

(72) 발명자

본나스, 크리스텔

독일 10367 베를린 셰펠스트라쎄 1

디르나글, 올리히

독일 10719 베를린 과자넨스트라쎄 48

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 각각 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51 및 52에 제시된 유도(deduced) 아미노산 서열을 갖는 hs3, hl-4, hl-5, hs4, hl-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301, mK3, ha, hAma 및 hAmE로 지칭되는 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 폴리뉴클레오티드;
- (b) 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56 및 57에 제시된 코딩 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드;
- (c) 서열 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는 뮤린 폴리펩티드 mS, mG3, mG5, m301 및 mK3의 인간화 버전 코딩 폴리뉴클레오티드;
- (d) 서열 32, 34, 36, 및 38에 제시된 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 N-말단으로서 서열 24, 26, 28, 및 30에 제시된 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열이 도입된 융합물을 포함하는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;
- (e) 서열 31, 33, 35, 및 37에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열의 5'로 서열 23, 25, 27, 및 29에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 융합물을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- (f) 나선 A를 포함하는 전장 에리트로포이에틴 (EPO)의 N-말단부를 포함하고

- (i) 나선 A와 나선 B 사이의 10 이상의 아미노산 단편;
- (ii) 나선 B의 10 이상의 아미노산 단편;
- (iii) 나선 B와 나선 C 사이의 6 이상의 아미노산 단편;
- (iv) 나선 C의 10 이상의 아미노산 단편;
- (v) 나선 C와 나선 D 사이의 20 이상의 아미노산 단편; 또는
- (vi) 나선 D의 10 이상의 아미노산 단편

중 1 이상이 결여되어 있으며, 세포 보호 활성 및 신경보호 활성을 가지지만, 조혈 활성을 없는 EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드; 및

(g) (f)의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드의 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성 및 신경보호 활성을 가지지만, 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드

로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥.

청구항 2

제1항에 있어서, DNA 또는 RNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, DNA가 게놈 DNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하는 발현 제어 서열과 작동가능하게 연결되어 있는 것인 벡터.

청구항 6

제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제4항 또는 제5항의 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제4항 또는 제5항의 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 EPO 변이체 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 산화, 황산화, 인산화, 올리고사카라이드의 부가 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 상기 EPO 변이체의 변형 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제4항 또는 제5항의 벡터를 사용하여 시험관 내에서 세포를 유전자 조작하는 것을 포함하며, EPO 변이체 폴리펩티드가 제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인, 1 이상의 EPO 변이체 발현가능 세포의 제조 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제4항 또는 제5항의 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 EPO 변이체 폴리펩티드의 제조 방법에 의해 수득가능한 폴리펩티드.

청구항 11

제10항의 폴리펩티드를 포함하는, 세포 사멸에 의한 조직 손상과 관련된 상태의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물로서, 상기 상태가 급성 또는 만성 신경변성 또는 신경염증성 장애이거나, 심장, 폐, 신장, 간 또는 췌장의 급성 또는 만성 장애인 제약 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 급성 신경변성 또는 신경염증성 장애가 색전 폐색 및 혈전 폐색을 비롯한 뇌 허혈 또는 경색증, 급성 허혈 후 재관류, 출생전후 저산소증-허혈성 손상, 심장 정지, 두개내 출혈, 거미막하 출혈 및 두개내 병변, 척수 병변, 척추내 병변, 편타성 혼들린 영아 증후군, 감염성 뇌염, 수막염, 및 두통으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 만성 신경변성 또는 신경염증성 장애가 치매, 피크병(Pick's disease), 미만성 루이 소체 질환, 진행성 핵상 마비 (스틸-리차드손(Steel-Richardson) 증후군), 다발 경화증, 다기관 위축, 신경변성 관련 만성 간질 상태, 운동 뉴런 질환, 퇴행성 조화운동불능, 피질 기재 변성, 구암의 ALS-파킨슨 치매 복합증 (ALS-Parkinson's Dementia complex of Guam), 아급성 경화성 뼈뇌염, 헌팅تون(Huntington) 질환, 파킨슨 질환, 시뉴클레이노페씨(synucleinopathy), 원발성 진행성 실어증, 선조체혹질 변성, 마카도-조세프(Machado-Joseph) 질환/척수소뇌성 실조증 유형 3 및 올리브뇌교소뇌 변성, 질 드 라 투렛(Gilles De La Tourette) 질환, 연수 및 가연수 마비, 척수 및 척수연수 근육 위축 (케네디(Kennedy) 질환), 원발성 측삭 경화증, 가족성 연축성 대마비, 베르드나히-호프만(Werdnig-Hoffmann) 질환, 쿠겔베르그-웰란더(Kugelberg-Welander) 질환, 테이-삭스

(Tay-Sach) 질환, 샌드호프(Sandhoff) 질환, 가족성 연축성 질환, 연축성 하반신마비, 진행성 다초점성 뇌백질 병증, 가족성 자율신경기능장애 (릴리-데이(Riley-Day) 증후군), 다발신경병증, 프리온 질환, 중독, 정동 장애, 정신분열 장애, 만성 피로 증후군, 및 만성 통증으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 정제 또는 검출을 촉진하는 이종 웨პ티드 서열, 마커 단백질 및 리포터 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 융합 파트너의 코딩 서열을 추가로 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제10항에 있어서, 폴리펩티드의 정제 또는 검출을 촉진하는 이종 웨პ티드 서열, 마커 단백질 및 리포터 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 융합 파트너에 융합된 폴리펩티드.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 에리트로포이에틴 (EPO)의 신규한 내인성 변이체 및 세포 사멸 (아폽토시스, 괴사) 및 염증에 의한 조직 손상과 관련된 상태의 치료 또는 예방, 특히 신경보호, 예를 들어, 신경계의 급성 질환 (예를 들어 뇌졸증) 및 만성 질환 (예를 들어 ALS)의 치료를 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

뇌졸증은 미국에서 매년 400,000명 이상이 고통받는 쇠약 질환이며 미국에서 세번째로 높은 통상의 사망 원인이다. 또한 신경학적 입원환자의 절반은 뇌졸증 관련 문제를 가지고 있다. 이러한 경향에 있어, 이러한 숫자는 2050년까지 매년 100만명으로 증가할 것으로 예상된다. 뇌졸증의 직접 비용 (보호 및 치료) 및 간접 비용 (생산성 손실)을 함께 고려시, 뇌졸증은 미국 사회에서만 매년 433억 달러의 부담을 발생시킨다. 환자의 약 1/3은 처음 세달 내에 죽게되며, 1/3에게는 심각한 장애가 남게되며, 단지 1/3만이 만족스런 결과로서 회복된다. 1990년에, 뇌혈관 질환은 전세계적으로 43만명 이상을 죽게하는, 제2의 세계적 사망의 유발 원인이었다. 따라서, 공중 건강 전망에 있어, 뇌졸증은 가장 관련있는 질환 중 하나이다.

[0003]

뇌졸증은 뇌의 영역에서의 순환이 갑자기 멈추어서 상응하는 신경학적 기능의 손실을 일으키는 것을 특징으로 한다. 뇌혈관 사고 또는 뇌졸증 증후군이라고도 또한 불리는 뇌졸증은 혈전증, 색전증, 및 출혈을 포함하는 병태생리학적 원인의 이질적 군을 포함하는 비특이적 용어이다. 뇌졸증은 현재 출혈성 또는 허혈성으로 분류된다. 급성 허혈성 뇌졸증은 혈전증 또는 색전증에 의해 야기되는 뇌졸증을 지칭하며, 모든 뇌졸증의 80%를 차지한다.

[0004]

허혈성 뇌졸증은 뇌에 공급되는 동맥, 가장 보편적으로는 내경동맥의 가지의 차단으로부터 발생한다. 이러한 차단은 일반적으로 죽상동맥경화증에 의한 혈액 응고 (혈전) 또는 지방 침착물 (죽종)의 한 조각이 파괴되고 (색전이 되고), 혈류를 따라 여행하다가, 뇌에 공급되는 동맥에서 멈추게 되는 경우에 발생된다. 혈액 응고는 동맥 벽의 지방 침착물이 파열될 때 형성될 수 있다. 이러한 지방 침착물의 파열은 또한 큰 지방 침착물이 혈류를 느리게 하여 졸졸 흐르게 할 때 형성될 수 있다. 느리게 흐르는 혈액은 덩어리와 더욱 유사하다. 이에

따라 좁아진 동맥에서의 뎅어리 형성 및 이러한 동맥의 차단의 위험성은 높다. 혈액 응고는 또한 다른 영역, 예컨대 심장 또는 심장 판막에서 형성될 수 있다. 이러한 혈액 응고에 의한 뇌졸증은 최근 심장 수술을 받은 사람 및 심장 판막 장애 또는 이상 심장 리듬 (부정맥), 특히 심방 세동을 가진 사람들 사이에서 가장 보편적이다. 또한, 과량의 적혈구 (적혈구증가증)와 같은 어떤 장애에서, 혈액이 진해짐으로 인해 혈액 응고의 위험성이 증가한다.

[0005] 허혈성 뇌졸증은 또한 어떤 사람이 혈류 손실이 많거나 또는 매우 저혈압인 경우에 발생할 수 있는 바와 같이, 뇌로의 혈류가 감소되는 경우에 발생할 수 있다. 때로는, 뇌로의 혈류는 정상이나 혈류나 충분한 산소를 함유하고 있지 않은 경우에 허혈성 뇌졸증이 발생한다. 혈류의 산소 함량을 감소시키는 장애에는 중증 빈혈 (적혈구의 결핍), 질식, 및 일산화탄소 중독이 포함된다. 일반적으로, 이러한 경우에서의 뇌 손상은 광범위하며 (광범위(diffuse)), 혼수상태가 발생한다. 염증 또는 감염이 뇌에 공급되는 혈관을 좁아지게 하는 경우에, 허혈성 뇌졸증이 발생할 수 있다. 유사하게, 코카인 및 암페타민과 같은 약물이 동맥의 연축을 일으킬 수 있는데, 이는 뇌졸증을 일으킬 정도로 뇌로 공급되는 동맥을 좁아지게 할 수 있다.

[0006] 뇌는 신경원성 대사 및 기능을 유지시키기 위해 글루코스 및 산소를 요구한다. 산소가 뇌로 불충분하게 전달되는 경우 저산소증이 유발되며, 불충분한 뇌 혈류로부터 허혈이 발생된다. 뇌 허혈의 결과는 감소된 뇌 혈류의 정도 및 지속시간에 의존한다. 뉴런은 30 내지 60 분 동안 허혈을 견딜 수 있다. 만약 허혈성 영역에서 흐름이 다시 확립되지 못한다면, 일련의 대사성 과정이 일어난다. 뉴런은 ATP가 고갈되게 되고 매우 덜 효율적인 경로인 무산소 해당작용으로 변환된다. 락테이트가 축적되고 세포내 pH가 감소된다. ATP의 충분한 공급이 없으면, 원형질막에서의 이온 펌프가 제대로 작동되지 않는다. 나트륨, 물, 및 칼슘의 세포 내로의 유입의 생성으로 인해 뉴런 및 아교 세포의 빠른 팽창이 야기된다. 막 탈분극은 또한 뇌에서 홍분성 신경전달물질로 작용하는 아미노산 글루타메이트 및 아스파르테이트의 많은 방출을 자극한다. 글루타메이트는 또한 신경원성 세포막의 나트륨 및 칼슘 이온 채널, 즉, 매우 특징화된 N-메틸-D-아스파르테이트 (NMDA) 칼슘 채널을 활성화시킨다. 과다 칼슘 유입은 넓은 범위의 효소계 (프로테아제, 리파아제, 및 뉴클레아제)의 활성화 장애를 야기시킨다. 이러한 효소 및 이들의 대사성 산물, 예컨대 산소 자유 라디칼은 뉴런의 세포막, 유전성 물질, 및 구조 단백질을 손상시켜, 결국 뉴런의 세포 사멸을 유발한다 (Dirnagl, U. et al. (1999) Trends Neurosci. 22: 391-397).

[0007] 뇌졸증은 갑자기 발생하여, 빠르게 진행되며, 수 분 내지 수 일 내에 뇌 조직을 사멸시킨다. 허혈성 뇌는 두개의 조직 부분으로 구별된다 - 경색증의 코어 및 허혈성 반음영으로 알려진 주위 구역 - 회복할 수 없이 손상된 코어 주위의 관류부족성 및 대사성 저항 부분. 코어 및 반음영은 두가지의 상이한 종류의 세포 사멸: 괴사 및 아폽토시스 (예정된 세포 사멸 또는 지연된 신경원성 세포 사멸이라고도 또한 불림)을 특징으로 한다. 코어에서의 심각한 관류 결핍은 대사 과정, 세포 에너지 공급 및 이온 항상성의 파괴를 야기시키는데, 이로 인해 세포는 수 분 내에 이들의 일체성을 잃어버리게 된다. 따라서, 세포 및 조직의 급성 괴사가 코어에 나타난다. 반음영에서는, 측부 혈관에 의해 몇몇 나머지 관류가 유지되는데, 이는 기능적 대사를 완전하게 유지시킬 수 없을 수 있으나, 즉각적 구조 붕괴는 방지된다. 하지만, 시간이 지남에 따라 (수 시간 내지 수 일), 세포 항상성의 변경은 점점 더 세포를 사멸시키며, 경색증의 부분이 증가된다. 따라서 반음영은 경색증의 성숙 동안 위험 조직으로서 고려된다. 이러한 영역에서, 아폽토시스 및 염증성 신호전달 캐스캐이드가 중요한 역할을 한다. 이는 애초에 결국 경색증이 될 수 있는 50 부피%를 구성할 수 있다. 지연된 세포 사멸을 유발하는 메카니즘은 허혈에 의해 유발되었지만, 아직 생존가능한 뇌 영역에서 특이적 신경보호 치료에 대한 표적을 제공한다.

[0008] 지금까지의 치료적 옵션은 매우 실망스럽다: 주요 임상 실험 (NINDS)에서 유효성이 입증된 유일한 치료법인 rtPA를 사용한 혈전 용해는 3 시간 범위에서만 단지 유효하며, 이의 적용은 단지 수 %의 허혈성 뇌졸증 환자로 제한된다. 즉, 기본적 지지 요법 이외에, 현재 95 % 이상의 뇌졸증은 특이적으로 치료될 수 없다. 이는 지난 10년에 걸쳐 발표된 이러한 질환의 기본적 병태생리에 관한 우리의 지식과는 명확한 대조를 이룬다. 특히, 실질 뇌 손상 및 내인성 신경보호 뿐 아니라, 기능적 및 구조적 재구성의 메카니즘에 관한 광대한 지식이 축적되어 왔다.

[0009] 최근, 신경보호 성질을 갖는 내인성 뇌 단백질에 대한 잠재적인 치료적 역할이 관심을 받아왔다. 성장 호르몬/프로락톤 시토카인 족의 일원인 신장의 세뇨관주위 모세혈관 내피의 세포에 의해 주로 생산되는 당단백질 호르몬인 EPO (Zhu Y. and D'Andrea A.D: (1994) Curr. Opin. Hematol. 1: 113-118)가 가능성 있는 후보군이다. 비록 EPO가 최초로 특징되어졌고 현재 이의 조혈 호르몬으로서의 역할에 대해 널리 공지되어 있지만, 설치류 및 인간 뇌 조직 뿐 아니라 배양된 뉴런 및 별아교세포에서의 EPO 및 이의 수용체 (EPOR)의 검출을 통해 EPO의 다

른 생물학적 역할에 관한 연구를 확장시켰다.

[0010] 뇌에서, 측분비 EPO/(Epo-R)₂ 시스템은 성인 적혈구생성의 내분비계와 독립적으로 존재하는데; 뉴런은 (Epo-R)₂를 발현하고 별아교세포는 EPO를 생성한다 ([Ruscher et al. (2002) J. Neurosci. 22, 10291-301]; [Prass et al. (2003) Stroke 34, 1981-1986]). EPO가 허혈 및 저산소증에 의해 유발되는 신경원성 아폽토시스의 강력한 억제제라는 것이 시험관 내 및 생체 내에서 증명되었다 ([Ruscher et al. (2002) J. Neurosci. 22, 10291-301]; [Bernaudin, M., et al. (1999) J Cereb Blood Flow Metab. 19: 643-51]; [Morishita, E., et al. (1997) Neuroscience. 76: 105-16]). EPO를 신경원성 배양물에 첨가하는 것은 저산소증 및 글루탐산 독성에 대해 보호하며 ([Henn F. A. and Braus D.F. (1999) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 249: 48-56], [Vogeley K. et al. (2000) Am. J. Psychiatry 157: 34-39]), 뇌졸중의 설치류 모델에서의 신경학 기능장애를 감소시킨다([Brines M. L. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 10526-10531] 및 [Bernaudin et al. (1999) J. Cereb. Blood Flow Metab. 19: 643-651])는 것이 몇몇 그룹에 의해 보고되었다. 이러한 실험에서 가능성 있는 결과들은 급성 뇌졸중에 대한 EPO 치료가 안전하고 이로울 수 있다 것이 밝혀진 경우에 인간 연구를 통해 확증되었다 ([Ehrenreich H. et al. (2002) Mol. Medicine 8: 495-505] 및 WO 00/35475 A2). 이러한 세포 및 EPO의 더욱 특별한 신경보호 성질은 보다 큰 실험에서 이러한 발견들을 구체화하기 위해 이러한 영역에서의 추가적 연구를 진행시켰고, 현재 예를 들어, 정신분열병을 포함하는 다른 장후에서의 EPO의 사용 또한 제안되었다 ([Ehrenreich H et al. (2004) Molecular Psychiatry 9: 42-54] 및 WO 02/20031 A2).

[0011] 조직 손상을 막기 위한 EPO의 적용에 있어, 종종 조혈 활성을 요구되지 않으며 만약 저산소증 또는 허혈 유도된 조직 손상의 작용을 치료하거나 개선시키기 위해 많은 양의 EPO를 투여하는 경우에는 불리할 수도 있다. 따라서, 단지 세포 보호 성질만 나타내며 조혈 성질은 없는 EPO 변이체를 만들려는 시도가 있어왔다. US 2003/0130197은 신경변성 장애 치료를 위한 EPO의 웨티드 모방체를 기술하는데, 이는 자연 발생 EPO 또는 이의 단편에 대한 어떠한 서열 상동성도 보유하지 않는다. US 6,531,121은 내피 세포 장벽의 횡단능의 증가를 나타내며 감소된 조혈 활성을 갖는 재조합 EPO의 완전 탈시알릴화(desialylation)에 의해 생성된 아시알로에리트로포이에틴을 개시한다. 카르바밀화(carbamylated) 에리트로포이에틴 (CEPO) 또한 조직 보호 작용을 나타내지만 어떠한 적혈구생성 작용은 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다 ([Leist et al. (2004) Science 305: 239-242] 및 WO 2005/025606 A1).

[0012] 마지막으로, EPO의 17-mer 웨티드가 2개의 신경원성 세포주인 SK-N-MC 및 NS20Y의 세포 사멸을 억제하며 (Campana W.M. et al. (1998) Int. J. Mol Medicine 1: 235-241), 동시에 어떠한 조혈 활성도 갖지 않음이 밝혀졌다. 하지만, NS20Y 세포에서의 100 pg/ml 재조합 EPO (rhEPO) 및 SK-N-MC 세포에서의 400 pg/ml rhEPO와 동일한 항아폽토시스 작용을 도출하기 위해서는 1 ng/ml의 EPO 웨티드가 필요하였다. 약 66.000 g/mol의 rhEPO (계산된 분자량은 약 33.000 g/mol이지만, 여기에는 rhEPO에 포함된 올리고사카라이드 잔기의 중량은 포함되지 않음) 및 약 1.900 g/mol의 EPO 웨티드의 명백한 분자량이 주어진 경우, 각각 1.52 pmol/1 및 6.06 pmol/1의 rhEPO 및, 1 nmol/1의 EPO 웨티드의 농도가 동일한 수준의 세포 보호 작용을 도출하였다. 결과적으로 EPO 웨티드는 세포 사멸의 예방에 있어, rhEPO보다 650배 내지 165배 덜 활성이다. 17-mer에 포함된 EPO 영역이 EPO의 세포 보호 기능에 주요 역할을 하지 않음을 이러한 특징으로부터 명백하다. 따라서, 선행 문헌에서 공지된 감소된 조혈 활성을 갖는 모든 EPO 변이체는 이들이 자연 발생이 아니라는 점에서 단점이 있는데, 이는 이들을 rhEPO와 비교시, 이들이 천연 글리코실화를 잃어버렸거나 또는 인공적으로 절단된 것이고/거나 이들의 세포 보호 활성이 매우 감소되었기 때문이다. 따라서, 자연 발생 EPO와 가까우며 rhEPO와 동일하거나 또는 보다 더 나은 조직 보호 활성을 갖지만 조혈성은 덜하거나 또는 아예 없으며, 특히 어떠한 적혈구생성 활성도 없는 EPO 유도체를 제공하는 것이 선행 문헌에서 요구되었다.

[0013] 인간 및 마우스 조직 (뇌, 신장)에서 자연적으로 발생된 것으로서, rhEPO와 유사하거나 또는 더 나은 세포 보호 활성을 나타내지만 어떠한 상당한 조혈 활성도 나타내지 않는, 신규한 EPO 변이체를 제공함으로써 상기 문제점을 해결한다.

발명의 요약

[0014] 일 측면에서 본 발명은

[0015] (a) 각각 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도(deduced) 아미노산 서열을 갖는 hs3, hl-4, hl-5, hs4, hl-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301 및 mK3으로 지정되는 폴리웨티드의 성숙형을 적어도

코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[0017] (b) 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 및 21에 제시된, 코딩 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드;

[0018] (c) 서열 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 mS, mG3, mG5, m301 및 mK3의 인간화 버전 코딩 폴리뉴클레오티드;

[0019] (d) 서열 32, 34, 36, 및 38에 제시된 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 N-말단으로의 서열 24, 26, 28, 및 30으로 제시된 아미노산 서열 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 융합물을 포함하는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;

[0020] (e) 서열 31, 33, 35, 및 37에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열의 5'로의 서열 23, 25, 27, 및 29에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열의 융합물을 포함하는 폴리뉴클레오티드;

[0021] (f) (a) 내지 (e) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0022] (g) (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 단편 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 단편에서 1 내지 10의 아미노산 잔기가 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고/있거나 1 내지 10의 아미노산이 접합점의 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고, 상기 단편은 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0023] (h) (a) 내지 (g) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드와 50% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;

[0024] (i) 상보성 가닥이 염격한 조건 하에 (a) 내지 (h) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드

[0025]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 추가적 측면은 또다른 보다 고등 진핵 종으로부터의 에리트로포이에틴 (EPO) 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드의 동족체이다.

[0027] 본 발명의 추가적 측면은

[0028] (a) 나선 A를 포함하는 전장 EPO의 N-말단부를 포함하고

[0029] (i) 나선 A와 나선 B 사이의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 아미노산 단편;

[0030] (ii) 나선 B의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 아미노산 단편;

[0031] (iii) 나선 B와 나선 C 사이의 2 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 3, 4, 5, 또는 6 아미노산 단편;

[0032] (iv) 나선 C의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23 아미노산 단편;

[0033] (v) 나선 C와 나선 D 사이의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27 아미노산 단편; 및/또는

[0034] (vi) 나선 D의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 아미노산 단편

[0035] 중 1 이상이 결여되어 있으며, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없

는 EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;

[0036] (b) (a) 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0037] (c) 상보성 가닥이 염격한 조건 하에 (a) 내지 (b) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드

[0038]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥이다.

[0039] 바람직한 측면에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 DNA, 게놈 DNA 또는 RNA이다.

[0040] 또다른 측면에서 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드는 원핵 및/또는 진핵 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하는 발현 제어 서열과 작동가능하게 연결되어 있다.

[0041] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포이다.

[0042] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터 및/또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 트랜스제닉 비인간 동물이다.

[0043] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계 및 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 EPO 변이체 폴리펩티드의 제조 방법이다.

[0044] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 산화, 황산화, 인산화, 올리고사카라이드의 부가 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 상기 EPO 변이체의 변형 단계를 추가로 포함한다.

[0045] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 벡터를 사용하여 시험관 내에서 세포를 유전자 조작하는 것을 포함하는, EPO 변이체 폴리펩티드가 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는, 1 이상의 EPO 변이체 발현가능 세포의 제조 방법이다.

[0046] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖거나 또는 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 폴리펩티드이다.

[0047] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 폴리펩티드에 특이적 결합하는 항체이다.

[0048] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 항체 및 1 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이다.

[0049] 본 발명의 또다른 측면은 세포 사멸, 예를 들어, 아폽토시스 및 괴사, 뿐 아니라 염증에 의한 조직 손상과 관련된 상태의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 본 발명의 벡터, 본 발명의 숙주 세포, 본 발명의 폴리펩티드의 용도이다.

[0050] 본 발명의 바람직한 용도에서, 세포 사멸은 허혈, 저산소증, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 자가면역, 외상에 의해, 화학적으로 (예를 들어, 대사, 독성), 또는 방사선에 의해 유도된다.

[0051] 본 발명의 바람직한 용도에서, 상기 상태는 급성 신경변성/신경염증성 장애 또는 만성 신경변성/신경염증성 장애이거나, 심장 (예를 들어, 심근경색증), 폐 (예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환), 신장 (예를 들어, 사구체신염), 간 (예를 들어, 만성 간 부전) 또는 췌장 (예를 들어, 췌장염)의 급성 또는 만성 장애이거나, 또는 기관 (예를 들어, 신장 또는 간) 또는 세포 이식 (예를 들어, 줄기 세포)과 관련되어 있다.

[0052] 바람직하게는 급성 신경변성 및/또는 신경염증성 장애는 색전 폐색 및 혈전 폐색을 비롯한 뇌 허혈 또는 경색증, 재관류 후 급성 허혈, 출생전후 저산소증-허혈성 손상, 심장 정지, 두개내 출혈, 거미막하 출혈 및 두개내 병변 (예를 들어, CNS 외상), 척수 병변, 척추내 병변, 편타성 혼들린 영아 증후군, 감염성 뇌염 (예를 들어, 헤르페스 뇌염), 수막염 (예를 들어, 박테리아성), 두통 (예를 들어, 편두통)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0053] 바람직하게는 만성 신경변성/신경염증성 장애는 치매 (예를 들어, 알쓰하이머병, 혈관성 치매), 퍼크병(Pick's disease), 미만성 루이 소체 질환, 진행성 핵상 마비 (스틸-리차드손(Steel-Richardson) 증후군), 다발 경화증, 다기관 위축 (사이-드래거(Shy-Drager) 증후군 포함), 신경변성 관련 만성 간질 상태, 운동 뉴런 질환, 퇴행성 조화운동불능, 피질 기재 변성, 구암의 ALS-파킨슨 치매 복합증 (ALS-Parkinson's Dementia complex of Guam), 아급성 경화성 범뇌염, 헌팅تون(Huntington) 질환, 파킨슨 질환, 시뉴클레이노파씨(synucleinopathy), 원발성 진행성 실어증, 선조체흑질 변성, 마카도-조세프(Machado-Joseph) 질환/척수소뇌성 실조증 유형 3 및 올리브뇌교 소뇌 변성, 질 드 라 투렛(Gilles De La Tourette) 질환, 연수 및 가연수 마비, 척수 및 척수연수 근육 위축 (케네디(Kennedy) 질환), 원발성 측삭 경화증, 가족성 연축성 대마비, 베르드니히-호프만(Werdnig-Hoffmann) 질환, 쿠겔베르그-웰란더(Kugelberg-Welander) 질환, 테이-삭스(Tay-Sach) 질환, 샌드호프(Sandhoff) 질환, 가족성 연축성 질환, 연축성 하반신마비, 진행성 다초점성 뇌백질병증, 가족성 자율신경기능장애 (릴리-데이(Riley-Day) 증후군), 다발신경병증 (예를 들어, 당뇨병성, 알콜-독성, 갈렝-바레-증후군(Guillain-Barre-Syndrome), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증), 프리온 질환, 중독, 정동 장애 (예를 들어, 우울증), 정신분열 장애, 만성 피로 증후군, 만성 통증 (예를 들어, 요통)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 용도에서, 상기 상태는 노화이다.
- [0055] 본 발명의 바람직한 용도에서, 약제는 상기 상태의 발현 전 또는 후에 투여된다.
- 발명의 상세한 설명**
- [0056] 달리 정의하지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명에 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상반되는 경우에, 정의를 포함하는 본원이 우선할 것이다. 여기에서 바람직한 방법 및 물질을 기술하지만, 본원에 기술된 것과 유사하거나 또는 균등범위의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히, 및 기타 참조문헌은 이를 전체가 참고문헌으로 인용된다. 본원에 개시된 물질, 방법, 및 예는 단지 예시일 뿐이며, 이로 제한되어서는 안된다.
- [0057] 본 발명은 EPO 변이체가 신경원성 조직에서 발현된다는 놀라운 관찰 및 산소 및 글루코스 손실에 의해 유도되는 손상으로부터 변이체를 보호하지만 조혈 활성을 보이지 않은 결론에 기초한다. 이러한 거동은 EPO의 조혈 기능이 요구되지 않거나 또는 해로운 상황에서의 치료제로서의 이들의 사용을 적합하게 한다. 따라서 본 발명의 제 1 측면은
- [0058] (a) 각각 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는 hs3, hl-4, hl-5, hs4, hl-1, h2-1, mS, mG3, mG5, m301 및 mK3으로 지칭되는 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 폴리뉴클레오티드;
- [0059] (b) 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 및 21에 제시된, 코딩 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드;
- [0060] (c) 서열 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 mS, mG3, mG5, m301 및 mK3의 인간화 버전 코딩 폴리뉴클레오티드;
- [0061] (d) 서열 32, 34, 36, 및 38에 제시된 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 N-말단으로의 (바람직하게는 직접, 즉, 어떠한 아미노산의 개재도 없이) 서열 24, 26, 28, 및 30에 제시된 아미노산 서열 군으로부터 선택되는 아미노산 서열의 융합물을 포함하는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;
- [0062] (e) 서열 31, 33, 35, 및 37에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열의 5'로의 (바람직하게는 5'에 직접, 즉, 어떠한 폴리뉴클레오티드의 개재도 없이) 서열 23, 25, 27, 및 29에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열의 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열의 융합물을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- [0063] (f) (a) 내지 (e) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;
- [0064] (g) (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 단편 코딩 폴리뉴클레오티드로

서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 단편에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기가 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고/있거나 1 내지 10의 아미노산이 접합점의 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고, 상기 단편은 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0065] (h) (a) 내지 (g) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드와 50% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드; 및

[0066] (i) 상보성 가닥이 염격한 조건 하에 (a) 내지 (h) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드

[0067] 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥이다.

[0068] 본 발명은 또한

[0069] (a) 각각 서열 50, 51, 52, 53 및 61에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는, ha, hAma, hAmE, hA-10 및 ha-수송 서열로 지칭되는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;

[0070] (b) 폴리펩티드의 성숙형을 적어도 코딩하는 서열 55, 56, 57, 58 및 60에 제시된 코딩 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드;

[0071] (c) (a) 내지 (b) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0072] (d) (a) 내지 (b) 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 단편 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 단편에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기가 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고/있거나 1 내지 10의 아미노산이 접합점의 N- 및/또는 C-말단에서 결실되어 있고, 상기 단편은 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;

[0073] (e) (a) 내지 (b) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드와 50% 이상 동일한 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드; 및

[0074] (i) 상보성 가닥이 염격한 조건 하에 (a) 내지 (h) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드

[0075]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥의 웨티드에 관한 것이다.

[0076] 추가적 측면에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또다른 보다 고등 진핵 종, 특히 포유동물, 더욱 바람직하게는 비인간 영장류; 설치류, 예를 들어, 래트, 또는 기니아 퍼그; 반추동물, 예를 들어, 소; 또는 양; 말; 돼지; 토끼; 개; 또는 고양이로부터 유래되며, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 본 발명의 EPO 변이체의 동족체를 포함한다. 본 문맥에서 용어 동족체는 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 또는 60에 따른 폴리뉴클레오티드와 동일한 결실을 본질적으로 포함하는, 또다른 종으로부터 유래된 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 만약 폴리뉴클레오티드의 결실이 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 또는 61에 따른 EPO 변이체 폴리펩티드에서 각각의 결실된 폴리펩티드에 상동성인 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드의 결실과 연관되어 있다면, 이러한 결실은 본질적으로 동일한 것으로 고려된다. 2개의 웨티드 서열 사이의 상동성을 결정하는 기준은 잘 확립되어 있다. 이러한 목적을 위해 BLASTP와 같은 프로그램이 사용될 수 있다. 만약 결실이 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 또는 21에서 각각의 결실로서 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, 55, 56, 57, 58 또는 61 정도의 뉴클레오티드와 관련되어 있다면, 이러한 결실 또한 본질적으로 동일한 것으로 생각되며, 이는 또한 도 2 및 3에 나타나 있다.

- [0077] 본 발명의 추가적 측면은
- [0078] (a) 나선 A를 포함하는 전장 EPO의 N-말단부를 포함하고
- [0079] (i) 나선 A와 나선 B 사이의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 아미노산 단편;
- [0080] (ii) 나선 B의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 아미노산 단편;
- [0081] (iii) 나선 B와 나선 C 사이의 2 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 3, 4, 5, 또는 6 아미노산 단편;
- [0082] (iv) 나선 C의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23 아미노산 단편;
- [0083] (v) 나선 C와 나선 D 사이의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27 아미노산 단편; 및/또는
- [0084] (vi) 나선 D의 10 이상의 아미노산 단편, 바람직하게는 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 아미노산 단편
- [0085] 중 1 이상이 결여되어 있으며, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드;
- [0086] (b) (a) 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드 유도체 코딩 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리펩티드와 비교시 상기 유도체에서의 1 내지 10의 아미노산 잔기는 보존적으로 치환되어 있으며, 상기 유도체는 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 것인 폴리뉴클레오티드;
- [0087] (c) 상보성 가닥이 염격한 조건 하에 (a) 내지 (b) 중 어느 하나에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로서, 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드
- [0088]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 상보성 가닥이다.
- [0089] 본 문맥에 있어, EPO 폴리펩티드의 나선 A, B, C, 및 D는 도 4에 개발된 바와 같이 마우스 및 인간으로부터의 전장 EPO의 각각의 나선 A, B, C, 및 D 영역에 상동성인 영역이다. 2개의 폴리펩티드 서열 사이의 상동성을 결정하는 방법은 당업계에 주지되어 있으며 당업자는 예를 들어 또다른 종으로부터 유래된 주어진 EPO 폴리펩티드 서열을 정렬시키고 이러한 EPO 폴리펩티드에서의 나선 A, B, C, 및 D의 각각의 위치를 결정할 수 있을 것이다. EPO 변이체 폴리뉴클레오티드는 보다 고등 진핵생물, 특히 포유동물 또는 조류로부터 유래되는 것이 바람직하다. 바람직한 포유동물은 인간, 비인간 영장류; 설치류, 예를 들어, 래트, 또는 기니아 피그; 반추동물, 예를 들어, 소; 또는 양; 말; 돼지; 토끼; 개; 또는 고양이이다. 다양한 종으로부터의 많은 수의 이러한 전장 EPO 코딩 폴리뉴클레오티드는 공지되어 있으며, 고양이 (진뱅크 접속번호 L10606), 돼지 (진뱅크 접속번호 10607), 양 (진뱅크 접속번호 10610), 개 (진뱅크 접속번호 L13027), 짧은꼬리원숭이 (진뱅크 접속번호 M18189), 붉은털 원숭이 (진뱅크 접속번호 L10609), 마우스 (진뱅크 접속번호 12930), 래트 (진뱅크 접속번호 L10608), 인간 (진뱅크 접속번호 M11319) 보스 타우루스(Bos taurus) (진뱅크 접속번호 U44762) 및 보스 인디쿠스(Bos indicus) (진뱅크 접속번호 L41354)를 비제한적으로 포함한다.
- [0090] 바람직하게는 EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드는 다음의 것이 결여되어 있다: (i); (ii); (iii); (iv); (v); (vi); (i) 및 (ii); (i) 및 (iii); (i) 및 (iv); (i) 및 (v); (i) 및 (vi); (ii) 및 (iii); (ii) 및 (iv); (ii) 및 (v); (ii) 및 (vi); (iii) 및 (iv); (iii) 및 (v); (iii) 및 (vi); (iv) 및 (v); (iv) 및 (vi); (v) 및 (vi); (i), (ii) 및 (iii); (i), (ii) 및 (iv); (i), (ii) 및 (v); (i), (ii), (vi), (i), (vi), (i), (iii) 및 (iv); (i), (iii) 및 (v); (i), (iv) 및 (v); (i), (iv) 및 (vi); (i), (v) 및 (vi); (ii), (iii) 및 (iv); (ii), (iii) 및 (v); (ii), (iii) 및 (vi); (ii), (iv) 및 (v); (ii), (iv) 및 (vi); (ii), (v) 및 (vi); (ii), (v) 및 (vi); (iii), (iv) 및 (v); (iii), (iv) 및 (vi); (iii), (v) 및 (vi); 또는 (iv), (v) 및 (vi).
- [0091] 세포 보호 활성을 나타내는 폴리펩티드는 산소 또는 글루코스 순실, 화학적 또는 방사선 노출, 또는 바이러스

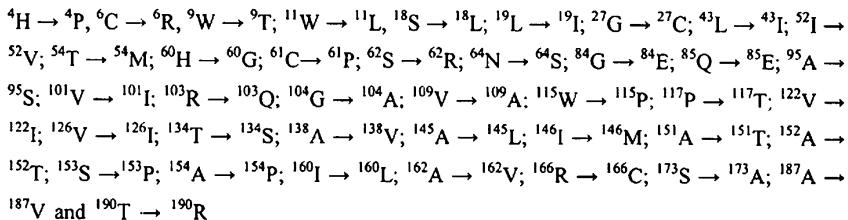
또는 박테리아 감염에 의해 유도된 아폽토시스에 의한 손상으로부터 뉴런을 보호하는 각각의 EPO 변이체의 능력의 50% 이상 (예를 들어, 적어도: 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99.5%; 또는 100% 또는 그 이상)을 갖는 폴리펩티드이다. 세포, 특히 신경원성 세포에 대한 손상을 결정하는 분석은 당업계에 공지되어 있다. 적합한 분석은 하기 본원에서 기술된 산소 글루코스 손실 분석이다. 기술된 분석에서, 락테이트 디히드로게나제 활성 (LDH)의 양을 판독한다. 하지만, 세포에 유도된 손상, 특히 세포 사멸의 양 (예를 들어, 아폽토시스, 과사)를 평가할 수 있는 다양한 다른 방법이 존재한다. 이러한 분석에는 터널(Tunnel) 분석, MTT-분석, 염색 (예를 들어, 에티듐 브로마이드 및 아크리딘 오렌지 염색)에 의한 생/사(life/death) 분석, 카스파제 분석, 전자 현미경, DNA-분절이 비제한적으로 포함되며, 이들은 모두 당업계에 공지되어 있다.

[0092] 본 질상 조혈 활성을 나타내지 않는 EPO 변이체 폴리펩티드는 당업계에서 공지된 콜로니 형성 분석을 통해 도출된 폴리펩티드로서, 이의 예는 하기 기술되어 있으며, 각각 rhEPO 및 wt mEPO와 동일한 몰 농도에서 10% 미만의 CFU-E (콜로니 형성 단위-적혈구모세포), 바람직하게는 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1 % 미만이다. 주어진 대조 반응(wt 또는 EPO 변이체가 없음)에서 관찰된 각각의 CFU-E의 수치를 빼서 rhEPO, wt mEPO, 또는 EPO 변이체에 대한 각각의 CFU-E 수치를 계산한다.

[0093] 본 발명 폴리펩티드의 문맥에서, 용어 "접합점"은 rhEPO 또는 마우스 wt EPO에서 연속적이지 않으며 EPO mRNA에서의 스플라이스 사건 또는 기타 재배열의 잠재적 결과물인 부위로서, 2개의 아미노산이 서로 동행되는 부위를 지칭한다. 본 발명의 EPO 변이체의 각각의 접합점은 도 4로부터 유도될 수 있으며, 예를 들어, hS3에 대한 ENIT | VQQQ, h1-4에 대한 VQQQ | ALLV, h1-5에 대한 VNFY | ALLV, hS4에 대한 KRME | PWEP, h1-1에 대한 ITVP | GPVG, h2-1에 대한 LNEN | NHC, mS에 대한 KRME | KELM, mG3에 대한 LLAN | FLRG, mG5에 대한 DTFC | RRGD, m301에 대한 KVNF | LRGK 또는 mK3에 대한 LSEA | VHGR가 있다.

[0094] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 시험관 내에서 합성될 수 있으며 (예를 들어, 포스포라미다이트-기재 합성에 의함) 또는 세포, 예컨대 포유동물의 세포로부터 얻어질 수 있다.

[0095] 각각 서열 14, 16, 18, 20, 및 22에 제시된 유도 아미노산 서열을 갖는 mS, mG3, mG5, m301 및 mK3으로 지칭된 EPO 변이체는 마우스로부터 단리되었다. 마우스 서열은 인간 서열과 매우 상동성이다. 인간 및 마우스로부터 유래된 EPO의 아미노산 서열의 정렬은 도 4에서 제공된다. 마우스 서열은 위치 8에서 알라닌 잔기의 결여 및 뒤이은 39 치환에 의해 인간 서열과 구별된다 (넘버링은 인간 EPO의 각각의 아미노산 위치에 따른 것이며, 나타낸 첫번째 아미노산은 그 위치에서의 인간 아미노산이고 두번째는 상응하는 마우스 아미노산이다):



[0096]

[0097] 인간화 mS, mG3, mG5, m301 또는 mK3은 마우스 아미노산 서열에 비해 인간의 위치 8에 및/또는 바람직하게는 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 또는 37 위치 중 1 이상에서 추가 알라닌 잔기를 보유한다. mS, mG3, mG5, m301 및 mK3가 완전 인간화된 것, 즉, 상기 개괄된 위치에서의 모든 아미노산이 각각의 변이체에 존재하는 한, 이들이 마우스 서열보다 인간 서열인 것이 특히 바람직하다. 마우스 변이체의 인간화는 인간의 치료에 사용되는 경우에 직면할 수도 있는 임의의 면역학적 문제점을 감소시킬 것으로 예상된다.

[0098] 본 발명의 EPO 변이체 핵산 분자는 DNA, cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA 또는, RNA일 수 있으며, 이중-가닥의 또는 단일-가닥의, 센스 및/또는 안티센스 가닥일 수 있다. 이러한 분자는 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 제조될 수 있거나, 또는 1 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 처리함으로써 생성될 수 있다. 리보핵산 (RNA) 분자는 시험관 내 전사에 의해 제조될 수 있다.

[0099] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 자연 발생 서열, 또는 자연 발생 서열과 상이하지만, 유전성 코드의 동의성으로 인해 동일한 폴리펩티드, 즉, 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 및 22를 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 나아가, 이러한 핵산 분자는 코딩 서열에 제한되지 않는데, 예를 들어, 이들은 코딩 서열의 상류 또는 하류에 놓여있는 몇몇 또는 모든 비코딩 서열을 포함할 수 있다.

- [0100] 나아가, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 자연 상태에서는 발견되지 않는 분절을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 벡터 (예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터) 또는 이종 세포의 계놈 (또는 자연 염색체 위치 이외의 위치에서의 상동성 세포의 계놈)에 혼입된 재조합 핵산 분자를 포함한다. 이에 따라, 재조합 핵산 분자 및 사용은 하기에서 추가로 논의된다.
- [0101] 바람직한 실시태양에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 (a) 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 50, 51, 52, 53 또는 60의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 (b) 각각 서열 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 55, 56, 57, 58 또는 61의 뉴클레오티드 서열과 50%, 바람직하게는 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일하며, 동시에 세포 보호 활성, 특히 신경보호 활성을 가지지만, 본질상 어떠한 조혈 활성도 없는 핵산 분자를 포함한다.
- [0102] 2개의 서열 간의 동일성%의 결정은 문헌 [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873-5877]의 수학 알고리즘을 사용하여 수행된다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410]의 BLASTN 및 BLASTP 프로그램에 혼입되어 있다. BLAST 뉴클레오티드 조사는 스코어 = 100, 단어 길이 = 12의 BLASTN 프로그램을 사용하여 수행되며, EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 핵산에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻는다. BLAST 단백질 조사는 스코어 = 50, 단어 길이 = 3인 BLASTP 프로그램을 사용하여 수행되며, 각각 EPO 변이체 폴리펩티드와 상동성인 아미노산 서열을 얻는다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 얻기 위해, 문헌 [Altschul et al. (1997) Nucleic acids Res. 25: 3389-3402]에 기술된 바와 같은 갭(Gapped) BLAST이 이용된다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램의 이용시, 각각의 프로그램의 기본 파라미터가 사용된다.
- [0103] 2개의 핵산 서열 산의 상동성의 측정을 위해 혼성화가 또한 사용될 수 있다. 본원에 개시된 임의의 EPO 변이체 코딩 핵산 서열, 또는 이들의 유도체 또는 단편이 표준 혼성화 기법에 따라 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다. 시험원 (예를 들어, 포유동물 세포)으로부터의 DNA 또는 RNA로의 EPO 변이체 프로브의 혼성화는 시험원 중 관련 있는 EPO DNA 또는 RNA의 존재의 지표이다. 혼성화 조건은 당업자에게 공지되어 있으며 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1- 6.3.6, 1991]에서 확인될 수 있다. 엄격한 조건은 45°C에서의 6X 염화 나트륨/나트륨 시트레이트 (SSC)에서의 혼성화 후 65°C에서의 0.2 X SSC, 0.1 % SDS 중 세척과 균등한 정도로 정의된다. 내부 결실을 보유한 변이체에 특이적인 프로브를 선택하는 경우, 상동성 핵산 검출에 사용되는 프로브가 결실의 경계, 예를 들어, hs3, h1-4, h1-5, hS4, mS, mG3, mG5 또는 m301과 중첩되는 것이 바람직하다. 스플라이싱이 단백질의 또다른 C-말단, 예를 들어, h1-1, h2-1 또는 mK3을 유도하는 경우, 상동성 DNA 서열 검출에 사용되는 프로브가 공지된 EPO 서열 및 또다른 C-말단 사이의 경계와 중첩되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 프로브가 스플라이스 부위의 10 상보성 염기 5' 및 스플라이스 부위의 10 상보성 염기 3'를 포함하도록 고안될 수 있다.
- [0104] "단리된 DNA"는 (1) 임의의 자연 발생 서열과 동일하지 않은 서열을 포함하는 DNA, 또는 (2) 자연 발생 서열을 갖는 DNA (예를 들어, cDNA 또는 계놈 DNA)의 관점에서, 관심있는 DNA를 포함하는 유전자가 자연 발생하는 유기체의 계놈에서의 관심있는 DNA를 포함하는 유전자에 인접한 1 이상의 유전자가 없는 DNA이다. 따라서 상기 용어는 벡터, 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스, 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 계놈 DNA 내에 혼입된 재조합 DNA를 포함한다. 상기 용어는 또한 상응하는 계놈 DNA가 인트론을 가지며 이에 따라 상이한 서열을 갖는 cDNA와 같은 1 이상의 인접 유전자가 결여된 계놈 단편; 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 제조되며 1 이상의 인접 유전자가 결여된 cDNA 또는 계놈 DNA의 단편; 1 이상의 인접 유전자가 결여된 제한 단편; 비-자연 발생 단백질 예컨대 융합 단백질, 뮤테인, 또는 주어진 단백질의 분획물 코딩 DNA; 및 cDNA 또는 자연 발생 핵산의 변성 변이체인 핵산과 같은 별도의 분자를 포함한다. 또한, 이는 하이브리드 유전자, 즉, 비-자연 발생 융합 단백질 코딩 유전자의 부분인 재조합 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단리된 DNA가 예를 들어, cDNA 또는 계놈 DNA 라이브리 또는, 예를 들어, 제한 다이제스트(digest) 반응 혼합물 또는 전기영동 젤 슬라이스 내의 계놈 DNA 제한 다이제스트 내의 수 천 내지 수 백만개의 다른 DNA 분자 중에 존재하는 DNA를 의미하지 않음이 상기로부터 명백할 것이다.
- [0105] 본 발명의 추가적 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 단백질이다. 용어 "벡터"는 세포 내에 포함된 단백질 및/또는 핵산에 도입될 수 있거나 또는 이를 도입할 수 있는 단백질 또는 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 혼합물을 지칭한다. 도입된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 단백질은 벡터의 도입 시 세포 내에서 발현되는 것이 바람직하다.
- [0106] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 벡터는 플라스미드, 파지미드(phagemid), 파지, 코스미드(cosmid), 인공적 포유동물 염색체, 녹-아웃 또는 녹-인 구조물, 바이러스, 특히 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 감쇠된 백

시니아 바이러스, 카나리 폭스 바이러스, 렌티바이러스 (Chang, L.J. and Gay, E.E. (2000) *Curr. Gene Therap.* 1:237- 251), 헤르페스 바이러스, 특히 단순 헤르페스 바이러스 (HSV-1, [Carlezon, W. A. et al. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*]), 바클로바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련-바이러스 (AAV, [Carter, P.J. and Samulski, R.J. (2000) *J. Mol. Med.* 6:17-27]), 리노바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 필로바이러스 및 이들의 유전자 조작된 버전 (예를 들어, 문헌 [Cobinger G. P. et al (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:225-30] 참조), 비로좀, "순수한" DNA 리포좀, 및 핵산 코팅된 입자, 특히 골드 스피어(gold sphere)를 포함한다. 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터가 특히 바람직하다 ([Lindemann et al. (1997) *Mol. Med.* 3:466-76] 및 [Springer et al. (1998) *Mol. Cell.* 2:549-58]). 리포좀은 일반적으로 예를 들어, 리포좀 혼탁액의 초음파 처리에 의해 양이온성, 중성 및/또는 음이온성 지질로 만들어진 작은 단층 또는 다층 소포이다. DNA는 예를 들어 리포좀의 표면에 이온적으로 결합될 수 있거나 또는 리포좀에 내부적으로 봉입될 수 있다. 적합한 지질 혼합물을 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 다양한 세포주 상에 사용되는 DOTMA (1,2-디올레일옥스프로필-3-트리메틸암모늄브로마이드) 및 DPOE (디올레오일포스파티딜에탄올아민)을 포함한다.

[0107]

핵산 코팅된 입자는 세포 내로 입자의 기계적 도입을 가능하게 하는 소위 "유전자 총"을 사용하여 세포 내로 핵산을 도입시키는 또다른 수단이다. 바람직하게는 입자 그자체는 비활성이며, 이에 따라 바람직한 실시태양에서는 골드 스피어로 제조된다.

[0108]

추가적 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 원핵 및/또는 진핵 숙주 세포에서 발현가능한 발현 제어 서열과 작동가능하게 연결된다. 상기 지칭된 전사/번역 조절 인자는 유도가능한 및 유도가능하지 않은, 구성적이고, 세포 주기 조절되며, 대사적으로 조절된 프로모터, 인핸서, 오퍼레이터, 사일렌서, 억제자 및 당업자에게 공지되어 있으며, 유전자 발현을 유도하거나 또는 다르게 조절하는 다른 요소를 비제한적으로 포함한다. 이러한 조절 요소에는 구성적 발현 관련 조절 요소, 예컨대 RNA 중합효소 III 등에 의해 전사되는 프로모터, 예를 들어 snRNA U6 또는 scRNA 7SK 유전자에 대한 프로모터, 사이토메갈로바이러스 hCMV 즉각 초기 유전자, SV40 아데노바이러스의 초기 또는 후기 프로모터, 예를 들어, NBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV, MMTV 또는 HIV로부터 유래되며, 유도가능한 발현 등을 가능하게 하는 바이러스 프로모터 및 활성자 서열, 예를 들어 CUP-I 프로모터, 예를 들어 tet-on 또는 tet-off 시스템에서 사용되는 tet-억제자, lac 시스템, trg 시스템; 조직 특이적 발현, 바람직하게는 신경 세포 특이적 발현 관련 조절 요소, 예를 들어, 프로모터 (예를 들어, Thy-1.2, NSE, 미오신 경쇄 II, 티로신 히드록실라제, CaMKII알파 프로모터, 혈소판-유래 성장 인자 베타-사슬 (PDGF), 도파민 베타-히드록실라제, Tau, 세포 주기 특이적 발현 관련 조절 요소 (예를 들어, NRSE/RE-1; 뉴런-억제성 침묵 요소/억제자 요소 1), 예를 들어, cdc2, cdc25C 또는 사이클린 A; 또는 TAC 시스템, TRC 시스템, 파지 A의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd coat 단백질의 제어 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터, 산 포스파타제에 대한 프로모터, 효모 a- 또는 a-접합 인자의 프로모터가 비제한적으로 포함된다.

[0109]

본원에 사용된 "작동가능하게 연결된"은 발현 제어 서열이 관심있는 코딩 서열의 발현을 효과적으로 제어하도록 유전성 구조물 내에 혼입시키는 것을 의미한다.

[0110]

유사하게, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 추가 폴리펩티드 서열 코딩 하이브리드 유전자, 예를 들어 마커 또는 리포터로 작용하는 단백질을 코딩하는 서열의 일부를 형성할 수 있다. 하이브리드 유전자는 융합 단백질을 유도할 수 있거나 또는 2 이상의 부분이 내부 리보솜 부착 부위 (IRES) 서열에 의해 분리될 수 있는데, 이는 2 이상의 분리 단백질의 발현을 유도한다. 마커 및 리포터 유전자의 예에는 β -락타마제, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제 (CAT), 아데노신 디아미나제 (ADA), 아미노글리코사이드 포스포트랜스페라제 (neo^r, G418^r), 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR), 히그로마이신-B-포스포트랜스페라제 (HPH), 티미딘 키나제 (TK), lacZ (β -갈اكتоз이다제 코딩), 녹색 형광 단백질 (GFP) 및 이들의 변이체 및 잔틴 구아닌 포스포리보실-트랜스페라제 (XGPRT)가 포함된다. 본 발명의 실시와 관련된 많은 표준 과정에 대해서는, 당업자는 추가 유용한 시약, 예를 들어 마커 또는 리포터의 기능을 할 수 있는 부가 서열을 알 것이다. 하이브리드 유전자의 발현이 하나의 폴리펩티드를 유도하는 경우, 하이브리드 폴리펩티드는 일반적으로 EPO 변이체 폴리펩티드인 제1 부분 및 예를 들어, 상기 기술된 리포터 또는 Ig 불변 영역 또는 Ig 불변 영역의 부분, 예를 들어, IgG2a 중쇄의 CH2 및 CH3 도메인인 제2 부분을 포함할 것이다. 다른 하이브리드는 정체 및/또는 검출을 촉진하는 이종 펩티드 서열, 예를 들어, 항원 tag, 예를 들어, myc tag, 또는 일정 영역에 우선적으로 결합하는 tag, 예를 들어, 키친 tag 또는 His tag를 포함할 수 있다. 재조합 핵산 분자는 또한 이종 신호 서열에 작동가능하게 연결된 EPO 변이체 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 신호 서열은 세포 내에 상이한 구획에 대한 단백질을 지정할 수 있으며, 당업자에게 주지되어 있다. 바람직한 신호 서열은 생성된 단백질의 분비를 촉진시키는 서열이다.

바람직하게는 이러한 신호 및/또는 taq 서열은 최종 EPO에 대해 2 이상의 아미노산, 바람직하게는 10 이하의 추가 아미노산이 없는 본질적으로 순수 단백질을 제공하기 위해 정제 후 EPO 변이체를 절단할 수 있도록 고안된다. 이러한 절단 부위는 당업계에 주지되어 있으며, 예를 들어, 엔도펩티다제 절단 부위 및 인테인(intein) 절단 부위를 포함한다.

[0111]

본 발명의 또 다른 측면은 상기 개발된 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 유전자 조작된 숙주 세포이다. 본 발명의 목적에 사용될 수 있는 숙주 세포는 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 원핵 세포, 예컨대 박테리아(예를 들어, *E. coli* 및 *B. subtilis*); 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 단순 진핵 세포, 예컨대 효모(예를 들어, 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 및 피키아(*Pichia*)); 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염될 수 있는 곤충 세포계, 예컨대 Hi5 세포의 Sf9; 예를 들어, 플라스미드로 주입될 수 있는 제노푸스 난모세포; 예를 들어, EPO 변이체 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV) 또는 담배 모자이크 바이러스(TMV))로 감염될 수 있거나, 또는 EPO 변이체 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환될 수 있는 식물 세포계; 또는 예를 들어 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터), 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, CMV IE 및 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터) 또는 박테리아 세포로부터 유래된 프로모터(예를 들어, tet-억제자 결합이 tet-on 및 tet-off 시스템에 사용됨)를 포함하는 재조합 발현 구조물로 형질전환될 수 있는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 및 NIH 3T3 세포)을 비제한적으로 포함한다. 또한 포유동물로부터 직접 얻어지며 플라스미드 벡터로 형질감염되거나 또는 바이러스 벡터로 감염된 1차 또는 2차 세포가 숙주 세포로서 유용하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입하는데 사용되는 각각의 벡터 및 숙주 세포에 따라, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 염색체 또는 미토콘드리아 DNA에 통합될 수 있거나 또는 염색체외적으로, 예를 들어, 에피솜적으로 유지될 수 있거나, 또는 단지 세포에 일시적으로 포함될 수 있다.

[0112]

EPO는 생체 내에서 매우 글리코실화되므로, 단백질의 충실한 글리코실화를 제공하는 발현 시스템을 선택하는 것이 바람직하다. 결과적으로, 본 발명의 EPO 슬라이스 변이체 코딩 폴리뉴클레오티드를 보다 고등 진핵 세포, 특히 포유동물 세포, 예를 들어, COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3 또는 NIH 3T3 세포에 도입하는 것이 바람직하다.

[0113]

본 발명의 추가적 측면은 상기 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오티드, 벡터 및/또는 숙주 세포를 포함하는 트랜스제닉 비인간 동물이다. 상기 동물은 신체를 구성하는 세포 중 단지 일부만이 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및/또는 세포를 포함함을 의미하는 모자이크 동물일 수 있거나, 또는 모든 동물 세포가 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 포함하거나 또는 본 발명의 세포로부터 유래된 것을 의미하는 트랜스제닉 동물일 수 있다. 모자이크 또는 트랜스제닉 동물은 세포 내에 포함되어 있는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 대한 동형접합성 또는 이형접합성을 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 트랜스제닉 동물은 본 발명의 단백질 코딩 유전자에 대하여 동형접합성 또는 이형접합성 녹-아웃 또는 녹-인 동물이다. 동물은 원칙적으로 임의 동물일 수 있지만, 바람직하게는 비인간 영장류 말, 소, 양, 염소, 돼지, 개, 고양이, 염소, 토끼, 마우스, 래트, 기니아 퍼그, 햄스터, 또는 게르빌루스 쥐의 균으로부터 선택되는 포유동물이다.

[0114]

본 발명의 또 다른 측면은 상기 기술된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 EPO 변이체 폴리펩티드의 제조 방법이다. 숙주 세포 및 벡터의 바람직한 조합은 상기 개발되어 있으며 추가적 조합은 당업자에게 명백할 것이다. 회수되는 펩티드의 의도되는 추후 용도에 따라 적합한 세포 유형을 선택할 수 있다. 세포에 의해 생산된 단백질이 본질적으로 글리코실화의 자연 패턴을 나타내는 것이 바람직한 경우에는 상기 개발된 바와 같은 진핵 세포가 선택되는 것이 바람직하며, 예를 들어, 일반적으로 진핵 세포에서만 단백질에 도입되는 글리코실화 또는 다른 변형이 바람직하지 않거나 또는 필요하지 않은 경우에는 원핵 세포가 선택된다.

[0115]

단백질 약물의 약동학은 단백질의 변형에 의해 상당히 변할 수 있음이 선행 문헌에 공지되어 있다. 전장 EPO에 있어서 글리코실화, 특히 올리고사카라이드 층쇄 말단에의 시알산 잔기의 존재는 순환 시간과 관련있으며 (WO 95/05465), 시알산 기의 제거는 갈락토스 잔기를 노출시켜 간의 클리어런스를 증가시킨다는 것이 기술되어 있다. 따라서 EPO 순환 시간을 향상시키려는 한가지 접근법은 시알산 잔기를 증가시키는 것이다. 이에 따라 몇몇 접근법은 추가적 글리코실화 부위의 공급과 연관이 있다 (예를 들어, WO 91/05867, WO 94/09257 및 WO

01/81405 참조). 이러한 변형된 EPO 유사체는 1 이상의 추가적 N-연결 및/또는 O-연결된 탄화수소 사슬을 가질 수 있다. EPO의 반감기를 개선시키려는 다른 시도는 아미노산 골격 길이를 변화시키는 폴리에틸렌 글리콜 잔기 (PEG)의 부가와 연관되어 있다 (예를 들어, WO 00/32772, WO 01/02017, WO 03/029291 참조). 또 다른 시도는 산화, 황산화, 인산화, 페길화(PEGylation) 또는 이들의 조합으로 추가로 변형된 1 이상의 N-연결 및/또는 O-연결된 올리고사카라이드로 EPO 분자를 변형시키는 것이다 (WO 2005/025606 참조). 이러한 모든 접근법은 본 발명의 EPO 변이체의 반감기를 연장시키기 위해 균등하게 사용될 수 있으며, 이에 따라 바람직한 실시태양에서, 상기 방법은 산화, 황산화, 인산화, 올리고사카라이드의 부가 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 EPO 변이체의 변형 단계를 추가로 포함한다. N-연결 또는 O-연결된 올리고뉴클레오티드의 부가가 바람직한 경우, 선행 문헌에 기술된 바와 같은 추가 글리코실화 부위를, 예를 들어, (각각의 위치가 본 발명의 변이체에 존재하는 경우) 위치 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 및/또는 138에 도입함으로써, 상기의 것을 도입할 수 있다 (WO 01/81405 참조).

[0116] 본 발명의 추가적 측면은 특허청구범위 제3항 또는 제4항의 벡터를 사용하여 시험관 내에서 세포를 유전자 조작하는 것을 포함하는, EPO 변이체 폴리펩티드가 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는, 1 이상의 EPO 변이체 발현가능 세포의 제조 방법이다.

[0117] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖거나 또는 상기 언급된 방법에 의해 수득가능한 폴리펩티드이다. 본 발명의 폴리펩티드는 본원에 개시된 모든 폴리펩티드 및 1 내지 10의 N- 및/또는 C-말단 결실을 보유하는 상기 폴리펩티드의 단편을 포함한다. 바람직하게는 결실은 10 미만, 9 미만, 8 미만, 7 미만, 6 미만, 5 미만, 4 미만, 3 미만, 2 미만, 1 미만의 아미노산이다. 본 발명에 의해 구현되는 폴리펩티드는 또한 관련없는 아미노산 서열과 융합되는 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 및 22에 나타난 바와 같은 EPO 슬라이스 변이체 또는 14, 16, 18, 20 및 22의 인간화 버전 또는 상기 정의된 바와 같은 것들의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 관련없는 서열은 추가적 기능성 도메인 또는 신호펩티드를 포함할 수 있다. 신호펩티드는 하기에서 더욱 상세하게 기술되고 예시된다.

[0118] 폴리펩티드는 10 이하 (예를 들어, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 이하)의 보존적 치환을 갖는 상기 기술된 임의의 것일 수 있다. 보존적 치환은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 하나의 극성 아미노산을 또 다른 극성 아미노산으로의 치환 및 하나의 산성 아미노산을 또 다른 산성 아미노산으로의 치환을 통상적으로 포함한다. 따라서, 보존적 치환은 바람직하게는 다음의 아미노산 군 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌, 발린, 프롤린, 이소루신, 및 루신 (비극성, 지방쇄 사슬); 아스파르트산 및 글루탐산 (음이온 전하 측쇄); 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 시스테인, 세린, 및 트레오닌 (극성 비전하 측쇄); 리신, 히스티딘, 및 아르기닌; 및 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신 (방향족 측쇄); 및 리신, 아르기닌, 및 히스티딘 (극성 전하 측쇄). 주어진 치환의 효과, 예를 들어 pK_1 등에 대한 효과를 결정하는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 1 이상의 보존적 치환을 갖는 폴리펩티드는 모두 산소 또는 글루코스 손실, 독성, 화학적으로, 물리적으로, 기계적으로, 염증성, 또는 방사선 노출, 또는 바이러스 또는 박테리아 감염에 의해 유도된 (예를 들어, 아폽토시스 또는 괴사에 의한) 손상/세포 사멸로부터 뉴런을 보호하기 위해 변경되지 않은 EPO 변이체의 능력의 50% 이상 (예를 들어, 적어도: 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 98%; 99%; 99.5%; 또는 100% 또는 그 이상)을 갖도록 요구되어 진다.

[0119] 폴리펩티드 및 웨이퍼드는 모두 적절한 폴리펩티드 또는 웨이퍼드 코딩 뉴클레오티드 서열을 사용하여, 표준 시험관 내 재조합 DNA 기법 및 생체 내 형질전환에 의해 제조될 수 있다. 당업자에게 주지된 방법이 관련 코딩 서열 및 적절한 전사/번역 제어 신호물을 포함하는 구조물 발현 벡터에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989]] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology [Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989]]에 기술된 기법 참조.

[0120] 본 발명의 폴리펩티드 및 단편은 상기 기술되어 있으며, 생체 내 사용시 생체 내에서 관련된 폴리펩티드의 생존을 촉진시키기 위해 아미노- 및/또는 카르복실-말단에 차단제를 부가함으로써 변형된 것들을 포함한다. 이는 웨이퍼드 말단이 세포 흡수 전에 프로테아제에 의해 분해되는 경향이 있는 상황에서 유용할 수 있다. 이러한 차단제는 투여되는 웨이퍼드의 아미노 및/또는 카르복실 말단 잔기에 부착될 수 있는 추가적 관련 또는 관련없는 웨이퍼드 서열을 비제한적으로 포함할 수 있다. 이는 웨이퍼드의 합성 동안 화학적으로 또는 당업자에게 친숙한 방법에 의한 재조합 DNA 기법을 통해 행해질 수 있다.

[0121] 별법으로, 피로글루탐산 또는 당업계에 공지된 다른 분자와 같은 차단제가 아미노 및/또는 카르복실 말단 잔기

에 부착될 수 있거나, 또는 아미노 말단의 아미노 기 또는 카르복실 말단의 카르복실 기가 상이한 잔기로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 웨티드는 투여 전에 제약상 허용가능한 "담체" 단백질에 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링될 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "단리된" 폴리웨티드 또는 웨티드 단편은 자연 발생 대응물을 가지지 않거나 또는 예를 들어, 헤, 췌장, 간, 비장, 난소, 고환, 근육, 연결 조직, 신경 조직, 위장관 조직 또는 종양 조직과 같은 조직, 또는 혈액, 혈청, 또는 오줌과 같은 체액 중에 자연적으로 이를 동반하는 성분으로부터 분리 또는 정제된 폴리웨티드 또는 웨티드 단편을 지칭한다. 통상적으로, 폴리웨티드 또는 웨티드 단편은 자연적으로 관련있는 단백질 및 다른 자연 발생 유기 분자가 아닌 것이 70 건조 중량% 이상인 경우에 "단리된" 것으로 고려된다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리웨티드 (또는 이의 웨티드 단편)의 제제의 80 건조 중량%, 더욱 바람직하게는 90 건조 중량%, 가장 바람직하게는 99 건조 중량%가 각각 본 발명의 폴리웨티드 (또는 이의 웨티드 단편)이다. 이에 따라 예를 들어, 폴리웨티드 x의 제제의 80 건조 중량%, 더욱 바람직하게는 90 건조 중량%, 가장 바람직하게는 99 건조 중량%가 폴리웨티드 x이다. 화학적으로 합성된 폴리웨티드가 이의 성질에 의해 자연적으로 이를 동반하는 성분으로부터 분리되기 때문에, 합성 폴리웨티드는 "단리된" 것이다.

[0123] 본 발명의 단리된 폴리웨티드 (또는 웨티드 단편)는 예를 들어 천연원 (예를 들어 조직 또는 체액)으로부터의 추출물에 의해; 폴리웨티드 코딩 재조합 핵산의 발현에 의해; 또는 화학적 합성에 의해 얻을 수 있다. 자연 기원인 공급원과 상이한 세포계에서 생산된 폴리웨티드는 "단리된" 것인데, 이는 이를 자연적으로 동반하는 성분이 필연적으로 없기 때문이다. 단리 또는 정제의 정도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 또는 HPLC 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0124] 본 발명의 추가적 측면은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되거나 또는 상기 언급된 방법에 의해 수득 가능한 EPO 변이체 폴리웨티드에 특이적 결합하는 항체이다. 용어 "항체"는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 및 이들의 결합 단편, 특히 Fc-단편 뿐 아니라 소위 "단일-사슬-항체" (Bird R. E. et al (1988) Science 242:423-6), 키메라, 인간화, 특히 CDR-그라프트된 항체, 및 디아바디 또는 테트라바디 (Holliger P. et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-8)를 포함한다. 또한 예를 들어 본 발명의 폴리웨티드에 특이적 결합하는 과지 디스플레이를 포함하는 기법을 통해 선택되는 단백질과 같은 면역글로불린을 포함한다. 본 문맥에서, 용어 "특이적 결합"은 스플라이스 접합점 또는 다른 과정에 의해 생산되는 접합점, 예를 들어, hS3의 ENIT | VGQQ, h1-4의 VGQQ | ALLV, h1-5의 VNFY | ALLV, hS4의 KRME | PWEP, h1-1의 ITVP | GPVG, h2-1의 LNEN | NHC, mS의 KRME | KELM, mG3의 LLAN | FLRG, mG5의 DTFC | RRGD, m301의 KVNF | LRGK 또는 mK3의 LSEA | VHGR으로부터 유래되는 웨티드에 대해 부착되는 항체를 지칭한다. 이러한 웨티드는 N- 또는 C-말단 아미노산을 추가적으로 포함할 수 있으며 또는 덜 포함할 수 있다. 항체의 변이체에 대한 친화도가 전장 인간 또는 뮤린 EPO에 비해 50 배 이상, 바람직하게는 100 배 이상, 더욱 바람직하게는 1000 배 이상인 경우, 항체는 EPO 변이체에 특이적인 것으로 고려된다. 바람직하게는 본 발명의 특이적 항체는 전장 인간 또는 뮤린 EPO에 결합하지 않거나, 본질적으로 결합하지 않는다. 주어진 특이성을 갖는 항체의 제조 및 선택 방법은 당업계에 주지되어 있다.

[0125] 본 발명의 추가적 측면은 세포 사멸 (예를 들어, 아폽토시스 및 괴사)에 의한 조직 손상과 관련된 상태의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포, 폴리웨티드의 용도에 관한 것이다. 아폽토시스 또는 괴사는 세포 붕괴를 유발하는데, 이는 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포, 또는 폴리웨티드를 사용함으로써 예방 또는 개선될 수 있다. 세포 사멸은 바람직하게는 허혈, 저산소증, 박테리아 또는 바이러스 감염, 방사선, 또는 대사성, 독성, 화학적, 자가면역학적, 또는 외상적 자극을 포함하는, 많은 상이한 내부 및 외부 자극에 의해 유도될 수 있다. 세포 사멸 검출 방법은 당업계에 주지되어 있는데, 이의 예에는, 형태적 기준을 사용하는 방법, 터넬 분석, MTT-분석, 염색 (예를 들어, 에티듐 브로마이드 및 아크리딘 오렌지 염색)에 의한 생/사 분석, 카스파제 분석, 전자 현미경, DNA-분절 또는 하기 기술된 LDH 방출 분석이 있다. 예를 들어, 아폽토시스는 염색질 단편형성, 세포성 함유물의 혈관외유출, 및 세포의 궁극적 사멸을 특징으로 한다. 이는 많은 급성 또는 만성 병리적 과정에 일정한 역할을 하는 것으로 인식되어 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 용도는 급성 및 만성 신경변성 또는 신경염증성 장애, 심장 (예를 들어, 심근경색증), 폐 (예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환), 신장 (예를 들어, 사구체신염), 간 (예를 들어, 만성 간 부전) 또는 췌장(예를 들어, 췌장염)의 급성 또는 만성 장애, 뿐 아니라 세포 이식 (예를 들어, 줄기 세포) 또는 기관 이식 (예를 들어, 신장 또는 간)과 관련된 상태의 예방, 치료, 또는 개선을 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 또는 폴리웨티드를 투여하는 것을 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명의 EPO 변이체가 수송 동안 및/ 또는 외상적 손상 후 기관 또는 사지 저장을 위해 사용되는 저장 용액에 포함될 수 있음 또한 고려되어진다.

- [0126] 급성 신경변성 장애에는 뇌혈관 기능부족, 국소 또는 광범위 뇌 외상, 광범위 뇌 손상, 및 척수 손상을 포함하는 신경원성 세포 사멸과 관련된 다양한 유형의 급성 신경변성 장애가 비제한적으로 포함된다. 급성 신경변성 장애의 예로는 색전 폐색 및 혈전 폐색을 비롯한 뇌 허혈 또는 경색증, 재판류 후 급성 허혈, 출생전후 저산소증-허혈성 손상, 심장 정지, 뿐 아니라 임의 유형의 두개내 출혈 (예컨대 경막외, 경막하, 거미막하 및 뇌내), 및 두개내 및 척추내 병변 (예컨대 타박상, 관통, 전단, 암박 및 열상), 편타성 흔들린 영아 증후군 감염성 뇌 염 (예를 들어, 헤르페스 뇌염), 수막염 (예를 들어, 박테리아성), 두통 (예를 들어, 편두통)이 있다.
- [0127] 본 발명의 EPO 변이체로 치료될 수 있는 만성 신경변성 장애에는 치매 (예를 들어, 알츠하이머병, 혈관성 치매), 피크병, 미만성 루이 소체 질환, 진행성 핵상 마비 (스틸-리차드슨 증후군), 다발 경화증, 다기관 위축 (샤이-드래거 증후군 포함), 신경변성 관련 만성 간질 상태, 근위축성 측삭 경화증 포함 운동 뉴런 질환, 퇴행성 조화운동불능, 퍼질 기재 변성, 구암의 ALS-파킨슨-치매 복합증, 아급성 경화성 범뇌염, 헌팅تون 질환, 파킨슨 질환, 시뉴클레이노페씨 (다기관 위축 포함), 원발성 진행성 실어증, 선조체혹질 변성, 마카도-조세프 질환/척수소뇌성 실조증 유형 3 및 올리브뇌교소뇌 변성, 질드라 투렛 질환, 연수 및 가연수 마비, 척수 및 척수연수 근육 위축 (케네디 질환), 원발성 측삭 경화증, 가족성 연축성 대마비, 베르드니히-호프만 질환, 쿠겔베르그-웰란더 질환, 테이-삭스 질환, 샌드호프 질환, 가족성 연축성 질환, 연축성 하반신마비, 진행성 다초점성 뇌백질병증, 가족성 자율신경기능장애 (릴리-데이 증후군), 및 프리온 질환 (크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob), 게르스트만 스트루슬러 사인커(Gerstmann-Strussler-Scheinker) 질환, 쿠루 및 치명적 가족성 불면증을 비제한적으로 포함) 다발신경병증 (예를 들어, 당뇨병성, 알콜-독성, 갈郎-바례-증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증), 프리온 질환, 중독, 정동 장애 (예를 들어, 우울증), 정신분열 장애, 만성 피로 증후군, 만성 통증 (예를 들어, 요통)이 비제한적으로 포함된다.
- [0128] 본 발명의 추가적 측면은 항노화 약제의 제조를 위한 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 백터, 숙주 세포 또는 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 EPO 변이체의 이러한 적용은 노화를 동반하는 대부분의 신체 기능의 진행성 황폐는 세포 사멸과 관련되어 있다는 사실에 기초하여, 따라서 이로운 세포 보호 작용만을 제공하는 본 발명의 EPO 변이체는 EPO의 연속적 투여와 일반적으로 관련되는 부작용(EPO의 적혈구생성 작용에 기여할 수 있음)을 겪지 않으면서 계속적으로 섭취할 수 있다고 생각되어진다.
- [0129] 놀랍게도 본 발명자들은 본 발명에 따른 핵산 및 단백질이 놀라운 항염증 성질을 가진다는 것을 발견하였다 (도면 및 실험 참조). 따라서, 이러한 EPO 변이체는 염증성 및 퇴행성 질환의 치료에 유용하다. 염증성 질환에는 다발 경화증, 바이러스 및 박테리아 감염 또는 패혈증과 같은 질환이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 퇴행성 질환에는 뇌졸중, 심근경색증과 같은 질환이 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0130] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산의 생체 내 발현의 모든 종류의 형태에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 치료제로서 사용되는 형질전환된 세포, 특히 줄기 세포에 관한 것이다. 이러한 세포는 본 발명에 따른 핵산으로 안정하게 형질전환될 수 있다. 핵산은 프로모터와 작동가능하게 연결된 카세트에 있을 수 있다. 프로모터는 특히 예컨대 염증 또는 변성을 나타내는 뇌 조직 또는 신경원성 조직과 같은 조직의 발현을 유도할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 각각의 개시내용은 WO 97/14307로부터 얻을 수 있다.
- [0131] EPO 폴리펩티드의 활성 (단위 unit, U)은 전통적으로 설치류 모델에서의 적혈구 생산 자극에 대한 이의 유효성을 기준으로 하여 (나아가 EPO의 국제적 표준에 의해 유도된 바와 같이) 정의된다. 통상의 EPO (MW 약 34,000)의 1 단위 (U)는 약 10 ng의 단백질이다 (1 mg 단백질은 약 100,000 U임). 하지만, 본 발명에 언급한 바와 같이, 에리트로포이에틴의 비조혈 형태의 사용이 관련되어 있으며, 이에 따라, 조혈 활성에 기초한 이러한 정의는 부적절하다. 따라서, 본원에 사용된 EPO 변이체의 활성 단위는 중성 또는 다른 에리트로포이에틴-반응성 세포성 시스템에서, 이와 동일한 시스템에서 천연 EPO에 의해 도출되는 활성과 동일한 활성을 도출하기 위해 요구되는 단백질의 양으로 정의된다. 당업자는 본원의 지침에 따라 비조혈 EPO의 단위를 쉽게 결정할 것이다.
- [0132] 추가적 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 백터, 숙주 세포, 폴리펩티드 및/또는 항체 및 1 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0133] 본 발명의 일 측면의 실시에 있어, 상기 기술된 제약 조성물은 충분한 수준의 에리트로포이에틴 변이체를 제공하는 임의의 경로를 통해 표유동물에 투여될 수 있다. 이는 전신적 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 이러한 투여는 비경구, 점막관통, 예를 들어, 경구, 코, 직장, 정맥내, 설하, 점막하, 또는 경피 투여일 수 있다. 바람직하게는, 이러한 투여에는 비경구, 예를 들어, 정맥내 또는 복강내 주사가 있으며, 또한 동맥내, 근육내, 피내 및 피하 투여를 비제한적으로 포함한다. 본 발명의 제약 조성물이 국소적으로 투여되는 경우, 이는 치료되는 기관 또는 조직 내로 직접 주사될 수 있다. 신경계의 치료의 경우의 투여 경로에는 뇌내, 심실내, 뇌실내,

경막내, 수조내, 척수내, 및/또는 척수주위 경로의 투여가 비제한적으로 포함되는데, 이는 두개내 및 척추내 바늘, 및 카테터를 펌프 장치와 함께 또는 없이 사용할 수 있다.

[0134] 바람직한 실시태양에서, 제약 조성물은 투여 단위 당 약 0.5 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 0.6 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 0.7 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 0.8 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 0.9 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 1 내지 5 mg의 EPO 변이체; 1.5 내지 5 mg의 EPO 변이체; 2 내지 5 mg의 EPO 변이체; 2.5 내지 5 mg의 EPO 변이체; 3.5 내지 5 mg의 EPO 변이체; 4 mg 내지 5 mg의 EPO 변이체; 또는 4.5 내지 5 mg의 EPO 변이체 범위 내의 비독성 유효량을 포함하는 EPO-반응성 세포, 조직 또는 기관의 보호 또는 향상에 적합한 투여 단위형의 EPO 변이체 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0135] 바람직한 실시태양에서, EPO 변이체 폴리펩티드는 100 ng/체중 kg 내지 약 50 µg/체중 kg, 바람직하게는 약 20 µg/체중 kg 내지 약 50 µg/체중 kg의 투여량으로 전신으로 투여될 수 있다. 이러한 혈청 농도는 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 시간에서 달성될 수 있다. 이러한 투여량은 필요한 경우 반복될 수 있다. 예를 들어, 투여는 임상적으로 필요한 한 매일, 또는 격일, 매 3일, 매 4일, 매 5일, 매 6일, 또는 매 7일에 투여될 수 있거나, 또는 적절한 간격 후, 예를 들어, 매 1 내지 12주, 바람직하게는 매 3 내지 8주에 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 유효량의 EPO 변이체 및 제약상 허용되는 담체는 단일 용량 바이알 또는 다른 용기에 포장될 수 있다. 각각의 치료되는 질환 또는 상태에 따라 EPO 변이체는 단일 용량으로, 소정의 기간 동안 또는 연속으로 투여될 수 있다. 급성 상태 또는 질환이 치료되는 경우, 예를 들어, 2일 내지 12개월, 바람직하게는 1주 내지 6개월, 더욱 바람직하게는 2주 내지 3개월 동안의 기간 동안 단일 용량의 EPO 변이체를 환자에게 제공하는 것이 충분할 수 있다. 만성 질환 또는 상태가 치료되거나 또는 EPO 변이체가 노화 관련 황폐의 예방 또는 감소에 사용되는 경우에는, EPO 변이체는 연속으로 투여될 수 있다. 본 발명의 EPO 변이체가 주어진 일정 시간 동안 또는 연속으로 투여되는 경우, 상기 나타낸 간격 및 바람직한 간격으로 투여되는 것이 바람직하다. 필요한 간격은 예를 들어 PEG에 의한 EPO의 변형에 부분적으로 의존할 것인, 각각의 EPO 변이체의 약동학 및 각각의 질환의 치료 또는 개선에 필요한 EPO 변이체의 혈청 농도에 부분적으로 의존할 것이다. EPO 변이체의 정확한 지속시간, 용량 및 유형의 결정은 예를 들어, 치료받는 환자의 상태, 및 상태의 중증도 등을 고려하여 실무자에 의해 행해질 것이다.

[0136] 투여의 다른 경로, 예컨대 관류액의 사용, 기관에의 주사, 또는 다른 국소 투여를 통해, 상기 기술한 EPO 변이체의 유사한 농도를 발생시키는 제약 조성물이 제공될 것이다. 약 10 pg/ml 내지 약 1000 ng/ml의 농도가 바람직하다.

[0137] 본 발명의 제약 조성물은 치료적 유효량의 화합물, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 세포 또는 벡터, 및 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 용어 "제약상 허용되는"은 연방 정부 또는 주 정부의 관리소에 의해 승인되었거나 또는 미국 약전 또는 동물, 더욱 특히 인간에의 사용을 위해 일반적으로 승인된 다른 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 아쥬반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 제약 담체는 광유, 동물, 식물 또는 합성 기원, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등의 것들을 포함하는 물 및 오일 등의 염수 용액과 같은 멸균 액체 일 수 있다. 염수 용액은 제약 조성물이 정맥내로 투여되는 경우에 바람직한 담체이다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한 특히 주사가능한 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 제약 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 벼, 밀, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화 나트륨, 견조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 혼탁액, 애벌전, 정제, 환제, 캡슐제, 분제, 서방형 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 결합제 및 담체 예컨대 트리글리세라이드와 함께 좌제로 제제화될 수 있다. 본 발명의 화합물은 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도되는 것들과 같은 유리 아미노 기로 형성된 것들, 및 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼슘, 수산화 제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것들과 같은 유리 카르복실 기로 형성된 것들을 포함한다. 적합한 제약 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기술되어 있다. 이러한 조성물은 환자에게 적합한 투여 형태를 제공하기 위해, 적합한 양의 담체와 함께 바람직하게는 정제된 형태의 치료적 유효량의 화합물을 포함할 것이다. 제제는 투여 모드에 적합하여야만 한다.

[0138] 경구 투여에 적합한 제약 조성물은 캡슐제 또는 정제; 분제 또는 과립; (수성 또는 비수성 액체 중) 용액, 시럽 또는 혼탁액; 식용 포움 또는 위프(whip); 또는 애벌전으로서 제공될 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐제

는 락토스, 전분 또는 이들의 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카르보네이트, 스테아르산 또는 이들의 염을 포함할 수 있다. 연질 젤라틴 캡슐제는 식물 오일, 왁스, 지방, 반고체, 또는 액체 폴리올 등을 포함할 수 있다. 용액 및 시럽은 물, 폴리올 및 당을 포함할 수 있다.

[0139] 경구 투여에 의도되는 활성제는 위장관에서 활성제의 붕괴 및/또는 흡수를 지연시키는 물질로 코팅되거나 또는 이와 혼합될 수 있다 (예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 사용될 수 있다). 활성제의 서방성은 많은 시간에 걸쳐 달성될 수 있으며, 필요하다면 활성제는 위에서 분해되는 것으로부터 보호될 수 있다. 경구 투여를 위한 제약 조성물은 특정 위장관 위치에서 특이적 pH 또는 효소적 상태에 의해 활성제의 방출을 촉진시킬도록 제제화될 수 있다.

[0140] 경피 투여에 적합한 제약 조성물은 연장된 시간 동안 수용주의 표피와 친밀한 접촉을 유지시키기 위해 의도된 분리 폐지로서 제공될 수 있다. 국소 투여에 적합한 제약 조성물은 연고제, 크림제, 혼탁액, 로션제, 분제, 용액, 페이스트, 젤, 스프레이, 에어로졸 또는 오일로서 제공될 수 있다. 피부, 입, 눈 또는 다른 외부 조직에의 국소 투여에 있어서, 국소 연고제 또는 크림제가 사용되는 것이 바람직하다. 연고제로 제제화되는 경우, 활성 성분은 파라핀 또는 물-혼화성 연고제 기재와 함께 사용될 수 있다. 별법으로, 활성 성분은 수중유 기재 또는 유중수 기재와 함께 크림제로 제제화될 수 있다. 눈에의 국소 투여에 적합한 제약 조성물은 눈 점액을 포함한다. 이러한 조성물에서, 활성 성분은 적합한 담체, 예를 들어 수성 용매에 용해되거나 또는 혼탁될 수 있다. 입에의 국소 투여에 적합한 제약 조성물은 로젠지제, 파스텔지 및 입세척제를 포함한다.

[0141] 코 투여에 적합한 제약 조성물은 고체 담체 예컨대 (바람직하게는 20 내지 500 μm 범위의 입도를 갖는) 분제를 포함할 수 있다. 분제는 흡입제가 취해지는 방식, 즉, 코에 가깝게 놓여진 분제의 용기로부터 코를 통한 빠른 흡입을 통해 투여될 수 있다. 별법으로, 코 투여에 적합한 조성물은 액체 담체, 예를 들어, 코 스프레이 또는 코 점액을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 활성 성분의 수용액 또는 오일 용액을 포함할 수 있다. 흡입을 통해 투여하기 위한 조성물은 소정의 투여량의 활성 성분을 제공하도록 구조화될 수 있는 가압 에어로졸, 분무기 또는 취입기를 비제한적으로 포함하는 특이적으로 채택된 장치로 공급될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 제약 조성물은 비강을 통해 폐로 투여된다.

[0142] 직장 투여에 적합한 제약 조성물은 좌제 또는 관장제로서 제공될 수 있다. 질 투여에 적합한 제약 조성물은 질 좌제, 탐폰, 크림제, 젤, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제제로서 제공될 수 있다.

[0143] 비경구 투여에 적합한 제약 조성물은, 조성물이 의도되는 수용주의 혈액에 충분히 등장성이 되도록 만드는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 용질을 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사가능한 용액 또는 혼탁액을 포함한다. 이러한 조성물에 존재할 수 있는 다른 성분에는 예를 들어 물, 알콜, 폴리올, 글리세린 및 식물유가 포함된다. 비경구 투여에 적합한 조성물은 단위-투여 또는 다중-투여 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알에 존재할 수 있으며, 단지 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어 멸균 염수 주사 용액의 첨가만이 요구되는 동결건조된 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 혼탁액은 멸균 분제, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다. 일 실시태양에서, EPO 변이체의 주사가능한 용액을 포함하는 자가주사기가 앰브런스, 응급실, 및 전쟁 상황에 의한 응급 사용을 위해 제공될 수 있으며, 심지어는 특히 예컨대 잔디 깍는 기계의 방심한 사용에 의한 외상적 절단의 가능성이 일어날 수 있는, 가정용 환경에서의 자가-투여를 위해서도 제공될 수 있다. 심지어는 의료인이 도착하기 전 또는 중증 발가락을 가진 고통을 받는 사람이 응급실 병상에 도착하기 전이라도 실행가능한 한 빨리 중증 부위의 여러 부위에 EPO 변이체를 투여함으로서 중증 발 또는 발가락에서의 세포 및 조직이 재부착 후 생존할 가능성을 증가시킬 수 있다.

[0144] 바람직한 실시태양에서, 조성물은 일반적인 과정에 따라 인간에게의 정맥내 투여를 위해 적합한 제약 조성물로서 제제화될 수 있다. 통상적으로, 정맥내 투여를 위한 조성물은 멸균 등장성 수성 완충액 중의 용액이다. 필요하다면, 조성물은 또한 주사 부위의 통증을 완화시키기 위한 리도카인과 같은 국소 마취제 및 가용화제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분들은 예를 들어 활성제의 양을 나타내는 완전 밀봉된 용기 예컨대 앰플 또는 사카테(sachette) 중의 예를 들어 동결건조된 건조 분말 또는 무수 농축물로서, 단위 투여형으로 별도로 또는 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입을 통해 투여되는 경우에, 멸균 제약 등급 물 또는 염수를 포함하는 주입병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사를 통해 투여되는 경우, 멸균 염수의 앰플이 투여 전에 성분들과 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0145] 좌제는 일반적으로 0.5 중량% 내지 10 중량% 범위의 활성 성분을 포함하고; 경구 제제는 바람직하게는 10% 내지 95%의 활성 성분을 포함한다.

- [0146] 관류액 조성물은 이식되는 기관 조에 사용하기 위해, 계내 관류를 위해, 또는 기관 수거 전에 기관 공여자의 맥 관계에 투여하기 위해 제공될 수 있다.
- [0147] 이러한 제약 조성물은 개인에 대한 급성 또는 만성, 국소 또는 전신 투여에 적합하지 않는, EPO 변이체 또는 EPO 변이체 형태의 농도를 포함할 것이지만, 이는 처리되는 기관 또는 조직을 일반적인 주기에 노출 또는 복귀 시키기 전에 시체, 기관 조, 기관 관류액, 또는 계내 관류액에서 본원에서 의도하는 기능을 수행하여 거기에 포함되는 EPO 변이체의 농도를 제거 또는 감소시킬 것이다.
- [0148] 본 발명은 또한 본 발명의 제약 조성물의 1 이상의 성분이 충전된 1 이상의 용기를 포함하는 제약 팩 또는 키트를 제공한다. 임의로 제약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 조절하는 정부 관리소에 의해 규정된 형태에 대한 지시서가 이러한 용기(들)과 관련되어 있을 수 있는데, 이러한 지시서에는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 관리소의 승인이 반영되어 있다.
- [0149] 또다른 실시태양에서, 예를 들어, EPO 변이체는 서방성 시스템으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 정맥내 주입, 삽입형 삼투 펌프, 경피 패치, 리포좀, 또는 다른 투여 모드를 사용하여 투여될 수 있다. 일 실시태양에서, 펌프가 사용될 수 있다 (문헌 [Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201]; [Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507]; [Saudek et al. (1989) N. Eng. J. Med. 321: 574] 참조). 또다른 실시태양에서, 화합물은 소포, 특히 리포좀으로 전달될 수 있다 (문헌 [Langer (1990) Science 249:1527-1533]; [Treat et al. (1989) in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, N. Y., 353-365]; WO 91/04014; U.S. 4,704,355 참조). 또다른 실시태양에서, 중합성 물질이 사용될 수 있다 (문헌 [Medical Applications of Controlled Release (1974) Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, FLA.]; [Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, (1984) Smolen and Ball (eds.), Wiley: N.Y.]; [Ranger and Peppas (1953) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61]; [Levy et al. (1985) Science 228:190]; [During et al. (1989) Ann. Neurol. 25: 351]; [Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71: 105] 참조).
- [0150] 또다른 실시태양에서, 서방성 시스템이 치료 표적물, 즉, 표적 세포, 조직 또는 기관에 근접하게 놓일 수 있으며, 이에 따라 단지 전신 용량의 일부만이 요구될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Goodson (1984) 115-138 in Medical Applications of Controlled Re-lease, vol. 2] 참조). 다른 서방성 시스템은 랑거(Langer)에 의한 리뷰에 검토되어 있다 (1990, Science 249: 1527-1533).
- [0151] 또다른 실시태양에서, 적절하게 제제화된 EPO 변이체는 코, 경구, 직장, 질, 또는 설하를 통해 투여될 수 있다.
- [0152] 특이적 실시태양에서, 본 발명의 제약 조성물을 치료가 필요한 영역 내로 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있는데; 이는 예를 들어, 주사, 카테터, 좌제 또는 임플란트 (막, 예컨대 실라스틱(silastic) 막, 또는 섬유를 포함하는 다공성, 비다공성, 또는 젤라틴성 물질임)를 통해, 수술 동안 국소 주입, 수술 후 국소 적용 (예를 들어, 상처 드레싱과 함께)에 의해 달성될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0153] 바람직한 유효 용량의 선택은 당업자에게 공지된 몇몇 인자를 고려하여 당업자에 의해 결정될 것이다. 이러한 인자에는 제약 조성물의 특정 형태, 예를 들어, 폴리펩티드 또는 벡터, 및 이의 약동학 파라미터 예컨대 생체이용률, 대사, 반감기 등을 포함하는데, 이러한 것들은 제약 화합물에 대한 관리 승인을 얻기 위해 통상적으로 이용되는 일반적인 개발 과정 동안에 확립될 것이다. 용량을 고려할 때의 또다른 인자는 치료되는 상태 또는 질환 또는 일반적 개인에게서 달성되는 이점, 환자의 체중, 투여가 급성 또는 만성인지에 따른 투여의 경로, 부수하는 약제, 및 투여되는 제약 제제의 유효성에 영향을 미치는 것으로 주지된 다른 인자를 포함한다. 따라서 정확한 투여량은 실무자의 판단 및 각각의 환자의 환경, 예를 들어, 개개의 환자의 상태 및 면역 상태에 따라, 표준 임상 기법에 의해 결정되어져야만 한다.
- [0154] 본 발명의 또다른 측면에서, 관류액 또는 관류 용액은 이식을 위한 기관의 저장 및 관류에 제공되는데, 상기 관류 용액은 EPO 변이체-반응성 세포 및 관련 세포, 조직 또는 기관을 보호하기에 유효한 양의 제약 조성물을 포함한다.
- [0155] 이식은 어떤 공여자로부터 기관 (세포, 조직, 또는 다른 신체 부위를 포함)을 수거하여 다른 수용자로 이식하는 이종 이식; 및 신체의 일부에서 얻은 기관을 다른 곳에 대체하는 자가이식 (기관을 제거하고 생체 외에서 절제하고, 복구하거나, 또는 예컨대 종양 제거를 위해 다르게 조작하고, 그 후 원래의 위치로 되돌리는 벤치 수술 과정을 포함)을 비제한적으로 포함한다. 일 실시태양에서, 관류 용액은 약 1 내지 약 25 U/ml 에리트로포이에틴, 5% 히드록시에틸 전분 (약 200,000 내지 약 300,000의 분자량을 가지며 에틸렌 글리콜, 에틸렌 클로로히드

린, 염화 나트륨 및 아세톤이 실질적으로 없음); 25 mM KH₂PO₄; 3 mM 글루타티온; 5 mM 아데노신; 10 mM 글루코스; 10 mM HEPES 완충액; 5 mM 마그네슘 글루코네이트; 1.5 mM CaCl₂. 105 mM 나트륨 글루코네이트; 200,000 유닛 페니실린; 40 유닛 인슐린; 16 mg 텍사메타손; 12 mg 페놀 레드를 포함하며, 7.4-7.5의 pH 및 약 320 mOSm/1의 삼투압을 갖는 위스콘신 대학 (UW) 용액 (U.S. 4,798,824)이다. 이러한 용액은 이식 전 시체의 신장 및 췌장을 유지시키기 위해 사용된다. 용액을 사용시, 시체의 신장 보존에 추천되는 30 시간 제약을 초과하여 보존을 연장시킬 수 있다. 이러한 특정 관류액은 유효량의 제약 조성물을 포함하는 본 사용을 위해 채택될 수 있는 많은 용액 중의 예시일 뿐이다. 추가적 실시태양에서, 관류액 용액은 약 5 내지 약 35 U/ml 에리트로포이에틴, 또는 약 10 내지 약 30 U/ml 에리트로포이에틴과 등가물을 포함한다.

[0156] 본원의 전체 목적을 위한 EPO 변이체의 바람직한 수용주는 인간이지만, 본원의 방법은 다른 포유동물, 특히 가정에서 기르는 동물, 가축, 컴패니언(companion) 및 동물원 동물에도 마찬가지로 적용된다. 하지만, 본 발명은 이로 제한되지 않으며, 임의의 포유동물에 적용되기에 이로울 수 있다.

[0157] 뇌졸증 발병의 위험성이 있는 것으로 알려진 사람의 경우, 본 발명의 제약 조성물의 예방적 투여가 가능하다. 이러한 경우에, 제약 조성물, 특히 EPO 변이체 폴리펩티드는 바람직하게는 상기 개괄된 바람직한 1일 용량 및 특히 바람직한 1일 용량으로 투여된다. 100 ng/체중 kg 내지 약 50 µg/체중 kg, 바람직하게는 약 20 µg/체중 kg 내지 약 50 µg/체중 kg이 바람직하다. 이러한 투여는 뇌졸증의 발병 위험성이 감소될 때까지 계속될 수 있다. 하지만 대부분의 경우에는, 뇌졸증이 진단된 경우에 제약 조성물이 투여될 것이다. 이러한 경우, 제약 조성물의 제1 용량은 뇌졸증의 제1 증상이 명백해진 후 24 시간 내, 바람직하게는 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 시간 내 또는 그보다 짧은 시간 내에 처음 투여된다. 그 후 투여는 바람직하게는 7일 이상, 더욱 바람직하게는 14일 이상, 더욱 바람직하게는 21일 이상 동안 계속된다. 상기 용량은 바람직하게는 하루에 한번, 바람직하게는 상기 나타낸 용량으로 투여된다.

실시예

뮤린 EPO cDNA의 합성

[0178] 트리졸 추출을 통해 야생형 C57BL/6 또는 SV129S6 마우스의 신장 또는 2개의 상이한 마우스 뇌 (뇌졸증 후 1 시간)로부터 RNA를 단리하였다. 클로로포름 및 이소프로판을 사용하여 RNA를 침전시키고, 마지막으로 DEPC-H₂O에 용해시켰다. 프로메가사(Promega)로부터의 RQ1 RNase-없는 DNase 프로토콜에 DNA를 다이제스트시켰다. 반응 혼합물에 200 µl 페놀/클로로포름/이소프로필 알콜 (25/24/1)을 첨가하여 반응을 중지시키고 10000 rpm 및 10°C에서 10 min 동안 원심분리하였다. 상등액을 200 µl 클로로포름/이소프로필 알콜 (24/1)과 혼합시키고 10000 rpm 및 10°C에서 10 min 동안 원심분리하였다. 20 µl 8 M 염화 리튬 및 550 µl 무수 에탄올을 상등액에 첨가하였다. 그 후 이 혼합물을 -70°C에서 1 h 동안 인큐베이션시키고, 이어서 11000 rpm 및 0°C에서 원심분리하여 30 min 동안 침전시켰다. 생성된 펠렛을 600 µl 75% 에탄올로 세척하고, 8000 rpm (4°C, 10 min)에서 원심분리하고, 실온에서 건조시켰다. RNA를 20 µl DEPC-H₂O에 용해시켰다.

[0179] 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 역전사효소 (MuLV, RNase H 마이너스, 프로메가사로부터 구입)를 3 µg RNA 및 3 µl 랜덤 핵사머 프라이머를 포함하는 DEPC-H₂O (10 µM)와 함께 15 µl 반응 부피 중의 제1 가닥 cDNA 합성에 사용하였다. 6 µl M-MuLV 반응 완충액 (5x), 2 µl dNTP (각각 2.5 mM), 1 µl RNase 억제제 (1U/µl), 1 µl M-MuLV 역전사효소 및 5 µl DEPC-H₂O를 사용하여 다음의 프로그램으로 운영되는 PCR 기계에서 역전사를 수행시켰다: 21°C에서 5 min; 37°C에서 1 h; 95°C에서 5 min.

[0180] 생성된 cDNA 풀(pool)을 사용하여 네스티드(Nested) PCR 접근을 통해 완전 EPO cDNA를 증폭시켰다. 제1 단계는 EPO 유전자 (genepo_센스 (서열 39) gaa ctt cca agg atg aag act tgc age 및 genepo_안티센스; (서열 40): gtg gca gca gca tgt cac ctg tc)의 코딩 영역 밖에 놓여있는 프라이머를 사용하였다. 제2 단계는 후속 클로닝에 대한 BamH1 절단 부위 (epo_센스 (서열 41 tat gga tec atg ggg gtg ccc gaa cgt ccc ac) 및 epo_안티센스 (서열 42 tat gga tcc tca cct gtc ccc tct cct gca gac)가 부착되어 있는, 개시 코돈에서 정지 코돈까지의 유전자를 증폭시키도록 고안된 프라이머를 사용하였다. 모든 프라이머는 MWG-바이오텍 아게(MWG-Biotech AG)로부터의 것이었다. 제1 PCR (95°C에서 3 min; 35 주기: 65°C에서 30 sec, 72°C에서 1 min, 95°C에서 30 sec; 72°C에서 10 min; 4°C 유지) 및 제2 PCR (95°C에서 3 min; 5 주기: 67°C에서 30 sec; 72°C에서 1 min, 95°C에서 30 sec; 15 주기: 70°C에서 30 sec, 72°C에서 1 min, 95°C에서 30 sec; 72°C에서 10 min; 4°C)의 2 단계로 허바이드(Hybaid) PCR 기계에서 네스티드 PCR을 수행하였다.

[0181] 양쪽 PCR 모두에서 제조자의 프로토콜에 따라 Pfu 터보 호트스타트(Pfu Turbo Hotstart) DNA 중합효소 (스트라타진사(Stratagene))를 사용하였다. 제1 단계의 PCR 생성물을 제2 단계를 위해 1:50으로 희석시켰다. 제2 cDNA 합성 프로토콜을 다음의 파라미터를 사용하여 액세스(Access) RT-PCR 시스템 (인비트로젠사)을 사용하여 수행하였다 : 48°C 5 min; 94°C 2 min; 40 주기: 94°C 30 sec, 65°C 1 min, 70°C 2 min; 70°C 7 min; 4°C. 제2 PCR을 상기 기술한 바와 같이 수행하였다.

[0182] 증폭된 전장 EPO cDNA 및 EPO 이성체를 1.2% TAE-아가로스 겔 상에서 분리시켰다. 다양한 PCR 생성물의 사진을 도 1a에 나타내었다. 그 후 위자드 SV-Ge1 클린업 시스템 (Wizard SV-Ge1 Cleanup System) (프로메가사) 또는 겔 추출 키트 (Gel Extraction Kit) (독일 헬덴에 위치한 큐아겐사(Qiagen))를 사용하여 단편을 정제시켰다. Pfu 중합효소는 블런트 말단(blunt end) 생성물을 발생시키기 때문에, 화학적 감응성 Top10 원 샷 셀 (One Shot Cell)을 사용하는 pCR-블런트 II-TOPO 벡터에서 cDNA를 서브클로닝시켰다 (양쪽 모두 인비트로젠파로부터 입수함).

[0183] 큐아겐 QIA 프렙 키트(Qiagen QIA prep Kit)를 사용하여 단일 콜로니의 플라스미드-DNA를 단리시켰다. 터르모 시퀴나제(Thermo Sequenase)™ 프라이머 사이클 시퀀싱 키트(Primer Cycle Sequencing Kit) (아미샴 바이오사이언스(Amersham Biosciences))를 사용하여 ALF익스프레스(ALFexpress)™ DNA 시퀀서(Sequencer) (파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech)) 상에 삽입물을 시퀀싱시켰다. 프라이머 M13FWDCY (서열 43: gtc gtg act ggg aaa ace ctg gcg) 및 M13REVCY (서열 44 agc gga taa caa ttt cac aca gga)를 Cy5로 표지하였다. 시퀀싱의 파라미터는 다음과 같다: t=900 min; T=55°C; 800V; 55 mA 및 30 W. 서열 분석을 통해 엑손 4가 결여된 EPO의 신규한 변이체 및 3개의 내부 결실 변이체의 존재를 밝혔다. 뉴클레오티드 서열을 도 2a 및 도 2b에 도시하고 코딩된 웨티드 서열을 도 4에 도시하였다. EPO 변이체 mS의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 13 및 서열 14에 상응하였다. EPO 변이체 mG3의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 15 및 서열 16에 상응하였다. EPO 변이체 mG5의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 17 및 서열 18에 상응하였다. EPO 변이체 m301의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 19 및 서열 20에 상응하였다. EPO 변이체 mK3의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 21 및 서열 22에 상응하였다.

인간 EPO cDNA의 합성

[0184] 인간 성인 신장 (남성) 및 치명적 뇌 (남성) 폴리 A+ RNA를 스트라타진사로부터 구입하였다. 상기 기술된 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 역전사효소 (MuLV, RNase H 마이너스)에 따라 250 ng 신장 RNA 또는 200 ng 뇌 RNA로부터 cDNA를 발생시켰다. 생성된 cDNA 풀을 사용하여 다음의 프라이머와 함께 Pfu 중합효소 (스트라타진사)를 사용하여 완전 EPO cDNA를 증폭시켰다: Hepo_센스 (서열 45): gat ggg ggt gca cga atg tcc tgc 및 Hepo_안티센스 (서열 46): cac acc tgg tca tct gtc ccc tgt c.

[0185] 인비트로젠파로부터의 PCR 기계에서 PCR을 수행하였다 (95°C에서 3 min; 35 주기: 67°C에서 30 sec, 72°C에서 1 min, 95°C에서 30 sec; 72°C에서 10 min). 치명적 뇌 cDNA의 경우에, 20 주기의 PCR 생성물에서 제2 증폭 단계를 수행하는, 네스티드 PCR 접근법을 사용하였다. 증폭된 PCR 생성물을 1.2% TAE-아가로스 겔 상에서 분리시키고 (도 1b), 겔 추출 키트 (독일 헬덴에 위치한 큐아겐사)를 사용하여 정제시켰다. 화학적 감응성 Top10 원 샷 셀을 사용하는 pCR-블런트 II-TOPO 벡터에서 정제된 cDNA를 서브클로닝시켰다 (양쪽 모두 인비트로젠파로부터 입수함). QIA 프렙 키트(독일 헬덴에 위치한 큐아겐사)를 사용하여 단일 콜로니의 플라스미드-DNA를 단리시켰다. 터르모 시퀴나제™ 프라이머 사이클 시퀀싱 키트 (아미샴 바이오사이언스)를 사용하여 ALF익스프레스™ DNA 시퀀서 (파마시아 바이오테크) 상에 삽입물을 시퀀싱시켰다. 프라이머 M13FWDCY (서열 43) 및 M13REVCY (서열 44)를 Cy5로 표지하였다. 시퀀싱의 파라미터는 다음과 같다: t=900 min; T=55°C; 800V; 55 mA 및 30 W. 서열 분석을 통해 각각 엑손 3 및 엑손 4의 처음 반이 결여된 인간 EPO의 2개의 신규한 변이체, 및 마우스에서 검출된 바와 같은 반복된 트리머 또는 헥사머의 규칙에 따르는 많은 변이체의 존재를 밝혔다. 뉴클레오티드 서열을 도 3a 및 도 3b에 도시하고 코딩된 웨티드 서열을 도 4에 도시하였다. EPO 변이체 hS3의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 1 및 서열 2에 상응하였다. EPO 변이체 h1-4의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 3 및 서열 4에 상응하였다. EPO 변이체 h1-5의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 5 및 서열 6에 상응하였다. EPO 변이체 hS4의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 7 및 서열 8에 상응하였다. EPO 변이체 h1-1의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 9 및 서열 10에 상응하였다. EPO 변이체 h1-2의 뉴클레오티드 및 웨티드 서열은 각각 서열 11 및 서열 12에 상응하였다.

[0187] HEK 세포에서의 His-태그된 단백질의 발현

클로닝을 위한 BamHI 및 EcoRI 제한 부위를 정지 코돈 없이 오버행(overhang) 센스 프라이머 및 오버행 안티센스 프라이머를 사용하여 마우스 및 인간 EPO 변이체에 첨가하였다 (마우스 변이체에 대하여: epo_센스 (서열 41) 및 epoeco_안티센스 (서열 47): aaa gaa ttc cct gtc ccc tct cct gca gac ctc; 인간 변이체에 대하여; hepobam_se (서열 48): tat gga tcc atg ggg gtg cac gaa tgt cc, hepoco_as [서열 49]: aga gaa ttc tct gtc ccc tgt cct gca g). BamHI 및 EcoRI 제한 부위를 사용하여 pcDNA-3.1-HIS/V5 A (인비트로젠사)에서 PCR 생성물을 클로닝시켰다. XL-1 블루 컴피턴트 셀(Blue Competent Cell) (recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)] (스트라타진사)에서 플라스미드를 증폭시켰다. XL-1 블루 컴피턴트 셀 형질전환 프로토콜을 β-메르캅토에탄올 없이 60 초의 연장된 가열 펄스를 사용하여 수행하였다. QIA프렙 스픈 미니프렙 키트(QIAprep Spin Miniprep Kit) (독일 헬덴에 위치한 큐아젠사)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 포유동물 세포로의 형질감염을 위해, 엔도프리 플라스미드 맥시 키트 (EndoFree Plasmid Maxi Kit) (독일 헬덴에 위치한 큐아젠사)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 조직 배양 플라스크 (25 cm²) 중의 둘베코의 개질된 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; 베를린에 위치한 바이오크롬사(Biochrom), 1 g/l 글루코스, 3.7 g/l NaHCO₃; 10% 소태아 혈청 GOLD, 1% 페니실린/스트렙트아비딘 및 1% L-글루타민으로 보충됨)에서 37°C 및 5% CO₂에서 18일 동안 HEK 293 세포 (BD 바이오사이언스사(BD biosciences))를 성장시켰다. 80-90% 전면생장에 도달한 후 매 2-3일에 세포를 분할시켰다. DIV18에서 항생제가 없는 둘베코의 개질된 이글 배지를 포함하는 12 웰 플레이트에 웰 당 120,000 세포를 플레이팅시켰다. 50% 전면생장까지 세포를 약 48 시간 동안 성장시켰다. HEK 세포에 대해 제공된 프로토콜을 채택하여 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (인비트로젠사)을 사용하여 형질감염을 수행하였다.

[0189] 형질감염 10분 전에 HEK-세포의 플레이팅 배지를 항생제가 없는 무혈청 DMEM으로 대체하였다. DNA-리포펙타민 복합체를 사용하여 세포를 37°C에서 5 시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 배지를 항생제가 없는 새로운 혈청-포함 DMEM으로 교환하였다. DIV2에서 세포를 분할시키고 항생제가 포함된 둘베코의 개질된 이글 배지에 플레이팅시켰다.

[0190] His-태그된 EPO 변이체의 발현 및 정제

[0191] His-태그된 단백질을 HEK-세포에서 일시적으로 발현시켰다. pcDNA-3.1-HIS/V5 A - 구조물로의 형질감염 후 2-6 일에 HEK293 세포로부터의 배지를 수거하였다. 세포 파편을 3500 rpm, 4°C에서 15 min 동안 펠렛화시켰다. his-tag 단백질의 정제를 위해 BD TALON™ 금속 친화성 수지(Metal Affinity Resin) (BD 바이오사이언스사)를 사용하였다. 모든 단계 (평형화, 세척, 및 용출)을 pH 7.1에서 수행하였다. 제공된 프로토콜을 4°C의 연장된 밤새 결합 단계로 변형시켰다. 용출물을 500 μl-분획물로 모았다. 뮤린 EPO ELISA-키트 (R&D) 또는 산타-크루즈로부터의 항-rhEPO 항체를 사용하는 웨스턴 블롯을 통해 분획물을 분석하였다. 제조자 프로토콜에 따라 아미瞪 바이오사이언스사로부터의 HiTrap™ 텔염 컬럼 (5 ml)을 사용하여 단백질-포함 분획물로부터 이미다졸을 제거하였다. 여기에는 완충액의 PBS로의 교환이 포함되었다.

[0192] 웨스턴 블롯

[0193] 표준-프로토콜을 사용하여 110 V에서 운행되는 16% SDS-GeI를 제조하였다. 니트로셀룰로스-막 상에서 45분 동안 200 mA에서 블롯팅하였다. 0.1% Tween-20 중의 5% 비-지방 건조 우유 분말을 포함하는 차단 완충액에서 1 시간 이상 동안 블롯을 차단시켰다. 제1 항체 (EPO (H-162) sc-7956 토키 폴리클로날 IgG, 산타 크루즈사, 1:500)를 사용하여 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 제2 항체 (염소 항-토끼 HRP; 1:1000)를 실온에서 2 시간 동안 첨가하였다. 루미놀을 사용하여 블롯을 드러내고; 2 시간 동안 빛에 노출시켰다. 막을 폰세아우 레드 (Ponceau Red)로 염색시켰다. EPO 특이적 항체는 모든 EPO 변이체를 검출할 수 있었다.

[0194] 에리트로이드 콜로니 형성 분석

[0195] 수컷 C57BL/6 마우스 (8-11주)의 경골 및 대퇴골로부터 골수 세포를 수거하고 α-배지 (10% 소태아 혈청 GOLD, 1% 페니실리움/스트렙토아비딘 및 1% L-글루타민으로 보충됨)에 재현탁시켰다. 8 부의 메토 컬트(Metho Cult) SF 3236 메틸 셀룰로스 (스템셀 테크놀로지 잉크(StemCell Technologie Inc)), 1 부의 세포 및 2 부의 EPO 유도체 (뮤린 EPO의 경우에 150 U/l)를 포함하는 HEK-세포 사전조정 배지와 혼합된 α-배지를 포함하는 35 mm² 페트리 접시 (225.000 세포/접시)에 세포를 시딩시켰다. 양성 대조군으로서 150 U/l의 rhEPO (로쉐사(Roche))를 사용하였다. 5% CO₂를 포함하는 습윤화된 대기 중에서 플레이트를 48 시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 평가 시 혈모글로빈화된 6 이상의 세포를 포함하는 붉은빛 콜로니만을 고려하였다.

[0196] EPO 변이체의 조혈 가능성

[0197] 메토 컬트 SF 3236은 단지 적절한 시토카인의 첨가 후에만 콜로니의 형성을 촉발시켰다 (CFU-M, CFU-G 또는 CFU-E). 에리트로포이에틴의 첨가 후, 2일 후, CFU-B (콜로니 형성 단위 - 적혈구모세포)의 형성을 관찰할 수 있다. 작은 불균일한 붉은빛 콜로니는 3일째 사라졌다.

[0198] 이러한 분석에서, 변이체의 조혈 가능성을 시험하고 EPO 뿐 아니라 rhEPO의 야생형과 비교하였다. 비교를 위해 다음의 조건을 준비하였다: 음성 대조군으로서 pZ/EG로 형질감염된 HEK 세포로부터의 배지, 양성 대조군으로서 pZ/EG 세포 + 150 U/l rhEPO (로쉐사)로 형질감염된 HEK 세포로부터의 배지, 및 pZ/EG-EPO-IRES (150 U/l 뮤린 EPO), pZ/EG-스플라이스-IRES (변이체 S; mS) 또는 pZ/EG-G3-IRES (변이체 G3; mG3)로 형질감염된 HEK 세포로부터의 배지. DIV2에서, 단지 혈모글로빈화된 6 이상의 세포를 포함하는 붉은빛 콜로니만을 계수하였다. 이러한 독립 실험의 결과를 도 5에 도시하였다.

[0199] 뮤린 EPO와 rhEPO를 비교시, 뮤린 EPO 변이체 (mS 및 mG3-변이체)는 조혈 가능성이 없었다.

[0200] 원발성 신경원성 배양물

[0201] 위스타(Wistar) 래트의 E16에서부터 초기 E19 배아에서 래트 원발성 신경원성 배양물을 수득하였다 (독일 베를린에 위치한 Bundesinstitut fuer gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinaermedizin). 튜뷸린 α-1 프로모터의 제어 하에 Cre-재조합효소를 발현하는 이형접합성 트랜스제닉 마우스의 E16 배아로부터 Cre-발현 마우스 뉴런을 수득하였다 ([Dr. U. Schweitzer; Experimental Endocrinology, Charite]에 의해 제공됨). 문헌 [Brewer (1995) J Neurosci Res. 42: 674-83]로부터의 변형된 프로토콜에 따라 뮤린 및 래트 배양물을 제조하였다. 수막을 제거하고 PBS에서 2회 세정한 후 뇌 피질을 단리하였다 (독일 베를린에 위치한 바이오크롬사). 트립신/EDTA (PBS 중 0.05/0.02% w/v) 중의 37°C에서 15 min 인큐베이션 후, N-Med (10% 소태아 혈청이 포함된 갑코사(Gibco)의 개질된 이글 배지, 바이오크롬사로부터의 100 U 페니실린 + 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 100 IE 인슐린/1, 10 mM HEPES 및 44 mM 글루코스)에서 조직을 2회 세정시키고, 파스테르(Pasteur) 피펫을 사용하여 작은 부피의 N-Med에 조심스럽게 용해시켰다. 210 g에서 2 분 원심분리시킴으로써 세포를 실온에서 웰렛화시키고 NBM 스타터(starter) 배지 (2% B27 보충물이 포함된 갑코사로부터의 뉴로베이살(Neurobasal) 배지, 1% Pen/Strep, 0.5 mM L-글루타민 및 25 μM 글루타메이트)에 재현탁시켰다.

[0202] 배양 플레이트의 제조

[0203] 24-웰 플레이트 및 6-웰 플레이트를 바이오크롬사로부터의 폴리-L-리신 (PBS 중 2.5 μg/ml)을 사용하여 4°C에서 밤새 인큐베이션을 통해 사전처리하였다. PBS로 웰을 세정한 후, 코팅 배지 (PAA로부터의 5% FCS Gold를 포함하는 개질된 이글 배지, 1% Pen/Strep, 10mM HEPES 및 바이오크롬사로부터의 0.03 w/v 콜라겐 G)를 사용하여 37°C에서 1 h 인큐베이션시키고, 그 후 웰을 조심스럽게 PBS로 2회 세정하였다. 플레이팅 배지의 부피 및 유형을 실험 과정에 따라 선택하였다.

[0204] 래트 원발성 피질 뉴런에서의 산소 글루코스 손실 - 뇌 혈액의 세포 배양 모델

[0205] OGD에 있어, 배양 배지를 PBS로 한번 세정하여 세척하였다. 500 μl의 탈산소화 아글리세믹 용액 (BSS₀-O₂;

143.8 mM Na⁺, 5.5 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺, 0.8 mM Mg²⁺, 125.3 mM Cl⁻, 26.2 mM HCO₃⁻ 및 0.8 mM SO₄²⁻, pH 7.4)을 사용하여, 5% CO₂, 85% N₂ 및 10% H₂를 포함하는 기체 혼합물로 플러싱된, 제공된, 습윤화 기밀 인큐베이터 (컨셉트(Concept) 400, 미국 브리드젠플에 위치한 루스킨 테크놀로지스(Ruskin Technologies))에 의해 발생되는 저산소증 대기 중에서 OGD를 유도하였다. OGD-시간은 배양물의 밀도 및 세대에 의존하였고 2 h 30 min 내지 2 h 40 min으로 다양하였다. 대조 실험에 있어, 웰을 500 μl의 산소화된 글리세믹 BSS₀ 용액 (BSS₀+O₂; 143.8 mM Na⁺, 5.5 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺, 0.8 mM Mg²⁺, 125.3 mM Cl⁻, 26.2 mM HCO₃⁻, 0.8 mM SO₄²⁻, 및 20 mM 글루코스, pH 7.4)으로 처리하고, 5% CO₂를 포함하는 정상산소 대기 하에서 37°C에서 인큐베이션시켰다. OGD 후 즉시, 처리된 세포 및 대조군의 BSS 용액을 40% 제어된 NBM + 60% 새로운 NBM을 포함하는 500 μl의 배지로 교환하였다. 24 h 후, 세포 사멸의 지표로서 상등액 중의 락테이트 디히드로게나제 (LDH) 활성을 측정하였다.

[0206] LDH 측정을 위해, 25 μl의 배지를 96 웰 플레이트 (그라이너사(Greiner)) 중의 100 μl 새로운 β-NADH 용액 (1 x LDH-완충액 중 0.15 mg/ml; 시그마(Sigma), 환원형)과 혼합시켰다. 25 μl의 22.7 mM 피루베이트 (시그마)를 첨가한 후 즉시, 리더(Reader) (터르모 랙시스템 (Thermo Labsystems; MRX^{TC} 레벨레이션(MRX^{TC} Revelation))내에 플레이트를 두었다. 파라미터를 다음과 같이 선택하였다: 필터: 340 nm, 진탕 시간: 5 sec, 간격: 30 sec, 계수: 10. LDH-농도를 LDH-기준에 비례해서 계산하였다 (그라이너사, 시스템 구경측정기).

[0207] 형질감염된 HEK293 세포 발현 EPO 변이체로부터의 조정된 배지에 의한 신경보호 유도

[0208] 다음의 실험에서, rhEPO (재조합 인간 EPO, 독일 다이젠휴펜에 위치한 시그마 알드리치사(Sigma Aldrich))를 양성 대조군으로서 사용하였다. 신경보호 분석을 도 6에 도식적으로 나타내었다. 24-웰 플레이트에 최종 부피 600 μl NBM 스타터 배지 중의 300,000 세포의 밀도로 뉴런을 플레이팅하였다. 4일 후, 200 μl의 배지를 250 μl 새로운 NBM (글루타메이트가 없는 NBM 스타터와 동일함)로 대체하였다.

[0209] rhEPO, 야생형 mEPO, 야생형 hEPO 또는 EPO 변이체로의 사전처리를 위해, 최종 부피 200 μl의 배지를 제거하고, 각각 등물량 (200 U/1 rhEpo에 상응함)의 EPO 또는 EPO 변이체를 포함하는 200 μl 새로운 NBM+B27로 충전시켰다. HEK293 세포로부터의 조정된 배지 중의 다양한 EPO 변이체 (뿐 아니라 mEPO 및 hEPO)의 등가 농도를 웨스턴 블로트 및 EPO-ELISA를 통해 측정하였다. 그 후 뉴런을 정상 산소, 습윤화 상태 하에서 37°C에서 48 h 동안 성장시킨 후, 산소 글루코스 손실 (OGD)를 수행하였다 (나타낸바와 같은 OGD 간격). OGD 후 24 h에 LDH 방출의 측정을 통해 세포 사멸을 평가하였다. 모크(mock)-처리된 뉴런 (골격 플라스미드로 형질감염된 HEK293으로부터의 배지; =ko; 100%)와 비교하여, LDH 방출의 감소를 통해 신경보호를 정량적으로 측정하였다. 모든 실험에서, 본 발명자들은 wt EPO와 비교시 EPO 변이체에 의해 제공된 신경보호 작용이 훨씬 뛰어남을 발견하였다 (뮤린 EPO 및 이들의 변이체에 대해 도 7 패널 A 및 B 참조 및 인간 EPO 및 이들의 변이체에 대해 도 8 패널 A 및 B 참조).

[0210] 뮤린 EPO 변이체에 의해 유도된 신경보호는 EPO (rhEPO 뿐 아니라 야생형 마우스 EPO)에 의해 유도된 것 보다 훨씬 뛰어나다. 예를 들어, EPO에 의해 매개된 신경보호는 명백하게 정의된 OGD 길이의 윈도우 (명백하게 정의된 손상 수준에 상응함)에서만 단지 관찰될 수 있다. 낮은 농도에서, hS3 및 hS4에 의한 신경보호는 wt hEPO의 신경보호와 동일하거나 또는 더욱 우수하다. 전반적으로, 변이체에 의해 유도된 신경보호는 rhEPO에 의해 유도된 것보다 강하였다. 또한, 변이체는 EPO 변이체와 동일한 과정에 의해 생산된 mEPO 및 hEPO 모두의 야생형보다 큰 신경보호 가능성을 가졌다.

[0211] H9c2 - 혀혈 모델

[0212] 래트 BDIX 심장 근육모세포 세포주 (유럽의 세포 배양 콜렉션(European Collection of Cell Cultures)으로부터 수득함)를 2mM L-글루타민, 10% 불활성화 소태아 혈청 및 1 % 페니실린-스트렙트아비딘으로 보충된 4.5g/1 글루코스를 포함하는 DMEM (바이오크롬사) 중에서 배양시켰다. 미혼탁(subconfluent) 배양물 (70%)을 1:4로 하위배양(subculture)시켰다. 세포를 120pM hEPO 또는 hS3을 포함하는 400 μl 배지에 각각 24-웰 플레이트 중 웰 당 15,000 세포 밀도로 플레이팅시키고 48 시간 동안 배양시켰다. 2 mM L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙트아비딘으로 보충된 4.5g/1 글루코스를 포함하는 400 μl 혈청-결핍 DMEM 중에서 세포를 배양하고 이를 5% CO₂, 85%

N_2 및 10% H_2 를 포함하는 가스 혼합물로 포화된 무산소 작업실에서 (컨셉트 400, 미국 브리드젠피드에 위치한 루스킨 테크놀로지스)에 둠으로써 저산소증을 달성하였다. 대조군 세포를 정상산소 인큐베이터 중 혈청-결핍 DMEM 중에 두었다. 실험의 마지막에 배지를 400 μl 새로운 혈청-결핍 DMEM으로 대체하고, 24 h 후 표준 프로토콜에 따라 LDH를 측정하였다.

[0213] 면역침전

[0214] 음식 및 물에 자유롭게 접근하는 수컷 129S6 마우스 또는 수컷 C57BI6 마우스 (8-10주, 베를린의 Bundesinstituts fuer Risikobewertung)를 실험에 사용하였다. 60 mg/kg 투여량의 CoCl₂를 피하로 주사하고 18 시간 후 동물을 사멸시켰다. 혈청에서의 단백질 발현을 측정하고, 상업적으로 입수가능한 ELISA로 신장 및 뇌 단백질을 추출하였다 (R&D, mEPO).

[0215] 면역침전을 위한 항체를 R&D (항-mEPO 항체, 염소, 비오틴-표지됨) 및 산타-크루즈사 (항-rhEPO, 토끼)로부터 구입하였다. 표준 프로토콜에 따라 면역침전을 수행하고 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0216] 실온에서 10 μg 다르브포이에틴A로 2 시간 인큐베이션시켜 웨스턴 블롯 검출 항체의 차단을 달성한 후 블롯을 인큐베이션시켰다.

[0217] 알파-나선-돌연변이체의 생성 (도 10)

[0218] 표준 프로토콜을 사용하는 PCR 기재 접근법에 의해 모든 인간 알파-나선-돌연변이체를 발생시켰다.

[0219] 돌연변이체 A (hAmA) 및 돌연변이체 E (hAmE)는 위치 41에서의 아미노산 교환 (아르기닌)이 있는 알파-나선의 변이체이다. cDNA 서열의 AGG를 돌연변이체 A에 있어서는 GCG (알라닌)로, 또는 돌연변이체 E에 있어서는 GAG (글루타메이트)로 변경시켰다. -20aa 및 -10aa는 각각 c-말단에서 20 아미노산 또는 10 아미노산이 결여된 알파-나선의 결실 변이체이다. 모든 돌연변이는 V5 및 His-tag 없이 발생되었으며, HEK 293 세포에서 발현되었다. 신경보호 실험을 상이한 변이체를 발현시키는 형질감염된 HEK 세포의 배지를 사용하여 상기 기술한 바와 같이 수행하였다.

[0220] H9c2 세포의 허혈 모델에서의 hEPO 및 hs3 변형된 세포보호 (도 11)

[0221] H9c2 심장 근육모세포에서의 혈청 손실 및 저산소증으로 이루어지는 허혈 모델에서의 정제된 hEPO 및 hs3에 대한 EPO 변이체의 세포보호 가능성을 예시적으로 나타내었다 (도 1). 아폽토시스성 세포 사멸의 마커로서 LDH 방출을 평가하였다. 본 발명자들은 두 변이체 모두에서 상당한 세포보호능을 발견하였다 (hEPO 및 hs3에 대해 약 20% 및 25%).

[0222] 면역침전을 통해 CoCl₂-처리된 마우스의 신장 단백질 추출물에서의 EPO 스플라이싱 이소형을 밝혔다 (도 12)

[0223] PCR-기재 접근법을 통해 인간 및 뮤린 조직에서의 EPO 스플라이싱 이소형의 발견을 보강하기 위해, 본 발명자들은 2개의 이소형을 인식하도록 시험된 항체를 사용하여 CoCl₂ 처리된 마우스의 뮤린 혈청, 뇌 및 신장 단백질 추출물 상에서 면역침전을 수행하였다. CoCl₂의 피하 주사는 몇몇 마우스 조직, 즉, 혈액, 뇌, 간 및 신장에서의 에리트로포이에틴 농도를 증가시키는 것으로 공지되어 있다.

[0224] 본 발명자들은 CoCl₂ 처리된 마우스의 혈청, 뇌 및 신장 단백질 추출물로부터 에리트로포이에틴 (약 40kDa)을 침전시킬 수 있었고 (도 2); 미처리된 마우스의 신장 단백질 추출물로부터의 에리트로포이에틴의 침전은 낮은 발현 수준으로 인해 실패하였다. 또한, 본 발명자들은 CoCl₂ 처리된 마우스의 신장 단백질 추출물에서의 두번째 소량의 단백질 (약 30kDa)의 존재를 증명할 수 있었다. 이러한 단백질은 다르브포이에틴A와의 항체-항원 상호작용의 완전 차단을 통해 보여지는 바와 같이 항-rhEPO 항체에 의해 특이적으로 인식되었다. 이러한 발견은 뮤린 에리트로포이에틴 스플라이싱 이소형의 존재를 강하게 뒷받침한다. 이러한 결과는 제2 마우스 종, 즉 C57BI6에서 재현되었다.

[0225] 에리트로포이에틴 알파-나선의 상이한 이소형에 의해 변형된 신경보호 (도 13)

[0226] 지금까지 확인된 에리트로포이에틴 변이체의 신경보호 가능성의 분석을 통해, 본 발명자들은 알파 나선이 에리트로포이에틴의 신경보호 특성에 있어 기능적 중요 도메인임을 제시하였다. 이러한 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 HEK 293 세포에서 인간 에리트로포이에틴, 즉 알파-나선 도메인의 짧아진 형태를 발현시키고, 우리의 OGD-모델에서 이러한 웨티드를 시험하였다. 본 발명자들은 도 13에서 보여지는 바와 같이 이러한 웨티드의 30pM 및 15pM로의 보호 가능성은 hEPO 30pM과 균등함을 발견하였다.

[0227] 인간 에리트로포이에틴의 알파 나선 도메인에의 기능적 중요 잔기를 확인하기 위해, 본 발명자들은 아미노산 변경 (hAmA 및 hAmE) 또는 완전 도메인 결실 (hA-10 및 hA-20)을 포함하는 상이한 에리트로포이에틴 돌연변이체를 발생시켰다.

[0228] 위치 41에서의 중성 또는 산성 아미노산 변경 중 어느 것도 우리의 OGD 모델에서의 알파-나선의 신경보호 가능성을 파괴시킬 수 없었다 (도 14).

[0229] 몇몇 인간 EPO-이소형에 의해 변형된 신경보호 (n=6) P<0.05; ANOVA1 대 대조군 (도 14)

[0230] 알파-나선의 c-말단에 10 또는 20 아미노산이 결여된 결실 변이체를 HEK293 세포에서 발현시키고 OGD-모델에서 시험하였다. 결실 변이체 hA-10은 hS3 스플라이스 이소형에 상당하는 신경보호 성질을 여전히 가지고 있었다. 20 아미노산 (hA-20)의 결실은 더이상 보호성이 없는 웨티드를 유발하였다 (도 15).

[0231] 인간 에리트로포이에틴 변이체의 면역조정 (도 16)

[0232] 인간 EPO 변이체 hS3 및 hS4는 강한 면역조정 작용을 나타내었다. 엔도톡신 리포풀리사카라이드 (LPS)로 자극된 인간 마크로파지에서, hS3 및 hS4는 항-염증성 시토카인 IL-10을 유발하고 프로-염증성 시토카인 IL-6 및 IL-8의 발현을 감소시켰다. EPO (hWT)와 비교시, hS3 및 hS4의 항-염증성 작용은 더더욱 두드러졌다. 이러한 EPO 변이체의 항-염증 성질은 염증성 (예를 들어, 다발 경화증, 바이러스 및 박테리아 감염, 폐혈증) 및 퇴행성 질환 (예를 들어, 뇌졸증, 심근경색증)의 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0158] 도 1: EPO PCR 생성물의 비교를 나타낸다: 패널 A는 1.2% 아가로스 젤 상에 포화된, 상이한 뮤린 EPO 변이체를 포함하는 순수 플라스미드 또는 마우스 뇌 및 신장으로부터의 cDNA로 수행된 다양한 PCR 반응의 DNA 생성물을 나타낸다. 왼쪽 레인에서부터 오른쪽 레인으로, 1 kb 문자량 마커, 순수 mK3, 순수 mG3, 순수 mG5, 순수 m301, 순수 mS, 순수 mWT, 뇌 cDNA, 신장 cDNA의 생성물을 포함한다. 패널 B는 인간 뇌로부터의 cDNA로 수행된 PCR의 DNA 생성물을 나타낸다. 왼쪽 레인에서부터 오른쪽 레인으로, 1 kb 문자량 표준 및 인간 뇌 cDNA의 PCR 생성물을 포함한다.

[0159] 도 2: 뮤린 뇌 cDNA 및 "야생형" 뮤린 EPO에서 확인되는 EPO 변이체의 뉴클레오티드 서열, 즉 상기 기술된 EPO의 서열의 정렬을 나타낸다.

[0160] 도 3: 인간 뇌 cDNA 및 "야생형" 인간 EPO에서 확인되는 EPO 변이체의 뉴클레오티드 서열의 정렬을 나타낸다.

[0161] 도 4: 각각의 "야생형" EPO를 갖는 마우스 및 인간에서 확인되는 EPO 변이체의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다.

[0162] 도 5: 뮤린 및 인간 EPO 및 본 발명의 EPO 변이체의 조혈 활성을 나타낸다. 패널 A는 뮤린 EPO 및 EPO 변이체의 콜로니 형성 분석의 결과를 나타내고, 패널 B는 인간 EPO 및 EPO 변이체에 대한 콜로니 형성 분석의 결과를 나타낸다.

[0163] 도 6: rhEPO 및 EPO-이성체를 사용하는 신경보호 분석을 위한 실험 셋업(setup)을 나타낸다.

[0164] 도 7: 패널 A는 1 h 40 min 및 1 h 50 min에서의 산소 글루코스 손실 (OGD) 길이를 사용하는 실험을 보여준다. 양쪽 시간 지점 모두에서 신경보호자에 대한 40-50%의 보호 래트는 관찰되었으나, mEPO 및 rhEPO에 의한 보호는 관찰되지 않았다. 패널 B는 2개의 상이한 시간 지점을 사용하는 실험을 보여준다 (2개의 실험 간의 OGD 길이는 뉴런의 밀도에 따라 다양하다). 2 h 45 min에서는, 신경보호자 (60-70%)와 비교하여 wtEPO에 의한 약한 보호

(20-30%)만이 달성되었다. rhEPO의 완전 보호능은 단지 보다 큰 손상 수준 (3 h 15min)에서만 관찰되었다.

[0165] 도 8: 패널 A는 100 U/1 hEPO와 동가의 단백질 농도를 사용하여 2 h 00 min, 2 h 15 min 및 2 h 20 min OGD 길이를 사용하는 실험을 보여준다. 모든 3개의 시간 지점에서, 인간에 대한 40-50%의 보호 랙트는 관찰되었으나, mEPO 및 rhEPO에 의한 보호는 관찰되지 않았다. 패널 B는 2개의 상이한 시간 지점을 사용하는 실험을 보여준다 (2개의 실험 간의 OGD 길이는 뉴런의 밀도에 따라 다양하다). 2 h 45 min에서는, 신경보호자 (60-70%)와 비교하여 wtEPO에 의한 약한 보호 (20-30%)만이 달성되었다. EPO의 완전 보호능은 단지 보다 큰 손상 수준 (3 h 15min)에서만 관찰되었다.

[0166] 도 9: 패널 A는 각각 pcDNA3.1 - V5/His-hEPO, pcDNA3.1-V5/His-hS3 또는 pcDNA3.1-V5/His-hS4로 형질감염된 HEK293-세포의 배지로부터의 웨스턴 블롯(Western Blot)을 보여준다. 이러한 배지는 도 8에 나타낸 실험에 사용되었다. 마우스-EPO-ELISA (R&D)에 의해 정량화된 hEPO의 농도는 2U/ml였다. rhEPO (=2.5 ng이 젤에 로딩됨), hEPO (=0.4 ng이 젤에 로딩됨), hS3 및 hS4: 각각 20 μ l 배지 (형질감염 후 2일에 모음). 마커 = 5 μ l 벤치마크(BenchMark)TM His-태그된 단백질 표준물 (인비트로겐사(Invitrogen)). 패널 B는 His-Tag-정제된 마우스 야생형 EPO (mEPO), 인간 hS3 및 hS4 EPO 변이체의 웨스턴 블롯을 보여준다. mEPO는 EPO-마우스-ELISA에 의해 정량화되었다. 130 pg mEPO를 젤에 로딩시켰다. (원발성 항체: 토끼 항-rhEPO-안티코르퍼(Antikoerrper); 산타-크루즈(Santa-Cruz)).

[0167] 도 10: 재조합적으로 제조되고 (알파-나선 변이체) 및 생체 내에서 확인된 EPO 변이체의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 여기서의 서열 50은 인간 알파 나선 야생형 서열이고; 서열 51은 hAmA (첨 돌연변이 알라닌)이고; 서열 52는 hAmE (첨 돌연변이 글루탐산)이고; 서열 53은 hA-10 (결실 돌연변이체)이고, 서열 54는 hA-20 (결실 돌연변이체)이다.

[0168] 도 11: H9c2 심장 근육모세포에서의 혈청 손실 및 저산소증으로 이루어지는 혀혈 모델에서의 hEPO 및 hs3 변형된 세포보호(cytoprotection)를 나타낸다. 정상산소 또는 저산소증 상태에서의 혈청-고갈 DMEM-배지에서 24시간 동안 H9c2 세포를 인큐베이션시켰다. 24시간 후 LDH 분석을 통해 아폽토시스를 평가하였다. 정상산소 및 저산소증 상태에서의 미처리된 세포의 엘타 LDH 방출을 100%로 설정하여 데이터를 표준화하였다. A: 표준화 LDH 방출의 평균값을 나타내는 컬럼 도식을 나타낸다. B: 중앙값 (박스를 가로지르는 선), 25% (하부 힌지(hinge)), 75% (상부 힌지), 최대값 및 최소값을 나타내는 박스 플롯 도식으로서 데이터를 나타낸다. 실험수 n=7. P*<0,001 (ANOVA1).

[0169] 도 12: R&D로부터의 항-mEPO 항체 (염소, 비오틴-표지됨)를 사용한 EPO 변이체의 면역침전을 나타낸다; A: CoCl2-처리된 마우스 (129S6)의 심장 단백질 추출물에서의 제2 EPO 이소형 (30kDa)의 검출을 나타낸다. B: 다르브포이에틴A(DarboiotinA)에 의한 항체-항원 상호작용의 차단을 나타낸다.

[0170] 도 13: 에리트로포이에틴 알파-나선에 의해 변형된 신경보호 (hA; n=4). hA 100/U1: 30pM; hA 50 U/1: 15pM; hEPO: 30pM=100 U/1; P*<0,05; ANOVA1 대 대조군을 나타낸다.

[0171] 도 14: 몇몇 인간 EPO-이소형에 의해 변형된 신경보호 (n=6) P*<0,05; ANOVA1 대 대조군을 나타낸다.

[0172] 도 15: 에리트로포이에틴 알파-나선 결실 변이체에 의해 변형된 신경보호 (n=6) P*<0,05; ANOVA1 대 대조군을 나타낸다. A: 표준화 LDH 방출의 평균값을 보여주는 컬럼 도식을 나타낸다. B: 표준화 LDH 방출의 중앙값 및 백분율값 (25%, 75%)을 보여주는 박스 플롯을 나타낸다.

[0173] 도 16: 인간 마크로파지에 의한 LPS-유도된 시토카인 생성물 상에서의 인간 EPO 변이체 및 전장 인간 EPO의 작용을 나타낸다. 정제된 인간 단핵구를 6일 동안 rhu M-CSF (50 ng/ml)의 존재 하에 마크로파지 내에서 분화시켰다. 마크로파지 (1x10⁶/ml)를 3시간 동안 hS4, hS3 또는 hEPO (각각 300 mU/ml)로 사전인큐베이션시킨 후 4시간 동안 10 ng/ml 엔도톡신 (E.coli 0127:B8로부터의 LPS)으로 자극하였다. 상등액 중의 시토카인 농도를 ELISA로 결정하였다 (시토메트릭 비드 어레이(Cytometric Beads Array), 독일 하이델베르크에 위치한 벡톤 디킨슨사(Becton Dickinson)). 평균±SD로 데이터를 나타내었다. ** 결과는 대조군 (PBS)과 달랐다 (p<0.01; 만-휘트니(Mann-Whitney) U 시험; n=3-9/군).

[0174] 도 17: EPO 결실 변이체의 핵산 서열의 정렬을 나타낸다.

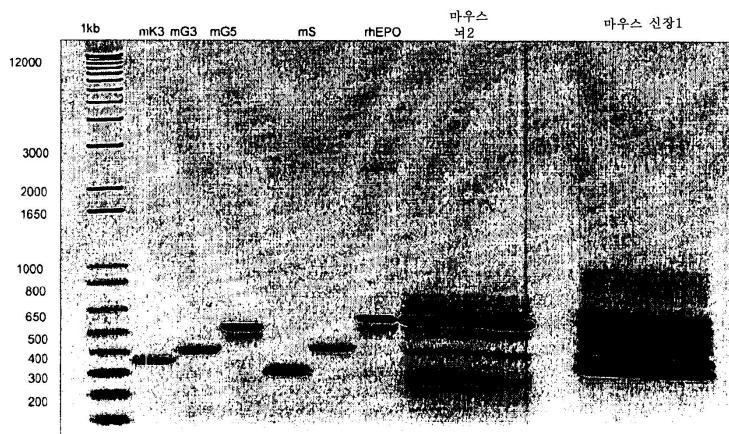
[0175] 도 18: 재조합적으로 제조된 결실 변이체 및 돌연변이체 뿐 아니라 야생형 나선 A (hWT-EPO 나선 A)의 DNA 서열을 나타낸다. 여기에서 서열 55는 hA (야생형 나선 A)이고, 서열 56은 hAmA (알라닌을 갖는 결실 돌연변이체)이고, 서열 57은 hAmE (글루탐산을 갖는 결실 돌연변이체)이고, 서열 58은 hA-10 (결실 돌연변이체 나선 A 마이-

너스 10 aa)이고, 서열 59는 hA-20 (결실 돌연변이체 나선 A 마이너스 20 aa)이다.

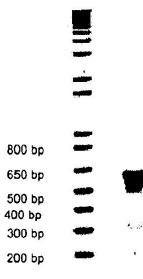
[0176] 도 19: 리더 수송 서열이 결실된 바람직한 실시태양을 나타낸다. A는 서열 60으로서의 리더가 없는 hA DNA 서열을 보여준다. 이는 성숙 방출된 단백질이다. 이는 또한 리더-서열 (서열 63)을 보여준다. B는 서열 61로서의 리더가 없는 hA 아미노산 서열 및 서열 62로서의 리더 서열의 아미노산 서열을 보여준다.

도면1

도면1

A**B**

1KB EPO PCR (인간 신장)



도면2a

| | | |
|----------|---|-----|
| mEpo | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| mS | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| mG3 | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| mG5 | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| m301 | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| mK3 | atgggggtgcccgaacgtcccacccctgctgetttaactctccttgctactgattc | 55 |
| mEpo | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| mS | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| mG3 | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| mG5 | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| m301 | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| mK3 | ctctgggcctcccaagtcctctgtgtccccacgcctcatctgcgacagtgcgagt | 110 |
| mEpo | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| mS | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| mG3 | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| mG5 | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| m301 | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| mK3 | tctggagaggtaacatcttagaggccaaggaggcagaaaatgtcacgtgggttgt | 165 |
| mEpo | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| mS | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| mG3 | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| mG5 | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| m301 | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| mK3 | gcagaaggcccacactgagtgaaaatattacagtcccagataccaaagt <u>caact</u> | 220 |
| mEpo | <u>tctatgcttggaaaaaatggaggtgaaacaacaggccatagaagtttggcaagg</u> | 275 |
| mS | <u>tctatgcttggaaaaaatggaggtgaaacaacaggccatagaagtttggcaagg</u> ----- | 243 |
| mG3 | <u>tctatgcttggaaaaaatggaggtgaaacaacaggccatagaagtttggcaagg</u> | 275 |
| mG5 | <u>tctatgcttggaaaaaatggaggtgaaacaacaggccatagaagtttggcaagg</u> | 275 |
| m301 | <u>tc-----</u> ----- | 222 |
| mK3 | <u>tctatgcttggaaaaaatggaggtgaaacaacaggccatagaagtttggcaagg</u> | 275 |
| mEpo | cctgtccctgcttcagaagccatctgcaggcccaggccctgctagccattcc | 330 |
| mS | ----- | - |
| mG3 | cctgtccctgcttcagaagccatctgcaggcccaggccctgctagccaa----- | 326 |
| mG5 | cctgtccctgcttcagaagccatctgcaggcccaggccctgctagccattcc | 330 |
| m301 | ----- | - |
| mK3 | cctgtccctgcttcagaagc----- | 296 |
| mEpo | tcccagccaccagagacccttcagttcatatagacaaagccatcagtggctac | 385 |
| mS | ----- | - |
| mG3 | ----- | - |
| mG5 | tcccagccaccagagacccttcagttcatatagacaaagccatcagtggctac | 385 |
| m301 | ----- | - |
| mK3 | :-----: | - |

도면2b

| | | |
|------|---|-----|
| mEpo | gtagcctcaactcactgcttcgggtactgggagctcagaaggaaattgtatgtcgcc | 440 |
| mS | -----aaggaaattgtatgtcgcc | 260 |
| mG3 | ----- | - |
| mG5 | gtagcctcaactcactgcttcgggtactgggagctcagaaggaaattgtatgtcgcc | 440 |
| m301 | ----- | - |
| mK3 | ----- | - |
| | | |
| mEpo | tccagataccaccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc | 495 |
| mS | tccagataccaccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc | 315 |
| mG3 | ----- | - |
| mG5 | tccagataccaccccacctgctccactccgaacactcacagtggatactttctgc | 495 |
| m301 | ----- | - |
| mK3 | ----- | - |
| | | |
| mEpo | aagcttccgggtctacgccaacttccctccggggaaactgaagctgtacacgg | 550 |
| mS | aagcttccgggtctacgccaacttccctccggggaaactgaagctgtacacgg | 370 |
| mG3 | -----cttcctccggggaaactgaagctgtacacgg | 358 |
| mG5 | a----- | 496 |
| m301 | -----ctccggggaaactgaagctgtacacgg | 250 |
| mK3 | -----tgtacacgg | 305 |
| | | |
| mEpo | gagaggctgcaggagaggggacagggtga | 579 |
| mS | gagaggctgcaggagaggggacagggtga | 399 |
| mG3 | gagaggctgcaggagaggggacagggtga | 387 |
| mG5 | -----ggagaggggacagggtga | 513 |
| m301 | gagaggctgcaggagaggggacagggtga | 279 |
| mK3 | gagaggctgcaggagaggggacagggtacatgtctgctgccaccgtggacccg | 360 |
| | | |
| mEpo | ----- | |
| mK3 | acgaacttgcgtccccgtactgtgtcatgccaacccctccaccactccaaacccctc | 415 |
| | | |
| mEpo | ----- | |
| mK3 | atcaaacgggtcattaccttaccagtctgtcccatggacactccagcaccag | 470 |
| | | |
| mEpo | ----- | |
| mK3 | cagtgacatcctcggggccagaagaacttcccagagctccattctgaaatctaaa | 525 |
| | | |
| mEpo | ----- | |
| mK3 | gatgtcgctggacaagcccgaggccccagagaagaagagcctcagaatcagctcg | 580 |
| | | |
| mEpo | ----- | |
| mK3 | gatttgttttag | 591 |

도면3a

```

hWT atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
hs3 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
h1-4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
h1-5 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
hs4 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
h1-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtgtcgccctctggccctccaggc
h2-1 atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtgtcgccctctggccctccaggc

hWT ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
hs3 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
h1-4 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
h1-5 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
hs4 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
h1-1 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag
h2-1 ctggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagggtagccatcttggaggccaaggaggcccag

hWT aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
hs3 aatatcacg-----atccatctgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
h1-4 aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
h1-5 aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
hs4 aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
h1-1 aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc
h2-1 aatatcacgacgggtgtgaaactcgacgttgaaatactgtcccaacccaaagttaatttc

hWT tatgcctgaaagggatggagggtcgccgacggccgtagaagtctggcagggctggccctgtgtcgaaagct
hs3 -----gtcgccgcaggccgtcgccgtagaagtctggcagggctggccctgtgtcgaaagct
h1-4 tatgcctgaaagggatggagggtcgccgtcgccgt-----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc
h1-5 tatgcctgaaagggatggagggtcgccgtcgccgt-----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc
hs4 tatgcctgaaagggatggagggtcgccgtcgccgt-----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc
h1-1 -----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc
h2-1 -----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc

hWT gtccctgccccccaggccctgttgtcaactcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
hs3 gtccctgccccccaggccctgttgtcaactcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
h1-4 -----ctgttgtcaactcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
h1-5 -----ctgttgtcaactcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
hs4 -----ccctgtccatcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
h1-1 -----gccccctgttgtcaactcttccagccgtggagggccctgcagctgtggataaaagcc
h2-1 -----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc

418
hWT gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
hs3 gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
h1-4 gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
h1-5 gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
hs4 gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
h1-1 gtcagtggcccttcgcacccatctgttccggctctggagggcccaaggaaaggccatctccctccagat
h2-1 -----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc

hWT gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
hs3 gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
h1-4 gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
h1-5 gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
hs4 gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
h1-1 gccccctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgcaaaactttcccgagttactccaaatttc
h2-1 -----atccatctgtcccaacccaaagttaatttc

```

도면3b

```

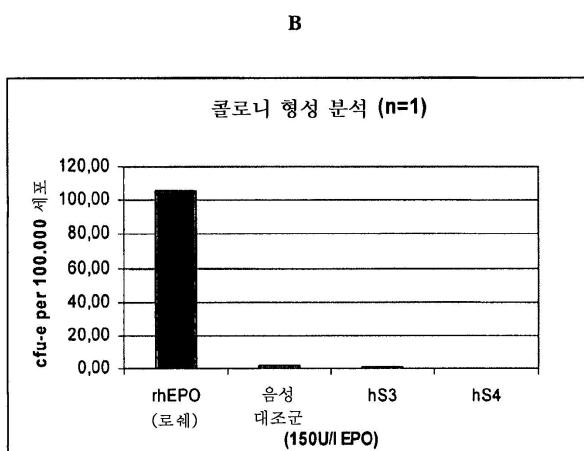
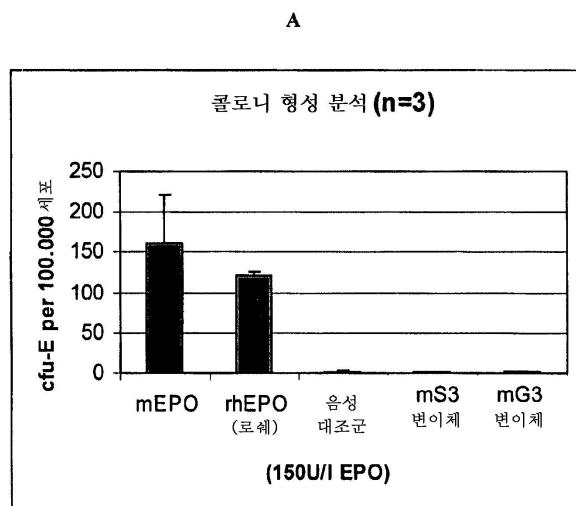
hWT ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
hs3 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
h1-4 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
h1-5 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
hs4 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
h1-1 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga
h2-1 ctcggggaaagctgaagctgtacacagggaggccgtcaggacagggacagatga

```

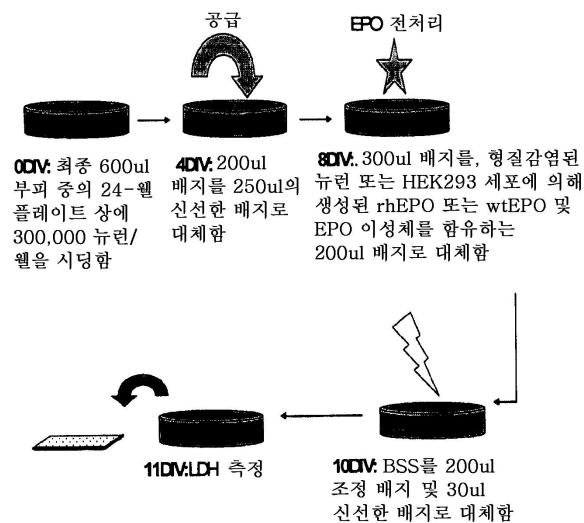
도면4

| 나선 점화도 | 나선 A | 나선 B |
|--|------|--------|
| x xx | x | # B' x |
| hWT MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQAVEMOGALISEAVRGQLVN hS3 MGPHCPCPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN h1-4 MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN h1-5 MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN hS4 MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN h1-1 MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN h2-1 MGVIICPAWLMILSLSLSPIGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEHCSLNENITWDTEKNEFAKNEREVOQO-----AVLN mWT MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN mS MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN mG3 MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN mG5 MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN m301 MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN mK3 MGPERP-TLILSLSLPLGEVIGAPRULCDSRVLERYLLEAKEAENTTGGAEGRLENITWDTEKNEFAKNEREVOQAEVWQGLSLSLSEALIQLQALAN | | |
| 나선 점화도 | 나선 C | 나선 D |
| x x x | x xx | x xx |
| hWT SGPWEPQLHDKAVGSLRSLTTLRIGAQKEATSPDADASAPRLTTADTEKLERVSYNFTRKLKLYTGACRIGDRSTOP hS3 SGPWEPQLHDKAVGSLRSLTTLRIGAQKEALSPDADASAPRLTTADTEKLERVSYNFTRKLKLYTGACRIGDRSTOP h1-4 SDPWEPEQLHDKAVGSLRSLTTLRIGAQKEALSPDADASAPRLTTADTEKLERVSYNFTRKLKLYTGACRIGDRSTOP h1-5 SDPWEPEQLHDKAVGSLRSLTTLRIGAQKEALSPDADASAPRLTTADTEKLERVSYNFTRKLKLYTGACRIGDRSTOP hS4 -- PWEPEQLHDKAVGSLRSLTTLRIGAQKEALSPDADASAPRLTTADTEKLERVSYNFTRKLKLYTGACRIGDRSTOP h1-1 ----- h2-1 ----- mWT SGPPEPQLHDKAISGRSLSTLRLGQKEIMSPDTTPAPERLTUDTEKLERVYANFLGOKLYTGACRIGDRSTOP mS ----- KEIMSPDTTPAPERLTUDTEKLERVYANFLGOKLYTGACRIGDRSTOP mG3 ----- FLGOKLYTGACRIGDRSTOP mG5 SGPPEPQLHDKAISGRSLSTLRLGQKEIMSPDTTPAPERLTUDTEKLERVYANFLGOKLYTGACRIGDRSTOP m301 ----- FLGOKLYTGACRIGDRSTOP mK3 QVICCCHRGGPTINLRUTVSQSTTINHOTGHYLTLSHHSISSDILGARTSOISIKSKOVAGQARGBEEFONQDF | | |

도면5

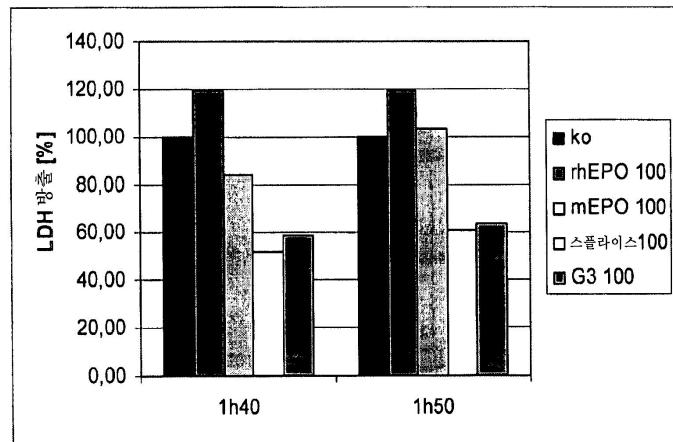


도면6

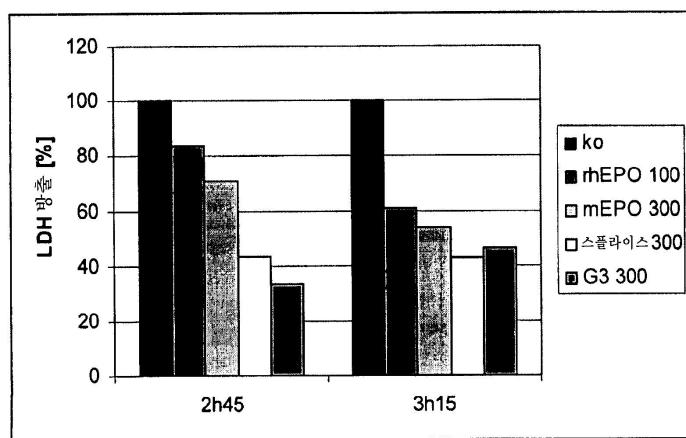


도면7

A

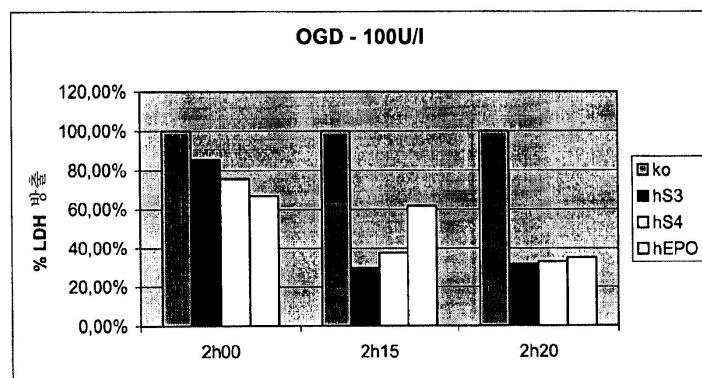


B

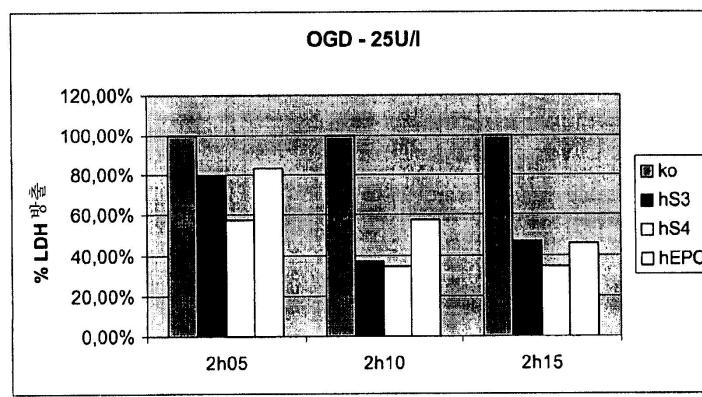


도면8

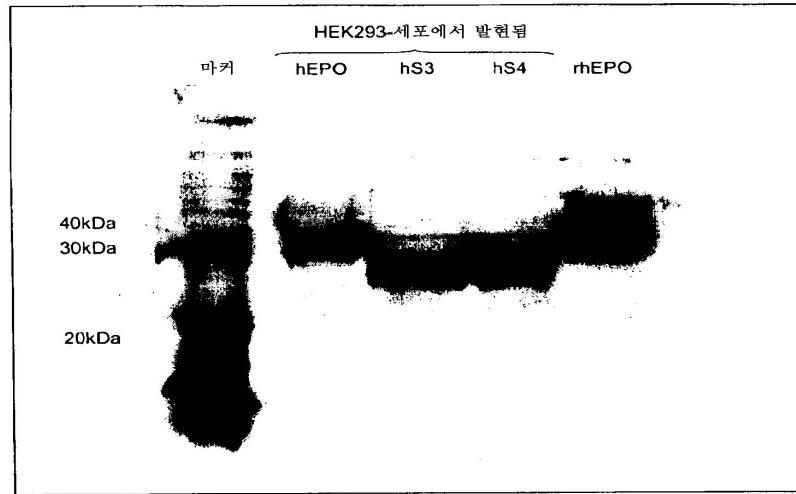
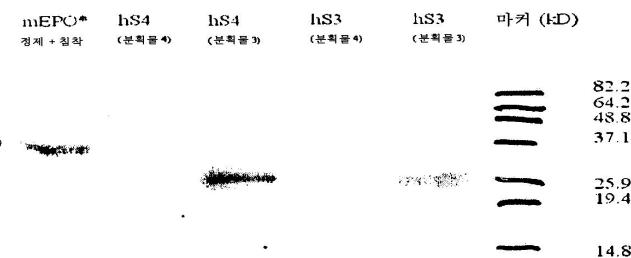
A



B

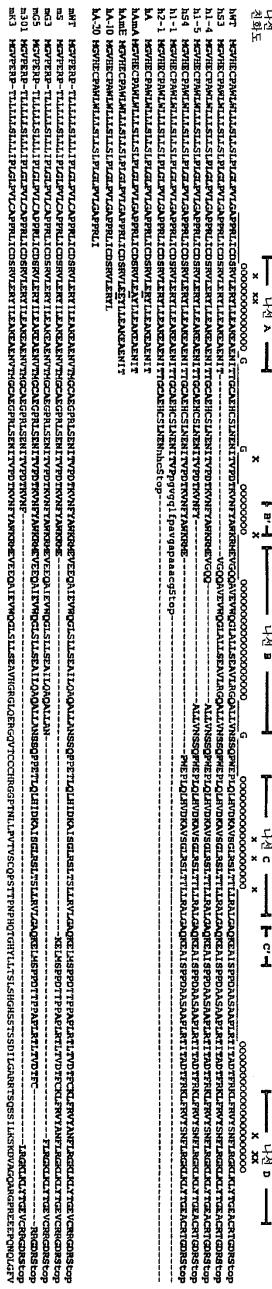


도면9

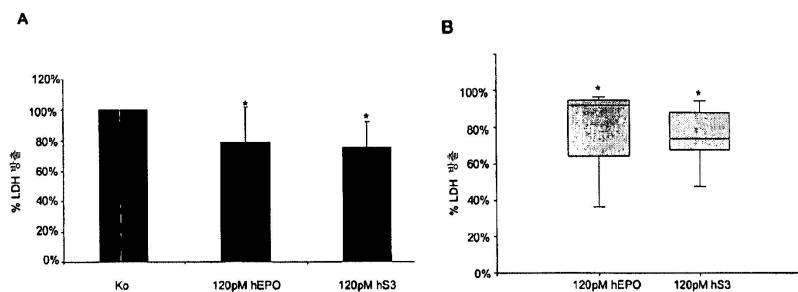
A**B**

[φ△]

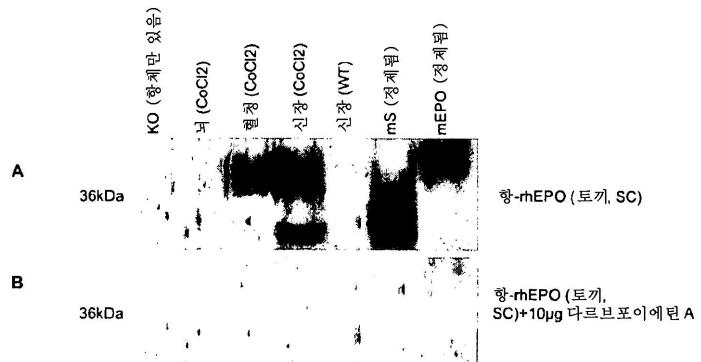
도면10



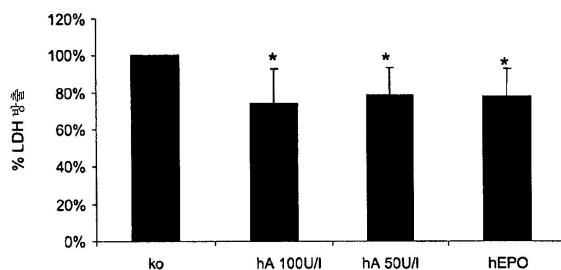
도면11



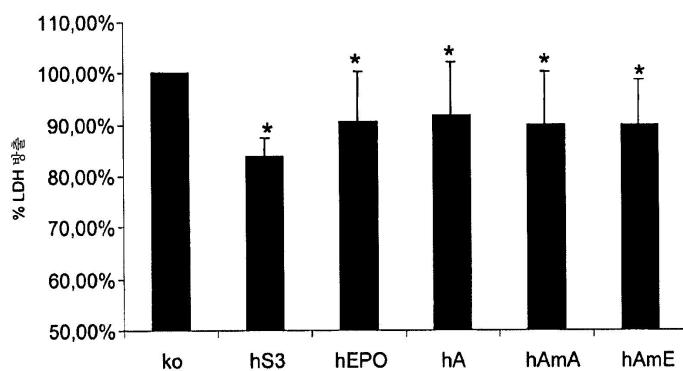
도면12



도면13

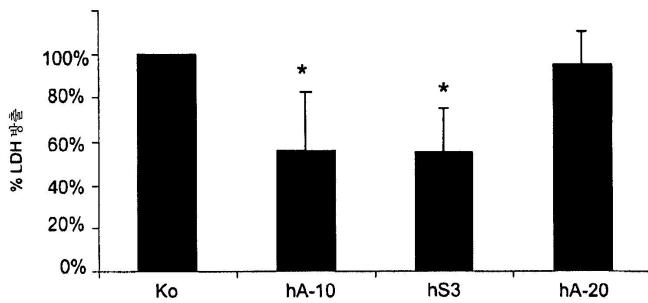


도면14

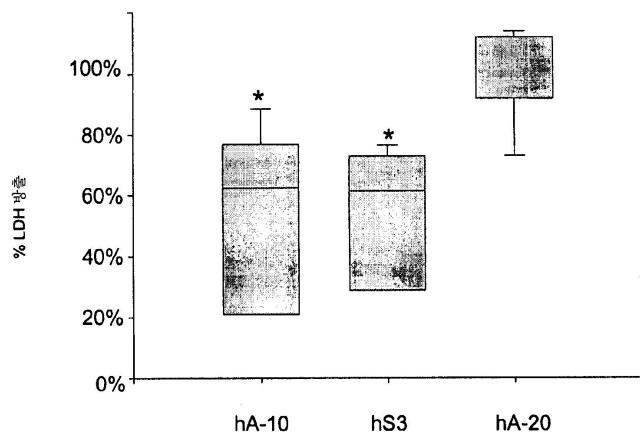


도면15

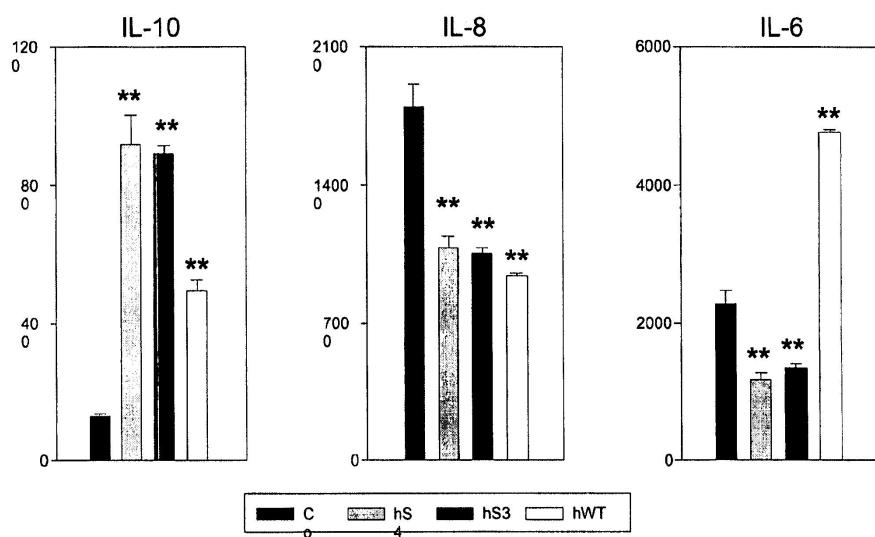
A



B



도면16



도면17

```

atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc
Atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc
Atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc
Atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc
Atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc
Atgggggtgacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcctcccagtc

ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag
ctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaacctttggaggccaaggaggccgag

aatatcacgacgggctgtgtaactcgacgttgaaatatactactgtcccagacaccaaagttaatttc
aatatcacg-----
aatatcacg-----
aatatcacg-----
-----

tatgccttggaaagaggatggagggtcgccagcggccgtagaagtctggcagggctggccctgtgtcgaaagct
-----
-----
-----
-----
-----

gtccttgcggggccaggccctgttgtcaactttccagccgtggagccctgcagctgcatgtggataaagcc
-----
-----
-----
-----
-----

gtcagtggcccttcgcagcctcaccactctgttccggctctgcgagccagaaggaagccatctccctccagat
-----
-----
-----
-----
-----

gtccggcctcagctgtccactccgaacaatcactgtgacactttccgaaactttccgagtctactccaaatttc
-----
-----
-----
-----
-----

ctccggggaaagctgaagctgtacacacaggggaggcctgcaggacagggagatga
-----
-----
-----
-----
-----

hWT
hA
hAmA
hAmE
hA-10
hA-20

```

도면18

hA (hWT-EPO 나선 A) - 서열 55

```
atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctct
gggcctcccaagtccctggggccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg
```

hAmA (돌연변이체 알라닌 hWT-EPO 나선 A) 서열 56

```
atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctct
gggcctcccaagtccctggggccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggcgt
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg
```

hAmE (돌연변이체 글루탐산 hWT-EPO 나선 A) 서열 57

```
atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctct
gggcctcccaagtccctggggccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggaggaggt
acctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacg
```

hA-10 (hWT-EPO 나선 A 마이너스 10aa) 서열 58

```
atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctct
gggcctcccaagtccctggggccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
acctc
```

hA-20 (hWT-EPO 나선 A 마이너스 20aa) 서열 59

```
atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctct
gggcctcccaagtccctggggccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggt
```

도면19

A - 리더가 없는 hA DNA:

(리더 수송 서열이 없는 hWT-EPO 나선 A)-서열 60-(성숙 방출된 단백질)

5'-
gccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctggaggccaaggaggccgagaatatcacg...-3'

리더-서열(서열 63):

5'-atgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggtttcctgtccctgtgtcgctccctctgggcctcccaagtccctggc-3'

B - 리더가 없는 hA 아미노산 :

(리더 수송 서열이 없는 hWT-EPO 나선 A)-서열 61(성숙 방출된 단백질):

APPRLICDSRVLERYL

리더-서열 (서열62): MGVHECPAWLWLSSLLPLGLPVLG

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Charite - Universitatsmedizin Berlin

<120> Erythropoietin Splice Variants

<130> U60011PCT

<160> 63

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgccctcatct gtgacagccg agtccctggag 120

aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacgg tcggcagca ggccgttagaa 180

gtctggcagg gcctggccct gctgtcgaa gctgtcctgc gggccaggc cctgttggtc 240

aactcttccc agccgtggga gccctgcag ctgcattgtgg ataaagccgt cagtggcctt 300

cgcagcctca ccactctgct tcgggctctg cgagccaga aggaagccat ctccctcca 360

gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca atcactgctg acactttccg caaacttttc 420

cgagtttactt ccaatttcctt ccggggaaag ctgaagctgtt acacagggga ggcctgcagg 480

acaggggaca gatga 495

<210> 2
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | His | Glu | Cys | Pro | Ala | Trp | Leu | Trp | Leu | Leu | Ser | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Gly | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

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

Ala Glu Asn Ile Thr Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln
 50 55 60

Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu
 65 70 75 80

Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys
 85 90 95

Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly
 100 105 110

Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro
 115 120 125

Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr
 130 135 140

Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys
 145 150 155

Arg Thr Gly Asp Arg
 160 164

<210> 3
<211> 525
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcttggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cggcgtgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctgaaaggagg 240
 atggaggctcg ggcagcaggc cctgttggtc aactttccc agccgtgggaa gcccctgcag 300
 ctgcatgtgg ataaagccgt cagtggcctt cgccgcctca ccactctgtc tcgggctctg 360
 ggagccccaga aggaagccat ctcccctcca gatgcccct cagctgtcc actccgaaca 420
 atcaactgctg acactttccg caaaacttttc cggactact ccaatttctt ccggggaaag 480
 ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatga 525

<210> 4
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | His | Glu | Cys | Pro | Ala | Trp | Leu | Trp | Leu | Leu | Ser | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Gly | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

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

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

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

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp
 85 90 95

Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser
 100 105 110

Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
 115 120 125

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp
 130 135 140

Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys
 145 150 155 160

Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165 170

<210> 5
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcttggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcttggag 120

aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc cctttggtc 240

aactttccc agccgtggaa gcccctgcag ctgcatgtgg ataaagccgt cagtggcctt 300

cgcagcctca ccactctgct tcgggctctg ggagcccaga aggaagccat ctccctcca 360

gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactttc 420

cgagtctact ccaattcct ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg 480

acaggggaca gatga 495

<210> 6
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | His | Glu | Cys | Pro | Ala | Trp | Leu | Trp | Leu | Leu | Ser | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Gly | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 20 | 30 |

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

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ile | Thr | Val | Pro | Asp | Thr | Lys | Val | Asn | Phe | Tyr | Ala | Leu | Leu | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 65 | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Ser | Gln | Pro | Trp | Glu | Pro | Leu | Gln | Leu | His | Val | Asp | Lys | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 85 | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ser | Gly | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Thr | Leu | Leu | Arg | Ala | Leu | Gly | Ala |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 100 | 110 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Lys | Glu | Ala | Ile | Ser | Pro | Pro | Asp | Ala | Ala | Ser | Ala | Ala | Pro | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 115 | 125 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Phe | Arg | Lys | Leu | Phe | Arg | Val | Tyr | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 130 | 140 |

Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg
 145 150 155 160

Thr Gly Asp Arg

<210> 7
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgcctgtct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtctggag 120

aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cggcgtgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagttt atttctatgc ctgaaagagg 240

atggagccgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg cttcgcagc 300

ctcaccactc tgttcgggc tctggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgct 360

gcctcagctg ctccactccg aacaatcaact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc 420

tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg 480

gacagatga 489

<210> 8
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Met Glu Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
 85 90 95

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys
 100 105 110

Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr
 115 120 125

Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe
 130 135 140

Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly
 145 150 155 160

Asp Arg

<210> 9
 <211> 475
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggttctcc tgtccctgtc gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtccctggag 120

aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cggctgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgcctccaggc cctgttggtc aactcttccc agccgtggaa 240

gccctgcag ctgcatgtgg ataaagccgt cagtggcctt cgccgcctca ccactctgtc 300

tcgggctcg ggagcccaga aggaagccat ctccctcca gatgcggcct cagctgtcc 360

actccgaaca atcactgctg acactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttcct 420

ccggggaaag ctgaagctgt acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatga 475

<210> 10
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | His | Glu | Cys | Pro | Ala | Trp | Leu | Trp | Leu | Leu | Ser | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Gly | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

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

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ile | Thr | Val | Pro | Gly | Pro | Val | Gly | Gln | Leu | Phe | Pro | Ala | Val | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

Ala Pro Ala Ala Ala Cys Gly
85

<210> 11
<211> 301
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgcctgtct gtcgtccct 60

ctgggctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtccctggag 120

aggtaacctt tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cggctgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaacaatca ctgctgacac ttccgcaaa ctctccgag tctactcaa 240

tttcctccgg gaaagctga agctgtacac aggggaggcc tgcaggacag gggacagatg 300

a 301

<210> 12
<211> 68
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

Asn Asn His Cys
 65

<210> 13
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
 atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ctttgctact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tcccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gtttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240

gagaaggaat tcatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca 300

gtggatactt tcgtcaagct cttccgggtc tacgccaact tccctccgggg gaaactgaag 360

ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtga 399

<210> 14
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15

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

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

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
 50 55 60

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

Glu Lys Glu Leu Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu
 85 90 95

Arg Thr Leu Thr Val Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala
 100 105 110

Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg
 115 120 125

Arg Gly Asp Arg
 130

<210> 15
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 15
 atgggggtgc cggAACgtcc caccctgctg ctttactct ctttgctact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtgcagg tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240

gagggtggaaag aacaggccat agaagttgg caaggcctgt ccctgctctc agaagccatc 300

ctgcaggccc aggccctgct agccaacttc ctccggggga aactgaagct gtacacggga 360

gagggtctgca ggagagggga caggtga 387

<210> 16
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | Pro | Glu | Arg | Pro | Thr | Leu | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu | Ile |
| | | | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asn | Val | Thr | Met | Gly | Cys | Ala | Glu | Gly | Pro | Arg | Leu | Ser | Glu | Asn |
| | | | | 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | |

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

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Glu | Gln | Ala | Ile | Glu | Val | Trp | Gln | Gly | Leu | Ser | Leu | Leu |
| | | | | | 85 | | | 90 | | | 95 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Glu | Ala | Ile | Leu | Gln | Ala | Gln | Ala | Leu | Leu | Ala | Asn | Phe | Leu | Arg |
| | | | | | | | | 100 | | | 105 | | 110 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Lys | Leu | Lys | Leu | Tyr | Thr | Gly | Glu | Val | Cys | Arg | Arg | Gly | Asp | Arg |
| | | | | | | 115 | | 120 | | | | | 125 | | |

<210> 17
 <211> 513
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg ctttactct ctttgcact gattcctctg 60

ggcctccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtgcagg tctggagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgttg gaaaagaatg 240

gaggtgaaag aacaggccat agaagtttg caaggcctgt ccctgcttc agaagccatc 300

ctgcaggccc aggcctgct agccaattcc tcccagccac cagagaccct tcagctcat 360

atagacaag ccatcagtgg tctacgtac ctcacttac tgttcggt actggagct 420

cagaaggaat tgaatgtcgcc tccagatacc accccacctg ctccactccg aacactcaca 480

gtggatactt tctgcaggag agggacagg tga 513

<210> 18
<211> 170
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | Pro | Glu | Arg | Pro | Thr | Leu | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | 10 | | | | 15 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu | Ile |
| | | | | | | | 20 | | | | 25 | | 30 | | |

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asn | Val | Thr | Met | Gly | Cys | Ala | Glu | Gly | Pro | Arg | Leu | Ser | Glu | Asn |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

| | | |
|--|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn Ser Ser Gln | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Pro Glu Thr Leu Gln Leu His Ile Asp Lys Ala Ile Ser Gly Leu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Arg Ser Leu Thr Ser Leu Leu Arg Val Leu Gly Ala Gln Lys Glu Leu | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Met Ser Pro Pro Asp Thr Thr Pro Pro Ala Pro Leu Arg Thr Leu Thr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Val Asp Thr Phe Cys Arg Arg Gly Asp Arg | | |
| 165 | 170 | |
| <210> 19 | | |
| <211> 279 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Mus musculus | | |
| <400> 19 | | |
| atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg ctttactct ctttgctact gattcctctg 60 | | |
| ggcctcccgag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtgcgt tctggagagg 120 | | |
| tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180 | | |
| ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tcctccgggg gaaactgaag 240 | | |
| ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggta 279 | | |

<210> 20
<211> 92
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

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

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

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys
65 70 75 80

Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg Gly Asp Arg
85 90

<210> 21
<211> 591
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 21
atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgtgc ctttactct ctttgcact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgctg acagtgcagg tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgttg gaaaagaatg 240

gagggtggaag aacaggccat agaagttgg caaggcctgt ccctgcttc agaagctgt 300

cacgggagag gtctgcagga gaggggacag gtgacatgct gctgccaccg tggtggaccg 360

acgaacttgc tccccgtcac tgtgtcatgc caaccctcca ccactccaa ccctcatcaa 420

acgggtcatt accttcttac cagtctgtcc catggacact ccagcaccag cagtgacatc 480

ctcgccccca gaagaacttc ccagagctcc attctgaaat ctaaagatgt cgctggacaa 540

gcccgggccc ccagagaaga agagccttag aatcagctcg gattttta g 591

<210> 22

<211> 196

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | Pro | Glu | Arg | Pro | Thr | Leu | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | 10 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 20 | | | | | | | | 30 |

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asn | Val | Thr | Met | Gly | Cys | Ala | Glu | Gly | Pro | Arg | Leu | Ser | Glu | Asn |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 50 | | | | 55 | | | | | | | 60 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Thr | Val | Pro | Asp | Thr | Lys | Val | Asn | Phe | Tyr | Ala | Trp | Lys | Arg | Met |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 65 | | | | | | | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Glu | Glu | Gln | Ala | Ile | Glu | Val | Trp | Gln | Gly | Leu | Ser | Leu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | 85 | | | | | | | 95 |

Ser Glu Ala Val His Gly Arg Gly Leu Gln Glu Arg Gly Gln Val Thr
 100 105 110

Cys Cys Cys His Arg Gly Pro Thr Asn Leu Leu Pro Val Thr Val
 115 120 125

Ser Cys Gln Pro Ser Thr Thr Pro Asn Pro His Gln Thr Gly His Tyr
 130 135 140

Leu Leu Thr Ser Leu Ser His Gly His Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ile
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Arg Arg Thr Ser Gln Ser Ser Ile Leu Lys Ser Lys Asp
 165 170 175

Val Ala Gly Gln Ala Arg Gly Pro Arg Glu Glu Glu Pro Gln Asn Gln
 180 185 190

Leu Gly Phe Val
 195

<210> 23
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tggccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtccctggag 120

aggtaacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacg 159

<210> 24
 <211> 53
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Asn | Ile | Thr |
| | | 50 | | |

<210> 25

<211> 225

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cggcgtgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta attc 225

<210> 26

<211> 82

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

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

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

Met Glu

<210> 27
 <211> 243
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 27
 atgggggtgc cggAACgtcc caccctgctg cttttactct ctttgctact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tcccccacgc ctcatctgcg acagtgcagt tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gtgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240

gag 243

<210> 28
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Val | Pro | Glu | Arg | Pro | Thr | Leu | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | 5 | | | | | 10 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Ala | Pro | Pro | Arg | Leu | Ile |
| | | | | | | | | 20 | | | | | 30 | | |

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asn | Val | Thr | Met | Gly | Cys | Ala | Glu | Gly | Pro | Arg | Leu | Ser | Glu | Asn |
| | | | | 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | |

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

Glu

<210> 29

<211> 326

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

atgggggtgc ccgaacgtcc caccctgctg cttttactct ctttgctact gattcctctg 60

ggcctcccag tcctctgtgc tcccccacgc ctcatctgcg acagtcgagt tctggagagg 120

tacatcttag aggccaagga ggcagaaaaat gtcacgatgg gttgtgcaga aggtcccaga 180

ctgagtgaaa atattacagt cccagataacc aaagtcaact tctatgcttg gaaaagaatg 240

gaggtggaag aacaggccat agaagtttg caaggcctgt ccctgctctc agaagccatc 300

ctgcaggccc aggcctgct agccaa 326

<210> 30
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Met Gly Val Pro Glu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

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

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

Glu Asn Val Thr Met Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Leu Ser Glu Asn
50 55 60

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

Glu Val Glu Glu Gln Ala Ile Glu Val Trp Gln Gly Leu Ser Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn
100 105

<210> 31
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
gtcgggcagc aggccgtaga agtctggcag ggcctggccc tgctgtcgga agctgtcctg 60

cggggccagg ccctgttggt caactttcc cagccgtggg agcccctgca gctgcatgtg 120

gataaagccg tcagtggcct tcgcagcctc accactctgc ttccggctct gggagcccag 180

aaggaagcca tctccctcc agatgcggcc tcagtgctc cactccgaac aatcactgct 240

gacactttcc gcaaactttt ccgagtctac tccaaattcc tccggggaaa gctgaagctg 300

tacacagggg aggccctgcag gacaggggac agatga 336

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Gln | Gln | Ala | Val | Glu | Val | Trp | Gln | Gly | Leu | Ala | Leu | Leu |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

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

80

85

90

95

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

100

105

110

<210> 33
<211> 234
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33 cccctgcagc tgcatgtgga taaagccgtc agtggccttc gcagcctcac cactctgctt 60

cgggctctgg gagccccagaa ggaaggccatc tccccctccag atgcggcctc agctgctcca 120

ctccgaacaa tcactgctga cactttccgc aaactcttcc gagtctactc caatttcctc 180

cggggaaagc tgaagctgta cacaggggag gcctgcagga cagggacag atga 234

<210> 34
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
20 25 30

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
 35 40 45

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
50 55 60

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
65 70 75 80

<210> 35
<211> 156
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35
aaggaaattga tgtcgcctcc agataccacc ccacacctgctc cactccgaac actcacagtg 60

gatactttct gcaagctttt ccgggtctac gccaaacttcc tccggggaa actgaagctg 120

tacacgggag aggtctgcag gagaggggac aggtga 156

<210> 36
<211> 51
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Glu | Leu | Met | Ser | Pro | Pro | Asp | Thr | Thr | Pro | Pro | Ala | Pro | Leu | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Thr Leu Thr Val Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala Asn
20 25 30

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Val Cys Arg Arg
 35 40 45

Gly Asp Arg
50

<210> 37
<211> 61
<212> DNA
<213> *Mus musculus*

<400> 37
cttccctccgg gggaaactga agctgtacac gggagaggtc tgcaggagag gggacaggtg 60

a 61

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Leu | Arg | Gly | Lys | Leu | Lys | Leu | Tyr | Thr | Gly | Glu | Val | Cys | Arg | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |

Gly Asp Arg

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 39
gaacttccaa ggatgaagac ttgcagc 27

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 40
gtggcagcag catgtcacct gtc 23

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 41
tatggatcca tgggggtgcc cgaacgtccc ac

32

<210> 42
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 42
tatggatcct cactgtccc ctctcctgca gac

33

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 43
gtcgtagactg ggaaaaccct ggcg

24

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 44
agcggataaac aatttacac agga

24

<210> 45
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

gatgggggtg cacgaatgtc ctgc

24

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cacacacctgggt catctgtccc ctgtc

25

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

aaagaattcc ctgtccctc tcctgcagac ctc

33

<210> 48

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 48

tatggatcca tgggggtgca cgaatgtcc

29

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 49
agagaattct ctgtccctg tcctgcag 28

<210> 50
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
50

<210> 51
<211> 53
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Homo sapiens point mutation

<400> 51

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

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

<210> 52
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Homo sapiens point mutation

<400> 52

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr
 50

<210> 53
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

<223> Homo sapiens ha-10 deletion mutant

<400> 53

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

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

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
35 40

<210> 54

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Homo sapiens hA-20 deletion mutant

<400> 54

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

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

Ile

<210> 55

<211> 159

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 55

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtaacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacf 159

<210> 56

<211> 159

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> hAmA (Mutant Alanin hWT-EPO Helix A)

<400> 56

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

gcgttaacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacf 159

<210> 57

<211> 159

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> hAmE (Mutant Glutamic-Acid hWT-EPO Helix A)

<400> 57

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

gagtaacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacf 159

<210> 58

<211> 129

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> hA-10 (hWT-EPO Helix A minus 10aa)

<400> 58

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgccctcatct gtgacagccg agtccctggag 120

aggtaacctc 129

<210> 59

<211> 99

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> hA-20 (hWT-EPO Helix A minus 20aa)

<400> 59

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgccctcatc 99

<210> 60

<211> 78

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 60

gccccaccacg cctcatctgt gacagccgag tcctggagag gtaccttttg gaggccaagg

aggccgagaa tatcacg 78

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 61

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 62

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
 20 25

<210> 63
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 63
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtccctggg c 81