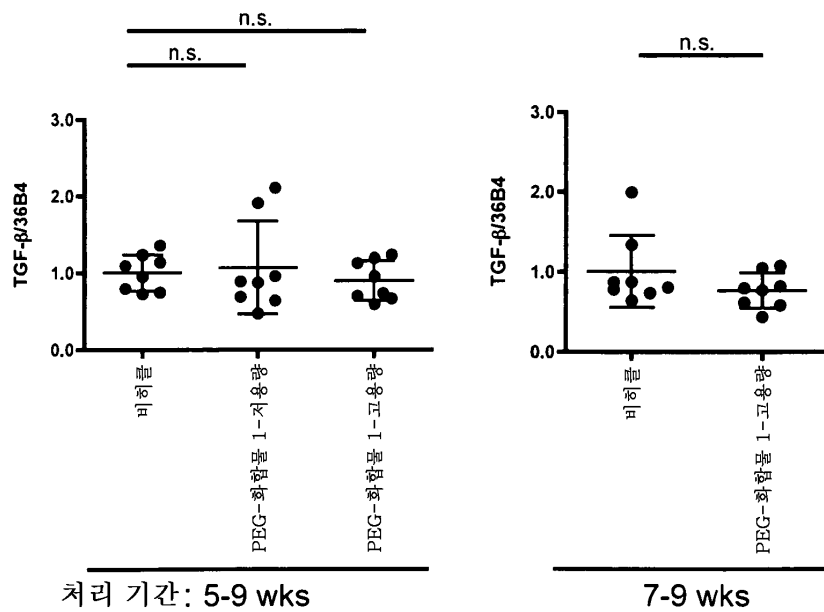
도면39c

제1형 콜라겐



도면39d

TGF-β



도면 40a

변형된 FGF-21 폴리펩티드 융합 단백질

화합물명	SEQ ID NO:	융합 배열	연결 펩티드	SEQ ID NO:
화합물 101	401	PKE(2)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
화합물 102	402	PKE(2)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGS	355
화합물 103	403	PKE(2)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEEEDEEED	356
화합물 104	404	PKE(2)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEP	357
화합물 105	405	PKE(2)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHGS	358
화합물 106	406	PKE(2)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGS	359
화합물 107	407	PKE(2)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGS	360
화합물 108	408	PKE(2)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGSGSGS	361
화합물 109	409	PKE(2)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSPTPTSPSTPTPTSPS	362
화합물 110	410	PKE(2)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGGEKKKEKEEQEERETKP	363
화합물 111	411	PKE(2)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	364
화합물 112	412	PKE(2)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	365
화합물 113	413	PKE(2)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSPTPTSPSTPTPTSPSTPTPTSPS	366
화합물 114	414	PKE(2)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
화합물 115	415	PKE(2)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEP	368
화합물 116	416	PKE(2)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	369
화합물 117	417	PKE(2)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPSPPEP	370
화합물 118	418	PKE(2)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEGGGSPTPEP	371
화합물 119	419	PKE(2)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEDEEDPTPEP	372
화합물 120	420	PKE(2)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPEEEDPSPEPTPEP	373
화합물 121	421	PKE(2)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPEEEDPSPEPTPEPSPPEP	374
화합물 122	422	PKE(2)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPGGGSGSPPEPTPEPSPPEP	375
화합물 123	423	PKE(2)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	376

회합물명	SEQ ID NO:	융합 배열	연결 펄터드	SEQ ID NO:
회합물 124	424	HuSA(C34A)-L201-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
회합물 125	425	HuSA(C34A)-L202-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	355
회합물 126	426	HuSA(C34A)-L203-FGF21(Cmp. 2)	GETGS	377
회합물 127	427	HuSA(C34A)-L204-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	378
회합물 128	428	HuSA(C34A)-L205-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEET	379
회합물 129	429	HuSA(C34A)-L206-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	359
회합물 130	430	HuSA(C34A)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	380
회합물 131	431	HuSA(C34A)-L208-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	381
회합물 132	432	HuSA(C34A)-L209-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	382
회합물 133	434	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	359
회합물 134	435	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	380
회합물 135	436	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 1)	GGGGS	359
회합물 136	437	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEETGS	380
회합물 137	440	FGF21(Cmp. 2)-L205-HuSA(C34A)	GETGSSGEET	379
회합물 138	441	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEETGS	382
회합물 139	442	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)	GETGSSGEETGS	383
회합물 140	443	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEETGS	382
회합물 141	446	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	382
회합물 142	447	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEETGS	382
회합물 143	448	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	382
회합물 144	449	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEETGS	382
회합물 145	450	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEETGS	383
회합물 146	451	FGF21(Cmp. 1)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEETGS	383

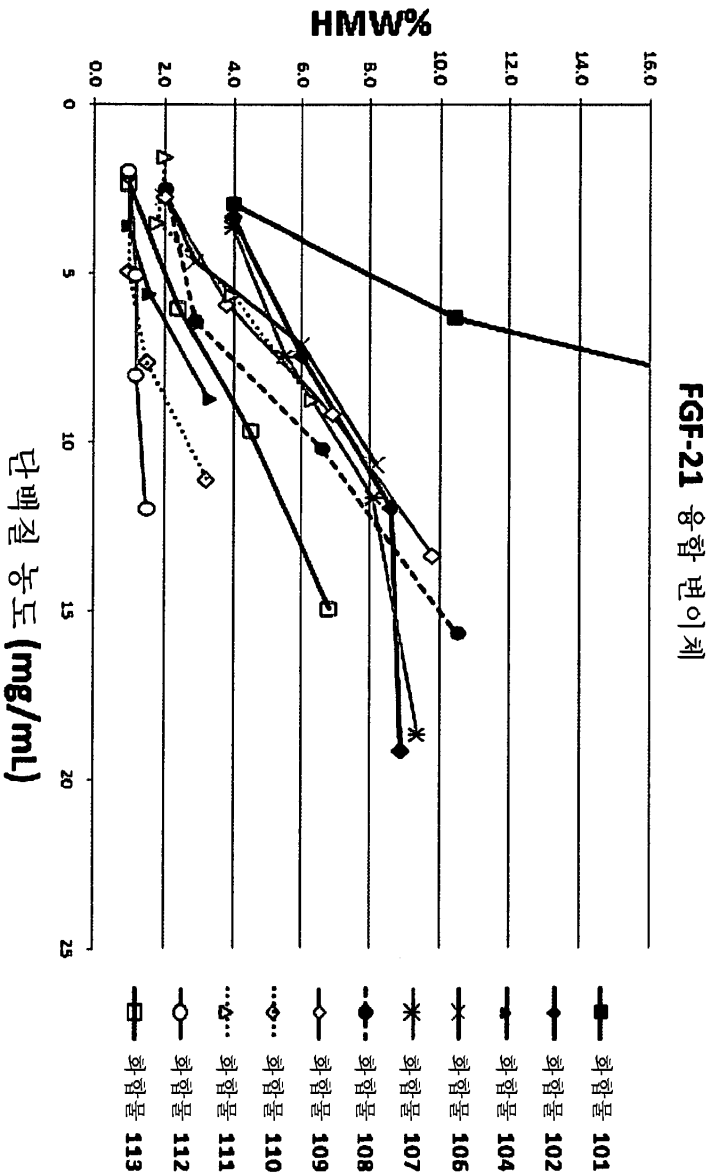
도면 40c

화합물명	SEQ ID NO:	융합 배열	연결 펩티드	SEQ ID NO:
화합물 147	452	PKE(1)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
화합물 148	453	PKE(1)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGS	355
화합물 149	454	PKE(1)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEDEEEED	356
화합물 150	455	PKE(1)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEP	357
화합물 151	456	PKE(1)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHS	358
화합물 152	457	PKE(1)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	359
화합물 153	458	PKE(1)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
화합물 154	459	PKE(1)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGS	361
화합물 155	460	PKE(1)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTPSSTPTPSSTPTPS	362
화합물 156	461	PKE(1)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGEEKKEKEKEQERETKP	363
화합물 157	462	PKE(1)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	364
화합물 158	463	PKE(1)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP	365
화합물 159	464	PKE(1)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSTPTPSSTPTPSSTPTPSSTPTPSSTPTPS	366
화합물 160	465	PKE(1)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
화합물 161	466	PKE(1)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEP	368
화합물 162	467	PKE(1)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP	369
화합물 163	468	PKE(1)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPPSPPEP	370
화합물 164	469	PKE(1)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEGGGSPTEP	371
화합물 165	470	PKE(1)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEEEEDPTPEP	372
화합물 166	471	PKE(1)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEEEEDPSPEPTPEP	373
화합물 167	472	PKE(1)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPEEEDPSPEPTPEPPSPPEP	374
화합물 168	473	PKE(1)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPPEPTPEPPSGGGSPPPEPTPEPPSPPEP	375
화합물 169	474	PKE(1)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEPPSPPEPTPEP	376

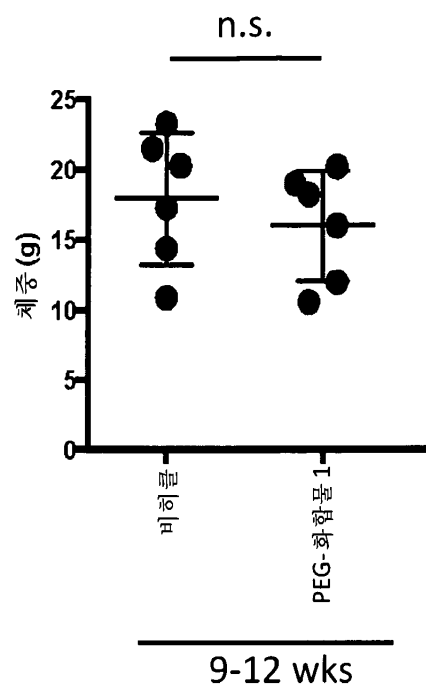
도면40d

화합물명	SEQ ID NO:	융합 배열	연결 펩티드	SEQ ID NO:
화합물 170	475	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGS	360
화합물 171	476	Fc(hlgG1a_191)-L250-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	350
화합물 172	477	Fc(hlgG1a_191)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPPEPTPEPSPPEPTPEP	365
화합물 173	478	Fc(hlgG1a_191)-L251-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPPSPPEPTPEP	351
화합물 174	479	Fc(hlgG1a_191)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHGS	358
화합물 175	480	Fc(hlgG1a_191)-L252-FGF21(Cmp. 2)	ELQLEESAAEAQEGELE	352
화합물 176	481	Fc(hlgG1a_190)-L253-FGF21(Cmp. 2)	SSGGGSGGGSGGGGS	353
화합물 177	482	Fc(hlgG1a_191)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	359
화합물 178	483	Fc(hlgG1a_189)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGSGGGSGGGSGGGGS	359
화합물 179	484	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21-1aa(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	360
화합물 180	485	Fc(hlgG1a_191)-L7-FGF21-3aa(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	360
화합물 181	486	Fc(hlgG1f_1.1_186)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	360
화합물 182	487	Fc(hlgG1a_191b)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	360

도면41

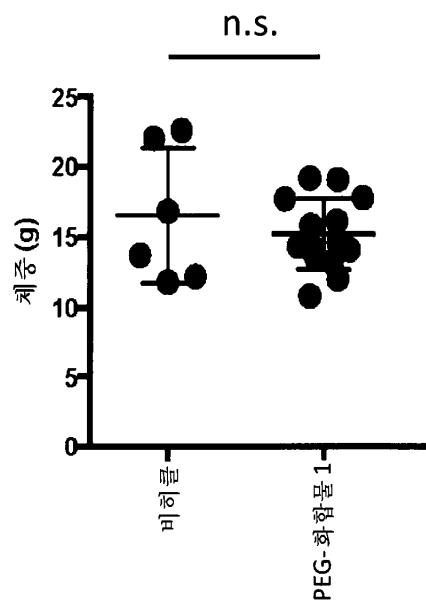


도면42a



처리 기간:

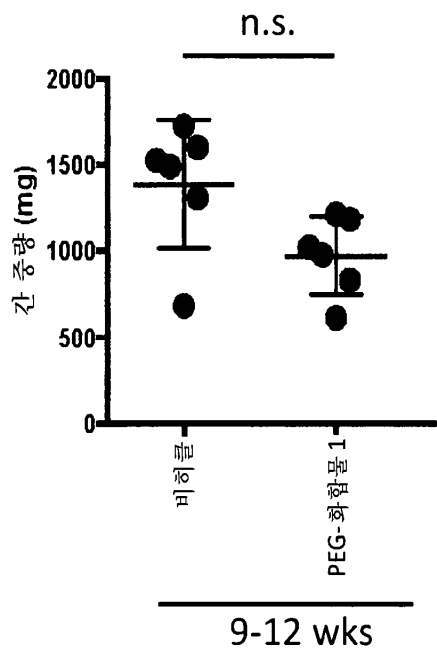
도면42b



처리 기간:

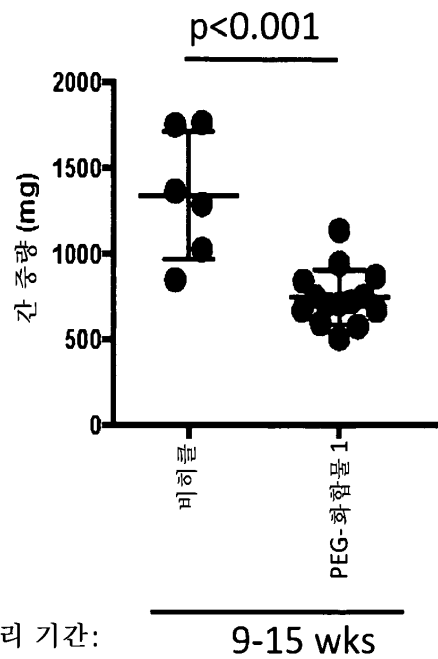
9-15 wks

도면43a



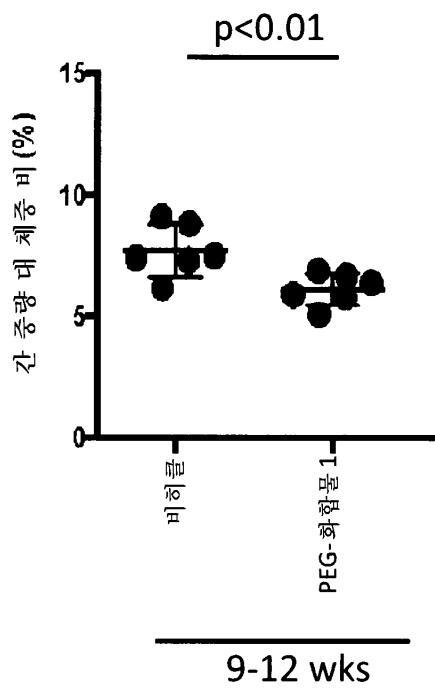
처리 기간:

도면43b



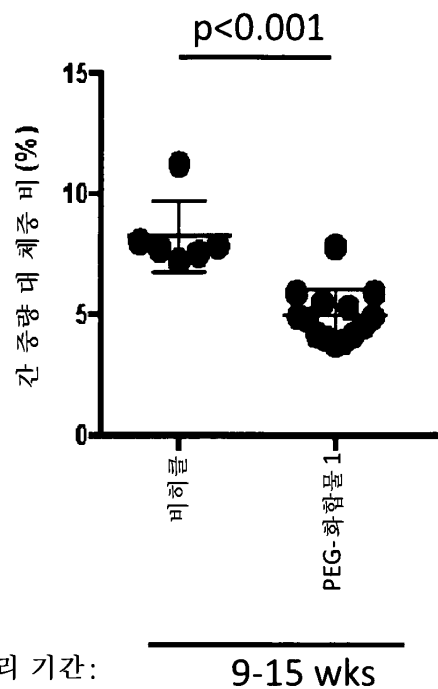
처리 기간:

도면44a



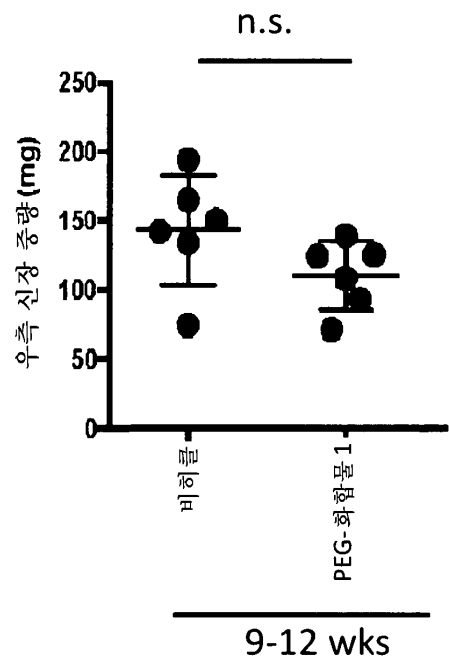
처리 기간:

도면44b



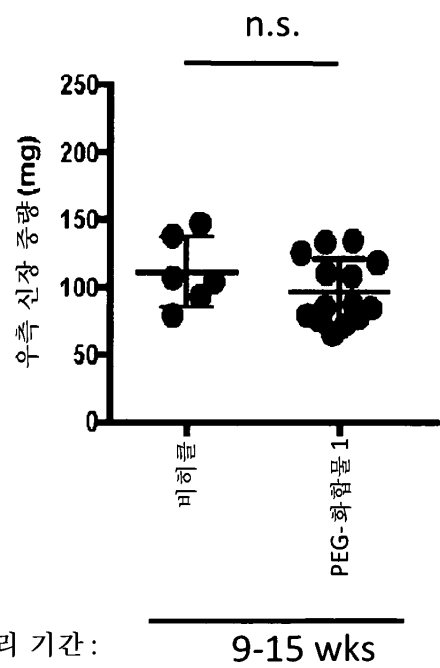
처리 기간:

도면45a



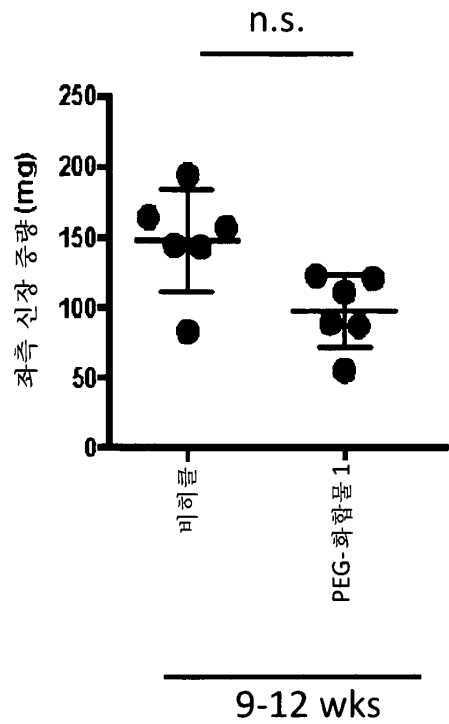
처리 기간:

도면45b



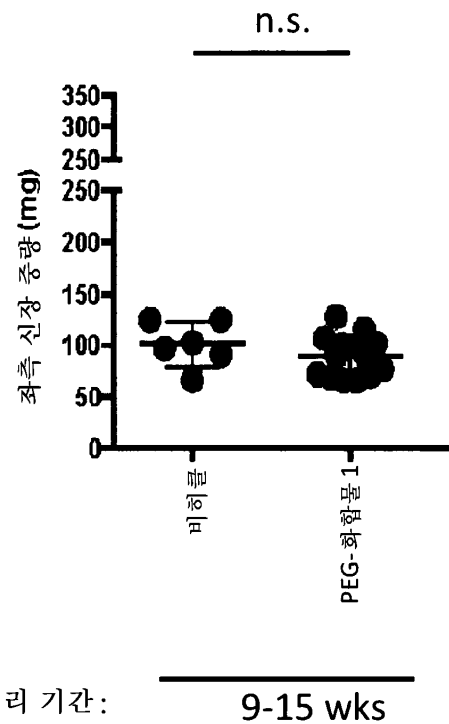
처리 기간:

도면46a



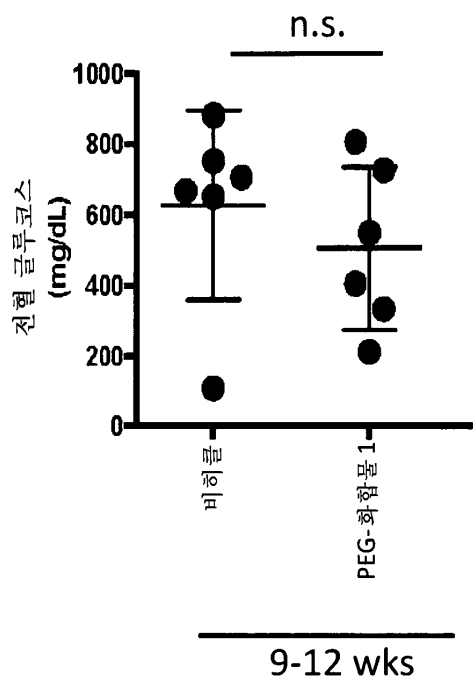
처리 기간:

도면46b



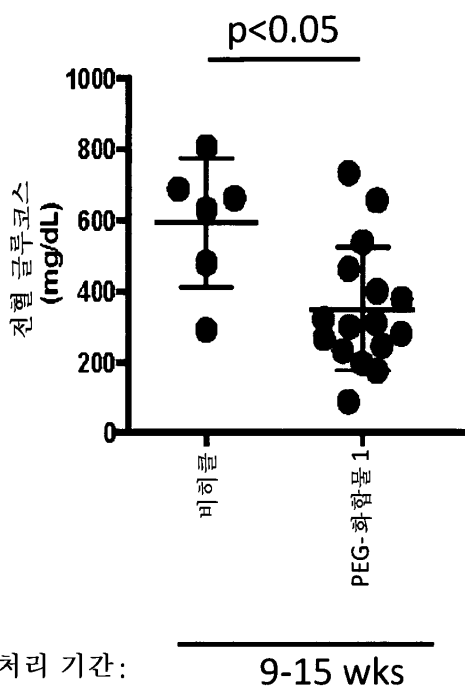
처리 기간:

도면47a



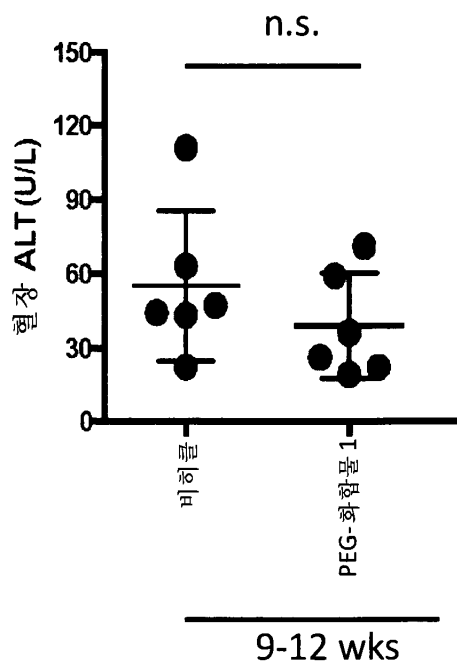
처리 기간:

도면47b



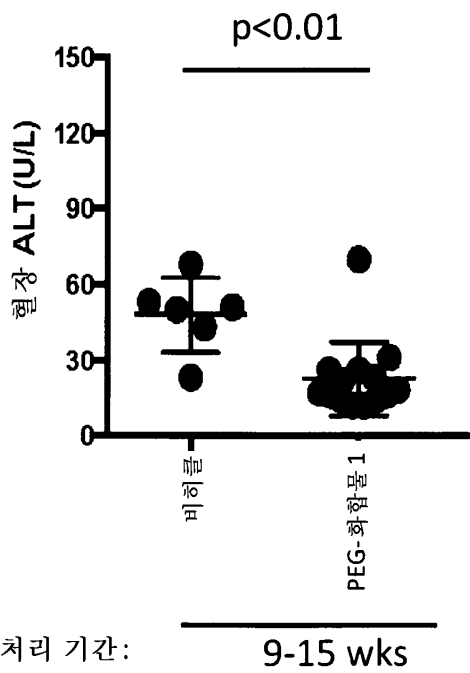
처리 기간:

도면48a



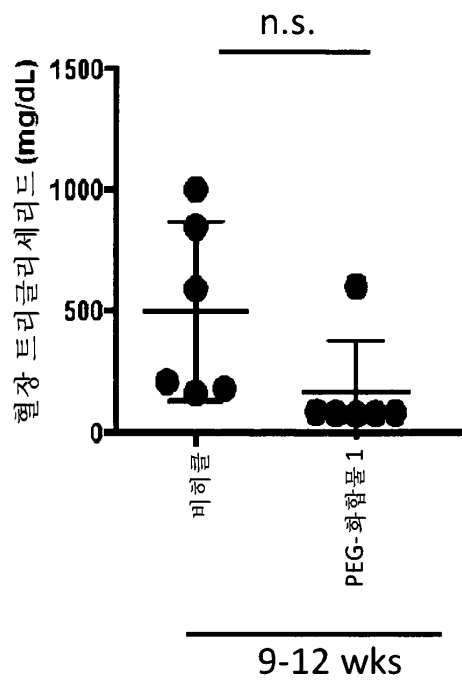
처리 기간:

도면48b



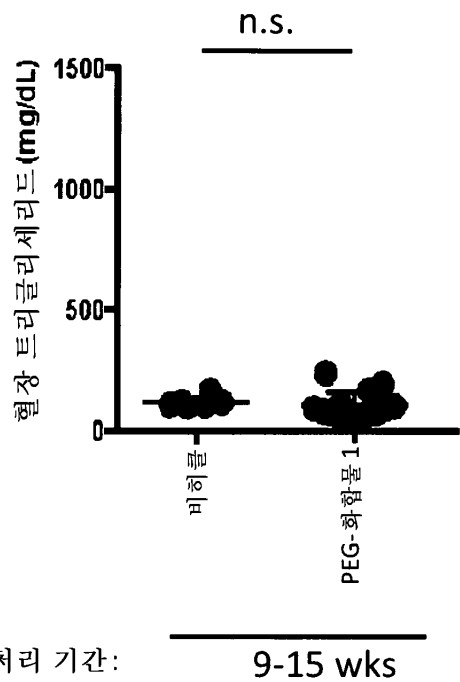
처리 기간:

도면49a



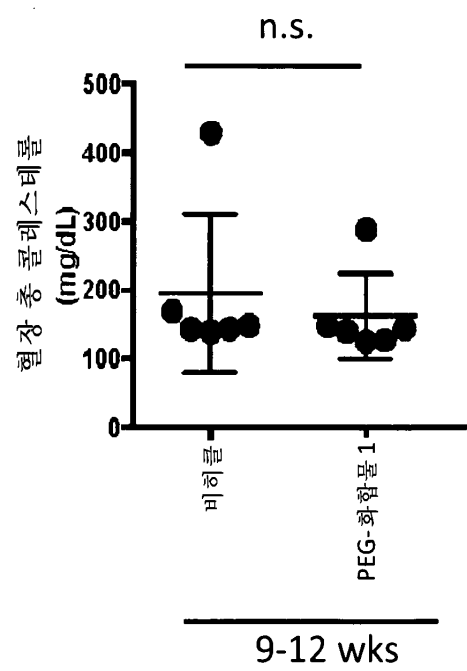
처리 기간:

도면49b



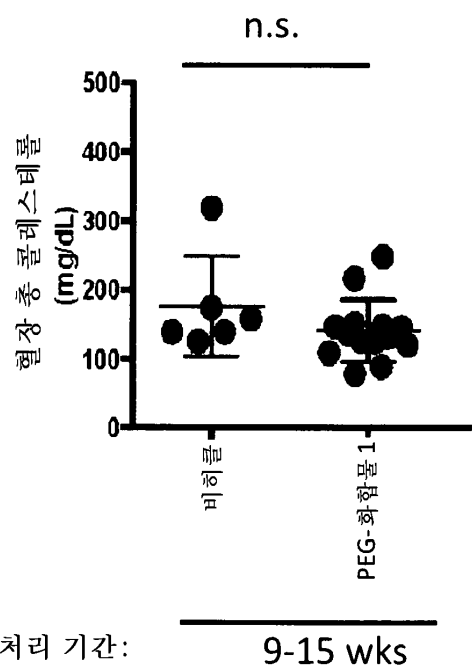
처리 기간:

도면50a



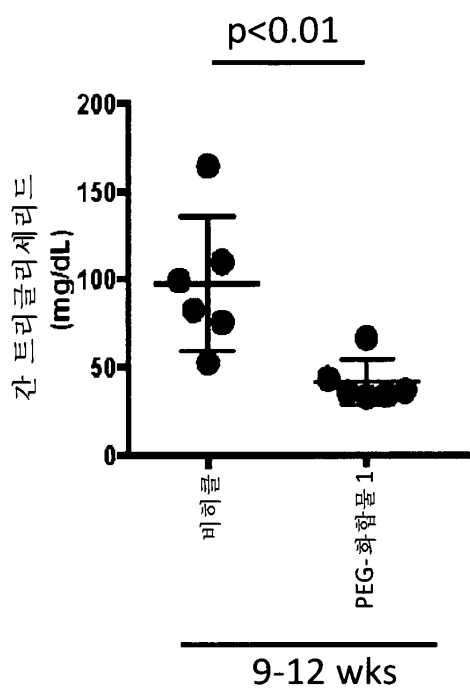
처리 기간:

도면50b



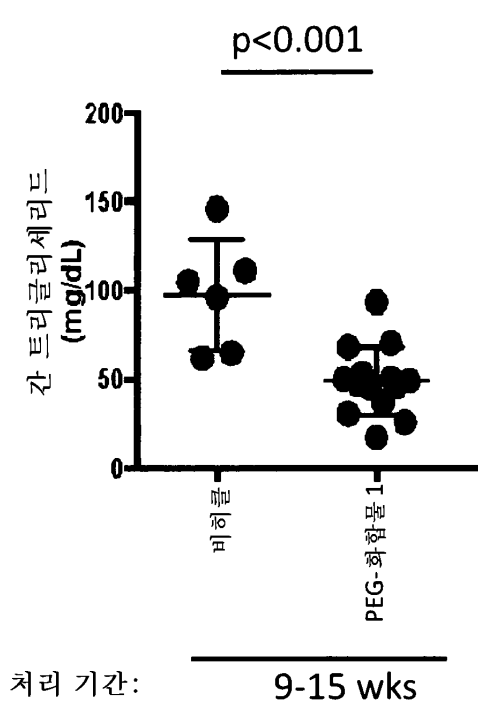
처리 기간:

도면51a



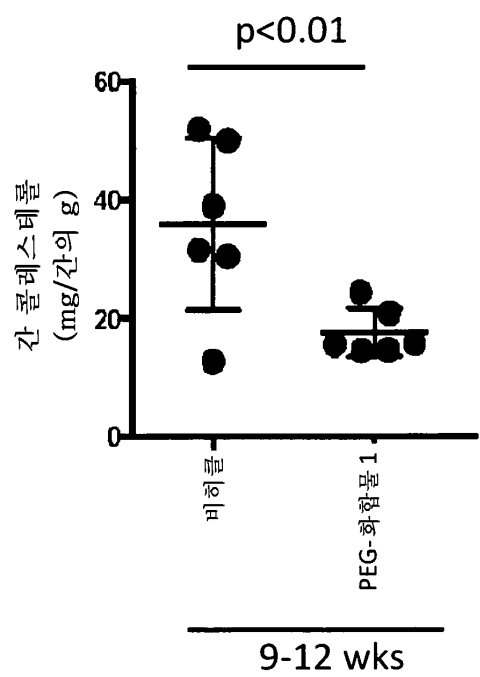
처리 기간 :

도면51b



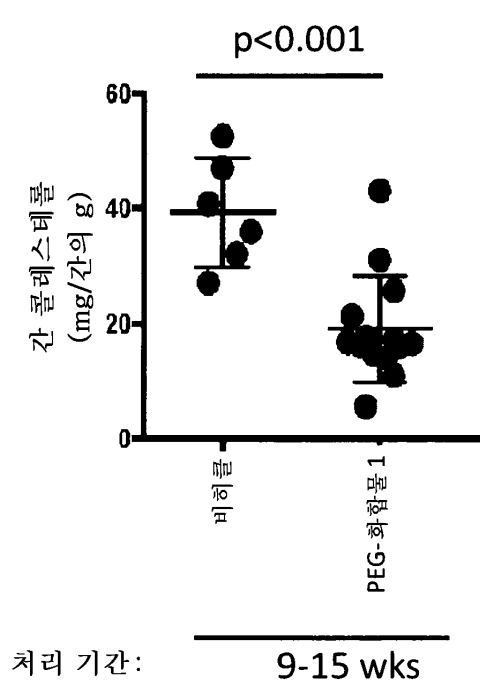
처리 기간 :

도면52a



처리 기간:

도면52b

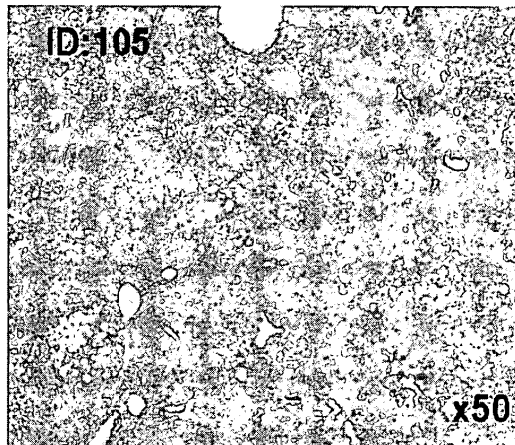


처리 기간:

9-15 wks

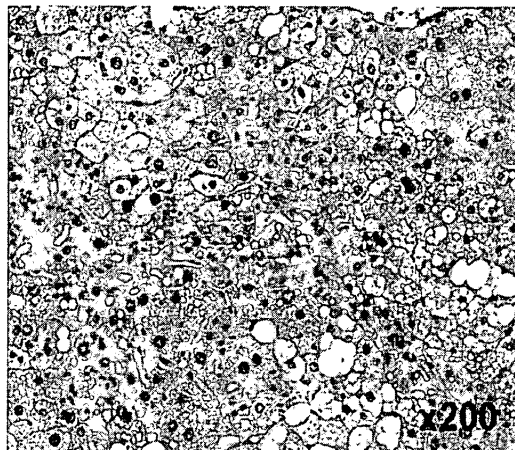
도면53a

비히클 (9-12주 처리)



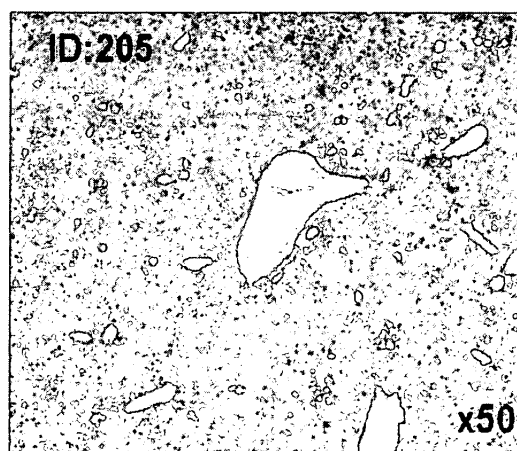
도면53b

비히클 (9-12주 처리)



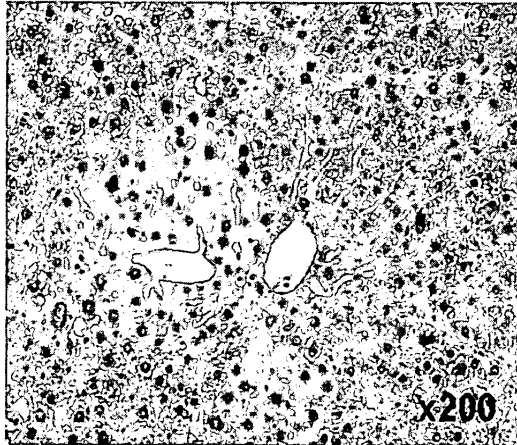
도면53c

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



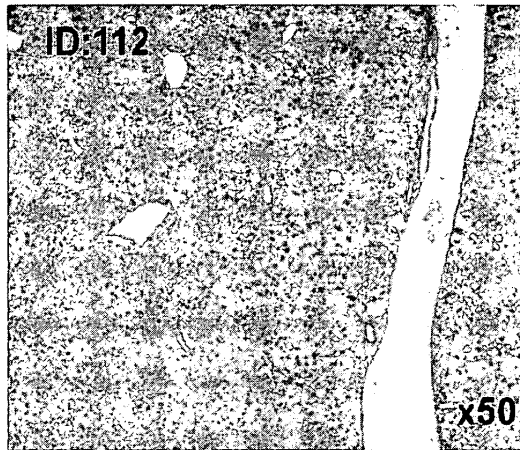
도면53d

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



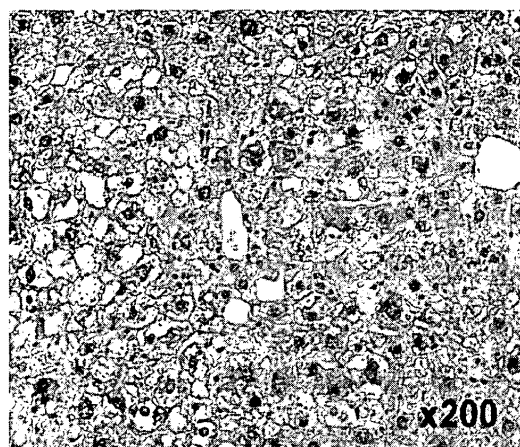
도면53e

비히클 (9-15주 처리)



도면53f

비히클 (9-15주 처리)



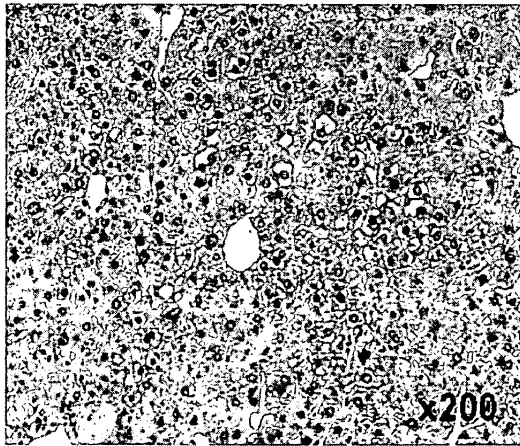
도면53g

PEG-화합물 1
(9-15주 처리)

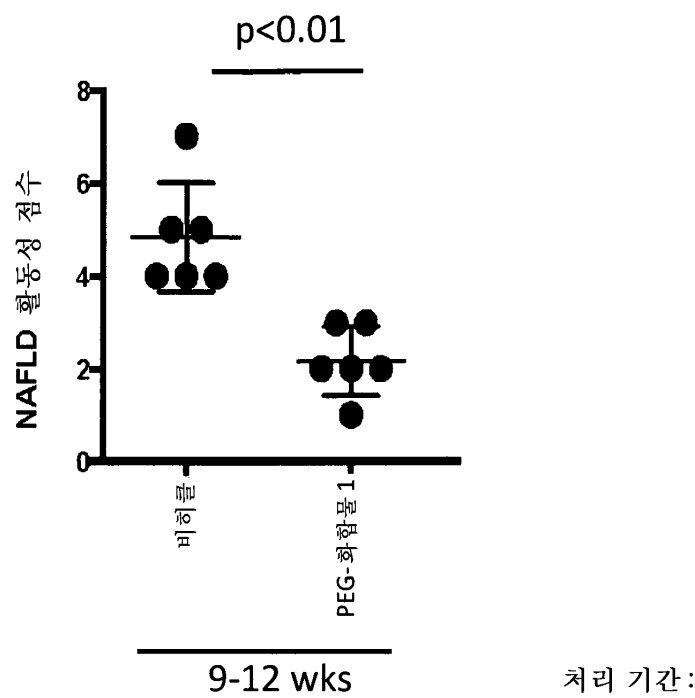


도면53h

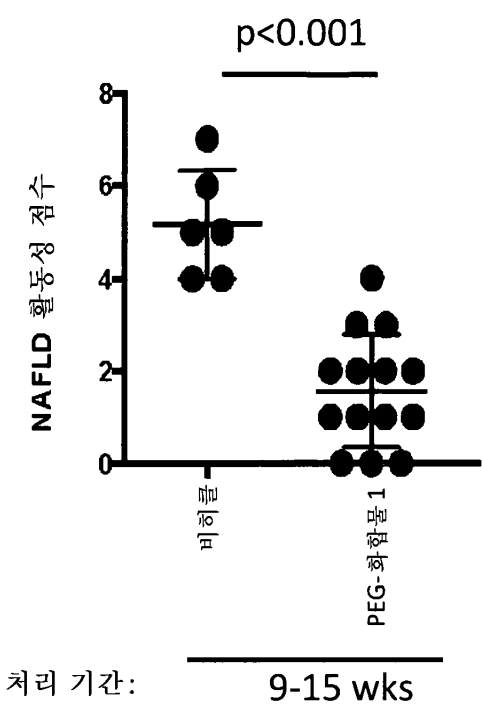
PEG-화합물 1
(9-15주 처리)



도면54a

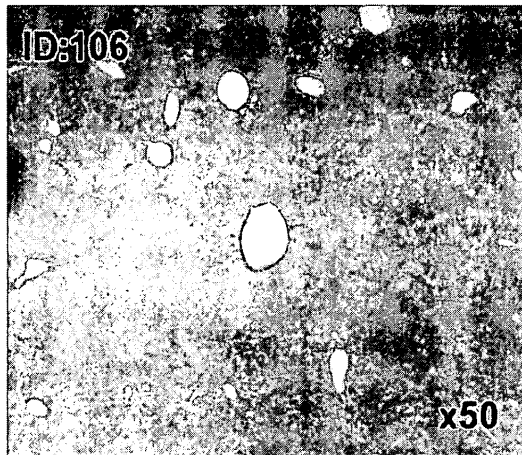


도면54b



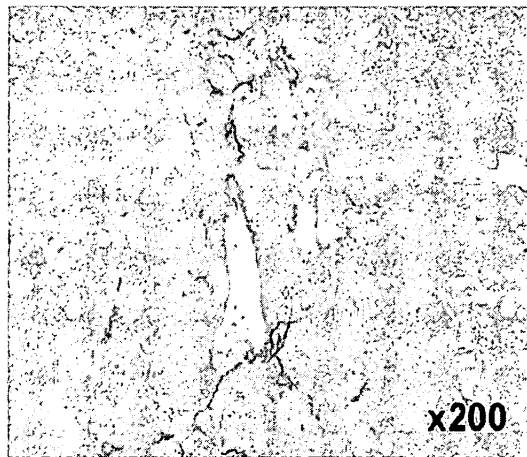
도면55a

비히클 (9-12주 처리)



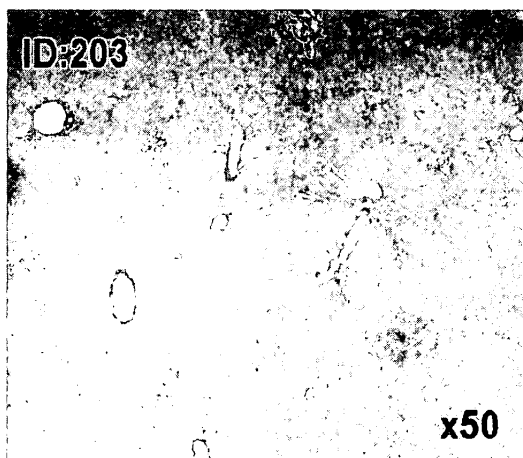
도면55b

비히클 (9-12주 처리)



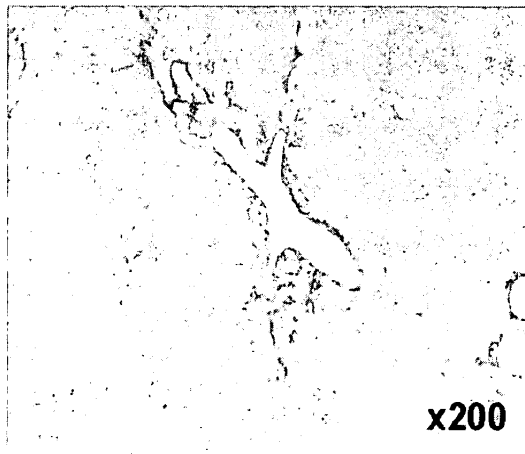
도면55c

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



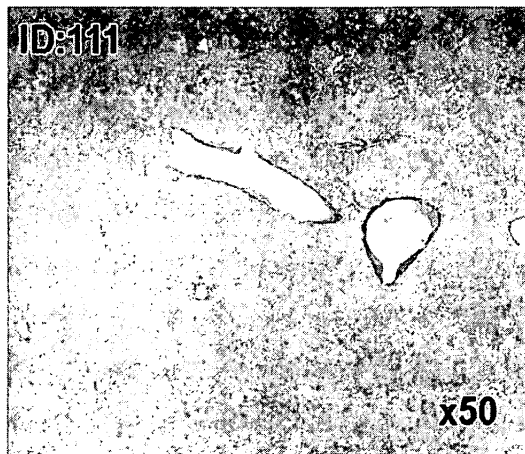
도면55d

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



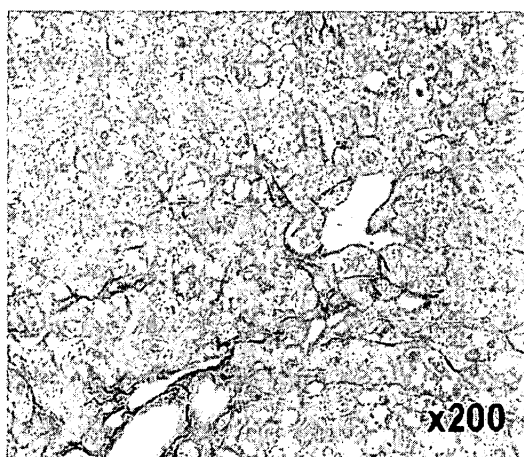
도면55e

비히클 (9-15주 처리)



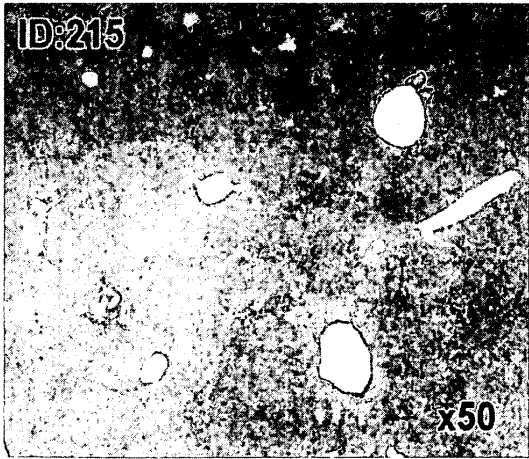
도면55f

비히클 (9-15주 처리)



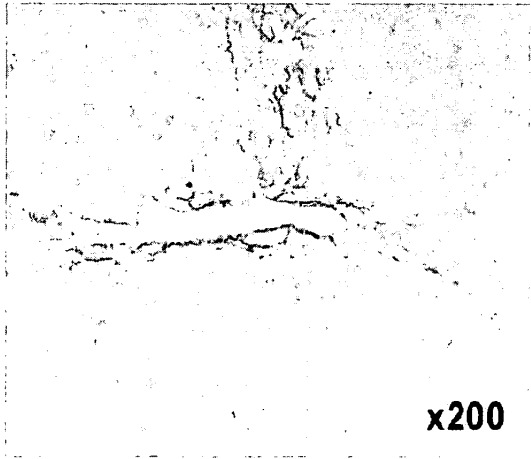
도면55g

PEG-화합물 1
(9-15주 처리)

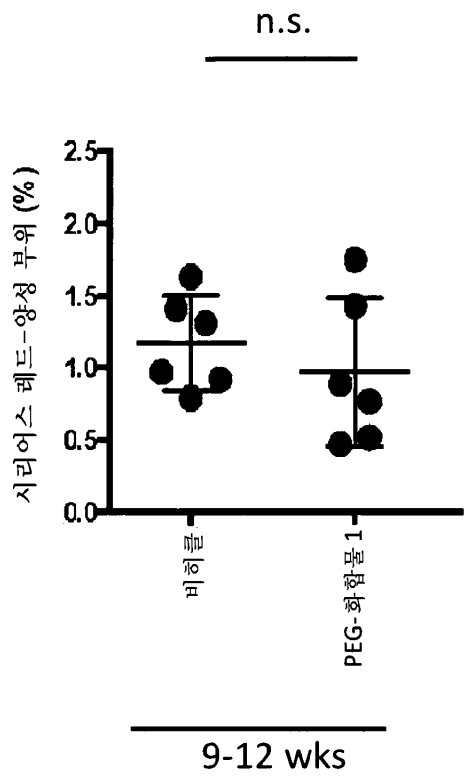


도면55h

PEG-화합물 1
(9-15주 처리)

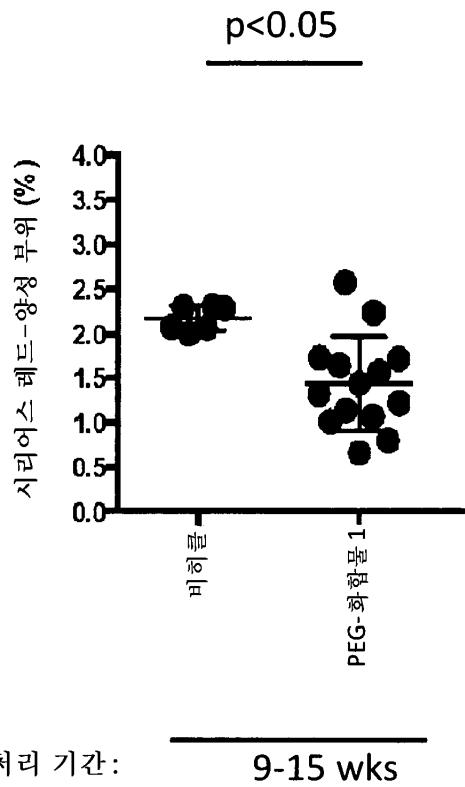


도면56a



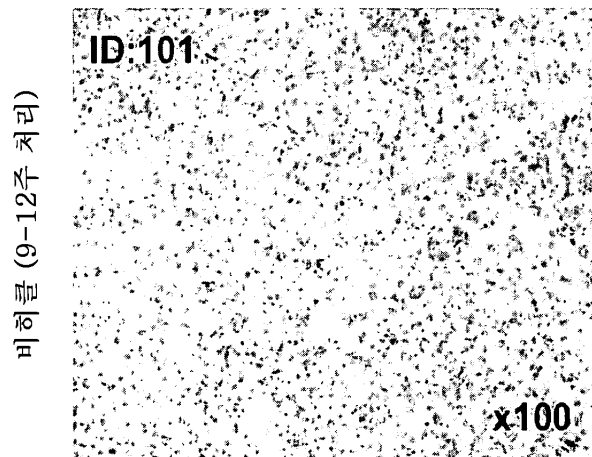
처리 기간:

도면56b

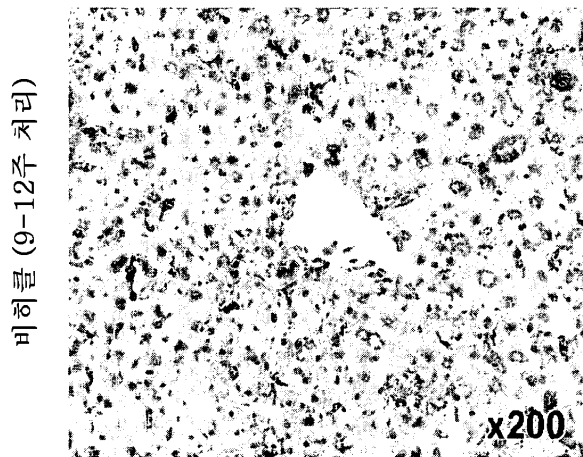


처리 기간:

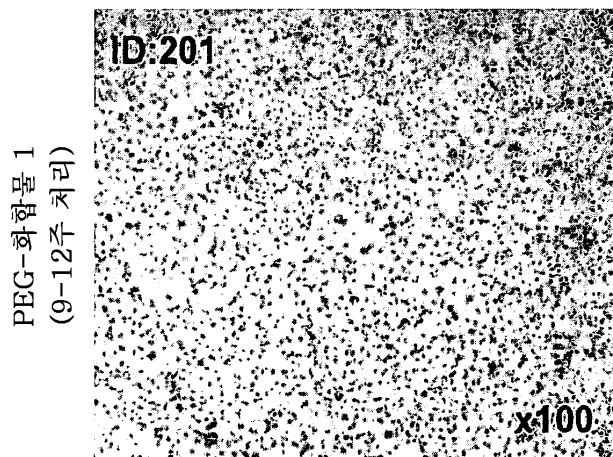
도면57a



도면57b

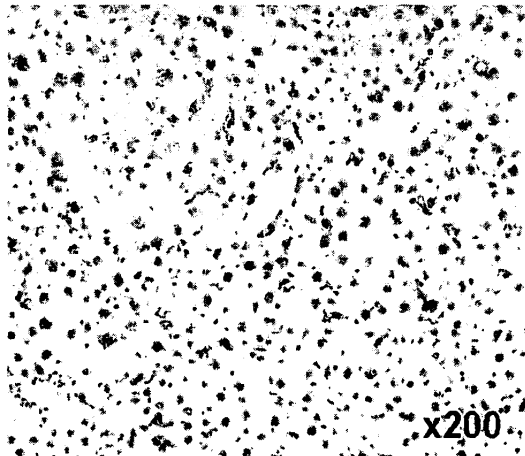


도면57c



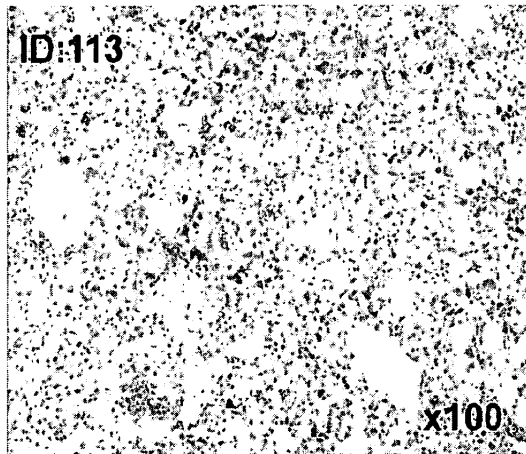
도면57d

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



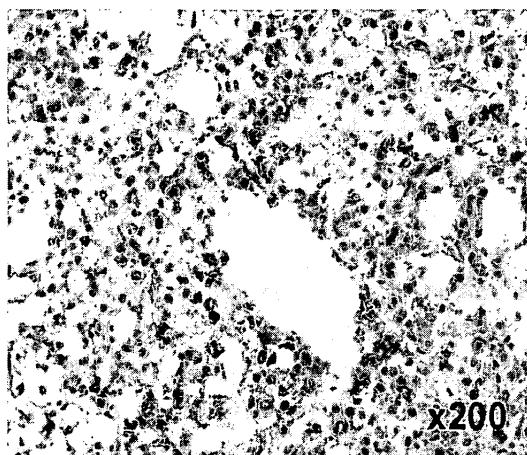
도면57e

비히클 (9-15주 처리)

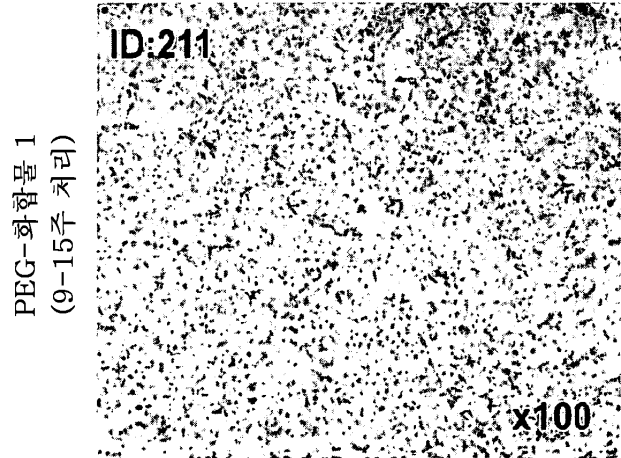


도면57f

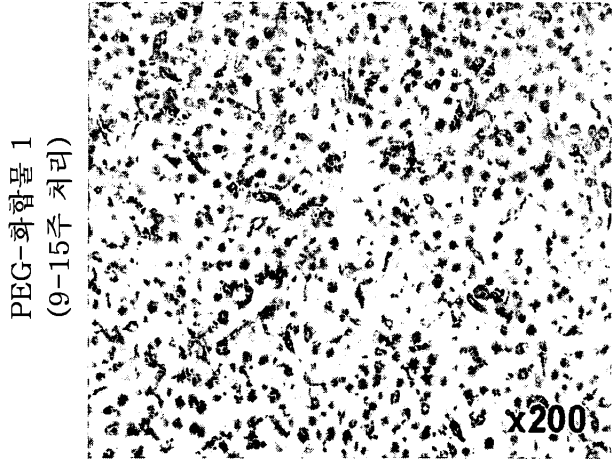
비히클 (9-15주 처리)



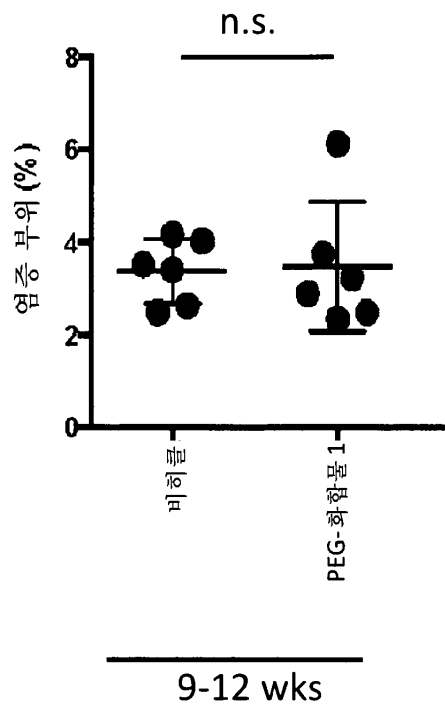
도면57g



도면57h

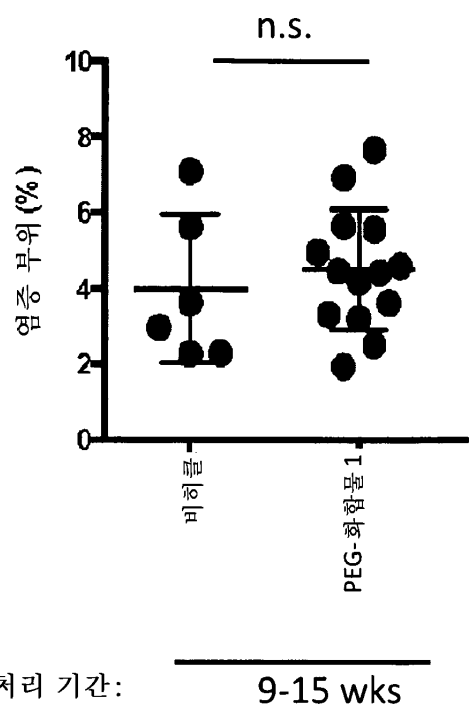


도면58a



처리 기간:

도면58b

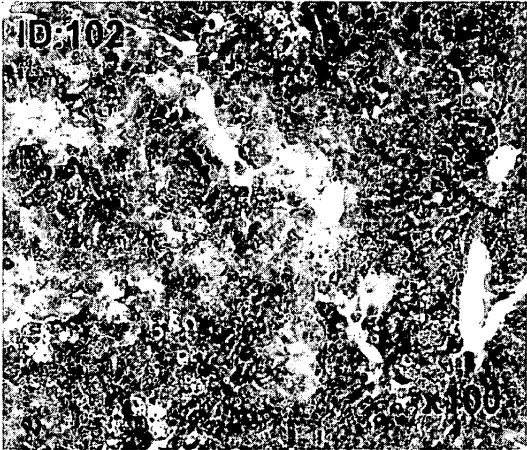


처리 기간:

9-15 wks

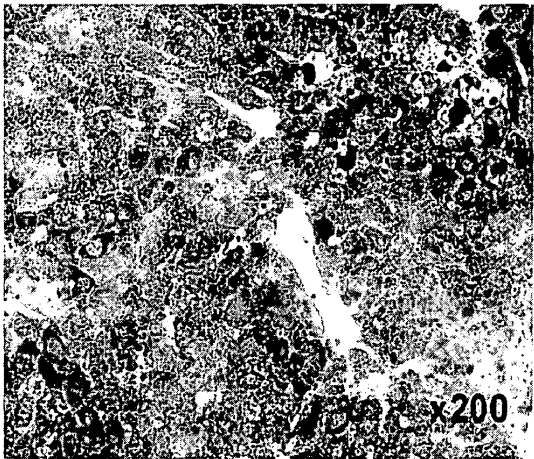
도면59a

비히클 (9-12주 처리)



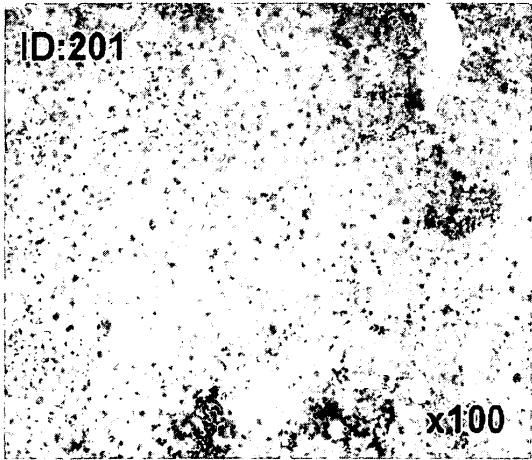
도면59b

비히클 (9-12주 처리)



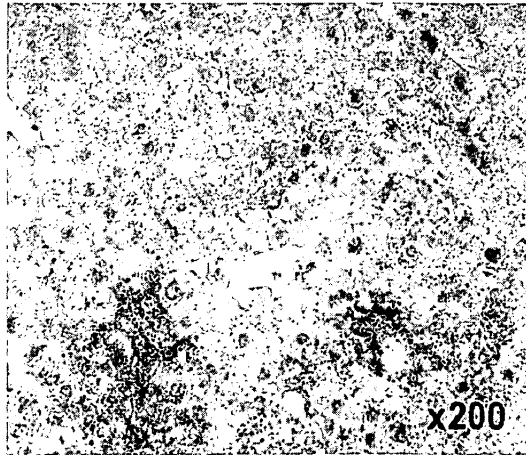
도면59c

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



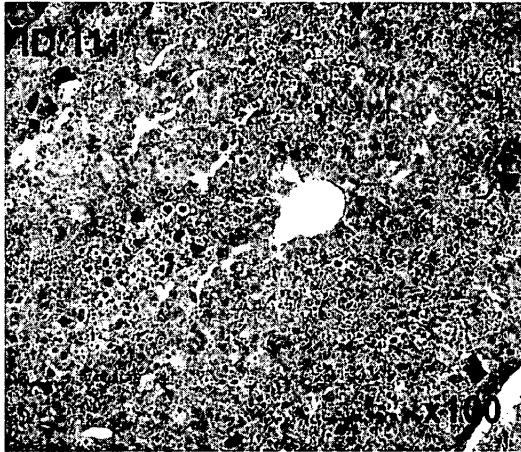
도면59d

PEG-화합물 1
(9-12주 처리)



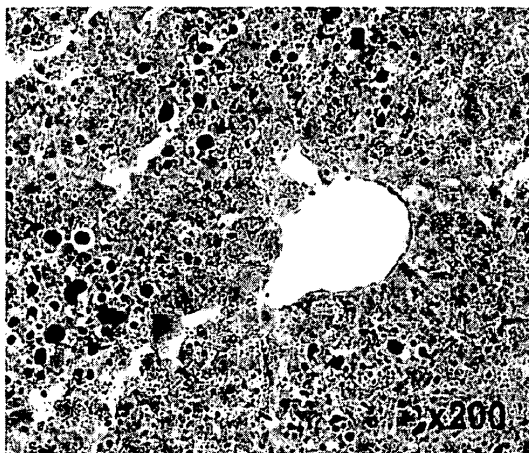
도면59e

비히클 (9-15주 처리)



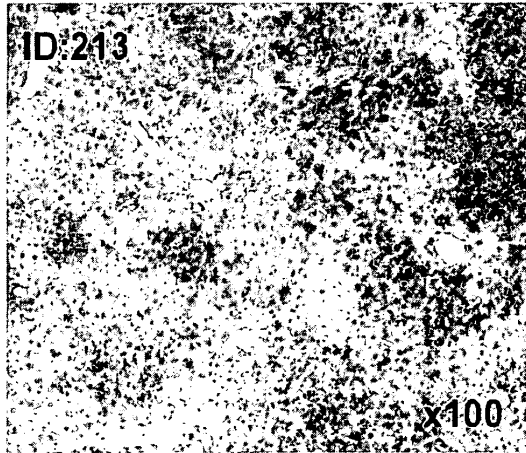
도면59f

비히클 (9-15주 처리)



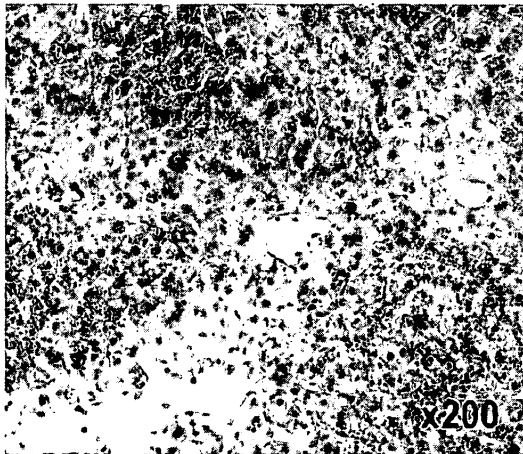
도면59g

PEG-화합물 1
(9-15주 처리)

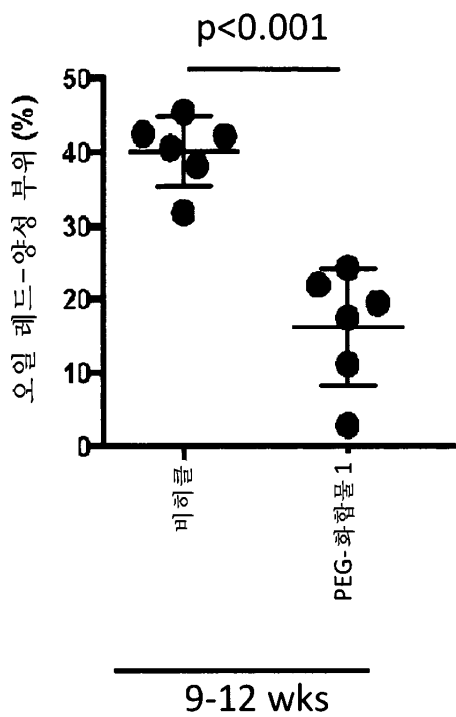


도면59h

PEG-화합물 1
(9-15주 처리)

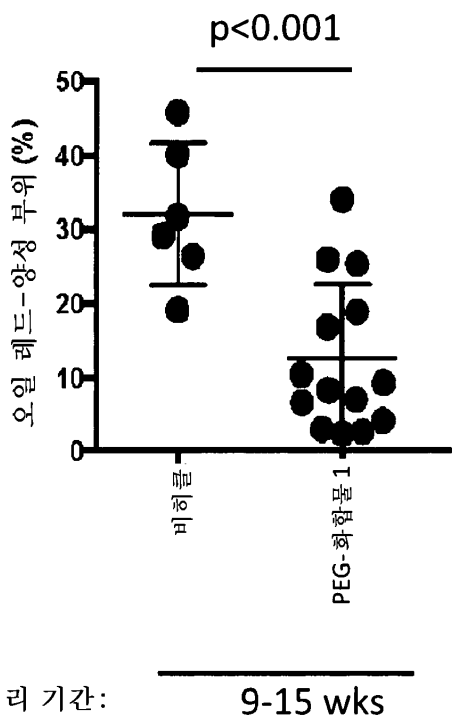


도면60a



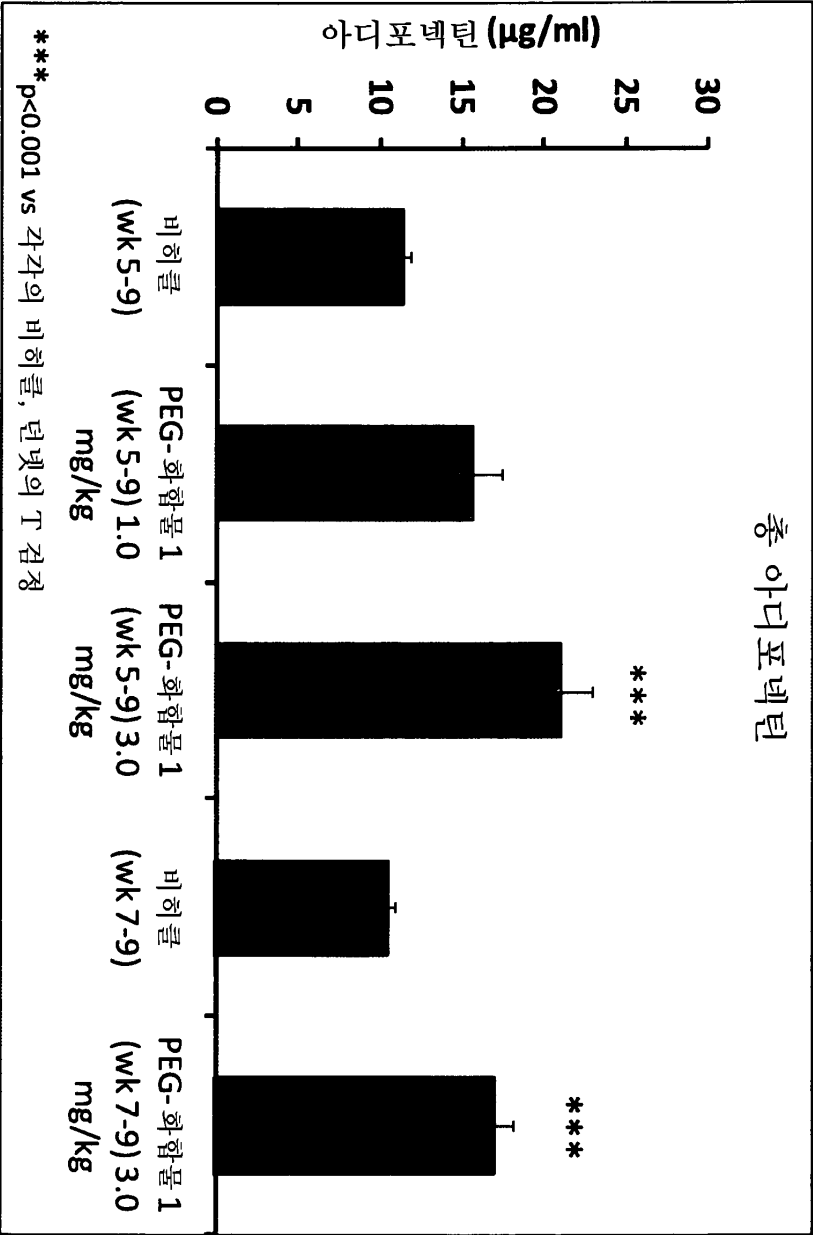
처리 기간:

도면60b

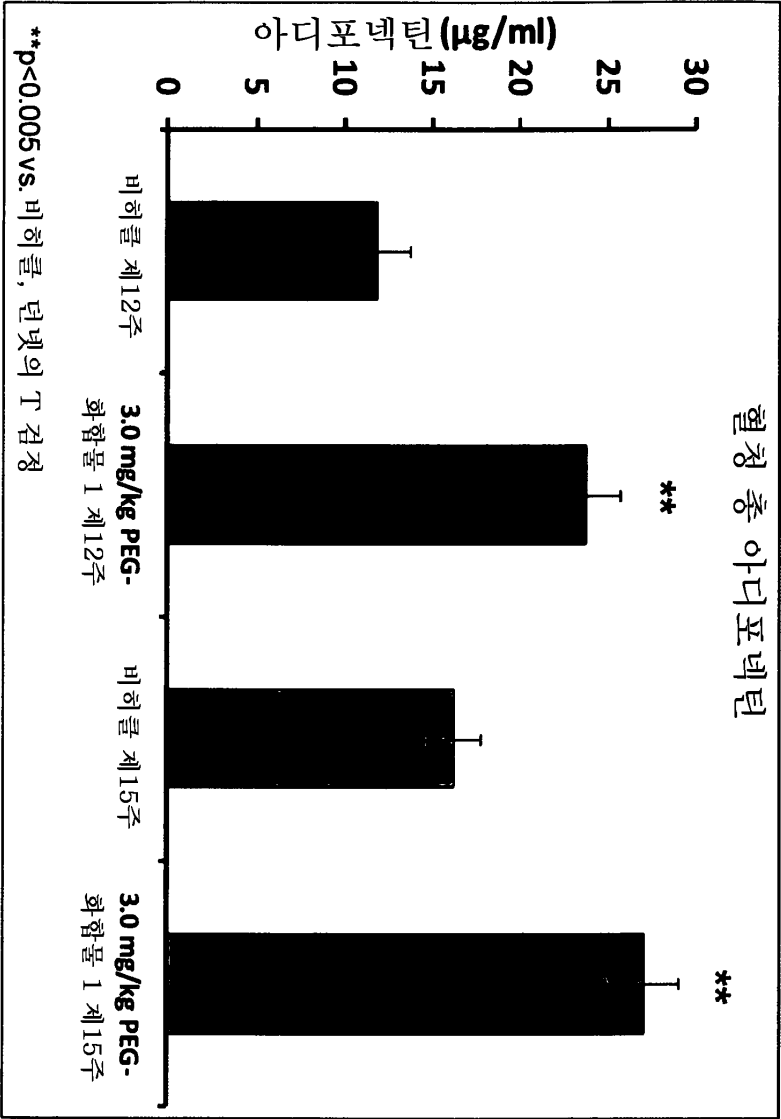


처리 기간:

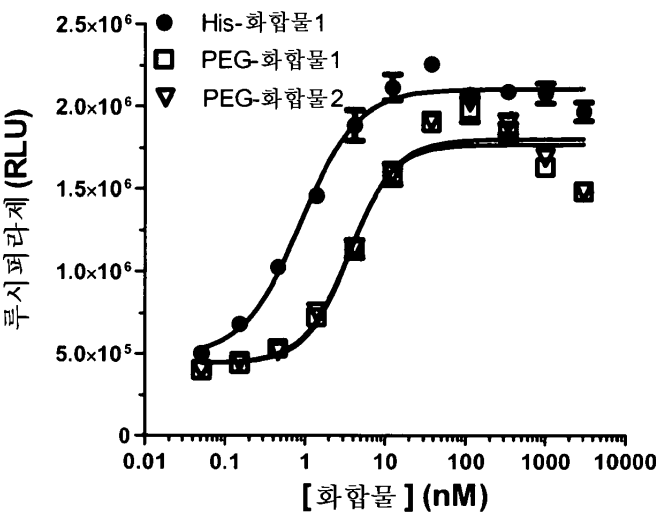
도면61



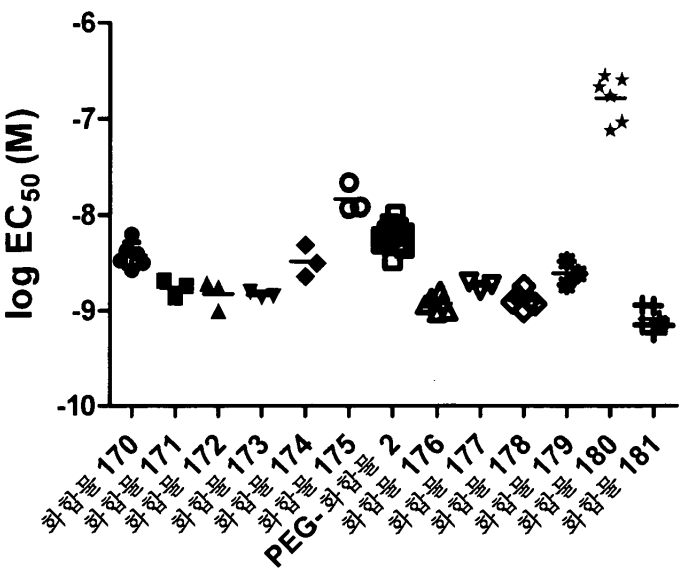
도면62



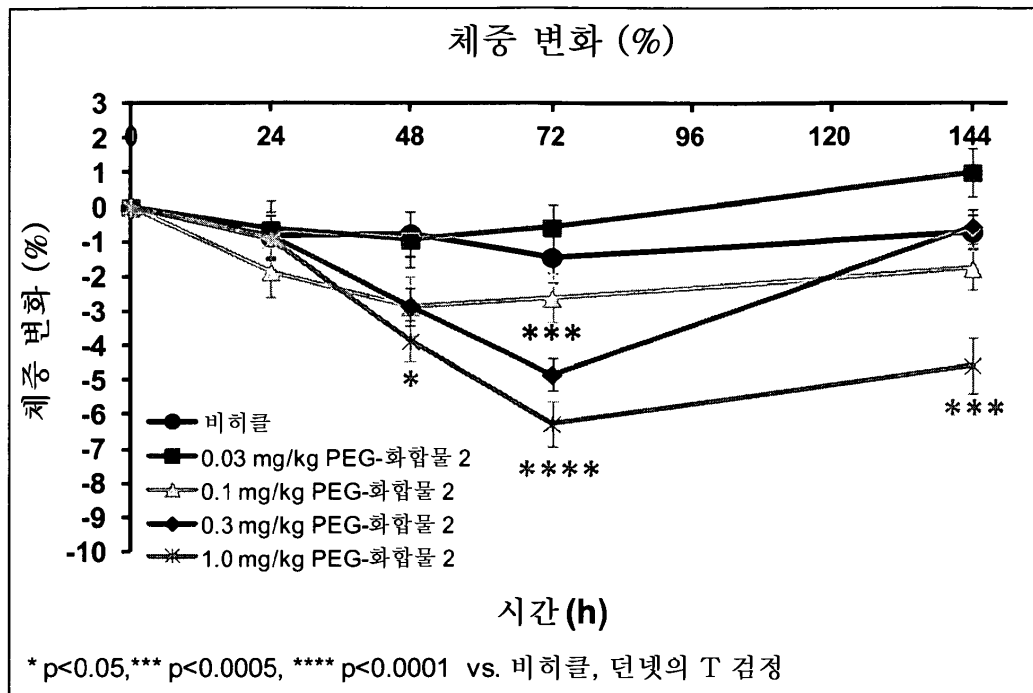
도면63



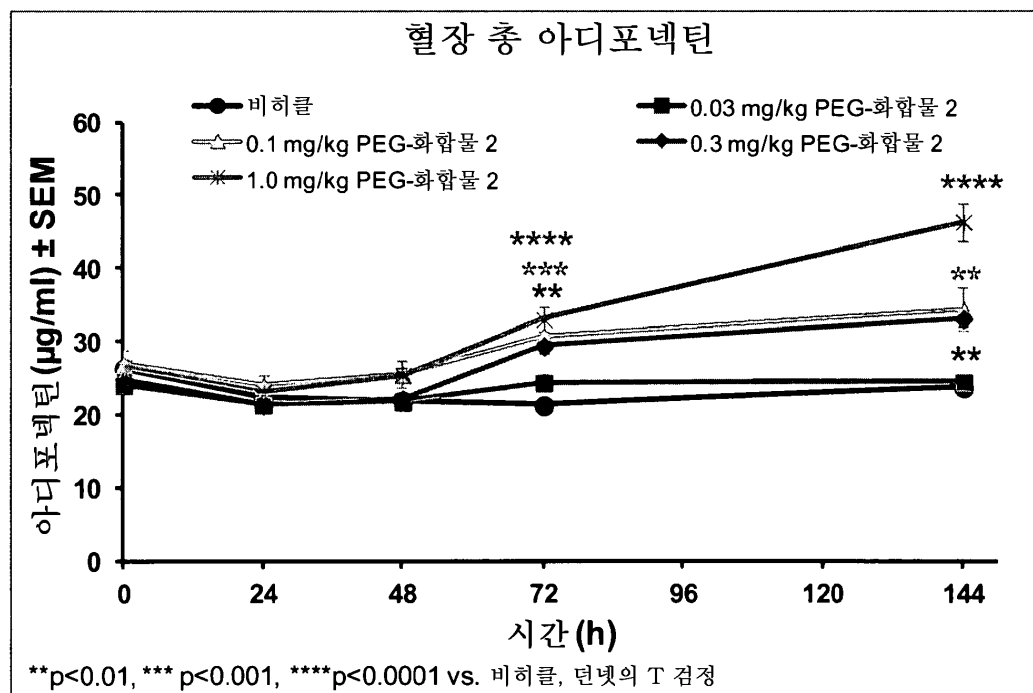
도면64



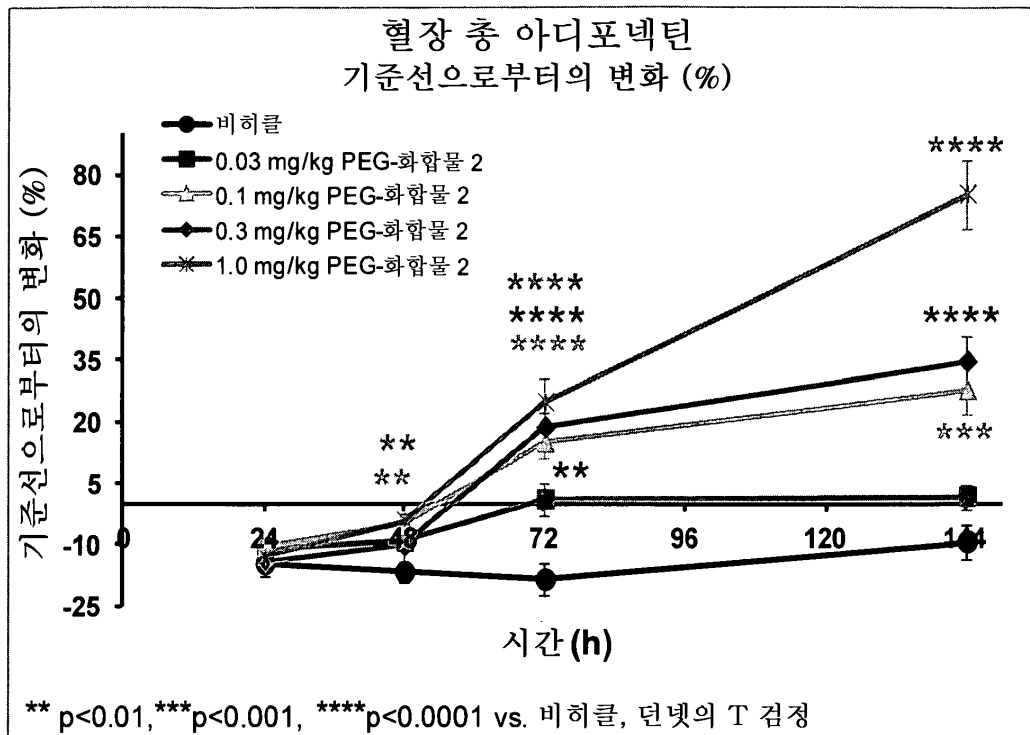
도면65



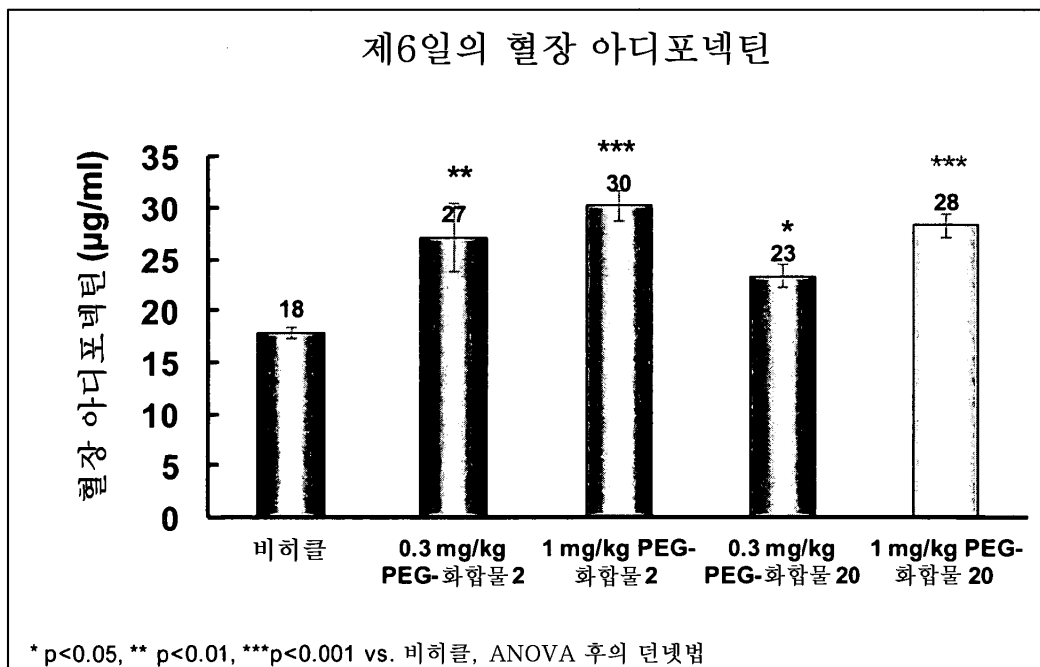
도면66a



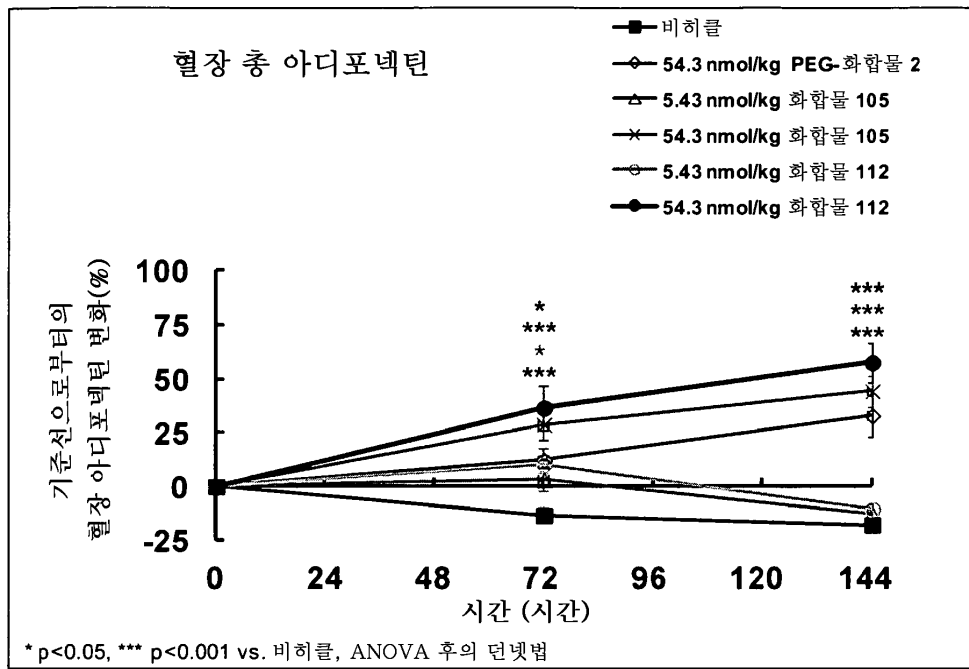
도면66b



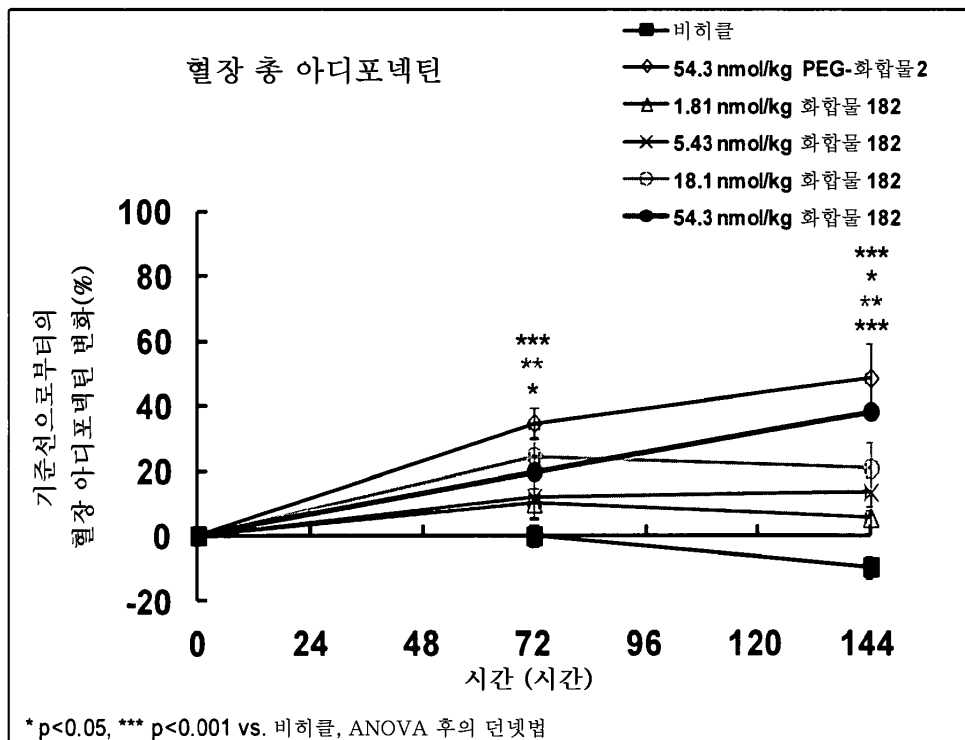
도면67a



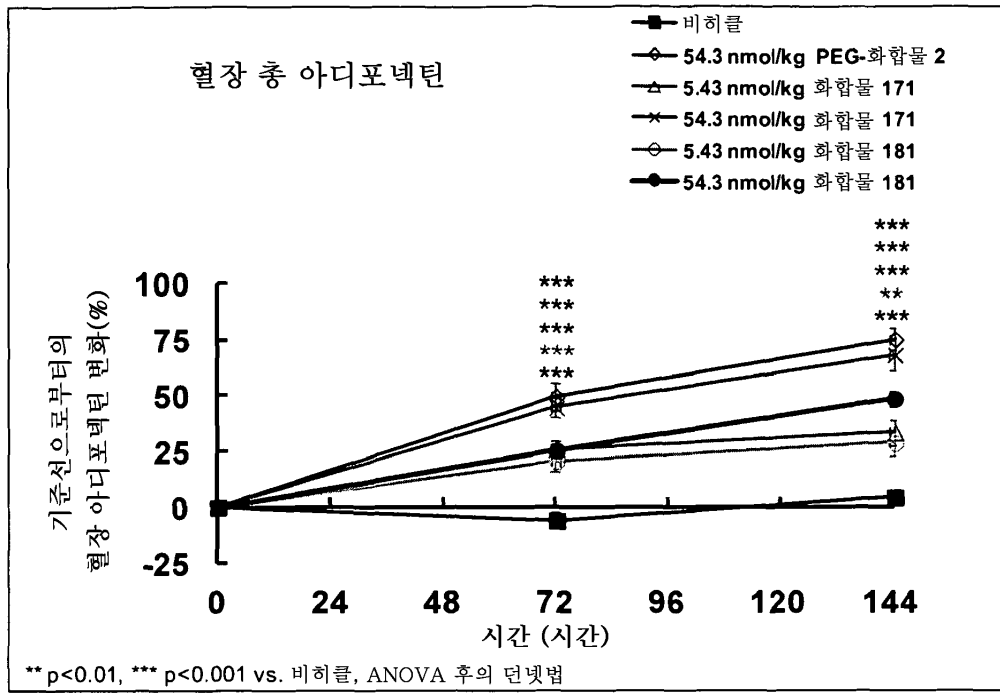
도면67b



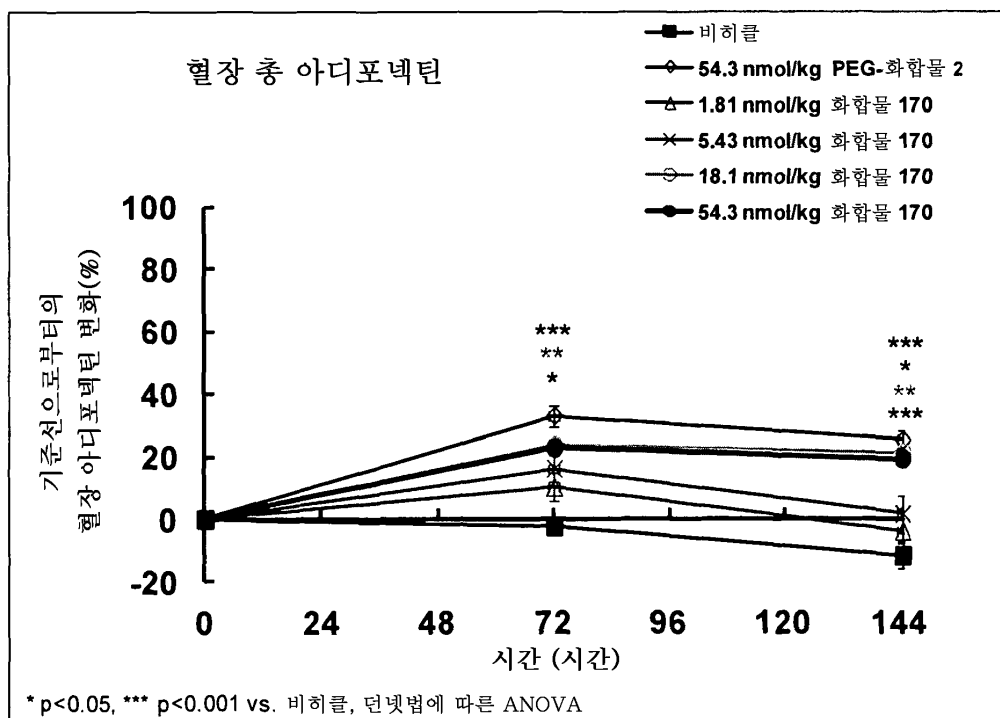
도면67c



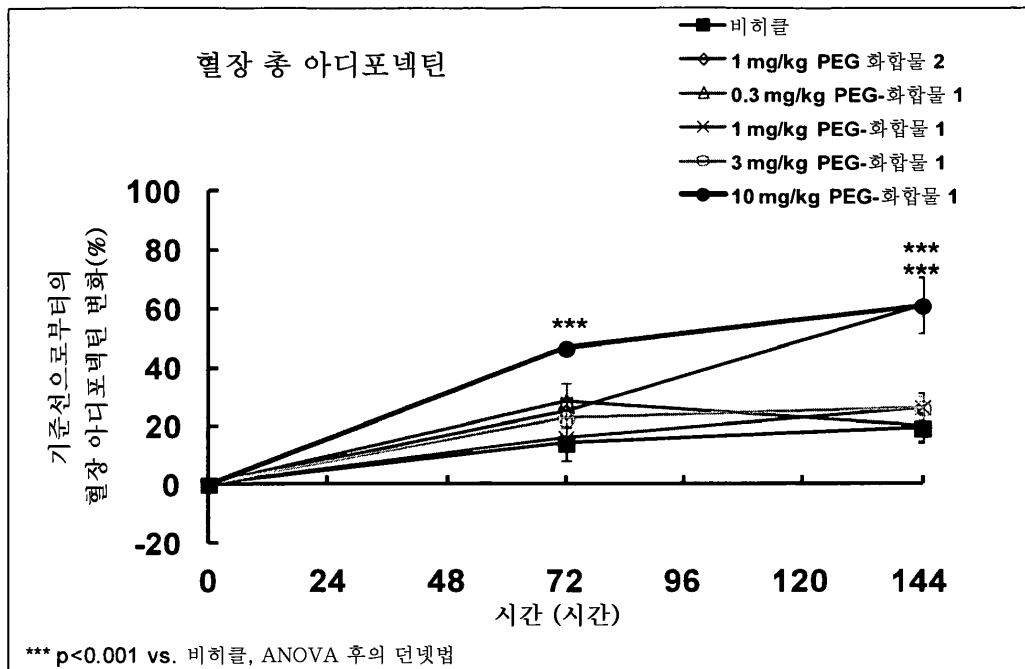
도면67d



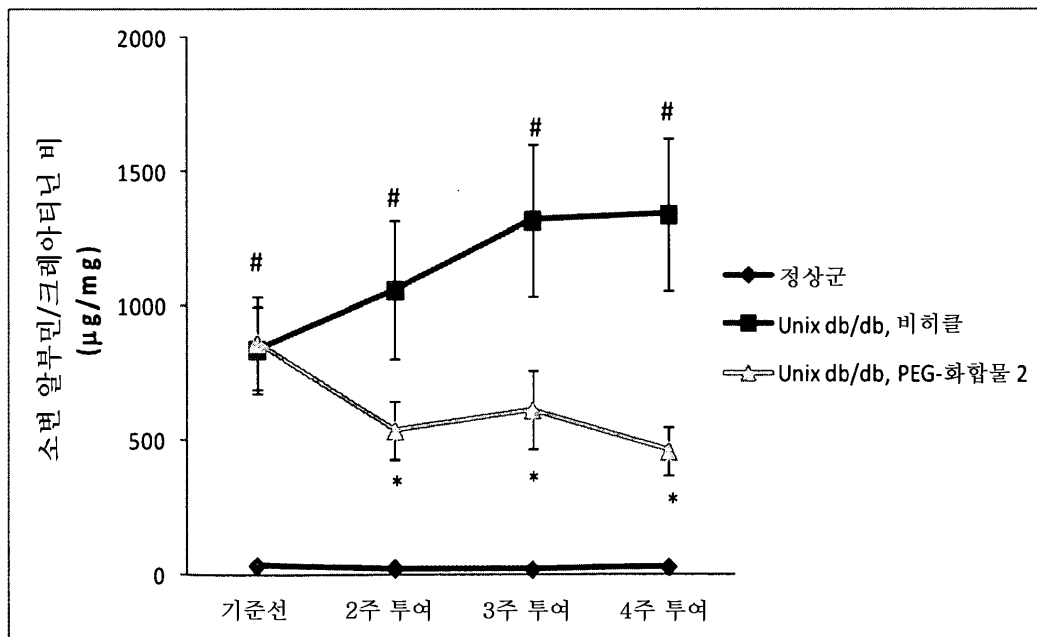
도면67e



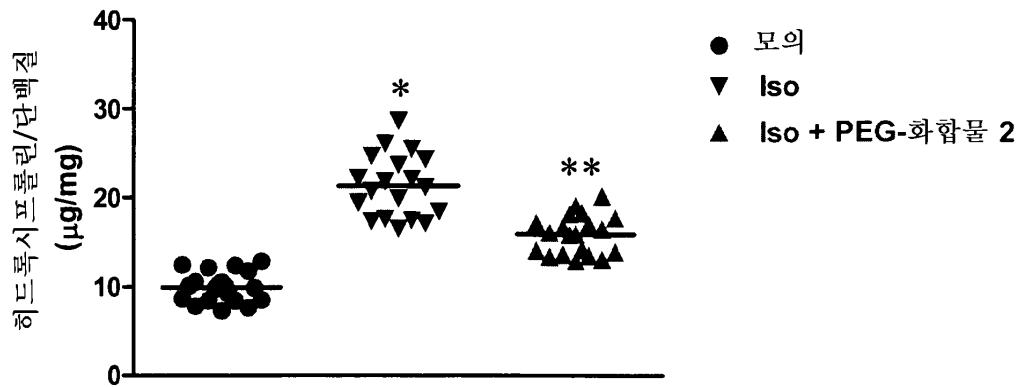
도면67f



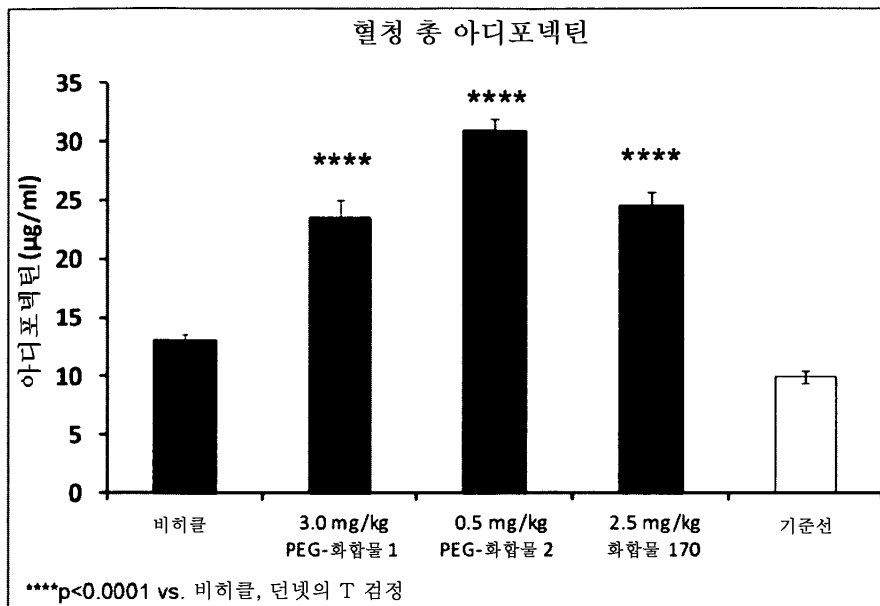
도면68



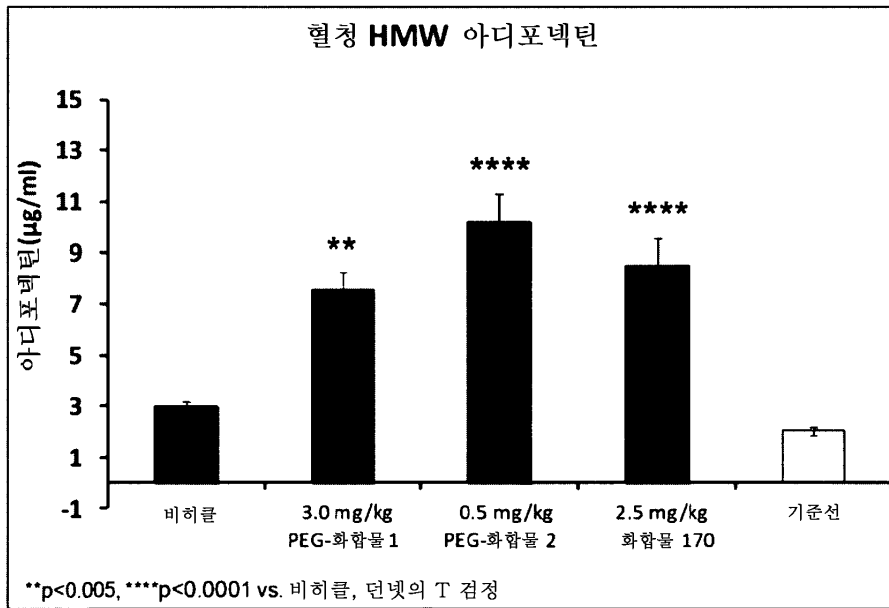
도면69



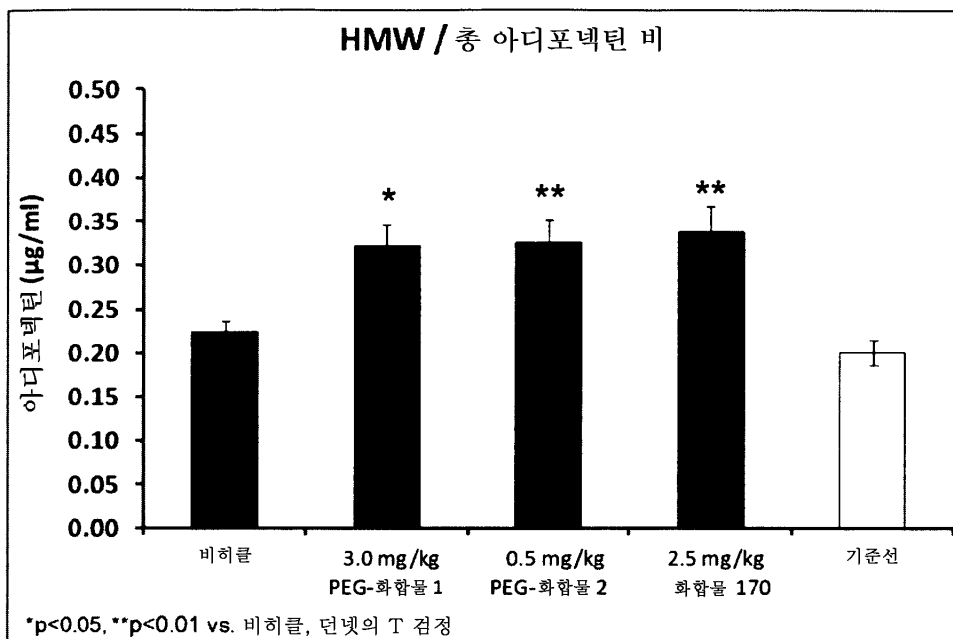
도면70a



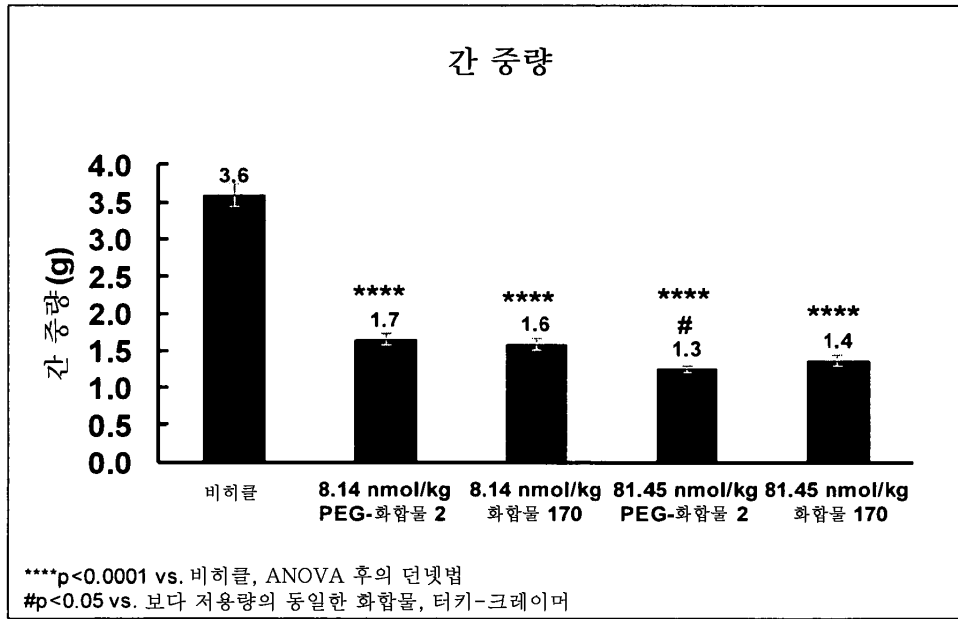
도면70b



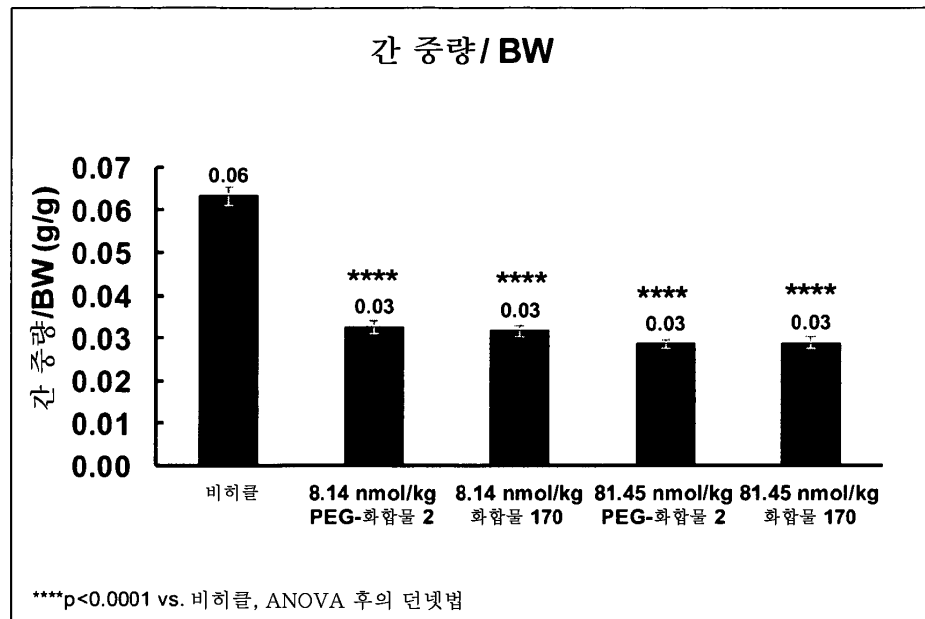
도면70c



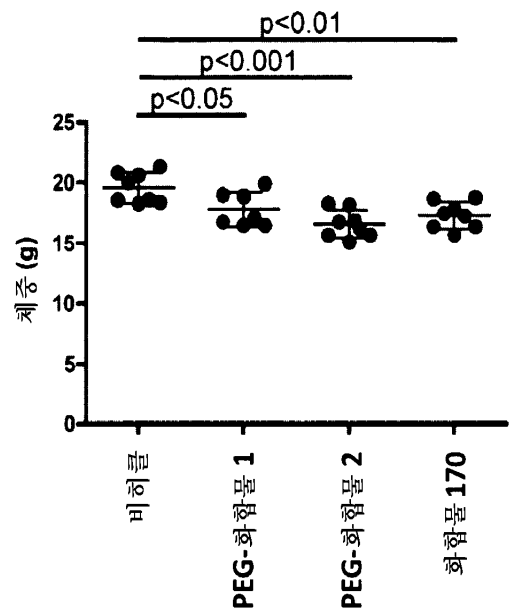
도면71a



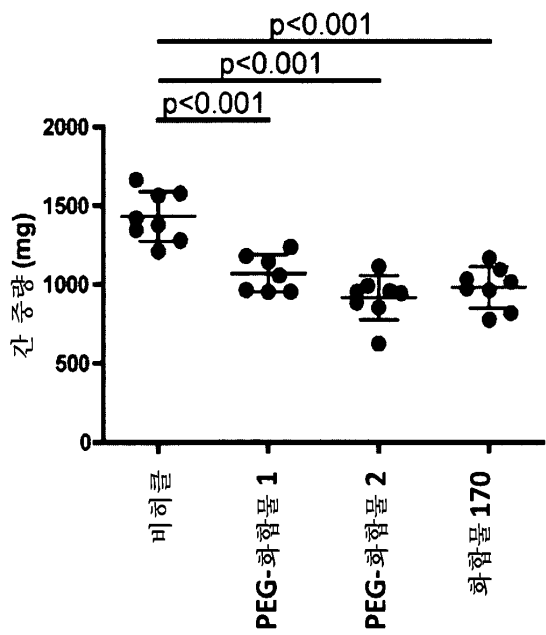
도면71b



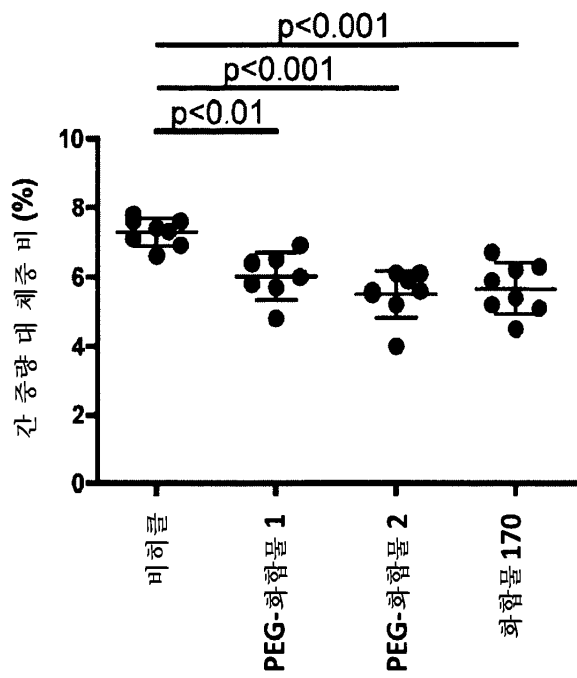
도면72a



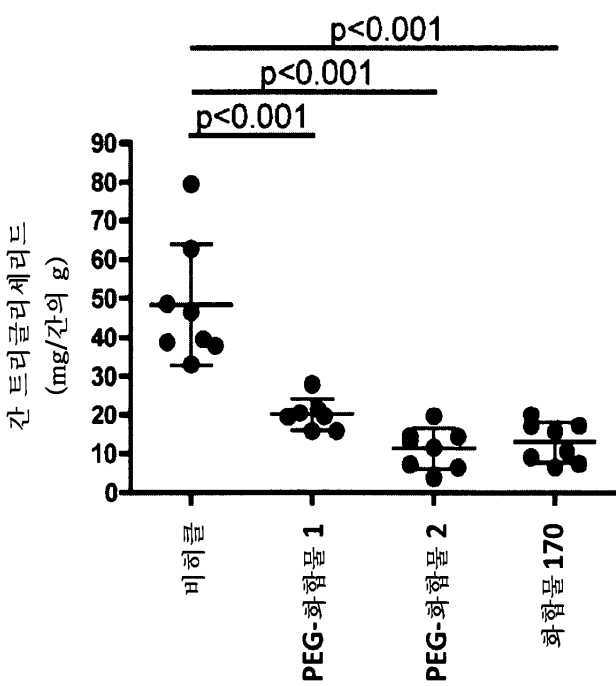
도면72b



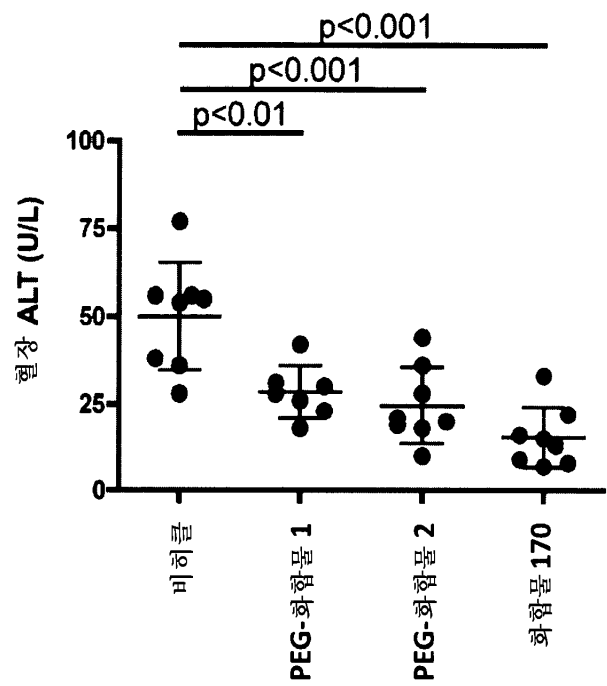
도면72c



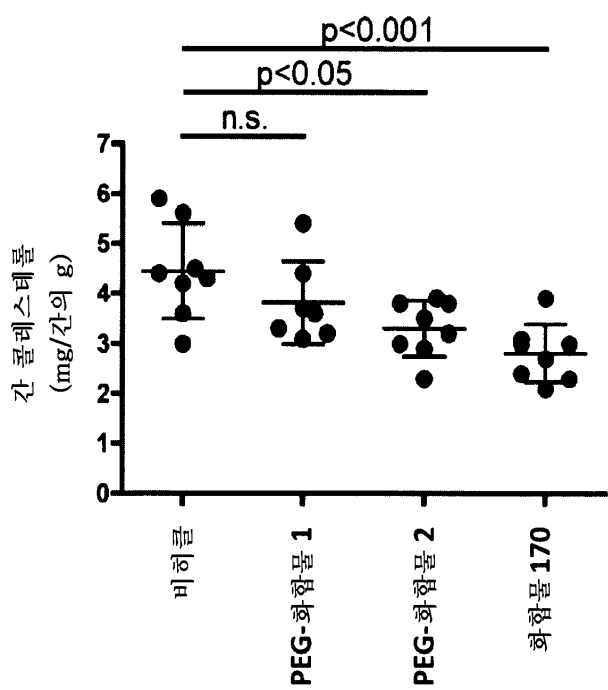
도면72d



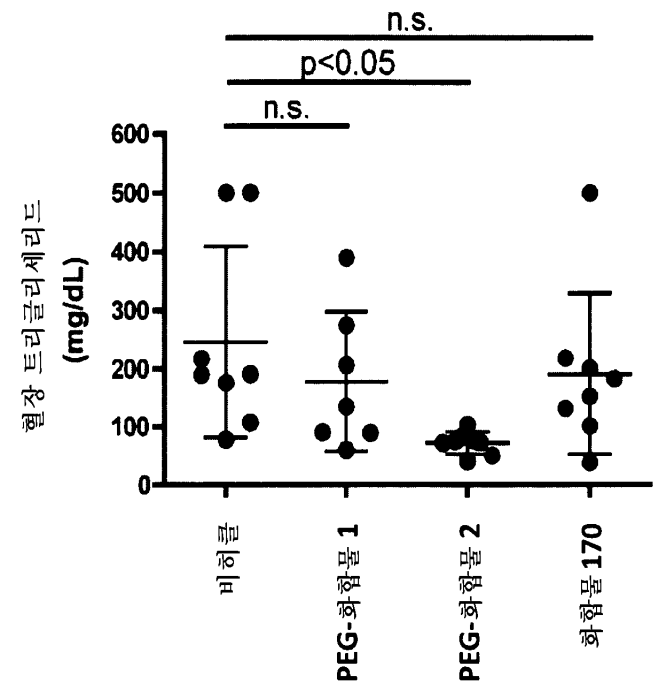
도면72e



도면72f



도면72g



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
- <120> Modified FGF-21 Polypeptides and Uses Thereof
- <130> 43270.2213
- <141> 2015-10-23
- <150> US 62/068,296
- <151> 2014-10-24
- <150> US 62/068,514
- <151> 2014-10-24
- <150> US 62/068,523
- <151> 2014-10-24
- <150> US 62/068,526
- <151> 2014-10-24
- <150> US 62/068,534
- <151> 2014-10-24
- <150> US 62/141,337
- <151> 2015-04-01
- <150> US 62/141,383

<151> 2015-04-01

<160> 487

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210

> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met His His His His His His Ser Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser

1 5 10 15

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu

115 120 125

Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala

130 135 140

Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro

145 150 155 160

Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu

165 170 175

Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180 185 190

<210> 3

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

100 105 110

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

115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu

165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

195 200 205

Ser

<210> 4

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp

20 25 30

Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu

35 40 45

Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro

165 170 175

Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro

180 185 190

Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

195 200 205

<210> 5

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 6

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 195 200 205
 Ser

<210> 7

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp

20 25 30

Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu

35 40 45

Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro

165 170 175

Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro

180 185 190

Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

195 200 205

<210> 8

<211> 546

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

caccccatcc ctgactccag tcctctctg caattcgggg gccaaagtcg gcagcggtag	60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg	120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg	180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg	360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca	420
ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg	480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct	540
tcctga	546

<210> 9

<211> 576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgcatcatc atcatcatca tagcggcggc caccccatcc ctgactccag tcctctctg	60
caattcgggg gccaaagtcg gcagcggtag ctctacacag atgatgccca gcagacagaa	120
gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa	180
agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca	240
tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct	300
gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa	360
gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc	420
cgaggaccag ctgcttctt gccactacca ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc	480
ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg ggctcctcgg accctctgag catggtggga	540
ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct tcctga	576

<210> 10

<211> 630

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60

cttctgctgg gagcctgccca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc 120

gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac 180

ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc 240

ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaactt tgggagtcaa gacatccagg 300

ttcctgtgcc agcgccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc 360

tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420

ggcctcccgc tgcacctgcc aggggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480

ccagctcgct tctgccact accaggccctg cccccgcac ccccgagcc acccggaatc 540

ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc 600

cagggccgaa gccccagcta cgcttcctga 630

<210> 11

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60

cttctgggag cctgccagcg acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg 120

ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg 180

gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg 240

cagctgaaag ccttgaagcc gggagttatt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc 300

ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgtcc actttgacct tgaggcctgc 360

agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc 420

ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg acctgcacc ccgaggacca 480

gctcgttcc tgccactacc aggctgccc ccgcacccc cggagccacc cggaatcctg 540

gccccccagc ccccgatgt gggctcctcg gacctctga gcatggtggg accttcccag 600

ggccgaagcc ccagctacgc ttctga 627

<210> 12

<211> 545

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 12

caccccatcc ctgactccag tctctctctg caattcgggg gccaatgccg gcagcggtag	60
ctctacacag atgatgccc gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg	120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctctg agctgaaagc cttgaagccg	180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgacctt gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtcgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg	360
aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca	420
ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg	480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc agctacgctt	540
cctga	545

<210> 13

<211> 630

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggg	60
cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc	120
ggggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac	180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg	300
ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga cctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac	420
ggcctcccgc tgcacctgcc agggacaacag tccccacacc gggaccctgc accccgagga	480
ccagctcgtt tectgccact accaggcctg cccccgcac tcccgagacc acccggaatc	540
ctggcccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctga	630

<210> 14

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg 120
ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg 180

gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg 240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagttatt caaatcttgg gactcaagac atccaggttc 300
ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacct tgaggcctgc 360
agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc 420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg acctgcacc ccgaggacca 480
gctcgcttcc tgccactacc aggctgccc cccgactcc cggagccacc cggaatcctg 540
gccccccagc ccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatgggtggg accttccag 600

ggccgaagcc ccagctacgc ttcttga 627

<210> 15

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA

<400> 15

ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccg cggacca 77

<210> 16

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant synthetase derived from Methanococcus jannaschii

synthetase

<400>

> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val

20 25 30

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

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

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

290	295	300	
Arg Leu			
305			
<210> 17			
<211> 77			
<212> DNA			
<213> Methanococcus jannaschii			
<400> 17			
ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa			60
tccggcccgc cggacca			77
<210> 18			
<211> 88			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> An optimized amber supressor tRNA			
<400> 18			
cccagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc			60
gagggttcga atcccttccc tgggacca			88
<210> 19			
<211> 89			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA			
<400> 19			
gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttct aatccgttct ctaggagtt			60
cgagggttcg aatccctccc ctgcacca			89
<210> 20			
<211> 306			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of			
p-azido-L-phenylalanine			
<400> 20			

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

245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 21
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-benzoyl-L-phenylalanine
 <400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

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

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
145 150 155 160

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

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 22
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
propargyl-phenylalanine
<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

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

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

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

 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 23
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
propargyl-phenylalanine
<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

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

130 135 140

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

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

 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305
 <210> 24
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 propargyl-phenylalanine
 <400> 24
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala			
20	25	30	
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln			
35	40	45	
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile			
50	55	60	
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp			
65	70	75	80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met			
85	90	95	
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys			
100	105	110	
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys			
115	120	125	
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro			
130	135	140	
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr			
145	150	155	160
Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His			
165	170	175	
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn			
180	185	190	
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys			
195	200	205	
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys			
210	215	220	
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile			
225	230	235	240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg			
245	250	255	

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu

305

<210> 25

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-phenylalanine

<400> 25

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

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

130 135 140

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

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

 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 26
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine
 <400> 26
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr			
20	25	30	
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln			
35	40	45	
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile			
50	55	60	
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp			
65	70	75	80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met			
85	90	95	
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys			
100	105	110	
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys			
115	120	125	
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro			
130	135	140	
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His			
145	150	155	160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile			
165	170	175	
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His			
180	185	190	
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser			
195	200	205	
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala			
210	215	220	
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro			
225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
245	250	255	

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

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

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

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 27

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-phenylalanine

<400>

27

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

Arg Leu

305

<210> 28

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 28

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr			
	20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln			
	35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile			
	50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp			
65	70	75	80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met			
	85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys			
	100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys			
	115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro			
	130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His			
145	150	155	160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile			
	165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His			
	180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser			
	195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala			
	210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro			
225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
	245	250	255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 29

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine

<400> 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

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

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

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

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

Arg Leu

305

<210> 30

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-acetyl

-phenylalanine

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

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

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

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

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

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

260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300
Arg Leu

305

<210> 31

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine

<400> 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

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

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

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

Arg Leu

305

<210> 32

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His		
145	150	155
Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 33
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine
 <400> 33
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

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

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

Arg Leu

305

<210> 34

<211> 208

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 34

Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys

1 5 10 15
Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 50 55 60
 Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu
 115 120 125
 Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
 130 135 140
 Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro
 145 150 155 160
 Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln
 165 170 175
 Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 180 185 190
 Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 195 200 205
 <210> 35
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35
 Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
 Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45

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

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

Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
180 185 190
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
195 200 205
Ala Ser
210

<210> 36

<211> 194

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 36

Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu
1 5 10 15
Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly
20 25 30

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

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

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

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

<210> 37

<211> 1043

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
1 5 10 15

Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
20 25 30
Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
50 55 60

Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
100 105 110

Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile
130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
145 150 155 160

Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser
165 170 175

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Ile Val Thr Leu
180 185 190

Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp
195 200 205

Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys
210 215 220

Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn
225 230 235 240

Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro
245 250 255

Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu
260 265 270

Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg
275 280 285

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

290	295	300	
Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln Gln			
305	310	315	320
Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp			
	325	330	335
Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu Pro			
	340	345	350
Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe			
	355	360	365
Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met			
	370	375	380
Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn			
385	390	395	400
Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn			
	405	410	415
Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile			
	420	425	430
Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu			
	435	440	445
Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly			
	450	455	460
Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val			
465	470	475	480
Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His			
	485	490	495
Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ser			
	500	505	510
Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val			
	515	520	525
Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe			
530	535	540	

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

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

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

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

Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser

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

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

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

 Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln
 980 985 990
 Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val
 995 1000 1005
 Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys
 1010 1015 1020
 Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly
 1025 1030 1035

Lys Arg Val Val Ser

1040

<210> 38

<211> 1043

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

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

1 5 10 15

Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr

65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val

85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro

145 150 155 160

Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg

165 170 175

Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr

180 185 190

Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly

195	200	205	
Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr			
210	215	220	
Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His			
225	230	235	240
Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala			
245	250	255	
Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn			
260	265	270	
Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe			
275	280	285	
Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp			
290	295	300	
Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln			
305	310	315	320
His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly			
325	330	335	
Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu			
340	345	350	
Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe			
355	360	365	
Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val			
370	375	380	
Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp			
385	390	395	400
Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly			
405	410	415	
Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr			
420	425	430	
Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp			
435	440	445	

Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe
 450 455 460
 Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
 465 470 475 480
 Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr
 485 490 495

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

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

 Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr
 625 630 635 640
 His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser
 645 650 655
 Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala
 660 665 670
 Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr
 675 680 685

 Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn

690	695	700	
Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val			
705	710	715	720
Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val			
	725	730	735
Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val			
	740	745	750
Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala			
	755	760	765
Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met			
	770	775	780
Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val			
785	790	795	800
Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val			
	805	810	815
Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys			
	820	825	830
Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu			
	835	840	845
Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro			
	850	855	860
Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp			
865	870	875	880
Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu			
	885	890	895
Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala			
	900	905	910
Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala			
	915	920	925
Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr			
	930	935	940

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

Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe
 1010 1015 1020
 Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His
 1025 1030 1035
 Ser Arg Val Phe Ser
 1040

<210> 39

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 39

atgaaaaaaa ctgctatcgc gatcgctgta gctctggctg gtttcgcgac cgtagctaac 60

gct 63

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 40

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

1 5 10 15

Thr Val Ala Asn Ala

20

<210> 41

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 41

atgaaaataa aaacagggtgc acgcatactc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt 60

tccgcctcgg ctctcgcc 78

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 42

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr

1 5 10 15

Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala

20 25

<210> 43

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 43

atgaaaaaga atatcgcat tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat 60

gcctatgca 69

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 44

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

1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 45

His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser

1 5

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 46

Tyr Ser Gln Thr

1

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 47

Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Tyr

1 5

<210> 48

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 48

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

50 55 60
 Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 49

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 49

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

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Ser Tyr Tyr Thr Lys Lys Ala Tyr Ser Ala Gly Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 50

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 50

Glu Met Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Asp

1 5 10 15

Asp Ser Tyr Tyr Ser Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Asp Leu Tyr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Tyr Asp Val Thr Asp Leu Ile Met His Glu Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 51

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 51

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

1 5 10 15

Asp Ser Tyr Tyr Ser Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Asp Leu Tyr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Tyr Asp Val Thr Asp Leu Ile Met His Glu Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 52

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 52

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Met

1 5 10 15

Asp Glu Tyr Asp Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Asn Tyr Tyr Asn Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Met Tyr Gly Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 53

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 53

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asn His

1 5 10 15

Leu Glu His Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Glu Tyr Pro Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60
Tyr Ala Val Thr Ile Thr Met Leu Lys Tyr Pro Thr Gln Ser Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 54

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 54

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

50 55 60
Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 55

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 55

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala
1 5 10 15
Ser His Tyr Glu Arg Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

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

<210> 56

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 56

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

<210> 57

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 57

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Gly Asn Ala Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 Tyr Ala Val Glu Asp Thr Asn Asp Tyr Pro His Thr His Arg Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 58

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 58

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

 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Ser Gly Tyr Thr Gly His Tyr Gln Pro Ile Ser Ile
 65 70 75 80
 Asn Tyr Arg Thr

<210> 59

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 59

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

1 5 10 15

Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Asp Pro Ser Ser Tyr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 60

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 60

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Glu

1 5 10 15

Pro Tyr Thr Pro Ile His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Gly Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Tyr Gly Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr

65 70 75 80

Arg Thr

<210> 61

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 61

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

1 5 10 15

Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Gly Asn Ala Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Ser Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr His Gln His Arg Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 62

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 62

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

1 5 10 15

Tyr Arg Arg Ser Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Asp Pro Ser Ser Tyr Thr

35 40 45

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

50

55

60

Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 63

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 63

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

1

5

10

15

Tyr Ser Lys His Gly His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20

25

30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Gly Asn Ala Thr

35

40

45

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

50

55

60

Tyr Ala Val Glu Asp Thr Asn Asp Tyr Pro His Thr His Arg Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 64

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 64

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Glu

1

5

10

15

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

<210> 65

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 65

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

<210> 66

<211> 86

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 66

```

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

           50           55           60
Tyr Ala Val Ser Lys Asp Asp Tyr Tyr Pro His Glu His Arg Pro Ile
65           70           75           80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
           85

```

<210> 67

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 67

```

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

           20           25           30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Gly Thr
           35           40           45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val

           50           55           60
Tyr Ala Val Tyr Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
65           70           75           80
Arg Thr

```

<210> 68

<211> 86

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 68

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

1 5 10 15

Tyr Glu Lys Thr Gln His Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Pro Glu Ser Gly Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Tyr Ala Gly Tyr Glu Tyr Pro His Thr His Arg Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 69

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 69

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

1 5 10 15

Ser Glu Glu Tyr Tyr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Tyr Tyr Val His Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Ala Val Val Ser Val Pro

65 70 75 80
Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 70

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 70

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asp

1 5 10 15

Pro Tyr Thr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Gly Pro Tyr Thr Thr Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Ser Tyr Tyr Tyr Ser Thr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr

65 70 75 80

Arg Thr

<210> 71

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 71

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

1 5 10 15

Asp Gly Pro Gly Leu Ser Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Ser Ser Gln Thr Thr

35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
50 55 60
Tyr Ala Val Ser Tyr Tyr Thr Lys Lys Ala Tyr Ser Ala Gly Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 72

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 72

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

50 55 60
Tyr Ala Val Tyr Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
65 70 75 80
Arg Thr

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 73

Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
1 5 10

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 74

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 75

Glu Pro Lys Ser Ser Asp

1 5

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 76

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

1 5 10 15

Ala Glu Gly Leu Ala

20

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 77

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu

1 5 10 15

Asp

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 78

Gly Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser

1 5

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 79

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 80

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 81

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 82

Gly Ser Gly Cys

1

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 83

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 84

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 85

Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser

1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 86

Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 87

Thr Val Ala Ala Pro Ser

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 88

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 89

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 90

Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser

1 5

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 91

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

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 92

Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 93

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 94

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 95

Lys Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 96

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

1 5 10 15

Leu Asp Gly

<210> 97

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 97

Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 98

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 99

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 100

Gln Pro Asp Glu Pro Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 101

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 101

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

1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180
<210> 102
<211> 173
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 102
Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

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

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe
115 120 125

Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile

130 135 140

Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met
145 150 155 160

Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
165 170

<210> 103

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 103

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

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

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 104

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 104

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65				70				75				80			
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
85				90				95							
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
100				105				110							
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Lys	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp
115				120				125							
Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
130				135				140							
Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
145				150				155				160			
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg
165				170				175							
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										
180															
<210>	105														
<211>	180														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														
<220><223>	Synthetic sequence														
<400>	105														
Met	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
1				5				10				15			
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
20				25				30							
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
35				40				45							
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
50				55				60							
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
65				70				75				80			

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

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175
Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 106

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 106

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

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

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His Lys Ser Arg Asp Pro Ala
115 120 125
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175
Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 107

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 107

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

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

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 108

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 108

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

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

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

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

130

135

140

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro

145

150

155

160

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165

170

<210> 109

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 109

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp

115

120

125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

130

135

140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp

145 150 155 160
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 110

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 110

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

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

20 25 30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala

100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu

115 120 125
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

130 135 140
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

145 150 155 160
Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165 170

<210> 111

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ala Ser

<210> 112

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 112

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 113

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 114

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 114

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His His Lys Ser Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 115

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 115

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

1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

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

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

 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Glu
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

 <210> 116
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 116

 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

[illegible]

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

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175
Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 117

 $\langle 211 \rangle$ 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 117

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

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

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

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 118

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 118

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

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140
Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
165 170

<210> 119

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 119

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

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

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

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 120
<211> 178
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 120

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

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

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

165 170 175
Ala Ser

<210> 121

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 121

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

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

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

165 170 175
Ala Ser

<210> 122

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 122

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

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

100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Ser Gly Gly Pro Ala Pro Arg Gly Pro

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

165 170 175

<210> 123

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 123

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Gly Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro

115 120 125

Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala

130 135 140

Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu

145 150 155 160
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
165 170

<210> 124

<211> 169

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 124

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

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

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

<210> 125

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 125

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Ser Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu

115 120 125

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

130 135 140

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro

145 150 155 160

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165 170

<210> 126

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 126

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

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

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

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

<210> 127

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 127

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 165 170

<210> 128

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 128

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

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

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

85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro His Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
115 120 125

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165

<210> 129

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 129

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

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

35 40 45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110
His Gly Leu Pro His Ser Gly Gly Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu
115 120 125
Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
130 135 140
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly
145 150 155 160
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
165

<210> 130

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 130

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

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

His Gly Leu Pro His Gly Ser Gly Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu

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

<210> 131

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 131

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

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

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

130 135 140
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
145 150 155 160
Thr Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

165 170

<210> 132

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 132

Met His His His His His His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu
1 5 10 15

Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala
20 25 30

Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly
35 40 45

Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu
65 70 75 80

Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro
85 90 95

Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
100 105 110

Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys
115 120 125

Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro
130 135 140

Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala
145 150 155 160

Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly

165					170				175		
Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser	
180					185						
<210> 133											
<400> 133											
000											
<210> 134											
<400> 134											
000											
<210> 135											
<400> 135											
000											
<210> 136											
<400> 136											
000											
<210> 137											
<400> 137											
000											
<210>											
138											
<400> 138											
000											
<210> 139											
<400> 139											
000											
<210> 140											
<400> 140											
000											
<210> 141											
<400> 141											
000											
<210> 142											
<400> 142											
000											
<210> 143											

<400> 143
000
<210> 144
<400> 144
000
<210> 145
<400> 145
000
<210> 146
<400> 146
000
<210> 147
<400> 147
000
<210> 148
<400> 148
000
<210> 149
<400> 149
000
<210> 150
<400> 150
000
<210> 151
<400> 151
000
<210> 152
<400> 152
000
<210> 153
<400> 153
000
<210> 154
<400> 154
000

<210> 155

<400> 155

000

<210> 156

<400> 156

000

<210> 157

<400> 157

000

<210> 158

<400> 158

000

<210> 159

<400> 159

000

<210> 160

<400> 160

000

<210> 161

<400> 161

000

<210> 162

<400> 162

000

<210> 163

<400> 163

000

<210> 164

<400> 164

000

<210> 165

<400> 165

000

<210> 166

<400> 166
 000
 <210> 167
 <400> 167
 000
 <210> 168
 <400> 168
 000
 <210> 169
 <400> 169
 000
 <210> 170
 <400> 170
 000
 <210> 171
 <400> 171
 000
 <210> 172
 <400>
 > 172
 000
 <210> 173
 <400> 173
 000
 <210> 174
 <400> 174
 000
 <210> 175
 <400> 175
 000
 <210> 176
 <400> 176
 000
 <210> 177
 <400> 177

000

<210> 178

<400> 178

000

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<400> 189

000

<210> 190

<400> 190

000

<210> 191

<400> 191

000

<210> 192

<400> 192

000

<210> 193

<400> 193

000

<210> 194

<400> 194

000

<210> 195

<400> 195

000

<210> 196

<400> 196

000

<210> 197

<400> 197

000

<210> 198

<400> 198

000

<210> 199

<400> 199

000

<210> 200

<400> 200

000

<210> 201

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa

poly(ethylene glycol)

<400> 201

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp

115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp

145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg

165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 <210> 202
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220
 ><223> Synthetic sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (109)..(109)
 <223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)
 <400> 202
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe
 115 120 125
 Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile
 130 135 140
 Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met

145 150 155 160

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

165 170

<210> 203

<400> 203

000

<210> 204

<400> 204

000

<210> 205

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 205

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Arg Asp Pro Ala
115 120 125
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175
Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 206

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 206

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

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

65 70 75 80
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly His Lys Ser Arg Asp Pro Ala
 115 120 125
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

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

Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 207

<400> 207

000

<210> 208

<400> 208

000

<210> 209

<400> 209

000

<210> 210

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)

<400> 210

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

1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

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

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

 165 170
 <210> 211
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (109)..(109)
 <223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)
 <400> 211
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

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

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

 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 165 170 175
 Tyr Ala Ser

<210> 212

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
 poly(ethylene glycol)

<400> 212

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro His His Ser Gly Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 213

<400> 213

000

<210> 214

<400> 214

000

<210> 215

<400> 215

000

<210> 216

<400> 216

000

<210> 217

<400> 217

000

<210> 218

<400> 218

000

<210> 219

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 219

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Pro His Arg Asp Pro Ala

115 120 125
Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

130 135 140
Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

145 150 155 160
Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro

165 170 175
Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 220

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 220

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

1 5 10 15

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

20 25 30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Gly His Arg Asp Pro Ala Pro Arg

115 120 125
Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro

130 135 140
Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser

145 150 155 160
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr

165 170 175
Ala Ser

<210> 221

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 221

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

1 5 10 15
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala

20 25 30
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

35 40 45
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile

50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala

100 105 110

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

115 120 125

Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr

165 170 175

Ala Ser

<210> 222

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa

poly(ethylene glycol)

<400> 222

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Xaa Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Ser Gly Gly Pro Ala Pro Arg Gly Pro
115 120 125

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro
130 135 140

Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
145 150 155 160

Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
165 170 175

<210> 223

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> misc_feature

<222> (109)..(109)

<223> Para-acetyl-L-phenylalanine optionally linked to a 30 kDa
poly(ethylene glycol)

<400> 223

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

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

35				40				45							
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
50				55				60							
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
65				70				75				80			
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
85				90				95							
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Xaa	Ser	Glu	Ala
100				105				110							

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

<210> 224

<400> 224

000

<210> 225

<400> 225

000

<210> 226

<400> 226

000

<210> 227

<400> 227

000

<210> 228

<400> 228

000

<210> 229
 <400> 229
 000
 <210> 230
 <400> 230
 000
 <210> 231
 <400> 231
 000
 <210> 232
 <400> 232
 000
 <210> 233
 <400> 233
 000
 <210> 234
 <400> 234
 000
 <210> 235
 <400> 235
 000
 <210> 236
 <400> 236
 000
 <210> 237
 <400> 237
 000
 <210> 238
 <400> 238
 000
 <210> 239
 <400> 239
 000
 <210> 240
 <400> 240
 000

<210> 241

<400> 241

000

<210> 242

<400> 242

000

<210> 243

<400> 243

000

<210> 244

<400> 244

000

<210> 245

<400> 245

000

<210> 246

<400> 246

000

<210> 247

<400> 247

000

<210> 248

<400> 248

000

<210> 249

<400> 249

000

<210> 250

<400> 250

000

<210> 251

<400> 251

000

<210> 252

<400> 252
000
<210> 253
<400> 253
000
<210> 254
<400> 254
000
<210> 255
<400> 255
000
<210> 256
<400> 256
000
<210> 257
<400> 257
000
<210> 258
<400> 258
000
<210
> 259
<400> 259
000
<210> 260
<400> 260
000
<210> 261
<400> 261
000
<210> 262
<400> 262
000
<210> 263
<400> 263

000

<210> 264

<400> 264

000

<210> 265

<400> 265

000

<210> 266

<400> 266

000

<210> 267

<400> 267

000

<210> 268

<400> 268

000

<210> 269

<400> 269

000

<210> 270

<400> 270

000

<210> 271

<400> 271

000

<210> 272

<400> 272

000

<210> 273

<400> 273

000

<210> 274

<400> 274

000

<210> 275

<400> 275

000

<210> 276

<400> 276

000

<210> 277

<400> 277

000

<210> 278

<400> 278

000

<210> 279

<400> 279

000

<210> 280

<400> 280

000

<210> 281

<400> 281

000

<210> 282

<400> 282

000

<210> 283

<400> 283

000

<210> 284

<400> 284

000

<210> 285

<400> 285

000

<210> 286

<400> 286

000

<210> 287
 <400> 287
 000
 <210> 288
 <400> 288
 000
 <210> 289
 <400> 289
 000
 <210> 290
 <400> 290
 000
 <210> 291
 <400> 291
 000
 <210> 292
 <400> 292
 000
 <210> 293
 <400>
 > 293
 000
 <210> 294
 <400> 294
 000
 <210> 295
 <400> 295
 000
 <210> 296
 <400> 296
 000
 <210> 297
 <400> 297
 000
 <210> 298

<400> 298

000

<210> 299

<400> 299

000

<210> 300

<400> 300

000

<210> 301

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 301

Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly

1 5

<210> 302

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 302

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 303

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 303

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

1 5 10 15

<210> 304

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 304

Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

<210> 305

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 305

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

20

<210> 306

<211> 24

<212>

> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 306

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser

20

<210> 307

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 307

Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser

20

<210> 308

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 308

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

1 5 10 15

Gly Pro Ser

<210> 309

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 309

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

1 5 10 15

Gly Ser Ser

<210> 310

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 310

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala

20

<210> 311

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 311

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser

20

<210> 312

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 312

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser

20

<210> 313

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 313

Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser

20

<210> 314

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 314

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala

20

<210> 315

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 315

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala

20

<210> 316

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 316

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala

20

<210> 317

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 317

atgcatccta ttcttgattc ttctcctctg ctgcaatttg ggggtcaggt ggcceaact 60

tacctgtaca ccgacgatgc gcaacagact gaggtcacc tggagatccg tgaggacggg 120

actgtcggag gggctgccga tcaatcccca gagtcactgc tgcaactgaa agccctgaag 180

cctgggggtca ttcagatcct gggcgtaaag acgagtcgtt tcctgtgcc aactcctgac 240

ggggcactgt atggctcgct gcattttgat cctgaggctt gtagttttcg cgaactgctg 300
ctggaagatg gttacaatgt gtatcagagt gaagcacacg gtctgcctct gcacctgggt 360
tctggtcgtg gtccggcgcg ttttctgccca ctgcctggcc tgcctccagc accacctgaa 420
ccaccgggta ttctggctcc gcaacctcca gacgtcggga gttcagatcc tctgtcgatg 480

gtagaaccgt cacaaggtcg ctctcctagt tacgcgtca 519

<210> 318

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 318

atgcatccta ttctgatgc ttctcctctg ctgcaatttg ggggtcaggt gcgccaacgt 60
tacctgtaca ccgacgatgc gcaacagact gaggtcacc tggagatccg tgaggacggg 120
actgtcggag gggctgccga tcaatcccca gagtactgc tgcaactgaa agccctgaag 180
cctgggggtca ttcagatcct gggcgtaaag acgagtcgtt tccgtgccca acgtcctgac 240
ggggcactgt atggctcgct gcattttgat cctgaggctt gtagttttcg cgaactgctg 300

ctggaagatg gttacaatgt gtattagagt gaagcacacg gtctgcctct gcactcgggc 360
tccggccgcg gtccggcccc ttttctgccca ctgcctggcc tgcctccagc accacctgaa 420
ccaccgggta ttctggctcc gcaacctcca gacgtcggga gttcagatcc tctgtcgatg 480
gtagaaccgt cacaaggtcg ctctcctagt tacgcgtca 519

<210> 319

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 319

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
65 70 75 80

Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
85 90 95

Ser Gln

<210> 320

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 320

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro
100

<210> 321

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 321

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515 520 525

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

530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

580 585

<210> 322

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 322

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85	90	95	
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu			
100	105	110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			
130	135	140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
165	170	175	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
275	280	285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
290	295	300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
325	330	335	

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

340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365

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

370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515 520 525

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

530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

580

<210> 323

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 323

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 324

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 324

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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

225

<210> 325

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 325

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 Asp 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 Lys 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> 326

<211>

227

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 326

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
1 5 10 15
Ala 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 Ser Ser 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 Lys 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> 327

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 327

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

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

50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

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

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

 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 328
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 328
 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 Gly 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 329

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 329

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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

225

<210> 330

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 330

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 Gln 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 331
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 331
 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 Ser 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 332
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 332
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 Ala 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 333
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 333
 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 His 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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> 334

<211>

233

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 334

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

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

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

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

180 185 190
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

225 230
<210> 335
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 335

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20	25	30
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
35	40	45
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr		
50	55	60
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
65	70	75
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
85	90	95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
100	105	110
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
115	120	125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met		
130	135	140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
145	150	155
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
165	170	175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
180	185	190
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val		
195	200	205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
210	215	220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
225	230	
<210> 336		
<400> 336		
000		
<210> 337		
<400> 337		

000

<210> 338

<400> 338

000

<210> 339

<400> 339

000

<210> 340

<400> 340

000

<210> 341

<400> 341

000

<210> 342

<400> 342

000

<210> 343

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 343

Gly Ser Gly His

1

<210> 344

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 344

His His Ser Gly

1

<210> 345

<211> 4

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 345
 His Gly Ser His
 1
 <210> 346
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 346
 Gly Ser Gly Pro
 1
 <210> 347
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 347
 His Ser Gly Gly
 1
 <210> 348
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 348
 His Gly Ser Gly
 1
 <210> 349
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 349

Lys Asp Ser Gln

1

<210> 350

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 350

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 351

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 351

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro

1 5 10 15

<210> 352

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 352

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gln Glu Gly Glu Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 353

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 353
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser

<210> 354

<211> 2
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 354

Gly Ser

1

<210> 355
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 355

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 356
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 356

Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp

1 5 10

<210> 357

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223

> Synthetic sequence

<400> 357

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

1 5 10

<210> 358

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 358

Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser

1 5 10

<210> 359

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 359

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 360

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 360

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 361

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 361

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15

<210> 362

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 362

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ser

<210> 363

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 363

Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro

20

<210> 364

<211>

> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 364

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 365

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 365

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

20 25 30

<210> 366

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 366

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr

20 25 30

Pro Ser Pro Ser

35

<210> 367

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 367

Pro Ser Pro Glu Pro

1 5

<210> 368

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 368

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro

20

<210> 369

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 369

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser

20 25 30

Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

35 40

<210> 370

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 370

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro

1 5 10 15

Ser Pro Glu Pro

20

<210> 371

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 371

Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Glu Pro

1 5 10

<210> 372

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 372

Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Thr Pro Glu Pro

1 5 10

<210> 373

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 373

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser

1 5 10 15

Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro

20

<210> 374

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 374

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu

1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro
20 25 30

Glu Pro

<210> 375

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 375

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser
20 25 30

Pro Glu Pro

35

<210> 376

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 376

Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Glu Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro
20 25

<210> 377

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 377

Gly Glu Thr Gly Ser

1 5

<210> 378

<

211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 378

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 379

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 379

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr

1 5 10

<210> 380

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 380

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser

1 5 10 15

<210> 381

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 381

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 382

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 382

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser

20

<210> 383

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 383

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser Gly Thr Gly Glu Ser Gly Glu Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 384

<400> 384

000

<210> 385

<400> 385

000

<210> 386

<400> 386

000

<210> 387

<400> 387

000

<210>

> 388
 <400> 388
 000
 <210> 389
 <400> 389
 000
 <210> 390
 <400> 390
 000
 <210> 391
 <400> 391
 000
 <210> 392
 <400> 392
 000
 <210> 393
 <400> 393
 000
 <210> 394
 <400> 394
 000
 <210> 395
 <400> 395
 000
 <210> 396
 <400> 396
 000
 <210> 397
 <400> 397
 000
 <210> 398
 <400> 398
 000
 <210> 399
 <400> 399
 000

<210> 400

<400> 400

000

<210> 401

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 401

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser

100 105 110

Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr

115 120 125

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His

180 185 190
Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly

195 200 205
Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly

210 215 220
Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

225 230 235 240
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

245 250 255
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser

260 265 270
Pro Ser Tyr Ala Ser

275

<210> 402

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 402

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

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

35 40 45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr

50 55 60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val

65 70 75 80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

180 185 190

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

195 200 205

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

210 215 220

His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

225 230 235 240

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro

245 250 255

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln

260 265 270

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

275 280

<210> 403

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 403

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

1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly			
	35	40	45
Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr			
	50	55	60
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile			
	85	90	95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu			
	100	105	110
Asp His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
	115	120	125
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
130	135	140	
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
145	150	155	160
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
	165	170	175
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
	180	185	190
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
195	200	205	
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala			
	210	215	220
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe			
225	230	235	240
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile			
	245	250	255

Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met

260 265 270

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

275 280 285

<210> 404

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 404

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

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

<210> 405

<211> 287

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 405

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

50 55 60
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile

85 90 95
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Ser His His His His His His His
100 105 110
His Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly

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

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

245 250 255
Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu
260 265 270
Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
275 280 285

<210> 406

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 406

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

1 5 10 15

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

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

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

 Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
 210 215 220
 Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

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

260

265

270

Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr

275

280

285

Ala Ser

290

<210> 407

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 407

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

1

5

10

15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

100

105

110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu

115

120

125

Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala

130

135

140

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

145 150 155 160
 Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu
 180 185 190
 Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro
 195 200 205
 Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val
 210 215 220

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

 Ala Ser
 290
 <210> 408
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 408
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
 35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
115 120 125

Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
130 135 140

Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
145 150 155 160

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
180 185 190

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
195 200 205

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
210 215 220

Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly
225 230 235 240

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
245 250 255

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
260 265 270

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
275 280 285

Tyr Ala Ser
290

<210> 409

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 409

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro

100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser

115 120 125

Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr

130 135 140

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His

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

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
260 265 270
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser
275 280 285

Pro Ser Tyr Ala Ser

290

<210> 410

<211> 298

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 410

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu

100 105 110
 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro His Pro
 115 120 125
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 130 135 140

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

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

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro
 275 280 285
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 290 295

<210> 411

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 411

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

1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

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

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

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

 210 215 220
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 225 230 235 240
 Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
 245 250 255

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
260 265 270

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
275 280 285

Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
290 295 300

<210> 412
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 412

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu
100 105 110

Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro
115 120 125

Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln
130 135 140

Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln

145 150 155 160

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

 165 170 175

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

 180 185 190

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

 195 200 205

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

 210 215 220

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

225 230 235 240

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

 245 250 255

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu

 260 265 270

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

 275 280 285

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

 290 295 300

Ser

305

<210> 413

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 413

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

 20 25 30

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

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

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

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

275					280					285									
Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly				
290					295					300									
Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser													
305					310														
<210>					414														
<211>					280														
<212>					PRT														
<213>					Artificial														
<220><223>					Synthetic sequence														
<400>					414														
Gly	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro				
1					5					10					15				
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr				
20					25					30									
Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gly				
35					40					45									
Pro	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr				
50					55					60									
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val				
65					70					75					80				
Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile				
85					90					95									
Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	His	Pro	Ile	Pro				
100					105					110									
Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr				
115					120					125									
Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg				
130					135					140									
Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu				
145					150					155					160				

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

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

<210> 415

<211> 295

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 415

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

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu
 100 105 110
 Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp
 115 120 125

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

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

 Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
 260 265 270
 Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly
 275 280 285
 Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 290 295
 <210> 416
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 416

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu
100 105 110

Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro
115 120 125

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His
130 135 140

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
145 150 155 160

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
165 170 175

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
180 185 190

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
195 200 205

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
210 215 220

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu

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

Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala
 275 280 285
 Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu
 290 295 300
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 305 310 315

<210> 417

<211> 295

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 417

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

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

65 70 75 80
 Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
 85 90 95
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
 100 105 110
 Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp

115 120 125
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu

130 135 140
Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu

145 150 155 160
Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu

165 170 175
Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys

180 185 190
Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser

195 200 205
Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu

210 215 220
Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His

225 230 235 240
Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu

245 250 255
Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro

260 265 270
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly

275 280 285
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

290 295

<210> 418

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 418

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln

115 120 125

Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

165 170 175

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

180 185 190

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu

245 250 255

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

260 265 270
Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

275 280 285
Ser

<210> 419

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 419

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly

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

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

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys

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

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

<210> 420

<211> 299

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 420

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

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

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

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

 245 250 255
 Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala
 260 265 270
 Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu
 275 280 285
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 290 295
 <210> 421

<211> 309

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 421

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu

100 105 110

Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro

115 120 125

Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser

130 135 140

Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr

145 150 155 160

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His
210 215 220

Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly
245 250 255

Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
260 265 270

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
275 280 285

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser
290 295 300

Pro Ser Tyr Ala Ser
305

<210> 422

<211> 310

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

Synthetic sequence

<400> 422

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Arg Glu Val Gln Lys Tyr Ser Asp Leu Gly
35 40 45

Pro Leu Tyr Ile Tyr Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr
50 55 60

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile
85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
100 105 110

Pro Pro Thr Pro Glu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Glu Pro
115 120 125

Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser
130 135 140

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr
145 150 155 160

Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp
165 170 175

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

Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr
195 200 205

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu
210 215 220

His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp
225 230 235 240

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu
245 250 255

Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
260 265 270

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
275 280 285

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
290 295 300

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
305 310

<210> 423

<211> 301

<212> PRT

<213> Artificial

<220

><223> Synthetic sequence

<400> 423

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro

100 105 110

Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe
245 250 255

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

<210> 424

<211> 759

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 424

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

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

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

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365

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

370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Ser His Pro Ile Pro Asp

 580 585 590
 Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu
 595 600 605
 Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu
 610 615 620

Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 625 630 635 640
 Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys

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

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

<210> 425

<211> 762

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 425

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

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

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

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

305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser His Pro

580 585 590

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

595 600 605

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

660 665 670

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu

675 680 685

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

690 695 700

Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu

705 710 715 720

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

725 730 735

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro

740 745 750

Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

755 760

<210> 426

<211> 762

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400

> 426

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
		320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
		400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
		480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser His Pro
 580 585 590

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 595 600 605

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
 610 615 620

Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 625 630 635 640

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
 645 650 655

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 660 665 670

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu
 675 680 685

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 690 695 700

Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu
 705 710 715 720

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro
 725 730 735

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro

740 745 750
 Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 755 760
 <210> 427
 <211> 767
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 427
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

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

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

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

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

370 375 380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

465 470 475 480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515 520 525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu

530 535 540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545 550 555 560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val

565 570 575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

580 585 590
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly

595 600 605
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr

610 615 620
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala

625 630 635 640
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly

645 650 655
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg

660 665 670

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

675 680 685

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser

690 695 700

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

705 710 715 720

Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro

725 730 735

Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu

740 745 750

Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

755 760 765

<210> 428

<211> 767

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 428

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100	105	110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			
130	135	140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
165	170	175	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
275	280	285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
290	295	300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
325	330	335	
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
340	345	350	

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

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

 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

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

 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly
 580 585 590
 Glu Gly Thr His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly

595 600 605
 Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
 610 615 620

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
 625 630 635 640
 Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
 645 650 655
 Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
 660 665 670
 Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
 675 680 685

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
 690 695 700
 Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala
 705 710 715 720
 Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro
 725 730 735
 Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu
 740 745 750

Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 755 760 765

<210> 429

<211> 772

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 429

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

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

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

420 425 430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

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

 610 615 620
 Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr
 625 630 635 640
 Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys
 645 650 655
 Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg
 660 665 670
 Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe

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

 740 745 750
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro
 755 760 765
 Ser Tyr Ala Ser

770

<210> 430

<211> 772

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 430

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

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

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

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

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

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

690 695 700
 Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala

725 730 735
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 740 745 750
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro
 755 760 765
 Ser Tyr Ala Ser
 770

<210> 431

<211> 777

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 431

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

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

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

115 120 125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys

225 230 235 240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245 250 255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260 265 270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

340 345 350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

 580 585 590
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile
 595 600 605
 Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg

610 615 620
 Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 625 630 635 640
 Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser

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

 705 710 715 720
 Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 725 730 735
 Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 740 745 750
 Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser
 755 760 765
 Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 770 775

<210> 432

<211> 777

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 432

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

35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

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

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

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

 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

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

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

 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu

530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val

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

 625 630 635 640
 Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser
 645 650 655
 Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 660 665 670
 Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr
 675 680 685
 Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu

 690 695 700
 Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
 705 710 715 720
 Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 725 730 735
 Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 740 745 750
 Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser

 755 760 765
 Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 770 775

<210> 433

<400> 433

000

<210> 434

<211> 771

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 434

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
275	280	285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
290	295	300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
325	330	335	
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
340	345	350	
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu			
355	360	365	
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro			
370	375	380	
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu			
385	390	395	400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro			
405	410	415	
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
420	425	430	

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
595 600 605

Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
610 615 620

Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
625 630 635 640

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
645 650 655

Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
660 665 670

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp

675 680 685
 Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
 690 695 700
 Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly
 705 710 715 720
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
 725 730 735

 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 740 745 750
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser
 755 760 765
 Tyr Ala Ser
 770
 <210> 435
 <211> 771
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 435
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

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

 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100	105	110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			
130	135	140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
165	170	175	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
275	280	285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
290	295	300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
325	330	335	
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr			
340	345	350	

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

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

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

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

 Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu

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

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

 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
 725 730 735
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 740 745 750
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser
 755 760 765
 Tyr Ala Ser
 770
 <210> 436
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence

 <400> 436
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30
 Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

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

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

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

 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
580	585	590
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
595	600	605
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		
610	615	620
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
625	630	635
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
645	650	655
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
660	665	670
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
675	680	685
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn		
690	695	700
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		
705	710	715
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		
725	730	735
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
740	745	750
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		
755	760	765

Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

770 775 780

<210> 437

<211> 780

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 437

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

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

 610 615 620
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 625 630 635 640
 Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
 645 650 655
 Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
 660 665 670
 Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp

 675 680 685

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
690 695 700
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn
705 710 715 720
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
725 730 735
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
740 745 750
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
755 760 765
Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
770 775 780
<210> 438
<400> 438
000
<210> 439
<400> 439
000
<210> 440
<211> 767
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 440
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu

115 120 125

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

130 135 140

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val

290 295 300

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

305 310 315 320
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu

 325 330 335
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 340 345 350
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 355 360 365
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 370 375 380
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg

 385 390 395 400
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 405 410 415
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 420 425 430
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 435 440 445
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro

 450 455 460
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 465 470 475 480
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 485 490 495
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 500 505 510
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu

 515 520 525
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 530 535 540
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn

625 630 635 640

Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr

645 650 655

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala

660 665 670

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

675 680 685

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

<210> 441

<211> 777

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 441

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

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

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
115 120 125

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
130 135 140

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
145 150 155 160

Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly
165 170 175

Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser
180 185 190

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
195 200 205

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
210 215 220

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
225 230 235 240

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

245	250	255
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu		
260	265	270
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro		
275	280	285
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu		
290	295	300
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His		
305	310	315
		320
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg		
340	345	350
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala		
355	360	365
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser		
370	375	380
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu		
385	390	395
		400
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
405	410	415
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
420	425	430
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
435	440	445
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
450	455	460
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
465	470	475
		480
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
485	490	495

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 500 505 510

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 515 520 525

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 530 535 540

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 545 550 555 560

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

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 580 585 590

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 595 600 605

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 610 615 620

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 625 630 635 640

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 645 650 655

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 660 665 670

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 675 680 685

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 690 695 700

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 705 710 715 720

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 725 730 735

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

740 745 750
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
755 760 765

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
770 775

<210> 442

<211> 787

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 442

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

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

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

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

165 170 175

Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Glu Ser Gly Glu Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415
Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu

420 425 430
Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys

435 440 445
His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys

450 455 460
Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys

465 470 475 480
Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu

485 490 495
Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val

500 505 510
Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe

515 520 525
Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser

530 535 540
Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu

545 550 555 560
Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe

565 570 575
Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln

580 585 590
Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala

595 600 605
Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr

610 615 620
Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys

625 630 635 640
Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser

645 650 655

Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser
660 665 670
Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro
675 680 685
Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe
690 695 700
Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu
705 710 715 720
Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
725 730 735
His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
740 745 750
Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
755 760 765
Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
770 775 780
Leu Gly Leu
785
<210> 443
<211> 786
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 443
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly

180 185 190

Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320
 Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu

 325 330 335
 Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
 340 345 350
 Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
 355 360 365
 Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
 370 375 380
 Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys

 385 390 395 400
 Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
 405 410 415
 Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
 435 440 445
 Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr

 450 455 460
 Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
 465 470 475 480
 Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
 485 490 495
 Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 500 505 510
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu

 515 520 525
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 530 535 540
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys

625 630 635 640

His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val

645 650 655

Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

Gly Leu

785

<210> 444

<400> 444

000

<210> 445

<400> 445

000

<210> 446

<211> 964

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 446

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu

115 120 125

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

130 135 140

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

145 150 155 160

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

	165		170		175
Ser	Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser				
	180		185		190
Asp	Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu				
	195		200		205
Glu	Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln				
	210		215		220
Gln	Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu				
225		230		235	240
Phe	Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys				
	245		250		255
Ser	Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu				
	260		265		270
Arg	Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro				
	275		280		285
Glu	Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu				
	290		295		300
Pro	Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His				
305		310		315	320
Asp	Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg				
	325		330		335
Arg	His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg				
	340		345		350
Tyr	Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala				
	355		360		365
Cys	Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser				
	370		375		380
Ser	Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu				
385		390		395	400
Arg	Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro				
	405		410		415

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

 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 485 490 495
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 500 505 510
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 515 520 525
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 530 535 540

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

 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 610 615 620
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 625 630 635 640
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 645 650 655
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

660	665	670
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
675	680	685
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
690	695	700
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
705	710	715
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
725	730	735
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
740	745	750
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
755	760	765
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
770	775	780
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro		
785	790	795
Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp		
805	810	815
Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr		
820	825	830
Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys		
835	840	845
Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg		
850	855	860
Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe		
865	870	875
Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr		
885	890	895
Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser		
900	905	910

Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 915 920 925

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 930 935 940

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro
 945 950 955 960

Ser Tyr Ala Ser

<210> 447

<211> 982

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 447

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30

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

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130	135	140	
Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val			
145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser			
	165	170	175
Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly			
	180	185	190
Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val			
195	200	205	
Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val			
210	215	220	
Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His			
225	230	235	240
Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala			
	245	250	255
Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly			
260	265	270	
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met			
275	280	285	
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu			
290	295	300	
Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu			
305	310	315	320
Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu			
	325	330	335
Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala			
340	345	350	
Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu			
355	360	365	
Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp			
370	375	380	

Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
385 390 395 400

Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
405 410 415

Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
420 425 430

Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
435 440 445

Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
450 455 460

Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
465 470 475 480

Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
485 490 495

Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
500 505 510

Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
515 520 525

Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
530 535 540

Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
545 550 555 560

Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
565 570 575

Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
580 585 590

Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
595 600 605

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
610 615 620

Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys

625 630 635 640
 His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val
 645 650 655

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

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

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

 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 850 855 860
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 865 870 875 880

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
885 890 895
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
900 905 910

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
980

<210> 448

<211> 963

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 448

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

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

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
115 120 125

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
130 135 140

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
145 150 155 160

Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Glu Thr Gly
165 170 175

Ser Ser Gly Glu Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ala Gly Glu Ser
180 185 190

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
195 200 205

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
210 215 220

Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
225 230 235 240

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
245 250 255

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
260 265 270

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
275 280 285

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
290 295 300

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
305 310 315 320

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
325 330 335

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

340 345 350
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 355 360 365

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

 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 435 440 445
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 450 455 460
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 465 470 475 480
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 485 490 495

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

 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 565 570 575
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 580 585 590

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 595 600 605
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 610 615 620

 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 625 630 635 640
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 645 650 655
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 660 665 670
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 675 680 685

 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 690 695 700
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 705 710 715 720
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 725 730 735
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 740 745 750

 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 755 760 765
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 770 775 780
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 785 790 795 800
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 805 810 815

 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 820 825 830
 Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala

835 840 845
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe

850 855 860
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
865 870 875 880

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
885 890 895

Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly
900 905 910

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
915 920 925

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
930 935 940

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser
945 950 955 960

Tyr Ala Ser

<210> 449

<211> 981

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 449

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu
325 330 335

Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
340 345 350

Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
355 360 365

Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
370 375 380

Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
385 390 395 400

Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
405 410 415

Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
420 425 430

Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
435 440 445

Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
450 455 460

Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
465 470 475 480

Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
485 490 495

Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
500 505 510

Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
515 520 525

Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
530 535 540

Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
545 550 555 560

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

565	570	575	
Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn			
580	585	590	
Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu			
595	600	605	
Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu			
610	615	620	
Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys			
625	630	635	640
His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val			
645	650	655	
Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp			
660	665	670	
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys			
675	680	685	
Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn			
690	695	700	
Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys			
705	710	715	720
Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His			
725	730	735	
Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe			
740	745	750	
Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys			
755	760	765	
Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu			
770	775	780	
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
785	790	795	800
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val			
805	810	815	

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 820 825 830
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 835 840 845
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 850 855 860

 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 865 870 875 880
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 885 890 895
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 900 905 910
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 915 920 925

 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 930 935 940
 Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 945 950 955 960
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 965 970 975
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 980

 <210> 450
 <211> 974
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence

 <400> 450
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60

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

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

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

 Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe
 260 265 270
 Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu

275	280	285	
Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe			
290	295	300	
Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro			
305	310	315	320
Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe			
325	330	335	
Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr			
340	345	350	
Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr			
355	360	365	
Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu			
370	375	380	
Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu			
385	390	395	400
Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp			
405	410	415	
Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu			
420	425	430	
Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys			
435	440	445	
His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys			
450	455	460	
Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys			
465	470	475	480
Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu			
485	490	495	
Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val			
500	505	510	
Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe			
515	520	525	

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

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

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

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

 Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala

770 775 780
 Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 785 790 795 800
 Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
 805 810 815
 Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu
 820 825 830

 Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
 835 840 845
 Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val
 850 855 860
 Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
 865 870 875 880
 Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser
 885 890 895

 Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu
 900 905 910
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg
 915 920 925
 Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 930 935 940
 Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser
 945 950 955 960

 Met Val Glu Pro Ser Gln Glu Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 965 970

 <210> 451
 <211> 992
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 451
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

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

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

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

 225 230 235 240
 Tyr Leu Gln Gln Ala Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
 245 250 255

Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
260 265 270
Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
275 280 285
Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
290 295 300
Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
305 310 315 320
Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
325 330 335
Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
340 345 350
Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
355 360 365
Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
370 375 380
Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
385 390 395 400
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
405 410 415
Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
420 425 430
Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
435 440 445
Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
450 455 460
Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
465 470 475 480
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
485 490 495
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp

500 505 510
 Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
 515 520 525
 Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
 530 535 540
 Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu

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

 610 615 620
 Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
 625 630 635 640
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
 645 650 655
 Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
 660 665 670
 Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys

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

 740 745 750

Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
 755 760 765
 Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
 770 775 780
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly
 785 790 795 800
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp
 805 810 815
 Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu
 820 825 830
 Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu
 835 840 845
 Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 850 855 860
 Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys
 865 870 875 880
 Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser
 885 890 895
 Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu
 900 905 910
 Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His
 915 920 925
 Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro
 930 935 940
 Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro
 945 950 955 960
 Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 965 970 975
 Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 980 985 990
 <210> 452
 <211> 272

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 452

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro

145 150 155 160

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro
 225 230 235 240
 Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 245 250 255

 Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 260 265 270
 <210> 453
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 453
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

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

 100 105 110
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 115 120 125
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala

145 150 155 160
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe

 165 170 175
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp

 180 185 190
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn

 195 200 205
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly

 210 215 220
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro

225 230 235 240
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

 245 250 255
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

 260 265 270
Tyr Ala Ser

275

<210> 454

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 454

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

1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

 20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

 35 40 45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp His Pro Ile Pro

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

180 185 190

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

195 200 205

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

210 215 220

His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

225 230 235 240

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro

245 250 255

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln

260 265 270

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

275 280

<210> 455

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 455

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

180 185 190

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

195 200 205

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

210 215 220

His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

225 230 235 240

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro

245 250 255

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln

260 265 270

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

275 280

<210> 456

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 456

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser His Pro

100 105 110

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

115 120 125

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

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

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

260 265 270
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

275 280

<210> 457

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 457

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

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50	55	60	
Pro Gly Val Asp Tyr Thr	Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys		
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser	Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro		
	85	90	95
Ser Gln Gly Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	100	105	110
Ser His Pro Ile Pro Asp Ser	Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln		
	115	120	125
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr	Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala		
	130	135	140
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp	Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln		
145	150	155	160
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln	Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile		
	165	170	175
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr	Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp		
	180	185	190
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu	His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe		
	195	200	205
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp	Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala		
	210	215	220
His Gly Leu Pro Leu His Leu	Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe		
225	230	235	240
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro	Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile		
	245	250	255
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp	Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met		
	260	265	270
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg	Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
	275	280	285
<210> 458			
<211> 285			

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 458

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe
225 230 235 240
Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile
245 250 255
Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met
260 265 270
Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
275 280 285
<210> 459
<211> 286
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Synthetic sequence
<400> 459
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
65 70 75 80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
85 90 95
Ser Gln Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
100 105 110
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
115 120 125
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu

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

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

 Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 275 280 285
 <210> 460
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 460
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35

40

45

Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr
 100 105 110
 Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe
 115 120 125
 Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln
 130 135 140
 Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala
 145 150 155 160
 Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro
 165 170 175
 Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln
 180 185 190
 Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala
 195 200 205
 Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
 210 215 220
 Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro
 225 230 235 240
 Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro
 245 250 255
 Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 260 265 270
 Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 275 280 285
 <210> 461
 <211> 293

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 461

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu

100 105 110

Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser

115 120 125

Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr

130 135 140

Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His

195 200 205

Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly

210 215 220
Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly
225 230 235 240
Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
245 250 255

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
260 265 270
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser
275 280 285
Pro Ser Tyr Ala Ser
290

<210> 462

<211> 295

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 462

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
85 90 95
Ser Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp

115 120 125
Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu
130 135 140

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

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

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly
275 280 285
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
290 295

<210> 463

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 463

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

20	25	30	
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu			
35	40	45	
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
50	55	60	
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys			
65	70	75	80
Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro			
85	90	95	
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu			
100	105	110	
Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro			
115	120	125	
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val			
130	135	140	
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His			
145	150	155	160
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser			
165	170	175	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln			
180	185	190	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly			
195	200	205	
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg			
210	215	220	
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His			
225	230	235	240
Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu			
245	250	255	
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu			
260	265	270	

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

275

280

285

Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

290

295

300

<210> 464

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 464

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

1

5

10

15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20

25

30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35

40

45

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

50

55

60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Gln Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr

100

105

110

Pro Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro

115

120

125

Pro Thr Pro Ser Pro Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu

130

135

140

Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala

145

150

155

160

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

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

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

290 295 300

Ala Ser

305

<210> 465

<211> 275

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 465

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

35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

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

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

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

 225 230 235 240
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 245 250 255
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 260 265 270
 Tyr Ala Ser
 275
 <210> 466
 <211> 290
 <212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 466

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

1 5 10 15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30
Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

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

85 90 95
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu

100 105 110
Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu

115 120 125
Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala

130 135 140
Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly

145 150 155 160
Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu

165 170 175
Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu

180 185 190
Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro

195 200 205
Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val

210 215 220

Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg
 225 230 235 240
 Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro
 245 250 255
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser

 260 265 270
 Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 275 280 285
 Ala Ser
 290
 <210> 467
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 467
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

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

 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu
 100 105 110
 Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro
 115 120 125

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser
130 135 140

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr

145 150 155 160

Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp
165 170 175

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

Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr
195 200 205

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu

210 215 220

His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp
225 230 235 240

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu
245 250 255

Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
260 265 270

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp

275 280 285

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
290 295 300

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
305 310

<210> 468

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 468

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu

100 105 110

Pro Pro Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu

115 120 125

Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro

245 250 255

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

260 265 270
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr

275 280 285

Ala Ser

290

<210> 469

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 469

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Glu Pro

100 105 110

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

115 120 125

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

180 185 190
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

195 200 205
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
210 215 220

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu

225 230 235 240
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

245 250 255
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

260 265 270
Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

275 280

<210> 470

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 470

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

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

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

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

 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
 260 265 270
 Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 275 280

 <210> 471
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence

<400> 471

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu Asp

100 105 110

Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser

115 120 125

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu

195 200 205

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

210 215 220

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu

225 230 235 240

Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
245 250 255

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
260 265 270

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg
275 280 285

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
290

<210> 472

<211> 304

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 472

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45
Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

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

85 90 95
Ser Gln Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu

100 105 110
Pro Glu Glu Glu Asp Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro

115 120 125
Ser Pro Glu Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe

130 135 140

Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln
 145 150 155 160
 Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala

165 170 175
 Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro
 180 185 190

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln
 195 200 205
 Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala

210 215 220
 Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln

225 230 235 240
 Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro
 245 250 255

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro
 260 265 270
 Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro

275 280 285
 Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

290 295 300

<210> 473

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 473

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

20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45
 Phe Thr Val Pro Tyr Ser Gln Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Glu Lys Pro
 85 90 95
 Ser Gln Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu
 100 105 110

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

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

 Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly
 245 250 255
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
 260 265 270
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 275 280 285

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

290

295

300

Ser

305

<210> 474

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 474

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

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Tyr Tyr Glu Gln Asn Ser Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

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

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Tyr Gly Ser Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Pro

100 105 110

Thr Pro Glu Pro Ser Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro His Pro Ile Pro

115 120 125

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

130 135 140

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

195 200 205

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

210 215 220

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

225 230 235 240

His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

245 250 255

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro

260 265 270

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln

275 280 285

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

290 295

<210> 475

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 475

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

305						310						315						320
Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser			
325					330					335								
Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu			
340					345					350								
Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg			
355					360					365								
Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly			
370					375					380								
Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser			
385					390					395					400			
Met	Val	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser					
405					410													
<210>	476																	
<211>	427																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial																	
<220><223>	Synthetic sequence																	
<400>	476																	
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			

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

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

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

 405 410 415
 Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 420 425
 <210> 477
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 477
 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro			
225	230	235	240
Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu			
245	250	255	
Pro His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln			
260	265	270	
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala			
275	280	285	
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln			
290	295	300	
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile			
305	310	315	320
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp			
325	330	335	
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe			
340	345	350	
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala			
355	360	365	

His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe
 370 375 380
 Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met
 405 410 415

Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 420 425

<210> 478

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 478

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Pro Ser Pro Glu Pro Pro Thr Pro Glu Pro Pro Ser Pro

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

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

 355 360 365
 Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 370 375 380
 Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser

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 Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser His		
225	230	235
Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg		
245	250	255
Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu		
260	265	270
Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro		
275	280	285
Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile		
290	295	300
Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala		
305	310	315
Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu		
325	330	335
Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly		
340	345	350
Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro		
355	360	365
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala		
370	375	380
Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu		
385	390	395
Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
405	410	
<210> 480		
<211> 416		

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 480

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

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

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

405 410 415

<210> 481

<211> 415

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 481

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly			
	245	250	255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala
355 360 365

Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro
370 375 380

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

Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
405 410 415

<210> 482

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 482

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu

 260 265 270
 Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
 275 280 285
 Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val

290 295 300
 Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
 305 310 315 320
 Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser

 325 330 335
 Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu
 340 345 350
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg
 355 360 365
 Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 370 375 380
 Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser

 385 390 395 400
 Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 405 410
 <210> 483
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 483
 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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

225

230

235

240

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

245

250

255

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

305

310

315

320

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

325

330

335

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

340 345 350

Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu

355 360 365

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

370 375 380

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

385 390 395 400

Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

405 410

<210> 484

<

211> 413

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 484

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 Asp Glu Leu 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 Lys 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 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly			
245	250	255	
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu			
260	265	270	
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp			
275	280	285	
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val			
290	295	300	
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro			
305	310	315	320
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser			
325	330	335	
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu			
340	345	350	
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg			
355	360	365	

Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly

370

375

380

Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser

385

390

395

400

Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

405

410

<210> 485

<211> 411

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 485

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

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

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

Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405

410

<210> 486

<211> 419

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 486

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35

40

45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

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

100

105

110

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

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165

170

175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
245 250 255

Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
260 265 270

Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
275 280 285

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
290 295 300

Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
305 310 315 320

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
325 330 335

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn
340 345 350

Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly
355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro
370 375 380

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

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
405 410 415

Tyr Ala Ser

<210> 487

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 487

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 Asp 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 Lys 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 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu
 260 265 270
 Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
 275 280 285
 Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val
 290 295 300
 Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
 305 310 315 320
 Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser
 325 330 335
 Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu
 340 345 350
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Gly Ser Gly Arg Gly Pro Ala Arg
 355 360 365
 Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 370 375 380
 Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser
 385 390 395 400
 Met Val Glu Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 405 410