



등록특허 10-2440820



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월05일
(11) 등록번호 10-2440820
(24) 등록일자 2022년09월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/775 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/775 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009391
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월06일
심사청구일자 2021년07월02일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월03일
- (65) 공개번호 10-2018-0040711
- (43) 공개일자 2018년04월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/050405
- (87) 국제공개번호 WO 2017/044424
국제공개일자 2017년03월16일
- (30) 우선권주장
62/215,256 2015년09월08일 미국(US)

- (56) 선행기술조사문현
US20110178029 A1

(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 37 항

심사관 : 고일영

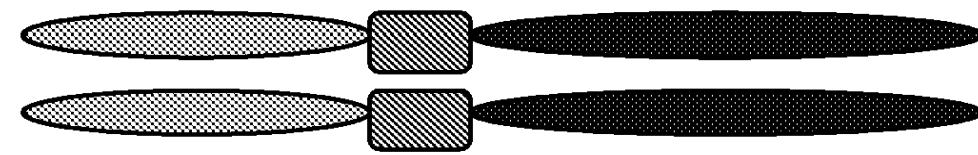
- (54) 발명의 명칭 **ApoA-1 응합 폴리펩티드 및 관련 조성물 및 방법**

(57) 요 약

ApoA-1 응합 폴리펩티드에 관한 조성물 및 방법이 개시된다. 응합 폴리펩티드는 ApoA-1 폴리펩티드 또는 ApoA-1 모방체에 상응하는 제1 폴리펩티드 세그먼트를 포함하고, 또한 이량체화 도메인 예컨대, 예를 들어, Fc 영역을 포함할 수 있으며, 이는 전형적으로 가요성 링커를 통해 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단에 연결

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2a



huApo A-1

링커

huIgG Fc

(SSSH한지-P238S-P331S CH2-CH3)

된다. 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함하고 이는 제2 생물학적 활성 (예를 들어, RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸하이드롤라제, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질, 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제, 또는 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드)을 부여한다. 또한 본원에 개시된 바와 같은 제1 및 제2 ApoA-1 융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체 단백질이 개시된다. 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질은 요법을 위한 방법에 유용하다.

(52) CPC특허분류

- C12N 9/18* (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Y 301/01002 (2013.01)
C12Y 301/01047 (2013.01)
C12Y 301/08001 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

- US20040115183 A1
US20140363428 A1
US20030008373 A1
WO2013127752 A1

명세서

청구범위

청구항 1

ApoA1-L1-D를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하는 융합 폴리펩티드이며, 여기서

ApoA1은 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 제1 폴리펩티드 세그먼트이며, 여기서 상기 제1 폴리펩티드 세그먼트는 콜레스테롤 유출 활성을 갖고;

L1은 10 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어지는 제1 폴리펩티드 링커이고;

D는 이뮤노글로불린 Fc 영역이고;

여기서 융합 폴리펩티드는 2개 아미노산 링커를 갖는 ApoA1-Fc 융합 폴리펩티드 또는 링커가 없는 ApoA1-Fc 융합 폴리펩티드와 비교 시 증가된 ApoA1 콜레스테롤 유출 활성을 갖는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, L1이 16 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어진 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, L1이 16개 아미노산 잔기, 21개 아미노산 잔기, 26개 아미노산 잔기, 31개 아미노산 잔기, 또는 36개 아미노산 잔기로 이루어진 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, L1이 서열식별번호: 22의 잔기 268-283, 서열식별번호: 26의 잔기 268-288, 서열식별번호: 2의 잔기 268-293, 서열식별번호: 54, 또는 서열식별번호: 24의 잔기 268-303에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 폴리펩티드 세그먼트가 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열식별번호: 2의 위치 180에 상응하는 아미노산 위치에 있는 벨린이 리신에 의해 대체되고/거나;

서열식별번호: 2의 위치 197에 상응하는 아미노산 위치에 있는 아르기닌이 시스테인에 의해 대체되는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서, 제1 폴리펩티드 세그먼트가 서열식별번호: 2의 잔기 19-267 또는 25-267에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 9

제1항에 있어서, Fc 영역이 인간 Fc 영역인 융합 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 인간 Fc 영역이 야생형 인간 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체인 융합 폴리펩티드.

청구항 11

제9항에 있어서, Fc 영역이 인간 γ 1 Fc 영역 또는 인간 γ 3 Fc 영역인 융합 폴리펩티드.

청구항 12

제10항에 있어서, Fc 영역이, Eu 잔기 C220이 세린에 의해 대체된 인간 γ 1 Fc 변이체인 융합 폴리펩티드.

청구항 13

제12항에 있어서, Eu 잔기 C226 및 C229가 각각 세린에 의해 대체된 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 14

제13항에 있어서, Eu 잔기 P238이 세린에 의해 대체된 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 15

제11항에 있어서, Fc 영역이, Eu 잔기 P331이 세린에 의해 대체된 인간 γ 1 Fc 변이체인 융합 폴리펩티드.

청구항 16

제14항에 있어서, Eu 잔기 P331이 세린에 의해 대체된 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 17

제1항에 있어서, Fc 영역이 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 294-525 또는 294-524, 또는 (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 294-525 또는 294-524에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 18

제1항에 있어서, 융합 폴리펩티드가 하기에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드:

- (i) 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524,
- (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524,
- (iii) 서열식별번호: 22의 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514,
- (iv) 서열식별번호: 26의 잔기 19-520, 19-519, 25-520, 또는 25-519, 또는
- (v) 서열식별번호: 24의 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534.

청구항 19

제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제, 및 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 20

제19항에 있어서, 융합 폴리펩티드가 ApoA1-L1-D-L2-P를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하는 것인 융합 폴리펩티드이며, 여기서

L2는 제2 폴리펩티드 링커이고;

P는 제2 폴리펩티드 세그먼트인

융합 폴리펩티드.

청구항 21

제19항에 있어서, 제2 폴리펩티드 세그먼트가 RNase인 융합 폴리펩티드.

청구항 22

제20항에 있어서, RNase가 서열식별번호: 4의 잔기 542-675에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 23

제21항에 있어서, 융합 폴리펩티드가 하기에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드:

- (i) 서열식별번호: 4의 잔기 19-675 또는 25-675, 또는
- (ii) 서열식별번호: 14의 잔기 19-675 또는 25-675.

청구항 24

제19항에 있어서, 제2 폴리펩티드 세그먼트가 파라옥소나제인 융합 폴리펩티드.

청구항 25

제24항에 있어서, 파라옥소나제가 서열식별번호: 12의 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 잔기 16-355, 또는 서열식별번호: 44의 잔기 16-355에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 26

제24항에 있어서, 융합 폴리펩티드가 하기에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드:

- (i) 서열식별번호: 28의 잔기 19-883 또는 25-883,
- (ii) 서열식별번호: 38의 잔기 19-873 또는 25-873,
- (iii) 서열식별번호: 46의 잔기 19-883 또는 25-883, 또는
- (iv) 서열식별번호: 48의 잔기 19-883 또는 25-883.

청구항 27

제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 폴리펩티드가 미엘로페옥시다제 (MPO) 억제제에 연결되는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 28

제1항 융합 폴리펩티드 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 상기 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 융합 폴리펩티드인 이량체 단백질.

청구항 29

제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 30

하기 작동가능하게 연결된 요소를 포함하는 발현 벡터:

전사 프로모터;

제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 세그먼트; 및
전사 터미네이터.

청구항 31

제30항의 발현 벡터가 도입되어 있는 배양된 세포이며, 여기서 세포는 DNA 세그먼트를 발현하는 것인 배양된 세포.

청구항 32

하기를 포함하는, 융합 폴리펩티드를 제조하는 방법:

제30항의 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양하며, 여기서 세포가 DNA 세그먼트를 발현하고, 코딩된 융합 폴리펩티드가 생성되는 것; 및

융합 폴리펩티드를 회수하는 것.

청구항 33

하기를 포함하는, 이량체 단백질을 제조하는 방법:

제30항의 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양하며, 여기서 세포가 DNA 세그먼트를 발현하고, 코딩된 융합 폴리펩티드가 이량체 단백질로서 생성되는 것; 및

이량체 단백질을 회수하는 것.

청구항 34

질병을 치료하는 조성물이며, 여기서 조성물은

제1항 및 제3항 내지 제18항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩티드; 및

제약상 허용되는 담체를 포함하고,

여기서 질병은

관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 및 비만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환;

천식 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 폐 질환; 및

악성 흑색종, 폐암, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 35

질병을 치료하기 위한 조성물이며, 여기서 조성물은

제28항의 이량체 단백질; 및

제약상 허용되는 담체를 포함하고,

여기서 질병은

관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 및 비만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환;

천식 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 폐 질환; 및

악성 흑색종, 폐암, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 36

질병을 치료하기 위한 조성물이며, 여기서 조성물은

제21항의 융합 폴리펩티드 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질; 및 제약상 허용되는 담체를 포함하고,

여기서 질병은

관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 및 비만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환;

천식, 특발성 폐 섬유증, 저산소증, 및 급성 호흡 곤란 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 폐 질환; 및

악성 흑색종, 폐암, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 37

질병을 치료하기 위한 조성물이며, 여기서 조성물은

제24항의 융합 폴리펩티드 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질; 및 제약상 허용되는 담체를 포함하고,

여기서 질병은

관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환;

파킨슨병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 신경계 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 질환;

류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 및 비만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환;

천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기관지확장증, 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 폐 질환; 및

슈도모나스 아에루기노사 감염을 특징으로 하는 감염성 질환; 및

악성 흑색종, 폐암, 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 38

황 머스타드 기체 또는 유기포스페이트에 대한 노출을 치료하기 위한 조성물이며, 여기서 조성물은

제24항의 융합 폴리펩티드 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질; 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 9월 8일자로 출원된 미국 가출원 번호 62/215,256의 이익을을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0003] 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 바 있는 서열 목록을 함유하고 이에 의해 그 전문이 참조로 포함된다. 2016년 8월 31일에 생성된, 상기 ASCII 사본은 "TRP_0110PC_20160831_Seq_Listing_ST25"로 명명되고 161,132 바이트 크기이다.
- ### 배경 기술
- [0005] 아포지단백질 A-I (ApoA-1) 및 고밀도 지단백질 (HDL)
- [0006] 심혈관 질환은 많은 국가에서 사망률의 주요 원인이며 전세계에서 매년 대략 16.7백만명의 사망의 이유가 된다. 심혈관 질환의 가장 흔한 결과는 심근경색 및 뇌졸중이며, 이는 아테롬성동맥경화증의 공통 기저 병인을 갖는다.
- [0007] 1970년대 이후 역학적 연구는 고밀도 지단백질 (HDL)의 낮은 수준이 심근경색에 대한 증가된 위험과 연관되는 것으로 제시된 바 있다. 이것은 HDL을 표적화하는 새로운 요법 (문헌 [Kingwell et al., *Nature Reviews Drug Discovery* 13:445-64, 2014] 참조)에 대한 다중 접근법으로 역 콜레스테롤 수송 (RCT)의 프로세스가 RCT 없이 HDL에서의 단순 증가보다 오히려 유익한 HDL 활성에 핵심적이라는 컨센서스 관점으로 이어졌다. 예를 들어, 지금까지 임상 시험에서, RCT를 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP)의 억제제로 억제함으로써 HDL을 증가시키는 약물은 효과적이지 않았다. 추가로, HDL은 산화 및 당화에 의해 손상되기 때문에, HDL의 수준을 측정하는 것이 화학요법 동안 및 신경변성 장애를 갖는 환자를 포함한 환자에서 그의 기능을 결정하는데 충분하지 않은 것으로 더욱 최근에 인식된 바 있다. 문헌 [Keeney et al., *Proteomics Clin Appl.* 7:109-122, 2013] 참조.
- [0008] 아포지단백질 A-1 (ApoA-1)은 HDL의 주요한 단백질 구성성분이다. 문헌 [Phillips, *Journal of Lipid Research* 54:2034-2048, 2013]. 인간 ApoA-1은 일련의 8개 22-mer 및 2개 11-mer 양친매성 α -나선 스패닝 잔기 44-243을 갖는, 243개 아미노산 단백질이다. 문헌 [Lund-Katz and Phillips, *Subcell Biochem.* 51:183-227, 2010]. 분자의 아미노-말단 2/3에서의 나선은 나선 다발 구조를 형성하는 반면, 카르복실-말단 영역은 지질 결합에 대해 중요한 별개의, 상대적으로 무질서한 도메인을 형성한다. C-말단 세그먼트와 지질의 상호작용은 ApoA-1 구조에서 입체형태적 변화를 유도하여, 분자의 α -나선 함량을 증가시키고 N-말단 나선 다발의 후속 개방을 허용한다. 상기 문헌 참조. ApoA-1의 지질 친화성은 세제-유사 특성을 부여하고, 그것은 인지질을 가용화하여 인지질 이중층의 세그먼트 및 디스크의 가장자리 주위에서 역평행, 이중-벨트 입체형태로 배열된 2개 ApoA-1 분자를 함유하는 디스크형 HDL 입자를 형성할 수 있다. 상기 문헌 [Phillips]. 입체형태적 적응성 ApoA-1은 또한 상이한 크기의 디스크형 입자 뿐만 아니라 구형 HDL 입자를 포함한, HDL 입자에 대해 안정성을 부여한다. 상기 문헌 참조. 이를 특징은 세포 인지질 및 콜레스테롤의 유출 및 안정한 HDL 입자의 생성을 때개하는데 있어 ABCA1을 갖는 파트너에 대해 ApoA-1을 허용한다. 상기 문헌 [Phillips]; 상기 문헌 [Lund-Katz and Phillips] 참조.
- [0009] HDL 입자 형성 및 기능에서의 그의 중요한 역할로 인해, ApoA-1은 여러 HDL-표적화된 치료 전략에 대한 초점이 되어 왔다. 그러나, ApoA-1의 합성을 증가시키는 니아신 및 피브레이트를 포함한 약물은 또한 VLDL의 농도를 저하시키고 따라서 HDL에 특이적이지 않다. 니아신의 임상 시험은 효능의 결여로 인해 정지된 반면, 피옥시솜 중식자 활성화 수용체 (PPAR)를 활성화시키는 피브레이트는 메타-분석에서 주요 심혈관 사건에서 10% 감소 ($p<0.05$) 및 관상 동맥 사건에서 13% 감소 ($p<0.0001$)를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Jun et al., *Lancet* 375:1875, 2010] 참조. 더욱 효과적인 요법이 필요하기 때문에, 전임상 개발에서 ApoA-1을 증가시키는 여러 다른 경구 활성 약물이 있다. 상기 문헌 [Kingwell et al.] 참조.
- [0010] ApoA-1을 증가시키는 것에 대한 대안적 접근법은 정제된 단백질의 직접 주사에 의한 것이다. 예를 들어, 문헌 [Kingwell et al., *Circulation* 128:1112, 2013] 참조. ApoA-1은 인간 혈장 (재구성된 HDL)으로부터 정제되고 임상 시험에서 실험된 바 있다. 재조합 ApoA-1은 또한 박테리아 및 포유동물 발현 시스템 둘 다에서 발현되고 임상 시험에서 실험된 바 있다. 이를 연구는 인지질로 재구성된 ApoA-1의 프리- β HDL 내로의 주입은 소규모 (47-60명 환자) 임상 시험 후에 혈관내 초음파 (IVUS)에 의해 측정된 바와 같이 플라크 부피의 감소 및 플라크 형태학에서의 개선을 유발하는 것으로 제시된 바 있다. 유망하지만, 천연 또는 재조합 ApoA-1의 사용은 짧은 ApoA-1 반감기 및 높은 제조 비용으로 인해 매주 투여에 대한 요건을 포함한 여러 제한을 갖는다.
- [0011] 고도로 활성인 ApoA-1 돌연변이체인 재조합 ApoA-1 밀라노는 박테리아 세포에서 발현되고 급성 관상동맥 증후군을 갖는 환자에서의 임상 시험에서 실험되었으며 (문헌 [Nissen et al., *JAMA* 290:2292, 2003] 참조), 여기서 플라크 부피의 감소가 보여졌다. 이 연구가 최초로 HDL 가설을 직접 시험하고 확증하기 위해 고려되는 동안,

박테리아 시스템에서 생성된 ApoA-1은 낮은 발현 수준 및 높은 제조 비용으로 인해 진행되지 않았다. 포유동물 세포에서 생성된 재조합 ApoA-1은 최근에 완료된 II상 연구를 포함한 임상 시험에서 추가로 진행되어졌다. 세레니스 테라퓨틱스(Cerenis Therapeutics)에 의해 개발 중인, CER-001은 포유동물 세포에 의해 생성되고 특이적 지질과 제제화되어 프리- β -유사 HDL 입자를 형성하는 재조합 ApoA-1이다. 세레니스에 따르면, CER-001은 MODE 시험 (NCT01412034)에서 가족성 고콜레스테롤혈증을 갖는 환자에서 MRI에 의해 측정된 경동맥 플라크 부피의 감소의 그의 일차 종점을 충족하였다. 카이-제곱 시험 (NCT01201837)에서, 세레니스는 CER-001이 급성 관상동맥 증후군을 갖는 환자에서 기준선에 비해 플라크 부피를 감소시켰지만, 상기 감소는 위약에 비해 유의하지 않았다고 발표하였다.

[0012] 마카크에서의 또 다른 연구에서, 지질 (POPC)로 재구성된 ApoA-1 밀라노는 21회 주입 동안 2일마다 주어진 비교적 고용량 (30, 100, 및 300 mg/kg)으로 주입되었다. 문헌 [Kempen *et al.*, *J. Lipid. Res.* 54:2341-2353, 2013]. 약물 주입은 내인성 콜레스테롤 에스테르화 속도를 신속하게 저하시켰고, LCAT 활성화의 결여로 인해 큰 ApoE-풍부 입자의 형성을 증가시켰으며, ABCA1-매개 유출의 지속된 자극으로 인해 유리 콜레스테롤의 큰 증가를 유발하였다. 상기 문헌 참조. 이들 결과는 다양한 재구성된 ApoA-1 밀라노의 주입이 정상 대사 경로를 통해 그것을 프로세싱하는 능력 없이 콜레스테롤 유출을 증진시킴으로써 HDL 대사를 파괴하는 것으로 제시한다.

[0013] HDL 주입 요법에 대한 전망은 매우 유망하지만, 현재 접근법의 제한 중 일부를 극복하는 개선된 재조합 ApoA-1 분자에 대한 필요가 있다. 정제를 단순화하기 위해 박테리아에서 His 태그로 생성된 ApoA-1을 포함한, 여러 재조합 ApoA-1 융합 단백질이 생성된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Prieto *et al.*, *Protein J.* 31:681-688, 2012; Ryan *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 27:98-103, 2003] 참조. 또 다른 예에서, IFN α 는 3aa (Gly Ala Pro) 링커를 통해 ApoA-1의 아미노 말단에 부착되었다. 문헌 [Fioravanti *et al.*, *J. Immunol.* 188:3988-3992, 2012] 참조. 이 구축물에서의 링커는 제한 효소의 선택에 의해 생성되었고, 융합 단백질은 간에 표적화하고 IFN α 요법의 독성을 감소시키기 위해 아데노바이러스 전달에 의해 시험되었다. ApoA-1은 또한 Fc 도메인 (ApoA-1-Ig)과 융합되었고 크리에이티브 바이오마트(Creative Biomart) (cat. 번호 APOA-1-33H) 및 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) (Cat # 10686-H02H-5)로부터 상업적으로 입수 가능하다. 그러나, 이 ApoA-1-Ig 분자는 매우 낮은 기능적 활성을 갖는다 (실시예 1 참조).

[0014] 추가적인 재조합 ApoA-1 융합 단백질은 항-CD20 scFv-ApoA-1 (Crosby *et al.*, *Biochem. Cell Biol.* 10:1139/bcb, 2015), IL-15-ApoA-1 (Ochoa *et al.*, *Cancer Res.* 73:139-149, 2013), 및 인간 테트라넥틴의 삼량체화 도메인의 첨가에 의해 제조된 삼량체 ApoA-1 융합 단백질 (Graversen *et al.*, *J. Cardiovascular Pharmacol.* 51:170-77, 2008)을 포함한다. 이들 예에서, 융합은 ApoA-1의 N-말단에서 일어났다.

[0015] 삼량체 테트라넥틴-ApoA-1 (TN-ApoA-1)은 역 콜레스테롤 유출에서 효과적이었고 마우스에서의 그의 반감기는 단량체 ApoA-1 경우의 3시간에 비해 12시간으로 증가되었다. 상기 문헌 [Gaversen *et al.*] 참조. 아테롬성동맥 경화증의 공격성 모델에서 (고-지방 식이가 공급된 LDLR $-/-$ 마우스), 삼량체 TN-ApoA-1은 대동맥 기부에서 병변의 진행을 감속시켰다. 상기 문헌 참조. 그러나, 비인간 영장류에서의 최근 연구는 지질화 TN-ApoA-1의 다중 주입이 내약성이 우수하지 않고 높은 면역원성 및 지질 축적을 유발하는 것으로 제시되었다. 문헌 [Regeness-Lechner *et al.*, *Toxicological Sciences* 150:378-89, 2016] 참조. 삼량체 융합 단백질은 인지질과 복합체화되고 3주 동안 4일마다 100 mg/kg 및 400 mg/kg의 농도로 주입되었고, 6주 회복 기간이 이어졌다. 지질화 TN-ApoA-1의 다중 주입 후에, 임상 상태는 악화되고 진행성 염증 반응을 나타내는 변화, 시토카인의 증가된 수준, C-반응성 단백질 및 다중 조직에서의 혈관/혈관주위 침윤물이 동반되었다. 항약물 항체의 빠른 형성은 지질화 TN-ApoA-1을 제공받는 모든 동물에서 발생하였다. 상기 문헌 참조. 치료된 동물의 조직에서의 삼량체 TN-ApoA-1의 축적은 N-말단 근처에 돌연변이를 갖는 환자에서 ApoA-1의 피브릴 형성 및 침착과 유사하다. 문헌 [Mizuguchi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 290:20947-20959, 2015; Das *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2015.10.029; Obici *et al.*, *Amyloid* 13:191-205, 2006] 참조.

[0016] 지질의 부재 하의 ApoA-1의 반감기는 매우 짧기 때문에, 임상 개발 중인 ApoA-1의 현재 형태는 주입 전에 프리 β -유사 HDL 입자로의 특이적 지질과의 제제화를 요구한다. 문헌 [Nanjee *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1203-1214, 1996 (지질-무함유 ApoA-1이 인간에서 볼루스 또는 느린 주입 후에 단지 2-2.3시간의 반감기를 갖는 것으로 제시함)] 참조. 지질 제제화 후에, 반감기는 약 48시간으로 증가하고, 따라서 빈번한 (매주) 투여가 여전히 요구된다.

[0017] ApoA-1 요법은 또한 인슐린 감수성 및 글루코스 흡수를 개선시키는데 유의한 이익을 제시한 바 있고 (문헌 [Drew *et al.*, *Nature Reviews Endocrinology* 8:237, 2012] 참조), 당뇨병 및 NASH (비-알콜성 지방간염)를 갖

는 환자에서 유용할 수 있다. 추가로, ApoA-1은 배양된 해마 뉴런 세포에서 아밀로이드-베타를 결합하고 신경 독성을 방지한다. 문헌 [Koldamova *et al.*, *Biochemistry* 40:3553, 2001; Paula-Lima *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:1361, 2009] 참조. 게다가, ApoA-1 다형성은 알츠하이머병에 대한 위험과 연결되고 ApoA-1은 신경변성 장애를 갖는 환자에서 저하된 수준으로 발견된다. 문헌 [Keeney *et al.*, *Proteomics Clin. Appl.* 7: 109-122, 2013] 참조.

[0018] ApoA-1 요법의 효능은 또한 암의 동물 모델에 입증된 바 있다. 한 연구는 마우스에서의 종양의 성장에 대한 ApoA-1 주입의 효과를 검사하였다. 문헌 [Zamanian-Daryoush *et al.*, *J. Biol. Chem.* 288:21237-21252, 2013] 참조. 자마니안-다리오шу(Zamanian-Daryoush) 등은 ApoA-1이 B16F10L 악성 흑색종 및 루이스 폐암종을 포함한, 다중 동계 종양 모델에서 종양 성장 및 전이를 강력하게 억제하는 것으로 밝혔다. ApoA-1의 효과는 면역 반응의 조정에 기인하였다. 종양에서의 골수-유래 억제자 세포(MDSC)의 동원 및 확장은 억제되었다. 또한 종양 혈관신생 및 매트릭스-분해 프로테아제 MMP-9의 억제도 있었다. 대조적으로, ApoA-1 요법은 CD11b 대식세포를 증가시켰고 IFN γ , IL-12b, 및 CXCL10, T 세포 활성화를 지지하는 Th1 반응의 마커의 양을 증가시켰다. 저자들은 T 세포가 종양 성장에 대한 ApoA-1의 강력한 억제 효과를 요구하였고, ApoA-1 요법은 종양에서 CD8+ T 세포의 특이적 증가를 유발하는 것으로 제시하였다. 상기 문헌 참조. 자마니안-다리오шу 등의 결과는 유망했지만, 상기 연구는 관찰된 효과를 달성하기 위해 고용량의 지질-무함유 ApoA-1을 사용하였으며 (마우스당 2일마다 15 mg) [상기 문헌 참조], 이는 아마도 ApoA-1의 짧은 반감기 때문에 요구되었을 것이다.

[0019] 또 다른 암 연구는 ApoA-1 및 모방체 웨티드 (L-4F, D-4F, L-5F)가 난소 암종의 뮤린 모델에서 종양 발생을 억제하는 것을 제시하였다. 문헌 [Su *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:19997-20002, 2010] 참조. 수(Su) 등은 트랜스제닉 마우스에서의 ApoA-1 과다발현, 또는 웨티드 모방체 투여가 자극 인지질을 감소시켰으며, 이는 종양 성장의 억제에 대한 추가적인 메카니즘을 시사한다는 것을 밝혔다. 상기 문헌 참조.

[0020] 연구는 또한 다발성 경화증 (MS)의 발병기전에서 ApoA-1에 대한 역할을 시사한 바 있다. 특히, ApoA-1 발현은 건강한 대조군과 비교하여 MS 환자에서 더 낮은 것으로 제시되었고, 원발성 진행성 MS 환자는 MS의 다른 형태를 갖는 환자보다 더 적은 혈장 ApoA-1을 가졌다. 문헌 [Meyers *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 277:176-185, 2014] 참조. MS에 대한 모델로서 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE)을 사용하여, ApoA-1 결핍 마우스는 야생형 동물과 비교하여 악화된 임상 질환 및 더 많은 신경변성을 나타내었다. 저자들은 ApoA-1 수준을 증가시키는 작용제가 MS에 대해 가능한 요법이라는 것을 시사한다. 상기 문헌 참조. 또 다른 MS 연구는 증가된 ApoA-1 수준과 연관된 ApoA-1 프로모터 다형성 A-대립유전자가 MS를 갖는 환자에서 개선된 인지 수행과 상호연관되며; A-대립유전자 담체는 전반적인 우월한 인지 수행을 나타내었고 인지 장애의 3-배 저하된 전반적인 위험을 갖는다는 것을 밝혔다. 문헌 [Koutsis *et al.*, *Mult. Scler.* 15:174-179, 2009] 참조.

웨티드 모방체

[0022] ApoA-1 모방체 웨티드는 질환의 수많은 동물 모델에서 효능을 제시한 바 있고 잠재적 치료제로서 그들을 매력적 이게 만든 특성을 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Reddy *et al.*, *Curr. Opin. Lipidol.* 25:304-308, 2014, 및 White *et al.*, *J. Lipid. Res.* 55:2007-2021, 2014] 참조. 웨티드 4F는 관상 동맥 질환을 갖는 고위험군 환자에서 시험된 바 있다. 산화에 저항성이 있는 여러 ApoA-1 모방체 웨티드는 지난 수년 동안 기재된 바 있다. 이들 α-나선 웨티드가 동물 모델에서 활성을 제시하지만, 이들의 짧은 반감기 때문에 매일 투여를 요구한다. 추가로, 근육 독성 및 고트리글리세리드혈증을 포함한 독성은 웨티드-치료된 동물에서 보여진 바 있다 (이들 독성은 ApoA-1로 치료된 마우스에서 보여진 바 있음). 서열 디자인에 의해 독성을 감소시키고 웨티드 생성의 비용을 감소시키기 위한 진보가 기재되었다. 예를 들어, 문헌 [Bielicki, *Curr. Opin. Lipidol.* 27:40-46, 2016] 참조. 또 다른 접근법은 고도로 연구된 D-4F 웨티드를 포함한, D-웨티드를 합성하는 것이었다. 이들은 더 긴 반감기를 갖고 경구로 주어질 수 있지만, 높은 제조 비용 및 조직에서의 D-웨티드의 축적은 이들 웨티드가 초기 임상 시험을 지나서 이동하는 것을 막을 수 있다.

RNase

[0024] RNase는 암 및 자가면역 질환에 대한 요법으로서 연구된 바 있다. 암 요법의 경우, 세포질 억제제에 의한 억제에 저항성이 있는 천연 (온코나제, 개구리 RNase), 및 재조합 인간 RNase1 (미국 특허 번호 8,569,457 참조) 둘 다가 보고된 바 있다. 추가로, 항종양 항체에 대한 세포독성 RNase (온코나제)의 접합에 의해 종양 세포에 RNase를 표적화하는 것으로 보고된 바 있다. 문헌 [Lui *et al.*, *Mol. Cancer* 13:1186, 2014; Newton *et al.*, *Blood* 97:528-535, 2001] 참조.

- [0025] RNase 요법은 또한 심혈관 질환의 마우스 모델에서 연구된 바 있다. 문헌 [See Simsekylmaz et al., *Circulation* 129:598–606, 2014] 참조. 이들 및 다른 저자들은 세포외 RNA가 혈관 손상 부위에 축적되고 세포 외 RNA가 염증성 시토카인의 생성을 유발한다는 것을 제시한다. 문헌 [Fischer et al., *Thromb. Haemost.* 108:730–741, 2012] 참조. RNase 요법은 가속된 심혈관 질환, 감소된 플라크 대식세포 함량, 및 생체내 손상된 경동맥에 대한 억제된 백혈구 동원의 마우스 모델에서의 신생내막 형성을 감소시켰다. 상기 문헌 [Simsekylmaz et al.] 참조.
- [0026] RNase 요법은 또한 급성 뇌졸중의 모델에서 연구된 바 있으며, 여기서 그것이 경색 크기를 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Walberer et al., *Curr. Neurovasc. Res.* 6:12–19, 2009] 참조. 따라서 RNase 1로의 전신 치료는 마우스를 동맥 혈전성 폐쇄로부터 구출하여 대뇌 부종을 제한하고 생체내 강력한 항염증 레지멘으로서 역할을 한다. 이들 RNase 요법 연구에서, RNase는 RNase 1의 반감기가 매우 짧기 때문에 피하로 이식된 삼투성 미니펌프를 사용한 연속 주입에 의해 주어졌다.
- [0027] RNase 요법은 또한 전신 홍반성 루푸스 (SLE)의 마우스 모델에서 연구된 바 있다. 문헌 [Sun et al., *J. Immunol.* 190:2536–2543, 2013] 참조. RNA 센서인 TLR7의 과다발현은 자가항체, 신장 질환, 및 조기 사망률을 갖는 루푸스-유사 질환을 유발한다. 이들 마우스와 트랜스진으로서 RNase A를 과다발현하는 마우스의 교배는 증가된 생존, 감소된 림프구 활성화, IgG 및 C3의 감소된 신장 침착물, 및 감소된 간 염증 및 괴사를 갖는 자손을 생산하였다.
- [0028] 세포외 단일 가닥 바이러스 RNA는 마우스에 척수강내 투여 후에 광범위한 신경변성이 유발되고, 뉴런 손상은 TLR7에 의해 매개되었다. 문헌 [Lehmann et al., *J. Immunol.* 189: 1448–58, 2012] 참조.
- [0029] 인간 RNase 1이 p238s 및 p331s 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 RNase-Ig (미국 특허 번호 8,937,157 참조)는 전신 홍반성 루푸스 (SLE)를 갖는 환자에서 리졸브 테라퓨틱스(Resolve Therapeutics)에 의해 임상 개발 중에 있다.
- [0030] 파라옥소나제
- [0031] 인간 파라옥소나제 1 (PON1)은 효율적인 에스테라제 활성을 갖는 리포락토나제이며 유기포스페이트를 가수분해 할 수 있다. PON1은 LDL 및 세포 막 산화를 방지하며 아테롬성동맥경화보호성인 것으로 간주된다. PON1은 HDL과 독점적으로 연관되며 HDL의 항산화 기능에 기여한다. 예를 들어, 문헌 [Mackness et al., *Gene* 567:12–21, 2015] 참조. HDL-PON1 활성에서의 감소는 PON1 활성의 손실이 염증 및 아테롬성동맥경화증을 촉진할 수 있는 기능장애 HDL로 이어지는 매우 다양한 염증성 질환에 존재한다. 예를 들어, 문헌 [Eren et al., *Cholesterol*. 792090 doi 10.1155/2013/792090, 2013] 참조. PON1 활성은 또한 알츠하이머병 및 다른 치매를 갖는 환자에서 저하되며, 이는 PON1의 가능한 신경보호 역할을 시사한다. 문헌 [Menini et al., *Redox Rep.* 19:49–58, 2014] 참조.
- [0032] PON1은 다종 동물 모델에서 보호 활성을 제시한 바 있다. 인간 PON1의 과다발현은 대사 증후군의 모델인, 조합된 랩틴 및 LDL 수용체 결핍을 갖는 마우스에서 아테롬성동맥경화증의 발생을 억제하였다. 문헌 [Mackness et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:1545–50, 2006] 참조.
- [0033] 또 다른 연구에서, STZ-유도된 당뇨병 전의 마우스에 재조합 PON1의 주입은 당뇨병의 감소된 발생률 및 더 높은 혈청 인슐린 수준을 생성하였다. PON1과 동시에 HDL의 첨가는 인슐린 분비에 대한 상가적 효과를 가졌다. 문헌 [Koren-Gluser et al., *Atherosclerosis* 219:510–518, 2011] 참조.
- [0034] 또 다른 연구에서, 단백질 형질도입 도메인 (PTD)을 함유하는 PON1 융합 단백질을 사용하여 PON1을 세포 및 조직 내로 형질도입하였다. PON1 형질도입은 산화 스트레스-유도된 염증성 반응으로부터 시험관내 소교 세포를 보호하고 파킨슨병 모델에서 도파민성 뉴런 세포 사멸에 대하여 보호하였다. 문헌 [Kim et al., *Biomaterials* 64:45–56, 2015] 참조.
- [0035] 또 다른 연구에서, 재조합 PON1을 마우스에게 투여하였고, 여기서 콜레스테롤 질량에서의 유의한 감소 및 콜레스테롤 생합성 속도에서의 억제가 있었고 아마도 아테롬성동맥경화증의 약화로 이어질 수 있다. 문헌 [Rosenblat et al., *Biofactors* 37:462–467, 2011] 참조.
- [0036] 또 다른 연구에서, 마우스에 재조합 아데노바이러스 PON1 또는 PON3이 주어졌고 이 중 어느 하나는 CCl₄-유도된 간 손상에 대한 보호하는 것으로 제시되었다. 인간 PON1 또는 인간 PON3 중 어느 하나의 과다발현은 간 산화성 스트레스를 감소시켰고 간에서 항산화제 능력을 강화시켰다. 문헌 [Peng et al., *Toxicol. Lett.*

193:159-166, 2010] 참조.

- [0037] 또 다른 연구에서, PON1은 Fc 도메인의 C-말단에 융합되었고, 인간 인슐린 수용체 (HIR)에 대한 항체를 사용하여 이중특이적 분자로서 발현하였다. HIRMAb-PON1이라고 명명된 이 분자는 CHO 세포에서 발현 후에 안정하였고, 레서스 원숭이에서 높은 혈액 농장벽 투과를 갖는 것으로 제시되었지만 간에 의해 급속히 제거되었다. 문헌 [Boado et al., *Biotechnol. Bioeng.* 108: 186-196, 2011] 참조.

헬소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제

- [0039] 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH)는 인지질 예컨대 혈소판-활성화 인자 및 산화된 인지질의 단쇄 아실 기를 가수분해하여 그의 염증성 특성을 감소시키는 LDL 및 HDL-연관 효소이다. 문헌 [Watson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:774-782, 1995; Stafforini, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23:73-83, 2009] 참조. 아데노바이러스-매개 유전자 전달을 통한 PAF-AH로의 요법은 래트 모델에서 단백뇨 및 사구체경화증을 완화시키는 것으로 보고된 바 있다. 문헌 [Iso-O *et al.*, *Molecular Therapy* 13:118-126, 2006] 참조. PAF-AH는 또한 래트에서 파라세타몰 중독 후에 간 회복을 증진시켰고, PAF는 고용량의 아세트아미노펜으로부터 간 독성과 연관되어 있다. 문헌 [Grypioti *et al.*, *Dig. Dis. Sci.* 52:2580-2590, 2007; Grypioti *et al.*, *Dig. Dis. Sci.* 53:1054-1062, 2008] 참조. 기능 상실을 유발하는 PAF-AH에서의 돌연변이는 일본인의 4%에서 존재하고, PAF-AH는 이들 개체에서 심혈관 질환 및 뇌졸중에 대한 독립적 위험 인자인 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Blankenberg *et al.*, *J. Lipid Res.* 44:1381-1386, 2003] 참조. 재조합 PAF-AH는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)을 갖는 환자 및 폐혈증을 갖는 환자에서 III상 임상 시험에 시험되었다. 문헌 [Karabina *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1761:1351-1358, 2006] 참조.

콜레스테릴 에스테르 전달 단백질

- [0041] 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질 (CETP)은 고-밀도 지단백질 (HDL)로부터 저밀도 및 초저밀도 지단백질 (LDL 및 VLDL)로 콜레스테릴 에스테르를 수송한다. 많은 CETP 억제제가 개발되고 임상 시험에서 실험된 바 있다. 토레세트라피브는 후기 단계 임상 시험으로 진보하는 첫번째 CETP 억제제였고, 항아테롬 발생 HDL 콜레스테롤 수준을 높이면서 프로아테롬 LDL 콜레스테롤 수준을 낮추는 혈장 지단백질 수준에 대한 유의한 효과를 제시하였다. 토레세트라피브는 CETP 내에 깊게 결합하고 소수성 터널의 N-말단 포켓에서 결합된 콜레스테릴 에스테르를 이동시키고 포켓으로부터 인지질을 대체한다. 문헌 [Liu et al., *J. Biol. Chem.* 287:37321-37329, 2012] 참조. CETP 억제제가 심혈관 질환의 요법에 유용할 수 있는 초기 희망은 충족되지 않았고; 4종의 억제제는 후기 단계 임상 시험에 도달했지만 심혈관 사건에서 감소를 제시하는데 실패하였다. 문헌 [Kosmas et al., *Clinical Medical Insights: Cardiology* 2016: 10 37-42 doi: 10.4137/CMC.S32667] 참조.

- [0042] CETP 억제제 및 심혈관 질환의 대안적인 관점이 부각된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Miller, *F100Research* 3:124, 2014] 참조. CETP의 방어적인 역할에 대한 증거가 늘어나고 있다. 예를 들어, 인간에서의 다중 연구는 현재 심혈관 질환이 CETP 수준에 대해 반비례 관계가 있다는 것을 제시한다. 추가로, 간 분비를 감소시킨 CETP 대립유전자는 심근경색의 증가된 위험과 연관된다. 상기 문헌 [Miller] 참조. CETP 억제제가 HDL 콜레스테롤 수준을 증가시키고 따라서 심혈관 질환을 감소시키는데 유익할 수 있다는 독창적인 생각은 맞지 않을 수 있다. HDL 콜레스테롤은 그의 지질 수송 기능 때문에 유익하고, HDL로부터 LDL 및 VLDL로의 콜레스테릴 에스테르의 CETP-매개 전달은 이 기능의 중요한 구성성분일 가능성이 있다.

발명의 내용

- [0043] 한 측면에서, 본 발명은 ApoA1-L1-D를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하는 융합 폴리펩티드이며, 여기서 ApoA1은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267, 25-267, 또는 1-267과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택된 제1 폴리펩티드 세그먼트이고; L1은 제1 폴리펩티드 링커이고; D는 이량체화 도메인인 융합 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, L1은 적어도 2개 아미노산 잔기, 적어도 3개 아미노산 잔기, 또는 적어도 16개 아미노산 잔기를 포함한다. 예를 들어, 특정한 변이에서, L1은 2 내지 60개 아미노산 잔기, 3 내지 60개 아미노산 잔기, 5 내지 40개 아미노산 잔기, 15 내지 40개 아미노산 잔기, 또는 16 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어진다. 보다 구체적인 변이에서, L1은 16개 아미노산 잔기, 21개 아미노산 잔기, 26개 아미노산 잔기, 31개 아미노산 잔기, 또는 36개 아미노산 잔기로 이루어지고; 일부 이러한 실시양태에서, L1은 서열식별번호: 22의 잔기 268-283, 서열식별번호: 26의 잔기 268-288, 서열식별번호: 2의 잔기 268-293, 서열식별번호: 54, 또는 서열식별번호: 24의 잔기 268-303에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는, 여기서 제1 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 세그먼트와 링커 L1, 그리고 이량체화 도메인인 D로 구성되는 융합 폴리펩티드이다.

리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 2의 잔기 19-267 또는 25-267에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0044]

상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, D는 이뮤노글로불린 종체 불변 영역 예컨대, 예를 들어, 이뮤노글로불린 Fc 영역이다. 이량체화 도메인이 이뮤노글로불린 Fc 영역인 특정 실시양태에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역 예컨대, 예를 들어, 야생형 인간 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 인간 Fc 변이체이다. 특히 적합한 Fc 영역은 인간 γ 1 및 γ 3 Fc 영역을 포함한다. 일부 변이에서, Fc 영역은, Eu 잔기 C220이 세린에 의해 대체된 인간 γ 1 Fc 변이체이고; 일부 이러한 실시양태에서 Eu 잔기 C226 및 C229는 각각 세린에 의해 대체되고/거나, Eu 잔기 P238은 세린에 의해 대체된다. 상기와 같은 Fc 영역을 포함하는 추가의 변이에서, Fc 영역은, Eu 잔기 P331이 세린에 의해 대체된 인간 γ 1 Fc 변이체이다. Fc 변이체는 야생형 인간 서열에 비해 글리코실화를 감소시키는 아미노산 치환을 포함할 수 있고; 일부 이러한 실시양태에서, Eu 잔기 N297은 또 다른 아미노산으로 대체된다. 상기와 같은 Fc 영역을 포함하는 추가의 변이에서, Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 증가 또는 감소시키는 아미노산 치환 (예를 들어, Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 중 적어도 하나에 대한 결합 친화성을 증가 또는 감소시키는 아미노산 치환)을 포함하는 Fc 변이체이다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합 친화성을 증가 또는 감소시키는 아미노산 치환을 포함한다. 적합한 Fc 영역은 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 294-525 또는 294-524에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 및 (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 294-525 또는 294-524에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0045]

상기와 같은 융합 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 26의 잔기 19-520, 19-519, 25-520, 또는 25-519, 또는 (vi) 서열식별번호: 24의 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 구체적인 변이에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 26의 잔기 19-520, 19-519, 25-520, 또는 25-519, 또는 (vi) 서열식별번호: 24의 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0046]

상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함한다. 특정한 변이에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), 또는 아밀로이드 베타 ($A\beta$)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, $A\beta$ -특이적 scFv이다. 상기와 같은 제2 폴리펩티드를 포함하는 융합 폴리펩티드는 식 ApoA1-L1-D-L2-P (아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지)에 의해 나타내어질 수 있으며, 여기서 ApoA1, L1, 및 D는 각각 상기와 같이 정의되며, 여기서 L2는 제2 폴리펩티드 링커이고 임의적으로 존재하고, 여기서 P는 제2 폴리펩티드 세그먼트이다. L2가 존재하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, L2는 서열식별번호: 4의 잔기 526-541에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0047]

또 다른 측면에서, 본 발명은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택된 제1 폴리펩티드 세그먼트, 및 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), 및 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, $A\beta$ -특이적 scFv로부터 선택되는 것인 융합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 2의 잔기 19-267 또는 25-267에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 변이에서, 융합 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 및 제2 폴리펩티드 세그먼트에 대해 아미노-말단에 위치된 링커 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메인을 추가로 포함한다.

[0048]

제2 폴리펩티드 세그먼트로서 RNase를 포함하는 상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, RNase는 인간 RNase 1 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 특정 실시양태에서, RNase는 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 542-675와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 구체적인 변이에서, RNase는 서열식별번호: 4의 잔기 542-675에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. RNase를 포함하고 상기와 같은 식 ApoA1-L1-D-L2-P를 갖는 융

합 폴리펩티드의 특정한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 잔기 19-675 또는 25-675, 또는 (ii) 서열식별번호: 14의 잔기 19-675 또는 25-675와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 잔기 19-675 또는 25-675, 또는 (ii) 서열식별번호: 14의 잔기 19-675 또는 25-675에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0049] 제2 폴리펩티드 세그먼트로서 파라옥소나제를 포함하는 상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 파라옥소나제는 인간 파라옥소나제 1 (PON1) 또는 그의 기능적 변이체이다. 특정 실시양태에서, 파라옥소나제는 서열식별번호: 12의 아미노산 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 아미노산 잔기 16-355, 또는 서열식별번호: 44의 아미노산 잔기 16-355와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 구체적인 변이에서, 파라옥소나제는 서열식별번호: 12의 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 잔기 16-355, 또는 서열식별번호: 44의 잔기 16-355에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 파라옥소나제를 포함하고 상기와 같은 식 ApoA1-L1-D-L2-P를 갖는 융합 폴리펩티드의 특정한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 잔기 19-883 또는 25-883에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0050] 제2 폴리펩티드 세그먼트로서 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH)를 포함하는 상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제는 인간 PAF-AH 또는 그의 기능적 변이체이다. 특정 실시양태에서, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제는 서열식별번호: 32의 아미노산 잔기 22-441과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 구체적인 변이에서, 파라옥소나제는 서열식별번호: 32의 잔기 22-441에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제를 포함하고 상기와 같은 식 ApoA1-L1-D-L2-P를 갖는 융합 폴리펩티드의 특정한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 34의 잔기 19-963 또는 25-963과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 34의 잔기 19-963 또는 25-963에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0051] 제2 폴리펩티드 세그먼트로서 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP)을 포함하는 상기와 같은 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질은 인간 CETP 또는 그의 기능적 변이체이다. 특정 실시양태에서, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질은 서열식별번호: 30의 아미노산 잔기 18-493과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 구체적인 변이에서, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질은 서열식별번호: 30의 잔기 18-493에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제를 포함하고 상기와 같은 식 ApoA1-L1-D-L2-P를 갖는 융합 폴리펩티드의 특정한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 40의 잔기 19-1019 또는 25-1019와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 40의 잔기 19-1019 또는 25-1019에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0052] 상기와 같은 융합 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 억제제에 연결된다.

[0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 융합 폴리펩티드 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 상기 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같은, 이량체화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드인 이량체 단백질을 제공한다.

[0054] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0055] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 작동가능하게 연결된 요소를 포함하는 발현 벡터를 제공한다: 전사 프로모터, 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 세그먼트, 및 전사 터미네이터. 또한 상기와 같은 발현 벡터가 도입되어 있는 배양된 세포이며, 여기서 세포는 DNA 세그먼트를 발현하는 것인 세포를 제공한다.

[0056] 또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양하며, 여기서 세포가 DNA 세그먼트를 발현하고, 코딩된

융합 폴리펩티드가 생성되는 것, 및 융합 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

- [0057] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 이량체 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양하며, 여기서 세포가 DNA 세그먼트를 발현하고, 코딩된 융합 폴리펩티드가 이량체 단백질로서 생성되는 것, 및 이량체 단백질을 회수하는 것을 포함한다.
- [0058] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0059] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 이량체 단백질 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0060] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 심혈관 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 심혈관 질환은 관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 변이에서, 관상동맥 심장 질환은 급성 관상동맥 증후군을 특징으로 한다.
- [0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 신경변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 신경변성 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 신경변성 질환은 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 신경변성 질환은 치매를 특징으로 하며, 일부 이러한 변이에서, 신경변성 질환은 알츠하이머병이다.
- [0062] 또 다른 측면에서, 본 발명은 아밀로이드 침착물을 특징으로 하는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 아밀로이드 침착물을 특징으로 하는 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 질환은 알츠하이머병이다.
- [0063] 또 다른 측면에서, 본 발명은 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 자가면역 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0064] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 염증성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 염증성 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 비만, 비-알콜성 지방간염, 관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 염증성 질환은 염증성 폐 질환 예컨대, 예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기관지확장증, 특발성 폐 섬유증, 고산소증, 저산소증 또는 급성 호흡 곤란 증후군이다.
- [0065] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 감염성 질환을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 감염성 질환은 박테리아 감염을 특징으로 하며; 일부 이러한 실시양태에서, 박테리아 감염은 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 감염이다.
- [0066] 또 다른 측면에서, 본 발명은 신증후군 (NS)을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 신증후군을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 변이에서, 대상체의 신증후군은 원발성 신장 질환 (예를 들어, 최소-변화 신병증, 초점성 사구체경화증, 막성 신병증, 또는 IgA 신병증), 아밀로이드증, 전신 홍반성 루푸스, 제1형 당뇨병 및 제2형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환과 연관된다.
- [0067] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 황 머스타드 기체 또는 유기포스페이트에 대한 노출을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 황 머스타드 기체 또는 유기포스페이트에 노출된 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다.
- [0068] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 암을 갖는 대상체에게 유효량의 상기 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다.

일부 실시양태에서, 암은 악성 흑색종, 신세포 암종, 비소세포 폐암, 방광암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 변이에서, 암 치료는 조합 요법이다. 일부 조합 요법 실시양태에서, 조합 요법은 비-ApoA1-매개 면역조정 요법 예컨대, 예를 들어, 항-PD-1/PD-L1 요법, 항-CTLA-4 요법, 또는 둘 다를 포함하는 면역조정 요법을 포함한다. 다른 조합 요법 실시양태에서, 조합 요법은 방사선 요법 또는 화학요법을 포함한다. 일부 조합 요법 실시양태에서, 조합 요법은 표적화된 요법을 포함하며; 일부 이러한 실시양태에서, 표적화된 요법은 (i) 특이적 세포-표면 또는 세포외 항원을 표적화하는 치료 모노클로날 항체 (예를 들어, VEGF, EGFR, CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1) 또는 (ii) 세포내 단백질 예컨대, 예를 들어, 세포내 효소 (예를 들어, 프로테아솔, 티로신 키나제, 시클린-의존성 키나제, 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-Raf (BRAF) 또는 MEK 키나제)를 표적화하는 소형 분자를 포함한다.

[0069] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 하기 상세한 설명을 참조하면 분명해질 것이다.

[0070] 정의

[0071] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 기재된 방법 및 조성물에 관련한 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 하기 용어 및 어구는 달리 명시되지 않는 한 그에 대해 설명된 의미를 갖는다.

[0072] 단수형 용어는 문맥이 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0073] "폴리펩티드"는 천연적으로 또는 합성적으로 생성되든지 간에, 웨პ티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 중합체이다. 약 10개 미만의 아미노산 잔기의 폴리펩티드는 통상적으로 "펩티드"로 지칭된다.

[0074] "단백질"은 1개 이상의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 거대분자이다. 단백질은 비-펩티드성 구성성분, 예컨대 탄수화물 기를 또한 포함할 수 있다. 탄수화물 및 다른 비-펩티드성 치환기는 단백질이 생성되는 세포에 의해 단백질에 첨가될 수 있고, 세포의 종류에 따라 변할 것이다. 단백질은 그의 아미노산 백본 구조의 관점에서 본원에 정의되며; 치환기 예컨대 탄수화물 기는 일반적으로 특정되지 않지만, 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다.

[0075] 용어 "아미노-말단" (또는 "N-말단") 및 "카르복실-말단" (또는 "C-말단")은 폴리펩티드 내에서의 위치를 나타내기 위해 본원에 사용된다. 문맥이 허용하는 경우, 이들 용어는 근접성 또는 상대적 위치를 나타내기 위해 폴리펩티드의 특정한 서열 또는 부분을 참조하여 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드 내에서의 참조 서열에 대해 카르복실-말단에 위치된 특정 서열은 참조 서열의 카르복실 말단에 근접하게 위치되지만, 반드시 완전한 폴리펩티드의 카르복실 말단에 있는 것은 아니다.

[0076] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 본원에서 동의어로 사용되며 5'에서 3' 말단으로 판독되는 테옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일- 또는 이중-가닥 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 RNA 및 DNA를 포함하며, 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 시험관 내에서 합성될 수 있거나, 또는 천연 및 합성 분자의 조합물로부터 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 크기는 염기 쌍 ("bp"로 약칭됨), 뉴클레오티드 ("nt"), 또는 킬로염기 ("kb")로 표현된다. 문맥이 허용되는 경우에, 후자의 2가지 용어는 단일-가닥 또는 이중-가닥인 폴리뉴클레오티드를 기재할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 2개 가닥이 길이상 약간 상이할 수 있고 그의 말단이 효소적 절단의 결과로서 엇갈릴 수 있으므로, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 분자 내의 모든 뉴클레오티드가 쌍형성되지 않을 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다. 이러한 쌍형성되지 않은 말단은 일반적으로 길이가 20 nt를 초과하지 않을 것이다.

[0077] "세그먼트"는 명시된 속성을 갖는 보다 큰 분자 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드)의 일부이다. 예를 들어, 명시된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 세그먼트는 5'에서 3' 방향으로 판독되는 경우에, 명시된 폴리펩티드의 아미노산의 서열을 코딩하는 보다 긴 DNA 분자의 일부, 예컨대 플라스미드 또는 플라스미드 단편이다. 또한, 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드의 문맥에서, "콜레스테롤 유출 활성을 갖는" 및 "서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는" 폴리펩티드 세그먼트는 콜레스테롤 유출 활성을 갖는 명시된 폴리펩티드 세그먼트 이외에, 본원에 기재된 바와 같은 다른 폴리펩티드 세그먼트 (예를 들어, 링커(들), 이량체화 도메인)를 포함하는 보다 긴 폴리펩티드 융합 분자의 일부이다.

[0078] 용어 "발현 벡터"는 그의 전사를 위해 제공하는 추가적인 세그먼트에 작동가능하게 연결된 관심 폴리펩티드를 코딩하는 세그먼트를 포함하는, 선형 또는 환상, DNA 분자를 나타내기 위해 사용된다. 이러한 추가적인 세그먼트는 프로모터 및 터미네이터 서열을 포함하고, 하나 이상의 복제 기점, 하나 이상의 선택가능 마커, 인핸서, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터

유래되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유할 수 있다.

[0079] 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제의 결합 및 전사 개시를 제공하는 DNA 서열을 함유하는 유전자의 일부를 나타내기 위해 관련 기술분야에서 인식되어 있는 의미로 본원에 사용된다. 프로모터 서열은 항상은 아니지만, 통상적으로 유전자의 5' 비-코딩 영역에서 발견된다.

[0080] "분비 신호 서열"은 보다 큰 폴리펩티드의 구성성분으로서, 보다 큰 폴리펩티드가 합성되는 세포의 분비 경로를 통과하도록 지시하는 폴리펩티드 ("분비 웨이드")를 코딩하는 DNA 서열이다. 보다 큰 폴리펩티드는 통상적으로 분비 경로를 통한 수송 동안 분비 웨이드를 제거하기 위해 절단된다.

[0081] "작동가능하게 연결된"은 둘 이상의 실체가 그들의 의도된 목적을 위해 일제히 기능하도록 함께 연결되는 것을 의미한다. DNA 세그먼트를 지칭하는 경우에, 예를 들어, 코딩 서열이 정확한 판독 프레임 내에서 연결되고, 전사가 프로모터에서 개시되고 코딩 세그먼트(들)를 통해 터미네이터까지 진행된다는 것을 나타낸다. 폴리펩티드를 지칭하는 경우에, "작동가능하게 연결된"은 공유적으로 (예를 들어, 디슬퍼드 결합에 의해) 및 비-공유적으로 (예를 들어, 수소 결합, 소수성 상호작용, 또는 염-브릿지 상호작용에 의해) 연결된 서열 둘 다를 포함하며, 여기서 서열의 목적되는 기능(들)은 유지된다.

[0082] 용어 "재조합"은 예를 들어, 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터와 관련하여 사용될 때, 이러한 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되어 있거나, 또는 이러한 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 천연 (비-재조합) 형태의 세포 내에 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는 달리 비정상적으로 발현되거나 과소-발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다. 본원에서 용어 "재조합 핵산"은, 일반적으로, 예를 들어, 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제를 사용하여 핵산을 조작함으로써 자연에서 정상적으로 발견되지 않는 형태로 본래 시험관내에서 형성되는 핵산을 의미한다. 이 방식으로, 상이한 서열의 작동가능한 연결이 달성된다. 따라서, 선형 형태로 단리된 핵산 또는 정상적으로 연결되지 않는 DNA 문자를 라이게이션시켜 시험관내에서 형성된 발현 벡터는 둘 다 본원에 개시된 목적을 위해 재조합된 것으로 간주된다. 재조합 핵산이 제조되고 숙주 세포 또는 유기체에 재도입되면, 이는 비-재조합적으로, 즉 시험관내 조작보다는 숙주 세포의 생체내 세포 기작을 사용하여 복제될 것이지만, 이러한 핵산은, 재조합적으로 생성되면, 이후에 비-재조합적으로 복제된다 하더라도, 여전히 본원에 개시된 목적을 위해 재조합된 것으로 간주되는 것으로 이해된다. 유사하게, "재조합 단백질"은 재조합 기술을 사용하여, 즉 상기 도시된 바와 같은 재조합 핵산의 발현을 통해 제조된 단백질이다.

[0083] 핵산의 일부와 관련하여 사용될 때, 용어 "이종"은 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 전형적으로 새로운 기능적 핵산이 제조되도록 배열된 비관련 유전자들로부터 2개 이상의 서열, 예컨대 한 공급원으로부터의 프로모터 및 또 다른 공급원으로부터의 코딩 영역을 갖도록 재조합적으로 생성된다. 유사하게, "이종"은, 단백질의 일부와 관련하여 사용될 때, 단백질이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열 (예를 들어, 2개 또는 융합 폴리펩티드의 세그먼트)을 포함하는 것을 나타낸다.

[0084] "이뮤노글로불린"은 척추동물 유기체에서 항체로서 기능하는 혈청 단백질이다. 5가지 클래스의 "이뮤노글로불린", 또는 항체, 단백질 (IgG, IgA, IgM, IgD, 및 IgE)이 고등 척추동물에서 식별되어 있다. IgG는 주요 클래스를 포함하고; 보통 혈장에서 발견된 두번째로 가장 풍부한 단백질로서 존재한다. 인간에서, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 명명된 4가지 하위클래스로 이루어진다. IgG 클래스의 중쇄 불변 영역은 그리스 문자 γ 로 식별된다. 예를 들어, IgG1 하위클래스의 이뮤노글로불린은 $\gamma 1$ 중쇄 불변 영역을 함유한다. 각각의 이뮤노글로불린 중쇄는 한 종에서 소정의 하위부류에 대해 본질적으로 가변적이지 않는 불변 영역 단백질 도메인 (CH1, 힌지, CH2, 및 CH3)으로 이루어진 불변 영역을 보유한다. 인간 및 비-인간 이뮤노글로불린 쇄를 코딩하는 DNA 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Ellison et al., *DNA* 1:11-18, 1981; Ellison et al., *Nuc. Acids Res.* 10:4071-4079, 1982; Kenten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6661-6665, 1982; Seno et al., *Nuc. Acids Res.* 11:719-726, 1983; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Amster et al., *Nuc. Acids Res.* 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, *Nature* 314:330-334, 1985; Boss et al., *Nuc. Acids Res.* 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., *Nature* 298:380-382, 1982; van der Loo et al., *Immunogenetics* 42:333-341, 1995; Karlin et al., *J. Mol. Evol.* 22:195-208, 1985; Kindsvogel et al., *DNA* 1:335-343, 1982; Breiner et al., *Gene* 18:165-174, 1982; Kondo et al., *Eur. J. Immunol.* 23:245-249, 1993] 및 진뱅크(GenBank) 기탁 번호 J00228 참조. 이뮤노글로불린 구조 및 기능의 검토를 위해,

문헌 [Putnam, *The Plasma Proteins, Vol V*, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; 및 Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994] 참조.

[0085] "이뮤노글로불린 헌지"는 CH1 및 CH2 도메인을 연결하는 이뮤노글로불린 중쇄의 일부이다. 인간 γ1의 헌지 영역은 대략 Eu 잔기 216-230에 상응한다.

[0086] 용어 "Fc 단편", "Fc 영역", 또는 "Fc 도메인"은, 본원에 사용된 바와 같이, 동의어이며 세포 상의 항체 수용체에 대한 결합을 담당하는 이뮤노글로불린의 일부 및 보체의 C1q 구성성분 (천연 발생 서열에 비해, 이러한 결합 활성을 제거하는 임의의 아미노산 변화의 부재 하에)을 지칭한다. Fc는 단백질 결정을 용이하게 형성할 항체의 단편인 "단편 결정질"을 나타낸다. 단백질분해적 소화에 의해 원래 기재되었던, 구별되는 단백질 단편은 이뮤노글로불린 단백질의 전체적인 일반적인 구조를 정의할 수 있다. 문헌에서 원래 정의된 바와 같이, Fc 단편은 디슬피드-연결된 중쇄 헌지 영역, CH2, 및 CH3 도메인으로 이루어진다. 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어는 또한 CH3, CH2, 및 제2의 이러한 쇄와 디슬피드-연결된 이량체를 형성하기에 충분한 헌지의 적어도 일부로 이루어진 단일쇄를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 Fc 영역은 천연 발생 서열의 변이체를 추가로 포함하며, 여기서 변이체는 이량체를 형성할 수 있고 증가된 또는 저하된 Fc 수용체-결합 또는 보체-결합 활성을 갖는 이러한 변이체를 포함한다.

[0087] "이량체화 도메인"은, 본원에 사용된 바와 같이, 2개 폴리펩티드가 생리학적 조건 하에 회합하여 이량체를 형성하도록 하는, 제2 폴리펩티드에 대한 친화성을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 일부 변이에서 제2 폴리펩티드가 상이할지라도, 제2 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드이다. 폴리펩티드는 공유 및/또는 비-공유 회합(들)을 통해 서로 상호작용할 수 있다. 이량체화 도메인의 예는 Fc 영역; 헌지 영역; CH3 도메인; CH4 도메인; CH1 또는 CL 도메인; 류신 지퍼 도메인 (예를 들어, jun/fos 류신 지퍼 도메인, 예를 들어, 문헌 [Kostelney *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-1553, 1992] 참조; 또는 효모 GCN4 류신 지퍼 도메인); 이소류신 지퍼 도메인; 이량체화 세포-표면 수용체 (예를 들어, 인터류킨-8 수용체 (IL-8R); 또는 인테그린 이종이량체 예컨대 LFA-1 또는 GPIIb/IIIa)의 이량체화 영역; 분비된, 이량체화 리간드 (예를 들어, 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 인터류킨-8 (IL-8), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 또는 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF); 예를 들어, 문헌 [Arakawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:27833-27839, 1994, 및 Radziejewski *et al.*, *Biochem.* 32:1350, 1993] 참조)의 이량체화 영역; 및 디슬피드 결합(들)이 폴리펩티드 및 적어도 1개 시스테인 잔기 (이하에 "합성 헌지")를 포함하는 제2 폴리펩티드 사이에 형성될 수 있도록 하는 적어도 1개 시스테인 잔기 (예를 들어, 약 1, 2, 또는 3 내지 약 10개 시스테인 잔기)를 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명에 따른 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역이다.

[0088] 용어 "이량체" 또는 "이량체 단백질"은 본원에 사용된 바와 같이, 이량체화 도메인을 통해 함께 연결된 본원에 기재된 바와 같은 2개 ("제1" 및 "제2") 융합 폴리펩티드의 다량체를 지칭한다. 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, "이량체" 또는 "이량체 단백질"은 예컨대 이량체화된 제1 및 제2 융합 폴리펩티드와 존재할 수 있는 또 다른 ApoA-1 폴리펩티드의 상호작용을 통해 (예를 들어, 천연 발생 내인성 ApoA-1 단백질과의 상호작용을 통해), 구형 HDL 입자를 형성할 수 있는 보다 고차원의 다량체 (예를 들어, 삼량체)의 문맥에서 이러한 이량체화된 제1 및 제2 융합 폴리펩티드에 관한 지칭을 포함한다. 용어는 또한 제1 또는 제2 융합 폴리펩티드에 추가적인 이량체화 도메인을 포함하여 생성될 수 있는 보다 고차원의 다량체의 문맥에서 이량체화된 제1 및 제2 융합 폴리펩티드에 대한 지칭을 포함한다 (예를 들어, 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 제1 융합 폴리펩티드 및 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 제2 융합 폴리펩티드는 CH1 및 CL 도메인 사이의 상호작용을 통해 이종 이량체화될 수 있고, 2개의 이러한 이종이량체는 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역을 통해 추가로 이량체화될 수 있고, 그로 인해 사량체가 형성될 수 있음).

[0089] 용어 "링커" 또는 "폴리펩티드 링커"는 펩티드 결합(들)에 의해 연결되고 2개의 이산된, 별개의 폴리펩티드 영역을 연결하는 2개 이상의 아미노산을 나타내기 위해 본원에 사용된다. 링커는 전형적으로 그들의 별개의 기능을 수행하기 위해 별개의 폴리펩티드를 허용하도록 디자인된다 (예컨대, 예를 들어, 여기서 다른 폴리펩티드 영역에 연결된 이량체화 도메인은 또 다른, 상응하는 이량체화 도메인과 회합하여 이량체를 형성함). 링커는 천연 서열, 그의 변이체, 또는 합성 서열의 일부일 수 있다. 링커는 또한 약어 "L"을 사용하여 본원에 지칭된다. 아래첨자 (예를 들어, "1" 또는 "2")와 "L"의 사용은 링커가 아미노산 서열에 대해 동일하거나 상이할 수 있는 폴리펩티드 쇄 내의 다중 링커 사이를 구분하기 위해 본원에 사용된다.

[0090] 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, "ApoA-1"에 대한 본원의 지칭은 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드 뿐만 아니라 그의 기능적 변이체, 기능적 단편, 및 모방체를 포함하는 것으로 이해된다. "ApoA1", "Apo A-1", "apoA-1",

및 "apo A-1"은 "ApoA1"과 동의어로 본원에 사용된다.

[0091] 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, "RNase" (예를 들어, "RNase 1"), "파라옥소나제" (예를 들어, "PON1"), "헬소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제" ("PAF-AH"), "콜레스테롤 에스테르 전달 단백질" ("CETP"), 또는 "레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제" ("LCAT")에 대한 본원의 지칭은 상기 중 임의의 천연 발생 폴리펩티드, 뿐만 아니라 그의 기능적 변이체 및 기능적 단편을 포함하는 것으로 이해된다.

[0092] 용어 "대립유전자 변이체"는 동일한 염색체 로커스를 차지하는 유전자의 임의의 2개 이상의 대안적인 형태를 나타내기 위해 본원에 사용된다. 대립유전자 변이는 돌연변이를 통해 자연적으로 일어나고, 집단 내에서 표현형 다양성을 유발할 수 있다. 유전자 돌연변이는 침묵일 수 있거나 (코딩된 폴리펩티드에서 변화 없음) 또는 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 용어 대립유전자 변이체는 또한 유전자의 대립유전자 변이체에 의해 코딩된 단백질을 나타내기 위해 본원에 사용된다.

[0093] 본 개시내용의 ApoA-1 융합 폴리펩티드는, 예를 들어, "ApoA1-L1-D," "ApoA1-L1-D-L2-P," "ApoA1-L1-[Fc 영역]," "ApoA1-L1-D-L2-RNase," "ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1," "ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제," 또는 "ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1"와 같은 식에 의해 본원에 지칭될 수 있다. 각각의 이러한 경우에, 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, 융합 폴리펩티드의 특정한 세그먼트를 지칭하는 용어 (예를 들어, "ApoA1", "D" (이량체화 도메인에 대해), "L1" (제1 폴리펩티드 링커에 대해), "Fc 영역", "RNase", "파라옥소나제" 등)는 본원에서 이러한 용어에 부여된 의미를 갖는 것으로 이해되고 본원에 기재된 바와 같은 다양한 실시양태를 포함한다.

[0094] 본원에 기재된 바와 같은 대상체에게의 가용성 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질의 투여에 의해 질환의 치료의 문맥에서, 용어 "유효량"은 질환의 1종 이상의 증상의 발생을 억제하거나 또는 그를 완화하는데 충분한 이러한 분자의 양을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 대상체에게의 이량체 ApoA1 융합 단백질의 투여에 의한 자가면역 질환의 치료의 특정한 문맥에서, 용어 "유효량"은 자가면역 질환의 1종 이상의 증상의 발생을 억제하거나 또는 그를 완화하도록 대상체에서 자가면역 반응을 조정하는데 충분한 이러한 분자의 양을 지칭한다. 작용제의 유효량은 "효과적인 레지멘"으로 본 발명의 방법에 따라 투여된다. 용어 "효과적인 레지멘"은 질환의 치료 또는 예방을 달성하는데 적당한 투여될 작용제의 양 및 투여 빈도의 조합을 지칭한다.

[0095] 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애를 치료하는 문맥에서, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 포유동물 예컨대, 예를 들어, 인간 및 다른 영장류를 포함한다. 상기 용어는 또한 가축 동물 예컨대, 예를 들어, 소, 돼지, 양, 말, 개, 및 고양이를 포함한다.

[0096] 용어 "조합 요법"은 지시된 치료 효과를 달성하는 적어도 2종의 구별되는 요법의 제공을 수반하는 치료 요법을 지칭한다. 예를 들어, 조합 요법은 2종 이상의 화학적으로 구별되는 활성 성분, 또는 작용제, 예를 들어, 본 발명에 따른 가용성 ApoA1 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질 및 또 다른 작용제 예컨대, 예를 들어, 또 다른 항염증제 또는 면역조정제의 투여를 수반할 수 있다. 대안적으로, 조합 요법은 본 발명에 따른 가용성 ApoA1 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질의, 단독 또는 다른 작용제와 함께 투여, 뿐만 아니라 또 다른 요법 (예를 들어, 방사선 요법)의 전달을 수반할 수 있다. 조합 요법을 구성하는 구별되는 요법은, 예를 들어, 동시적, 중첩적, 또는 순차적 투여 레지멘으로서 전달될 수 있다. 2종 이상의 화학적으로 구별되는 작용제의 투여의 문맥에서, 활성 성분은 동일한 조성물의 일부로 또는 상이한 조성물로서 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 별개의 조성물로서 투여되는 경우, 상이한 활성 성분을 포함하는 조성물은 동일한 또는 상이한 시점에, 동일한 또는 상이한 경로에 의해, 동일한 또는 상이한 투여 레지멘을 사용하여 투여될 수 있으며, 이들 모두는 특정한 문맥이 요구하는 바 및 주치의에 의해 결정되는 바이다.

[0097] 암을 치료하는 문맥에서, 용어 "비-ApoA1-매개 면역조정 요법"은 ApoA-1 또는 ApoA-1-매개 신호전달 경로를 특이적으로 표적화하지 않는 면역조정 요법을 의미한다.

[0098] 암을 치료하는 문맥에서, 용어 "표적화된 요법"은 전형적으로 정상 세포에 덜 유해한, 암 세포의 특정한 유형을 식별하고 공격하기 위해 치료제를 사용하는 치료의 유형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 요법은 암 세포의 성장 및 확산에 수반된 효소 및 다른 분자의 작용을 차단한다. 다른 실시양태에서, 표적화된 요법은 면역계가 암 세포를 공격하도록 돋겨나 또는 독성 물질을 직접적으로 암 세포로 전달한다. 특정 변이에서, 표적화된 요법은 소형 분자 약물 또는 모노클로날 항체를 치료제로서 사용한다.

[0099] 2개 아미노산 서열은 2개 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 최대 상응성을 위해 정렬될 때 동일한 경우에 "100% 아미노산 서열 동일성"을 갖는다. 서열 비교는 DNASTAR (위스콘신주 메디슨)에 의해 생성된 LASERGENE 생물정보학 컴퓨팅 스위트에 포함된 것들과 같은 표준 소프트웨어 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 최적 정렬을

결정함으로써 아미노산 서열을 비교하기 위한 다른 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있다. (예를 들어 문헌 [Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing* (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998)] 참조.) 2개 아미노산 서열은 2개 서열이 서로에 대해 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 서열 동일성을 적어도 갖는 경우에 "실질적인 서열 동일성"을 갖는 것으로 간주된다.

[0100] 퍼센트 서열 동일성은 통상적인 방법에 의해 결정된다. 예를 들어, 문헌 [Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48:603, 1986, 및 Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1992] 참조. 예를 들어, 2개 아미노산 서열은, 표 1에 제시된 바와 같이, 10의 캡 개방 폐널티, 1의 캡 연장 폐널티, 및 상기 문헌 [Henikoff and Henikoff]의 "BLOSUM62" 스코어링 매트릭스를 사용하여 정렬 스코어를 최적화하도록 정렬될 수 있다 (아미노산은 표준 1-문자 코드로 나타내어짐). 퍼센트 동일성은 이어서 하기와 같이 계산된다: ([동일한 매치의 총 수]/[보다 긴 서열의 길이 플러스 2개의 서열을 정렬시키기 위한 보다 긴 서열 내로 도입된 캡의 수])(100).

표 1: BLOSUM62 스코어링 매트릭스

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4					
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

[0102]

[0103] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 2개 아미노산 서열을 정렬하기 위해 이용가능한 많은 확립된 알고리즘이 있음을 인지한다. 피어슨(Pearson) 및 리프만(Lipman)의 "FASTA" 유사성 검색 알고리즘은 본원에 개시된 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열에 의해 공유된 동일성의 수준을 검사하기 위한 적합한 단백질 정렬 방법이다. FASTA 알고리즘은 문헌 [Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, 및 Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63, 1990]에 기재되어 있다. 간략하게, FASTA는 처음에 보존적 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 고려하지 않으면서, 최고 밀도의 동일성 (ktup 변수가 1인 경우) 또는 동일성의 쌍 (ktup=2인 경우)을 갖는 질의 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 2의 잔기 19-267 또는 25-267) 및 시험 서열에 의해 공유된 영역을 식별함으로써 서열 유사성을 특징으로 한다. 이어서, 최고 밀도의 동일성을 갖는 10개의 영역은 아미노산 치환 매트릭스를 사용하여 모든 쌍형성된 아미노산의 유사성을 비교함으로써 재스코어링되고, 영역의 단부는 최고 스코어에 기여하는 그러한 잔기만을 포함하도록 "트리밍된다". "컷오프" 값 (서열의 길이 및 ktup 값을 기반으로 한 소정의 식에 의해 계산됨)보다 더 큰 스코어를 갖는 여러 영역이 존재하면, 트리밍된 초기 영역은 영역이 캡을 갖는 대략적 정렬을 형성하도록 연결될 수 있는지 결정하기 위해 검사된다. 마지막으로, 2개 아미노산 서열의 최고 스코어링 영역은 아미노산 삽입 및 결실을 허용하는 니들만-분쉬-셀러스(Needleman-Wunsch-Sellers) 알고리즘 (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444, 1970; Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787, 1974)의

변형을 사용하여 정렬된다. FASTA 분석에 대한 예시적인 파라미터는 하기와 같다: ktup=1, 캡 개방 폐널티=10, 캡 연장 폐널티=1, 및 치환 매트릭스=BLOSUM62. 이들 파라미터는 문헌 [Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63, 1990]의 부록 2에서 설명된 바와 같이, 스코어링 매트릭스 파일 ("SMATRIX")을 변형함으로써 FASTA 프로그램에 도입될 수 있다.

[0104] 이러한 값이 "약" X 또는 "대략" X로 표현될 때, X의 지정된 값은 ±10%로 정확한 것으로 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0105] 도 1은 BHK 세포 배양물 ApoA-1 분자 및 그의 재조합 융합물에서의 콜레스테롤 유출을 예시한다. ApoA-1 및 Fc 영역 사이에 26개 아미노산 링커를 함유하는 ApoA-1-Fc 융합 단백질 (ApoA-1(26)Fc)은 2개 아미노산 링커를 갖는 ApoA-1-Fc 융합 단백질 (ApoA-1(2)Fc (테리오피온)) 또는 링커가 없는 ApoA-1-Fc 융합 단백질 (ApoA-1(0)Fc (시노 바이올))과 비교 시 증가된 콜레스테롤 유출을 입증하였고 야생형 인간 ApoA-1 (대조군 ApoA-1)과 유사한 활성을 가졌다. ApoA-1 분자는 ABCA1 발현을 위해 유도된 H3-콜레스테롤 표지화된 BHK 세포와 2시간 동안 인큐베이션되었다. Fc 단백질은 이량체인 것으로 예상되었지만; 제시된 농도는 분자당 ApoA-1의 질량을 기반으로 하여 계산되고 정규화되었다.

도 2a 및 2b는 구성성분 기능적 도메인을 포함한, 본 개시내용에 따른 융합 단백질의 특정 실시양태의 개략적 다이어그램을 제시한다. 도 2a는 인간 IgG Fc 영역에, 링커를 통해, 카르복실 말단에서 연결된 인간 ApoA-1 (또한 "THER 융합 단백질" 또는 "THER 분자"로서 본원에 지칭됨)의 개략도를 도시한다. 도 2b는 효소 영역에, 링커를 통해, 카르복실 말단에서 추가로 연결된 THER 융합 단백질 (이들 융합물은 또한 "이중기능적 효소 지질 수송" 또는 "BELT" 분자로 본원에 지칭되며; BELT 분자는 또한 일반적으로 THER 융합 단백질 또는 분자로서 본원에 지칭될 수 있음)의 개략도를 도시한다. 링커 서열 및 융합 단백질의 카르복실 말단에 존재하는 도메인은 구축물에 따라 달라진다.

도 3은 5종의 상이한 THER 분자를 발현하는 일시적으로 감염된 293T 세포로부터의 배양 상청액 (무혈청)의 웨스턴 블롯을 제시한다. 형질감염 및 웨스턴 블롯 분석은 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행되었다. 좌측에서 우측으로: 모의 - 모의 형질감염 음성 대조군; CD40IgG - CD40IgG DNA 형질감염 양성 대조군; THER0 - 2개 아미노산의 링커를 갖는 ApoA1-IgG 융합 단백질; THER2 - 16개 아미노산의 링커를 갖는 ApoA1-IgG 융합 단백질; THER4 - 26개 아미노산의 링커를 갖는 ApoA1-IgG 융합 단백질; THER6 - 36개 아미노산의 링커를 갖는 ApoA1-IgG 융합 단백질; THER4RNA - 인간 RNase1에 두번째 18개 아미노산 링커를 통해 추가로 연결된, 36개 아미노산의 링커를 갖는 ApoA1-IgG 융합 단백질.

도 4a-4e는 THER0 (도 4a), THER2 (도 4b), THER4 (도 4c), THER6 (도 4d), 및 THER4RNA2 (도 4e) ApoA-1 융합 단백질을 발현하는 안정한 CHO 클론의 초기 스크리닝 및 96 웰 배양 상청액으로부터의 융합 단백질의 상대 발현 수준을 요약하는 칼럼형 그래프를 제시한다 (하기 실시예 4 참조).

도 5a-5c는 보다 높은 수준의 융합 단백질을 발현한 THER 클론의 서브세트의 분석 결과를 제시하며, 이는 6 및 10일 배양 후의 그의 세포 성장 패턴 (도 5a), 상대 세포 생존율 (도 5b), 및 융합 단백질의 발현 (도 5c)을 평가한 것이다 (하기 실시예 4 참조).

도 6a 및 6b는 CHO 클론 소비된 배양 상청액으로부터 정제된 THER 융합 단백질의 비활원 (도 6a) 및 활원 (도 6b) SDS-PAGE 분석을 제시한다 (하기 실시예 4 참조).

도 7은 정제된 THER 융합 단백질의 네이티브 PAGE 젤 분석을 제시한다. 하기 실시예 4에 기재된 바와 같이 샘플을 제조하고 BLUE 네이티브 PAGE를 실행하고 염색하였다.

도 8은 융합 단백질의 항-IgG 포획 및 HRP-접합된 항-ApoA-1 항체로의 검출 단계를 사용하여, 샌드위치 ELISA에서 상이한 융합 단백질의 상대 결합을 요약하는 그래프를 제시한다 (하기 실시예 5 참조).

도 9는 정제된 ApoA1-IgG-RNase 이중특이적 융합 단백질 (THER4RNA2)의 연속 희석물의 샘플에 존재하는 RNase 활성을 측정하는 동역학적 효소 검정의 결과를 제시한다. RNASE얼러트(RNASEALERT)™ 검정 (IDT, 아이오와주 코랄빌)은 양성 대조군으로서의 RNase A ("RNase") 및 음성 대조군으로서의 ApoA-1-Ink26-hIgG ("THER4")를 사용하여, 하기 실시예 6에 기재된 바와 같이 수행하였다. 각각의 박스는 RNA의 소화 시 형광 신호를 생성하는 비-형광 RNA 기질의 고정 농도로, 45분 검정의 과정 동안 시간의 함수로서 관찰된 상대 형광 신호를 나타낸다.

도 10은 4 pmol/μl 단백질 희석으로 RNase 효소 활성을 비교한, 도 9에 제시된 데이터의 서브세트를 제시한다.

도 11은 정제된 융합 단백질 및 분화된 인간 단핵구 세포주, THP-1을 사용한 BODIPY-콜레스테롤 유출 검정의 결과를 제시한다. 검정은 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이 96 웰 플레이트 포맷으로 수행하였고, 데이터는 모든 샘플로부터 차감된 기준선 유출 (배지 단독)로, 5개 복제물로부터 관찰된 평균 유출로서 나타내었다.

도 12는 마우스 단핵구-대식세포 세포주 J774 A.1 (ATCC, 버지니아주 마나사스)을 사용한 콜레스테롤 유출 검정의 결과를 제시한다. 기준선 및 cAMP-자극된 유출 둘 다는 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0106] I. 개관

본 발명은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 ApoA1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편, 또는 대안적으로, ApoA-1 모방체인 제1 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 융합 폴리펩티드와 관련한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메인의 아미노-말단 단부 및 ApoA-1 폴리펩티드, 변이체, 단편 또는 모방체의 카르복실-말단 단부 사이의 펩티드 링커를 갖는 이량체화 도메인을 추가로 포함하며, 그로 인해 융합 폴리펩티드가 안정한 이량체를 형성하게 한다. 다른, 비-상호 베타적 측면에서, 융합 폴리펩티드는 ApoA-1 폴리펩티드, 변이체, 단편 또는 모방체에 대해 카르복실-말단인 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함하고 제2 생물학적 활성을 부여하는 이중특이적 구축물이다. 예시적인 제2 폴리펩티드는 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), 및 임의의 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 포함하며, 이를 중 어느 하나는 천연 발생 단백질 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편일 수 있다.

본 발명의 융합 분자는, 예를 들어, 대상체에서 역 콜레스테롤 수송을 증가시키고 다양한 질환의 치료에서 치료 이익을 제공하는데 사용될 수 있다. HDL의 주요 단백질인 ApoA-1은 이미 급성 관상동맥 증후군을 갖는 환자에서 임상 시험에서 유익한 활성을 제시한 바 있다. 본 발명의 ApoA-1 융합 분자는 관상동맥 심장 질환, 급성 관상동맥 증후군, 및 아데롬성동맥경화증 예컨대, 예를 들어, 뇌출증을 특징으로 하는 다른 심혈관 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 분자는 또한, 예를 들어, 자가면역 질환 (예를 들어, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스), 염증성 질환, 제2형 당뇨병, 비만 및 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)의 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질은 예컨대, 예를 들어, 제1형 당뇨병 및 치매의 치료에서 결합있는 ApoA-1을 대체하는데 사용된다. 특정 변이에서, 본원에 개시된 바와 같은 융합 단백질은 다발성 경화증 (MS)을 치료하는데 사용된다. ApoA-1 수준은 MS를 갖는 환자에서 낮아지는 것으로 제시된 바 있고 ApoA-1 결핍 마우스는 야생형 동물보다 MS에 대한 모델인 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE)에서 더 많은 신경변성 및 더 악화된 질환을 나타내는 것으로 제시된 바 있다. 문헌 [Meyers et al., *J. Neuroimmunol.* 277: 176–185, 2014] 참조. 데이터는 중추 신경계에 대한 ApoA-1의 양성 신경보호 효과를 추가로 시사한다. 문헌 [Gardner et al., *Frontiers in Pharmacology*: 20 November 2015 doi: 10.3389/fphar.2015.00278] 참조.

여러 연구는 자가면역 질환에 대한 ApoA-1 요법의 사용을 지지한다. 예를 들어, 전신 홍반성 루푸스 (SLE)를 갖는 환자는 낮은 HDL-콜레스테롤 수준을 갖고 존재하는 HDL은 종종 ApoA-1의 미엘로페옥시다제-매개 메티오닌 산화 및 티로신 염소화에 의해 손상되어 ABCA1-의존성 콜레스테롤 유출 활성의 손실을 유발한다. 문헌 [Shao et al., *J. Biol. Chem.* 281:9001-4, 2006; Hewing et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:779-89, 2014] 참조. 이는 SLE를 갖는 환자에서 보여진 항염증 특성의 손실 및 염증유발 HDL의 생성을 촉진한다. 문헌 [Skaggs et al., *Clin. Immunol.* 137:147-156, 2010; McMahon et al., *Arthritis Rheum.* 60:2428-2437, 2009] 참조. ApoA-1에 대한 자가항체는 SLE를 갖는 많은 환자에 존재하고, SLEDAI에 의해 평가된 SLE-질환 활성 및 SLICC/ACR 손상 인덱스에 의해 평가된 SLE 질환 관련된 기관 손상은 항-ApoA-1 항체와 긍정적으로 상호연관된다. 문헌 [Batukla et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 1108:137-146, 2007; Ahmed et al., *EXCLI Journal* 12:719-732, 2013] 참조. 추가로, 증가된 ApoA-1 농도는 루푸스 경향이 있는 SLE 1,2,3 마우스에서 자가면역 및 사구체신염을 악화시켰다. 문헌 [Black et al., *J. Immunol.* 195:4685-4698, 2015] 참조.

HDL의 콜레스테롤 유출 용량은 또한 높은 질환 활성을 갖는 류마티스 관절염 환자에서 손상되고 전신 염증 및 HDL 항산화제 활성의 손실과 상호연관된다. 문헌 [Charles-Schoeman et al., *Arthritis Rheum.* 60:2870-2879, 2009; Charles-Schoeman et al., *Ann. Rheum. Dis.* 71:1157-1162, 2012] 참조. ApoA-1 및 재구성된 HDL에 의한 루이스 래트에서의 관절염의 치료는 급성 및 만성 관절 염증을 감소시키고, 대식세포 TLR2 발현 및 활성화를 저하시켰다. 문헌 [Wu et al., *Arterioscler. Thromb. Basc. Biol.* 34:543-551, 2014] 참조. 프라바스타틴과 조합하여 ApoA-1 모방체 펩티드 D-4F를 갖는 래트에서의 콜라겐-유도된 관절염의 요법은 질환 활성을 유의하게

감소시켰다. 문헌 [Charles-Schoeman *et al.*, *Clin. Immunol.* 127:234-244, 2008] 참조.

[0111] 본 발명의 융합 분자는 또한 감염성 질환의 치료에 사용될 수 있다. 감염 및 내독소혈증 동안, ApoA-1의 감소 및 HDL 조성물 및 크기의 변화를 포함한 지질 대사 및 지단백질 조성의 유의한 변경이 발생한다. HDL은 그람-음성 LPS와 그람-양성 리포테이코산을 결합하고 중화시켜 이들 염증성 생성물의 클리어런스를 촉진할 수 있다. 약리학적 연구는 박테리아 감염 동안 재조합 ApoA-1의 이익을 지지한다. 예를 들어, 문헌 [Pirillo *et al.*, *Handb Exp Pharmacol.* 224:483-508, 2015] 참조.

[0112] 파라옥소나제 (예를 들어, PON1)를 함유하는 본 발명의 이중기능적 ApoA-1 융합 분자는 슈도모나스 아에루기노사, 그람 음성 박테리아에 감염된 환자의 요법에 특히 유용하다. 이는 피. 아에루기노사로의 감염이 공통인 면역손상 환자에서 특히 중요하다. 피. 아에루기노사는 퀘럼 센싱 (QS)으로 불리는 농도-의존적 프로세스에서 아실-호모세린 락톤으로 명명된 소형 신호전달 분자에 반응하여 병독성 인자를 분비하고 바이오플름을 형성한다. 파라옥소나제 1은 아실-호모세린 락تون을 분해하고, 어떠한 내인성 PON 상동체도 없는 드로소필라 멜라노가스터 (*Drosophila melanogaster*)의 트랜스제닉 생체내 모델에서 피. 아에루기노사로부터의 치사율로부터 보호하는 것으로 제시되었다. 문헌 [Estin *et al.*, *Adv. Exp. Biol.* 660:183-193, 2010] 참조.

[0113] 본 발명의 융합 분자는 또한 염증성 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질은 호중구, 대식세포, 및/또는 항원-제시 세포의 표현형을 변경하여 염증유발 반응을 감소시킬 수 있다. 본 발명의 분자는 수송체 분자 예컨대, 예를 들어, ABCA1에 의해 매개된, 세포 막으로부터의 콜레스테롤의 유출을 유발한다. 대식세포 및 수지상 세포를 포함한, 항원-제시 세포로부터의 콜레스테롤의 유출은 이들 세포에 의해 매개된 염증유발 반응을 억제하여, 염증성 시토카인의 감소된 생성을 유발할 수 있다. 연구는 항염증 효과를 매개하는데 있어서 ApoA-1의 이익을 지지한다. 예를 들어, ApoA-1로의 치료는 지질 래프트의 조성을 변경함으로써 CD40의 자극 후에 대식세포에서 염증유발 신호전달을 억제하는 것으로 제시되었다. 문헌 [Yin *et al.*, *J. Atherosclerosis and Thrombosis* 19:923-36, 2012] 참조. ApoA-1은 또한 지질 래프트로의 TRAF-6 동원의 저하 및 NF-κB의 활성화의 저하를 유발하는 것으로 제시되었다. 상기 문헌 참조. 또 다른 연구는 ApoA-1 또는 ApoA-1 모방체 4F로의 인간 단핵구 및 대식세포의 치료가 LPS에 대한 그들의 반응을 변경하여, 염증성 시토카인 MCP-1, MIP-1, RANTES, IL-6 및 TNF α의 저하된 생성을 유발하였지만, IL-10의 생성을 증가시켰던 것으로 제시되었다. 문헌 [Smythies *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C1538-48, 2010. doi:1152/ajpcell.00467.2009] 참조. 또 다른 연구는 ApoA-1로의 치료가 THP-1 세포로부터의 LPS-유도된 MCP-1 방출을 유의하게 저하시키고 CD11b 및 VCAM-1의 발현을 억제하였던 것으로 제시하였다. 문헌 [Wang *et al.*, *Cytokine* 49:194-2000, 2010] 참조. 따라서 ApoA-1은 인간 단핵구 및 대식세포의 활성화 및 부착을 억제하고, 항염증 표현형으로의 분화로 인해 큰 기능적 변화를 유도한다.

[0114] 염증성 폐 질환은 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자로 치료될 수 있는 염증성 질환 중에 있다. 혈청 ApoA-1은 조합된 아토피 및 천식을 갖는 환자에서 FEV1과 긍정적으로 상호연관되지만, 천식이 없는 아토피성 및 비아토피성 대상체에서는 그렇지 않은 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Barochia *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191:990-1000, 2015] 참조. 또 다른 연구에서, 특발성 폐 섬유증을 갖는 환자는 대조군과 비교하여 세기관지 세척액에서 ApoA-1의 낮은 수준을 가졌다 ($P<0.01$). 문헌 [Kim *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182:633-642, 2010] 참조. 추가로, 블레오마이신으로 치료된 마우스에서 ApoA-1로의 비강내 치료는 폐에서 염증 세포 및 콜라겐 침착의 수를 감소시키는데 매우 효과적이었다. 상기 문헌 참조.

[0115] 비만은 본 발명에 따른 ApoA-1 융합 분자로의 치료에 순응성인 또 다른 염증성 질환이다. 증거는 비만을 퇴치하기 위한 ApoA-1 및 HDL의 사용을 지지한다. 문헌 [Mineo *et al.*, *Circ. Res.* 111:1079-1090, 2012] 참조. 예를 들어, ApoA-1의 과다발현 또는 ApoA-1 모방체 웹티드 D-4F의 투여는 고-지방 식이를 공급한 마우스에서 백색 지방 질량 및 인슐린 저항성을 저하시키고 에너지 소비량을 증가시키는 것으로 제시된 바 있다. 추가로, ob/ob 마우스에서, ApoA-1 모방체 L-4F는 지방증 및 염증을 낮추고 글루코스 내성을 개선시키는 것으로 제시되었다. 상기 문헌 참조.

[0116] 본 발명에 따른 ApoA-1 융합 분자로 치료될 수 있는 또 다른 장애는 환자에서 심혈관 질환에 대한 더 높은 위험과 연관된 신증후군 (NS)이다. 여과가능한 HDL (즉, HDL3) 및 지질-부족 apo A1의 비뇨기 소모는 신증후군을 갖는 환자의 공통 특색이다. 이는 전형적으로 신장 근위 세관에서 쿠불린/메갈린 수용체를 통한 이들 분자의 저하된 재-섭취에 기인한다. 문헌 [Barth *et al.*, *Trends Cardiovasc. Med.* 11:26-31, 2001] 참조. 본원에 기재된 바와 같은 Fc 영역을 포함하는 ApoA-1 융합 분자는 분자가 Fc 도메인의 존재로 인해 FcRn을 통해 재순환되고 있으므로, 이 통상적인 방식으로 재흡수를 위한 필요를 견너뛸 것이다.

- [0117] 본원에 기재된 바와 같은 융합 분자는 또한 암을 갖는 환자의 요법에 사용될 수 있다. 본 발명의 ApoA-1 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질은 염증유발 반응을 감소시키면서, CD8⁺ T-세포의 활성화 및 종양 침윤을 증진시키는 것으로 예상된다. 연구는 암의 동물 모델에서의 ApoA-1 요법의 효능을 지지하고 ApoA-1 요법이 종양에서 CD8⁺ T 세포의 특이적 증가를 유발할 수 있는 것으로 지지한다. 예를 들어, 문헌 [Zamanian-Daryoush *et al.*, *J. Biol. Chem.* 288:21237-21252, 2013] 참조. 일부 측면에서, 본 발명의 ApoA-1 융합 분자는 1종 이상의 다른 항암 요법 예컨대, 예를 들어, 항암 면역요법과 조합하여 유용하다.
- [0118] 특정 측면에서, 본 발명은 또한 이량체화 도메인 (예를 들어, Fc 도메인) 및 ApoA-1 폴리펩티드, 또는 그의 기능적 변이체, 단편, 또는 모방체의 C-말단 사이에 가요성 링커를 제공함으로써 프리-베타 입자로부터 디스크형 입자 및 구형 입자까지의 성숙을 제어하면서 활성 ApoA-1 이량체를 안정화시키기 위한 방식을 제공한다. 링커를 함유하지 않는 이전 ApoA-1-Ig 분자는 야생형 ApoA1과 비교하여 콜레스테롤 유출 검정에서 낮은 활성을 나타낸다. 대조적으로, 본 발명의 융합 폴리펩티드를 이량체화하는 것은 콜레스테롤 유출 검정에서 ApoA-1 활성을 유지하고 또한 추가의 개선 예컨대, 예를 들어, RNase (예를 들어, RNase 1) 또는 이량체화 도메인에 C-말단인 다른 폴리펩티드 세그먼트의 융합을 허용한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 이량체화 도메인으로서의 Fc 영역의 사용은 또한 이량체의 증가된 반감기를 허용한다.
- [0119] 이론에 얹매이는 것으로 의도되지는 않지만, 링커의 길이는 그것이 콜레스테롤을 흡수함에 따라 확장하는 안정한 ApoA-1 이량체의 능력을 제어하는 것으로 여겨진다. 본 발명은 ApoA-1 폴리펩티드, 또는 그의 변이체, 단편, 또는 모방체의 C-말단 및 이량체화 도메인 예컨대, 예를 들어, Fc 도메인의 N-말단 사이에 가요성 링커를 함유하는 ApoA-1 융합 분자를 제공한다. 링커는 ApoA-1, 또는 기능적 변이체, 단편 또는 그의 모방체가 역 콜레스테롤 수송 (RCT)에서의 초기 및 결정적 단계인 세포로부터의 콜레스테롤 유출을 매개하도록 허용하는데 충분한 길이이다. 링커는 전형적으로 2 내지 60개 아미노산 길이이다. 대안적인 링커 길이를 갖는 ApoA-1 융합 분자는 ApoA-1의 C-말단을 제약함으로써 HDL 입자의 성숙을 제어하여 구별되는 기능적 특성을 갖는 것으로 여겨진다. 중간 크기의 HDL 디스크형 입자는 아테롬성동맥경화보호성 특성을 개선시킬 수 있고, CNS 수송 특성을 개선시킬 수 있다. 본 발명의 분자는 이를 중간 디스크형 스테이지에서 HDL 성숙의 진행을 변화시키고, 그로 인해 야생형 ApoA-1 단백질과 관련하여 본 발명의 융합 단백질의 효능을 개선시킬 수 있다. 본 발명의 분자는 삼량체 ApoA-1 입자로 구성된 구형 HDL 입자의 구조 및 조성에 영향을 미칠 가능성이 있다 (문헌 [Silva *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 105:12176-12181, 2008] 참조). 본 발명의 분자는 큰 구형 HDL 입자의 형성에서 천연 ApoA-1과 상호작용할 가능성이 있다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 이뮤노글로불린 Fc 영역이다. 본 발명의 ApoA-1-Fc 융합 분자는 ApoA-1 역 콜레스테롤 유출을 유지하고 광범위한 지질 제제화에 대한 요건을 제거하면서 ApoA-1 반감기를 확장한다. 추가로, Fc 영역의 존재는 항체 및 Fc 융합 단백질 제조에서 표준 실시에 따른 고정화된 단백질 A를 사용한 정제를 허용한다.
- [0121] ApoA-1의 구조적 연구 (예를 들어 문헌 [Gogonea, *Frontiers Pharmacol.* 6:318, 2016] 참조)는 ApoA-1이 지질-무함유 단량체부터 보다 고차원의 형태까지 성숙하기 때문에 다중 입체형태를 취한다는 것을 제시한다. 소각 중성자 산란 (SANS)으로부터 유래된 최근 데이터는 초 이중 나선 (DSH) 모델로 불리는 지질 코어 주위에 개방 배위에서 ApoA-1 이량체의 저해상도 구조를 제시한다. SANS 연구로부터의 다른 구조는 지질 코어의 조성에 의존하는 상이한 개방 배위에서 ApoA-1을 제시하며; 이를 구조에서, ApoA-1 단량체의 C-말단은 서로에 대해 상이한 위치에 있다. 유사하게, 제3 ApoA-1 단량체를 혼입하는 디스크형 ApoA-1 입자는 이량체 구형 ApoA-1에서의 위치와 비교하여 상이한 위치에서 각각의 단량체의 C-말단을 제시한다. 예를 들어, 상기 문헌 [Gogonea] 참조. 본 개시내용의 가요성 링커는 입체형태적 제약 없이 이를 위치를 취하도록 ApoA-1을 허용하기에 충분한 길이의 것이다.
- [0122] 특정 실시양태에서, 본 발명의 ApoA-1-[링커]-[이량체화 도메인] 분자는 이량체화 도메인에 카르복실-말단에 융합된 추가적인 폴리펩티드 세그먼트를 포함한다. 이러한 변이는 ApoA-1 기능적 활성 및 제2 생물학적 활성을 갖는 이중특이적 분자의 생성을 허용한다.
- [0123] 본 발명의 일부 측면에서, (i) 역 콜레스테롤 수송 활성을 갖고 ApoA1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편, 또는 대안적으로, ApoA1 모방체인 제1 폴리펩티드 세그먼트 및 (ii) 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 세그먼트 카르복실-말단인 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 레시

틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), 및 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드로부터 선택되는 것인 이중특이적 융합 분자가 제공된다. 이러한 제2 폴리펩티드는 천연 발생 단백질 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 및 이량체화 도메인은 상기 요약된 바와 같은 제1 및 제2 폴리펩티드 사이에 포함된다. 대안적 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메인이 결여된다.

[0124] Fc 영역이 결여된 본 발명의 ApoA-1 융합 분자의 일부 실시양태에서, 융합 분자는 PEG에 접합되어 확장된 반감기를 제공할 수 있다. 이러한 변이는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 분자, 예컨대, 예를 들어, RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), 또는 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 융합 분자를 포함할 수 있다.

[0125] 상기 요약된 바와 같은 이중특이적 분자의 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase이다. 바람직한 RNase는 인간 RNase 1 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 특정한 변이에서, RNase는 세포질 억제제에 의한 억제에 대한 그의 감수성을 유지하고 세포에 대한 매우 낮은 독성을 갖지만, 세포외로는 고도로 활성이다. RNase는 염증성 세포의 RNA의 소화에 의해 항염증 특성을 갖고 심혈관 질환 (예를 들어, 관상 동맥 질환, 뇌출증), 자가면역 질환, 염증성 질환, 제2형 당뇨병, 감염성 질환, 및 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)을 포함한, 다양한 질환의 치료를 위한 추가적인 치료 이익을 제공한다.

[0126] 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 RNase 세그먼트를 포함하는 이중특이적 ApoA-1 융합 분자는, 예를 들어, 염증성 질환 예컨대, 예를 들어, 염증성 폐 질환의 치료에 사용될 수 있다. 한 연구는 RNA 센서인 TLR3이 바이러스 병원체의 부재 하에 ARDS-유사 병리상태의 발생에 주요 역할을 갖는다는 것을 제시하였다. 문헌 [Murray et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178:1227-1237, 2008] 참조. 산소 요법은 ARDS에서 주요 치료적 개입이지만, 바이러스 감염에 대한 추가의 폐 손상 및 감수성에 기여한다. 산소 요법은 배양된 인간 상피 세포에서 증가된 TLR3 발현 및 활성화를 위한 주요 자극이고, TLR3의 부재 또는 차단은 마우스를 고산소 조건에 노출 후에 폐 손상 및 염증으로부터 보호하였다. 상기 문헌 [Murray et al.] 참조. 또 다른 연구는 세포의 RNA에 의한 TLR3 활성화가 급성 저산소증에 반응하여 발생하고, RNaseA로의 마우스에서의 요법이 급성 저산소증 후에 폐 염증을 약화시켰다는 것을 제시하였다. 문헌 [Biswas et al., *Eur. J. Immunol.* 45: 3158-3173, 2015] 참조. 본원에 기재된 바와 같은 RNase 세그먼트를 포함하는 이중특이적 ApoA-1 융합 분자는 또한, 예를 들어, 자가면역 질환 예컨대, 예를 들어, 전신 홍반성 루푸스 (SLE)의 치료에 사용될 수 있다. 연구는, 예를 들어, SLE 질환 발병기전에서 TLR7을 포함한, RNA 면역 복합체 및 RNA 수용체의 역할, 뿐만 아니라 SLE의 마우스 모델에서 RNase 과다발현의 보호 효과를 제시한다. 예를 들어 문헌 [Sun et al., *J. Immunol.* 190:2536-2543, 2013] 참조.

[0127] 상기 요약된 바와 같은 이중특이적 분자의 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 파라옥소나제이다. 바람직한 파라옥소나제는 인간 파라옥소나제 1 (PON1) 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 파라옥소나제 이중특이적 융합 분자는, 예를 들어, 그의 아테롬성동맥경화보호성, 항산화, 항염증 및/또는 신경보호 특성을 통하는 것을 포함한, ApoA-1-매개 요법에 순응성인 질환의 치료를 위한 추가적인 치료 이익을 제공한다. 일부 대안적 실시양태에서, PON1은, 결합이 PON1의 Tyr71에 의해 매개된, ApoA-1에 대한 그의 천연, 높은 친화성 결합을 통해 본 발명의 ApoA-1 융합 분자에 부착될 수 있다 (문헌 [Huang et al., *J. Clin. Invest.* 123:3815-3828, 2013] 참조). ApoA-1 융합 분자를 투여 전에 재조합 또는 천연 PON1과 함께 인큐베이션하는 것은 ApoA-1 융합 분자 상에 PON1을 "로딩"하는데 충분할 것이다.

[0128] 본원에 기재된 바와 같은 파라옥소나제 세그먼트를 포함하는 이중특이적 ApoA-1 융합 분자는, 예를 들어, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 연구는 자가면역 질환 예컨대 전신 홍반성 루푸스 (SLE)의 치료를 위한 파라옥소나제의 사용을 지지한다. 전신 홍반성 루푸스 (SLE)를 갖는 많은 환자에서 자가항체 역가는 PON1의 활성의 손실 (문헌 [Batukla et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 1108:137-146, 2007] 참조), 및 SLEDAI에 의해 평가된 SLE-질환 활성과 상호연관되고 SLICC/ACR 손상 인덱스에 의해 평가된 SLE 질환 관련된 기관 손상은 PON1 활성과 부정적으로 상호연관된다 (문헌 [Ahmed et al., *EXCLI Journal* 12:719-732, 2013] 참조). PON1 활성은 SLE를 갖는 환자에서 유의하게 감소되고, 아테롬성동맥경화증에 대한 위험 인자이다. 문헌 [Kiss et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 108:83-91, 2007] 참조. 추가로, 다른 연구는 염증성 질환 예컨대 염증성 폐 질환의 치료를 위한 파라옥소나제의 사용을 지지한다. 한 연구는 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 및 기관지확장증을 포함한, 황 머스타드 기체 (SM)에 노출 후에 오랫동안 말기 폐 질환을 갖는 환자가 세기관지 세척액에서 유의하게 감소된 수준의 PON1을 갖는다 ($p<0.0001$)는 것을 제시하였다. 문헌 [Golmanesh et al., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35:419-425, 2013] 참조. 또 다른 연구는 20년 전 SM에

노출된 이란 참전군인이 여전히 PON1 활성의 유의하게 낮은 혈청 수준을 갖고, 낮은 PON1은 폐 질환 중증도와 상호연관된다는 것을 제시하였다. 문헌 [Taravati *et al.*, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34:706-713, 2012] 참조.

[0129] 본원에 기재된 바와 같은 RNase 세그먼트 또는 파라옥소나제 세그먼트를 포함하는 이중특이적 ApoA-1 융합 분자는 또한, 예를 들어, 신경계 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 이중특이적 분자는 뇌로 수송되어, 여기서 이들은 보호성 파라옥소나제 또는 RNase 효소를 전달한다. 예를 들어, PON1은 그의 항산화 특성 때문에 뇌에서 보호성이고, RNase는 TLR7 및 다른 RNA 수용체의 자극을 통해 염증을 촉진하는 세포의 RNA를 소화함으로써 보호성이다. 본 발명의 ApoA-1/파라옥소나제 또는 ApoA1/RNase 이중특이적 분자를 사용한 치료에 순응성인 예시적인 신경계 질환은 다발성 경화증, 파킨슨병, 및 알츠하이머병을 포함한다.

[0130] 본 발명의 ApoA-1 융합 분자에의 미엘로페옥시다제 (MPO) 억제제의 부착은 MPO에 의해 매개된 산화로 인한 불활성화로부터 ApoA-1을 보호하는 방식으로서 특히 바람직할 수 있고, 또한 유사하게 파라옥소나제 예컨대 PON1을 포함하는 이중특이적 융합 폴리펩티드의 문맥에서 MPO-매개 산화 및 불활성화로부터 파라옥소나제를 유사하게 보호할 수 있다. ApoA-1의 미엘로페옥시다제-매개 산화는 ApoA-1의 가교를 촉진하고, 생체내 아테롬성동맥경화성 플라크에서 아밀로이드 침착으로 이어지는 메카니즘에서 연루될 수 있다. 문헌 [Chan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 290: 10958-71, 2015] 참조. MPO 억제제의 검토를 위해, 문헌 [Malle *et al.*, *Br J Pharmacol.* 152: 838-854, 2007] 참조. 본 발명의 분자에의 MPO 억제제의 부착은 또한 MPO 억제를 국부화하여 항-미생물 활성에서 중요한 MPO 활성을 보존하면서 산화로부터 ApoA-1을 선택적으로 보호할 수 있다.

[0131] 상기 요약된 바와 같은 이중특이적 분자의 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP) 및 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT)로부터 선택된다. CETP는 HDL 입자가 역 콜레스테롤을 수송 (RCT)의 프로세스 동안, 구체적으로는, LDL에 콜레스테롤의 비-로딩 및 전달을 통해 간으로 콜레스테롤을 전달할 수 있고, 이어서 LDL 수용체를 통해 간으로 다시 콜레스테롤을 수송하는 주요 메카니즘 중 하나에 수반된다. 이 비-로딩의 프로세스는 CETP를 요구한다. 본원에 제공된 바와 같은 개선된 ApoA-1 분자의 전달을 통해 RCT 경로의 초기 부분을 개선시키고, 이어서 다른 RCT 구성성분을 첨가하는 것은 매력적이고 잠재적으로 상승작용적 치료 접근법을 제공할 수 있다. ApoA-1을 함유하는 이중특이적 융합 분자의 형태로 보다 외인성 CETP를 제공하는 것은 CETP 활성 및 전체 역 콜레스테롤 수송을 증진시킬 수 있다.

[0132] LCAT를 함유하는 이중특이적 융합물은 내인성 CETP를 증진시키는 대안적인 수단을 제공할 수 있다. 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT)는 HDL과 연관된 효소이고 유리 콜레스테롤을 콜레스테릴 에스테르로 전환한 다음, HDL 입자로 단리하고 그의 구형 형상 형태를 허용한다. LCAT이 결여된 마우스에 주어진 인간 재조합 LCAT는 HDL-C 수준을 유의하게 개선시키고, 인간 ApoA-1 트랜스제닉 마우스에 주어질 때, HDL-C에서의 증가는 8-배이며, 상승작용을 시사한다. 문헌 [Roussel *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* 335:140-8, 2010] 참조. Fc에의 재조합 인간 LCAT 융합은 보고되어 있고 (문헌 [Spahr *et al.*, *Protein Sci.* 22:1739-53, 2013] 참조), ApoA-1 및 LCAT 둘 다를 함유하는 이중특이적 분자는 또한 단독으로 어느 하나의 단일-특이적 단백질보다 보다 효율적으로 RCT를 개선시킬 수 있다.

[0133] 상기 요약된 바와 같은 이중특이적 분자의 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 아밀로이드 베타 (A β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드이다. 구체적인 변이에서, 제2 폴리펩티드는 A β -특이적 단일 쇄 항체 예컨대, 예를 들어, A β -특이적 scFv이다. 아밀로이드 베타 웹티드에 특이적인 scFv는, 예를 들어, 문헌 [Cattepoel *et al.*, *PLoS One* 6:e18296, 2011]에 기재되어 있다. 이러한 실시양태에서, A β -결합 폴리펩티드는 전형적으로, 존재하는 경우, ApoA-1에 대해 C-말단에, 또는 이량체화 도메인에 대해 C-말단에 융합된다. 이 이중특이적 융합 분자는 알츠하이머병을 갖는 환자의 요법에 대해 개선된 특성을 갖는다.

II. 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질

[0135] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 ApoA1-L1-D를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하는 융합 폴리펩티드이며, 여기서 ApoA1은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택된 제1 폴리펩티드 세그먼트이고; L1은 제1 폴리펩티드 링커이고; D는 이량체화 도메인인 융합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함한다. 특정한 변이에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 (a) 천연 발생 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 또는 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT); (b) (a)에 명시된 임의의 천연 발생 단백질의 기능적 변이체 또는 단편; 또는 (c) 아밀로이드 베타 (A β)에 특이적으로 결합하는

폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, A β -특이적 scFv이다. 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 이러한 융합 폴리펩티드는 식 ApoA1-L1-D-L2-P (아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지)에 의해 나타내어질 수 있으며, 여기서 ApoA1, L1, 및 D는 각각 이전에 정의된 바와 같고, 여기서 L2는 제2 폴리펩티드 링커이고 임의적으로 존재하고, 여기서 P는 제2 폴리펩티드 세그먼트이다.

[0136] 또 다른 측면에서, 본 발명은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택된 제1 폴리펩티드 세그먼트, 및 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 세그먼트는 (a) 천연 발생 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 또는 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT); (b) (a)에 명시된 임의의 천연 발생 단백질의 기능적 변이체 또는 단편; 또는 (c) 아밀로이드 베타 (A β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, A β -특이적 scFv인 융합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 변이에서, 융합 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 및 제2 폴리펩티드 세그먼트에 대해 아미노-말단에 위치된 링커 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는, 예를 들어, 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 및 제2 폴리펩티드 세그먼트에 대해 아미노-말단에 위치된 이량체화 도메인을 추가로 포함한다.

[0137] 상기에 명시된 특정한 천연 발생 단백질의 기능적 변이체는 천연 단백질에 상응하는 관련 생물학적 또는 생화학적 활성을 대한 변이체를 평가하기 위한 통상의 검정을 사용하여 용이하게 식별될 수 있다. 예를 들어, ApoA-1의 경우에, 변이체는 공지된 콜레스테롤 유출 검정 예컨대 본원에 기재된 것을 사용하여 콜레스테롤 유출을 유도하는 그들의 능력에 대해 검정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tang *et al.*, *J Lipid Res.* 47:107-14, 2006] 참조. RNase 예컨대 인간 RNase 1의 경우에, 단일 또는 이중-가닥 RNA를 소화하는 그들의 능력에 대해 검정될 수 있는 변이체는 리보뉴클레아제 활성을 평가하기 위한 공지된 검정이다. 예를 들어, 문헌 [Libonati and Sorrentino, *Methods Enzymol.* 341:234-248, 2001] 참조. 파라옥소나제 1 (PON1) 변이체는 기질로서 디에틸 p-니트로페놀 포스페이트 (파라옥손)를 사용하여 포스포트리에스테라제 활성을 대해 또는 기질로서 페닐 아세테이트를 사용하여 아릴에스테라제 활성을 대해 검정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Graves and Scott, *Curr Chem Genomics* 2:51-61, 2008] 참조. 관련 CETP 및 LCAT 활성을 평가하기 위한 검정이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, LCAT 및 CETP 효소 활성을 측정하기 위한 검정은 상업적으로 입수 가능하고, 예를 들어, LCAT에 대하여 셀 바이오랩스(Ce11 Biolabs) Cat. 번호 STA-615, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) Cat. 번호 MAK107, 및 로아르 바이오케미칼(Roar Biomedical) Cat. 번호 RB-LCAT, 및 CETP에 대하여 압캡(Abcam) Cat. 번호 ab65383 및 시그마-알드리치 Cat. 번호 MAK106을 포함한다.

[0138] A β -결합 활성의 경우에, 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, 단일 쇄 항체는 임의의 다양한 공지된 검정을 사용하여 결합 활성을 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, 하나의 검정 시스템은 상업적으로 입수 가능한 바이오센서 기기 (비아코어(BIAcore)TM, 파마시아 바이오센서(Pharmacia Biosensor), 뉴저지주 피스카타웨이)를 이용하여, 여기서 결합 단백질 (예를 들어, A β -결합 후보, 예컨대 항체)은 센서 칩의 표면 상에 고정화되고, 가용성 항원을 함유하는 시험 샘플 (예를 들어, A β 웨프티드)은 세포를 통해 통과된다. 고정화된 단백질이 항원에 대한 친화성을 갖는 경우에, 그것은 항원에 결합할 것이며, 이는 배지의 굴절률에서의 변화를 야기하며, 이는 금 필름의 표면 플라즈몬 공명에서의 변화로서 검출된다. 이 시스템은 결합 친화성이 계산될 수 있는 것으로부터 온- 및 오프-속도의 결정, 및 결합의 화학량론의 평가를 허용한다. 이 기기의 사용은, 예를 들어, 칼손(Karlsson) (*J. Immunol. Methods* 145:229-240, 1991), 및 커닝햄(Cunningham) 및 웰스(Wells) (*J. Mol. Biol.* 234:554-563, 1993)에 의해 개시된다. A β -결합 폴리펩티드는 또한 관련 기술분야에 공지된 다른 검정 시스템 내에 사용될 수 있다. 이러한 시스템은 결합 친화성의 결정에 대한 스캐차드 분석 (문헌 [Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949] 참조) 및 열량측정 검정 (문헌 [Cunningham *et al.*, *Science* 253:545-548, 1991; Cunningham *et al.*, *Science* 254:821-825, 1991] 참조)을 포함한다.

[0139] 본 발명에 따른 사용을 위한 천연 발생 폴리펩티드 세그먼트 (예를 들어, 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드, RNase, 파라옥소나제 또는 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제)는 천연 발생 변이체 예컨대, 예를 들어, 대립유전자 변이체 및 개시내용과 일치하는 중간 상동체를 포함한다.

[0140] 특정한 참조 폴리펩티드 (예를 들어, 야생형 인간 ApoA-1)의 기능적 변이체는 일반적으로 참조 폴리펩티드에 관하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 것을 특징으로 한다. 이들 변화는 바람직하게는 부차적인 성질, 즉 보존적 아미노산 치환 (예를 들어 하기 표 2 참조, 이는 일부 예시적인 보존적 아미노산 치환을 열거함) 및 단백질 또는 폴리펩티드의 폴딩 또는 활성에 유의하게 영향을 미치지 않는 다른 치환; 소형 결실, 전형적으로 1 내지 약 30개 아미노산의 결실; 및 소형 아미노- 또는 카르복실-말단 확장, 예컨대 아미노-말단

메티오닌 잔기, 소형 링커 펩티드, 또는 정제를 용이하게 하는 소형 화장 (친화성 태그), 예컨대 폴리-히스티딘 트랙, 단백질 A (문헌 [Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3, 1991]), 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (문헌 [Smith and Johnson, *Gene* 67:31, 1988]), 또는 다른 항원성 에피토프 또는 결합 도메인이다. (일반적으로, 문헌 [Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2:95-107, 1991] 참조.) DNA 코딩 친화성 태그는 상업적 공급업체 (예를 들어, 파마시아 바이오텍, 뉴저지주 피스카타웨이)로부터 입수 가능하다. 보존적 치환은 또한 하기로부터 선택될 수 있다: 1) 알라닌, 글리신; 2) 아스파르테이트, 글루타메이트; 3) 아스파라긴, 글루타민; 4) 아르기닌, 리신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌, 발린; 6) 페닐알라닌, 티로신, 트립토판; 7) 세린, 트레오닌; 및 8) 시스테인, 메티오닌 (예를 들어, 문헌 [Creighton, *Proteins* (1984)] 참조).

[0141]

표 2: 보존적 아미노산 치환

<u>염기성</u>	<u>산성</u>	<u>극성</u>	<u>소수성</u>	<u>방향족</u>	<u>소형</u>
아르기닌	글루타메이트	글루타민	류신	페닐알라닌	글리신
리신	아스파르테이트	아스파라긴	이소류신	트립토판	알라닌
히스티딘			발린	티로신	세린
			메티오닌		트레오닌
					메티오닌

[0142]

[0143]

천연 발생 폴리펩티드에서의 필수 아미노산은 관련 기술분야에 공지된 절차, 예컨대 부위-지시된 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발에 따르면 식별될 수 있다 (문헌 [Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989; Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-4502, 1991]). 후자의 기술에서, 단일 알라닌 돌연변이는 분자에서 모든 잔기에 도입되고, 생성된 돌연변이체 분자는 생물학적 활성 (예를 들어, ApoA-1 변이 체에 대한 콜레스테롤 유출)에 대하여 시험되어 분자의 활성에 주요한 아미노산 잔기를 식별한다. 추가로, 관련 단백질 상호작용의 부위는 핵 자기 공명, 결정학 또는 광친화성 표지화와 같은 이러한 기술에 의해 결정되는 바와 같이 결정 구조의 분석에 의해 결정될 수 있다. 필수 아미노산의 동일성은 또한 관련된 단백질을 갖는 상동성 (예를 들어, 동일한 단백질 기능을 유지하는 종 오르토로그)의 분석으로부터 추론될 수 있다.

[0144]

다중 아미노산 치환은 돌연변이유발 및 스크리닝의 공지된 방법, 예컨대 문헌 [Reidhaar-Olson and Sauer *Science* 241:53-57, 1988, 또는 Bowie and Sauer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989]에 의해 개시된 것들을 사용하여 제조되고 시험될 수 있다. 간략하게, 이들 저자들은 동시에 폴리펩티드에서 2개 이상의 위치를 무작위화하고, 기능적 폴리펩티드를 선택하고, 이어서 돌연변이화된 폴리펩티드를 시퀀싱하여 각각의 위치에서 허용 가능한 치환의 스펙트럼을 결정하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 또 다른 방법은 영역-지시된 돌연변이유발이다 (문헌 [Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7:127, 1988]).

[0145]

변이체 뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 또한 DNA 셔플링을 통해 생성될 수 있다. (예를 들어 문헌 [Stemmer, *Nature* 370:389, 1994; Stemmer, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:10747, 1994; 국제 공개 번호 WO 97/20078] 참조.) 간략하게, 변이체 DNA 분자는 모 DNA의 무작위 단편화에 이어서 PCR을 사용한 재어셈블리에 의한 시험관내 상동 재조합에 의해 생성되어 무작위로 도입된 점 돌연변이를 유발한다. 이 기술은 모 DNA 분자의 패밀리, 예컨대 대립유전자 변이체 또는 상이한 종으로부터의 DNA 분자를 사용하여 변형되어 추가적인 가변성을 프로세스에 도입할 수 있다. 목적되는 활성에 대한 선택 또는 스크리닝, 이어서 돌연변이유발 및 검정의 추가적인 반복은 동시에 유해한 변화에 대해 선택하면서 바람직한 돌연변이에 대한 선택에 의해 서열의 빠른 "진화"를 제공한다.

[0146]

이전에 논의된 바와 같이, 본 발명에 따른 폴리펩티드 융합물은 특정한 폴리펩티드의 "기능적 단편"에 상응하는 폴리펩티드 세그먼트를 포함할 수 있다. 핵산 분자의 상용 결실 분석은 수행되어 주어진 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 기능적 단편이 수득될 수 있다. 예시로서, 서열식별번호: 1의 잔기 70-816의 뉴클레오티드 서열을 갖는 ApoA-1 코딩 DNA 분자는 Ba131 뉴클레아제로 소화되어 일련의 내포된 결실이 수득될 수 있다. 이어서 단편은 적절한 리딩 프레임에서 발현 벡터로 삽입되고, 발현된 폴리펩티드는 단리되고 콜레스테롤 유출을 유도하기 위한 능력에 대해 시험된다. 엑소뉴클레아제 소화에 대한 하나의 대안은 목적되는 단편의 생성을 구체화하도록 결실 또는 정지 코돈을 도입하기 위해 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발을 사용하는 것이다. 대안적으로, 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 특정한 단편은 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하여 합성될 수 있다.

- [0147] 따라서, 상기 논의된 바와 같은 방법을 사용하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 (i) 참조 폴리펩티드와 실질적으로 동일하고 (예를 들어, 인간 야생형 ApoA-1 폴리펩티드에 대해 서열식별번호: 2의 잔기 19-267 또는 25-267) 및 (ii) 참조 폴리펩티드의 목적되는 기능적 특성을 유지하는 다양한 폴리펩티드를 제조할 수 있다.
- [0148] 본 발명 내에 사용된 폴리펩티드 세그먼트 (예를 들어, ApoA-1, RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제, 이량체화 도메인 예컨대, 예를 들어, Fc 단편)는 다양한 종으로부터 수득될 수 있다. 단백질이 인간에서 치료상 사용되는 경우에, 인간 폴리펩티드 서열이 이용되는 것이 바람직하다. 그러나, 변이체 서열일 수 있는 것처럼, 비-인간 서열이 사용될 수 있다. 시험관내 진단 용도 및 수의학 용도를 포함한 다른 용도의 경우에, 환자와 동일한 종으로부터의 서열이 생체내 수의학 용도 또는 분자간 반응의 종 특이성이 존재하는 시험관내 용도에 바람직할 수 있을지라도, 인간 또는 비-인간 동물로부터의 폴리펩티드 서열이 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명 내에 사용하기 위한 폴리펩티드 세그먼트는, 비제한적으로, 인간, 비-인간 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 토끼류, 및 조류 폴리펩티드, 뿐만 아니라 그의 변이체일 수 있다.
- [0149] 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 인간 야생형 ApoA-1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-267 또는 25-267과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 구체적인 변이에서, 성숙 인간 야생형 ApoA-1의 위치 156에 상응하는 아미노산 위치에 있는 발린은 리신에 의해 대체되고/거나, 성숙 인간 야생형 ApoA-1의 위치 173에 상응하는 아미노산 위치에 있는 아르기닌은 시스테인에 의해 대체된다 (또한 V156K 및 R173C 변이체 또는 돌연변이로서 각각 본원에 지칭됨). 성숙 인간 야생형 ApoA-1의 위치 156은 서열식별번호: 2의 아미노산 위치 180에 상응하고 성숙 인간 야생형 ApoA-1의 위치 173은 서열식별번호: 2의 아미노산 위치 197에 상응한다. V156K 및 R173C 돌연변이는 야생형 ApoA-1과 비교하여 아테롬성동맥경화성 마우스에서 개선된 활성 및 반감기를 갖는다. 문헌 [Cho et al., *Exp Mol Med* 41:417, 2009] 참조.
- [0150] 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 세그먼트는 ApoA-1 모방체 예컨대, 예를 들어, 4F 웨პ티드이다 (문헌 [Song et al., *Int. J. Biol. Sci.* 5:637-646, 2009] 참조). ApoA-1 모방체는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있고, 문헌 [Reddy et al., *Curr. Opin. Lipidol.* 25: 304-308, 2014]에 검토되어 있다.
- [0151] 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 (예를 들어, 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단)인 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 특정 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 RNase이다. 일부 실시양태에서, RNase는 인간 RNase 1 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 542-675와 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 542-675와 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 542-675와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0152] 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 (예를 들어, 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단)인 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 파라옥소나제이다. 일부 실시양태에서, 파라옥소나제는 인간 파라옥소나제 1 (PON1) 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 12의 아미노산 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 아미노산 잔기 16-355 또는 서열식별번호: 44의 아미노산 잔기 16-355와 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 12의 아미노산 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 아미노산 잔기 16-355, 또는 서열식별번호: 44의 아미노산 잔기 16-355와 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 12의 아미노산 잔기 16-355, 서열식별번호: 42의 아미노산 잔기 16-355, 또는 서열식별번호: 44의 아미노산 잔기 16-355와 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0153] 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 (예를 들어, 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단)인 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 혈소판-활성화 인자 아세틸히

드롤라제 (PAF-AH)이다. 일부 실시양태에서, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제는 인간 PAF-AH 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 32의 아미노산 잔기 22-441과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 32의 아미노산 잔기 22-441과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 32의 아미노산 잔기 22-441과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0154] 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 (예를 들어, 이량체화 도메인에 대해 카르복실-말단)인 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP)이다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질은 인간 CETP 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 30의 아미노산 잔기 18-493과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 30의 아미노산 잔기 18-493과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 서열식별번호: 30의 아미노산 잔기 18-493과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0155] 본 발명에 따라 사용하기 위한 폴리펩티드 링커는 천연 발생, 합성, 또는 둘 다의 조합일 수 있다. 링커는 2개의 별개의 폴리펩티드 영역 (예를 들어, 이량체화 도메인 및 ApoA-1 폴리펩티드)을 연결하고 보다 긴 폴리펩티드의 별개의 및 이산된 도메인으로서 연결된 영역을 유지한다. 링커는 별개의, 이산된 도메인을 서로 협동하여 별개의 속성을 유지하도록 허용할 수 있다 (예를 들어, ApoA-1 폴리펩티드에 연결된 Fc 영역 이량체화 도메인의 경우에, Fc 수용체 (예를 들어, FcRn) 결합은 Fc 영역에 대해 유지되는 동안, ApoA-1 폴리펩티드의 기능적 특성 (예를 들어, 지질 결합)이 유지될 것임). 이종 폴리펩티드를 연결하기 위해 천연 발생 뿐만 아니라 인공 웨이드 링커의 사용의 예에 대해, 예를 들어, 문헌 [Hallewell *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264, 5260-5268, 1989; Alftan *et al.*, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson and Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; Khandekar *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272, 32190-32197, 1997; Fares *et al.*, *Endocrinology* 139, 2459-2464, 1998; Smallshaw *et al.*, *Protein Eng.* 12, 623-630, 1999; 미국 특허 번호 5,856,456] 참조.

[0156] 전형적으로, 링커 폴리펩티드 내의 잔기는 전체 친수성 특징 및 비-면역원성 및 가요성이도록 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 국부 안정성의 영역이 허용될 수 있을지라도, "가요성" 링커는 용액에서 실질적으로 안정한 보다 고차원의 입체형태가 결여된 것이다. 일반적으로, 소형, 극성 및 친수성 잔기가 바람직하며, 대형 소수성 잔기는 바람직하지 않는다. 국부 전하의 영역은 피해야 되며; 링커 폴리펩티드가 하전된 잔기를 포함하는 경우에, 이들은 폴리펩티드의 소형 영역 내에 알짜 중성 전하를 제공하기 위해 일반적으로 위치될 것이다. 따라서 대량 전하의 잔기에 인접한 하전된 잔기를 두는 것이 바람직하다. 일반적으로, 링커 폴리펩티드 내의 함유물에 바람직한 잔기는 Gly, Ser, Ala, Thr, Asn, 및 Gln을 포함하고; 보다 바람직한 잔기는 Gly, Ser, Ala, 및 Thr을 포함하고; 가장 바람직한 잔기는 Gly 및 Ser이다. 일반적으로, Phe, Tyr, Trp, Pro, Leu, Ile, Lys 및 Arg 잔기는 피해야 하고 (링커의 이뮤노글로불린 힌지 영역 내에 존재하는 한), 그들의 소수성 및 가요성의 결여로 인해 Pro 잔기 및 잠재적 면역원성으로 인해 Arg 잔기를 피해야 한다. 링커의 서열은 또한 원치않는 단백질분해를 피하기 위해 디자인될 것이다.

[0157] 특정 실시양태에서, 링커 L1은 적어도 2개 또는 적어도 3개 아미노산 잔기 (예를 들어, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 16개, 적어도 26개, 또는 적어도 36개 아미노산 잔기)를 포함한다. 특정한 변이에서, L1은 2 내지 60개 아미노산 잔기, 3 내지 60개 아미노산 잔기, 5 내지 40개 아미노산 잔기, 또는 15 내지 40개 아미노산 잔기로 이루어진다. 다른 변이에서, L1은 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 36, 2 내지 35, 2 내지 30, 2 내지 26, 3 내지 50, 3 내지 40, 3 내지 36, 3 내지 35, 3 내지 30, 3 내지 26, 5 내지 60, 5 내지 50, 5 내지 40, 5 내지 36, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 26, 10 내지 60, 10 내지 50, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 26, 15 내지 60, 15 내지 50, 15 내지 36, 15 내지 35, 15 내지 30, 또는 15 내지 26개 아미노산 잔기로 이루어진다. 다른 변이에서, L1은 16 내지 60, 16 내지 50, 16 내지 40, 또는 16 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어진다. 추가의 다른 변이에서, L1은 20 내지 60, 20 내지 50, 20 내지 40, 20 내지 36, 25 내지 60, 25 내지 50, 25 내지 40, 또는 25 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어진다. 또 다른 변이에서, L1은 26 내지 60, 26 내지 50, 26 내지 40, 또는 26 내지 36개 아미노산 잔기로 이루어진다. 보다 구체적인 변이에서, L1은 16개 아미노산 잔기, 21개 아미노산 잔기, 26개 아미노산 잔기, 31개 아미노산 잔기, 또는 36개 아미-

노산 잔기로 이루어진다. 일부 실시양태에서, L1은 서열식별번호: 2의 잔기 268-293, 서열식별번호: 26의 잔기 268-288, 서열식별번호: 22의 잔기 268-283, 서열식별번호: 54, 또는 서열식별번호: 24의 잔기 268-303에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0158] 예시적인 L2 링커는 적어도 3개 아미노산 잔기를 포함하고 전형적으로 최대 60개 아미노산 잔기이다. 특정 변이에서, L2 링커는 L1에 대해 상기 기재된 바와 같은 서열 길이의 범위를 갖는다. L2가 존재하고 P가 RNase인 식 ApoA1-L1-D-L2-P를 포함하는 폴리펩티드의 구체적 실시양태에서, L2는 서열식별번호: 4의 잔기 526-541에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0159] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 복수개 글리신 잔기를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 링커 (예를 들어, L1)는 복수개 글리신 잔기 및 임의적으로 적어도 1개 세린 잔기를 포함한다. 특정한 변이에서, 폴리펩티드 링커 (예를 들어, L1)는 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열식별번호: 15), 예컨대, 예를 들어, 서열식별번호: 15의 아미노산 서열의 2개 이상의 탠덤 반복을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n ([서열식별번호: 15]_n)을 포함하며, 여기서 n은 양의 정수 예컨대, 예를 들어, 1 내지 5, 2 내지 5, 3 내지 5, 1 내지 6, 2 내지 6, 3 내지 6, 또는 4 내지 6이다. 식 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n을 포함하는 폴리펩티드 링커의 구체적인 변이에서, n은 4이다. 식 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n을 포함하는 폴리펩티드 링커의 또 다른 구체적인 변이에서, n은 3이다. 식 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n을 포함하는 폴리펩티드 링커의 추가의 또 다른 구체적인 변이에서, n은 5이다. 식 [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n을 포함하는 폴리펩티드 링커의 추가의 또 다른 구체적인 변이에서, n은 6이다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 폴리펩티드 링커의 2개 다른 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드 링커 서열) 사이에 삽입된 일련의 글리신 및 세린 잔기 (예를 들어, [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, 여기서 n은 상기와 같이 정의됨)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 폴리펩티드 링커의 또 다른 서열 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드 링커 서열)의 1개 또는 양쪽 말단에 부탁된 글리신 및 세린 잔기 (예를 들어, [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, 여기서 n은 상기와 같이 정의됨)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 상부 힌지 영역 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 분자로부터 유래됨)의 적어도 일부, 중앙 힌지 영역 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 분자로부터 유래됨)의 적어도 일부 및 일련의 글리신 및 세린 아미노산 잔기 (예를 들어, [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, 여기서 n은 상기와 같이 정의됨)를 포함한다.

[0160] 또 다른 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 비-천연 발생 이뮤노글루불린 힌지 영역, 예를 들어 아미노산 서열에서 천연 발생 이뮤노글루불린 힌지 영역과 상이하도록 변경되어 있는 이뮤노글루불린 및/또는 힌지 영역에서 천연으로 발견되지 않은 힌지 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 힌지 영역으로 제조되어 폴리펩티드 링커를 제조할 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 시스테인의 천연 발생 수를 포함하지 않은 힌지 도메인을 포함하며, 즉 폴리펩티드 링커는 천연 발생 힌지 분자보다 더 적은 시스테인 또는 더 많은 수의 시스테인을 포함한다.

[0161] 다양한 이량체화 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 및 이량체 융합 단백질에 따라 사용하기에 적합하다. 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 이뮤노글루불린 중쇄 불변 영역, 예컨대 Fc 영역이다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 하나 이상의 이펙터 기능 (예를 들어, ADCC 및 CDC 이펙터 기능 중 하나 또는 둘 다)이 결여된다.

[0162] 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 N297 (인간 IgG 중쇄 불변 영역에 대한 EU 넘버링) (서열식별번호: 2의 아미노산 위치 375에 상응함)을 포함하나 이에 제한되지는 않은 문자가 글리코실화되지 않도록 CH2 영역에서 돌연변이를 갖는 인간 항체의 Fc 영역이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 힌지 영역의 3개 시스테인 (C220, C226, C229)이 각각 세린으로 변경되고, CH2 도메인의 위치 238에 있는 프롤린이 세린으로 변경된 인간 IgG1 (γ 1)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, Fc 영역은 N297이 임의의 다른 아미노산으로 변경된 인간 γ 1이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 Eu 위치 292 및 300 사이에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 인간 γ 1이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 잔기 292 및 300 사이에 임의의 위치에서 하나 이상의 아미노산 부가 또는 결실을 갖는 인간 γ 1이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 SCC 힌지 (즉, 시스테인 C220이 세린으로 변경되고 Eu 위치 226 및 229 각각에서 시스테인을 가짐) 또는 SSS 힌지 (즉, Eu 위치 220, 226 및 229에서의 3개 시스테인 각각이 세린으로 변경됨)를 갖는 인간 γ 1이다. 추가 실시양태에서, Fc 영역은 SCC 힌지 및 P238 돌연변이를 갖는 인간 γ 1이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 반감기에 중요한 FcRn 결합에 영향을 미치지 않으면서 Fc 감마 수용체 (I, II, III)에 의해 결합을 변경하는 돌연변이를 갖는 인간 γ 1이다. 추가

실시양태에서, Fc 영역은 문헌 [Ehrhardt and Cooper, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010 Aug. 3 (Immunoregulatory Roles for Fc Receptor-Like Molecules); Davis et al., *Ann. Rev. Immunol.* 25:525-60, 2007 (Fc 수용체-유사 분자); 또는 Swainson et al., *J. Immunol.* 184:3639-47, 2010]에 개시된 바와 같다.

[0163] Fc 이량체화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, Fc 영역은 융합 단백질의 항원-비의존성 이펙터 기능을 변경하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, Fc 영역은 생성된 분자의 순환 반감기를 변경하는 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 항체 유도체는 이들 치환이 결여된 항체와 비교 시 FcRn에 대한 증가된 또는 저하된 결합을 보이고, 따라서, 각각 증가된 또는 저하된 혈청내 반감기를 갖는다. FcRn에 대한 개선된 친화성을 갖는 Fc 변이체는 보다 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되고, 이러한 항체는 투여되는 항체의 긴 반감기가 목적되는 경우에 포유동물의 치료 방법에서 유용한 적용을 갖는다. 대조적으로, 저하된 FcRn 결합 친화성을 갖는 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 가질 것으로 예상되고, 이러한 항체는 또한, 예를 들어, 단축된 순환 시간이 유리할 수 있는 경우에, 예를 들어 출발 항체가 연장된 기간 동안 순환계에 존재할 때 독성 부작용을 갖는 경우에 포유동물에게 투여에 유용하다. 저하된 FcRn 결합 친화성을 갖는 Fc 변이체는 또한 태반을 가로지를 가능성이 더 작고, 따라서, 임신한 여성의 질환 또는 장애의 치료에도 유용하다. 추가로, 감소된 FcRn 결합 친화성이 목적될 수 있는 다른 용도는 뇌, 신장, 및/또는 간으로의 국부화가 목적되는 그러한 적용을 포함한다. 하나의 예시적 실시양태에서, 본 발명의 항체는 혈관계로부터 신장 사구체의 상피를 가로질러 감소된 수송을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질은 뇌로부터 혈관 공간으로 혈액 뇌 장벽 (BBB)을 가로질러 감소된 수송을 나타낸다. 한 실시양태에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 융합 단백질은 Fc 도메인의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. FcRn 결합 활성을 변경한 예시적인 아미노산 치환은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 WO 05/047327에 개시되어 있다.

[0164] 다른 실시양태에서, 본 발명의 융합 폴리펩티드는, 예를 들어, 야생형 Fc 영역과 비교 시, 폴리펩티드의 항원-비의존성 이펙터 기능, 특히 ADCC 또는 보체 활성화를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함한다. 예시적 실시양태에서, 이러한 융합 폴리펩티드는 Fc 감마 수용체에 대한 변경된 결합 (Fc γ R, 예를 들어, CD16)을 나타낸다. 이러한 융합 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드와 비교 시 Fc γ R에 대한 증가 또는 저하된 결합을 나타내고, 따라서, 각각 증진 또는 감소된 이펙터 기능을 매개한다. Fc γ R에 대한 개선된 친화성을 갖는 Fc 변이체는 이펙터 기능을 증진시키는 것으로 예상되고, 이러한 융합 단백질은 표적 분자 파괴가 목적되는 경우에 포유동물을 치료하는 방법에서 유용한 적용을 갖는다. 대조적으로, 저하된 Fc γ R 결합 친화성을 갖는 Fc 변이체는 이펙터 기능을 감소시킬 것으로 예상되고, 이러한 융합 단백질은, 예를 들어, 표적 세포 파괴가 바람직하지 않은 경우에, 예를 들어, 정상 세포가 표적 분자를 발현할 수 있거나, 또는 항체의 만성 투여가 원치 않는 면역계 활성화를 유발할 수 있는 상태의 치료에 또한 유용하다. 한 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드와 비교 시 읍소닌화, 식세포작용, 보체 의존성 세포독성, 항원-비의존성 세포독성 (ADCC), 또는 이펙터 세포 조정으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변경된 항원-비의존성 이펙터 기능을 나타낸다.

[0165] 한 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드는 활성화 Fc γ R (예를 들어, Fc γ I, Fc γ IIa, 또는 Fc γ IIIa)에 대한 변경된 결합을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 억제 Fc γ R (예를 들어, Fc γ IIb)에 대한 변경된 결합 친화성을 나타낸다. FcR 또는 보체 결합 활성이 변경된 예시적인 아미노산 치환은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 WO 05/063815에 개시되어 있다.

[0166] Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드는 또한 Fc 영역의 글리코실화를 변경하는 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 Fc 도메인은 감소된 글리코실화 (예를 들어 N- 또는 O-연결된 글리코실화)로 이어지는 돌연변이를 가질 수 있거나 또는 야생형 Fc 도메인의 변경된 글리코형태 (예를 들어 낮은 프룩토스 또는 무-프룩토스 글리칸)를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 분자는 글리코실화 모티프, 예를 들어 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 함유하는 N-연결된 글리코실화 모티프 근처에 또는 그 내에 아미노산 치환을 갖는다. 글리코실화를 감소 또는 변경하는 예시적인 아미노산 치환은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 번호 WO 05/018572 및 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0111281에 개시되어 있다.

[0167] 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한, 본원에 기재된 바와 같은 Fc 변이체의 다양한 실시양태는 본 발명의 융합 폴리펩티드와 조합될 수 있는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.

[0168] 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 294-525 또는 294-524, 또는 (ii) 서열식별 번호: 13의 잔기 294-525 또는 294-524에 제시된 서열로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%,

적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 294-525 또는 294-524, 또는 (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 294-525 또는 294-524에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0169] 상기 기재된 바와 같은 ApoA1-L1-D를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 26의 잔기 19-520, 19-519, 25-520, 또는 25-519, 또는 (vi) 서열식별번호: 24의 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534에 제시된 서열로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 26의 잔기 19-520, 19-519, 25-520, 또는 25-519, 또는 (vi) 서열식별번호: 24의 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0170] 상기 기재된 바와 같고 P가 RNase인 ApoA1-L1-D-L2-P를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 잔기 19-675 또는 25-675 또는 (ii) 서열식별번호: 14의 잔기 19-675 또는 25-675에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 잔기 19-675 또는 25-675 또는 (ii) 서열식별번호: 14의 잔기 19-675 또는 25-675에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0171] 상기 기재된 바와 같고 P가 파라옥소나제인 ApoA1-L1-D-L2-P를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 잔기 19-883 또는 25-883에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 잔기 19-883 또는 25-883에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0172] 상기 기재된 바와 같고 P가 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH)인 ApoA1-L1-D-L2-P를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 34의 잔기 19-963 또는 25-963에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 34의 잔기 19-963 또는 25-963에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 상기 기재된 바와 같고 P가 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP)인 ApoA1-L1-D-L2-P를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 40의 잔기 19-1019 또는 25-1019에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 40의 잔기 19-1019 또는 25-1019에 제시된 아미노산 서열과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같은 제1 및 제2 폴리펩티드 융합물을 포함하는 이량체 단백질을 제공한다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 융합 폴리펩티드 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 제1 및 제2 폴리펩티드 융합물은 ApoA1-L1-D를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하며, 여기서 ApoA1은 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택된 제1 폴리펩티드 세그먼트이고; L1은 제1 폴리펩티드 링커이고; D는 이량체화 도메인인 이량체 단백질을 제공한다. 일부 실시양태에서, 각각의 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 이량체화 도메

인에 대해 카르복실-말단에 위치된 제2 폴리펩티드 세그먼트를 추가로 포함한다. 특정한 변이에서, 제2 폴리펩티드 세그먼트는 (a) 천연 발생 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 또는 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT); (b) (a)에 명시된 임의의 천연 발생 단백질의 기능적 변이체 또는 단편; 또는 (c) 아밀로이드 베타 ($A\beta$)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, $A\beta$ -특이적 scFv이다. 제2 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 이러한 융합 폴리펩티드는 식 ApoA1-L1-D-L2-P (아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지)에 의해 나타내어질 수 있으며, 여기서 ApoA1, L1, 및 D는 각각 이전에 정의된 바와 같고, L2는 제2 폴리펩티드 링커이고 임의적으로 존재하고, P는 제2 폴리펩티드 세그먼트이다.

[0175] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 융합 폴리펩티드 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체 단백질이며, 여기서 각각의 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드 세그먼트, 제2 폴리펩티드 세그먼트, 및 이량체화 도메인을 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드 세그먼트는 콜레스테롤 유출 활성을 갖고 (i) 천연 발생 ApoA-1 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편 및 (ii) ApoA-1 모방체로부터 선택되고, 여기서 제2 폴리펩티드 세그먼트는 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단에 위치되고 (a) 천연 발생 RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 또는 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT), (b) (a)에 명시된 임의의 천연 발생 단백질의 기능적 변이체 또는 단편, 또는 (c) 아밀로이드 베타 ($A\beta$)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 예컨대, 예를 들어, $A\beta$ -특이적 scFv인 이량체 단백질을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 제1 폴리펩티드 세그먼트에 대해 카르복실-말단 및 제2 폴리펩티드 세그먼트에 대해 아미노-말단에 위치된다.

[0176] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) ApoA-1 폴리펩티드 또는 ApoA-1 모방체에 대해 카르복실-말단에 연결된 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 제1 융합 폴리펩티드 및 (b) ApoA-1 폴리펩티드 또는 ApoA-1 모방체에 대해 카르복실-말단에 연결된 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 제2 융합 폴리펩티드를 제공한다. 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 공동-발현되어 2개의 이중 벨트 ApoA-1 이량체로 구성된 안정한 사량체를 생성할 수 있으며, 여기서 ApoA-1 및 중쇄 사이 및 ApoA-1 및 경쇄 사이의 링커는 콜레스테롤 유출 및 역 콜레스테롤 수송을 허용하기에 충분한 길이이다.

[0177] 이량체 융합 단백질을 포함한, 본 발명의 융합 폴리펩티드는 추가로 이팩터 모이어티에 접합될 수 있다. 이팩터 모이어티는 표지화 모이어티 예컨대 방사성 표지 또는 형광 표지, TLR 리간드 또는 결합 도메인, 효소를 포함한 임의의 수의 문자일 수 있거나, 또는 치료 모이어티일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 이팩터 모이어티는 미엘로페옥시다제 (MPO) 억제제이다. MPO 억제제는 일반적으로 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Malle et al., Br J Pharmacol. 152: 838-854, 2007] 참조) 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드에 용이하게 접합될 수 있다. 예시적인 MPO 억제제는 3-알킬인돌 유도체를 기반으로 하는 억제제 (문헌 [Soubhye et al., J Med Chem 56:3943-58, 2013] 참조; MPO ($IC_{50} = 18nM$)의 높은 선택적 억제를 갖는 화합물을 포함한, 선택적이고 고도로 강력한 미엘로페옥시다제 억제제로서 3-알킬인돌 유도체의 연구를 기재함); 3-(아미노알킬)-5-플루오르인돌을 기반으로 하는 억제제 (문헌 [Soubhye et al., J Med Chem 53: 8747-8759, 2010] 참조); 2H-인다졸 및 1H-인다졸론을 기반으로 하는 억제제 (문헌 [Roth et al., Bioorg Med Chem 22: 6422-6429, 2014] 참조; 2H-인다졸 및 1H-인다졸론의 평가 및 IC_{50} 값 $<1 \mu M$ 을 갖는 화합물의 식별을 기재함); 및 벤조산 히드라지드-함유 화합물 (문헌 [Huang et al., Arch Biochem Biophys 570: 14-22, 2015] 참조; 벤조산 히드라지드-함유 화합물에 의해 MPO의 불활성화를 제시함, 여기서 MPO의 경쇄 서브유닛은 에스테르 결합의 절단에 의해 더 큰 중쇄로부터 유리됨)을 포함한다.

[0178] 또 다른 실시양태에서, 이량체 융합 단백질을 포함한, 본 발명의 융합 폴리펩티드는, 예컨대, 예를 들어, 혈청 반감기를 확장하기 위해 융합 단백질에 적어도 1개의 문자를 부착함으로써 반감기를 확장하도록 변형된다. 부착을 위한 이러한 문자는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기, 혈청 알부민, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체 또는 그의 트랜스페린-결합 부분, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 이러한 변형에 대한 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 단어 "부착된"은 공유적으로 또는 비-공유적으로 접합된 물질을 지칭한다. 접합은 유전자 조작에 의해 또는 화학적 수단에 의한 것일 수 있다.

III. 폴리펩티드 융합물 및 이량체 단백질을 제조하기 위한 물질 및 방법

[0180] 본 발명은 또한 상기 논의된 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및 RNA 분자를 포함한, 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 및 이중-가닥 문자 둘 다를 포함한다. 융합 폴리펩티드의 다양한 세그먼트 (예를 들어, 이량체화 도메인 예컨대 Fc 단편; ApoA1 및 P 폴리펩티드 세그먼트)를 코딩하는

폴리뉴클레오티드가 생성되고 함께 연결되어 핵산의 재조합 조작에 대해 공지된 방법을 사용하여 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 형성할 수 있다.

[0181] ApoA-1, RNase (예를 들어, RNase 1), 파라옥소나제 (예를 들어, PON1), 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 및 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT)를 코딩하는 DNA 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 다양한 이량체화 도메인 (예를 들어, 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 예컨대 Fc 단편)을 코딩하는 DNA 서열이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, scFv 포함한, A β -결합 항체의 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 관련 기술분야에 널리 공지된 기술 예컨대 재조합 항체 발현 라이브러리 (예를 들어, 파지 디스플레이 발현 라이브러리)의 스크리닝을 사용하여 용이하게 식별가능하다. 임의의 이들 폴리펩티드를 코딩하는 추가적인 DNA 서열은 유전자 코드를 기반으로 하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 생성될 수 있다. 대응물 RNA 서열은 T를 U로 치환함으로써 생성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 유전자 코드의 축중성의 면에서, 주어진 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자 중에서 상당한 서열 변이가 가능함을 용이하게 인식할 것이다. 기능적 변이체 및 이러한 폴리펩티드의 단편을 코딩하는 DNA 및 RNA는 또한 폴리뉴클레오티드 서열에 변이를 도입하기 위한 공지된 재조합 방법, 이어서 코딩된 폴리펩티드의 발현 및 적절한 스크리닝 검정을 사용한 기능적 활성 (예를 들어, 콜레스테롤 유출)의 결정을 사용하여 수득될 수 있다.

[0182] DNA 및 RNA를 제조하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 상보적 DNA (cDNA) 클론은 관심 폴리펩티드를 코딩하는 다량의 RNA를 생성하는 조직 또는 세포로부터 단리된 RNA로부터 제조될 수 있다. 총 RNA는 구아닌 HC1 추출 이어서 CsCl 구배에서 원심분리에 의한 단리를 사용하여 제조될 수 있다 (문헌 [Chirgwin et al., *Biochemistry* 18:52-94, 1979]). 폴리(A) $^+$ RNA는 아비브(Aviv) 및 레더(Leder)의 방법을 사용하여 총 RNA로부터 제조된다 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412, 1972). 상보적 DNA는 공지된 방법을 사용하여 폴리(A) $^+$ RNA로부터 제조된다. 대안적으로, 게놈 DNA는 단리될 수 있다. cDNA 및 게놈 클론을 식별하고 단리하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 수준 내에 널리 공지되어 있고, 라이브러리를 프로빙 또는 프라이밍하기 위해, 본원에 개시된 서열, 또는 그의 부분의 사용을 포함한다. 관심 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 혼성화 또는 폴리미라제 연쇄 반응 ("PCR", 물리스(Mullis), 미국 특허 4,683,202)에 의해 단리된다. 발현 라이브러리는 관심 폴리펩티드, 수용체 단편, 또는 다른 특이적 결합 파트너에 항체로 프로빙될 수 있다.

[0183] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 자동화된 합성에 의해 제조될 수 있다. 짧은, 이중-가닥 세그먼트 (60 내지 80 bp)의 생성은 기술적으로 간단하며, 상보적 가닥을 합성하고 이어서 그들을 어닐링함으로써 달성될 수 있다. 보다 긴 세그먼트 (전형적으로 >300 bp)는 20 내지 100개 뉴클레오티드 길이인 단일-가닥 단편으로부터 모듈 형태로 어셈블리된다. 폴리뉴클레오티드의 자동화된 합성은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 수준 내에 있고, 적합한 장비 및 시약은 상업적 공급업체로부터 입수 가능하다. 일반적으로 문헌 [Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C., 1994; Itakura et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53:323-356, 1984; 및 Clamie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:633-637, 1990] 참조.

[0184] 또 다른 측면에서, 물질 및 방법은 융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체 단백질을 포함한, 본 발명의 폴리펩티드 융합물을 생성하기 위해 제공된다. 융합 폴리펩티드는 통상적인 기술에 따라 유전자 조작된 숙주 세포에서 생성될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 외인성 DNA로 형질전환 또는 형질감염되고 배양물 중에서 성장될 수 있는 세포 유형이고, 박테리아, 진균 세포, 및 배양된 고등 진핵 세포 (다세포 유기체의 배양된 세포를 포함함), 특히 배양된 포유동물 세포를 포함한다. 클로닝된 DNA 분자를 조작하고 외인성 DNA를 다양한 숙주 세포에 도입하기 위한 기술은 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 및 Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green and Wiley and Sons, NY, 1993]에 기재되어 있다.

[0185] 일반적으로, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열은 발현 벡터 내에서, 일반적으로 전사 프로모터 및 터미네이터를 포함한, 그의 발현을 위해 요구되는 다른 유전자 요소에 작동 가능하게 연결된다. 벡터는 또한 통상적으로 하나 이상의 선택 가능 마커 및 하나 이상의 복제 기점을 함유할 것이지만, 통상의 기술자는 특정 시스템 내에서 선택 가능 마커가 별개의 벡터 상에 제공될 수 있고, 외인성 DNA의 복제가 숙주 세포 게놈 내로 통합에 의해 제공될 수 있음을 인식할 것이다. 프로모터, 터미네이터, 선택 가능 마커, 벡터 및 다른 요소의 선택은 관련 기술 분야의 통상의 기술자의 수준 내에 통상적인 디자인의 문제이다. 이러한 많은 요소는 문헌에 기재되어 있고 상

업적 공급업체를 통해 입수 가능하다.

[0186]

ApoA-1 융합 폴리펩티드를 숙주 세포의 분비 경로로 지시하기 위해, 분비 신호 서열은 발현 벡터에 제공된다. 분비 신호 서열은 천연 ApoA-1 폴리펩티드의 것일 수 있거나, 또는 또 다른 분비된 단백질 (예를 들어, t-PA; 미국 특허 번호 5,641,655 참조)로부터 유래되거나 신생 합성될 수 있다. 조작된 절단 부위는 숙주 세포에서 단백질분해적 프로세싱을 최적화하기 위해 분비 웨이드 및 폴리펩티드 융합물의 나머지 사이의 접합에서 포함될 수 있다. 분비 신호 서열은 폴리펩티드 융합물을 코딩하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결되고, 즉 2개 서열은 정확한 리딩 프레임 내에서 연결되고 새롭게 합성된 폴리펩티드 융합물을 숙주 세포의 분비 경로로 지시하기 위해 위치된다. 분비 신호 서열은 통상적으로 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열에 대해 5'에 위치되지만, 특정 신호 서열은 관심 DNA 서열에서 어느 곳에나 위치될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,037,743 (Welch et al.); 미국 특허 번호 5,143,830 (Holland et al.) 참조). 본 발명에 따라 사용하기에 적합한 분비 신호 서열은, 예를 들어, 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 1-18을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0187]

숙주 세포 분비 경로를 통한, 이량체화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드의 발현은 이량체 단백질의 생성을 유발하는 것으로 예상된다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 제1 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체 단백질 (예를 들어, 제1 및 제2 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 제1 및 제2 융합 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 ApoA1-L1-D 또는 ApoA1-L1-D-L2-P를 아미노-말단 위치부터 카르복실-말단 위치까지 포함하는 것인 이량체 단백질)을 제공한다. 이량체는 또한 적합한 조건 하에 구성성분 폴리펩티드의 인큐베이션 시 시험관내 어셈블리될 수 있다. 일반적으로, 시험관내 어셈블리는 변성화 및 환원 조건 하에 단백질 혼합물을 인큐베이션하고 이어서 폴리펩티드를 풀딩 및 산화환원하여 이량체를 형성하는 것을 포함할 것이다. 박테리아 세포에서 발현된 단백질의 회수 및 어셈블리는 하기 개시된다.

[0188]

배양된 포유동물 세포는 본 발명 내에 사용하기에 적합한 숙주이다. 외인성 DNA를 포유동물 숙주 세포에 도입하는 방법은 칼슘 포스페이트-매개 형질감염 (문헌 [Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973]), 전기천공 (문헌 [Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982]), DEAE-덱스트란 매개 형질감염 (상기 문헌 [Ausubel et al.]), 및 리포솜 매개 형질감염 (문헌 [Hawley-Nelson et al., *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone et al., *Focus* 15:80, 1993])을 포함한다. 배양된 포유동물 세포에서의 재조합 폴리펩티드의 생성은, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,713,339 (Levinson et al.); 미국 특허 번호 4,784,950 (Hagen et al.); 미국 특허 번호 4,579,821 (Palmeter et al.); 및 미국 특허 번호 4,656,134 (Ringold)에 개시되어 있다. 적합한 배양된 포유동물 세포는 COS-1 (ATCC 번호 CRL 1650), COS-7 (ATCC 번호 CRL 1651), BHK (ATCC 번호 CRL 1632), BHK 570 (ATCC 번호 CRL 10314), 293 (ATCC 번호 CRL 1573; 문헌 [Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977]) 및 차이나즈 햄스터 난소 (예를 들어, CHO-K1, ATCC 번호 CCL 61; CHO-DG44, 문헌 [Urbaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980]) 세포주를 포함한다. 추가적인 적합한 세포주는 관련 기술분야에 공지되어 있고 공공 기탁기관, 예컨대 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, 버지니아주 마나사스)으로부터 입수 가능하다. 강한 전사 프로모터, 예컨대 SV-40, 시토메갈로바이러스 또는 골수증식성 육종 바이러스로부터의 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,956,288 및 미국 특허 출원 공개 번호 20030103986 참조. 다른 적합한 프로모터는 메탈로티오네인 유전자로부터의 것들 (미국 특허 번호 4,579,821 및 4,601,978) 및 아데노바이러스 주요 후기 프로모터를 포함한다. 포유동물 세포에 사용하기 위한 발현 벡터는 각각 기탁 번호 98669, 98668, 및 PTA-5266 하에 미국 버지니아주 마나사스 10801 유니버시티 블러바드 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 기탁되어 있는 pZP-1, pZP-9, 및 pZMP21, 및 이들 벡터의 유도체를 포함한다.

[0189]

약물 선택은 일반적으로 외래 DNA가 삽입되어 있는 배양된 포유동물 세포를 선택하기 위해 사용된다. 이러한 세포는 통상적으로 "형질감염체"로서 지칭된다. 선택제의 존재 하에 배양되었고 관심 유전자를 그들의 자손으로 전할 수 있는 세포는 "안정한 형질감염체"로 지칭된다. 예시적인 선택가능 마커는 항생제 네오마이신에 대한 내성을 부여하는 유전자 코딩이다. 선택은 네오마이신-유형 약물, 예컨대 G-418 등의 존재 하에 수행된다. 선택 시스템은 또한 "증폭"으로 지칭된 프로세스인, 관심 유전자의 발현 수준을 증가시키는데 사용될 수 있다. 증폭은 형질감염체를 낮은 수준의 선택제의 존재 하에 배양하고 이어서 높은 수준의 도입된 유전자의 생성물을 생성하는 세포에 대해 선택하기 위해 선택제의 양을 증가시킴으로써 수행된다. 예시적인 증폭가능한 선택가능 마커는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 디히드로폴레이트 리덕타제이다. 다른 약물 내성 유전자 (예를 들어, 히그로마이신 내성, 다중-약물 내성, 푸로마이신 아세틸트랜스페라제)가 또한 사용될 수 있다. 세포-표면 마커 및 다른 표현형 선택 마커는 형질감염된 세포의 식별을 용이하게 하는데 사용될 수 있고 (예를 들어, 형광-활성화된 세포 분류에 의함), 예를 들어, CD8, CD4, 신경 성장 인자 수용체, 녹색 형광 단백질 등을 포함

한다.

[0190] 곤충 세포, 식물 세포 및 조류 세포를 포함한, 다른 고등 진핵 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 식물 세포 내에서 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)의 사용은 문헌 [Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987]에 검토되어 있다. 곤충 세포의 형질전환 및 그 내에서의 외래 폴리펩티드의 생성은 미국 특허 번호 5,162,222 (Guarino et al.) 및 WIPO 공개 WO 94/06463에 개시되어 있다.

[0191] 곤충 세포는 통상적으로 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병 바이러스 (AcNPV)로부터 유래된, 재조합 바클로바이러스에 감염될 수 있다. 문헌 [King and Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman & Hall, London; O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press., New York, 1994; 및 Richardson, Ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 1995] 참조. 재조합 바클로바이러스는 또한 문헌 [Luckow et al. (J. Virol. 67:4566-4579, 1993)]에 의해 기재된 트랜스포손-기반 시스템의 사용을 통해 생성될 수 있다. 전달 벡터를 활용하는, 이 시스템은 키트 형태로 상업적으로 입수 가능하다 (BAC-TO-BAC 키트; 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 메릴랜드주 게이터스버그). 전달 벡터 (예를 들어, PFASTBAC1; 라이프 테크놀로지스)는 관심 단백질을 코딩하는 DNA를 "백미드"로 불리는 큰 플라스미드로서 이. 콜라이(*E. coli*) 내에 유지된 바클로바이러스 계놈 내로 이동시키기 위해 Tn7 트랜스포손을 함유한다. 문헌 [Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning et al., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; 및 Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995] 참조. 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여, 폴리펩티드 용합물을 코딩하는 전달 벡터를 이. 콜라이 숙주 세포 내로 형질전환시키고, 세포를 재조합 바클로바이러스를 표시하는 개입된 lacZ 유전자를 함유하는 백미드에 대해 스크리닝한다. 재조합 바클로바이러스 계놈을 함유하는 백미드 DNA는 통상의 기술을 사용하여 단리되고, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포, 예를 들어 Sf9 세포를 형질감염시키기 위해 사용된다. 폴리펩티드 용합물을 발현하는 재조합 바이러스는 이후에 생성된다. 재조합 바이러스 스톡은 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 제조된다.

[0192] 단백질 생성을 위해, 재조합 바이러스는 숙주 세포, 전형적으로 가을 거염벌레, 스포도프테라 프루기페르다 (예를 들어, Sf9 또는 Sf21 세포) 또는 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) (예를 들어, 하이 파이브(HIGH FIVE) 세포; 인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)로부터 유래된 세포주를 감염시키는데 사용된다. 일반적으로 상기 문헌 [Glick and Pasternak] 참조. 또한 미국 특허 번호 5,300,435 참조. 무혈청 배지를 사용하여 세포를 성장시키고 유지한다. 적합한 배지 배합물을 관련 기술분야에 공지되어 있고 상업적 공급업체로부터 수득될 수 있다. 세포를 약 $2-5 \times 10^5$ 세포의 접종 밀도로부터 $1-2 \times 10^6$ 세포의 밀도까지 성장시키고, 이때 재조합 바이러스 스톡은 0.1 내지 10, 보다 전형적으로 거의 3의 감염 다중도 (MOI)로 첨가된다. 사용된 절차는 일반적으로 이용 가능한 실험실 매뉴얼에 기재되어 있다 (예를 들어, 상기 문헌 [King and Possee]; 상기 문헌 [O'Reilly et al.]; 상기 문헌 [Richardson] 참조).

[0193] 효모 세포를 포함한, 진균 세포가 또한 본 발명 내에 사용될 수 있다. 이와 관련하여 특정한 관심 효모 종은 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 및 피키아 메타놀리카(*Pichia methanolica*)를 포함한다. 에스. 세레비지아에 세포를 외인성 DNA로 형질전환시키고 그로부터 재조합 폴리펩티드를 생성하는 방법은 예를 들어 미국 특허 번호 4,599,311 (Kawasaki); 미국 특허 번호 4,931,373 (Kawasaki et al.); 미국 특허 번호 4,870,008 (Brake); 미국 특허 번호 5,037,743 (Welch et al.); 및 미국 특허 번호 4,845,075 (Murray et al.)에 개시되어 있다. 형질전환된 세포는 선택가능 마커에 의해 결정된 표현형, 통상적으로 약물 내성 또는 특정한 영양소 (예를 들어, 류신)의 부재 하에 성장하는 능력에 의해 선택된다. 사카로미세스 세레비지아에에 사용하기 위한 예시적인 벡터 시스템은 형질전환된 세포가 글루코스-함유 배지 중에서의 성장에 의해 선택되게 되는 미국 특허 번호 4,931,373 (Kawasaki et al.)에 의해 개시된 POT1 벡터 시스템이다. 효모에 사용하기 위해 적합한 프로모터 및 터미네이터는 당분해 효소 유전자 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,599,311 (Kawasaki); 미국 특허 번호 4,615,974 (Kingsman et al.); 및 미국 특허 번호 4,977,092 (Bitter) 참조) 및 알콜 데히드로제나제 유전자로부터의 것들을 포함한다. 또한, 미국 특허 번호 4,990,446; 5,063,154; 5,139,936; 및 4,661,454 참조. 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 스키조사카로미세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미세스 프라길리스(*Kluyveromyces fragilis*), 우스틸라고 마이디스(*Ustilago maydis*), 피키아 파스토리스, 피키아 메타놀리카, 피키아 구일레르몬디이(*Pichia guillermondii*) 및 칸디다 말토사(*Candida maltosa*)를

포함한, 다른 효모에 대한 형질전환 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986]; 미국 특허 번호 4,882,279 (Cregg); 및 문헌 [Raymond et al., *Yeast* 14:11-23, 1998] 참조. 아스페르길루스(*Aspergillus*) 세포는 미국 특허 번호 4,935,349 (McKnight et al.)의 방법에 따라 활용할 수 있다. 아크레모늄 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 형질전환시키는 방법은 미국 특허 번호 5,162,228 (Sumino et al.)에 개시되어 있다. 뉴로스포라(*Neurospora*)를 형질전환시키는 방법은 미국 특허 번호 4,486,533 (Lambowitz)에 개시되어 있다. 피키아 메타놀리카에서의 재조합 단백질의 생성은 미국 특허 번호 5,716,808; 5,736,383; 5,854,039; 및 5,888,768에 개시되어 있다.

[0194] 박테리아 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실루스(*Bacillus*), 및 다른 속의 균주를 포함한, 원핵 속 주 세포가 또한 본 발명 내에서 유용한 숙주 세포이다. 이들 숙주를 형질전환시키고 그 내에 클로닝된 외래 DNA 서열을 발현하기 위한 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 상기 문헌 [Sambrook et al.] 참조). 융합 폴리펩티드를 박테리아 예컨대 이. 콜라이에서 발현하는 경우에, 폴리펩티드는 세포질 내에, 전형적으로 불용성 과립으로서 유지될 수 있거나, 또는 박테리아성 분비 서열에 의해 주변세포질 공간으로 지시될 수 있다. 전자의 경우에, 세포는 용해되고, 과립은 회수되고, 예를 들어, 구아닌 HCl 또는 우레아를 사용하여 변성된다. 이어서 변성된 폴리펩티드는 변성제를 희석함으로써, 예를 들어 우레아 및 환원 및 산화된 글루타티온의 조합물의 용액에 대한 투석에 의해, 이어서 완충 염수 용액에 대한 투석에 의해 재풀딩되고 이량 체화될 수 있다. 대안적으로, 단백질은 세포질로부터 가용성 형태로 회수되고, 변성제의 사용 없이 단리될 수 있다. 단백질은 세포로부터, 예를 들어, 포스페이트 완충 염수 내에 수성 추출물로서 회수된다. 관심 단백질을 포획하기 위해, 추출물은 크로마토그래피 매질, 예컨대 고정화된 항체 또는 헤파린-세파로스 칼럼에 직접 적용된다. 분비된 폴리펩티드는 세포를 파괴하고 (예를 들어, 초음파치료 또는 삼투압 충격에 의함) 단백질을 회수하고, 그로 인해 변성 및 재풀딩에 대한 필요를 제거함으로써 주변세포질 공간으로부터 가용성 및 기능적 형태로 회수될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Lu et al., *J. Immunol. Meth.* 267:213-226, 2002] 참조.

[0195] 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 통상적인 절차에 따라 영양소 및 선택된 숙주 세포의 성장을 위해 요구되는 다른 구성성분을 함유하는 배양 배지 중에서 배양된다. 규정 배지 및 복합 배지를 포함한, 다양한 적합한 배지가 관련 기술분야에 공지되어 있고 일반적으로 탄소 공급원, 질소 공급원, 필수 아미노산, 비타민 및 미네랄을 포함한다. 배지는 또한 요구될 때 성장 인자 또는 혈청과 같은 구성성분을 함유할 수 있다. 성장 배지는 일반적으로, 예를 들어, 발현 벡터 상에서 전달되거나 숙주 세포 내로 동시-형질감염된 선택가능 마커에 의해 보완되는 약물 선택 또는 필수 영양소의 결핍에 의해 외인성으로 첨가된 DNA를 함유하는 세포를 선택할 것이다.

[0196] 본 발명의 단백질은, 전형적으로 크로마토그래피 기술의 조합에 의해, 통상적인 단백질 정제 방법에 의해 정제된다. 일반적으로 문헌 [Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988; 및 Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1994] 참조. 이뮤노글로불린 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 단백질은 고정화된 단백질 A 상의 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 추가적인 정제 단계, 예를 들어 겔 여과는 목적되는 수준의 순도를 수득하거나 또는 탈염화, 완충제 교환 등을 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0197] 예를 들어, 분별증류 및/또는 통상적인 정제 방법은 재조합 숙주 세포로부터 정제된 본 발명의 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질을 수득하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 황산암모늄 침전 및 산 또는 카오토로프제 추출은 샘플의 분별증류에 사용될 수 있다. 예시적인 정제 단계는 히드록시아파타이트, 크기 배제, FPLC 및 역상고성능 액체 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 적합한 크로마토그래피 매질은 유도체화 텍스트란, 아가로스, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 특수 실리카 등을 포함한다. PEI, DEAE, QAE 및 Q 유도체가 적합하다. 예시적인 크로마토그래피 매질은 페닐, 부틸 또는 옥틸 기로 유도체화된 그러한 매질, 예컨대 페닐-세파로스 FF (파마시아), 토요필 부틸 650 (토소 하스(Toso Haas), 웬실베니아주 몽고메리빌), 옥틸-세파로스 (파마시아) 등; 또는 폴리아크릴 수지, 예컨대 앰버크롬 CG 71 (토소 하스) 등을 포함한다. 적합한 고체 지지체는 그들이 사용되는 조건 하에 불용성인 유리 비드, 실리카-기반 수지, 셀룰로스계 수지, 아가로스 비드, 가교 아가로스 비드, 폴리스티렌 비드, 가교 폴리아크릴아미드 수지 등을 포함한다. 이들 지지체는 아미노 기, 카르복실 기, 술프히드릴 기, 히드록실 기 및/또는 탄수화물 모이어티에 의한 단백질의 부착을 허용하는 반응성 기로 변형될 수 있다.

[0198] 커플링 화학의 예는 브로민화시아노겐 활성화, N-히드록시숙신이미드 활성화, 에폭시드 활성화, 술프히드릴 활성화, 히드라지드 활성화, 및 카르보디이미드 커플링 화학을 위한 카르복실 및 아미노 유도체를 포함한다. 이들 및 다른 고체 매질은 널리 공지되어 있고 관련 기술분야에서 광범위하게 사용되고, 상업적 공급업체로부터 입수 가능하다. 폴리펩티드 단리 및 정제를 위한 특정한 방법의 선택은 통상적인 디자인의 문제이고 선택된 지지체의 특성에 의해 부분적으로 결정된다. 예를 들어, 문헌 [Affinity Chromatography: Principles & Methods

(Pharmacia LKB Biotechnology 1988); 및 Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996)] 참조.

[0199] 단백질 단리 및 정제에서의 추가적인 변이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고안될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 (예를 들어, ApoA-1에 상응하는 폴리펩티드 세그먼트에 특이적으로 결합하는 항체)는 면역친화성 정제에 의해 다량의 단백질을 단리하는데 사용될 수 있다.

[0200] 본 발명의 단백질은 또한 특정한 특성의 이용에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 고정화된 금속 이온 흡착 (IMAC) 크로마토그래피는 폴리히스티딘 태그를 포함하는 것들을 포함한, 히스티딘-풍부 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. 간략하게, 젤은 먼저 2가 금속 이온으로 하전되어 킬레이트를 형성한다 (문헌 [Sulkowski, *Trends in Biochem. 3:1, 1985*]). 히스티딘-풍부 단백질은 사용된 금속 이온에 따라, 상이한 친화성을 갖는 이 매트릭스에 흡착될 것이고, 경쟁적 용리, pH 저하, 또는 강한 킬레이트화제의 사용에 의해 용리될 것이다. 정제의 다른 방법은 렉틴 친화성 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에 의한 글리코실화 단백질의 정제를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol. 182:529, 1990*] 참조). 본 발명의 추가적인 실시양태 내에서, 관심 폴리펩티드의 융합 및 친화성 태그 (예를 들어, 말토스-결합 단백질, 이뮤노글로불린 도메인)는 정제를 용이하게 하기 위해 구축될 수 있다. 더욱이, 융합 폴리펩티드 또는 그의 이량체의 수용체- 또는 리간드-결합은 정제를 위해 활용될 수 있다. 예를 들어, A β -결합 폴리펩티드 세그먼트를 포함하는 융합 폴리펩티드는 친화성 크로마토그래피를 사용함으로써 단리될 수 있고, 여기서 아밀로이드 베타 (A β) 펩티드는 칼럼에 결합되고 융합 폴리펩티드는 결합된 후 표준 크로마토그래피 방법을 사용하여 용리된다.

[0201] 본 발명의 폴리펩티드는 거대분자, 특히 다른 단백질 및 핵산을 오염시키는 것, 및 감염원 및 발열원 무함유에 대하여 전형적으로 적어도 약 80% 순도, 보다 전형적으로 적어도 약 90% 순도, 바람직하게는 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 순도로 정제된다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 99.9% 순도보다 더 큰 제약상 순수한 상태로 정제될 수 있다. 특정한 제제에서, 정제된 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드, 특히 동물 기원의 다른 폴리펩티드를 실질적으로 함유하지 않는다.

IV. 사용 방법 및 제약 조성물

[0203] 본 발명의 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질을 사용하여 다양한 질환 또는 장애의 치료를 위한 ApoA-1-매개 요법을 제공할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 제2 폴리펩티드 세그먼트 (예를 들어, RNase, 파라옥소나제, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라제 (PAF-AH), 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 (CETP), 또는 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT))를 추가로 포함하는 이중특이적 융합물과 관련한 일부 측면에서, 융합 폴리펩티드 및 이량체 단백질은 이러한 치료를 위한 하나 이상의 추가적인 생물학적 활성을 추가로 제공할 수 있다.

[0204] 특정한 측면에서, 본 발명은 아테롬성동맥경화증을 특징으로 하는 심혈관 질환, 신경변성 질환, 아밀로이드 침착물을 특징으로 하는 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 감염성 질환, 비만, 대사 증후군, 신증후군, 화상, 황 머스타드 기체에 대한 노출, 유기포스페이트에 대한 노출 및 암으로부터 선택된 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 투여하는 것을 포함한다.

[0205] 본 발명에 따른 치료에 순응성이 아테롬성동맥경화성 심혈관 질환은, 예를 들어, 관상동맥 심장 질환 및 뇌졸중을 포함한다. 관상동맥 심장 질환의 치료의 일부 변이에서, 관상동맥 심장 질환은 급성 관상동맥 증후군을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 아테롬성동맥경화성 심혈관 질환은 대뇌 동맥 질환 (예를 들어, 두개외 대뇌 동맥 질환, 두개내 대뇌 동맥 질환), 동맥경화성 대동맥 질환, 신동맥 질환, 장간막 동맥 질환 및 말초 동맥 질환 (예를 들어, 대동맥장골동맥 폐쇄성 질환)으로부터 선택된다.

[0206] 본 발명에 따른 치료에 순응성이 신경변성 질환은, 예를 들어, 아밀로이드 침착물 및/또는 치매를 특징으로 하는 신경변성 질환을 포함한다. 아밀로이드 침착물을 특징으로 하는 예시적인 신경변성 질환은 알츠하이머병이다. 치매를 특징으로 하는 예시적인 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 신경변성 질환은 염증성 질환 예컨대, 예를 들어, CNS의 탈수초성 염증성 질환 (예를 들어 척수-시신경 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화형 MS (RRMS)을 포함한, 예를 들어, 다발성 경화증 (MS))이다.

[0207] 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병 또는 파킨슨병)을 치료하는 방법의 일부 실시양태에서, 신경변성 질환 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1) 또는 ApoA1-

L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 용합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 용합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, (ii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675, (iii) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (iv) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (v) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (vi) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0208]

본 발명에 따른 치료에 순응성인 자가면역 질환은, 예를 들어, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 제1형 당뇨병을 포함한다. 다른 실시양태에서, 자가면역 질환은 복강 질환, 신경염, 다발근염, 소아 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 백반증, 쇼그伦 증후군, 자가면역 체장염, 염증성 장 질환 (예를 들어, 크론병, 궤양성 결장염), 활동성 만성 간염, 사구체신염, 루푸스 신염, 경피증, 항인지질 증후군, 자가면역 혈관염, 사르코이드증, 자가면역 갑상선 질환, 하시모토의 갑상선염, 그레이브스병, 베게너 육아종증, 중증 근무력증, 애디슨병, 자가면역 포도막망막염, 심상성 천포창, 원발성 담즙성 간경변증, 악성 빈혈, 교감신경성 안염, 포도막염, 자가면역 용혈성 빈혈, 폐 섬유증, 만성 베릴롭 질환 및 특발성 폐 섬유증으로부터 선택된다. 일부 변이에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 경피증, 건선, 쇼그伦 증후군, 제1형 당뇨병, 항인지질 증후군 및 자가면역 혈관염으로부터 선택된다.

[0209]

일부 실시양태에서, 자가면역 질환의 치료를 위한 용합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]), ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1), 또는 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 용합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 용합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534, (vi) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, (vii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675, (viii) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ix) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (x) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (xi) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 류마티스 관절염 (RA)을 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, RA 치료를 위한 용합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역])를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 용합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 용합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, 또는 (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534와 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 전신 홍반성 루푸스 (SLE)를 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, SLE 치료를 위한 용합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1) 또는 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 용합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 용합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, (ii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675, (iii) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (iv) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (v) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (vi) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 다발성 경화증 (MS)를 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, MS 치료를 위한 용합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 용합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 용합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하

거나 또는 그로 이루어진다.

[0210]

본 발명에 따른 치료에 순응성인 염증성 질환은, 예를 들어, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 비만을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 질환은 신경변성 염증성 질환 예컨대, 예를 들어, 다발성 경화증, 알츠하이머병 또는 파킨슨병이다. 다른 실시양태에서, 염증성 질환은 아데롭성동맥경화성 질환 (예를 들어, 관상동맥 심장 질환 또는 뇌출중)이다. 추가의 다른 변이에서, 염증성 질환은 간염 (예를 들어, 비-알콜성 지방간염), 강직성 척추염, 관절염 (예를 들어, 골관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선성 관절염), 크론병, 케양성 결장염, 피부염, 계실염, 섬유근육통, 과민성 장 증후군 (IBS), 및 신염으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 염증성 질환은 염증성 폐 질환이며; 일부 이러한 실시양태에서, 염증성 폐 질환은 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기관지확장증, 특발성 폐 섬유증, 고산소증, 저산소증, 및 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)으로부터 선택된다. 일부 변이에서, 염증성 폐 질환을 갖는 환자는 황 머스타드 기체 (SM)에 노출되었던 환자이다. 다른 변이에서, 염증성 폐 질환을 갖는 환자는 유기포스페이트, 예컨대 살균제 또는 다른 신경독소에 노출되었던 환자이다.

[0211]

일부 실시양태에서, 염증성 질환 (예를 들어, 염증성 폐 질환)의 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]), ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1) 또는 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534, (vi) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, (vii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675, (viii) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ix) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (x) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (xi) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 특발성 폐 섬유증을 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, 특발성 폐 섬유증 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역])를 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, 또는 (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 황 머스타드 기체 (SM) 또는 유기포스페이트에 노출되었던 환자에서 염증성 폐 질환을 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 저산소증, 또는 고산소증을 치료하는 방법의 일부 특정한 변이에서, 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, 또는 (ii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675와 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 이러한 ApoA1-L1-D-L2-RNase 변이는 연장된 시간의 기간 동안 산소로 치료된 조산아를 치료하는데 사용된다.

[0212]

일부 실시양태에서, 황 머스타드 기체 (SM)에 대한 노출 또는 유기포스페이트에 대한 노출의 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48

의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어진다.

[0213] 본 발명에 따른 치료에 순응성인 감염성 질환은, 예를 들어, 박테리아 감염 및 기생충 감염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기생충 감염은 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) 또는 리슈마니아(*Leishmania*) 감염이다. 다른 실시양태에서, 박테리아 감염은 슈도모나스 아에루기노사 감염이다.

[0214] 슈도모나스 아에루기노사 감염을 치료하는 방법의 일부 실시양태에서, 슈도모나스 아에루기노사 감염 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ii) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (iii) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (iv) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어진다.

[0215] 일부 실시양태에서, 감염성 질환 (예를 들어, 염증성 폐 질환)의 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역])를 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, 또는 (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534와 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어진다.

[0216] 본 발명에 따라 치료될 수 있는 암은, 예를 들어, 하기를 포함한다: 두경부의 암 (예를 들어, 구강, 구인두, 비인두, 하인두, 비강 또는 부비동, 후두, 구순, 또는 타액선의 암); 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암, 소세포 암 종, 또는 중피종); 위장관암 (예를 들어, 결장직장암, 위암, 식도암, 또는 항문암); 위장관 기질 종양 (GIST); 췌장 선암종; 췌장 선방 세포 암종; 소장의 암; 간 또는 담도계의 암 (예를 들어, 간 세포 선종, 간세포성 암종, 혈관육종, 간외 또는 간내 담관육종, 바터 팽대부의 암, 또는 담낭암); 유방암 (예를 들어, 전이성 유방암 또는 염증성 유방암); 부인과 암 (예를 들어, 자궁경부암, 난소암, 난관암, 복막 암종, 질암, 외음부암, 임신성 용모성 종양, 또는 자궁암, 예를 들어 자궁내막암 또는 자궁 육종); 요로의 암 (예를 들어, 전립선암; 방광암; 음경암; 요도암, 또는 신장암, 예를 들어, 신세포 암종 또는 이행 세포 암종, 예를 들어 신우 및 요관); 고환암; 중추 신경계 (CNS)의 암, 예를 들어 두개내 종양 (예를 들어, 성상세포종, 역형성 성상세포종, 교모세포종, 펩지교종, 역형성 펩지교종, 상의세포종, 원발성 CNS 림프종, 수모세포종, 배세포 종양, 송과선 신생물, 수막종, 뇌하수체 종양, 신경초의 종양 (예를 들어, 슈반세포종), 척삭종, 두개인두종, 맥락종 종양 (예를 들어, 맥락종 암종); 또는 뉴런 또는 신경교 기원의 다른 두개내 종양) 또는 척수의 종양 (예를 들어, 슈반세포종, 수막종); 내분비 신생물 (예를 들어, 갑상선암, 예를 들어, 갑상선 암종, 수질성 암, 또는 갑상선 림프종; 췌장 내분비 종양, 예를 들어, 인슐린종 또는 글루카곤종; 부신 암종, 예를 들어, 크롬친화세포종; 카르시노이드 종양; 또는 부갑상선 암종); 피부암 (예를 들어, 편평 세포 암종; 기저 세포 암종; 카포시 육종; 또는 악성 흑색종, 예를 들어, 안내 흑색종); 골암 (예를 들어, 골 육종, 예를 들어, 골육종, 골연골종, 또는 유잉 육종); 다발성 골수종; 녹색종; 연부 조직 육종 (예를 들어, 섬유상 종양 또는 섬유조직구성 종양); 평활근 또는 골격 근의 종양; 혈관 또는 림프관 혈관주위 종양 (예를 들어, 카포시 육종); 활막 종양; 중피 종양; 신경 종양; 부신경절 종양; 골격외 연골 또는 골 종양; 및 만능성 중간엽 종양. 일부 이러한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자는 조합 요법 예컨대, 예를 들어, 비-ApoA1-매개 면역조정 요법 (예를 들어, 면역체크포인트 억제제를 포함하는 요법), 방사선 요법, 또는 화학요법을 포함하는 조합 요법의 구별되는 요법 중 하나로서 암 환자에게 투여된다.

[0217] 특정 실시양태에서, 조합 암 요법은 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자 및 표적화된 요법 예컨대, 예를 들어, 특이적 세포-표면 또는 세포외 항원을 표적화하는 치료 모노클로날 항체, 또는 세포내 단백질을 표적화하는 소형 분자 (예를 들어, 세포내 효소)를 포함한다. 예시적인 항체 표적화된 요법은 항-VEGF (예를 들어, 베바시주맙), 항-EGFR (예를 들어, 세툭시맙), 항-CTLA-4 (예를 들어, 이필리무맙), 항-PD-1 (예를 들어, 니볼루맙) 및 항-PD-L1 (예를 들어, 펜브롤리주맙)을 포함한다. 예시적인 소형 분자 표적화된 요법은 프로테아솜 억제제 (예를 들어, 보르테조맙), 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 이마티닙), 시클린-의존성 키나제 억제제 (예를 들어, 셀리시클립); BRAF 억제제 (예를 들어, 베무라페닙 또는 다브라페닙); 및 MEK 키나제 억제제 (예를 들어,

들어, 트라메티닙)을 포함한다.

[0218] 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 일부 암 조합 요법 변이에서, 조합 요법은 항-PD-1/PD-L1 요법, 항-CTLA-4 요법, 또는 둘 다를 포함한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자는 항-CTLA-4 또는 항-PD-1/PD-L1 요법에 대한 반응 속도, 뿐만 아니라 항-CTLA-4 + 항-PD-1/PD-L1 요법의 조합에 대한 반응 속도를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 융합 분자는 또한 항-CTLA-4, 항-PD-1/PD-L1, 또는 그의 조합과 연관된 독성을 감소시키는데 유용할 수 있다.

[0219] 특정 변이에서, 본 발명에 따라 치료되는 암은 악성 흑색종, 신세포 암종, 비소세포 폐암, 방광암 및 두경부암으로부터 선택된다. 이들 암은 면역 체크포인트 억제제 항-PD-1/PD-L1 및 항-CTLA-4에 대한 반응을 제시한 바 있다. 문헌 [Grimaldi *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 16:433-41, 2016; Gunturi *et al.*, *Curr. Treat. Options Oncol.* 15:137-46, 2014; Topalian *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 16:275-87, 2016] 참조. 따라서, 일부 보다 구체적인 변이에서, 임의의 이들 암은 항-PD-1/PD-L1 요법, 항-CTLA-4 요법 또는 둘 다와 조합하여 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자로 치료된다.

[0220] 일부 실시양태에서, 암의 치료를 위한 융합 분자는 구조 ApoA1-L1-D (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]), ApoA1-L1-D-L2-RNase (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-RNase1) 또는 ApoA1-L1-D-L2-파라옥소나제 (예를 들어, ApoA1-L1-[Fc 영역]-L2-PON1)를 갖는 폴리펩티드, 또는 임의의 상기 융합 폴리펩티드의 이량체화에 의해 형성된 이량체 단백질이며; 일부 이러한 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 (i) 서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (ii) 서열식별번호: 13의 아미노산 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524, (iii) 서열식별번호: 20의 아미노산 잔기 19-501, 19-500, 25-501, 또는 25-501, (iv) 서열식별번호: 22의 아미노산 잔기 19-515, 19-514, 25-515, 또는 25-514, (v) 서열식별번호: 24의 아미노산 잔기 19-535, 19-534, 25-535, 또는 25-534, (vi) 서열식별번호: 4의 아미노산 잔기 19-675 또는 25-675, (vii) 서열식별번호: 14의 아미노산 잔기 19-657 또는 25-675, (viii) 서열식별번호: 28의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, (ix) 서열식별번호: 38의 아미노산 잔기 19-873 또는 25-873, (x) 서열식별번호: 46의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883, 또는 (xi) 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 19-883 또는 25-883과 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0221] 치료 용도를 위해, 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질은 치료가 고려되는 질환 또는 장애의 관리와 연관된 통상적인 방법론과 일치하는 방식으로 전달된다. 본원의 개시내용에 따라, 유효량의 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질은 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는데 충분한 시간 동안 및 조건 하에 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다.

[0222] 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질의 투여를 위한 대상체는 특정한 질환 또는 장애가 발생할 위험이 큰 환자, 뿐만 아니라 기준 질환 또는 장애를 보이는 환자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 치료가 고려되는 질환 또는 장애를 갖는 것으로 진단되었다. 추가로, 대상체는 치료의 과정 동안 질환 또는 장애의 임의의 변화에 대해 (예를 들어, 질환 또는 장애의 임상 증상의 증가 또는 저하에 대해) 모니터링될 수 있다. 또한, 일부 변이에서, 대상체는 ApoA-1 단백질의 투여를 수반하는 치료를 필요로 하는 또 다른 질환 또는 장애에 걸리지 않는다.

[0223] 예방 용도에서, 제약 조성물 또는 의약은 특정한 질환에 감성이거나, 또는 달리 특정한 질환의 위험이 있는 환자에게 질환의 위험을 제거 또는 감소시키거나 질환의 발병을 지연시키기 위해 충분한 양으로 투여된다. 치료 용도에서, 조성물 또는 의약은 그러한 질환이 의심되거나 이미 그러한 질환에 걸린 환자에게 질환의 증상 및 그의 합병증을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 중지시키기 위해 충분한 양으로 투여된다. 이를 달성하는데 적당한 양은 치료상 또는 제약상 유효 용량 또는 유효량으로서 지칭된다. 예방적 및 치료적 레지멘 둘 다에서, 작용제는 통상적으로 충분한 반응 (예를 들어, 관상동맥 심장 질환에서 기존 플라크의 아테롬성동맥경화증 퇴행 또는 안정화)이 달성될 때까지 여러 투여량으로 투여된다. 전형적으로, 반응은 모니터링되고, 목적되는 반응이 사라지기 시작하면 반복 투여량이 제공된다.

[0224] 본 발명의 방법에 따른 치료에 대해 대상체 환자를 식별하기 위해, 수용되는 스크리닝 방법을 이용하여 특이적 질환과 연관된 위험 인자를 결정하거나 또는 대상체에서 식별된 기준 질환의 상태를 결정할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 개체가 특정한 질환으로 진단된 친척이 있는지 결정하는 것을 포함할 수 있다. 스크리닝 방법은 또한, 예를 들어, 유전성 구성성분을 갖는 것으로 공지된 특정한 질환에 대한 가족성 상태를 결정하기 위해 통상적인 정밀검사를 포함할 수 있다. 이를 위해, 뉴클레오티드 프로브가 관심 특정한 질환과 연관된 유전적 마커를 보유하는 개체를 식별하기 위해 통상적으로 이용될 수 있다. 추가로, 구체적 질환에 대한 마커를

식별하는데 유용한 매우 다양한 면역학적 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 스크리닝은 공지된 환자 정후학, 연령 인자, 관련 위험 인자 등에 의해 지시되는 바와 같이 시행될 수 있다. 이들 방법은 임상의가 치료를 위해 본원에 기재된 방법을 필요로 하는 환자를 통상적으로 선택하도록 한다. 이들 방법에 따라, 본 발명의 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 사용하는 치료는 독립적인 치료 프로그램으로서 또는 다른 치료에 대한 추적, 부가, 또는 협응 치료 레지멘으로서 시행될 수 있다.

[0225] 투여를 위해, 본 발명에 따른 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질은 제약 조성물로서 제제화된다. 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 포함하는 제약 조성물은 제약상 유용한 조성물을 제조하기 위한 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있고, 그에 의해 치료 분자는 제약상 허용되는 담체와 혼합물로 조합된다. 조성물은 수여체 환자가 그의 투여를 견딜 수 있는 경우에 "제약상 허용되는 담체"인 것으로 지정된다. 무균 포스페이트-완충 염수는 제약상 허용되는 담체의 한 예이다. 다른 적합한 담체는 관련 기술분야에서의 것들로 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)] 참조. 제제는 하나 이상의 부형제, 보존제, 가용화제, 완충제, 바이알 표면 상에서 단백질 손실을 예방하기 위한 일부민 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0226] 본 발명의 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 포함하는 제약 조성물은 유효량으로 대상체에게 투여된다. 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질은, 예를 들어, 근육내, 피하, 정맥내, 심방내, 관절내, 비경구, 비내, 폐내, 경피, 흉막내, 경막내, 및 경구 투여 경로를 포함한, 다양한 투여 방식에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 예방 및 치료 목적을 위해, 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질은 단일 볼루스 전달로, 연장된 기간에 걸쳐 연속적 전달 (예를 들어, 연속적 경피 전달)을 통해, 또는 반복 투여 프로토콜로 (예를 들어, 매시간, 매일, 또는 매주 기준으로) 대상체에게 투여될 수 있다.

[0227] 이 문맥에서 유효 투여량의 결정은 전형적으로 동물 모델 연구에 이은 인간 임상 시험을 기반으로 하고 모델 대상체에서 대상 질환 또는 장애의 발병 또는 중증도를 유의하게 감소시키는 유효 투여량 및 투여 프로토콜을 결정함으로써 유도된다. 본 발명의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지의 여부, 투여되는 다른 의약, 처치가 예방적인지 치료적인지의 여부, 및 조성물 자체의 특이적 활성 및 개체에서 목적되는 반응을 야기하는 그의 능력을 포함한, 많은 상이한 인자에 따라 달라진다. 통상적으로, 환자는 인간이지만, 일부 질환에서 환자는 비인간 포유동물일 수 있다. 전형적으로, 투여 레지멘은 최적 치료 반응을 제공하기 위해, 즉, 안정성 및 효능을 최적화하기 위해 조정된다. 따라서, 치료 또는 예방 유효량은 또한 임의의 목적되지 않은 측부 효과가 유익한 효과에 의해 능가되는 것이다 (예를 들어, 아테롬 성동맥경화성 심혈관 질환의 치료의 경우에, 임의의 목적되지 않는 측부 효과는 임의의 유익한 효과 예컨대 HDL에서의 증가, 아테롬성동맥경화증 퇴행, 및/또는 플라크 안정화에 의해 능가됨). 본 발명의 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질의 투여를 위해, 투여량은 전형적으로 약 0.1 μg 내지 100 mg/kg 또는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 50 mg/kg, 보다 통상적으로 10 μg 내지 5 mg/대상체의 체중 kg이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 작용제의 유효량은 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 20 mg/kg, 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg이다. 이 범위 내의 투여량은, 예를 들어, 매일의 다수 투여 또는 매일, 매주, 격주, 또는 매달 투여를 포함한, 단일 또는 다수 투여에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 특정 변이에서, 레지멘은 초기 투여 이어서 매주 또는 격주 간격의 다수의 후속 투여로 이루어진다. 또 다른 레지멘은 초기 투여에 이은 매달 또는 격월 간격의 다수의 후속 투여로 이루어진다. 대안적으로, 투여는 질환 또는 장애의 임상 증상의 모니터링 및/또는 질환 바이오마커 또는 다른 질환 상호연관성 (예를 들어, 아테롬성동맥경화성 심혈관 질환의 경우에 HDL 수준)의 모니터링에 의해 나타낸 바와 같이 불규칙 기준으로 수행될 수 있다.

[0228] 아테롬성동맥경화증의 치료를 위한 본 발명의 ApoA-1 조성물의 효능을 평가하기 위한 특히 적합한 동물 모델은, 예를 들어, 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 또는 ApoE가 결핍되어 있는 공지된 마우스 모델을 포함한다. LDLR 결핍 마우스는 12주 동안 고지방 식이를 먹은 후에 아테롬성동맥경화성 플라크가 발생하고, 인간 ApoA-1 (지질로 재구성됨)은 이 모델에서 플라크를 감소시키는데 효과적이다. ApoE 결핍 마우스는 또한 통상적으로 아테롬 성동맥경화증을 연구하기 위해 사용되고, 인간 ApoA-1 (지질로 재구성됨)은 이 모델에서 신속하게 작용한다. 간 리파제에 대해 트랜스제닉인 토끼는 ApoA-1 조성물을 시험하기 위한 또 다른 공지된 아테롬성동맥경화증 모델이다.

[0229] 알츠하이머병의 하나의 모델은 마우스에서 돌연변이체 아밀로이드- β 전구체 단백질 (APP) 및 프레세닐린 1의 과다발현을 사용한다. 이들 마우스에서, 인간 ApoA-1의 과다발현은 기억 및 학습 결핍이 예방된다. 문헌 [Lewis et al., *J Biol. Chem.* 285: 36958-36968, 2010] 참조.

- [0230] 류마티스 관절염 (RA)에 대한 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 모델이 또한 공지되어 있다. CIA는 RA와 유사한 면역학적 및 병리학적 특색을 공유하여, ApoA-1 조성물의 효능을 평가하기 위한 이상적 모델을 제조한다. 예를 들어, 문헌 [Charles-Schoeman *et al.*, *Clin Immunol.* 127:234-44, 2008] (CIA 모델에서, ApoA-1 모방체 펩티드, D-4F의 효능을 제시하는 연구를 기재함) 참조. RA에 대한 또 다른 공지된 모델은 암컷 루이스 래트에서의 PG-폴리사카라이드 (PG-PS)-유도된 관절염이다. 이들 마우스에서, ApoA-1 단백질 또는 재구성된 HDL의 투여는 급성 및 만성 관절 염증을 감소시켰다. 문헌 [Wu *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:543-551, 2014] 참조.
- [0231] 다발성 경화증 (MS)에 대한 동물 모델은, 예를 들어, CNS 항원으로의 면역화에 의해 CNS에서 자가면역 반응의 유도에 의존하는 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE) 모델을 포함하며 (또한 EAE의 문맥에서 "뇌염원"으로도 지칭됨), 이는 염증, 탈수초화, 및 약화로 이어진다. ApoA-1 결핍 마우스는 이 모델에서 야생형 동물보다 더 많은 신경변성 및 더 악화된 질환을 나타내는 것으로 제시된 바 있다. 문헌 [Meyers *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 277: 176-185, 2014] 참조.
- [0232] 본 발명의 융합 분자는 동물 종양 모델 예컨대, 예를 들어, B16 흑색종, 불량한 면역원성 종양에서 항종양 활성을 대해 평가될 수 있다. 종양 면역요법의 다중 모델이 연구된 바 있다. 문헌 [Ngiow *et al.*, *Adv. Immunol.* 130:1-24, 2016] 참조. B16 흑색종 모델은 체크포인트 억제제 항-CTLA-4, 항-PD-1, 및 그의 조합으로 광범위하게 연구된 바 있다. 항-CTLA-4 단독은 GM-CSF 형질도입된 종양 백신과 조합되거나, 또는 항-PD-1과 조합될 때만 이 모델에서 강력한 치료 효과를 갖는다. 문헌 [Weber, *Semin. Oncol.* 37:430-439, 2010; Ai *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 64:885-92, 2015; Haanen *et al.*, *Prog. Tumor Res.* 42:55-66, 2015] 참조. 악성 흑색종의 치료를 위한 ApoA-1 융합 분자의 효능은, 예를 들어, 촉진성 피하 종양 결절이 형성된 B16 흑색종 마우스에게 투여 후 감속된 종양 성장에 의해 제시된다. ApoA-1 융합 분자의 효능은 단독으로, 또는 대안적으로, 또 다른 항암 요법과 조합하여 (예를 들어, 종양 백신이 있거나 없는, 또는 항-PD-1/PD-L1이 있거나 없는, 항-CTLA-4) B16 흑색종 마우스에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 ApoA-1 융합 분자 및 항-CTLA-4의 조합을 사용하여 B16 흑색종 마우스에서의 종양 거부는 ApoA-1 요법을 사용하여 항-CTLA-4에 대한 증진된 반응을 입증한다. 마우스에서 기능적 활성이지만 이들 모델에서 면역원성으로 예상되고 (그로 인해 7-10일 후에 중화 항체의 형성을 유발할 가능성이 있는), 인간 단백질 서열을 포함하는 ApoA-1 융합 분자를 평가하기 위한 예시적인 연구에서, 마우스에 단기간 동안 본 발명의 융합 분자가 투여될 수 있고 (예를 들어, 1주, 예를 들어, 3일 간격으로 약 40mg/kg의 2개 용량으로 투여됨), 이어서 종양 성장을 전형적으로 융합 분자로 주사 후에 2 내지 3주 동안 모니터링된다.
- [0233] 제약 조성물의 투여량은 표적 부위에서 목적되는 농도를 유지하기 위해 담당 임상의에 의해 달라질 수 있다. 예를 들어, 정맥내 전달 방식이 선택되는 경우에, 표적 조직에서 혈류 내의 작용제의 국부 농도는 대상체의 상태 및 예상된 측정된 반응에 따라 리터당 약 1-50 나노몰의 조성물, 때때로 리터당 약 1.0 나노몰 내지 리터당 10, 15, 또는 25 나노몰일 수 있다. 전달 방식, 예를 들어, 경표피 전달 대 점막 표면에의 전달을 기반으로 하여 보다 고농도 또는 보다 저농도가 선택될 수 있다. 투여량은 또한 투여된 제제의 방출 속도를 기반으로 하여, 예를 들어, 비강 스프레이 대 분말, 지속 방출 경구 또는 주입된 입자, 경피 제제 등에 따라 조정되어야 한다. 동일한 혈청 농도 수준을 달성하기 위해, 예를 들어, 5 나노몰의 방출 속도를 갖는 서방형 입자 (표준 조건 하에)는 10 나노몰의 방출 속도를 갖는 입자의 투여량의 약 2배로 투여될 것이다.
- [0234] 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 포함하는 제약 조성물은 액체 형태로, 에어로졸로, 또는 고체 형태로 제공될 수 있다. 액체 형태는 주사 가능한 용액, 에어로졸, 점액, 외용 용액 및 경구 혼탁액으로 예시된다. 예시적인 고체 형태는 캡슐, 정제, 및 제어-방출 형태를 포함한다. 후자의 형태는 미니 삼투 펌프 및 임플란트로 예시된다. 예를 들어, 문헌 [Bremer *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 95-123 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems* 239-254 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997); Yewey *et al.*, "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997)] 참조. 다른 고체 형태는 크림, 페이스트, 다른 외용 적용 등을 포함한다.
- [0235] 분해성 중합체 마이크로구체는 치료 단백질의 높은 전신 수준을 유지하도록 디자인된 바 있다. 마이크로구체는 분해성 중합체 예컨대 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLG), 폴리무수물, 폴리 (오르토 에스테르), 비생분해성 에틸비닐 아세테이트 중합체로부터 제조되며, 여기서 단백질은 중합체 중에 포착된다. 예를 들어, 문헌 [Gombotz

and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, *Science* 281:1161, 1998; Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548, 1998] 참조. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-코팅된 나노구체는 또한 치료 단백질의 정맥내 투여를 위한 담체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gref *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:167, 1997] 참조.

[0236] 다른 투여 형태는, 예를 들어, 문헌 [Ansel and Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea & Febiger, 5th ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995), 및 Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996)]에 제시된 바와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고안될 수 있다.

[0237] 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물은 또한 조합 치료의 문맥에 사용될 수 있다. 용어 "조합 요법"은 대상체가 적어도 하나의 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질 및 또 다른 치료제를 투여받음을 나타내는 것으로 본원에 사용된다.

[0238] 제약 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩티드 또는 이량체 단백질을 포함하는 용기를 포함하는 키트로서 공급될 수 있다. 치료 분자는, 예를 들어, 단일 또는 다종 용량을 위한 주사가능한 용액의 형태로, 또는 주사 전에 재구성될 무균 분말로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 이러한 키트는 치료 단백질의 투여를 위해 건조-분말 분산기, 액체 에어로졸 발생기, 또는 네뷸라이저를 포함할 수 있다. 이러한 키트는 제약 조성물의 적응증 및 용법에 대한 서면 정보를 추가로 포함할 수 있다.

[0239] 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 예시된다.

실시예 1

[0241] 분자 디자인 및 제조: 2개 ApoA-1-Fc cDNA 구축물을 디자인하고, 합성하고, COS7 세포의 일시적 형질감염에 의해 발현하고, 이어서 발현된 단백질을 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 1개 구축물은 뉴클레오티드 서열을 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖고 서열식별번호: 2의 융합 폴리펩티드를 코딩하고, 또한 ApoA-1(26)Fc 또는 THER4로서 본원에 지칭하였다. 이 구축물은 인간 ApoA-1의 C-말단 단부 (서열식별번호: 2의 잔기 1-267) 및 인간 γ1 Fc 변이체 (서열식별번호: 2의 잔기 294-525) 사이의 26개 아미노산 링커 (서열식별번호: 2의 잔기 268-293)를 코딩하는 DNA 세그먼트를 함유하였다. 포유동물 세포에서의 발현 및 분비 신호 펩티드 (잔기 1-18)의 절단, 및 프로펩티드 (잔기 19-24)의 임의의 잠재적 절단 시, 이 융합 폴리펩티드는 서열식별번호: 2의 잔기 19-525, 19-524, 25-525, 또는 25-524에 상응하는 예측 아미노산 서열을 가졌다 (Fc 영역의 C-말단 리신은 Fc-함유 단백질의 생성에서 빈번하게 절단되는 것으로 공지됨). 다른 구축물은 ApoA-1 및 ApoA-1(26)Fc 구축물의 것들과 동일한 Fc 영역을 함유하였지만, 인간 ApoA-1 및 Fc 영역 사이의 (gly4ser) 링커가 결여되었고; 이 구축물은 또한 ApoA-1(2)Fc (테리오피온) 또는 THER0 ((gly4ser) 반복 단위가 없는 경우)으로 본원에 지칭된다. 이 구축물은 인간 IgG1의 ApoA-1 영역 및 헌지 영역 사이의 중첩 제한 부위의 삽입으로 인해 2개 아미노산 링커를 함유한다.

[0242] 콜레스테롤 유출: ApoA-1 융합 단백질의 콜레스테롤 유출 활성을 시험관내 검정을 사용하여 측정하였다. 문헌 [Tang *et al.*, *J Lipid Res.* 47:107-14, 2006] 참조. 시험관내 콜레스테롤 유출 검정을 방사성-표지화된 콜레스테롤 및 미페프리스톤-유도성 인간 ABCA1을 발현하는 BHK 세포를 사용하여 수행하였다. H3-콜레스테롤을 치료 24시간 전에 세포의 콜레스테롤을 표지화하기 위해 성장 배지에 첨가하고, ABCA1을 16-20시간 동안 10nM 미페프리스톤을 사용하여 유도하였다. 콜레스테롤 유출을, 37°C에서 2시간 동안 융합 단백질의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션하고, 열음 상에서 냉각시키고, 배지 및 세포를 분리하여 방사성표지화된 콜레스테롤을 측정함으로써 측정하였다. 야생형 인간 ApoA-1 단백질을 양성 대조군으로서 사용하였다. ApoA-1 및 Fc 영역 사이에 임의의 링커 없이 Fc에 직접 연결된, 상업적으로 입수가능한 ApoA-1-Fc 단백질 (APOA1 재조합 인간 단백질, hIgG1-Fc 태그; 시노 바이올로지칼, 인크.(Sino Biological, Inc.))을 또한 시험하고, ApoA-1(0)Fc (시노 바이올)로 본원에 지칭하였다. 이 검정의 결과는 도 1에 제시된다. 콜레스테롤 유출은 2개 아미노산 링커를 갖는 ApoA-1-Fc (ApoA-1(2)Fc (테리오피온)) 또는 링커가 없는 ApoA-1-Fc (ApoA-1(0)-Fc (시노 바이올))와 비교 시, 26개 아미노산 링커를 갖는 ApoA-1-Fc (ApoA-1(26)Fc)를 함유하는 배양물에서 증가되었다. ApoA-1(26)Fc는 또한 야생형 인간 ApoA-1 (대조군 ApoA-1)과 유사한 활성을 가졌다.

[0243] 실시예 2: 융합 구축물을 생성 및 서열 검증

[0244] 추가적인 ApoA1 융합 구축물을 디자인하고, 융합 유전자 서열을 유전자 합성을 위해 블루 헤론(Blue Heron) (워싱턴주 보텔)에 제출하였다. 기능적 도메인의 위치를 다이어그램화하는 기본 개략도는 ApoA1 융합 단백질의 디자인을 위해 도 2a 및 2b에 제시된다. pUC-기반 벡터에 삽입된 융합 유전자 구축물을 제한 효소 소화에 의해 단리하고, 융합 유전자를 코딩하는 단편을 포유동물 발현 벡터 pDG로 서브클로닝하였다. 간략하게, HindIII+XbaI 플랭킹 제한 부위를 벡터로부터 각각의 발현 유전자의 제거를 위해 사용하고, 하위단편을 겔 전기 영동에 의해 단리하고, DNA를 퀴아愧 정제 칼럼을 사용하여 추출하고, 30 마이크로리터 EB 완충액으로 용리하였다. 단편을 HindIII+XbaI 소화된 pDG 벡터로 라이게이션하고, 라이게이션 반응물을 NEB 5-알파, 화학적 적격 박테리아로 형질전환시켰다. 클론을 100 µg/ml 암피실린을 함유하는 3 ml LB 브로쓰에 접종하고, 200 rpm에서 진탕하면서 밤새 37°C에서 성장시키고, 퀴아젠 스펀 플라스미드 미니 프렙 키트를 사용하여 제조업체의 지침서에 따라 플라스미드 DNA를 제조하였다. 시퀀싱 프라이머를 IDT 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스(IDT Integrated DNA Technologies) (아이오와주 코랄빌)로부터 수득하였으며, 하기를 포함하였다:

pdgF-2: 5'-ggtttggcagtagatcaatgg-3' (서열식별번호: 16);

pdgR-2: 5'-ctattgtttccaaatccccc-3' (서열식별번호: 17);

higgras: 5'-accttgacttgtactcctt-3' (서열식별번호: 18).

[0248] 플라스미드 DNA (800 ng) 및 시퀀싱 프라이머 (25 pmol, 또는 5 µl의 5 pmol/µl 스톡)를 혼합하고, DNA 시퀀싱을 위해 진위즈(GENEWIZ) (뉴저지주 사우스 플레인필드)에 제출하였다. 이어서 크로마토그램을 분석하고, 서열을 콘티그로 어셈블리하고, 서열을 벡터 NTI 어드밴스 11.5 소프트웨어 (라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)를 사용하여 검증하였다.

[0249] 실시예 3: 일시적 HEK 293T 형질감염 시스템에서 융합 단백질의 발현

[0250] 본 실시예는 포유동물 일시적 형질감염 시스템에서 본원에 기재된 플라스미드 구축물의 형질감염 및 융합 단백질의 발현을 예시한다. 정확한 서열을 갖는 Ig 융합 유전자 단편을 포유동물 발현 벡터 pDG에 삽입하고, 양성 클론으로부터의 DNA를 퀴아젠 플라스미드 제조 키트 (퀴아젠(QIAGEN), 캘리포니아주 발렌시아)를 사용하여 증폭시켰다. 5개의 상이한 구축물을 생성하였다. 이들은 각각 인간 ApoA-1 유전자의 천연 코딩 서열 (서열식별번호: 36에 제시된 아미노산 서열을 코딩하는, 서열식별번호: 35에 제시된 뉴클레오티드 서열)을 포함하였다. 각각의 서열은 아포지단백질 A-1에 대한 야생형 신호 펩티드 (서열식별번호: 36의 아미노산 1-18을 코딩하는, 서열식별번호: 35의 뉴클레오티드 1-54) 및 프로펩티드 서열 (서열식별번호: 36의 아미노산 19-24를 코딩하는, 서열식별번호: 35의 뉴클레오티드 55-72)을 포함하였다. ApoA-1 서열의 C-말단 Q (Gln) 잔기를 가변 길이 링커 세그먼트를 통해 인간 IgG1 헌지, CH2 및 CH3 도메인에 연결하여 단일 쇄 (ApoA-1)-1nk-인간 IgG1 Fc 융합 유전자/단백질을 생성하였다. 인간 IgG1의 헌지 서열을 3개 시스테인이 세린 잔기로 대체되도록 돌연변이시켜, 이 영역에서 디술피드 결합 형성 또는 융합 단백질의 적절한 폴딩을 절충할 수 있는 쌍형성되지 않은 시스테인을 제거하였다. CH2의 P238 및 P331 잔기를 또한 세린으로 돌연변이시켜 이팩터 기능 예컨대 ADCC 및 보체 고정을 제거하였다. 각각의 구축물은 또한 아포지단백질 A-1의 카르복실 말단 (서열 ...TKKLNTQ (서열식별번호: 35 잔기 261-267)로 종결됨) 및 인간 Fc의 헌지 서열의 처음 (모티프 ...EPKSSDKT... (서열식별번호: 2의 잔기 294-301)로 시작됨) 사이에 삽입된 링커 서열을 포함하였다. 이 링커 서열은 구축물에 따라, 2개 아미노산 (또는 플랭킹 도메인을 갖는 중첩이 포함된 경우 4개) 내지 36개 아미노산 길이였다.

[0251] 가장 짧은 링커는 6개의 추가적인 뉴클레오티드 또는 2개의 추가적인 비-천연 아미노산의 링커 길이를 갖는 오직 2개의 중첩 제한 부위 (BgIII 및 XhoI)를 포함하였다. 제한 부위를 오직 요구되는 2개의 추가적인 아미노산이 아미노산 서열에 침가되도록 분자의 코딩 서열로 혼입하였다. 링커의 BgIII 부위는 ApoA-1의 C-말단 글루타민에 대한 코돈과 중첩하고, XhoI 부위를 코딩하는 뉴클레오티드 중 3개는 헌지의 첫번째 아미노산 (E-글루탐산)에 대한 코돈을 형성한다. 링커 아미노산 서열 (2개의 중첩 아미노산을 포함함)은 서열식별번호: 19의 뉴클레오티드 816-825에 의해 코딩된 서열식별번호: 20의 잔기 267-270에 제시된다. 이 구축물에 대한 융합 유전자 및 단백질은 THER0 ((gly4ser) 반복 단위가 없기 때문임) 또는 apoA-1-1nk(2)hIgG로 식별된다. THER0에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 서열식별번호: 19 및 서열식별번호: 20으로 열거된다. 수치는 이 구축물을 구체화하기 위해 THER0 명명법을 사용한다.

[0252] 제2 구축물은 제한 부위에 의해 플랭킹된 2개 (gly4ser) 서열 (16개 아미노산 링커)을 코딩하는 링커를 포함하였고, 이 구축물에 대한 융합 유전자 및 단백질은 THER2 (또는 apoA-1-1nk(16)-hIgG1 또는 apoA-1-(g4s)2-

hIgG1)로 식별된다. THER2에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 21 및 서열식별번호: 22로 열거된다. (gly4ser)2 링커 서열은 서열식별번호: 22의 잔기 268-283에 제시되고, (gly4ser)2 링커에 대한 코딩 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 21의 잔기 817-864에 제시된다.

[0253] 제3 구축물은 제한 부위에 의해 플랭킹된 4개 (gly4ser) 서열 (26개 아미노산 링커)을 포함하였고, 이 구축물에 대한 융합 유전자 및 단백질은 THER4 (또는 apoA-1-(g4s)4-mthIgG 또는 apoA-1-lnk(26)-mthIgG)로 식별되며, 여기서 "THER4"의 "4"는 (gly4ser) 반복 단위의 수를 지칭하고, 숫자 26은 비-천연, 도입된 링커 서열에서 코딩된 아미노산의 총 수를 지칭한다. THER4에 대한 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2로 열거된다. (gly4ser)4 링커 서열은 서열식별번호: 50 (서열식별번호: 2의 잔기 268-293)에 제시되고, (gly4ser)4 링커에 대한 코딩 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 49 (서열식별번호: 1의 잔기 817-894)에 제시된다.

[0254] 제4 구축물은 제한 부위에 의해 플랭킹된 6개 (gly4ser) 서열 (36개 아미노산 링커)을 코딩하는 링커를 포함하였고, 이 구축물에 대한 융합 유전자 및 단백질은 THER6 (또는 apoA-1-(g4s)6-mthIgG 또는 apoA-1-lnk(36)-mthIgG)으로 식별된다. THER6에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 23 및 서열식별번호: 24로 열거된다. (gly4ser)6 링커 서열은 서열식별번호: 52 (서열식별번호: 24의 잔기 268-303)에 제시되고, (gly4ser)6 링커에 대한 코딩 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 51 (서열식별번호: 23의 잔기 817-924)에 제시된다.

[0255] 제5 구축물은 제한 부위에 의해 플랭킹된 4개 (gly4ser) 서열 (36개 아미노산 링커)을 코딩하는 링커를 포함하였지만, 추가로, 구축물은 IgG1 도메인의 카르복실 말단에 제2 링커 및 효소 서열을 포함하였다. (gly4ser)4 링커 서열은 THER4에 대해 상기 기재된 바와 같다 (뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 49 및 서열식별번호: 50에 제시됨). 제2 링커는 N-연결된 글리코실화 부위를 포함하는 18개 아미노산 길이 서열 (VDGASSPVNVSSPSVQDI; 서열식별번호: 7의 뉴클레오티드 1-54에 의해 코딩된, 서열식별번호: 8의 아미노산 잔기 1-18), 이어서 인간 RNase1 효소 활성을 코딩하는 서열이다. 링커 서열은 서열식별번호: 7의 첫번째 54개 뉴클레오티드, 또는 서열식별번호: 8의 처음 18개 아미노산, 이어서 RNase 서열로 열거된다. ApoA-1-lnk-hIgG1 세그먼트는 NLG-RNase에 융합되고, 이 구축물은 THER4RNA2로 식별된다. 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 4로 식별된다.

[0256] 5개 구축물 각각에 대한 미니프랩 DNA를 제조하고, 농도를 나노드롭 분석에 의해 조사하였다.

[0257] 형질감염 전날에, 대략 1.2×10^6 293T 세포를 60 mm 디쉬에 플레이팅하였다. 미니-플라스미드 제제 (60mm 플레이트의 경우 4.0 μg DNA)를 퀴아젠 폴리펙트(QIAGEN POLYFECT)® 시약 (카탈로그 # 301105/301107)를 사용하고, 제조업체의 지침서에 따라 293T 형질감염에 사용하였다. 배양 상청액을 형질감염 후 48-72시간에 수확하였다. 대부분의 형질감염을 위해, 배지를 형질감염 후 24시간에 혈청-무함유 배지로 교환하고, 배양물을 수확전에 추가로 48시간 동안 인큐베이션하였다.

[0258] 배양 상청액은 추가의 분석을 위해 직접적으로 사용하였다. 일시적으로 감염된 세포로부터의 각각 7 μl 의 혈청-무함유 배양 상청액을 각각의 샘플에 첨가된 4X LDS 샘플 완충액 (라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)의 4X 희석물과 함께 젤 상에 로딩하여 1X LDS 로딩 완충액의 최종 농도를 수득하였다. 젤을 환원하기 위해, 샘플 환원제를 1/10 최종 부피로 첨가하였다. 샘플을 10분 동안 72°C에서 가열하고, 누페이지(NuPAGE)® 4-12% 비스-트리스 젤 (라이프 테크놀로지스/써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific), 뉴욕주 그랜드 아일랜드) 상에 로딩하였다. 젤을 1.5시간 동안 180 볼트로 1X 누페이지® MOPS SDS-PAGE 전개 완충액 (NP0001, 라이프 테크놀로지스/써모피셔)에서 전기영동에 적용하고, 단백질을 1시간 동안 30 볼트로 XCell II™ 블롯 모듈 (카탈로그 #EI002/EI9051, 라이프 테크놀로지스/써모피셔, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)을 사용하여 니트로셀룰로스로 옮겼다. 블롯을 5% 탈지유를 함유하는 PBS 중에서 4°C에서 밤새 블로킹하였다. 블롯을 양고추냉이 퍼옥시다제 접합된 염소 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch), 카탈로그 #109-036-098, Lot# 122301)의 1:250,000X 희석물과 함께 인큐베이션하였다. 블롯을 PBS/0.05% 트윈 20에서 각각 30분 동안 3회 세척하고, 1분 동안 써모사이언티픽 ECL 시약 (카탈로그 #32106)에서 현상하였다. 블롯을, 블롯에 따라, 30초 내지 2분 동안 오토라디오그래프 필름에 노출시켰다. 도 3은 대표적인 293T 일시적 형질감염으로부터 배양 상청액의 웨스턴 블롯 분석을 제시한다. 양성 및 음성 대조군 (각각 CD40IgG 및 모의 형질감염/DNA 없음)을 각각의 형질감염 시리즈에 포함하였다. 감염된 샘플은 도 3에 나타낸 바와 같고; 레인은 좌측에서 우측으로 하기와 같다: 레인 #1 - 모의 형질감염; 레인 #2 - CD40IgG; 레인 #3 - MW 마커; 레인 #4 - THER0; 레인 #5 - THER2; 레인 #6 - THER4; 레인 #7 - THER6; 레인 #8 - MW 마커; 레인 #9 - THER4RNA2.

[0259] THERO, THER2, THER4, 및 THER6 융합 단백질은 50 kDa 분자량 마커 위의 위치에서 전개하였다. 이들 융합 단백질에 대해 예측된 분자량은 각각 대략 55, 56, 56.6 및 57 kDa여야 한다. 증가하는 링커 길이는 각각의 융합 단백질에 대해 변경된 이동성에 의해 입증된다. THER4RNA2 분자는 대략 73.2 kDa이도록 예측되지만, ApoA-1은 28.6 kDa에 전개하는 것으로 예상된다. CD40lgG 대조군은 대략 55 kDa에 전개하는 것으로 예상된다.

실시예 4: 안정한 CHO 세포주에서 THERmthIgG 및 다중-서브유닛 Ig 융합 구축물 및 융합 단백질의 발현

[0261] 본 실시예는 진핵 세포주에서 본원에 기재된 상이한 Ig 융합 유전자의 발현 및 SDS-PAGE 및 IgG 샌드위치 ELISA에 의해 발현된 융합 단백질의 특징을 예시한다.

융합 단백질을 발현하는 안정한 세포주의 형질감염 및 선택

[0263] Ig 융합 단백질의 안정한 생성은 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) CHO DG44 세포 안으로, CMV 프로모터의 제어 하에 THER-mthIgG cDNA (다양한 길이의 링커에 의해 인간 IgG1의 헌지 및 Fc 도메인으로부터 분리된 인간 apo A-1 형태)를 함유하는, 선택가능, 증폭가능한 플라스미드, pDG의 전기천공에 의해 달성되었다.

[0264] pDG 벡터는 플라스미드에 대한 선택 압력을 증가시키기 위해 약화된 프로모터를 갖는 DHFR 선택가능 마커를 코딩하는 pcDNA3의 변형된 버전이다. 플라스미드 DNA (200 μ g)를 퀴아젠 하이스피드(QIAGEN HISPEED)® 맥시프 랩 키트를 사용하여 제조하고, 정제된 플라스미드를 고유한 AscI 부위 (뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 매사추세츠주 임스위치 카탈로그 # R0558)에 선형화하고, 폐놀 추출 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스)에 의해 정제하고, 에탄올 침전시키고, 세척하고, 이엑스-셀(EX-CELL)® 302 조직 배양 배지 (카탈로그 #14324, SAFC/시그마 알드리치, 미주리주 세인트 루이스)에서 재현탁하였다. 연어 정자 DNA (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스)를 폐놀 추출 및 에탄올 침전 직전에 담체 DNA에 첨가하였다. 플라스미드 및 담체 DNA를 공침전시키고, 400 μ g을 사용하여 전기천공에 의해 2×10^7 CHO DG44 세포를 형질감염시켰다.

[0265] 형질감염을 위해, CHO DG44 세포를 글루타민 (4 mM), 피루베이트, 재조합 인슐린 (1 μ g/ml), 폐니실린-스트렙토마이신, 및 2xDMEM 비필수 아미노산 (모두 라이프 테크놀로지스로부터 입수, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)을 함유하는, 이하에서 "이엑스-셀 302 완전" 배지로서 지칭된, 이엑스-셀® 302 배지 (카탈로그 # 13424C, SAFC 바이오사이언시스(SAFC Biosciences), 미주리주 세인트 루이스)에서 대수기로 성장시켰다. 비형질감염된 세포 및 형질감염될 세포에 대한 배지는 또한 HT (하이포크산틴 및 티미딘의 100x 용액으로부터 희석됨) (인비트로젠/라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)를 함유하였다. 전기천공을 280 볼트, 950 마이크로페럿으로, 정전용량 연장제를 갖는 바이오라드(BioRad) (캘리포니아주 허클레스) 진펄서(GENEPLICER)® 전기천공 유닛을 사용하여 수행하였다. 전기천공을 0.4 cm 갭 멀균, 일회용 큐벳에서 수행하였다. 전기천공된 세포를 전기천공 후 T75 플라스크에서 비-선택 이엑스-셀 302 완전 배지로 배양물의 전송 전에 5분 동안 인큐베이션하였다.

[0266] 형질감염된 세포를 250 세포/웰 (2500 세포/ml) 내지 2000 세포/웰 (20,000 세포/ml) 범위의 다양한 연속 희석으로 96 웰 편평 바닥 플레이트 (코스타(Costar))에 선택적인 플레이팅 전에 비-선택 배지에서 밤새 회수되도록 하였다. 세포 클로닝에 대한 배양 배지는 50 nM 메토트렉세이트를 함유하는 이엑스-셀 302 완전 배지였다. 형질감염 플레이트를 80 μ l 신선한 배지로 5일 간격에 공급하였다. 처음 몇 번의 공급 후에, 배지를 제거하고 신선한 배지로 대체하였다. 플레이트를 모니터링하고 클론 증식이 전면생장에 가깝게 될 때까지 개별 웰에 클론을 공급하고, 이후에 클론을 1 ml 배지를 함유하는 24 웰 디쉬로 확장시켰다. 최초 96 웰 플레이트로부터의 배양 상청액의 분취물을 24 웰 플레이트에 세포의 전달 및 확장 전에 두번째 96 웰 플레이트로 수확하였다. 이 두번째 플레이트를 IgG 농도를 추정하기 위한 ELISA 분석까지 냉동시켰다.

재조합 융합 단백질의 생성 수준에 대한 배양 상청액 스크리닝

[0268] 초기 형질감염체의 클론 증식이 충분하였다면, 마스터 웰로부터의 배양 상청액의 연속 희석물을 해동하고, 희석물을 IgG 샌드위치 ELISA의 사용에 의해 Ig 융합 단백질의 발현에 대해 스크리닝하였다. 간략하게, 눈크 맥시소르프(NUNC MAXISORP)® 플레이트를 PBS 중 2 μ g/ml F(ab'2) 염소 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치, 펜실베니아주 웨스트 그로브; 카탈로그 # 109-006-098)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBS/3% BSA로 블로킹하고, 배양 상청액의 연속 희석물을 2-3시간 동안 실온에서 또는 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05 % 트윈 20으로 3회 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제 접합된 F(ab'2)염소 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치, 웨스트 그로브, 펜실베니아, 카탈로그 # 109-036-098)로 PBS/0.5% BSA 중에서 1:7500-1:10,000으로, 1-2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20 중에서 5회 세척하고, 결합을 슈어블루리저브(SUREBLUE RESERVE)™ TMB 기질 (KPL 랩스, 메릴랜드주 게이더스버그; 카탈로그 #53-00-02)로 검출하였다. 반응을 동일 부피의 1N HCl을 첨가하여 중단시키고, 각각의 플레이트에서 웰당 흡광도를 시너지(SYNERGY)

TM HT 플레이트 판독기 (바이오텍(Biotek), 버몬트주 위누스키)에서 450nM로 판독하였다. 농도를 기지의 표준물인 THER 클론의 것과 동일한 Ig 테일을 갖는 단백질 A 정제된 인간 IgG 융합 단백질의 연속 희석물을 사용하여 생성된 표준 곡선에 대해 배양 상청액의 희석률의 OD450을 비교함으로써 추정하였다. 데이터를 GEN5TM 소프트웨어 (바이오텍(Biotek), 버몬트주 위누스키) 및 마이크로소프트 오피스 엑셀(EXCEL)[®] 스프레드시트 소프트웨어를 사용하여 수집하고 분석하였다.

[0269]

CHO 형질감염체의 초기 스크리닝의 결과는 표 3 및 도 4a-4e 및 5a-5c에 요약된다. 표 3은 스크리닝된 클론의 수, 96-웰 배양물로부터 관찰된 발현 수준의 범위, 및 초기 T25 및/또는 24 소비된 배양물로부터 관찰된 발현의 개요를 제시한다. 도 4a-4e는 형질감염 시리즈의 각각의 CHO 클론으로부터 수득된 생성 수준을 나타내는 일련의 칼럼형 그래프를 제시한다. THER0, THER2, THER4, THER6, 및 THER4RNA2 형질감염체로부터의 클론은 제시된 5개 패널의 각각에서 군으로 나타내어진다. 각각의 클론을 IgG 샌드위치 ELISA에 의해 적어도 한번 스크리닝하여 융합 단백질의 발현 수준을 평가하였다. 도 5a-5c는 초기 스크리닝 후에 가장 높은 발현을 갖는 CHO 형질감염체로부터 융합 단백질 발현의 제6일 및 제10일 검정의 결과를 제시하는 3개 패널을 제시한다. 제6일 및 제10일 검정을 T25 플라스크에서 1×10^5 생존가능 세포/ml (5×10^5 초기 접종물)로 5 ml 배양물을 설정함으로써 수행하였다. 배양물을 1 ml 분취물이 제거된 후에 6일 동안 성장시키고 생존 및 사멸 세포를 카운트하였다. 이어서 세포를 원심분리하고 배양 상청액을 IgG 샌드위치 ELISA 및 다른 분석물에 의해 추가의 분석을 위해 남겨 두었다. 배양물의 나머지를 제10일까지 추가의 4일 동안 인큐베이션하고, 세포를 세포 수, 생존율, 및 IgG 샌드위치 ELISA를 위해 수확된 상청액 샘플에 대해 카운트하였다. 결과는 제6일 및 제10일에서 세포 수, 생존율, 및 융합 단백질의 농도에 대해 그래프에 제시된 바와 같이 각각의 클론에 대해 칼럼형 형태의 표로 작성된다.

[0270]

표 3: 안정하게 감염된 CHO DG44 세포에서 ApoA1-IgG 융합 단백질의 발현

구축물	스크리닝된 클론	96 웰 상청액 발현 범위 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	소비된 T25 상위 생산자 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	상위 클론 상에서의 제6일/제10일 검정 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
THER0	45	0-46.5	135	60/230
THER2	135	0-36	145	45/125
THER4	237	0-76	165	70/200
THER6	192	0-57	145	85/250
THER4RNA2	50	0-45	90	50/118

[0271]

융합 단백질의 가장 높은 생성을 갖는 클론을 T25 및 이어서 T75 플라스크 내로 확장시켜 융합 단백질의 생성을 동결하고 규모확대하기 위한 세포의 적당한 수를 제공하였다. 생성 수준을 메토트렉세이트-함유 배양 배지에서 점진적 증폭에 의해 4개의 가장 양호한 클론으로부터의 배양물에서 추가로 증가시켰다. 세포의 각각의 연속 계대배양에서, DHFR 플라스미드를 증폭시킨 세포만이 생존할 수 있도록, 이엑스-셀 302 완전 배지는 메토트렉세이트의 증가된 농도를 함유하였다. 형질감염을 위한 배지는 선택적 증폭 하에, 달성된 증폭의 정도에 따라, 50 nM 내지 1 μM 범위의, 선택적 작용제로서 메토트렉세이트 (시그마-알드리치)의 다양한 수준을 함유하였다.

[0273]

배양 상청액으로부터 융합 단백질의 정제

[0274]

상청액을 Apo A-1-Ink-mthIgG1 구축물을 발현하는 소비된 CHO 세포 배양물로부터 수집하고, 0.2 μm PES 익스프레스 필터 (날진(Nalgene), 뉴욕주 로체스터)를 통해 여과하고, 단백질 A-아가로스 (IPA 300 가교 아가로스, 또는 IPA 400HC가 가교 아가로스) 칼럼 (레플리겐(Repligen), 매사추세츠주 월섬)을 가로지르는 중력 유동 친화성 크로마토그래피에 적용하였다. 칼럼을 0.1M 시트레이트 완충액, pH 2.2로 캔디셔닝하고, 이어서 상청액을 0.5M NHCO_3 으로 pH 8.0으로 조정하고, 중력 유동에 의해 로딩하여 융합 단백질이 결합하도록 하였다. 칼럼을 용리전에 여러 칼럼 부피 칼럼 세척 완충액 (90mM 트리스-염기, 150mM NaCl, 0.05% 아지드화나트륨, pH 8.7) 또는 둘베코 변형 PBS, pH 7.4로 세척하였다. 결합된 단백질을 0.1 M 시트레이트 완충액, pH 3.2를 사용하여 용리하였다. 분획 (0.8-0.9 ml)을 각각 분획을 0.2 ml 0.5M NaCO_3 - NaHCO_3 완충액으로 수직하여 각각의 분획을 중화시켰다. 각각의 분획으로부터의 분취물 (2 μl)의 단백질 농도를 나노드롭 (델라웨어주 월밍تون) 마이크로샘플 분광광도계를 사용하여 280nm에서 결정하고, 블랭크는 10:1 v:v 비에서 0.1 M 시트레이트 완충액, pH 3.2, 0.5M NaCO_3 을 사용하여 결정하였다. 융합 단백질을 함유하는 분획을 풀링하고, 완충액 교환을 D-PBS (하이클론, 씨모피셔 사이언티픽, 텍사스주 달라스), pH 7.4에 대한 스펙트럼 래보러토리즈 G2 (란치 도밍게즈(Ranch

Dominguez), 캘리포니아주, 카탈로그 #G235057, 퍼셔 사이언티픽 카탈로그 # 08-607-007) 플로트-에이-라이저 (FLOAT-A-LYZER)® 유닛 (MWCO 20kDa)을 사용하는 투석에 의해 수행하였다. 투석을 멸균, 2.2 리터 코닝 률러 병에서 4°C에서 밤새 수행하였다.

[0275] 투석 후에, 단백질을 0.2 μM 필터 유닛으로 여과하고, 분취물을 피로텔(PYROTELL)® LAL 젤 응고 시스템 단일 시험 바이알 (STV) (카탈로그 # G2006, 어소시에이츠 오브 케이프 코드(Associates of Cape Cod), 매사추세츠 주 이스트 팰머스)을 사용하여 내독소 오염에 대해 시험하였다. THER4 융합 단백질의 1 mg/ml 용액의 예측된 OD 280을 벡터 NTI(VECTOR NTI)® 버전 11.5 소프트웨어 패키지 (인포맥스(Informax), 메릴랜드주 노스 베데스다)에서 단백질 분석 툴 및 온라인 ExPASy 단백질 분석 툴로부터 예측된 절단 부위를 사용하여 1.19 (신호 펩티드 또는 6개 아미노산 프로펩티드가 없는 성숙 단백질) 또는 1.27 (6개 아미노산 프로펩티드를 포함함)인 것으로 결정하였다. CHO 세포로부터 분비된 융합 단백질이 재조합 분자로부터의 프로펩티드의 완전 절단에 관해 균질한지 여부는 불분명하다. 각각의 정제된 융합 단백질에 대한 OD280을 이들 툴을 사용하여 보정하였다.

apo A-1 IgG 융합 단백질의 환원 및 비환원 SDS-PAGE 분석

[0277] 정제된 융합 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 4-12% 비스-트리스 누페이지® 젤 (라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드) 상에서 전기영동에 의해 분석하였다. 융합 단백질 샘플을 디솔피드 결합의 감소의 존재 및 부재 하에 LDS 샘플 완충액 중에서 10분 동안 72°C에서 가열하고 4-12% 비스-트리스 젤 (카탈로그 #NP0301, 라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)에 적용하였다. 5 마이크로그램의 각각의 정제된 단백질을 젤에 로딩하였다. 단백질을 임페리얼(IMPERIAL)™ 단백질 염색 (피어스 임페리얼 단백질 염색 시약, 카탈로그 #24615, 씨모피셔 사이언티픽/피어스, 일리노이주 록포드)에 의해 전기영동 후에 시각화하고, 중류수에서 탈염색하였다. 분자량 마커는 동일한 젤 (칼레이도스코프(KALEIDOSCOPE)™ 사전염색된 표준, 카탈로그 #161-0324, 바이오-라드, 캘리포니아주 허클레스)에 포함되었다. 대표적인 비환원 및 환원 젤로부터의 결과는 각각 도 6a 및 6b에 제시된다. 레인은 좌측에서 우측으로 하기와 같다: 레인 #1 - 칼레이도스코프 사전염색된 MW 마커; 레인 #2 - THER0; 레인 #3 - THER2; 레인 #4 - THER4; 레인 #5 - THER6; 레인 #6 - THER4RNA2; 레인 #7 - 칼레이도스코프 사전염색된 MW 마커. 대략적 분자량은 도면 상에 제시된다.

[0278] 다시, 상이한 융합 단백질 사이의 링커 길이 차이는, THER0 단백질이 50kDa 바로 위에서 전개하는, 환원 및 비환원 젤 둘 다 상에서 입증된다. 헌지 디솔피드의 부재는 환원 또는 비환원 조건 하에 전기이동될 때 각각의 단백질에 대한 유사한 이동성에 의해 입증된다.

apo A-1 IgG 융합 단백질의 네이티브 젤 전기영동

[0280] 단백질 A 정제된 융합 단백질을 네이티브 PAGE 분석에 적용하였다. 블루 네이티브(BLUE Native) PAGE 젤을 제조업체의 지침서에 따라 제조된 캐소드 및 애노드 완충제와 함께 4-16% 비스-트리스 네이티브PAGE(NativePAGE)™ 젤 (라이프 테크놀로지스/씨모피셔)을 사용하여 전개하였다. 샘플 (4.5 μg 각각의 융합 단백질)을 가열없이, 4X 샘플 완충액을 사용하여, 세제 없이 제조하였다. 젤을 150 볼트로 30분 동안, 이어서 180 볼트로 1시간, 및 220 볼트로 마지막 시간 동안 전개하였다. 젤을 중류수 중에서 세척하고 임페리얼™ 단백질 염색에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 젤을 중류수 중에서 반복 세척하여 밤새 광범위하게 탈염색하여 젤을 전개하기 위해 사용된 캐소드 완충제 중에 존재하는 청색 다이를 제거하였다. 도 7은 이들 조건을 사용하여 대표적인 네이티브 젤을 제시한다. 분자량 마커는 샘플을 위해 사용된 로딩 완충액 중에서 다시 세제 첨가 없이 재현탁된, 6개 큰, 다중구성성분 단백질의 혼합물인, 지이 헬스케어 고분자량 보정 마커였다. 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 레인 #1 - 오렌시아(ORENCIA)® (아바타셉트; CTLA4hIgG); 레인 #2 - 항-마우스 CD40 모노클로날 항체 1C10; 레인 #3 - THER4RNA2; 레인 #4 - 지이 헬스케어 고 MW 보정 마커; 레인 #5 - THER6; 레인 #6 - THER4; 레인 #7 - THER2; 레인 #8 - THER0; 레인 #9 - 지이 헬스케어 고 MW 마커; 레인 #10 - 아테네 리서치 Apo A-1.

[0281] 네이티브 ApoA1-IgG 융합 단백질을 140 내지 233 kDa 마커 사이에 어딘가에 대략적 분자량에서 및 오렌시아® (아바타셉트)로서 유사한 이동성, 동일하 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖는 CTLA4Ig 융합 단백질과 함께 전개하였다. THER4RNase 이중특이적 융합 단백질은 RNase 도메인의 고도록 염기성 조성물로 인해 아마도 임페리얼 염색으로 잘 염색되지 않았지만, 233 내지 440 kDa 표준 사이에 이동하는 우세한 가시 밴드를 갖는 보다 확산된 패턴으로 이동하는 것으로 보인다.

실시예 5: THER Apo A-1 융합 단백질의 결합을 평가하기 위한 IgG/Apo A-1 샌드위치 ELISA의 사용

[0283] 항원 결합 ELISA를 수행하여 인간 아포지단백질 A-1에 특이적인 양고추냉이 페옥시다제 접합된 항체에 결합하고

그에 의해 검출될 고정화된 항-인간 IgG (Fc-특이적)에 의해 포획된, IgG 융합 단백질의 능력을 평가하였다. 높은 단백질-결합, 96-웰 ELISA 플레이트 (눈크 맥시소르프® 플레이트, 씨모피셔 사이언티픽)를 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 염소 항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치)로 코팅하였다. 플레이트를 PBS/3% BSA로 4°C에서 밤새 블로킹하였다. 각각의 THER 융합 단백질의 연속 희석물을, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 시작하여, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척한 후에 1:1500으로 희석된 양고추냉이 퍼옥시다제 접합된 항-인간 아포지단백질 A-1 (씨모피셔 사이언티픽, 카탈로그 # PAI-28965)과 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 4회 세척한 후에, 슈어블루 리저브™ TMB 기질 (카탈로그 #: 53-00-02, KPL, 메릴랜드주 게이더스버그)을 80 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 로 플레이트에 첨가하였다. 현상은 80 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 1N HCl의 첨가에 의해 중단하였다. 샘플을 시너지™ HT 바이오텍 플레이트 판독기 (바이오텍 기기, 버몬트주 위누스키)를 사용하여 450 nm에서 판독하고 데이터를 GEN5™ 2.0 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0284]

도 8은 대표적인 Apo A-1 결합 ELISA로부터의 결과를 제시한다. OD450은 융합 단백질의 농도에 대하여 플롯팅하였다. THER 0, 2, 4, 6, 및 THER4RNA2 융합 단백질은 모두 유사한 용량-반응 곡선을 나타내었고, 이는 분자가 각각 Ig 테일에 결합함으로써 포획되고 Apo A-1 도메인이 인간 Apo A-1에 표적화된 항체에 결합함으로써 검출될 수 있다는 것을 나타낸다. 인간 아포지단백질 A-1 (아테네 리서치 & 테크놀로지(Athens Research & Technology), 카탈로그 # 16-16-120101)을 대조군으로서 포함하였고 항-인간 Fc 특이적 항체에 의해 포획되지 않았다. 농도가 높을수록, 분자는 Apo A-1이 표적화된 항체에 의해 약한 결합을 제시하였고, 이는 Apo A-1이 항-Fc 항체에 의한 포획없이 플라스틱에 더 약하게 결합될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0285]

실시예 6: RNase 이중기능적 효소 지질 수송 융합 분자의 발현 및 시험

[0286]

Apo A-1 IgG RNase 융합 단백질 (THER4RNA2)에 대하여, RNase 활성을 검정하여 융합 구축물의 카르복실 단부에 효소의 융합이 RNA를 소화하는 분자의 능력으로 방해될 수 있는지 여부를 결정하였다. 도 9 및 10은 시너지™ HT 플레이트 판독기의 형광 및 동역학적 검정 기능을 사용하여 수행된 RNASE얼러트™ 검정 (IDT, 아이오와주 코랄빌)의 결과를 제시한다. RNASE얼러트™ 기질은 하나의 단부에서 플루오레세인 (R) 및 다른 단부에서 어두운 켄처 (Q)를 갖는 합성 RNA 올리고뉴클레오티드이다. 무손상일 때, 기질은 형광이 거의 없거나 전혀 없지만, RNase에 의해 절단될 때, 기질은 녹색 (490 nm 여기, 520 nm 방사) 형광을 내고 적절하게 장착된 형광 플레이트 판독기로 검출될 수 있다. 본 검정에서 양성 신호는 샘플(들)에 존재한 RNase에 의해 기질의 절단으로 인해 시간 경과에 따라 증가하는 형광 신호를 제시한다. 마이크로플레이트를 RNASE얼러트 기질 (20 pmol/ μl 의 고정 농도), 1X RNASE얼러트 완충액, 및 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가된 융합 단백질 또는 효소 대조군 희석물과 함께 인큐베이션하였다. 효소 활성 검정을 각각의 샘플에 대해 3회 반복하여 수행하고, 동역학적 검정이 60 초마다 연속 판독하여 45분 동안 진행되도록 하였다. 각각의 시점에서 증가하는 형광은 도 9에서 시간의 함수로서의 RFU/웰의 트레이스로서 각각의 웰에 대해 나타내어진다. 효소/융합 단백질의 연속 희석물은 20 pmol/ μl , 13.4 pmol/ μl , 8.9 pmol/ μl , 6 pmol/ μl , 4 pmol/ μl , 2.7 pmol/ μl , 1.8 pmol/ μl 의 효소를 포함하고, 효소를 포함하지 않았다. RNase A (암비온/씨모피셔, 카탈로그 #AM2270)를 양성 대조군으로 포함하고, THER4 (apo A-1-1nk26-hIgG)를 THER4RNA2 융합 단백질과 비교하기 위한 음성 대조군으로 포함하였다. 4 pmol/ μl 효소를 사용하여 생성된 트레이스의 중첩은 도 10에 제시된다. RNaseA, THER4RNA2, 및 THER4의 2개 복제물이 제시된다. 모든 효소는 4 pmol/ μl 이고 기질은 20 pmol/ μl 로 존재한다.

[0287]

실시예 7: 융합 단백질 수용자에 대한 콜레스테롤 유출의 측정

[0288]

2개의 별개의 검정을 사용하여, THER0, THER2, THER4, THER6, 및 THER4RNA2 융합 단백질을 사전-로딩된 단핵구/대식세포 세포주로부터 역 콜레스테롤 수송에 대한 수용자 분자로서 작용하기 위한 그들의 능력에 대해 평가하였다. 제1 검정은 인간 단핵구/대식세포 세포주 THP-1 및 콜레스테롤, BODIPY -콜레스테롤 또는 텁풀루오르-콜레스테롤의 형광 표지화된 유도체 (스테롤 탄소-24에 연결된 형광 봉소 디페로메텐 디플루오라이드를 갖는 콜레스테롤 화합물) (아반티 폴라 리피즈(Avant i Polar Lipids), 알라바마주 알라바스터)를 사용하였다. THP-1 세포를 4mM 글루타민, 10% FBS를 갖는 RPMI 중에서 성장시키고 플레이팅 전에 미드-로그 성장으로 유지하였다. 프로토콜은 문헌 [Sankaranarayanan *et al.* (*J. Lipid Res.* 52:2332-2340, 2011), 및 Zhang *et al.* (*ASSAY and Drug Development Technologies*: 136-146, 2011)]에 요약된 절차로부터 적합화하였다. 세포를 수확하고 33 ng/ml PMA를 함유하는 100 μl RPMI 배지에서 2×10^6 세포/ml 또는 2×10^5 세포/웰로 96-웰 편평 바닥 조직 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 세포를 36-48시간 동안 배양물에서 유지하여 분화가 검정 전에 발생하도록 하였다. 배양 배지를 흡인하고 플레이트를 1xPBS 중에서 세척하였다. 하기 구성성분으로 이루어진 표지화 배지 (배지 보충제를 함유하는 페놀 레드 무함유 RPMI, 0.2% FBS, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 ACAT 억제제, 산도즈 58-035

(시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 2.5 μM 로 LXR 효능제 T0-901317 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 35 ng/ml PMA (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 및 1.25 mM 메틸 베타-시클로덱스트린 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 50 μM 콜레스테롤 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 및 25 μM 텁플루오르 콜레스테롤 (아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids), 알라바마주 알라바스터) 함유)를 100 μl /웰의 부피로 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 10-12시간 동안 인큐베이션하였다. 평형 배지, 10% FBS, 33 ng/ml PMA (100 μl /웰)를 갖는 완전 RPMI를 각각의 웰에 첨가하고 수용자로 인큐베이션 전에 8시간 동안 인큐베이션하였다. 표지화/평형 배지를 플레이트로부터 흡인하고, 플레이트는 200 μl /웰 PBS + 0.15% BSA로 2회 세척하였다. 유출 수용자 시약을 유출 완충액 중 개별 웰에 첨가하고 검정 전에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 수용자를, 검정에 따라, 100nM 내지 500nM 범위의 농도로 유출 완충액에 첨가하였다. 유출 완충액은 성장 보충제 및 0.15% BSA를 갖는 폐놀 적색-무함유 RPMI였다. 샘플을 조건/수용자당 6-12의 세트로 전개하고, 통계적 분석을 위해 최소 5회 반복하여 사용하였다. APO A-1을 양성 대조군으로서 전개하고, 유출 배지 단독을 배경 음성 대조군 (기준선 유출)으로서 사용하였다. 유출 반응을 2시간 동안 진행되도록 하고, 그 후에 배양 배지를 흑색, 평행 바닥 96-웰 플레이트로 수확하였다 (배지 판독). 세포 용해물을 유출 플레이트의 각각의 웰에 100 μl 0.1 N NaOH의 첨가, 및 플레이트 진탕기에서 4°C에서 15분 동안 인큐베이션에 의해 제조하였다. 세포 용해물은 흑색, 96-웰 플레이트로 옮기고 (용해물 판독), 배지 및 용해물 샘플에 대한 형광을 485 nm에서 여기 및 528 nm에서 방사로 시너지™ HT 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 유출을 형광 측정의 비로 계산하였다: (배지/(배지+용해물) x 100). 특이적 유출을 각각의 시험된 수용자에 대한 총 유출/샘플로부터 수용자가 존재하지 않는 샘플의 기준선 판독을 뺏으로써 계산하였다. 데이터 분석을 그래프패드 프리즘 v 4.0 소프트웨어 (캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 수행하였다. 검정 결과는 도 11에 제시된다.

[0289]

제2 검정은 문헌 [Sankaranarayanan *et al.* (*J. Lipid Res.* 52:2332-2340, 2011), 및 Yancey *et al.* (*J. Lipid Res.* 45:337-346, 2004)]에 기재된 바와 같은 콜레스테롤의 방사성 유도체, [³H]-콜레스테롤을 사용하여 역 콜레스테롤 수송 (RCT)을 평가하기 위해 마우스 대식세포 세포주 J774A.1 (ATCC, 버지니아주 마나사스)를 사용하였다. 간략하게, J774 세포 (24 웰 플레이트 중에서 웰당 3.5×10^5)를 5% FBS, ACAT 억제제 산도즈 58-035 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 및 4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [³H]-콜레스테롤이 보충된 0.25 ml RPMI 배지 중에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. ACAT 억제제는 검정 동안 항상 존재하였다. 세포를 수용자로 인큐베이션 전에 cAMP (0.3mM)가 존재 또는 부재하는 배지에서 16-24시간 평형시켰다. cAMP의 존재는 ABCA1 분자를 상향조절한다. 표지화된 세포를 1% BSA를 함유하는 배지 중에서 세척하고, 이어서, 수용자 분자를 MEM-HEPES 배지 중에서 50, 100 및 200nM로 첨가하고, 측정 전에 4시간 동안 인큐베이션하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 이어서 100 μl 의 배지 중 [³H] 콜레스테롤을 액체 섬광 카운팅에 의해 측정하였다. 백분율 유출은 유출 인큐베이션 (t_0 샘플) 전에 세포에 존재한 총 [³H]콜레스테롤을 기반으로 한다. 세포에 존재하는 [³H]콜레스테롤을 측정하기 위해, 세포 단층을 이소프로판을 중에서 밤새 인큐베이션함으로서 세포 지질을 추출하였다. 지질 추출 후에, 지질 추출물에 존재하는 총 [³H]콜레스테롤을 액체 섬광 카운팅에 의해 측정하였다. 데이터 분석을 그래프패드 프리즘 소프트웨어 4.0 (캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 수행하였다. 검정 결과는 도 12에 제시된다.

[0290]

실시예 8: PON1 이중기능적 효소 지질 수송 융합 분자의 구축

[0291]

상기 기재된 apoA-1-IgG-RNase 발현 구축물 이외에, ApoA-1 인지질 수송 기능을 다른 효소 도메인의 활성 부위에 물리적으로 연결하는 추가적인 분자를 구축하였다. 하나의 이러한 분자는 각각 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 및 코딩된 아미노산 서열을 갖는, 인간 파라옥사나제 1 (PON1)에 상응하는 세그먼트를 함유한다. 이 아릴에스테라제 효소는 고밀도 지단백질 (HDL)과 독점적으로 연관된 인간 혈청에 존재하고, 저밀도 지단백질 분자의 산화를 억제한다. 산화로부터의 이 보호는 또한 혈관 및 관상동맥 질환의 발생을 억제한다. PON1의 성숙 단백질 형태는 그것이 분비 후에 그의 아미노 말단 신호 펩티드 (서열식별번호: 11의 뉴클레오티드 잔기 1 내지 45에 의해 코딩된, 서열식별번호: 12의 아미노산 잔기 1 내지 15)를 유지한다는 점에서 고유하다. 절단가능한 아미노 말단을 갖는 PON1의 돌연변이체 형태의 발현은 PON1이 먼저 ApoA-1에 결합하기보다 오히려 직접적으로 인지질에 결합함으로써 그의 아미노 말단을 통해 지단백질과 회합한다는 것을 입증하였다. 문헌 [Sorenson *et al.*, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:2214-2225, 1999] 참조. 신호 서열의 제거는 인지질, 프로테오리포솜, 및 혈청 지단백질에 PON1 모이어티의 결합을 제거하는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로, 야생형 PON1은 ApoA-1에 인지질의 부재 하에 직접적으로 결합하지 않는다. 상기 문헌 [Sorenson *et al.*] 참조. 이들 PON1 신호 서열 돌연변이체는 아마도 최적 인지질 기

질을 결합하기 위한 무능력으로 인해, 감소된 효소 활성을 제시하였다. 그럼에도 불구하고, 인간 PON1의 재조합, 활성 형태는 이 신호 서열을 누락하고 있는 박테리아에서 발현하였다. 문헌 [Stevens *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:12780-12784, 2008] 참조. ApoA-1의 존재는 효소의 아릴에스테라제 활성을 안정화시키는 것으로 보인다.

[0292] PON1의 아미노 말단 신호 서열의 제거 (및 그로 인해 인지질 결합 모이어티) 및 인간 apoA-1-link-IgG를 갖는 이 영역의 치환은 ApoA-1 도메인에 결합된 최적 기질을 제공하면서 아릴에스테라제 효소 활성을 안정시키는, ApoA-1의 인지질 결합 도메인을 갖는 효소 활성을 직접적으로 연결한다. 이러한 분자는 여전히 거래되고, ApoA-1에 의해 결합된 인지질로 수송되고 신호 서열 도메인을 대안적인 인지질 결합 도메인으로 대체함으로 인해 효소 활성을 보유한다. 추가로, 이들 2개의 도메인을 융합하는 이중기능적 분자는 개선된 발현을 나타내고, apo A-1의 활성 결합을 통해 맥락총에 PON1 활성의 표적화를 용이하게 한다. PON1은 인슐린 수용체 표적화 항체의 카르복실 말단에서 발현하였지만 (문헌 [Boado *et al.*, *Mol. Pharm.* 5:1037-1043, 2008; Boado *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 108:186-196, 2011] 참조); 아미노 말단 신호 펩티드는 이 융합 단백질에 포함되었다. 여기 기재된 융합 유전자 및 단백질은 apo A-1 도메인에 말단절단된 효소의 직접 물리적 커플링에 의해 신호 펩티드에 대한 요건을 제거하고, 그로 인해 PON1의 결합 기능 및 아릴에스테라제 활성 둘 다를 보존함으로써 PON1 융합 단백질 발현의 신규 방법을 제공한다.

[0293] 융합 유전자 및 단백질에 대한 서열은 THER4PON1에 대하여 서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 28 (각각 뉴클레오티드 및 아미노산 서열) 및 THER2PON1에 대하여 서열식별번호: 37 및 서열식별번호: 38 (각각 뉴클레오티드 및 아미노산 서열)에 제시된다. 유사한 융합 유전자 및 단백질은 hIgG1-링커-PON1 세그먼트(들)에 융합된 ApoA-1의 대안적인 링커 형태를 함유한다. THER4PON1 및 THER2PON1 분자 내에 PON1 서열은 인간 PON1에 대하여 Q192 대립유전자에 상응한다.

[0294] PON1의 대안적인 형태는 또한 Apo A-1에 PON1을 연결하는 이중기능적 융합 분자를 구축하는데 사용된다. 상이한 기질에 대한 효소 활성에 영향을 미치는 서열 다양성은 PON1 서열의 위치 192에 존재한다. 상기 문헌 [Steven *et al.*] 참조. 이 위치에서의 아미노산은 인간에서 글루타민 (Q) 또는 아르기닌 (R), 또는 토끼에서 리신 (K)일 수 있다. 위치 192에서 아르기닌 대립유전자는 시험관내 및 생체내 더 높은 촉매 활성을 갖는 것으로 보고된 바 있다. 유사하게, 위치 192에서의 리신을 갖는 PON1의 토끼 형태는 시험관내 및 생체내 보다 안정한 촉매 활성을 갖는 것으로 보고된 바 있다 (상기 문헌 [Steven *et al.*]; 문헌 [Richter *et al.*, *Circulation Cardiovascular Genetics* 1:147-152, 2008] 참조). 이들 대안적인 PON1 서열은 PON1 Q192K 형태에 대하여 서열식별번호: 41 (뉴클레오티드) 및 서열식별번호: 42 (아미노산), 및 PON1 Q192R 형태에 대하여 서열식별번호: 43 (뉴클레오티드) 및 서열식별번호: 44 (아미노산)에 제시된다. 이들 대안적 PON1 형태 및 THER4 서열 사이에 융합 구축물 (apoA-1(g4s)4hIgGNLG-...)은 PON1 서열의 아미노산 192에서 (또는 서열식별번호: 46 및 서열식별번호: 48에 제시된 THER4PON1Q 변이체의 아미노산 720에서) PON1 서열에 존재하는 다양성에 따라, THER4PON1 Q192K (각각 서열식별번호: 45 및 서열식별번호: 46에 제시된 뉴클레오티드 및 아미노산 서열) 또는 THER4PON1 Q192R (각각 서열식별번호: 47 및 서열식별번호: 48에 제시된 뉴클레오티드 및 아미노산 서열)로 지정된다. 유사하게, 융합 유전자/단백질의 THER2 형태는 THER2PON1 Q192K 또는 THER2PON1Q192R로 나타낸다. 모든 이를 융합 구축물에 대하여, PON1 아미노 말단 신호 서열 (서열식별번호: 12의 아미노산 1-15)은 제거된다.

[0295] PON1을 포함하는 이중특이적 효소 지단백질 전달 단백질은 비독성 기질 4-(클로로메틸)페닐 아세테이트 (CMPA) 및 페닐 아세테이트를 사용하여 아릴에스테라제/PON1 활성에 대해 스크리닝된다 (상기 문헌 [Richter *et al.*] 참조). 이들 기질은 기질 및 반응 생성물이 유기포스페이트 살충제와 비교하여 상대적으로 비독성이므로 활성을 스크리닝하는데 바람직하다. CMPA 기질 (시그마-알드리치, 임크. 미주리주 세인트 루이스)은 융합 단백질의 연속 희석물과 함께 인큐베이션되고 CMPA 가수분해의 속도는 자외선 투명한 96-웰 플레이트 (코스타, 매사추세츠주 캠브리지)를 사용하여 25°C에서 4분 동안 280nm에서 분석된다. 희석은 3회 반복하여 또는 4회 반복하여 실시되고 기질 농도는 20mM 트리스-HCl (pH 8.0), 1.0 mM CaCl₂에서 3mmol/L로 고정된다. 유사하게, 아릴에스테라제 검정은 기질로서 페닐 아세테이트 상에서 수행된다. PA 가수분해의 속도는 높고 염 조건 및 낮은 염 조건 둘 다 하에 4분 동안, 270nm에서 측정된다.

실시예 9: PAFAH 또는 CETP 이중기능적 효소 지질 수송 융합 분자의 구축

[0297] 상기 기재된 apoA-1-IgG-RNase 및 apoA-1-IgG-PON1 발현 구축물 이외에, ApoA-1 인지질 수송 기능을 다른 효소 도메인의 활성 부위에 물리적으로 연결하는 추가적인 분자가 구축된다.

[0298] 하나의 이러한 분자는 각각 서열식별번호: 31 및 서열식별번호: 32에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 및 코딩된

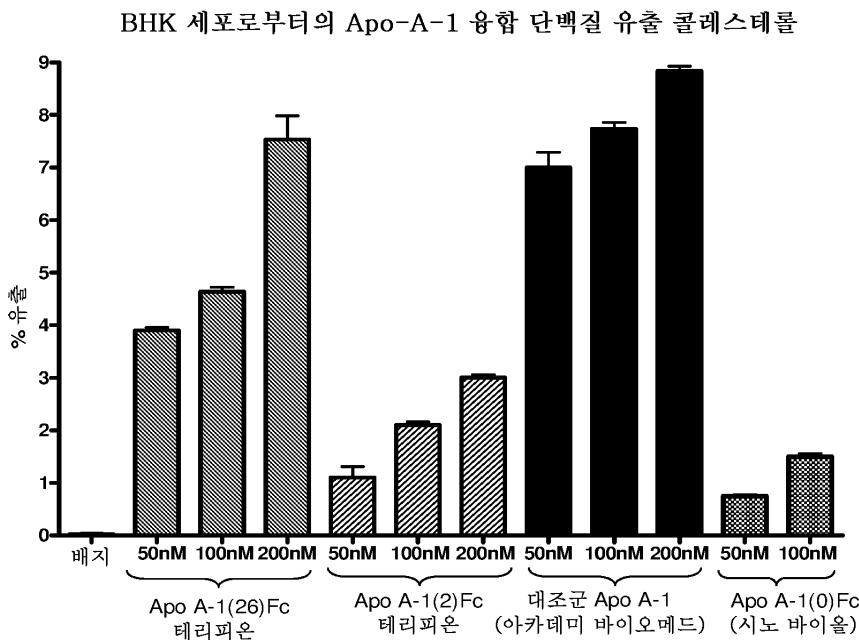
아미노산 서열을 갖는, 인간 PAFAH (지단백질-연관 포스포리파제 A2, 인간 포스포리파제 A2 군 VII, 혈소판 활성화 인자 아세틸 히드롤라제)에 상응하는 세그먼트를 함유한다 (또한 진뱅크 기탁 번호 NM_005084 (전사체 변이체 1) 참조). PAFAH 아미노산 서열은 뉴클레오티드 1593 내지 1595에서의 정지 코돈을 갖는, 서열식별번호: 31의 뉴클레오티드 270 내지 1592에 의해 코딩된다. 융합 유전자 및 단백질은 2개 문자 사이에 삽입된 N-연결된 글리코실화 링커를 갖는 인간 IgG의 카르복실 말단에서 PAFAH 코딩 서열을 융합하여 디자인된다. THER4PAFAH 뉴클레오티드 및 코딩된 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 33 및 서열식별번호: 34로 제시된다. 21개 아미노산 신호 웨티드 (MVPPKLHVLFCLCGCLAVVYP; 서열식별번호: 32의 잔기 1-21)가 없는 PAFAH 서열은 서열식별번호: 34의 아미노산 위치 544에서 NLG 링커에 융합된다.

[0299] 또 다른 이러한 문자는 각각 서열식별번호: 29 및 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 및 코딩된 아미노산 서열을 갖는 인간 CETP 또는 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질 (CETP), 전사체 변이체 1에 상응하는 세그먼트를 함유한다 (또한 진뱅크 기탁 번호 NM_000078 참조). CETP 단백질은 서열식별번호: 29의 뉴클레오티드 58 내지 1537에 의해 코딩된다. 융합 유전자 및 단백질은 2개 문자 사이에 삽입된 N-연결된 글리코실화 링커를 갖는 인간 IgG의 카르복실 말단에서 CETP 코딩 서열을 융합시켜 디자인된다. THER4CETP (또는 인간 apo A-1-(g4s)4-hIgG-NLG-CETP) 뉴클레오티드 및 코딩된 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 39 및 서열식별번호: 40으로 제시된다. 신호 웨티드 (서열식별번호: 30의 아미노산 1-17)를 코딩하는 뉴클레오티드 (서열식별번호: 29의 57-107)는 NLG 링커 서열 및 CETP 성숙 웨티드 사이에 융합 유전자를 생성하기 위해 제거된다. 이들 2개 단백질 도메인 사이에 융합 접합은 서열식별번호: 40의 아미노산 544에 위치된다.

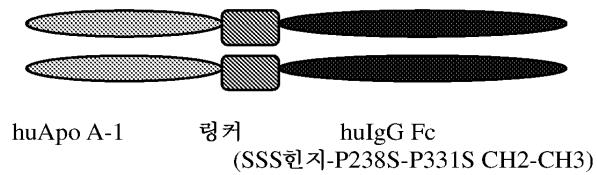
[0300] 상기로부터, 본 발명의 구체적인 실시양태가 예시의 목적을 위해 본원에 기재되었지만, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 가능한 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구범위에 의한 것을 제외하고는 제한되지 않는다. 본원에 인용된 모든 간행물, 특히, 및 특히 출원은 그 전체가 모든 목적으로 본원에 참조로 포함된다.

도면

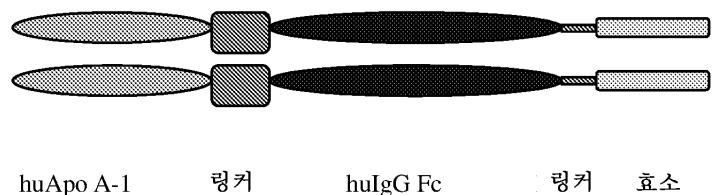
도면1



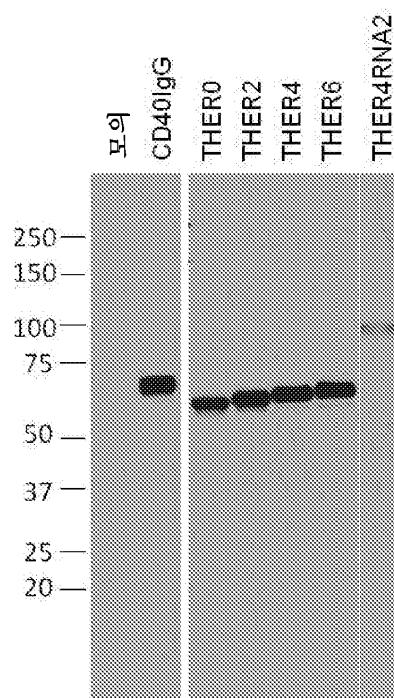
도면2a



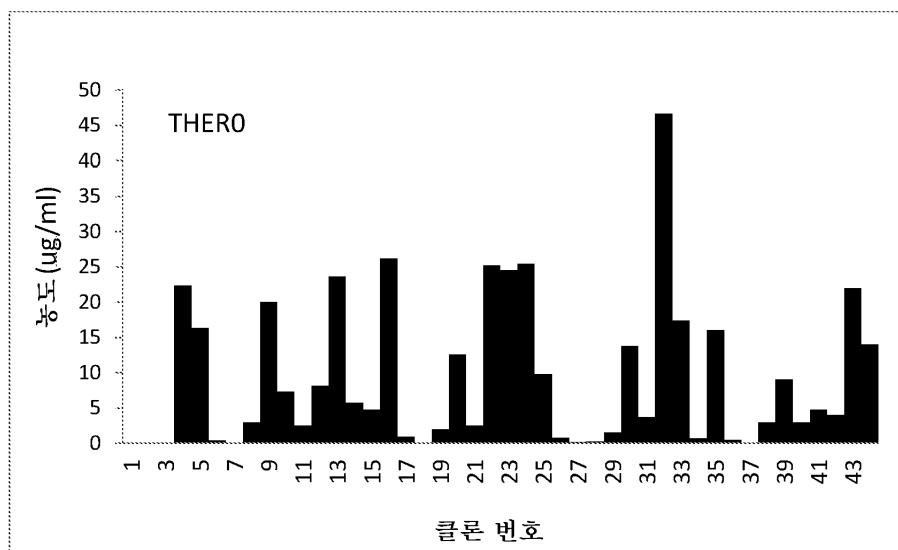
도면2b



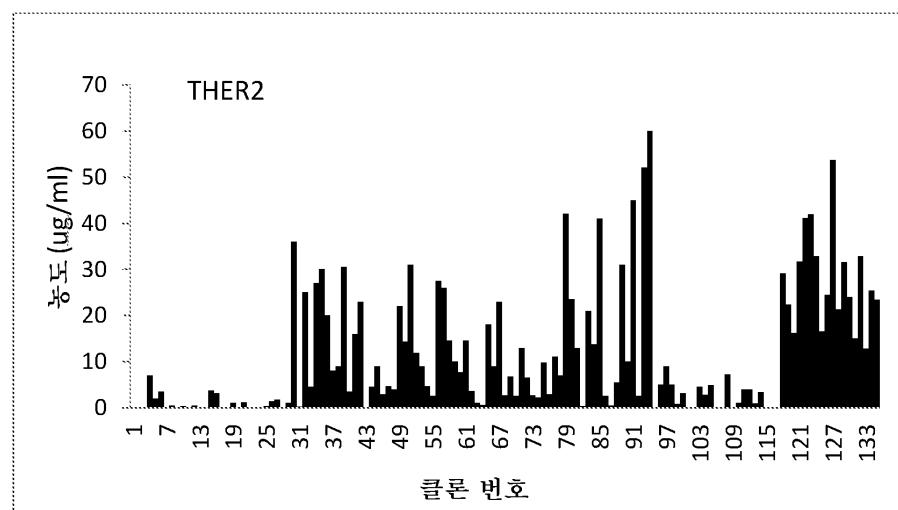
도면3



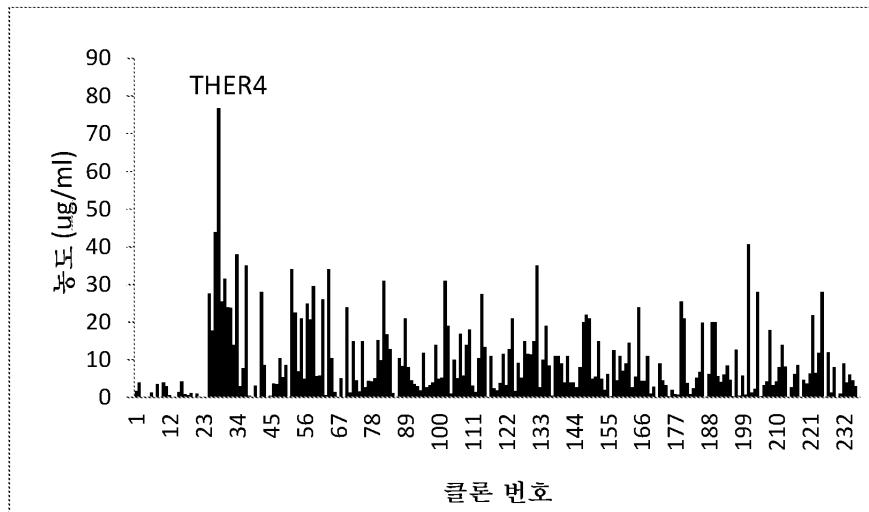
도면4a



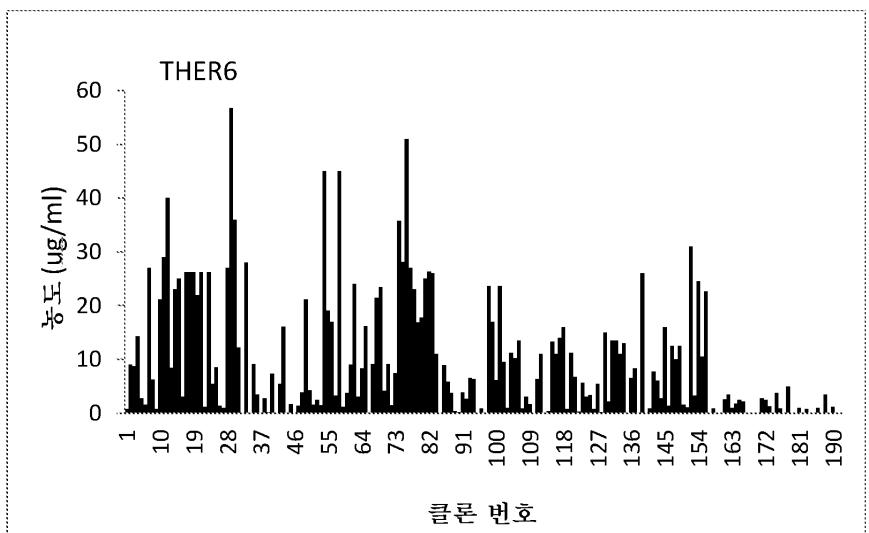
도면4b



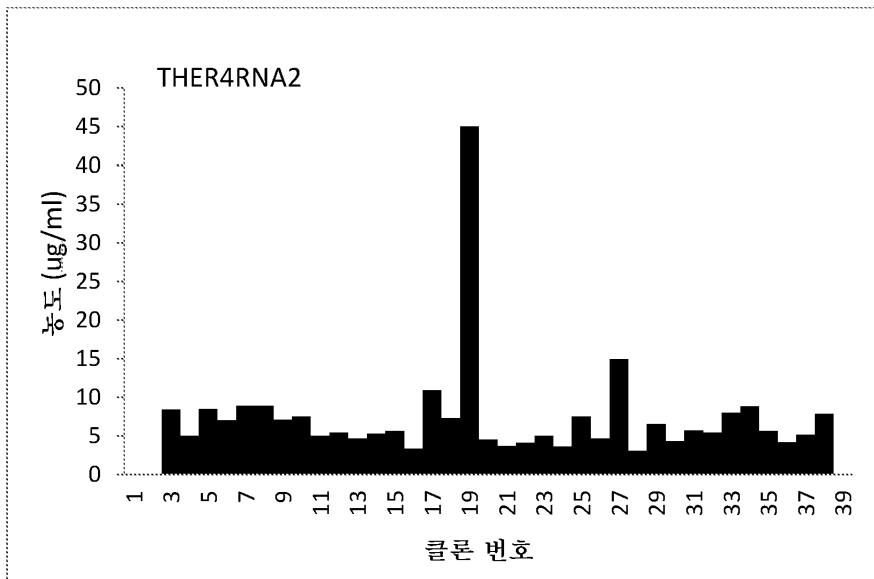
도면4c



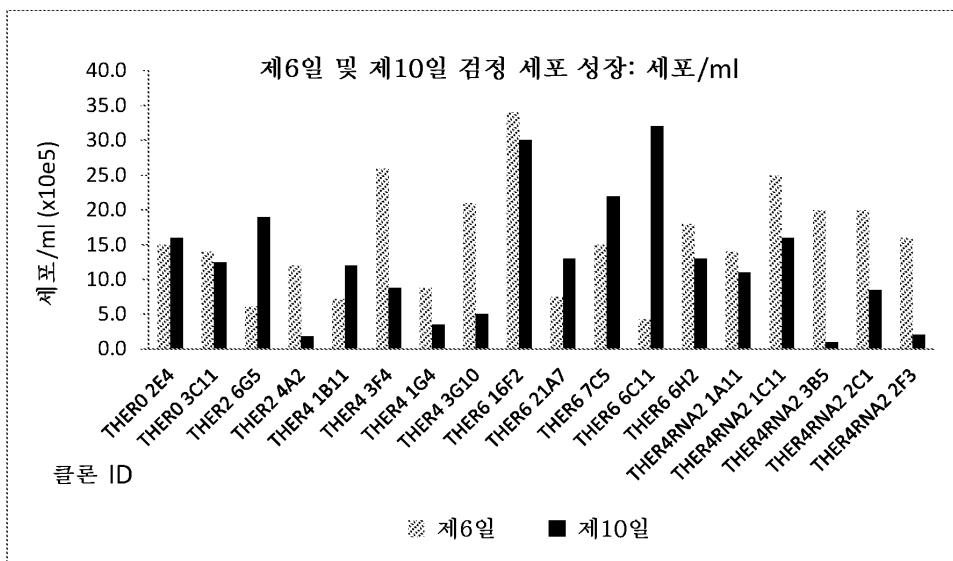
도면4d



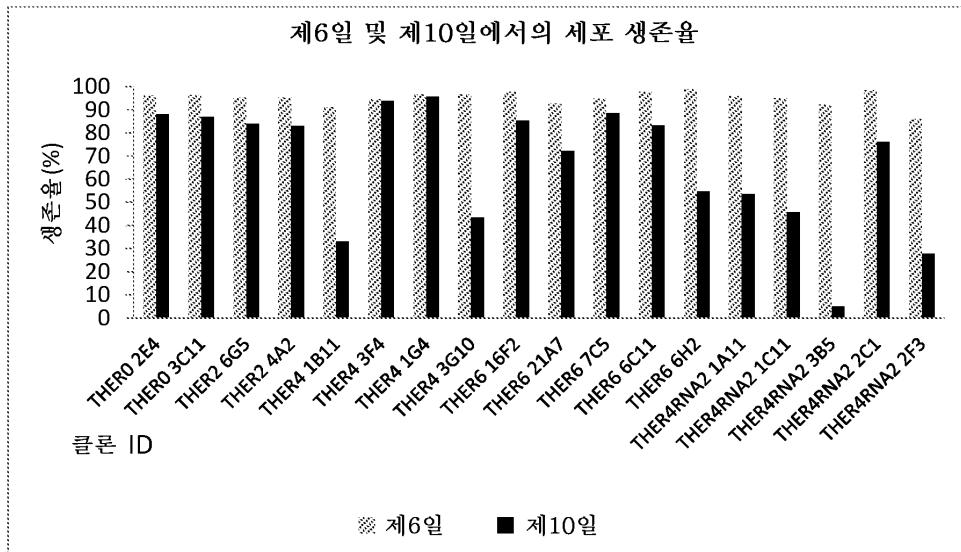
도면4e



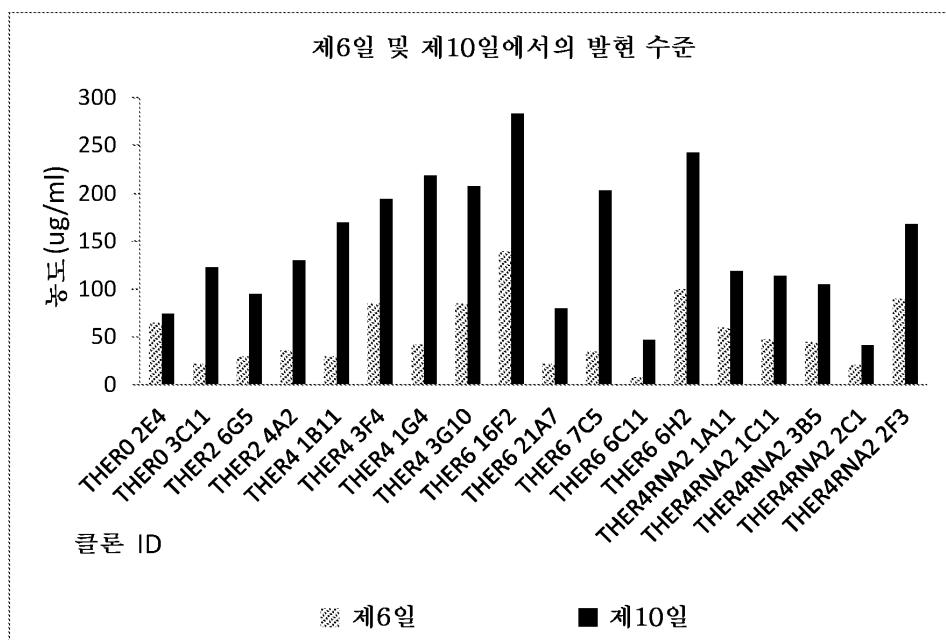
도면5a



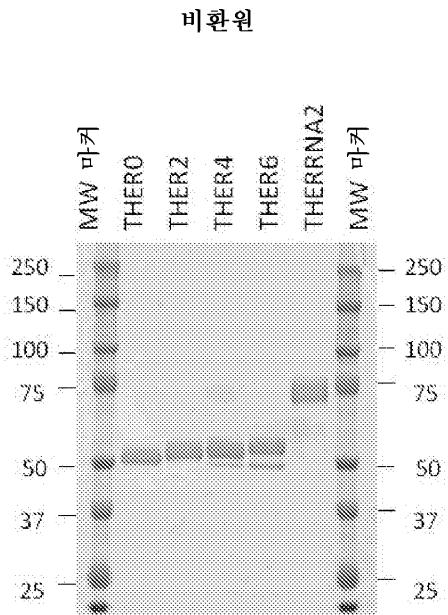
도면5b



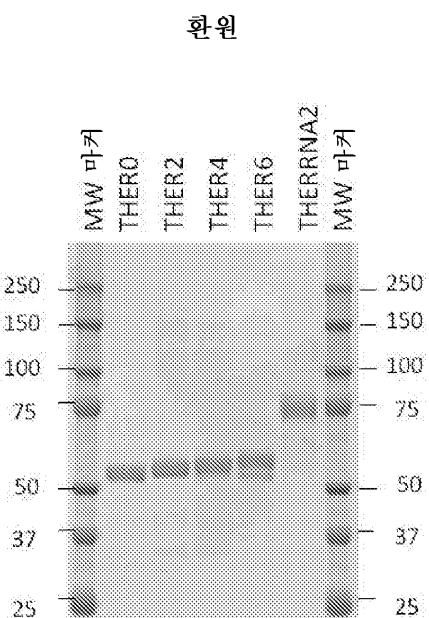
도면5c



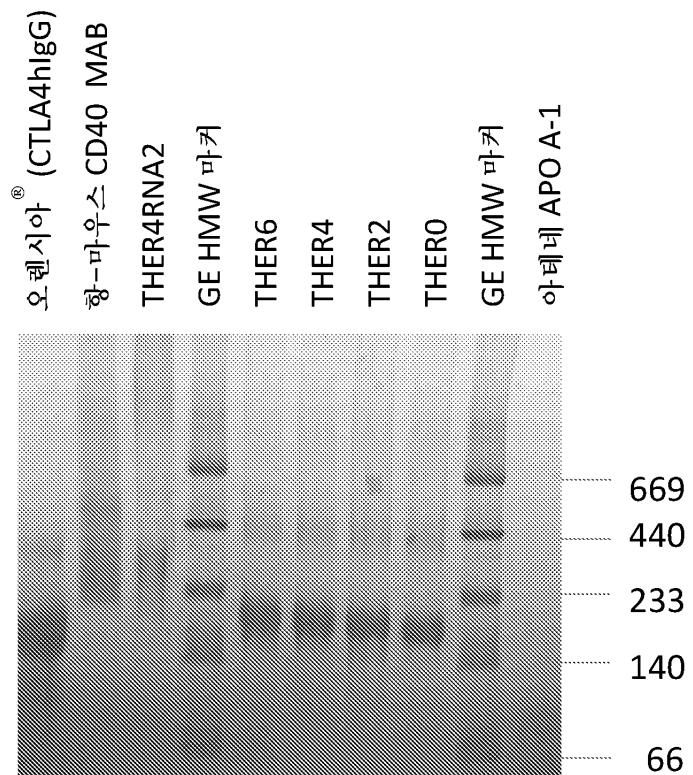
도면6a



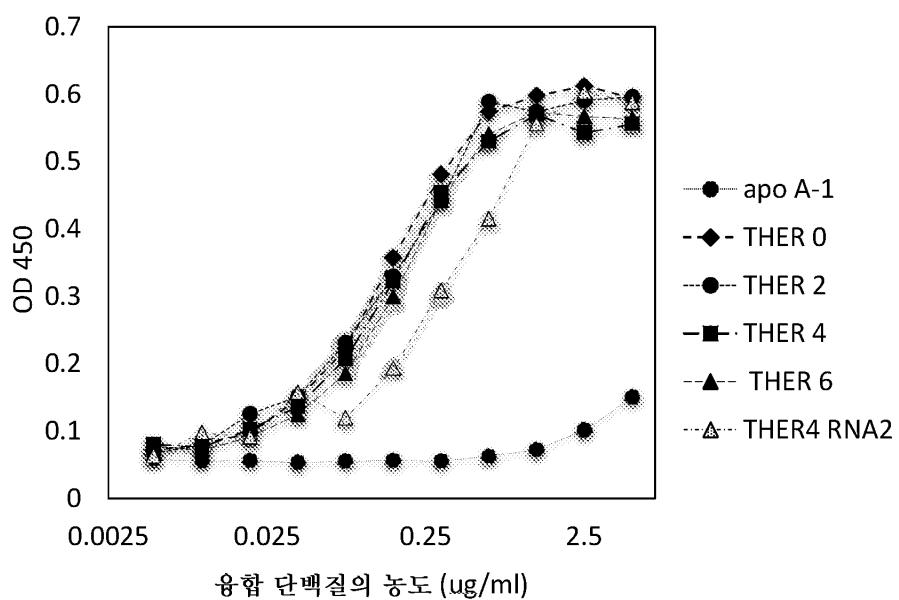
도면6b



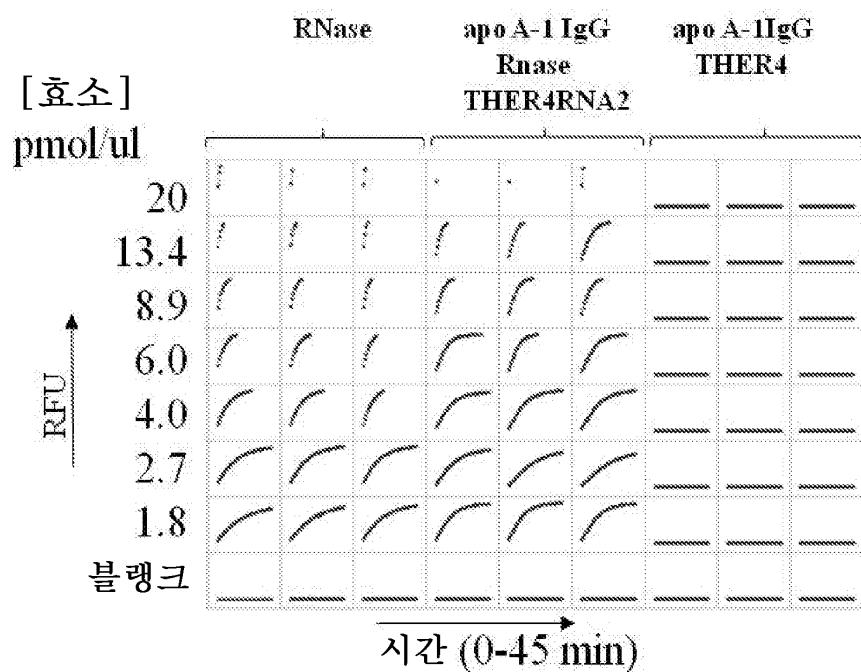
도면7



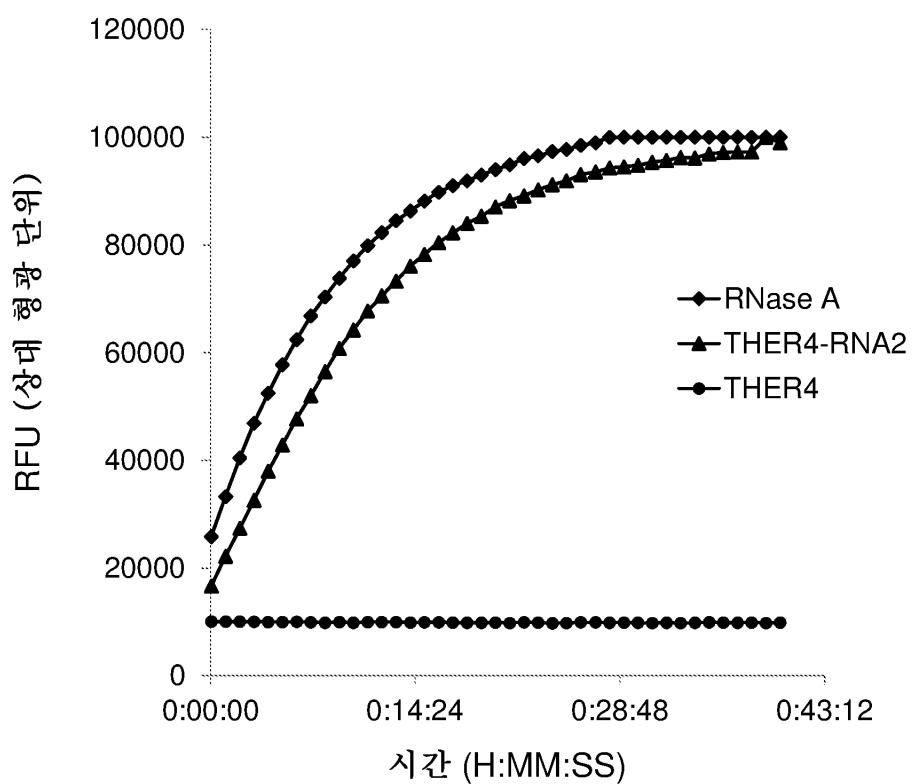
도면8



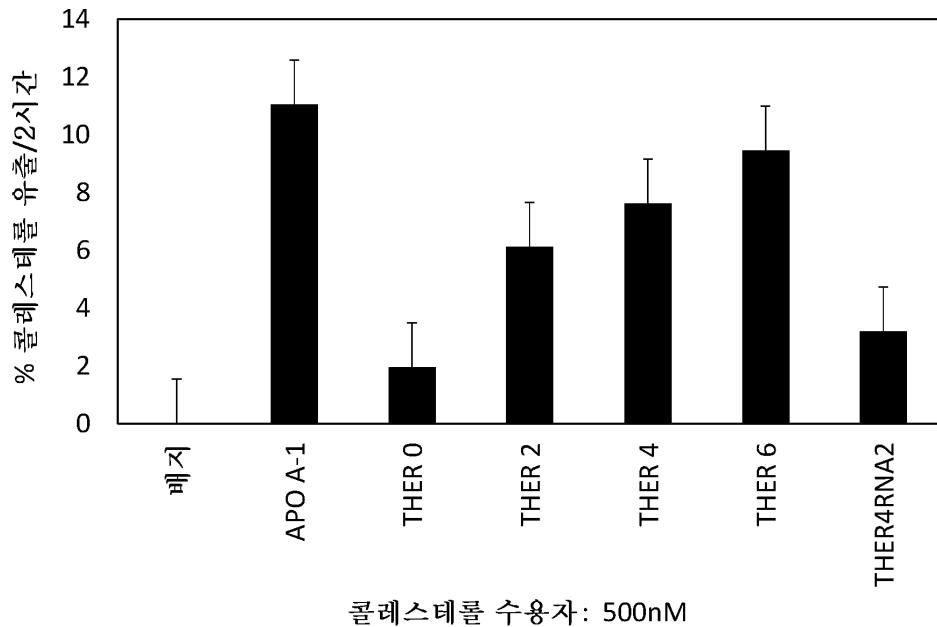
도면9



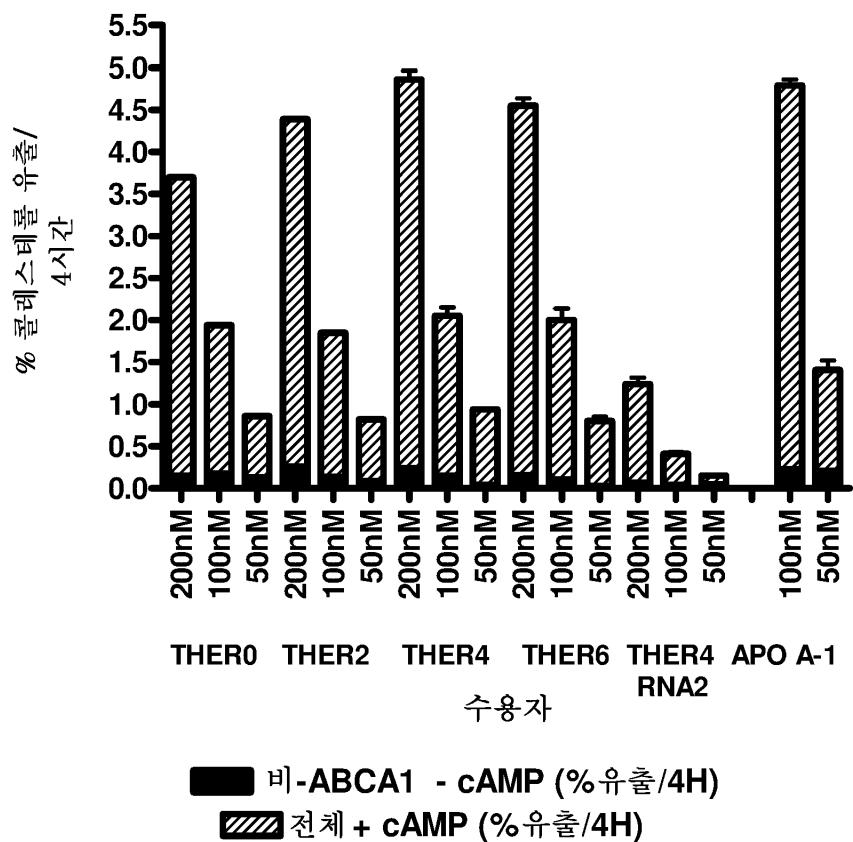
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Theripion Inc.

<120> ApoA-1 Fusion Polypeptides and Related Compositions and Methods

<130> TRP-0110PC

<150> US 62/215,256

<151> 2015-09-08

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1602

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG DNA

<400> 1

gttaagcttgcacccatgaa agctgcggcgtt ctgaccctgg ccgtgccttt cctgacgggg 60

agccaggctc ggcatttcgt gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg 120

aaggacctgg ccactgtgtt cgtggatgtt ctcaaagaca gggcagaga ctatgtgtcc 180

cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttgc caactggac 240

agcgtgacctt ccacccatcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc 300

tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360

gaggtgaagg ccaagggtca gcccatttcg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag 420

atggagctct accggcagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtcctaaga gggcgcgc 480

cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccactgg gcgaggagat ggcgcaccgc 540

gcgcgcgc 540 atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc 600

cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gggcgccag actggccag 660

taccaccca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc 720

gaggacctcc gccaaggcct gtcggccgtt ctggagagct tcaaggctcag cttccctgagc 780

gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca 840

ggtgtggag gatctggagg aggtggagg ggtggaggtt gtttaccgg tctcgagccc 900

aaatctctg acaaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctggggagga 960

tcgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 1020

gaggtcacat gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1080

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaggc cgccggagga gcagtacaac	1140
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1200
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc	1260
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag	1320
ctgaccaaga accaggttag cctgacactc ctggtaaag gtttatcc cagcgacatc	1380
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1440

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtag	1500
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560
cagaagagcc tctctctc tccggtaaa tgataatcta ga	1602

<210> 2

<211> 525

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(18)

<400> 2

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

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

290 295 300

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu

305 310 315 320

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

325 330 335

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

340 345 350

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

355 360 365

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

405 410 415

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

420 425 430

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

435 440 445

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

450 455 460

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

465 470 475 480

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

485 490 495

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

500 505 510

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

515 520 525

<210> 3

<211> 2052

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG-hRNase1 DNA

<400> 3

gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgcttt cctgacgggg	60
agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtc ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc	180
cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacct ccacccctag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
tggataacc tggaaaagga gacagagggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360

gagggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat gagcgcgcgc atgtggacgc gtcgcacg catctggccc cttacagcga cagcgcttgg ccgcgcgc tgaggcttc aaggagaacg gcggccgc taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gaggacctcc gccaaggcct gtcgcgcgtg ctggagagct tcaaggtcag gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg ggtggtagt gatctggagg aggtggagg ggtggaggtg gtttaccgg tctcgagccc aaatcttcg acaaaaactca cacatcttca ccgtccccag cacctgaact tcgtcagtc tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgccggagga agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc gagttacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccgccct ccatcgagaa aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ctgaccaaga accaggtcag cctgaccctg ctggtaaag gtttctatcc gccgtggagt gggagagcaa tggcgcgcg gagaacaact acaagaccac ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag agcagcccca gcgtgcagga tatcccttc ctggcaagg cagcggcagc atatggactc agacagttcc cccagcagca atgatgaggc gccgaaatat gacacagggg cggtgcaaac gagccctgg tagatgtcca gaatgtctgt ttccaggaaa caggcgaact gctacaagag caactccagc atgcacatca ggctccaggt accccaactg tgcataccgg gcctgtgaag ggagccata tgtgccagtc cacttgcatt taataatcta ga	420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1560 1620 1680 1740 1800 1860 1920 1980 2040 2052
---	--

<210> 4

<211> 675

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG-hRNase1

<400> 4

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
 210 215 220
 Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
 245 250 255
 Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 290 295 300
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 340 345 350
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 405 410 415
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 420 425 430
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 435 440 445
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

450	455	460
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
465	470	475
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
485	490	495
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
500	505	510
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
515	520	525
Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Pro		
530	535	540
Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met		
545	550	555
Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met		
565	570	575
Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr		
580	585	590
Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu		
595	600	605
Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser		
610	615	620
Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro		
625	630	635
Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala		
645	650	655
Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu		
660	665	670
Asp Ser Thr		
675		
<210> 5		
<211> 414		
<212> DNA		

<213> Homo sapiens

<400> 5

gatatccctt ccctggcaa ggaatcccg gccaagaaat tccagggca gcatatggac	60
tcagacagtt cccccagcag cagctccacc tactgttaacc aaatgtatgag gcgcggaaat	120

atgacacagg ggcggtgcaa accagtgaac accttgtc acgagccc ggttagatgtc	180
cagaatgtct gttccagga aaaggtcacc tgcaagaacg ggcagggcaa ctgctacaag	240
agcaactcca gcatgcacat cacagactgc cgccgtacaa acggctccag gtaccccaac	300
tgtgcatacc ggaccagccc gaaggagaga cacatcatg tggctgtga agggagccca	360
tatgtgccag tccactttga tgcttctgtg gaggactcta cctaataatc taga	414

<210> 6

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ile Pro Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg

1	5	10	15											
Gln	His	Met	Asp	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Cys

	20	25	30												
Asn	Gln	Met	Met	Arg	Arg	Arg	Asn	Met	Thr	Gln	Gly	Arg	Cys	Lys	Pro

	35	40	45												
Val	Asn	Thr	Phe	Val	His	Glu	Pro	Leu	Val	Asp	Val	Gln	Asn	Val	Cys

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

Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys

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

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

	85	90	95												
Arg	Tyr	Pro	Asn	Cys	Ala	Tyr	Arg	Thr	Ser	Pro	Lys	Glu	Arg	His	Ile

Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala

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

Ser Val Glu Asp Ser Thr

130

<210> 7

<211> 462

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 3-NLG-WThRNase1 DNA

<400> 7

gtcgacggag	ctagcagccc	cgtgaacgtg	agcagcccc	gcgtgcagga	tatcccttcc	60
ctggcaagg	aatcccgggc	caagaaattc	cagcggcagc	atatggactc	agacagtcc	120
cccagcagca	gctccaccta	ctgtaaccaa	atgatgaggc	gccggaatat	gacacagggg	180
cggtgcaaac	cagtgaacac	ctttgtgeac	gagccctgg	tagatgtcca	aatgtctgt	240
ttccaggaaa	aggtcacctg	caagaacggg	cagggcaact	gctacaagag	caactccagc	300
atgcacatca	cagactgccc	cctgacaaac	ggctccaggt	accccaactg	tgcataccgg	360

accagccgaa	aggagagaca	catcattgtg	gcctgtgaag	ggagccata	tgtgccagtc	420
cactttagatg	cttctgtgga	ggactctacc	taataatcta	ga		462

<210> 8

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 3-NLG-WThRNase1

<400> 8

Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln

1 5 10 15

Asp Ile Pro Ser Leu Gly Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg

20 25 30

Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys

35 40 45

Asn Gln Met Met Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys

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

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

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

Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile

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

Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala

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

Ser Val Glu Asp Ser Thr

145	150	
-----	-----	--

<210> 9

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial

<220><

223> (g4s)5 linker DNA

<400> 9

agatctctcc ggaggagggtg gtcaggtgg tggaggatct ggaggagggtg gtcaggtgg	60
---	----

tggaggatct ggaggagggtg ggagtaccgg tctcgag	97
---	----

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> (g4s)5 linker

<400> 10

Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu

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

<210> 11

<211> 1099

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcgaagc tgattgcgt caccctttt gggatggac tggactttt caggaaccac	60
cagtcttctt accaaacacg acttaatgtt ctccgaggaga tacaaccgtt agaacttcct	120
aactgttaatt tagttaaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgcctaatt	180
ggactggctt tcattagctc tggattaaag tatcctggaa taaagagctt caaccccaac	240
agtccctggaa aaatacttctt gatggacctg aatgaagaag atccaacagt gttgaaattt	300
gggatcactg gaagtaattt tgatgtatct tcatttaacc ctcattggat tagcacatc	360

acagatgaag ataatgccat gtaccccttg gtggtaaccatccagatgc caagtccaca	420
gtggagttgtt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcatctaaa aaccatcaga	480
cataaacttc tgccttaattt gaatgatattt gttgtgtgg gacctgagca ctttatggc	540
acaaatgatc actatccc ttacaatcctt gggagatgtt tttgggtta	600
gcgtggctgtt atgttgtcta ctatagtc aagtgaagtgc gagtgggtgc agaaggattt	660
gattttgcta atggaatcaa catttcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttt	720
ctggctcata agattcatgtt gtatgaaaag catgctaattt ggacttaac tccattgaag	780

tcccttgact ttaataccctt cggtggataac atatctgtgg atcctgagac aggagacctt	840
tgggttggat gccatcccaa tggcatgaaa atcttcttctt atgactcaga gaatcctct	900
gcatcagagg tgcttcgaat ccagaacattt ctaacagaag aacctaagg gacacagggtt	960
tatgcagaaa atggcacagt gttgcaaggc agtacagtgc cctctgtgtt caaaggaaa	1020
ctgctgattt gcacagtgtt tcacaaagctt cttaactgtt agctctaaaca gaccgattt	1080
cacccatgcc atagaaactt	1099

<210> 12

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(15)

<400> 12

Met Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe
 50 55 60
 Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn
 65 70 75 80
 Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr
 85 90 95
 Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe
 100 105 110
 Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr
 115 120 125
 Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe
 130 135 140
 Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg
 145 150 155 160
 His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu
 165 170 175
 His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Gln
 180 185 190
 Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr
 195 200 205
 Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn
 210 215 220
 Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu
 245 250 255
 Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser
 260 265 270
 Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly
 275 280 285
 Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val

290	295	300
Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
305	310	315
Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
325	330	335
Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		
340	345	350
Cys Glu Leu		
355		
<210> 13		
<211> 525		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG with proline at Eu position 331 in Fc		
region		
<400>		
13		
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser		
1	5	10
Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp		
20	25	30
Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp		
35	40	45
Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys		
50	55	60
Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr		
65	70	75
Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp		
85	90	95
Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys		
100	105	110
Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe		

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

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

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

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 290 295 300
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
 305 310 315 320

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 340 345 350
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 405 410 415
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 420 425 430
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 435 440 445

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 450 455 460
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 465 470 475 480
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 485 490 495
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 500 505 510

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520 525

<210> 14

<211> 675

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hWTAP01-(g4s)4-mthIgG-hRNase1 with proline at Eu position 331 in
 Fc region

<400> 14

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

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

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

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala
 165 170 175
 Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 180 185 190
 Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
 195 200 205
 Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
 210 215 220

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

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

Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 290 295 300
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 340 345 350

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 405 410 415

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 420 425 430
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 435 440 445
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 450 455 460
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 465 470 475 480

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 485 490 495
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 500 505 510
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly
 515 520 525

Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Pro

530 535 540

Ser Leu Gly Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met

545 550 555 560

Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser

610 615 620

Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro

625 630 635 640

Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala

645 650 655

Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu

660 665 670

Asp Ser Thr

675

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> linker

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> sequencing primer

<400> 16

gttttggca gtacatcaat gg 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> sequencing primer

<400> 17

ctattgtctt cccaatcctc cc 22

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> sequencing primer

<400> 18

accttgca t gta tcctt 20

<210> 19

<211> 1531

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THERO DNA (apo A-1-(lnk2)-mthIgG; apo A-1-mthIgG)

<400> 19

gttaagttt ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60
 agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccccctg ggatcgagtg 120
 aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc 180

cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac 240
 agcgtgacct ccacccctcag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagg 300
 tggataacc tgaaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag 360
 gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggagg 420
 atggagctct accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtcctaaga gggcgccgc 480
 cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccaactgg gcgaggagat gcgccaccgc 540

gcgcgcccc atgtggacgc gctgcccacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc	720
gaggacctcc gccaaggcct gctgccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tcgagccaa atcttctgac	840
aaaactcaca catctccacc gtccccagca cctgaactcc tggaggatc gtcagtctc	900
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctcc ggaccctga ggtcacatgc	960
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1020
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1080
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1140
aaggcttcca acaaaggccct cccagctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaagg	1200
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1260
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg	1320
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccgtgct ggactccgac	1380
ggctcttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaaac	1440
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1500
tctctcttc cggtaaatg ataatctaga a	1531
<210> 20	
<211> 501	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220><223> THER0 polypeptide (apo A-1-(lnk2)-mthIgG; apo A-1-mthIgG)	
<400> 20	
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser	
1 5 10 15	
Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp	
20 25 30	
Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp	
35 40 45	
Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys	
50 55 60	

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys

260 265 270

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

275 280 285

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

290 295 300

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

305	310	315	320
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
325	330	335	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
340	345	350	
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
355	360	365	
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
370	375	380	
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
385	390	395	400
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln			
405	410	415	
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
420	425	430	
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr			
435	440	445	
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
450	455	460	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
465	470	475	480
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
485	490	495	
Leu Ser Pro Gly Lys			
500			
<210> 21			
<211> 1573			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> THER2 DNA (apo A-1-(1nk16)-mthIgG; apo A-1-(g4s)2-mthIgG)			
<400> 21			
gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgcttt cctgacgggg 60			

agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctc当地gaca gccggcagaga ctatgtgtcc	180
cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacctt ccacccctag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
tggataacc tggaaaagga gacagagggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag	420
atggagctt accgcccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc	480
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat gcgcgaccgc	540
gcgcgcgccatgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcccgcgcag actggccgag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc	720
gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
ggaggaggtg ggagtaccgg tctcgagccc aaatttctg aaaaaactca cacatctcca	900
ccgtccccag cacctgaact cctgggagga tcgtcagtttcc cccaaaaccc	960
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc	1020
cacgaagacc ctgaggctaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1080
aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctacc	1140
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaagcc	1200
ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag	1260
gtgtacaccc tggcccccatttcc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgaccc	1320
ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg	1380
gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactcc acggctccctt cttcctctac	1440
agcaagtcac ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg	1500
atgcatgagg ctctgcacaa cc当地acacg cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa	1560
tgataatcta gaa	1573
<210> 22	
<211> 515	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220><223> THER2 polypeptide (apo A-1-(lnk16)-mthIgG; apo A-1-(g4s)2-mthIgG)	

<400> 22

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
 245 250 255
 Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser
 275 280 285
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 290 295 300
 Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 305 310 315 320
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 325 330 335

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 405 410 415
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 420 425 430
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 435 440 445
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 450 455 460

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 465 470 475 480
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

485	490	495
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
500	505	510
Pro Gly Lys		
515		
<210> 23		
<211> 1633		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> THER6 DNA (apo A-1-(lnk36)-mthIgG; apo A-1-(g4s)6-mthIgG)		
<400> 23		
gttaagcttgcacccatgaa agctgcggcgtc tgacattgg ccgtgccttt cctgacgggg	60	
agccaggctc ggcatttcgt gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtgc	120	
aaggacctgg ccactgtgtat cgtggatgtc ctcaaagaca gccccggcagaga ctatgtgtcc	180	
cagtttgaag gtcggccctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttgc caactggcac	240	
agcgtgaccc tcacccatcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300	
tgggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360	
gaggtgaagg ccaagggtgca gcccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc gcaggaggag	420	
atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtcctaaga gggcgccgc	480	
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccactgg gcggaggagat gcgccaccgc	540	
gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc	600	
cagcgcttgg ccgcgcgcct tggggcttc aaggagaacg gccccggcag actggccgag	660	
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc	720	
gaggacctcc gccaaggcct gctggccgtc ctggagagct tcaagggtcag cttctgagc	780	
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840	
ggtgtggag gatctggagg aggtggagg ggtggaggtg gttctggagg aggtggtagt	900	
ggaggtggag gttctaccgg tctcgagccc aaatcttcgt acaaaaactca cacatctcca	960	
ccgtccccag cacctgaact cctggggagga tcgtcagtttcc cccaaaaccc	1020	
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gctgggtggt ggacgtgagc	1080	
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1140	
aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	1200	

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaagcc	1260
ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	1320
gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1380
ctggtaaag gtttatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg	1440
gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactcc acggctctt cttctctac	1500
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgttttc atgctccgtg	1560
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctctctc tccggtaaa	1620
tgataatcta gaa	1633

<210> 24

<211> 535

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER6 polypeptide (apo A-1-(1nk36)-mthIgG; apo A-1-(g4s)6-mthIgG)

<400> 24

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130	135	140
Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu		
145	150	155
Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala		
165	170	175
Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp		
180	185	190
Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn		
195	200	205
Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu		
210	215	220
Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln		
225	230	235
Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala		
245	250	255
Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly		
260	265	270
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
275	280	285
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr Gly Leu Glu		
290	295	300
Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro		
305	310	315
Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
325	330	335
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
340	345	350
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
355	360	365
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
370	375	380

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 385 390 395 400
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 405 410 415
 Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 420 425 430

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 435 440 445
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 450 455 460
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 465 470 475 480
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 485 490 495

Lys Leu Thr Val Asp Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 500 505 510
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 515 520 525
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535

<210> 25

<211> 1588

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THER3 DNA (apo A-1-(1nk21)-mthIgG; apo A-1-(g4s)3-mthIgG)

<400> 25

gttaagtttgcacccatgaa agctgcgggtc ctgaccttgg ccgtgctctt cctgacgggg 60

agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccccctg ggatcgagtg	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtc ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc	180
cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacct ccacccatcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggatcc	300
tggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360

gagggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc	420
atggagctc accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc	480

cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat gcgacccgc	540
gcgcgcgcgc atgtggacgc gtcgcgcacg catctggccc cttacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcggcgccag actggccgag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc	720
gaggacctcc gccaaggcct gtcgcgcgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctcagggtgg tggaggatct	840
ggaggaggtg ggagtgggtgg aggtggttct accggctctcg agcccaaatac ttctgacaaa	900

actcacacat ctccaccgtc cccagcacct gaactcctgg gaggatcgta agtcttc	960
ttccccccaa aacccaagga cacccatcg atctcccgaa cccctgaggt cacatgcgt	1020
gtggtgacg tgagccacga agacccttagt gtcaagttca actggtaacgt ggacggcg	1080
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcgt acaacagcac gtaccgtgt	1140
gtcagcggtcc tcaccgtctt gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgc	1200
gtctccaaca aageccccc accctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag	1260
ccccgagaac cacaggtgta caccctgecc ccattccggg atgagctgac caagaaccag	1320

gtcagcciga ccigcttgtt caaaggcttc tatcccacgc acatcgccgt ggagtggag	1380
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1440
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggaaacgtc	1500
ttctcatgtt ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctt	1560
ctctctccgg gtaaatgata atctagaa	1588

<210> 26

<211> 520

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER3 polypeptide (apo A-1-(lnk21)-mthIgG; apo A-1-(g4s)3-mthIgG)

<400> 26

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 35 40 45
 Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 50 55 60

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

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

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

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu

275	280	285
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala		
290	295	300
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
305	310	315
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
325	330	335
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
340	345	350
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
355	360	365
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
370	375	380
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
385	390	395
Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
405	410	415
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
420	425	430
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
435	440	445
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
450	455	460
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
465	470	475
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
485	490	495
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
500	505	510
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
515	520	

<210> 27

<211> 2677

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THER4PON1 DNA

<400> 27

gttaagcttgcacccatgaa agctgcggcgtcgtacccctgg ccgtgccttt cctgacgggg	60
agccaggctc ggcatttcgt gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtgaaggacctgg ccactgtgtatggatgtcctcaaagaca gcccggcagaga ctatgtgtcc	120
cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacacg ctaaacctaa agtcccttga caactggac	180
agcgtgacct ccaccccttag caagctgcgcga acagctcgccctgtgac ccaggagttc	240
 tggataacc tgaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggaggaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgcaggaggatggagctct accggccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtccaaga gggcgccgc	300
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccactgg gcggaggat ggcgcaccgcgcccc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	360
cagcgcttgg ccgcgcgcct tggactctc aaggagaacg gcccggccag actggccgataccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc	420
 gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtcgtggagact tcaaggctcgttccctgagc gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca ggtggtgagg gatctggagg aggtggagg ggtggaggtg gttctaccgg tctcgagccc	480
aaatctctg acaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctggggagatcgctcgttccccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccttggatcacat gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg tacgtggacg gctgtggagg gcataatgcc aagacaaacg cggggaggagcgtacaac	540
 agcacgttacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaaggagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccgccct ccatcgagaa aaccatctcc aaaggccaaag ggccggcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgagctgaccaaga accaggtcag cctgacccgtc ctggtaaaag gttctatcc cagcgacatc gccgtggagg gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtcctggactccg acggctcctt cttccctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	600
	720
	780
	840
	900
	960
	1020
	1080
	1140
	1200
	1260
	1320
	1380
	1440
	1500

cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560		
cagaagagcc tctctcttc tcgggtaaa gtcgacggag ctagcagccc cgtgaacgtg	1620		
agcagccccca gcgtgcagga tatccttcc aggaaccacc agtcttctta ccaaacacga	1680		
cttaatgctc tccgagaggt acaaccgta gaacttccta actgttaattt agttaagga	1740		
atcgaaactg gctctgaaga cttggagata ctgcctaattg gactggctt cattagctc	1800		
ggattaaagt atcctgaaat aaagagctc aaccccaaca gtcctggaaa aataactctg	1860		
atggacctga atgaagaaga tccaacagtg ttggatttg ggatcactgg aagtaaattt	1920		
gatgtatctt catttaaccc tcatggatt agcacattca cagatgaaga taatgccatg	1980		
tacccctgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagttgtt taaattcaa	2040		
gaagaagaaa aatcgcttt gcatctaaaa accatcagac ataaacttct gcctaatttgc	2100		
aatgatattt tgctgtggg acctgagcac tttatggca caaatgatca ctatttctt	2160		
gaccctact tacaatcctg ggagatgtat ttgggttag cgtggcgta tggatctac	2220		
tatagtccaa gtgaagttcg agtggtgca gaaggattt atttgctaa tggatcaac	2280		
atttcacccg atggcaagta tgtctatata gctgagttgc tggctataa gattcatgt	2340		
tatgaaaagc atgtaattt gacttaact ccattgaagt cccttgactt taataccctc	2400		
gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt gggttggatg ccatccaaat	2460		
ggcatgaaaa tcttcttcta tgactcagag aatcccttg catcagaggt gcttcgaatc	2520		
cagaacattc taacagaaga acctaaatgt acacaggtt atgcagaaaa tggcacatgt	2580		
ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaaggaaac tgctgattgg cacagtgttt	2640		
cacaaagctc ttactgtga gctctaataa tctagaa	2677		
<210> 28			
<211> 883			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> THER4PON1 polypeptide			
<400> 28			
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser			
1	5	10	15
Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp			
20	25	30	
Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp			

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

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

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

Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asn Asn Ile Ser
 785 790 795 800

Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly
 805 810 815

Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val
 820 825 830

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

835 840 845

Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val
 850 855 860

Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr
 865 870 875 880

Cys Glu Leu

<210> 29

<211> 1717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

atatacgggc tccaggctga acggctcgaa ccacttacac accactgcct gataaccatg	60
ctggctgcca cagtccgtac cctggccctg ctggcaatg cccatgcctg ctccaaaggc	120

accttcgcacg aggcaggcat cgtgtgccgc atcaccaagc ctgccttcct ggtgttgAAC	180
cacgagactg ccaagggtgat ccagaccGCC ttccagcgag ccagctacCC agatatcACG	240
ggcgagaAGG ccatgatgCT cttggccAA gtcaagtATg ggTTgcACAA catccAGATC	300
agccacttgt ccatcgccAG cagccaggTG gagctggTgg aagccaaGTC cattgatgtC	360
tccattcaga acgtgtCTGT ggtttcaAG gggaccCTGA agtatggCTA caccACTGCC	420
tggggctgg gtattgatCA gtccattgAC ttccgagatCG actctGCCat tgacctCCAG	480
atcaacacAC agctgacCTG tgactCTGGT agagtgcGGa ccgatGCCc TGACTGCTAC	540

ctgtctttcc ataagctgCT cctgcATCTC caaggggAGC gagagcCTGG gtggatcaAG	600
cagctgttca caaatttcat ctccttCACC ctgaagCTGG tcctgaAGGG acagatCTGC	660
aaagagatCA acgtcatCTC taacatCATG gccgatttTG tccagacaAG ggctGCCAGC	720
atccttCAG atggagACAT tggggTggAC atttCCCTGA caggtgatCC cgtcatCACa	780

gcctcctacc tggagtccta tcacaagggt cattcatct acaagaatgt ctcagaggac 840
 ctccccctcc ccaccttctc gcccacactg ctggggact cccgcatgct gtacttctgg 900
 ttctctgagc gagtcttcca ctcgctggcc aagtagctt tccaggatgg ccgcctcatg 960

ctcagcctga tgggagacga gttcaaggca gtgctggaga cctgggctt caacaccaac 1020
 cagggaaatct tccaagaggt tgtcgccgc ttccccagcc aggcccagt caccgtccac 1080
 tgcctcaaga tgcccaagat ctccgtccaa aacaaggag tcgtggtaa ttcttcagtg 1140
 atggtaaat tcctcttcc acgcccagac cagcaacatt ctgtagctt cacatttcaa 1200
 gaggatatcg tgactaccgt ccaggcctcc tattctaaga aaaagctttt cttaaagcctc 1260
 ttggatttcc agattacacc aaagacttgtt tccaaattga ctgagagcag ctccgagtcc 1320
 gtccagagct tcctgcagtc aatgatcacc gctgtggca tccctgaggt catgtctcg 1380

ctcgaggtag tgtttacagc cctcatgaac agcaaaggcg tgacgcctt cgacatcatc 1440
 aaccctgaga ttatcactcg agatggctc ctgctgctc agatggactt tggcttcct 1500
 gagcacctgc tggtgattt cctccagagc ttgagctaga agtctccaag gaggtggaa 1560
 tgggcttgtt agcagaaggc aagcaccagg ctcacagctg gaaccctgg gtctccctca 1620
 gcgtggtgga agttgggta ggagtagcgg gatggagatt ggctccaaac tcctccatat 1680
 cctaaaggcc cactggcatt aaagtgtgt atccaaag 1717

<210> 30

<211> 493

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His

1 5 10 15

Ala Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile

20 25 30

Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile

35 40 45

Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys

50 55 60

Ala Met Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln

65 70 75 80

Ile Ser His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala
 85 90 95

Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly
 100 105 110

Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln
 115 120 125

Ser Ile Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr
 130 135 140

Gln Leu Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys
 145 150 155 160

Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu
 165 170 175

Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu
 180 185 190

Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser
 195 200 205

Asn Ile Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser
 210 215 220

Asp Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile
 225 230 235 240

Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys
 245 250 255

Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu
 260 265 270

Gly Asp Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His
 275 280 285

Ser Leu Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu
 290 295 300

Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr
 305 310 315 320

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

325	330	335
Gln Val Thr Val His Cys Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn		
340	345	350
Lys Gly Val Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro		
355	360	365
Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile		
370	375	380

Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys Lys Leu Phe Leu Ser		
385	390	395
Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu		
405	410	415
Ser Ser Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala		
420	425	430
Val Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe Thr Ala		
435	440	445

Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu		
450	455	460
Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe		
465	470	475
Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser		
485	490	
<210> 31		
<211> 1880		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 31		
gggtcgggc cacaaggccg cgctaggcgg acccaggaca cagccgcgc gcagccacc	60	

cgcccgccgc ctgccagagc tgctcgcccc gcagccaggg ggacagcggc tggtcgagg	120	
ctcgcagtgc tgtcgccgag aagcagtccg gtttggagcg ctgggtcgc gtttgtgcgc	180	
ggtggaacgc gcccaggac cccagttccc gcgagcagct ccgcgcgcgc cctgagagac	240	
taagctgaaa ctgctgctca gctcccaaga tggtgccacc caaattgcat gtgctttct	300	
gcctctgcgg ctgcctggct gtggttatc ctttgactg gcaatacata aatcctgttg	360	

cccatatgaa atcatcagca tgggtcaaca aaatacaagt actgatggct gctgcaagct	420
ttggccaaac taaaatcccc cggggaaatg ggccttattc cgttgggtgt acagacttaa	480
tgttgatca cactaataag ggcacccct tgcgttata ttatccatcc caagataatg	540
atcgccctga cacccttgg atcccaaata aagaatattt ttggggctt agcaaatttc	600
ttgaaacaca ctggcttatg ggcaacatt tgaggtact cttgggtca atgacaactc	660
ctgcaaactg gaattcccct ctgaggcctg gtgaaaata tccacttgtt gtttttctc	720
atggtcttgg ggcattcagg acacttatt ctgctattgg cattgacctg gcatctcatg	780
ggtttatagt tgctgctgta gaacacagag atagatctgc atctgcaact tactattca	840
aggaccaatc tgctgcagaa atagggaca agtctggct ctaccttaga accctgaaac	900
aagaggagga gacacatata cgaatgagc aggtacggca aagagcaaaa gaatgttccc	960
aagctctcag tctgattctt gacattgatc atggaaagcc agtgaagaat gcattagatt	1020
taaagttga tatgaaacaa ctgaaggact ctattgatag gaaaaaaaata gcagtaattt	1080
gacattcttt tggtgagca acggttattc agactcttag tgaagatcag agattcagat	1140
gtggatttgc cctggatgca tggatgttgc cactgggtga tgaagtatat tccagaattc	1200
ctcagccctt ctttttatc aactctgaat atttccaata tcctgctaattt atcataaaaa	1260
tgaaaaaatg ctactcacct gataaagaaaa gaaagatgtat tacaatcagg gttcagtcc	1320
accagaattt tgctgacttc acttttgcattt ctggcaaat aattggacac atgctcaat	1380
taaaggagaa catagattca aatgttagcta ttgatcttag caacaagct tcattagcat	1440
tcttacaaaa gcatttagga cttcataag attttgatca gtggactgc ttgattgaag	1500
gagatgatga gaatcttatt ccagggacca acattaacac aaccaatcaa cacatcatgt	1560
tacagaactc ttccagaata gagaataca attaggatta aaataggttt tttaaaatgc	1620
ttgtttcaaa actgtctaaa attatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgagag	1680
agagagagag agagagagag agagagagag agaattttaa tgtattttcc caaaggactc	1740
atatttaaa atgtaggcta tactgtatc gtgattgaag ctggactaa gaatttttc	1800
ccttagatg taaagaaaga atacagtata caatattcaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	1880
<210> 32	
<211> 441	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	

Met Val Pro Pro Lys Leu His Val Leu Phe Cys Leu Cys Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Ala Val Val Tyr Pro Phe Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His
 20 25 30

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

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

Ser Ala Ile Gly Ile Asp Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala
 165 170 175
 Val Glu His Arg Asp Arg Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp
 180 185 190
 Gln Ser Ala Ala Glu Ile Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr
 195 200 205
 Leu Lys Gln Glu Glu Glu Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln
 210 215 220

Arg Ala Lys Glu Cys Ser Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp
 225 230 235 240
 His Gly Lys Pro Val Lys Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu

245	250	255
Gln Leu Lys Asp Ser Ile Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His		
260	265	270
Ser Phe Gly Gly Ala Thr Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg		
275	280	285
Phe Arg Cys Gly Ile Ala Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp		
290	295	300
Glu Val Tyr Ser Arg Ile Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu		
305	310	315
Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser		
325	330	335
Pro Asp Lys Glu Arg Lys Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln		
340	345	350
Asn Phe Ala Asp Phe Thr Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met		
355	360	365
Leu Lys Leu Lys Gly Asp Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser		
370	375	380
Asn Lys Ala Ser Leu Ala Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys		
385	390	395
Asp Phe Asp Gln Trp Asp Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu		
405	410	415
Ile Pro Gly Thr Asn Ile Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln		
420	425	430
Asn Ser Ser Gly Ile Glu Lys Tyr Asn		
435	440	
<210> 33		
<211> 2907		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> THER4PAFAH DNA		
<400> 33		
gttaagcttg ccaccatgaa agtgcggtg ctgaccttgg ccgtgcttt cctgacgggg		
60		

agccaggctc ggcattctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagt	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gccgcagaga ctatgtgtcc	180
cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacctt ccaccccttag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
tggataacc tggaaaagga gacagagggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc gcaggaggag	420
atggagctt accgcagaa ggtggagcc ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc	480
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat gcgcgaccgc	540
gcgcgcgccatgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcccgcgcag actggccgag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc	720
gaggacctcc gccaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
ggtggtgag gatctggagg aggtggaggt ggtggaggtg gtttaccgg tctcgagccc	900
aaatcttctg acaaactca cacatctcca ccgtccccag cactgaaact cctggagga	960
tcgtcagtct tcctttccc cccaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	1020
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	1080
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	1140
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1200
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc	1260
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag	1320
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gtttatcc cagcgacatc	1380
gccgtggagt gggagagcaa tggcgcgcg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1440
ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	1500
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560
cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctgcgcgc cgtgaacgtg	1620
agcagccca gcgtgcagga tatcttgc tggcaataca taaatctgt tgcccatatg	1680
aaatcatcag catggtaaa caaaatacaa gtactgtatgg ctgcgcacatc cttggccaa	1740
actaaaatcc cccggggaaa tggccttat tccgtgggtt gtacagactt aatgtttat	1800

cacactaata agggcacctt cttgcgtta tattatccat ccaagataa tgatgcctt 1860

gacaccctt ggatccaaa taaagaatat tttgggtc ttagcaaatt tcttggaca 1920

cactggctt tggcaacat ttgaggta ctcttggtt caatgacaac tcctgcaa 1980

tggaattccc ctctgaggcc tggtgaaaaa tatccactg ttgttttc tcatggctt 2040

gggcattca ggacactta ttctgctt ggcattgacc tggcatctca tgggttata 2100

gttgctgctg tagaacacag agatagatct gcatctgcaa ctactattt caaggacaa 2160

tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg ctctaccta gaaccctgaa acaagaggag 2220

gagacacata tacgaaatga gcaggtacgg caaagagcaa aagaatgtt ccaagcttc 2280

agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga atgcattaga tttaaagttt 2340

gatatggAAC aactgaagga ctctattgtt agggaaaaaa tagcagtaat tggacattct 2400

tttggtgag caacggttat tcaactctt agtgaagatc agagattcag atgtggatt 2460

gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagtat attccagaat tcctcagccc 2520

ctctttta tcaactcttga atattccaa tattctgcta atatcataaa aatgaaaaaa 2580

tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca gggttcagt ccaccagaat 2640

tttgcgtact tcaactttgc aactggcaaa ataattggac acatgctcaa attaaaggga 2700

gacatagatt caaatgtgc tattgatctt agcaacaaag cttcattagc attcttacaa 2760

aagcatttag gacttcataa agattttgtt cagtggtact gcttgattga aggagatgt 2820

gagaatctta ttccaggac caacattaac acaaccaatc aacacatcat gttacagaac 2880

tcttcaggaa tagagaaata caattag 2907

<210> 34

<211> 963

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER4PAFAH polypeptide

<400> 34

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

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

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

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

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

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

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

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

290	295	300
Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu		
305	310	315
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
325	330	335
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
340	345	350
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
355	360	365
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
370	375	380
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
385	390	395
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
405	410	415
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
420	425	430
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
435	440	445
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln		
450	455	460
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
465	470	475
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
485	490	495
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
500	505	510
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
515	520	525
Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Phe		
530	535	540

Asp Trp Gln Tyr Ile Asn Pro Val Ala His Met Lys Ser Ser Ala Trp
 545 550 555 560
 Val Asn Lys Ile Gln Val Leu Met Ala Ala Ala Ser Phe Gly Gln Thr
 565 570 575
 Lys Ile Pro Arg Gly Asn Gly Pro Tyr Ser Val Gly Cys Thr Asp Leu
 580 585 590

Met Phe Asp His Thr Asn Lys Gly Thr Phe Leu Arg Leu Tyr Tyr Pro
 595 600 605
 Ser Gln Asp Asn Asp Arg Leu Asp Thr Leu Trp Ile Pro Asn Lys Glu
 610 615 620
 Tyr Phe Trp Gly Leu Ser Lys Phe Leu Gly Thr His Trp Leu Met Gly
 625 630 635 640
 Asn Ile Leu Arg Leu Leu Phe Gly Ser Met Thr Thr Pro Ala Asn Trp
 645 650 655

Asn Ser Pro Leu Arg Pro Gly Glu Lys Tyr Pro Leu Val Val Phe Ser
 660 665 670
 His Gly Leu Gly Ala Phe Arg Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Gly Ile Asp
 675 680 685
 Leu Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ala Ala Val Glu His Arg Asp Arg
 690 695 700
 Ser Ala Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Lys Asp Gln Ser Ala Ala Glu Ile
 705 710 715 720

Gly Asp Lys Ser Trp Leu Tyr Leu Arg Thr Leu Lys Gln Glu Glu Glu
 725 730 735
 Thr His Ile Arg Asn Glu Gln Val Arg Gln Arg Ala Lys Glu Cys Ser
 740 745 750
 Gln Ala Leu Ser Leu Ile Leu Asp Ile Asp His Gly Lys Pro Val Lys
 755 760 765
 Asn Ala Leu Asp Leu Lys Phe Asp Met Glu Gln Leu Lys Asp Ser Ile
 770 775 780

Asp Arg Glu Lys Ile Ala Val Ile Gly His Ser Phe Gly Gly Ala Thr

785	790	795	800
Val Ile Gln Thr Leu Ser Glu Asp Gln Arg Phe Arg Cys Gly Ile Ala			
805	810	815	
Leu Asp Ala Trp Met Phe Pro Leu Gly Asp Glu Val Tyr Ser Arg Ile			
820	825	830	
Pro Gln Pro Leu Phe Phe Ile Asn Ser Glu Tyr Phe Gln Tyr Pro Ala			
835	840	845	

Asn Ile Ile Lys Met Lys Lys Cys Tyr Ser Pro Asp Lys Glu Arg Lys			
850	855	860	
Met Ile Thr Ile Arg Gly Ser Val His Gln Asn Phe Ala Asp Phe Thr			
865	870	875	880
Phe Ala Thr Gly Lys Ile Ile Gly His Met Leu Lys Leu Lys Gly Asp			
885	890	895	
Ile Asp Ser Asn Val Ala Ile Asp Leu Ser Asn Lys Ala Ser Leu Ala			
900	905	910	

Phe Leu Gln Lys His Leu Gly Leu His Lys Asp Phe Asp Gln Trp Asp			
915	920	925	
Cys Leu Ile Glu Gly Asp Asp Glu Asn Leu Ile Pro Gly Thr Asn Ile			
930	935	940	
Asn Thr Thr Asn Gln His Ile Met Leu Gln Asn Ser Ser Gly Ile Glu			
945	950	955	960
Lys Tyr Asn			

<210> 35
<211> 801
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 35

atgaaagctg cggtgctgac cttggccgtg ctcttcctga cggggagccca ggctcggcat	60
--	----

ttctggcagc aagatgaacc cccccagagc ccctgggatc gagtgaagga cctggccact	120
gtgtacgtgg atgtgctcaa agacagcgcc agagactatg tgtcccagtt tgaaggctcc	180
gccttggaa aacagctaaa cctaaagctc cttgacaact gggacagcgt gacctccacc	240

ttcagcaagc tgcgcaaca gctcgccct gtgaccagg agttctggaa taacctggaa 300
 aaggagacag agggcctgag gcaggagatg agcaaggatc tggaggaggt gaaggccaag 360
 gtgcagccct acctggacga cttccagaag aagtggcagg aggagatgga gctctaccgc 420
 cagaaggtagg acccgctgag cgagagatc caagagggcg cgccagaa gctgcacgag 480

ctgcaagaga agctgagccc actggcgag gagatgcgcg accgcgcgcg cgccatgtg 540
 gacgcgctgc gcacgcatac ggccccctac agcgacgagc tgcgccagcg ctggccgcg 600
 cgccttgagg ctctcaagga gaacggcggc gccagactgg ccgagtacca cgccaaggcc 660
 accgagcatc tgagcacgct cagcgagaag gccaagcccg cgctcgagga cctccgcaa 720
 ggccgtgtgc ccgtgctgga gagcttcaag gtcagttcc tgagcgtct cgaggactac 780
 actaagaagc tcaacaccca a 801

<210> 36

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Ser
1		5			10									15	

Gln	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp
				20										30	

Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp
		35													45
Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys
		50													60

Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr
65		70			75							80			

Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp
		85			90									95	
Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys
		100			105									110	

Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe
		115			120									125	

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

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

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

260 265

<210> 37

<211> 2647

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THER2PON1 DNA

<400> 37

gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgacccctgg ccgtgcctt cctgacgggg	60
agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc	180
cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacct ccaccccttag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300

tgggataacc tgaaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
gagggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag	420
atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc	480

cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agcccactgg gcgaggagat ggcgcaccgc	540
gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gcggcgcag actggccgag	660
taccaccca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc	720
gaggacctcc gcacaaggcct gctgcccgtg ctggagagct tcaaggtcag cttcctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
ggaggaggtg ggagtaccgg tctcgagccc aaatcttcg acaaactca cacatctcca	900
ccgtccccag cacctgaact cctgggagga tcgtcagttt tcccttccc cccaaaaccc	960
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggcacat gcgtgggtt ggacgtgagc	1020
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1080
aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	1140
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	1200
ctcccaaggcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag	1260
gtgtacaccc tgccccatc ccggatgatc ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1320
ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg	1380
gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctccctt cttctctac	1440
agcaagctca ccgtggacaa gaggcaggtgg cagcagggga acgtttctc atgctccgtg	1500
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctctctc tccggtaaa	1560
gtcgacggag cttagcagccc cgtgaacgtg agcagccccca gcgtgcagga tatcctttc	1620
aggaaccacc agtcttctta ccaaacacga cttaatgctc tccgagaggt acaaccgtat	1680
gaacttccta actgttaattt agttaaaggaa atcgaaactg gctctgaaga cttggagata	1740
ctgcctaattt gactggctt cattagctct ggattaaagt atcctgaaat aaagagcttc	1800
aaccccaaca gtccctggaaa aatacttctg atggaccttg atgaagaaga tccaaacagt	1860
ttggaaattgg ggatcactgg aagttttt gatgtatctt cattaaccc tcatggatt	1920
agcacattca cagatgaaga taatgccatg tacctctgg ttgtgaacca tccagatgcc	1980
aagtccacag tggagttgtt taaatttcaa gaagaagaaa aatcgcttt gcatctaaaa	2040
accatcagac ataaacttct gcctaatttg aatgatattg ttgctgtggg acctgagcac	2100
ttttatggca caaatgatca ctatttctt gaccctact tacaatctg ggagatgtat	2160
ttgggttttag cgtggtcgta tggatctac tatagtccaa gtgaagttcg agtgggtggca	2220
gaaggattt atttgctaa tggaaatcaac atttcacccg atggcaagta tgtctatata	2280
gctgagttgc tggctataa gattcatgtg tatgaaaagc atgctaattt gactttaact	2340

ccattgaagt cccttgactt taataccctc gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca 2400

ggagaccttt gggttggatg ccatccaaat ggcataaaaa tcttcttcta tgactcagag 2460

aatccctctg catcagaggt gttcgaatc cagaacattc taacagaaga acctaaagt 2520

acacagggtt atgcagaaaa tggcacagtg ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac 2580

aaaggaaac tgctgattgg cacagtgtt cacaaagctc ttactgtga gctctaataa 2640

tctagaa 2647

<210> 38

<211> 873

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER2PON1 polypeptide

<400> 38

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

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

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

405 410 415

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

420 425 430

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

435 440 445

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro

450 455 460

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

465 470 475 480

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

485 490 495

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

500 505 510

Pro Gly Lys Val Asp Gly Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro

515 520 525

Ser Val Gln Asp Ile Leu Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr

530 535 540

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

545 550 555 560

Asn Leu Val Lys Gly Ile Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu

565 570 575

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

580 585 590

Lys Ser Phe Asn Pro Asn Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu

595 600 605

Asn Glu Glu Asp Pro Thr Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys

610 615 620

Phe Asp Val Ser Ser Phe Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp

625 630 635 640

Glu Asp Asn Ala Met Tyr Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys

645	650	655	
Ser Thr Val Glu Leu Phe Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu			
660	665	670	
His Leu Lys Thr Ile Arg His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile			
675	680	685	
Val Ala Val Gly Pro Glu His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe			
690	695	700	
Leu Asp Pro Tyr Leu Gln Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp			
705	710	715	720
Ser Tyr Val Val Tyr Tyr Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu			
725	730	735	
Gly Phe Asp Phe Ala Asn Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr			
740	745	750	
Val Tyr Ile Ala Glu Leu Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys			
755	760	765	
His Ala Asn Trp Thr Leu Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr			
770	775	780	
Leu Val Asp Asn Ile Ser Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val			
785	790	795	800
Gly Cys His Pro Asn Gly Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn			
805	810	815	
Pro Pro Ala Ser Glu Val Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu			
820	825	830	
Pro Lys Val Thr Gln Val Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly			
835	840	845	
Ser Thr Val Ala Ser Val Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val			
850	855	860	
Phe His Lys Ala Leu Tyr Cys Glu Leu			
865	870		
<210> 39			
<211> 3084			
<212> DNA			

<213> Artificial

<220><223> THER4CETP DNA

<400> 39

gttaagtttgcacccatgaa agctgcggtg ctgaccctgg ccgtgcctt cctgacgggg	60
agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gccggcagaga ctatgtgtcc	180
cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agctccttga caactggac	240
agcgtgacct ccacccctag caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
tgggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
gaggtgaagg ccaaggtgca gcccttacctg gacgacttcc agaagaagtg gcaggaggag	420
atggagctct accggcagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agctccaaga gggcgccgc	480
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccccactgg gcgaggagat gcgcgaccgc	540
gcgcgcgcgc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggcttc aaggagaacg gcggcgccag actggccag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgccctc	720
gaggacctcc gcaaggcct gctgccgtg ctggagagct tcaaggtagc cttctgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
ggttgtggag gatctggagg aggtggaggt ggtggaggtg gtttaccgg tctcgagccc	900
aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctggagga	960
tcgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	1020
gagggtcacat gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg	1080
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	1140
agcacgtacc gtgtggtcag cgtccctacc gtccgtcacc aggactggct gaatggcaag	1200
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc	1260
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tggcccatc ccggatgag	1320
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaa gtttctatcc cagcgacatc	1380
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1440
ctggactccg acggctcctt cttcttctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	1500
cagcagggga acgttttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560
cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgcggag ctgcgcgcg cgtgaacgtg	1620
agcagccca gctgtcagga tatctgctcc aaaggcacct cgcacgaggc aggcacatcg	1680

tgccgcatca ccaaggctgc ctcctgggt ttgaaccacg agactgccaa ggtgatccag
accgccttcc agcgagccag ctacccagat atcacggcg agaaggccat gatgctcctt 1800

ggccaagtca agtatgggtt gcacaacatc cagatcagcc acttgtccat cgccagcagc
caggtggagc tgggtggaaagc caagtccatt gatgtctcca ttcagaacgt gtctgtggtc
ttcaaggggc cctctaagta tggctacacc actgccttgtt ggctgggtat tgatcagtcc
attgacttcg agatcgactc tgccattgac ctccagatca acacacagct gacctgtgac
tctgttagag tgcggaccga tgcccctgac tgctacctgt cttccataa gctgctctg
catctccaag gggagcgaga gcctgggtgg atcaaggcagc tgttcacaaa tttcatctcc
ttcacccctga agctggctt gaagggacag atctgcaaag agatcaacgt catctctaac 2220

atcatggccg attttgtcca gacaaggcgtt gccagcatcc tttcagatgg agacattgg
gtggacattt ccctgacagg tgatcccgtc atcacagcct cctacctgga gtcccatcac
aagggtcatt tcatactacaa gaatgtctca gaggacctcc ccctccccac cttctcgccc
acactgctgg gggactcccg catgctgtac ttctggttct ctgagcgagt cttccactcg
ctggccaagg tagtttcca ggtatggccgc ctcatgctca gcctgatggg agacgagttc
aaggcagtgc tggagacctg gggcttcaac accaaccagg aaatcttcca agaggttgtc
ggcgcgcttcc ccagccaggc ccaagtcacc gtccactgcc tcaagatgcc caagatctcc 2640

tgccaaaaca agggagtcgt ggtcaattct tcagtgatgg tggaaattccctt cttccacgc
ccagaccaggc aacattctgt agcttacaca tttgaagagg atatcggtac taccgtccag
gcctcctatt ctaagaaaaa gctttctta agccctttgg atttccagat tacaccaaaag
actgtttcca acttgactga gagcagctcc gagtcggcgtcc agagcttcct gcagtcaatg
atcaccgctg tggcatccc tgaggtcatg tctcggctcg aggttagtgg tacagccctc
atgaacagca aaggcgttag cctttcgac atcatcaacc ctgagattat cactcgagat
ggcttcctgc tgctgcagat ggactttggc ttccctgagc acctgcttgtt ggatttcctc 3060

cagagcttga gctaataatc taga 3084

<210> 40

<211> 1019

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER4CETP polypeptide

<400> 40

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

1	5	10	15
Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp			
20	25	30	
Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp			
35	40	45	
Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys			
50	55	60	
Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr			
65	70	75	80
Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp			
85	90	95	
Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys			
100	105	110	
Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe			
115	120	125	
Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu			
130	135	140	
Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu			
145	150	155	160
Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala			
165	170	175	
Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp			
180	185	190	
Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn			
195	200	205	
Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu			
210	215	220	
Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln			
225	230	235	240
Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala			
245	250	255	

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 290 295 300
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 340 345 350
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 405 410 415
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 420 425 430
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 435 440 445
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 450 455 460
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 465 470 475 480
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 485 490 495
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

500	505	510
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly		
515	520	525
Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Cys		
530	535	540
Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile Thr Lys		
545	550	555
Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr		
565	570	575
Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met		
580	585	590
Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser		
595	600	605
His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala Lys Ser		
610	615	620
Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly Thr Leu		
625	630	635
Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile		
645	650	655
Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu		
660	665	670
Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys Tyr Leu		
675	680	685
Ser Phe His Lys Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu Pro Gly		
690	695	700
Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu		
705	710	715
Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile		
725	730	735
Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp Gly		
740	745	750

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

 805 810 815
 Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Gly
 820 825 830
 Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr Asn Gln
 835 840 845
 Glu Ile Phe Gln Glu Val Val Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val
 850 855 860
 Thr Val His Cys Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly

 865 870 875 880
 Val Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro Arg Pro
 885 890 895
 Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Val Thr
 900 905 910
 Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu
 915 920 925
 Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser

 930 935 940
 Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val Gly
 945 950 955 960
 Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe Thr Ala Leu Met
 965 970 975
 Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile
 980 985 990
 Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu

995	1000	1005
His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser		
1010	1015	
<210> 41		
<211> 1068		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> human PON1 Q192K DNA		
<400> 41		
atggcgaagc tgattgcgt caccctttg gggatggac tggactctt caggaaccac		60
cagtcctttt accaaacacg acttaatgt ctccgaggaga tacaaccgt agaacttctt		120
aactgttaatt tagttaaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgcctaat		180
ggactggctt tcattagctc tggattaaag tatcctggaa taaagagctt caaccccaac		240
agtccctggaa aaatacttct gatggacctg aatgaagaag atccaacagt gttggatttg		300
gggatcaactg gaagtaattt tggatgtatct tcatttaacc ctcatggat tagcacattc		360
acagatgaag ataatgccat gtacccctcg gtggtaacc atccagatgc caagtccaca		420
gtggagttgt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcatctaaa aaccatcaga		480
cataaacttc tgccataattt gaatgatatt gttgctgtgg gacctgagca ctttatggc		540
acaaatgatc actatttct tgacccctac taaaatcct gggagatgtt tttgggtta		600
gcgtggtcgt attttgtcta ctatagtcca agtgaagttc gagtggtggc agaaggattt		660
gattttgcta atgaaatcaa catttcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttg		720
ctggctata agattcatgt gtatgaaaag catgctaatt ggactttaac tccattgaag		780
tcccttgact ttaataccct cgtggataac atatctgtgg atcctgagac aggagacctt		840
tgggttggat gccatccaa tggcatgaaa atcttcttct atgactcaga gaatccct		900
gcatcagagg tgcttcgaat ccagaacatt ctaacagaag aacctaaagt gacacaggtt		960
tatgcagaaa atggcacagt gttgcaaggc agtacagttt cctctgtgtt caaaggaaa		1020
ctgctgattt gcacagtgtt tcacaaagct cttaactgtt agtctaa		1068
<210> 42		
<211> 355		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> human PON1 Q192K polypeptide		

<400> 42

Met Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr

115 120 125

Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu

165 170 175

His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Lys

180 185 190

Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu

245 250 255

Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser

260 265 270

Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val

325 330 335

Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr

340 345 350

Cys Glu Leu

355

<210> 43

<211> 1065

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atggcgaagc tgattgcgct caccctttt gggatggac tggactctt caggaaccac 60

cagtttctt accaaacacg acttaatgtt ctccgagagg tacaaccgt agaacttcct 120

aactgttaatt tagttaagg aatcgaaact ggctctgaag acttggagat actgccta 180

ggactggctt tcattagctc tggattaaag tatcctggaa taaagagctt caaccccaac 240

agtccctggaa aaatacttct gatggacctg aatgaagaag atccaacagt gttggattt 300

gggatcactg gaagtaattt tcatgtatct tcatttaacc ctcatggat tagcacattc 360

acagatgaag ataatgccat gtaccccttg gtggtaacc atccagatgc caagtccaca 420

gtggatgtt ttaaatttca agaagaagaa aaatcgctt tgcataaaa aaccatcaga 480

cataaaacttc tgcataattt gaatgtatatt gttgctgtgg gacctgagca ctttatggc 540

acaatgatc actatttct tgaccctac ttaagatcct gggagatgta tttgggtta 600

gcgtggtcgt atttgtcta ctatagtcca agtgaagttc gagtggtggc agaaggattt
 660
 gattttgcta atggaatcaa catttcaccc gatggcaagt atgtctatat agctgagttg
 720
 ctggctata agattcatgt gtatgaaaag catgctaatt ggacttaac tccattgaag
 780
 tccctigact ttaataccct cgtggataac atatctgtgg atcctgagac aggagaccc
 840
 tgggttggat gccatccaa tggcatgaaa atcttcttct atgactcaga gaatcctct
 900
 gcatcagagg tgcttcgaat ccagaacatt ctaacagaag aacctaaagt gacacaggtt
 960

tatgcagaaa atggcacagt gttgcaaggc agtacagttg cctctgtgtcaaaaggaaa
 1020
 ctgctgatttgcacagtgtt tcacaaagct ctttactgtg agctc
 1065

<210> 44

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Ala Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr

115 120 125

Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu

165 170 175

His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Arg

180 185 190

Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu

245 250 255

Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser

260 265 270

Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val

325 330 335

Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr

340 345 350

Cys Glu Leu

355

<210> 45

<211> 2677

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THER4PON1 Q192K DNA

<400> 45

gttaagcttgcacccatgaa agctgcggc	60
ctgaccctgg ccgtgcctt cctgacgggg	
agccaggcgc ggcatttcgt gcagcaagat gaacccccc agagccccig ggatcgagt	120
aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctcaaagaca gggcagaga ctatgtgtcc	180
cagttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
agcgtgacct ccacccctcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
tggataacc tgaaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
gagggtgaagg ccaagggtgca gccctacccg gacgacttcc agaagaagtgcagaggag	420
atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtcacaaga gggcgccgc	480
cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccactgg gcgaggagat ggcgcaccgc	540
gcccgcgc c atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
cagcgcttgg cccgcgcct tgggtcttc aaggagaacg gggcgccag actggccag	660
taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgtc	720
gaggacctcc gccaaggcct gctccgcgtt ctggagagct tcaaggtagc ttcttgagc	780
gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
ggtgggtggag gatctggagg aggtggggagt ggtggaggtt gtttaccgg tctcgagccc	900
aaatcttctg acaaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctggagga	960
tcgtcagtc tcccttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	1020
gagggtcacat gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	1080
tacggtggacg gctgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cggggagga gcagtacaac	1140
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1200
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagcct ccatcgagaa aaccatctcc	1260
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tggcccccac ccggatgag	1320
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gtttctatcc cagcgcacatc	1380
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtt	1440
ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	1500
cagcagggga acgtttctc atgctccgtt atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560
cagaagagcc tctctcttc tccggtaaa gtcgacggag ctgcacggcc cgtgaacgtt	1620
agcagccccca gctgtcagga tatcctttc aggaaccacc agtctttta ccaaacacga	1680
cttaatgctc tccgagaggtt acaaccgtt gaacttccta actgttaattt agttaaagga	1740

atcgaaactg gctctgaaga cttggagata ctgcctaatt gactggctt cattagctc	1800
ggattaaagt atccctgaat aaagagctc aaccccaaca gtcctggaaa aatacttctg	1860
atggacctga atgaagaaga tccaacagtg ttggatttg ggatcactgg aagtaaattt	1920
gatgtatctt catttaaccc tcatggatt agcacattca cagatgaaga taatgccatg	1980
tacccctgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagtgtt taaattcaa	2040

gaagaagaaa aatcgcttt gcatctaaaa accatcagac ataaacttct gcctaatttgc	2100
aatgatattt tgctgtggg acctgagcac ttttatggca caaatgatca ctattttttt	2160
gaccctact taaaatcctg ggagatgtat ttgggttag cgtggcgta tgggtctac	2220
tatagtccaa gtgaagttcg agtggtggca gaaggatttg attttctaa tggaatcaac	2280
atttcacccg atggcaagta tgtctatata gctgagttgc tggctcataa gattcatgtg	2340
tatgaaaagc atgctaattt gacttaact ccattgaagt cccttgactt taataccctc	2400
gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt gggttggatg ccatccaaat	2460

ggcatgaaaa tcttcttcta tgactcagag aatccctcg catcagaggt gcttcgaatc	2520
cagaacattc taacagaaga acctaaagtg acacaggtt atgcagaaaa tggcacagtg	2580
ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaaggaaac tgctgattgg cacagtgttt	2640
cacaaagctc ttactgtga gctctaataa tctagaa	2677

<210> 46

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER4PON1 Q192K polypeptide

<400> 46

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

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr

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

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

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

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

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

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

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

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

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

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala

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

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

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

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

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

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

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

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

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

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Asp Leu Ser Gly Gly

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

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

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

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

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu

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

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335

 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 340 345 350

 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365

 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380

 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 385 390 395 400

 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 405 410 415

 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 420 425 430

 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 435 440 445

 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 450 455 460

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 465 470 475 480

 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 485 490 495

 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 500 505 510

 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Asp Gly
 515 520 525

 Ala Ser Ser Pro Val Asn Val Ser Ser Pro Ser Val Gln Asp Ile Leu
 530 535 540

 Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg
 545 550 555 560

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

565	570	575
Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe		
580	585	590
Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn		
595	600	605
Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr		
610	615	620
Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser Lys Phe Asp Val Ser Ser Phe		
625	630	635
Asn Pro His Gly Ile Ser Thr Phe Thr Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr		
645	650	655
Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe		
660	665	670
Lys Phe Gln Glu Glu Lys Ser Leu Leu His Leu Lys Thr Ile Arg		
675	680	685
His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp Ile Val Ala Val Gly Pro Glu		
690	695	700
His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Lys		
705	710	715
Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr		
725	730	735
Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn		
740	745	750
Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu		
755	760	765
Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu		
770	775	780
Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser		
785	790	795
Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly		
805	810	815

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

820 825 830

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

835 840 845

Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val

850 855 860

Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr

865 870 875 880

Cys Glu Leu

<210> 47

<211> 2677

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> THER4PON1 Q192R DNA

<400> 47

gttaagcttg ccaccatgaa agctgcggtg ctgaccttgg ccgtgcctt cctgacgggg	60
agccaggctc ggcatttctg gcagcaagat gaacccccc agagccctg ggatcgagtg	120

aaggacctgg ccactgtgta cgtggatgtg ctc当地agaca gggcagaga ctatgtgtcc	180
--	-----

cagtttgaag gctccgcctt gggaaaacag ctaaacctaa agtccttga caactggac	240
---	-----

agcgtgaccc ccacccctcg caagctgcgc gaacagctcg gccctgtgac ccaggagttc	300
---	-----

tgggataacc tggaaaagga gacagaggc ctgaggcagg agatgagcaa ggatctggag	360
--	-----

gaggtgaagg ccaaggtgca gccctacctg gacgacttcc agaagaagtgc gagggaggag	420
--	-----

atggagctct accgccagaa ggtggagccg ctgcgcgcag agtccaaga gggcgccgc	480
---	-----

cagaagctgc acgagctgca agagaagctg agccactgg gcgaggagat ggcgaccgc	540
---	-----

gccccccccc atgtggacgc gctgcgcacg catctggccc cctacagcga cgagctgcgc	600
---	-----

cagcgcttgg ccgcgcgcct tgaggctctc aaggagaacg gggcgccag actggccgag	660
--	-----

taccacgcca aggccaccga gcatctgagc acgctcagcg agaaggccaa gcccgcgc	720
---	-----

gaggacctcc gccaaggcct gctgccgtg ctggagagct tcaaggctcg cttccgtgac	780
--	-----

gctctcgagg agtacactaa gaagctcaac acccaagatc tctccggagg aggtggctca	840
---	-----

ggtgtgtggag gatctggagg aggtggaggat ggtggaggat gttctaccgg tctcgaccgc	900
---	-----

aaatcttctg acaaaactca cacatctcca ccgtccccag cacctgaact cctgggagga	960
tcgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	1020
gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	1080
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgccggagga gcagtacaac	1140
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1200
gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccgccct ccatcgagaa aaccatctcc	1260
aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag	1320
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc	1380
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1440
ctggactccg acggctcctt ctcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	1500
cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1560
cagaagagcc tctctctc tccggtaaa gtcgacggag ctgcgcaccc cgtaacgtg	1620
agcagccca gctgcagga tatcctttc aggaaccacc agtcttctt ccaaacacga	1680
cttaatgctc tccgagaggt acaaccgta gaacttccta actgttaattt agttaaagga	1740
atcgaaactg gctctgaaga cttggagata ctgcctaattg gactggctt cattagctc	1800
ggattaaagt atcctgaaat aaagagctc aacccaaaca gtcctggaaa aataactctg	1860
atggaccctga atgaagaaga tccaacagtg ttggatttg ggatcactgg aagtaaattt	1920
gatgtatctt catttaaccc tcatggatt agcacattca cagatgaaga taatgccatg	1980
tacccctgg tggtaacca tccagatgcc aagtccacag tggagtgtt taaatttcaa	2040
gaagaagaaa aatcgcttt gcatctaaa accatcagac ataaacttct gcctaatttgc	2100
aatgatattt ttgctgtggg acctgagcac tttatggca caaatgatca ctatccctt	2160
gaccctact taagatcctg ggagatgtat ttgggttag cgtggctgtac tggatctac	2220
tatagtccaa gtgaagttcg agtgggtggca gaaggatttg atttgctaa tggaatcaac	2280
atttcacccg atggcaagta tgtctatata gctgagttgc tggctataa gattcatgtg	2340
tatgaaaagc atgctaattt gactttaact ccattgaagt cccttgactt taatccctc	2400
gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca ggagacctt ggggtggatg ccatccaaat	2460
ggcatgaaaa tcttcttcta tgactcagag aatccctctg catcagaggt gcttcgaatc	2520
cagaacattc taacagaaga acctaaagtg acacaggtt atgcagaaaa tggcacagtg	2580
ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac aaaggaaac tgctgattgg cacagtgttt	2640

cacaaggctc ttactgtga gctctaataa tctagaa 2677

<210> 48

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> THER4PON1 Q192R polypeptide

<400> 48

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
 20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
 35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
 50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
 85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
 100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
 115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
 130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Met Arg Asp Arg Ala
 165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
 180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

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

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

690	695	700
His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Arg		
705	710	715
Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr		
725	730	735
Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn		
740	745	750
Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu		
755	760	765
Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu Lys His Ala Asn Trp Thr Leu		
770	775	780
Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser		
785	790	795
Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp Val Gly Cys His Pro Asn Gly		
805	810	815
Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val		
820	825	830
Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu Glu Pro Lys Val Thr Gln Val		
835	840	845
Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln Gly Ser Thr Val Ala Ser Val		
850	855	860
Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr Val Phe His Lys Ala Leu Tyr		
865	870	875
Cys Glu Leu		
<210> 49		
<211> 82		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> (gly4ser)4 linker DNA		
<400> 49		

aggtggttct accggctctcg ag 82
<210> 50
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> (gly4ser)4 linker
<400> 50
Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu
20 25

<210> 51
<211> 112
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> (gly4ser)6 linker DNA
<400> 51
agatctctcc ggaggaggtg gctcaggtgg tggaggatct ggaggaggtg ggagtgggg 60
aggtggttct ggaggaggtg gtatggagg tggaggttct accggctctcg ag 112
<210> 52
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> (gly4ser)6 linker
<400> 52

Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Ser Thr Gly Leu
35
<210> 53
<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> (gly4ser)5 linker DNA

<400> 53

gatctctccg gaggaggtgg ctcaggtggt ggaggatctg gaggaggtgg gagtggtgga 60

ggtggttctg gaggaggtgg tagtaccggt ctc 93

<210> 54

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> (gly4ser)5 linker

<400> 54

Asp Leu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Leu

20 25 30