



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0064453
(43) 공개일자 2009년06월18일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/76 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7007639

(22) 출원일자 2009년04월14일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2009년04월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/019841

국제출원일자 2007년09월13일

(87) 국제공개번호 WO 2008/033413

국제공개일자 2008년03월20일

(30) 우선권주장

60/844,349 2006년09월14일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

휴먼 게놈 사이언시즈, 인코포레이티드

미국 메릴랜드주 20850 록크빌 셰이디 그로브 로드 14200

(72) 발명자

서브라마니안, 마니

미국 21042 메릴랜드 엘리코트 씨티 스타프포드 레인 10217

스툼프, 데이비드, 카터

미국 20854 메릴랜드 포토맥 다린 테라쓰 11501

(74) 대리인

남상선

전체 청구항 수 : 총 222 항

(54) 알부민 융합 단백질

(57) 요약

본 발명은 알부민 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 본 발명에 또한 포함되며, 벡터는 핵산을 함유하고, 이 핵산 벡터에 의해 숙주 세포는 형질전환된다. 그리고 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 만드는 방법 및 이 핵산, 벡터 및/또는 숙주 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 약제학적 조성물을 포함하며, 이 약제학적 조성물은 알부민 융합 단백질을 포함한다. 그리고 본 발명은 본 발명이 알부민 융합 단백질을 사용하여 질병, 장애 또는 질환을 치료, 예방 또는 경감하는 방법에 관한 것이다.

대표도

```

1 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA 60
1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 20

61 GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120
21 A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D H V 40

121 AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180
41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 60

181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240
61 N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L 80

241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300
81 R E T Y G E N A D C C A K Q E P E R N E 100

301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360
101 C F L Q H K D D N P N L F R L V R P E V 120

361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420
121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 140

421 GAA ATT GCC AGA AGA CAT CTT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG 480
141 E I A R R H P Y F Y A P E L L F F A K R 160
    
```

(30) 우선권주장

60/858,410	2006년11월13일	미국(US)
60/902,039	2007년02월20일	미국(US)
60/942,647	2007년06월07일	미국(US)
60/960,039	2007년09월12일	미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 구성원으로부터 선택된 구성원을 포함하는 알부민 융합 단백질:

- (a) 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체;
- (b) 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서 상기 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함한다);
- (c) (a) 또는 (b)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 상기 치료 X의 단편 또는 변이체는 치료 단백질 X의 생물학적 활성을 가지고, 여기서 상기 알부민 단편 또는 이의 변이체는 알부민 활성을 가진다);
- (d) (c)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 상기 알부민 활성은 융합되지 않은 상태에 있는 치료 단백질 X의 저장 기간에 비해, 치료 단백질 X의 저장 기간을 길게하는 능력이다)
- (e) (c)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 상기 알부민 활성은 융합되지 않은 상태에 있는 치료 단백질 X의 혈청 반감기에 비해, 치료 단백질 X의 혈청 반감기를 길게하는 능력이다)
- (f) (a)-(e)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 알부민 단편 또는 변이체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-387의 아미노산 서열을 포함한다);
- (g) (a)-(f)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체는 알부민의 N-말단, 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체의 N-말단에 융합되어 있다);
- (h) (a)-(f)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체는 알부민의 C-말단, 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체의 C-말단에 융합되어 있다);
- (i) (a)-(f)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서, 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체는 알부민의 N-말단 및 C-말단, 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체의 N-말단 및 C-말단에 융합되어 있다);
- (j) (a)-(f)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(이는 제 1 치료 단백질 X 또는 이의 단편 또는 변이체, 및 제 2 치료 단백질 X 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하고, 여기서 상기 제 1 치료 단백질 X 또는 이의 단편 또는 변이체는 상기 제 2 치료 단백질 X, 또는 이의 단편 또는 변이체와는 상이하다);
- (k) (a)-(i)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체는 알부민 또는 이의 알부민 단편 또는 변이체로부터 링커(linker)에 의해 분리되어 있다);
- (l) (a)-(k)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서 알부민 융합 단백질이 다음 식을 가지며:

$$R1-L-R2; R2-L-R1; \text{ 또는 } R1-L-R2-L-R1,$$

상기 식에서 R1은 치료 단백질:X, 또는 이의 단편 또는 변이체이고, L은 펩티드 링커이며, R2는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 알부민 또는 알부민의 단편 또는 변이체이다);

- (m) (a)-(l)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체(여기서 알부민 융합 단백질의 저장 수명은 융합되지 않은 상태에 있는 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 저장 수명보다 더 길다);

(n) (a)-(1)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체 (여기서 알부민 융합 단백질의 혈청 반감기는 융합되지 않은 상태에 있는 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 혈청 반감기보다 더 길다);

(o) (a)-(1)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체 (여기서 상기 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 실험관내 생물학적 활성은 융합되지 않은 상태에서의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 실험관내 생물학적 활성보다 더 크다); 및

(p) (a)-(1)의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체 및 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체 (여기서 상기 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 생체내 생물학적 활성은 융합되지 않은 상태에서의 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 생체내 생물학적 활성보다 더 크다)

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질은 숙주 세포에서 발현되며, 여기서 상기 숙주 세포가 효모, 포유류 세포 또는 박테리아 세포임을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 분비 선도 서열을 추가로 포함함을 특징으로 하는 알부민 융합 단백질.

청구항 4

제 1 항의 알부민 융합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 5

제 4 항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 6

제 1 항의 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에 있는 질병, 장애 또는 감염을 치료하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 질병, 장애 또는 감염이 적응증 Y를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 질병, 장애 또는 감염은 만성 간염, B 형 간염; 만성 B 형 간염, C 형 간염 감염; 만성 C 형 간염; D형 간염; 만성 D형 간염; 인간 유두종 감염; 헤르페스 단순 바이러스 감염(Herpes Simplex Virus Infection); 외부 침형콘딜로마(Condylomata Acuminata); HIV 감염; 종양학; 암; 솔리드 종양; 흑종과; 악성 흑색종; 신장 암, 폐암, 대장암, 유방암, 간암, 전립선 암, 방광암, 위암; 육종; 에이즈 관련된 카포시육종(AIDS-Related Kaposi's Sarcoma); 림프종; T 세포 림프종; 피부 T 세포 림프종(Cutaneous T-Cell Lymphoma); 비호지킨림프종, 뇌종양 환자; 신경아교종(Glioma); 다형성아교모세포종(Glioblastoma Multiforme); 경부 형성 이상; 백혈병; 전백혈병(Prelukemia); 골수 장애; 뼈 장애; 카멜레이라 세포 백혈병, 만성 골수백혈병(Chronic Myelogenous Leukemia); 혈액 악성; 혈액 장애; 다발성 골수종; 세균성 감염; 케모프로텍션(Chemoprotection); 저혈소판증(Thrombocytopenia); 복합 경화증; 폐 섬유증; 나이관련된 황반 변성, 황반 변성; 크론병; 신경계 장애, 관절염, 류머티스 관절염; 궤양성 대장염; 골다공증, 뼈감소증(Osteopenia), 파골세포형성(Osteoclastogenesis); 섬유근육통(Fibromyalgia); 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 만성 피로 증후군; 발열; 출혈(Hemorrhagic) 발열; 바이러스성 출혈 발열; 고혈당증; 당뇨병; 요붕증(Diabetes Insipidus); 당뇨병(diabetes mellitus); 타입 1 당뇨병; 타입 2 당뇨병; 인슐린 저항, 인슐린 결핍; 고지 혈증; 고케톤혈증(Hyperketonemia); 비-인슐린 의존 당뇨병(NIDDM); 인슐린-의존 당뇨병(IDDM); 중증 급성 호흡기 증후군(사스) 또는 질병 관리를 위한 미국 기관에 의해 식별된 카테고리 A, B, 또는 C 제제에 의한 감염(infection)

by a Category A, B, or C agent identified by the United States Centers for Disease Control) 또는 이의 조합물로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 질병 또는 장애가 C형 간염 또는 B형 간염임을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질병 또는 장애가 C형 간염 또는 HIV 감염임을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이:

- (a) 작제물 ID 2249;
- (b) 작제물 ID 2343;
- (c) 작제물 ID 2366;
- (d) 작제물 ID 2381;
- (e) 작제물 ID 2382;
- (f) 작제물 ID 2410;
- (g) 작제물 ID 3165;
- (h) 작제물 ID 3422;
- (i) 작제물 ID 3423;
- (j) 작제물 ID 3424;
- (k) 작제물 ID 3476;
- (l) 작제물 ID 3960;
- (m) 작제물 ID 4290;
- (n) 작제물 ID 4291;
- (o) 작제물 ID 4292;
- (p) 작제물 ID 4295; 및
- (q) 작제물 ID 4296로부터 선택된 알부민 융합 작제물을 포함하는 숙주 세포에 의해 발현됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 알부민 융합 작제물이 (d)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 알부민 융합 작제물이 (g)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 알부민 융합 작제물이 (l)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 환자가 C형 간염을 가지고 상기 환자가 치료를 받은 적이 없거나 치료의 경험이 있음

을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 환자가 치료의 경험이 있고 비반응자(non-responder)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 비반응자가 폐경화된-감염 알파 및 리바비린을 포함하는 하나 이상의 조합 치료 프로토콜에 불능(fail)이 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 상기 C형 간염이 유전형 1 or 유전형 2/3임을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질의 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 600 μ g/투여량;
- (b) 약 900 μ g/투여량;
- (c) 약 1000 μ g/투여량;
- (d) 약 1200 μ g/투여량;
- (e) 약 1800 μ g/투여량;
- (f) 약 2000 μ g/투여량; 및
- (g) 약 2400 μ g/투여량을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이:

- (a) 1주마다 한번;
- (b) 2주마다 한번;
- (b) 3주마다 한번;
- (c) 4주마다 한번;
- (d) 5주마다 한번으로부터 선택되는 투여 계획에 따라 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2주마다 그리고 4주마다의 조합을 포함하는 투여 계획에 따라 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질의 투여 계획이 알부민 융합 단백질을 처음 4주 동안 2주마다 그 다음에 4주마다 투여하는 것을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 20 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 계획이 24 내지 48 주 동안됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 15 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스

제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제(enhancer)로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 24 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 $900\mu\text{g}$ /투여량 내지 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량이며, (4) 상기 환자가 상기 알부민 융합 단백질을 가지고 2주마다 한번 투여되는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 $900\mu\text{g}$ /투여량;
- (b) 약 $1200\mu\text{g}$ /투여량; 및
- (c) 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제 31 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 31 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 $900\mu\text{g}$ /투여량 내지 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량이며, (4) 상기 환자가 상기 알부민 융합 단백질을 가지고 4주마다 한번 투여되는 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 $900\mu\text{g}$ /투여량;
- (b) 약 $1200\mu\text{g}$ /투여량; 및
- (c) 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 36 항 또는 제 37 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;

- (d) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 38 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 38 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 $900\mu\text{g}$ /투여량 내지 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량이며, (4) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 43 또는 44 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 $900\mu\text{g}$ /투여량;
- (b) 약 $1200\mu\text{g}$ /투여량; 및
- (c) 약 $1800\mu\text{g}$ /투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 43 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 46 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제;

- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 46 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제 46 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 1200 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 2주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제 52 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 52 항에 있어서, 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 52 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제 55 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 1200 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 52 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제 58 항에 있어서, 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제 58 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제 61 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (3) 상기 치료상 유효량

이 약 1200 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질을 24 내지 48주 동안 처음 4주의 치료는 2주마다 한번 후속하여 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 64

제 63 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

제 63 항 또는 제 64 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제 65 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

제 65 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

제 65 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제 69 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질을 2주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 71

제 70 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량; 및

(c) 약 1800 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제 70 항 또는 제 71 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제 72 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제 72 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제 72 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제 75 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 77

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질을 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 78

제 77 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량; 및
- (c) 약 1800 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 79

제 77 항 또는 제 78 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여

투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 80

제 79 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 81

제 79 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 82

제 79 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 83

제 82 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 84

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파-2b를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파-2b가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 85

제 84 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 86

제 84 또는 85 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량; 및
- (c) 약 1800 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 87

제 84 항 내지 제 86 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 88

제 87 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 89

제 87 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 90

제 87 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 91

제 90 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 92

질병, 장애 또는 감염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:

- (a) 단기간 동안 허용될 수 있는 안전 프로필을 가진 인터페론의 최대 용량을 상기 환자에 투여하는 단계; 및
- (b) 장기간 동안 인터페론의 유지용량을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 93

제 92 항에 있어서, 상기 최대 용량이:

- (a) 인터페론의 표준 용량과 같은 용량;
- (b) 인터페론의 표준 용량 이상의 용량;
- (c) 인터페론의 표준 용량보다 1배 더 큰(1x higher) 용량;
- (d) 인터페론의 표준 용량보다 2배 더 큰 용량;
- (e) 인터페론의 표준 용량보다 3배 더 큰 용량;
- (f) 인터페론의 표준 용량보다 4배 더 큰 용량;
- (g) 인터페론의 표준 용량보다 5배 더 큰 용량;
- (d) 인터페론의 표준 용량보다 6배 더 큰 용량;
- (e) 인터페론의 표준 용량보다 7배 더 큰 용량;
- (f) 인터페론의 표준 용량보다 8배 더 큰 용량;

- (g) 인터페론의 표준 용량보다 9배 더 큰 용량; 및
- (h) 인터페론의 표준 용량보다 10배 더 큰 용량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 94

제 92 항 또는 제 93 항에 있어서, 상기 유지 용량이:

- (a) 인터페론의 표준 용량과 같은 용량;
- (b) 인터페론의 표준 용량 이상의 용량;
- (c) 상기 최대 용량의 1/4인 용량;
- (d) 상기 최대 용량의 1/2인 용량;
- (e) 상기 최대 용량의 1/3인 용량;
- (f) 상기 최대 용량의 1/8인 용량;
- (g) 상기 최대 용량보다 용량보다 1배 더 작은(1x lower) 용량;
- (h) 상기 최대 용량보다 용량보다 2배 더 작은 용량;
- (i) 상기 최대 용량보다 용량보다 3배 더 작은 용량;
- (j) 상기 최대 용량보다 용량보다 4배 더 작은 용량;
- (k) 상기 최대 용량보다 용량보다 5배 더 작은 용량;
- (l) 상기 최대 용량보다 용량보다 6배 더 작은 용량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 95

제 92 항 내지 제 94 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 최대 용량 및 상기 유지 용량이:

- (a) 하루에 한번;
- (b) 하루에 두번;
- (c) 일주일에 한번;
- (d) 일주일에 두번;
- (e) 일주일에 세번;
- (f) 일주일에 한번;
- (g) 2주일에 한번;
- (h) 3주일에 한번; 및
- (i) 4주일에 한번으로부터 선택되는 투여 계획에 따라 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 96

제 92 항 내지 제 95 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단기간이:

- (a) 1주;
- (b) 2주;
- (c) 3주;
- (d) 4주;
- (e) 5주;
- (f) 6주;

- (g) 7주; 및
- (h) 8주로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 97

제 92 항 내지 제 96 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장기간이:

- (a) 16주 이상;
- (b) 20주 이상;
- (c) 24주 이상;
- (d) 30주 이상;
- (e) 36주 이상;
- (f) 40주 이상;
- (g) 46주 이상;
- (h) 48주 이상;
- (i) 50주 이상; 및
- (j) 60주 이상으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 98

질병, 장애 또는 감염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:

- (a) 단기간 동안 더욱 많은 빈도의 투여 계획으로 인터페론의 유효량을 상기 환자에 투여하는 단계; 및
- (b) 장기간 동안 더욱 적은 빈도의 투여 계획으로 상기 인터페론을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 99

제 98 항에 있어서, 상기 더욱 많은 빈도의 투여 계획이:

- (a) 하루에 한번;
- (b) 하루에 두번;
- (c) 일주일에 한번;
- (d) 일주일에 두번;
- (e) 일주일에 세번; 및
- (f) 2주일에 한번으로부터 선택되는 투여 계획에 따라 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 100

제 98 항 또는 제 99 항에 있어서, 상기 더욱 적은 빈도의 투여 계획이 상기 더욱 많은 빈도의 투여 계획보다 적으며,

- (a) 일주일에 한번;
- (b) 일주일에 두번;
- (c) 2주일에 한번;
- (d) 3주일에 한번; 및
- (e) 4주일에 한번으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 101

제 98 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단기간이:

- (a) 1주;
- (b) 2주;
- (c) 3주;
- (d) 4주;
- (e) 5주;
- (f) 6주;
- (g) 7주; 및
- (h) 8주로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 102

제 98 항 내지 제 101 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장기간이:

- (a) 16주 이상;
- (b) 20주 이상;
- (c) 24주 이상;
- (d) 30주 이상;
- (e) 36주 이상;
- (f) 40주 이상;
- (g) 46주 이상;
- (h) 48주 이상;
- (i) 50주 이상; 및
- (j) 60주 이상으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 103

질병, 장애 또는 감염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이:

- (a) 단기간 동안 더욱 많은 빈도의 투여 계획으로 허용가능한 안전 프로필을 가진 인터페론의 최대 용량을 상기 환자에 투여하는 단계; 및
- (b) 장기간 동안 더욱 적은 빈도의 투여 계획으로 상기 인터페론의 유지 용량을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 104

제 103 항에 있어서, 상기 최대 용량이:

- (a) 인터페론의 표준 용량과 같은 용량;
- (b) 인터페론의 표준 용량 이상의 용량;
- (c) 인터페론의 표준 용량보다 1배 더 큰(1x higher) 용량;
- (d) 인터페론의 표준 용량보다 2배 더 큰 용량;
- (e) 인터페론의 표준 용량보다 3배 더 큰 용량;

- (f) 인터페론의 표준 용량보다 4배 더 큰 용량;
- (g) 인터페론의 표준 용량보다 5배 더 큰 용량;
- (d) 인터페론의 표준 용량보다 6배 더 큰 용량;
- (e) 인터페론의 표준 용량보다 7배 더 큰 용량;
- (f) 인터페론의 표준 용량보다 8배 더 큰 용량;
- (g) 인터페론의 표준 용량보다 9배 더 큰 용량; 및
- (h) 인터페론의 표준 용량보다 10배 더 큰 용량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 105

제 103 항 또는 제 104 항에 있어서, 상기 유지 용량이:

- (a) 인터페론의 표준 용량과 같은 용량;
- (b) 인터페론의 표준 용량 이상의 용량;
- (c) 상기 최대 용량의 1/4인 용량;
- (d) 상기 최대 용량의 1/2인 용량;
- (e) 상기 최대 용량의 1/3인 용량;
- (f) 상기 최대 용량의 1/8인 용량;
- (g) 상기 최대 용량보다 용량보다 1배 더 작은(1x lower) 용량;
- (h) 상기 최대 용량보다 용량보다 2배 더 작은 용량;
- (i) 상기 최대 용량보다 용량보다 3배 더 작은 용량;
- (j) 상기 최대 용량보다 용량보다 4배 더 작은 용량;
- (k) 상기 최대 용량보다 용량보다 5배 더 작은 용량;
- (l) 상기 최대 용량보다 용량보다 6배 더 작은 용량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 106

제 103 항 내지 제 105 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 더욱 많은 빈도의 투여 계획이:

- (a) 하루에 한번;
- (b) 하루에 두번;
- (c) 일주일에 한번;
- (d) 일주일에 두번;
- (e) 일주일에 세번; 및
- (f) 2주일에 한번으로부터 선택되는 투여 계획에 따라 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 107

제 103 항 또는 제 106 항에 있어서, 상기 더욱 적은 빈도의 투여 계획이 상기 더욱 많은 빈도의 투여 계획보다 적으며,

- (a) 일주일에 한번;
- (b) 일주일에 두번;
- (c) 2주일에 한번;

- (d) 3주일에 한번; 및
- (e) 4주일에 한번으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 108

제 103 항 내지 제 107 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단기간이:

- (a) 1주;
- (b) 2주;
- (c) 3주;
- (d) 4주;
- (e) 5주;
- (f) 6주;
- (g) 7주; 및
- (h) 8주로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 109

제 103 항 내지 제 108 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장기간이:

- (a) 16주 이상;
- (b) 20주 이상;
- (c) 24주 이상;
- (d) 30주 이상;
- (e) 36주 이상;
- (f) 40주 이상;
- (g) 46주 이상;
- (h) 48주 이상;
- (i) 50주 이상; 및
- (j) 60주 이상으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 110

제 92 항 내지 제 109 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질병, 장애 또는 감염은 만성 간염, B 형 간염; 만성 B 형 간염, C 형 간염 감염; 만성 C 형 간염; D형 간염; 만성 D형 간염; 인간 유두종 감염; 헤르페스 단순 바이러스 감염(Herpes Simplex Virus Infection); 외부 침형콘딜로마(Condylomata Acuminata); HIV; HIV 감염; 종양학; 암; 솔리드 종양; 흑종과; 악성 흑색종; 신장 암, 폐암, 대장암, 유방암, 간암, 전립선 암, 방광암, 위암; 육종; 에이즈 관련된 카포시육종(AIDS-Related Kaposi's Sarcoma); 림프종; T 세포 림프종; 피부 T 세포 림프종(Cutaneous T-Cell Lymphoma); 비호지킨림프종, 뇌종양 환자; 신경아교종(Glioma); 다형성아교모세포종(Glioblastoma Multiforme); 경부 형성이상; 백혈병; 전백혈병(Prelukemia); 골수 장애; 뼈 장애; 카벨레이라 세포 백혈병, 만성 골수백혈병(Chronic Myelogenous Leukemia); 혈액 악성; 혈액 장애; 다발성 골수종; 세균성 감염; 케모프로텍션(Chemoprotection); 저혈소판증(Thrombocytopenia); 복합 경화증; 폐 섬유증; 나이관련된 황반 변성, 황반 변성; 크론병; 신경계 장애, 관절염, 류머티스 관절염; 궤양성 대장염; 골다공증, 뼈감소증(Osteopenia), 파골세포형성(Osteoclastogenesis); 섬유근육통(Fibromyalgia); 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 만성 피로 증후군; 발열; 출혈(Hemorrhagic) 발열; 바이러스성 출혈 발열; 고혈당증; 당뇨병; 요붕증(Diabetes Insipidus); 당뇨병(diabetes mellitus); 타입 1 당뇨병; 타입 2 당뇨병; 인슐린 저항, 인슐린 결핍; 고지혈증; 고케톤혈증(Hyperketonemia); 비-인슐린 의존 당뇨병(NIDDM); 인슐린-의존 당뇨병(IDDM); 중증 급성 호흡기

증후군 (사스) 및 질병 관리를 위한 미국 기관에 의해 식별된 카테고리는 A, B, 또는 C 제제에 의한 감염 (infection by a Category A, B, or C agent identified by the United States Centers for Disease Control) 또는 이의 조합물로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 111

제 110 항에 있어서, 상기 질병, 장애 또는 감염이 C형 간염 또는 B형 간염임을 특징으로 하는 방법.

청구항 112

제 111 항에 있어서, 상기 질병 또는 장애가 C형 간염 또는 HIV 감염임을 특징으로 하는 방법.

청구항 113

제 110 항 또는 제 111 항에 있어서, 상기 C형 간염이:

- (a) 유전형 1;
- (b) 유전형 2; 및
- (c) 유전형 3으로부터 선택되는 유전형임을 특징으로 하는 방법.

청구항 114

제 92 항 내지 제 113 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터페론이 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 또는 인터페론 오메가 또는 이의 단편임을 특징으로 하는 방법.

청구항 115

제 114 항에 있어서, 상기 인터페론 알파가:

- (a) 인터페론 알파-2a;
- (b) 인터페론 알파-2b;
- (c) 인터페론 알파-2c;
- (d) 공통(Consensus) 인터페론;
- (c) 인터페론 알파콘-1;
- (d) 인터페론 알파-n1;
- (e) 인터페론 알파-n3; 및
- (f) 인터페론 알파의 임의의 상업적으로 이용될 수 있는 형태로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 116

제 115 항에 있어서, 상기 상업적으로 이용될 수 있는 인터페론 알파가:

- (a) INTRON[®] A;
- (b) ROFERON[®] A;
- (c) Berofer 알파 인터페론;
- (d) OMNIFERON[™];
- (e) MULTIFERON[™];
- (f) WELLFERON[®] ;
- (g) INFERGEN[®] ;

(h) SUMIFERON[®]; 및

(i) MAXY-ALPHA[™]로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 117

제 114 항에 있어서, 상기 인터페론이 지속성임을 특징으로 하는 방법.

청구항 118

제 117 항에 있어서, 상기 지속성 인터페론이:

(a) 알부민 또는 이의 단편 또는 변이체에 융합되어 있는 인터페론 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질;

(b) BELEROFON[®];

(c) 인터페론-알파-XL;

(d) LOCTERON[™];

(e) 폐길화된 인터페론 알파-2a;

(f) 폐길화된 인터페론 알파-2b; 및

(g) 폐길화된 공통(consensus) 인터페론.

청구항 119

제 118 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이

(a) 작제물 ID 2249;

(b) 작제물 ID 2343;

(c) 작제물 ID 2366;

(d) 작제물 ID 2381;

(e) 작제물 ID 2382;

(f) 작제물 ID 2410;

(g) 작제물 ID 3165;

(h) 작제물 ID 3422;

(i) 작제물 ID 3423;

(j) 작제물 ID 3424;

(k) 작제물 ID 3476;

(l) 작제물 ID 3960;

(m) 작제물 ID 4290;

(n) 작제물 ID 4291;

(o) 작제물 ID 4292;

(p) 작제물 ID 4295; 및

(q) 작제물 ID 4296로부터 선택된 알부민 융합 작제물을 포함하는 숙주 세포에 의해 발현됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 120

제 92 항 내지 제 119 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터페론이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 121

제 120 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 리바비린 또는 리바비린 유사체;
- (b) 항바이러스 효소 억제제;
- (c) 뉴클레오시드 유사 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 비-뉴클레오시드 유사 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (e) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (f) 티아졸리드;
- (g) 항바이러스 항체;
- (h) 새로운 면역조절제;
- (i) 시클로필린 억제제;
- (j) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (k) 인터페론 활성제(enhancer)로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 122

제 120 항 또는 제 121 항에 있어서, 상기 항바이러스성제 환자에 매일 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 123

치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 저장 수명 또는 혈청 반감기를 연장시키는 방법으로서, 상기 방법이 융합되지 않은 상태에 있는 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 저장 수명 또는 혈청 반감기에 비해, 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체의 저장 수명 또는 혈청 반감기를 연장시키기에 충분한, 치료 단백질 X 또는 치료 X의 단편 또는 변이체를 알부민 또는 알부민 단편 또는 이의 변이체에 융합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 124

제 123 항의 알부민 융합 단백질을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 125

제 124 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 126

제 124 항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 127

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자가 상기 알부민 융합 단백질을 가지고 2주마다 한번 투여되는 방법.

청구항 128

제 127 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 129

제 127 항 또는 제 128 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 130

제 129 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 131

제 129 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 132

제 129 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 133

제 132 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 134

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자가 상기 알부민 융합 단백질을 가지고 4주마다 한번 투여되는 방법.

청구항 135

제 134 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;

- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 136

제 134 항 또는 제 135 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 137

제 136 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 138

제 136 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 139

제 136 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 140

제 139 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 141

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 142

제 141 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 143

제 141 항 또는 제 142 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 144

제 141 항 내지 제 143 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 145

제 144 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 146

제 144 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 147

제 144 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 148

제 147 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 149

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 환자는 75kg 이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 2주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 150

제 149 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;

- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 151

제 149 항 또는 제 150 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 152

제 151 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 153

제 151 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 154

제 151 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 155

제 154 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 156

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 157

제 156 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;

- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 158

제 156 항 또는 제 157 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 159

제 158 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 160

제 158 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 161

제 158 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 162

제 161 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 163

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 164

제 163 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 165

제 163 항 또는 제 164 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;

- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 166

제 163 항 내지 제 165 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과항 바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 167

제 169 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 168

제 166 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 169

제 166 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 170

제 169 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 171

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg 이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 2주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 172

제 171 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;

- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 173

제 171 항 또는 제 172 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 174

제 173 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 175

제 173 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 176

제 173 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 177

제 176 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 178

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 179

제 178 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;

- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 180

제 178 항 또는 제 179 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 181

제 180 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 182

제 180 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 183

제 180 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 184

제 183 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 185

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 186

제 185 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 187

제 185 항 또는 제 186 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;

- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 188

제 185 항 내지 제 187 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 189

제 188 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 190

제 188 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 191

제 188 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 192

제 191 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 193

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 2주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 194

제 193 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;

- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 195

제 193 항 또는 제 194 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 196

제 195 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 197

제 195 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 198

제 195 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 199

제 198 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 200

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에 상기 알부민 융합 단백질로 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 201

제 200 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;
- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및

(e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 202

제 200 항 또는 제 201 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 203

제 202 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 204

제 202 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 205

제 202 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 206

제 205 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 207

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 있으며, (2) 상기 C형 간염이 유전형 2 또는 3이고, (3) 상기 치료상 유효량이 약 900 μ g/투여량 내지 약 2400 μ g/투여량이며, (4) 상기 환자에 처음 4주의 치료기간 동안 2주마다 한번, 후속적으로 4주마다 한번 상기 알부민 융합 단백질을 투여하는 방법.

청구항 208

제 207 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 209

제 207 항 또는 제 208 항에 있어서, 상기 치료상 유효량이:

- (a) 약 900 μ g/투여량;
- (b) 약 1200 μ g/투여량;
- (c) 약 1800 μ g/투여량;

- (d) 약 2100 μ g/투여량; 및
- (e) 약 2400 μ g/투여량으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 210

제 207 항 내지 제 209 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 211

제 210 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 212

제 210 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 213

제 210 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 214

제 213 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 215

성숙 알부민에 융합되어 있는 성숙 인터페론 알파를 포함하는 알부민 융합 단백질의 치료상 유효량으로, C형 간염을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 성숙 인터페론 알파가 성숙 알부민의 C-말단에서 융합되어 있고, (1) 상기 환자가 치료를 받은 적이 없으며, (2) 상기 환자는 75kg이상 몸무게가 나가며; (3) 상기 C형 간염이 유전형 1이고, (4) 상기 치료상 유효량이 약 1200 μ g/투여량 내지 약 1800 μ g/투여량이며, (5) 상기 환자에게 투여 후 2주째 상기 알부민 융합 단백질의 추가 투여량으로 4주마다 한번 투여하는 방법.

청구항 216

제 215 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 총 24 내지 48주 동안 환자에 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 217

제 215 항 또는 제 216 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 하나 또는 그 초과 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 218

제 217 항에 있어서, 상기 항바이러스제가:

- (a) 항바이러스 효소 억제제;
- (b) 뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (c) 비-뉴클레오시드 유사체 항바이러스 폴리머라제 억제제;
- (d) 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제;
- (e) 티아졸리드;
- (f) 항바이러스성 항체;
- (g) 새로운 면역조절제;
- (h) 시클로필린 억제제;
- (i) 헵토프로텍티브 제제; 및
- (j) 인터페론 활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 219

제 217 항에 있어서, 상기 항바이러스제가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 220

제 217 항에 있어서, 상기 알부민 융합 단백질이 2, 3 또는 4개의 항바이러스제와 조합하여 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 221

제 220 항에 있어서, 항바이러스제 중 하나가 리바비린 또는 리바비린 유사체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 222

제 215 항 내지 제 221 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 75kg 이상의 몸무게를 가짐을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

<1> 컴팩트 디스크 상에 기재된 서열에 대한 참조

<2> 본 출원은 "1본", "2본", "CRF"로 라벨링된 세 개의 동일한 콤팩트 디스크(CD-R)의 전자 문서로서 제공되는 하기 "서열 목록"에 관한 것이다. 이 콤팩트 디스크는 각각 "PF619PP5 Sequence Listing.txt(198,000바이트, 2007년 9월 7일에 생성됨)의 파일을 포함하며, 이는 전체 내용이 참조로서 포함된다.

<3> 배경기술

<4> 본 발명은 일반적으로 알부민 또는 알부민의 단편 또는 변이체와 융합된 치료 단백질(하나 이상의 폴리펩티드, 항체, 펩티드, 또는 이들의 단편 및 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않음)에 관한 것이다. 본 발명은 폴리뉴클레오티드 엔코딩 치료 알부민 융합 단백질, 치료 알부민 융합 단백질, 조성물, 약학적 조성물, 제형 및 키트를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드 엔코딩 치료 알부민 융합 단백질로 형질전환된 숙주 세포가 또한 본 발명에 포함되고, 상기 폴리뉴클레오티드, 및/또는 숙주 세포를 이용하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는 방법도 포함된다.

<5> 성숙한 형태에서 585 아미노산의 단백질(도 1(SEQ ID NO:1)에 도시됨)인 인간 혈청 알부민(Human serum

albumin: HSA, 또는 HA)은 혈청의 삼투압에 중요한 부분을 책임지고, 내인성 및 외인성 리간드의 담체로서도 작용한다. 현재, 임상적 용도를 위한 HA가 인간 혈액으로부터의 추출에 의해 생성된다. 미생물에서의 재조합 HA(rHA)의 생성이 EP 330 451 및 EP 361 991에 기술되어 있다.

<6> 통상적으로, 천연 상태 또는 재조합으로 생성되는 치료 단백질, 예를 들어 인터페론 및 성장 호르몬은 특히 수성 용액에서 포플레이팅되는 경우에 짧은 저장-수명을 나타내는 불안정한 분자이다. 투여를 위해 포플레이팅되는 경우에 이러한 분자의 불안정성은 다수의 분자가 저장 동안 항상 냉동 건조되고 냉각되어, 분자를 수송하고/하거나 저장하기 어렵게 만드는 것을 의미한다. 저장 문제는 약학적 제형이 병원 환경의 외부에서 저장되고 투약되어야 하는 경우에 특히 심각하다.

<7> 불안정한 단백질 분자의 저장 문제에 대한 실질적인 해법이 거의 제안되지 않았다. 따라서, 바람직하게는 최소 저장 후 조작을 요구하는 간단한 제형으로 용이하게 분배되는, 단백질성 치료 분자의 장기간 지속되는 안정화된 제형이 필요하다.

<8> 생체 투여시, 천연 상태 또는 재조합적으로 생성된 치료 단백질, 예를 들어 인터페론 및 성장 호르몬은 혈류로부터의 신속한 제거에 의해 짧은 혈장 안정성을 나타낸다. 따라서, 상기 단백질에 의해 제공되는 치료 효과는 또한 일시적이다. 따라서, 생체 내에서의 요망되는 치료 효과를 유지하기 위해, 혈류로부터의 상기 단백질의 신속한 제거는 치료 분자가 더욱 높은 용량 또는 더욱 빈번한 횟수로 투여되어야 한다는 것을 의미한다. 그러나, 치료 단백질의 투여에 대해 투여량 계획을 증가시키는 것은 종종 환자의 주입 부위 반응, 부작용, 및 독성을 증가시킨다. 유사하게, 치료 단백질의 보다 높은 용량의 투여는 또한 일반적으로 환자의 독성 및 부작용을 증가시킨다.

<9> 화학적 컨쥬게이션을 포함하는, 제안된 치료 분자의 혈장 안정성을 증가시키기 위한 수개의 실질적 해법은 환자에게 제한된 이익을 제공한다. 일반적으로, 대부분의 경우, 이들 화학적으로 변형된 치료 분자는 여전히 환자의 현저한 주입 부위 반응, 부작용, 및 독성을 보유하면서 잦은 횟수의 투여 스케줄로 투여된다. 따라서, 천연 또는 재조합적으로 생성된 치료 분자보다 생체 내에서 보다 높은 혈장 안정성을 지니고, 덜 빈번하게 투여됨으로써 환자의 잠재적인 부작용을 감소시킬 수 있는 안정된 형태의 치료 분자가 요구된다.

<10> 발명의 개요

<11> 본 발명은 알부민 또는 알부민의 단편(일부) 또는 변이체에 융합된 치료 단백질(예를 들어, 폴리펩티드, 항체, 펩티드, 또는 이들의 단편 또는 변이체)를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 알부민 또는 알부민의 단편(일부) 또는 변이체에 융합된 치료 단백질(예를 들어, 폴리펩티드, 항체, 펩티드, 또는 이들의 단편 또는 변이체)을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나, 이로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명은 또한 치료 단백질의 저장 수명을 연장하고, 융합되지 않은 상태에 비해 치료 단백질의 혈장 안정성을 증가시키고/거나 시험관내 및/또는 생체내에서 용액(또는 약학적 조성물)에서의 치료 단백질 및/또는 이의 활성을 안정화시키기에 충분한, 알부민 또는 알부민의 단편(일부) 또는 변이체에 융합된 치료 단백질(예를 들어, 폴리펩티드, 항체, 펩티드, 또는 이들의 단편 또는 변이체)을 포함하는 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나, 이로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질이 또한 본 발명에 포함되고, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 숙주 세포, 및 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 숙주 세포를 이용하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는 방법이 포함된다.

<12> 본 발명의 바람직한 양태에서, 알부민 융합 단백질은 표 2에 기술된 것 및 상기 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<13> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 제형을 포함한다. 이러한 제형은 키트 또는 용기에 존재할 수 있다. 이러한 키트 또는 용기는 치료 단백질의 연장된 저장 수명에 관한 설명서와 함께 포장될 수 있다. 이러한 포플레이션은 환자에게 약제학적 제형을 투여하는 단계를 포함하여, 환자, 예를 들어 포유동물 또는 인간의 질병 또는 질병 증상을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키거나, 진단하는 방법에 사용될 수 있다.

<14> 다른 구체예에서, 본 발명은 질병 또는 장애를 예방하거나, 치료하거나, 개선시키는 방법을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 질병 또는 장애를 치료하거나, 예방하거나, 개선시키기에 효과적인 양의 표 1의 "치료 단백질:X"(표 1의 "적응증(Indication):Y" 단락에 나열된 치료되는 질병 또는 장애와 동일한 행)에 기술된 치료 단백질 또는 치료 단백질에 상응하는 일부(또는 이의 단편 또는 변이체)를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 치료, 예방 또는 개선이 요망되는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 표 1의 "적응증:Y" 단락에 기술된

질병 또는 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

<15> 한 구체예에서, 표 1 또는 2에 기술된 알부민 융합 단백질은 연장된 저장 수명을 지닌다.

<16> 제 2 구체예에서, 표 1 또는 2에 기술된 알부민 융합 단백질은 표 1에 기술된 상응하는 융합되지 않은 치료 분자보다 더욱 안정한다.

<17> 본 발명은, 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키기 위해 변형된 본 발명의 핵산 분자(표 1 및 2에 기술된 폴리뉴클레오티드를 포함하나 이에 제한되지 않음)를 함유하도록 변형된 트랜스제닉 유기체를 추가로 포함한다.

<18> **도면의 간단한 설명**

<19> 도 1A-D는 인간 알부민의 성숙한 형태(SEQ ID NO:1) 및 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드(SEQ ID NO:2)의 아미노산 서열을 도시한다. SEQ ID NO:2의 1 내지 1755 뉴클레오티드는 인간 알부민의 성숙한 형태(SEQ ID NO:1)를 엔코딩한다.

<20> 도 2는 pPPC0005 클로닝 벡터(ATCC 수탁된 PTA-3278)의 제한효소 지도를 도시한다.

<21> 도 3은 pSAC35 효모(*S. cerevisiae*) 발현 벡터(Sleep et al., BioTechnology 8:42(1990))의 제한효소 지도를 도시한다.

<22> 도 4는 Hs294T 흑색종 세포에서의 CID 3165(CID 3165 단백질) 및 재조합 IFN α (rIFN α)에 의해 엔코딩된 IFN 알부민 융합 단백질의 항증식 활성을 비교한다. 세포를 다양한 농도의 CID 3165 단백질 또는 rIFN α 로 배양하였고, 배양후 3일째에 BrdU 혼합에 의해 증식을 측정하였다. CID 3165 단백질은 10ng/ml 초과 농도에서 세포 증식을 측정가능한 억제율 야기하였고, 약 200ng/ml에서 50% 억제가 달성되었다. (■)=CID 3165 단백질, (◆)=rIFN α .

<23> 도 5는 ISRE-SEAP/293F 리포터 세포에서의 SEAP 활성에 대해 IFN α 알부민 융합 단백질의 다양한 희석액의 효과를 도시한다. 알부민의 IFN α 융합된 업스트림의 하나의 제조물(◆) 뿐만 아니라, 알부민의 IFN α 융합된 다운스트림의 두개의 상이한 제조물(●) 및 (■)를 시험하였다.

<24> 도 6은 치료되는 원숭이의 OAS(p41)의 mRNA 수준에 대해 작제물 2249(CID 2249)에 포함된 DNA에 의해 엔코딩된 IFN α 융합 단백질의 시간 및 용량의 효과를 도시한다(실시예 76 참조). 시간 포인트 당: 첫번째 막대 = 비히클 대조군, 두번째 막대 = 1일(정맥내) 30 μ g/kg CID 2249 단백질, 세번째 막대 = 1일(피하) 30 μ g/kg CID 2249 단백질, 네번째 막대 = 1일(피하) 300 μ g/kg CID 2249 단백질, 다섯번째 막대 = 1, 3 및 5일(피하) 40 μ g/kg 재조합 IFN α .

<25> 도 7은 만성 헤파티티스 C 제노타입 1으로 감염된 그리고 0 내지 24주 동안 리바비린과 조합하여 HSA-IFN α 2b로의 치료 후 리바비린(PEG-RBV)(비반응자)와의 조합하여 페길레이트된 인터페론 알파의 하나 이상의 치료 요법에 이전에 반응하지 않은 환자에, 중앙(median) RNA 변화(log₁₀ IU/ml)에 의해 측정된, HCV RNA 티터에서의 감소를 보여준다.

<26> 도 8A는 만성 헤파티티스 C 제노타입 1으로 감염되고, 48주 동안(예를 들어, ETR 또는 치료 반응의 끝) 리바비린과 조합하여 매 2 또는 4주마다 900 μ g, 1200 μ g, 1500 μ g 또는 1800 μ g의 HSA-IFN α 2b로의 치료 후 실시간 양적 PCR에 의해 측정된 바와 같이, HCV RNA 음성을 얻는 리바비린(비반응자)와 조합하여 인터페론 알파의 하나 이상의 치료 요법에 이전에 반응하지 않은 환자의 백분율을 보여준다.

<27> 도 8B는 48주 동안 리바비린과 조합하여 매 2 또는 4주마다 900 μ g, 1200 μ g, 1500 μ g 또는 1800 μ g의 HSA-IFN α 2b의 치료 후 ETR을 가지는 리바비린(PEG+RBV)와 조합하여 페길화된 인터페론 알파의 하나 이상의 치료 요법에 이전에 반응하지 않은 비반응자 환자의 하부군의 백분율을 보여준다.

<28> 도 8C는 48주 후속하여 24주 후속 기간 동안 리바비린과 조합하여 매 2 또는 4주마다 900 μ g, 1200 μ g, 1500 μ g 또는 1800 μ g의 HSA-IFN α 2b의 치료 후 비반응자에 의해 달성되는 전체 지속된 비물로직 반응(SVR)을 보여준다.

<29> 도 8D는 48주 후속하여 24주 후속 기간 동안 리바비린과 조합하여 매 2 또는 4주마다 900 μ g, 1200 μ g, 1500 μ g 또는 1800 μ g의 HSA-IFN α 2b의 치료 후 PEG+RBV 비반응자에 의해 달성되는 SVR 속도를 보여준다.

<30> **상세한 설명**

- <31> **정의**
- <32> 본원을 통해 사용된 특정 용어의 이해를 돕기 위해 하기의 정의를 제공한다.
- <33> 본원에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 구조 내에서 하나 이상의 치료 단백질 X(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 포함하거나 이로 구성된 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자; SEQ ID NO:Y(표 2의 칼럼 6에 기술된 바와 같음)의 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성된 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자; SEQ ID NO:X에 나타낸 바와 같은 서열을 포함하거나 이로 구성된 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자; SEQ ID NO:Z의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자; 표 2 또는 실시예에 기술된 바와 같이 생성된 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자; 본 발명의 치료 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자, 표 2에 기술된 알부민 융합 작제물에 함유된 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자, 또는 ATCC에 수탁된 알부민 융합 작제물(표 3에 기술된 바와 같음)에 포함된 뉴클레오티드 서열을 지니는 핵산 분자를 의미한다.
- <34> 본원에서 사용되는 용어 "알부민 융합 작제물"은, 예를 들어 (1) 기능적 자가-복제 벡터(서플 벡터, 발현 벡터, 통합 벡터, 및/또는 복제 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않음), (2) 전사 개시를 위한 영역(예를 들어, 프로모터 영역, 예를 들어 조절성 또는 유도성 프로모터, 항시성(constitutive) 프로모터), (3) 전사 종결을 위한 영역, (4) 선도 서열, 및 (5) 선별 마커와 같은 요소 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 구조 내에서 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 결합된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된 핵산 분자; 구조 내에서 표 2 또는 실시예에 기술된 바에 따라 생성된 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 결합된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된 핵산 분자; 또는 구조 내에서 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 결합된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된 핵산 분자를 의미한다.
- <35> 본 발명은 일반적으로 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드; 알부민 융합 단백질; 및 알부민 융합 단백질 또는 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리펩티드를 이용하여 질환 또는 장애를 치료하거나, 예방하거나, 개선시키는 방법에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "알부민 융합 단백질"은 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자에 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자의 융합에 의해 형성된 단백질을 의미한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 유전학적 융합에 의해 서로 결합된, 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함한다(즉, 알부민 융합 단백질은 치료 단백질의 모두 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 구조 내에서 알부민의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드와 결합된 핵산의 전사에 의해 생성됨). 치료 단백질 및 알부민 단백질, 알부민 융합 단백질의 일부는 알부민 융합 단백질의 "일부", "영역" 또는 "부분"으로 언급될 수 있다(예를 들어, "치료 단백질 일부" 또는 "알부민 단백질 일부"). 하나의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료 단백질 X의 또는 이의 단편 또는 변이체(치료 단백질 X의 성숙한 형태를 포함하나 이에 제한되지 않음)의 하나 이상의 분자 및 알부민 또는 이의 단편 또는 변이체(알부민의 성숙한 형태를 포함하나 이에 제한되지 않음)를 포함한다.
- <36> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 숙주 세포에 의해 가공되고, 주위 배양 배지로 분비된다. 발현을 위해 사용된 숙주의 분비 경로에서 발생하는 미성숙한 알부민 융합 단백질의 가공은 신호 펩티드 절단; 이황화 결합의 형성; 적절한 폴딩; 탄수화물의 첨가 및 가공(예를 들어, N- 및 O-형 당화); 특이적 단백질 분해 절단; 및 중합체 단백질로의 어셈블리를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 가공된 형태이다. 추가 구체예에서, "알부민 융합 단백질의 가공된 형태"는 N-말단 신호 펩티드 절단을 겪은 알부민 융합 단백질을 의미하고, 본원에서는 "성숙한 알부민 융합 단백질"을 또한 의미한다.
- <37> 여러 예에서, 본 발명의 알부민 융합 작제물을 함유하는 대표적 클론은 미국 미생물 보존센터(본원에서는 "ATCC®"로 언급됨)에 수탁되어 있다. 더욱이, 당 분야에 공지되고 본원의 다른 곳에 기술된 기술에 의해 수탁소로부터 제공된 알부민 융합 작제물을 회복시키는 것이 가능하다. ATCC®은 미합중국 20110-2209 버지니아주, 머

내서스, 유니버시티 불러바드 10801(10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA)에 위치하고 있다. ATCC® 수탁은 특허 절차의 목적상 미생물의 수탁의 국제적 승인에 대한 부타페스트 조약에 따라 이루어진다.

- <38> 한 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 또 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 표 2에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 의해 엔코딩된 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 서열이 표 2의 SEQ ID NO:Y로 나타낸 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 융합 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 변이체를 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 혈청 알부민 단백질 성분은 혈청 알부민의 성숙한 일부이다. 본 발명은 추가로 이들 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- <39> 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 변이체를 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 치료 단백질의 성숙한 일부이다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 치료 단백질의 세포외 가용성 도메인이다. 대안적 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 치료 단백질의 활성 형태이다. 본 발명은 추가로 이들 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- <40> 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편 또는 변이체, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질의 성숙한 일부 및 혈청 알부민의 성숙한 일부를 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 본 발명은 이들 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.
- <41> **치료 단백질**
- <42> 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 유전학적 융합에 의해 서로 결합되는 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체, 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성된 단백질을 엔코딩한다.
- <43> 추가의 구체예는 화학적 컨주게이션에 의해 서로 연결된 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체, 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성된 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- <44> 본원에서 사용되는 용어 "치료 단백질"은 하나 이상의 치료적 및/또는 생물학적 활성을 지니는 단백질, 폴리펩티드, 항체, 펩티드 또는 이들의 단편 또는 변이체를 의미한다. 본 발명에 의해 포함되는 치료 단백질은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항체, 및 생물체제를 포함하나 이에 제한되지 않는다(용어 펩티드, 단백질, 및 폴리펩티드는 본원에서 상호교화적으로 사용됨). 특히, 용어 "치료 단백질"은 항체 및 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 것으로 간주된다. 따라서, 본 발명의 단백질은 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체, 및/또는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 함유할 수 있다. 추가로, 용어 "치료 단백질"은 치료 단백질의 내생적으로 또는 자연적으로 발생하는 관련물을 의미할 수 있다.
- <45> "치료 활성"을 나타내는 폴리펩티드 또는 "치료적으로 활성"인 단백질은 치료 단백질, 예를 들어 본원에 기술되거나 당 분야에 널리 공지된 치료 단백질중 하나 이상과 관련하여 하나 이상의 공지된 생물학적 및/또는 치료적 활성을 지니는 폴리펩티드를 의미한다. 비제한적 예로서, "치료 단백질"은 질병, 질환 또는 장애를 치료하거나, 예방하거나, 개선시키는데 유용한 단백질이다. 비제한적인 예로서, "치료 단백질"은 특정 세포 유형(정상(예를 들어, 림프구) 또는 비정상(예를 들어, 암세포))에 특이적으로 결합함으로써, 특이적 세포 유형으로 화합물(약물, 또는 세포독성제)을 표적화하는데 사용될 수 있는 단백질이다.
- <46> 한 구체예에서, "치료 단백질" 부분은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 포함될 수 있고, 이 치료 단백질 부분

은 인터페론이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 인터페론 알파이다. 또 다른 구체예에서, "치료 단백질" 부분은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 포함될 수 있고, 이 치료 단백질 부분은 제한됨 없이 인터페론 베타, 인터페론 감마 또는 오메가 인터페론이다.

<47> 추가 구체예에서, 인터페론 하이브리드가 또한 알부민의 아미노 또는 카르복시 말단에 융합되어 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질을 형성할 수 있다. 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질은 인터페론 활성, 예를 들어 항바이러스 반응, 세포 성장의 조절, 및 면역 반응의 조절을 향상시키거나 억제할 수 있다(Lebleu et al., *PNAS USA*, 73:3107-3111 (1976); Gresser et al., *Nature*, 251:543-545 (1974); and Johnson, *Texas Reports Biol Med*, 35:357-369 (1977)). 각각의 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질이 바이러스 감염(예를 들어, 간염(예를 들어, HCV); 또는 HIV), 다발성 경화증, 또는 암을 치료하거나, 예방하거나, 개선시키기 위해 사용될 수 있다.

<48> 한 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 인터페론 하이브리드 부분은 인터페론 알파-인터페론 알파 하이브리드(본원에서는 알파-알파 하이브리드로 언급됨)를 포함한다. 예를 들어, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 알파-알파 하이브리드 부분은 인터페론 알파 D에 융합된 인터페론 알파 A로 구성되거나 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, A/D 하이브리드는 인터페론 알파 D에 대해 일반적인 BgIII 제한 부위에서 융합되고, 여기서 A/D 하이브리드의 N-말단 부분은 인터페론 알파 A의 아미노산 1-62에 해당하고, C-말단 부분은 인터페론 알파 D의 아미노산 64-166에 해당한다. 예를 들어, 이러한 A/D 하이브리드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDELLDKFCTELYQQLNDLEACVMQ
EERVGETPLMNX2DSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE (SEQ ID NO:99), 여기서, X₁은 R 또는 K
이고, X₂는 A 또는 V이다. 추가의 구체예에서, A/D 하이브리드는 일반적인 PvuIII 제한 부위에서 융합되고, 여
기서 A/D 하이브리드의 N-말단 부분은 인터페론 알파 A의 아미노산 1-91에 해당하고, C-말단 부분은 인터페론
알파 D의 아미노산 93-166에 해당한다. 예를 들어, 이러한 A/D 하이브리드는 하기의 아미노산 서열을
포함한다:

CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVMQ
EERVGETPLMNX2DSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE (SEQ ID NO:100), 여기서, X₁은 R 또는
K이고, 두번째 X₂는 A 또는 V이다. 이러한 하이브리드는 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제
4,414,510호에 추가로 기술되어 있다.

<49> 추가의 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 알파-알파 하이브리드 부분은 인터페론 알파 F
에 융합된 인터페론 알파 A로 구성되거나 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, A/F 하이브리드는 일반적인 Pvu
III 제한 부위에서 융합되고, 여기서 A/F 하이브리드의 N-말단은 인터페론 알파 A의 아미노산 1-91에 해당하고,
C-말단 부분은 인터페론 알파 F의 아미노산 93-166에 해당한다. 예를 들어, 이러한 A/F 하이브리드는 하기와
같은

아미노산 서열을

포함한다:

CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDMEACVIQE
VGVEETPLMNVDISILAVKKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSKIFQERLRRKE (SEQ ID NO:101), 여기서, X₁은 R 또는 K

이다. 이러한 하이브리드는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 미국 특허 제 4,414,510호에 추가로 기술되어
있다. 추가의 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 알파-알파 하이브리드 부분은 인터페론
알파 B에 융합된 인터페론 알파 A로 구성되거나 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, A/B 하이브리드는 일반적
인 PvuIII 제한 부위에서 융합되고, 여기서 A/B 하이브리드의 N-말단 부분은 인터페론 알파 A의 아미노산 1-91에
해당하고, C-말단 부분은 인터페론 알파 B의 아미노산 93-166에 해당한다. 예를 들어, A/B 하이브리드는 하기의

아미노산

서열을

지닌다:

CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEX2X3X
4X5QEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSLSLINLQKRLKSKE (SEQ ID NO:102), 여기서, X는 R 또
는 K이고, X₂ 내지 X₅는 SCVM 또는 VLCD이다. 이러한 하이브리드는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 미국
특허 제 4,414,510호에 추가로 기술되어 있다.

<50> 또 다른 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 인터페론 하이브리드 부분은 인터페론 베타-인
터페론 알파 하이브리드(본원에서는 베타-알파 하이브리드로 언급됨)를 포함한다. 예를 들어, 인터페론 하이브
리드 알부민 융합 단백질의 베타-알파 하이브리드 부분은 인터페론 알파 D(인터페론 알파-1으로도 언급됨)에 융
합된 인터페론 베타-1으로 구성되거나 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, 베타-1/알파 D 하이브리드가 융합되

고, 여기서 N-말단 부분은 인터페론 베타-1의 아미노산 1-73에 해당하고, C-말단 부분은 인터페론 알파 D의 아미노산 74-167에 해당한다. 예를 들어, 이러한 베타-1/알파 D 하이브리드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다: MSYNLGLFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDPIDEEIKQLQFQKEDAAITIEMLQNIFAIFRQDSSAAWDEDLDFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNXSILAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE (SEQ ID NO:103), 여기서, X는 A 또는 V이다. 이러한 하이브리드는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 미국 특허 제 4,758,428호에 추가로 기술되어 있다.

<51> 또 다른 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 인터페론 하이브리드 부분은 인터페론 알파-인터페론 베타 하이브리드(본원에서는 알파-베타 하이브리드로 언급됨)를 포함한다. 예를 들어, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 알파-베타 하이브리드 부분은 인터페론 베타-1에 융합된 인터페론 알파 D(인터페론 알파-1으로도 언급됨)로 구성되거나 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, 알파 D/베타-1 하이브리드가 융합되고, 여기서 N-말단 부분은 인터페론 알파 D의 아미노산 1-73에 해당하고, C-말단 부분은 인터페론 베타-1의 아미노산 74-166에 해당한다. 예를 들어, 알파 D/베타-1 하이브리드는 하기의 아미노산 서열을 지닌다: MCDLPETHSLDNRRITLMLLAQMSRISPSCLMDRHDGFGFPQEEFDGNQFQKAPATISVLHELQQIFNLFTTKDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHKLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN (SEQ ID NO:104). 이러한 하이브리드는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 미국 특허 제 4,758,428호에 기술되어 있다.

<52> 추가의 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 인터페론 하이브리드 부분은 알파-알파 인터페론 하이브리드, 알파-베타 인터페론 하이브리드, 및 베타-베타 인터페론 하이브리드의 추가의 조합을 포함할 수 있다. 추가의 구체예에서, 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질의 인터페론 하이브리드 부분은 인터페론 하이브리드의 아미노산 서열에 대한 돌연변이, 치환, 결실 또는 첨가를 포함하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 생산 수준을 개선시키거나, 안정성을 증가시키거나, 활성을 증가 또는 감소시키거나, 새로운 생물학적 특성을 수여하기 위해 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질에 대한 이러한 변형이 이루어질 수 있다.

<53> 상기 기술된 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질은 본 발명에 의해 포함되고, 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포 및 벡터도 포함된다. 한 구체예에서, 상기 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질은 연장된 저장 수명을 지닌다. 추가의 구체예에서, 상기 기술된 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 인터페론 하이브리드 알부민 융합 단백질은 상응하는 융합되지 않은 인터페론 하이브리드 분자보다 시험관내 및/또는 생체내에서 보다 긴 혈청 반감기 및/또는 용액(또는 약학적 조성물)에서의 보다 안정된 활성을 지닌다.

<54> 또 다른 비제한적인 예에서, "치료 단백질"은 생물학적 활성, 특히 질병, 장애 또는 감염의 치료, 예방 또는 개선에 유용한 활성을 지니는 단백질이다. 치료 단백질이 지닐 수 있는 생물학적 활성의 비제한적인 목록은 세포의 HIV-1 감염의 억제, 장 상피 세포 증식의 자극, 장 상피 세포 투과도의 감소, 인슐린 분비 자극, 기관지 확장 및 혈관확장의 유도, 알도스테론 및 레닌 분비의 억제, 혈압 조절, 신경 성장 촉진, 면역 반응 향상, 염증반응 향상, 식욕의 억제, 또는 하기의 "생물학적 활성" 단락 및/또는 표 1의 소정의 치료 단백질(컬럼 2)에 기술된 생물학적 활성중 하나를 포함한다.

<55> 한 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 카테고리 A-필로(Filo)(Ebola), 아레나(Arena)(Pichende), 카테고리 B-토가(Toga)(VEE) 또는 카테고리 C-분야(Bunya)(Punta toro), 플라비(Flavi)(Yellow fever, West Nile)로 분류된 바이러스 억제제에 사용된다. 예를 들어, HSA의 다운스트림에 융합된 IFN-알파(CID 3165 단백질)의 항바이러스 활성을 평가하기 위해 CPE 억제, 뉴트럴 레드 염색 및 바이러스 수득률 검정을 사용하였다. 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이 및 인간 피검체에서 CID 3165 단백질의 약동학 및 약역학을 평가하였다. 상기 결과는 바람직한 안전 지수와 함께 모든 RNA 바이러스에 대해 항바이러스 활성이 달성되었음을 나타낸다. CPE 검정에서 IC50 값은 <0.1 ng/ml (Punta Toro A) 내지 19 ng/ml (VEE)이었다. 시노몰구스 원숭이에서, CID 3165 단백질의 반감기는 90시간이었고, 투여후 14일까지 검출가능하였다. 인간 피검체에서, CID 3165 단백질은 안전하고, 매우 내약성이 있다. 단일 주사 투여 후의 C_{max}는 용량 비례적이었다. 500 µg 코호트에서의 평균 C_{max}는 22 ng/ml이었고, 평균 t_{1/2}는 150시간이었다. 2 내지 4주에 한번 또는 그 이상의 투여는 약동학에 의해 지지된다. C형 간염에 대한 항바이러스 반응은 단일 주사 코호트(120-500 µg)의 피검체 대부분에서 관찰되었다.

<56> 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 C형 감염 및/또는 만성 C형 간염 감염(HCV)을 지닌 환자를 치료하는데 사용된다. 백혈구 인페론으로도 공지된 인터페론 알파는 HCV에 감염된 환자의 치료를 위한 치료 표준물질이다. 용어 "인터페론 알파"는 항바이러스 활성을 지닌 고도로 상동한 관련 폴리펩티드족을 의미한다. IFN-알파-HSA 융합체의 인터페론 알파 부분은 당 분야에 공지된 임의의 인터페론 알파 또는 이의 단편으로 구성되거나

이를 포함한다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분의 비제한적인 예는 표 1의 치료 단백질 컬럼에 기술된 인터페론 알파 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 구체예에서, 인터페론 알파 부분은 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-2c, 콘센서스(consensus) 인터페론, 인터페론 알파 콘-1, 인터페론 알파-n1, 인터페론 알파-n3, 임의의 시판되는 형태의 인터페론 알파, 예를 들어 INTRON[®]A (Schering Corp., Kenilworth, N.J.), ROFERON[®]A (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), 베로포르 알파 인터페론 (Berofor alpha inteferon, Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn.), OMNIFERON[™](Viragen, Inc., Plantation, FL), MULTIFERON[™](Viragen, Inc., Plantation, FL), WELLFERON[®] (GlaxoSmithKline, London, Great Britian), INFERGEN[®](Amgen, Inc., Thousands Oaks, CA), SUMIFERON[®] (Sumitomo, Japan), BELEROFON[®](Nautilus Biotech, France), MAXY-ALPHA[™](Maxygen, Redwood City, CA / Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.)또는 임의의 정제된 인터페론 알파 제품 또는 이의 단편으로 구성되거나 이들을 포함한다. 추가 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분은 연장되거나 조절된 방출을 위해 변경되거나 제형된 인터페론 알파를 대안적으로 포함하거나, 이로 구성되어 있다. 예를 들어, 상기 인터페론 알파 부분은 제한됨 없이, 인터페론-알파-XL(Flamel Technologies, France) 및 LOCTERON[™](BioLex Therapeutics/OctoPlus, Pittsboro, NC)를 포함하는, 상업적으로 사용될 수 있는 연장된 방출 또는 조절된 방출 인터페론 알파를 대안적으로 포함하거나 이로 구성된다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분은 화학 부분의 부착에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 인터페론 알파 부분은 페길레이션(pegylation)에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분은 인터페론 알파-2a, 2b, 또는 콘센서스 인터페론의 페길화된 형태로 구성되거나 이들을 포함하고, 시판되는 페길화된 인터페론 알파, 예를 들어 PEG-INTRON[®](Schering Corp., Kenilworth, N.J.), PEGASYS[®](Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), PEG-OMNIFERON[™](Viragen, Inc., Plantation, FL) 또는 이들의 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, "IFN-알파-HSA" 융합체는 당 분야에 공지된 임의의 인터페론 알파 단백질 또는 이의 단편에 융합된 HSA를 의미한다.

<57> HCV로 감염된 환자는 HCV 감염의 치료를 위한 인터페론 요법에 대한 사전의 노출에 기초한 두개의 카테고리 내에 해당될 수 있다. "치료-미경험 환자" 또는 "미경험 환자"는 인터페론 요법으로 치료된 적이 없는 환자이다. "치료 경험 환자" 또는 "경험 환자"는 인터페론 요법으로 치료된 적이 있거나 치료되고 있는 환자이다. "미반응자"는 인터페론 요법으로 기존에 치료되었으나 치료의 제1차 종료점, 예를 들어 조기 바이러스 부하 감소(EVR) 또는 치료 종료 반응(ETR)을 충족시키는데 실패한 경험 환자이다. "재발자(Relapser)"는 인터페론 요법으로 이전에 치료받은 및 EVR 또는 ETR과 같은 치료의 달성된 제 1 종점을 가지는 그러나, 그 후 시점에서 HCV에 대해 후속하여 양성되는 경험있는 환자이다. 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, "HCV 환자"는 HCV에 감염되고, 미경험 또는 경험을 가지는 환자를 지칭한다. 추가로, 본원에서 사용되는 바와 같이, 경험이 있는 "HCV 환자"는 미반응자 또는 재발자이다.

<58> 추가로, C형 간염 바이러스는 여러 유전형으로 분류될 수 있으며, 네 개의 유전형, 즉 유전형 1, 2, 3 또는 4로 분류될 수 있고, 가장 관련 있는 것은 4이다. 일반적으로, HCV 환자를 감염시키는 C형 간염 바이러스는 단일한 유전형을 포함한다. 그러나, 간염 바이러스는 두 개 이상의 유전형의 조합을 포함할 수 있다. 게다가, C형 간염 바이러스의 유전형은 또한 공지된 HCV 유전형중 하나의 변이체일 수 있다. 추가의 구체예에서, HCV 환자의 C형 간염 바이러스는 유전형 1, 2 또는 3, 또는 이의 변이체이다. 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, "HCV"는 임의의 유전형의 C형 간염 바이러스 또는 이의 조합물 또는 변이체를 의미한다.

<59> HCV를 지닌 환자를 위한 표준 치료 요법은 항바이러스제, 예를 들어 리바비린(ribavirin)과 조합된 인터페론 알파를 이용한 치료를 포함한다. 일반적으로, 인터페론 알파는 매일, 1주일에 2회, 또는 매주 투여되고, 리바비린은 매일 적어도 24주, 48주 또는 더 긴 기간 동안 투여된다. 그러나, 최근의 연구는 또한 HCV의 치료를 위해 인터페론 알파와 기타 항바이러스제가 조합되어 사용된다. 따라서, 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 단독으로 또는 항바이러스제, 예를 들어 리바비린과 조합되어 HCV 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합은 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 초과항 바이러스제, 예컨대, 리바비린 및/또는 다른 항바이러스제와 조합하여, HCV 환자에 투여될 수 있다.

<60> 상기 언급된 바와 같이, HCV로의 환자의 치료의 표준은 매일, 일주일에 2회, 또는 매주의 투여량 계획에 따라, 항바이러스제, 예컨대 리바비린과 조합하여 인터페론으로의 치료를 포함한다. 그러나, 인터페론으로의 치료는

제한됨 없이, 플루(flu)와 같은 증상, 피곤, 불면증, 두통, 구역질, 및 우울을 포함하는, 큰 부작용과 관련되어 있으며, 이는 치료에 대한 환자의 참을성(tolerability)을 심하게 제한할 수 있다. 인터페론의 잦은 투여는 현재의 치료 표준에 의해 요구되는 것이며, 이는 감소된 삶의 질의 연장된 기간을 초래하고, 환자가 치료의 완성을 위해 행동 장애(disincentive)을 야기한다. 잦은 투여 및 감소된 삶의 질의 이 조합은 많은 수의 환자의 불연속적 치료로 이끌고 있다. 따라서, 적은 빈도수 투여 계획을 가지고, 후속하여 환자에게 삶의 질과 관련하여 적게 영향을 주고 수락에 대한 더 큰 자극을 제공하는, 개선된 치료 프로토콜에 대한 명백한 필요성이 있다.

<61> 투여 요법의 주 목적은 가능한한 빠르게 양적 한계 아래로 바이러스의 수준을 줄이고 그 다음에 치료 중 그리고 치료를 넘어서서, 바이러스 음성을 유지하는 것이다. HCV 분야에서, 4주에서 양적 한계 아래의 HCV RNA 수준으로 정의되는 빠른 바이러스 반응(rapid virologic response: RVR)은 지속된 바이러스 반응의 강력한 양성 예견자이다. 4주에서 RVR을 얻고 12주에 걸쳐 이러한 음성을 유지하는 환자는 치료 요법의 완성 후 아마 HCV RNA 음성을 유지할 것이다. 따라서, HCV RNA 음성을 4주에 달성하고, 12주에 걸쳐 지속된 바이러스 반응(SVR) 또는 치료에 대한 이러한 음성을 지속하는 HCV 환자의 수를 최대화 하는 것이 당업에 필요하다.

<62> 본 발명은 줄어든 횟수의 투여에 대한 필요성과 4주에서의 RVR을 최대화 하는 필요성을 합치는 투여 계획을 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 단 기간을 위해 더욱 자주 후속하여 장기간을 위해 덜 자주 항 바이러스 제제와 조합하거나 단독으로 인터페론의 HCV 환자에 투여하는 것을 포함하는 투여 계획을 제공한다. 특정 구체예에서, 상기 투여 계획은 단기 간을 위해 매일, 일주일에 두 번, 또는 2주일에 한번 항바이러스 제제와 조합하거나 단독으로 인터페론을 투여하고, 후속하여 장기간의 치료 프로토콜을 위해 2주에 한번, 3주에 한번 또는 4주에 한번 항바이러스 제제와 조합하여 인터페론을 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인터페론은 인터페론 알파이다. 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에 의해 포함되는 인터페론 알파는 당업에 알려진 임의의 인터페론 알파 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 오랜 작용 인터페론 알파, 예를 들어 제한됨 없이 IFN-알파-HSA 융합 단백질 또는 폐기된 인터페론이 투여된다. 본 발명에 의해 정의된 바와 같이, 인터페론 알파가 항바이러스 제제와 조합하여 또는 단독으로 투여되는 단기간은 제한됨 없이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 주 미만을 포함한다. 또한, 장기간은 제한됨 없이 적어도 16주, 적어도 20주, 적어도 24주, 적어도 30주, 적어도 36주, 적어도 40주, 적어도 46주, 적어도 48주, 적어도 50주, 적어도 60주 또는 그 초과를 포함한다. 특정 구체예에서, 인터페론 알파는 2-4주 동안 일주일에 한번 후속하여 치료 프로토콜의 기간 동안 한달에 한번 항 바이러스 제제와 조합하거나 단독으로 투여된다. 추가 특이적 구체예에서, 인터페론 알파는 항바이러스 제제와 조합하거나 단독으로 2-4주 동안 2주에 한번 후속하여 치료 프로토콜의 기간 중 한달에 한번 투여된다. 추가 구체예에서, 인터페론 알파는 단기간 동안 더 높은 또는 더 큰 용량으로 그리고 장기간 동안 더 낮은 용량으로 투여된다.

<63> 상기 기술된 바와 같이, CID 3165 단백질의 약동학은 2 내지 4주에 1회 또는 그 이상의 투여 스케줄을 지지한다. 따라서, 추가의 구체예에서, HCV 환자는 2 내지 4주에 1회로 IFN-알파-HSA 융합체 단독 또는 유효한 양의 항바이러스제와의 조합물로 투여됨으로써 치료된다. 또 다른 구체예에서, HCV 환자는 2 내지 4주에 1회로 IFN-알파-HSA 융합체와 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 초과항 바이러스제의 유효량과의 조합물로 투여됨으로써 치료된다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 4주에 1회 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 4주에 1회 이상으로 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 4주에 1회 또는 그 이상으로 HCV 환자에게 투여되고, 상기 치료는 또한 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 초과항 바이러스제의 유효량의 투여를 포함한다.

<64> 또 다른 구체예에서, HCV 환자는 24주 이상 동안 2 또는 4주마다 한번 IFN-알파-HSA 융합으로 치료된다. 추가 구체예에서, HCV 환자는 48주 동안 2 또는 4주마다 한번 IFN-알파-HSA 융합으로 치료된다. 추가 구체예에서, HCV 환자는 제노타입 1으로 감염된다. 또 다른 구체예에서, HCV 환자는 제노타입 2 또는 3으로 감염된다. 추가 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합물은 적어도, 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 항바이러스제, 예를 들어 제한됨 없이 리바비린과 조합하여 투여된다.

<65> 따라서, 추가 구체예에서, HCV 환자는 2 또는 4주의 조합으로 IFN-알파-HSA 융합물로 치료된다. 한 구체예에서, HCV 환자는 치료 요법의 초기 중에 매 2주마다 두 번 IFN-알파-HSA 융합물로 후속하여 치료의 남은 기간을 위해 IFN-알파-HSA 융합물로 4주 마다 치료된다. 추가 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합물로의 이러한 치료는 하나, 둘, 셋 또는 넷 이상의 항바이러스제, 예를 들어 제한됨 없이 리바비린과 조합된다. 추가 구체예에서, 이러한 치료는 24주 또는 48주의 전체 기간 동안 된다.

<66> 또 다른 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 HCV 요법의 유지를 위한 저용량 단독요법으로 사용될 수 있다. 추

가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 HCV의 치료를 위해 리바비린 및 하나 이상의 기타 항바이러스제와의 조합으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 또 다른 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 HCV의 치료를 위해 리바비린인 아닌 하나, 둘, 셋 또는 그 초과 항바이러스제와의 조합으로 사용될 수 있다.

<67> 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 기타 바이러스 감염 또는 HCV 감염과 조합한 다른 바이러스 감염의 치료를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 B형 간염(HBV)의 치료를 위해 사용될 수 있다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 인체 유두종 바이러스(HPV)의 치료를 위해 사용될 수 있다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합체는 모발상세포 백혈병, 악성흑색종, 소포림프종, 만성 골수 백혈병, 카포시 육종과 관련된 AIDS, 다발골수종, 또는 신세포암을 포함하나 이에 제한되지 않는 암의 치료에 사용될 수 있다.

<68> 임의의 치료 요법의 주 목적은 가능한 빨리 질병 또는 장애를 치료하고 제거하는 것이고 이 질병 또는 장애의 제거에 따른 치료의 효과를 유지하여 환자를 완치시키는 것이다. 더구나, 약에 대한 빠른 반응은 종종 치료의 최종 산물의 양성 예견자이다. 그러나, 인터페론을 가지고 질병 또는 장애를 가진 환자를 치료하는 것은 큰 부작용과 관련될 수 있다, 상기 부작용은 제한됨 없이, 감기와 같은 증상, 피곤, 불면, 두통, 구토 및 우울을 포함한다. 인터페론 치료의 이 부작용은 치료 요법의 환자 내성에 영향을 주어 많은 수의 환자 불연속 치료의 결과를 초래한다. 따라서, 이 인터페론 치료의 초기 효과 및 내성을 최대 하도록 고안되어 있는 새로운 치료 프로토콜에 대한 필요성이 있다.

<69> 본 발명은 질병 또는 장애를 가진 환자에 인터페론의 투여가 포함된 치료 프로토콜을 위해 제공되며, 여기서 상기 환자는 단기를 위해 더욱 잦은 투여 계획으로 그리고 장기간을 위한 덜 잦은 투여 계획으로 인터페론이 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 특정 기간에서 인터페론을 환자가 받는, 투여의 빈도수는 투여의 수를 지칭한다. 예를 들어, 투여 계획은 제한 없이 매일, 하루에 두 번, 일주일에 한 번, 일주일에 두 번, 일주일에 세 번, 이주일에 한 번, 3주에 한 번, 4주에 한 번 동일 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 더욱 잦은 투여 계획은 환자가 덜 잦은 투여 계획으로 투여되는 것보다 더욱 잦은 인터페론을 수용하는 투여 계획이다. 인터페론의 치료의 초기에 투여의 빈도수를 증가하면 환자에 인터페론의 "프론트-로드(front-load)"를 제공하여 초기에 효율을 최대 하는 것이다. 그 다음에 후속하여 투여의 횟수의 감소는 인터페론 치료의 결과로서 발생하는 부작용의 기간을 줄이면서 내성을 증가시키며, 치료 프로토콜의 나머지를 통해 상기 효과를 지속하도록 제공된다. 더욱 잦은 투여 계획이 유용한 기간은 치료되는 질병 또는 장애에 의존한다. 따라서, 본원에서 정의한 바와 같이, "단기간"은 환자의 질병 또는 장애를 제거함에 있어서 인터페론의 초기 효과를 최대 하도록 요구되는 기간을 지칭한다. 덜 잦은 투여를 위한 "장기간"은 인터페론의 최대 효과를 위한 기간에 후속하는 치료의 남아있는 기간을 지칭한다. 예를 들어, 단기간은 제한 없이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주를 포함할 수 있다. 더 긴 기간은 제한 없이 적어도 16주, 적어도 20주, 적어도 24주, 적어도 30주, 적어도 36주, 적어도 40주, 적어도 46주, 적어도 48주, 적어도 50주, 적어도 60주, 또는 그 초과 기간을 포함할 수 있다.

<70> 추가 구체예에서, 본 발명은 단기간을 위한 질병 또는 장애를 가진 환자에 허용가능한 안전 프로파일로 최대 용량의 인터페론의 투여, 후속하여 장기간을 위한 인터페론의 유지 용량의 투여를 포함하는 치료 프로토콜을 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 허용되는 안전 프로파일의 최대 용량의 인터페론은 환자가 허용가능한 최대 프로파일을 가지는 것으로 알려져 있는 인터페론의 가장 높은 용량이다. 특정 구체예에서, 허용가능한 안전 프로파일을 가진 최대 용량의 인터페론은 제한 없이 적어도 본 발명을 위해 제공된 표준 용량 또는 상기 표준 용량보다 적어도 한 번, 두 번, 세 번, 네 번, 다섯 번, 여섯 번, 일곱 번, 여덟 번, 아홉 번 또는 열 번이 더 높은 용량이다. 인터페론의 용량은 당업에 알려진 표준에 의해 측정될 수 있다. 비제한적 예로서, 이 용량은 중량 기초(예를 들어, $\mu\text{g/kg}$) 또는 아래에 논의되는 바와 같은 전체 제형된 농도에 기초될 수 있다. 더구나, 상기 유지 용량은 본원에서 사용되는 바와 같이, 환자에서 인터페론의 효능을 유지할 수 있는 허용가능한 안전 프로파일을 가진 상기 최대 용량에 비해 적은 용량을 지칭한다. 예를 들어, 상기 유지 용량은 제한됨 없이 인터페론의 표준 용량 또는 허용가능한 안전 프로파일을 가진 최대 용량에 비해 적어도 1/2, 1/3, 1/4, 1/8, 1배, 2배, 3배, 4배, 6배 또는 그 초과로 적은 용량을 포함할 수 있다. 본원에서 정의된 바와 같이, "단기간"은 환자의 질병 또는 장애를 제거하는 인터페론의 초기 효능을 최대 하는 허용가능한 안정 프로파일을 가진 최대 용량을 가능하게 하도록 요구되는 기간을 지칭한다. "장기간"은 인터페론의 최대 효능을 위한 기간에 후속하는 남아있는 치료 기간을 지칭한다. 예를 들어, 단기간은 제한됨 없이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주를 포함할 수 있다. 장기간은 제한됨 없이 적어도 16주, 적어도 20주, 적어도 24주, 적어도 30주, 적어도 36주, 적어도 40주, 적어도 46주, 적어도 48주, 적어도 50주, 적어도 60주, 또는 그 초과 기간을 포함할 수 있다.

<71> 추가 구체예에서, 본 발명은 단기간을 위한 질병 또는 장애가 있는 환자에게 허용가능한 안전 프로파일로 최대 용

량의 인터페론의 투여에 후속하여 장기간을 위한 유지 용량의 인터페론의 투여를 포함하는 프로토콜을 위해 제공되며, 여기서 허용가능한 안전 프로파일의 최대 용량의 인터페론은 상기 유지 용량의 인터페론보다 더욱 잦은 투여 계획으로 투여된다.

<72> 본원에서 사용되는 "치료 활성" 또는 "활성"은 효과가 인간의 요망되는 치료 결과와 일치하는 활성, 또는 비인간 포유동물 또는 기타 종 또는 유기체의 요망되는 효과를 의미할 수 있다. 치료 활성은 생체내 또는 시험관내에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 요망되는 효과는 세포 배양물에서 검정될 수 있다. 이러한 시험관내 또는 세포 배양 검정은 당 분야에 기술된 바와 같이 다수의 치료 단백질에 대해 통상적으로 이용가능하다. 검정의 예는 본원의 실시예 부분 또는 표 1의 "예시적 활성 검정" 컬럼(컬럼 3)에 기술된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

<73> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 예를 들어 세포 표면 및 분비 단백질에 해당하는 치료 단백질은 하나 이상의 올리고당 그룹의 부착에 의해 종종 변형된다. 당화로 언급되는 변형은 단백질의 물리적 특성에 극적으로 영향을 줄 수 있고, 단백질 안정성, 분비 및 국소화에 중요할 수 있다. 당화는 폴리펩티드 백본을 따라 특정 위치에서 발생한다. 보통, 세린 또는 트레오닌 잔기에 부착되는 O-형 올리고당으로 특징되는 당화; 및 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 서열에 위치한 아스파라긴 잔기에 부착되는 N-형 올리고당으로 특징되는 당화의 두개의 주요한 유형의 당화가 있고, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. N-아세틸뉴라민산(시알산으로도 공지됨)은 보통 N-형 및 O-형 올리고당 둘 모두의 말단 잔기이다. 단백질 구조 및 세포 유형과 같은 변수는 다양한 당화 부위에서의 사슬 내의 탄수화물 단위의 수 및 특성에 영향을 준다. 당화 이성질체는 또한 소정의 세포 유형 내의 동일한 부위에서 일반적이다.

<74> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질, 및 이의 유사체 및 변이체는 이들이 발현되는 숙주 세포에 의하거나, 이들의 발현의 기타 상태로 인해, 하나 이상의 부위에서의 당화가 이들의 핵산 서열의 조작의 결과로서 변경되어 변형될 수 있다. 예를 들어, 당화 이성질체는, 예를 들어 아미노산 잔기의 치환 및 결실, 예를 들어 아스파라긴에 대한 글루타민의 치환에 의해 당화 부위를 제거하거나 도입시킴으로써 생성될 수 있거나, 당화되지 않은 재조합 단백질은 이들을 당화시키지 않는 숙주 세포, 예를 들어 대장균 또는 당화-결핍 효모에서 단백질을 발현시킴으로써 생성될 수 있다. 이들 방법은 하기에 보다 상세히 기술되어 있고, 당 분야에 공지되어 있다.

<75> 치료 단백질, 특히 표 1에 기술된 치료 단백질, 및 이들의 핵산 및 아미노산 서열은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 화학약품 초록 서비스 데이터베이스즈(Cheical Abstracts Services Databases)(예를 들어, CAS 레지스트리), 유전자은행(GenBank)과 같은 공개 데이터베이스, 및 데이터베이스에 제공된 서브스크립션(subscription), 예를 들어 GenSeq(예를 들어, Derwent)에서 이용가능하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 유도하기 위해 사용될 수 있는 치료 단백질의 예시적 뉴클레오티드 서열은 표 2의 컬럼 7의 "SEQ ID NO:X"에 제시되어 있다. SEQ ID NO:X으로 나타낸 서열은 소정의 치료 단백질을 엔코딩하는 야생형 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 전장 또는 성숙)이거나, 몇몇 예에서 상기 서열은 야생형 폴리뉴클레오티드 서열의 변이체(예를 들어, 야생형 치료 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드(여기서, 폴리뉴클레오티드의 DNA 서열은, 예를 들어 특정 종에서의 발현에 최적화되었음); 야생형 치료 단백질의 변이체(즉, 부위 특이적 돌연변이; 대립 돌연변이)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드)일 수 있다. 동렬에 기술된 작제물을 유도하기 위해 SEQ ID NO:X로서 나타낸 서열을 사용하는 것은 당업자의 능력에 포함된다. 예를 들어, SEQ ID NO:X가 전장의 단백질에 해당하나, 상기 단백질의 일부만이 특정 CD를 생성시키기 위해 사용되는 경우, 특정 단편을 증폭시키기 위해 분자 생물학적 기술, 예를 들어 PCR을 이용하고, 적절한 벡터로 이를 클로닝시키는 것은 당업자의 기술내에 해당한다.

<76> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 일부에 해당하는 추가의 치료 단백질은 표 1의 "치료 단백질 X" 컬럼(컬럼 1)에 기술된 치료 단백질 또는 펩티드, 또는 이의 단편 또는 변이체중 하나를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<77> 표 1은 본 발명의 알부민 융합 단백질, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되는 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 일부에 해당하는 치료 단백질의 비제한적인 목록을 제공한다. 첫번째 컬럼의 "치료 단백질 X"는 치료 단백질 분자 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성된 단백질의 학명 및 상표명을 함유하는 삽입구의 뒤에 올 수 있는 치료 단백질 분자를 기술한다. 본원에서 사용되는 "치료 단백질 X"는 개별적 치료 단백질 분자를 의미하거나, 본 컬럼에 기술된 소정의 치료 단백질 분자와 관련된 치료 단백질의 전체 그룹을 의미할 수 있다. "생물학적 활성" 컬럼(컬럼 2)은 치료 단백질 분자와 관련된 생물학적 활성을 기술한다. 컬럼 3의 "예시적 활성 검정"은 치료 단백질:X 또는 치료 단백질 X(또는 이의 단편) 부분을 포함하는 알부민 용

합 단백질의 치료적 및/또는 생물학적 활성을 시험하기 위해 사용될 수 있는 검정을 기술하는 참조를 제공한다. "예시적 활성 검정" 컬럼에 인용된 각각의 참조는, 특히 표 1의 "생물학적 활성"에 기술된 생물학적 활성을 검정하기 위한 참조(예를 들어, 본원의 방법 섹션)에 기술된 각각의 활성 검정의 기술에 대해서, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된다. 네번째 컬럼 "적응증:Y"는 치료 단백질 X 또는 치료 단백질 X(또는 이의 단편) 부분을 포함하는 알부민 융합 단백질에 의해 치료, 예방, 진단, 및/또는 개선될 수 있는 질병, 장애, 적응증 및/또는 질환을 기술한다. "작제물 ID" 컬럼(컬럼 5)은 참조된 치료 단백질 X(또는 이의 단편) 부분을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 표 2에 기술된 예시적 알부민 융합 작제물에 대한 링크를 제공한다.

표 1

치료 단백질:X	생물학적 활성	예시적 활성 분석	Indication:Y	Construct ID	치료 단백질:Z
인터페론 알파(인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-2a; 계조합; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 페그인터페론 알파-2b; 리바비린 및 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 공동(consensus); YM 643; C1F1; 인터페론-알파 공동; 계조합 메티오닐 공동 인터페론; 계조합 공동 인터페론; CGP 35269; RO 253036; RO 258310; INTRON A; PEG-INTRON; OIF; OMNIFERON; PEG-OMNIFERON; VELDONA; PEG-REBETRON; ROFERON A; WELLFERON;	일 범위의 세포 반응 예를 들어 항바이러스, 항증식성, 항종양 및 면역조절 활성을 제공한다; 두 효소: 단백질 키나제 및 올리고뉴클레오타이드 합성효소의 생성을 자극한다.	항-바이러스 분석: Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferons. J. Virol. 37(2):755-8; 항-증식 분석: Gao Y, et al. (1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11):7305-13.	만성 감염; 감염 B; 만성 감염 B; 감염 C; 만성 감염 C; 감염 D; 만성 감염 D; 인유두종 바이러스; 단순포진바이러스 감염(Herpes Simplex Virus Infection); 외부형 침구 콘딜로마(External Condylomata Acuminata); 및 HIV의 감염. 다른 장애 및 질병은 종양학; 암; 종양성종양(Solid Tumors); 흑색종; 악성 흑색종(Malignant Melanoma); 신암(예를 들어, 신세포암(Renal Cancer (e.g., Renal Cell Carcinoma); 폐암 (예컨대, 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암) 결장암; 유방암; 간암; 전립선암; 방광암; 위암; 육종; AIDS-관련된 카포시 육종(Related Kaposi's Sarcoma); 림프종; T 세포 림프종; 피부의 T-세포 림프종; 비호지킨림프종(Non-Hodgkin's Lymphoma); 뇌암(Brain Cancer); 교종(Glioma); 다형성 교모세포종(Glioblastoma Multiforme); 경부의 이행성증(Cervical Dysplasia); 백혈병(Leukemia); 백혈병전구상태(Prelukemia); 골수 장애(Bone Marrow Disorders); 뼈 장애; 모발상세포백혈병; 만성 미엘로제너스 백혈병(Myelogenous Leukemia); 혈액암(Hematological Malignancies); 혈액학적 장애(Hematological Disorders); 다발성	2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 4296.	참조 표 2, SEQ ID NO:Z 특별한 구조를 위해

<78>

표 1

치료 단백질:X	생물학적 활성	예시적 활성 분석	Indication:Y	Construct ID	치료 단백질:Z
ALFERON N/LDO; REBETRON; ALTEMOL; VIRAFERONPEG; PEGASYS; VIRAFERON; VIRAFON; AMPLIGEN; INFERGEN; INFAREX; ORAGEN)			골수종(Multiple Myeloma); 세균 감염; 화학 방호(Chemoprotection); 혈소판감소증(Thrombocytopenia); 다발성 경화증(Multiple Sclerosis); 폐섬유증(Pulmonary Fibrosis); 연령 관련성 황반 변성(Age-Related Macular Degeneration); 황반부 변성(Macular Degeneration); 크론병(Crohn's Disease); 신경계장애; 궤양성; 류머티스관절염(Ulcerative Colitis); 폐양성 대장염(Osteoporosis), 오스테오포로시스(Osteopenia), 오스테오클라스트계세포증(Osteoclastogenesis); 피브로미알지아(Fibromyalgia); 쇼그렌증후군(Sjogren's Syndrome); 만성 피로 증후군; 열병; 헤파지피버(Hemorrhagic Fever); 바이러스성 헤파지피버; 고혈당증; 당뇨병; 요붕증(Diabetes Insipidus); 진성 당뇨병; 1형 당뇨병; 2형 당뇨병; 인슐린 내성; 인슐린 결핍; 고지혈증; 케톤과잉혈증; 인슐린비의존성 당뇨병(NIDDM); 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM); 당뇨병과 관련된 질병. 예를 들어 비제한적으로 비만, 심장병, 고혈당증, 감염, 망막증, 및/또는 귀염; 대사 장애; 면역 장애; 비만; 폐관 장애; 체중 억제; 식욕		

<79>

표 1

치료 단백질:X	생물학적 활성	예시적 활성 분석	Indication:Y	Construct ID	치료 단백질:Z
			역제; 신드롬 X. 바이러스성 감염은 또한 심한 급성 호흡 중후군(Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)) 및 다른 코로나바이러스 감염; 필로바이러스(filoviruses), 예를 들어 비제한적으로 에볼라 바이러스(Ebola viruses) 및 마버그 바이러스(Marburg virus); 아레나바이러스(Arenaviruses), 예를 들어 비제한적으로 피첸데 바이러스(Pichende virus), 라사 바이러스(Lassa virus), 주닌 바이러스(Junin virus), 마추포 바이러스(Machupo virus), 구아나리토 바이러스(Guanarito virus); 및 림포사이틱 코리오펜링티스 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)); 분야바이러스(Bunyaviruses), 예를 들어 비제한적으로 폰타 토로 바이러스(Punta toro virus), 크리민-콩고 헤모라지크 피버 바이러스(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus), 등애매개열바이러스(sandfly fever viruses), 리프트 계곡열바이러스(Rift Valley fever virus), 라 크로세 바이러스(La Crosse virus), 및 한타바이러스(hantaviruses);		

<80>

표 1

치료 단백질:X	생물학적 활성	예시적 활성 분석	Indication:Y	Construct ID	치료 단백질:Z
			플라비바이러스(Flaviviruses), 예를 들어 비제한적으로 황열, 반지 바이러스(Banji virus), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), Dengue 바이러스(Dengue viruses), 일본 뇌염 바이러스, 킨트기매개체염, 옴스크 출혈열바이러스(Omsk Hemorrhagic Fever), 및 키아사누 포레스트 질병 바이러스(Kyasaur Forest Disease virus); 토포가바이러스(Togaviruses), 예를 들어 비제한적으로 베네주엘라(Venezuelan), 이스턴(eastern), 및 웨스턴 말 뇌염 바이러스(western equine encephalitis viruses), 로스 리버 바이러스(Ross River virus), 및 루벨라 바이러스(Rubella virus); 오토록스 바이러스(Orthopox viruses), 예를 들어 비제한적으로 백신니아(Vaccinia), 카우폭스(Cowpox), 스몰록스(Smallpox), 및 몽키폭스(Monkeypox); 포진성바이러스(Herpesviruses); FluA/B; 호흡기 신시티알 바이러스(Respiratory Sincytial virus(RSV)); 파라플루(parafu); 홍역(measles); 리노바이러스(rhinoviruses); 아데노바이러스; 셀리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus); 바이러스성		

<81>

표 1

치료 단백질:X	생물학적 활성	예시적 활성 분석	Indication:Y	Construct ID	치료 단백질:Z
			헤모라지크 피버(Viral Hemorrhagic fevers); 라보바이러스(Rhabdoviruses); 파라믹소바이러스(Paramyxoviruses), 예를 들어 비제한적으로 니파 바이러스 및 헨드라 바이러스; 및 다른 바이러스성 제제(미국 Centers for Disease Control and Prevention에서 높은 우선적 질병 제제로서 식별됨) (주, Category A, B, 및 C 제제; 참조, 예를 들어, Moran, Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20(2):311-30 and Darling et al., Emerg. Med. Clin. North Am. 2002;20(2):273-309). 상기 질병, 장애 및 감염의 임의의 조합은 치료될 수 있다.		

<82>

표 2

융합 No.	구조 ID	구조 명	설명	발현 벡터	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	Leader 서열
1	3422	pSAC35:APsp.HSA.IFNa	산 포스파타제 신호 펩티드에 후속하여 성숙한 HSA 및 IFNa.	pSAC35	128	117	139	150	151	산 포스파타제
2	3423	pSAC35:INVsp.HSA.IFNa	역전효소 신호 펩티드 후속하여 성숙한 HSA 및 IFNa.	pSAC35	129	118	140	152	153	역전효소
3	3424	pSAC35:KTsp.HSA.IFNa	킬러 독신 신호 펩티드 후속하여 성숙한 HSA 및 IFNa.	pSAC35	130	119	141	154	155	킬러 독신
4	2249	pSAC35:IFNa2-HSA 또한 pSAC23:IFNa2-HSA 로 명명	성숙한 IFNa2 는 성숙한 HSA 의 상류 및 HSA/kex2 리더 서열의 하류를 융합	pSAC35	131	120	142	156	157	HSA/kex2
5	2343	pSAC35:INV-IFNa2.HSA	인터페론 알파 2 성숙한 HSA 의 상류 및 역전효소 신호 펩티드의 하류를 융합	pSAC35	132	121	143	158	159	역전효소
6	2366	pSAC35:MAF-IFNa2.HSA	성숙한 IFNa2 은 성숙한 HSA 의 상류 및 이스트 메이팅 인자 알파 리더 서열의 하류를 융합	pSAC35	133	122	144	160	161	MAF-1
7	2381	pC4:HSA-IFNa2(C17-E181)	IFNa2 의 아미노산 C17 내지 E181 (SEQ ID NO:273 의 아미노산 C1 내지 E165 으로 도시된 단편)는 HSA 의 하류를 융합	pC4	134	123	145	162	163	HSA

<83>

표 2

융합 No.	구조 ID	구조 명	설명	발현 벡터	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	Leader 서열
8	2382	pC4:IFNa2-HSA	IFNa2 는 성숙한 HSA 의 상류를 융합	pC4	135	124	146	164	165	Native IFNa2 리더
9	2410	pSAC35:INV:IFNa-HSA	성숙한 IFNa2 역전효소 신호 펩티드 및 성숙한 HSA 의 상류 융합	pSAC35	136	125	147	166	167	역전효소
10	3165	pSAC35:HSA.IFNa 또한 CID 3165, pSAC35:HSA.INFa 로 명명	HSA 는 IFNa 의 상류 및 HSA/kex2 리더의 하류 융합	pSAC35	137	126	148	없음	없음	HSA/kex2
11	3476	pSAC35:G19Rsp.HSA.IFNa	변경된 HSA/kex2 신호 서열 후속하여 성숙한 HSA 후속하여 INF-알파.	pSAC35	138	127	149	168	169	변경된 HSA/Kex2
12	3960	pSAC35:HSA.IFN알파 2a	HSA/Kex2 신호 서열 후속하여 C-말단에 인터페론 알파 2a에 융합된 성숙한 HSA	pSAC35	171	170	172	173	174	HSA/Kex2
13	4290	pSAC35:HSA(C34S).INFa	HSA/Kex-2 신호 서열 후속하여 C-말단에 성숙한 인터페론 알파에 융합된 변이 성숙한 HSA (C34S의 성숙한 HSA)	pSAC35	180	175	185	없음	없음	HSA/Kex-2

<84>

표 2

융합 No.	구조 ID	구조 명	설명	발현 벡터	SEQ ID NO:Y	SEQ ID NO:X	SEQ ID NO:Z	SEQ ID NO:A	SEQ ID NO:B	Leader 서열
14	4291	pSAC35:HSA.INFa(C5 86S)	HSA/Kex-2 신호 서열 후속하여 C-말단에 변이 성숙한 인터페론 알파(C1S의 성숙한 IFNa)에 융합된 성숙한 HSA	pSAC35	181	176	186	없음	없음	HSA/Kex-2
15	4292	pSAC35:HSA.INFa(C6 14S)	HSA/Kex-2 신호 서열 후속하여 C-말단에 변이 성숙한 인터페론 알파(C29S의 성숙한 IFNa)에 융합된 성숙한 HSA	pSAC35	182	177	187	없음	없음	HSA/Kex-2
16	4295	pSAC35:HSA.INFa(C6 83S)	HSA/Kex-2 신호 서열 후속하여 C-말단에 변이 성숙한 인터페론 알파 (C98S의 성숙한 IFNa)에 융합된 성숙한 HSA	pSAC35	183	178	188	없음	없음	HSA/Kex-2
17	4296	pSAC35:HSA.INFa(C7 23S)	HSA/Kex-2 신호 서열 후속하여 C-말단에 변이 성숙한 인터페론 알파 (C138S의 성숙한 IFNa)에 융합된 성숙한 HSA	pSAC35	184	179	189	없음	없음	HSA/Kex-2

<85>

<86>

표 2는 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 목록을 제공한다. 첫 번째 컬럼인 "융합 번호"는 각각의 폴리뉴클레오티드에 대한 융합 번호를 제공한다. 컬럼 2인 "작제물 ID"는 본 발명의 각각의 폴리뉴클레오티드에 대한 독특한 수의 식별자를 제공한다. 작제물 ID는 표 1의 해당하는 열에 나열된 소정의 치료 단백질:X에 해당하는 치료 단백질 부분을 포함하거나 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 확인하기 위해 사용될 수 있고, 여기서 작제물 ID는 컬럼 5에 제시된다. "작제물명" 컬럼(컬럼 3)은 소정의 알부민 융합 작제물 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<87>

표 2의 네 번째 컬럼인 "기재사항"은 소정의 알부민 융합 작제물의 일반적 기재사항을 제공하고, 다섯 번째 컬럼인 "발현 벡터"는 소정의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 폴리뉴클레오티드가 클로닝되는 벡터를 기술한다. 벡터는 당업에 공지되어 있고, 시판되거나 다른 곳에 기술되어 있다. 예를 들어, 실시예에 기술된 바와 같이, (1) 소정의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, (2) 선도 서열, (3) 프로모터 영역, 및 (4) 전사 종결자 중 하나 이상을 포함하거나 이로 구성된 "발현 카세트"는 편리한 클로닝 벡터로 어셈블링된 후, 예를 들어 효모 발현 벡터 또는 포유동물 발현 벡터를 포함하는 발현 벡터와 같은 대안적 벡터로 이동될 수 있다. 한 구체예에서, 효모(S.cervisiae)에서의 발현을 위해, 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 발현 카세트를 pSAC35로 클로닝된다. 또 다른 구체예에서, CHO 세포에서의 발현을 위해, 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 발현 카세트가 pC4로 클로닝된다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 폴리뉴클레오티드는 pC4:HSA로 클로닝된다. 추가의 구체예에서, NSO 세포에서의 발현을 위해, 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 발현 카세트는 pEE12로 클로닝된다. 기타 유용한 클로닝 및/또는 발현 벡터는 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 범위 내에 속한다.

<88>

컬럼 6의 "SEQ ID NO:Y"은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 전장 아미노산 서열을 제공한다. 대부분의 예에서, SEQ ID NO:Y는 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 가공되지 않은 형태를 나타내는데, 다시 말하면 SEQ ID NO:Y는 신호 서열, HSA 부분, 및 특정 작제물에 의해 엔코딩되는 모든 치료 부분을 나타낸다. 본 발명에 의해 특히 고려되는 것은 SEQ ID NO:Y를 엔코딩하는 모든 폴리뉴클레오티드이다. 이들 폴리뉴클레오티드가 세포로부터 엔코딩된 단백질을 발현시키는데 사용되는 경우, 세포의 자연 분비 및 가공 단계는 표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 나열된 신호 서열이 결여된 단백질을 생성시킨다. 나열된 신호 서열의 특정 아미노산 서열은 본 발명의 명세서에 후에 제시되거나 당 분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 일부 구체예는 세포(표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 제시된 선도 서열이 결핍된 세포)에 의해 생성된 알부민 융합 단백질을 포함한다. 또한, 본 발명의 구체예에 포함되는 것은 표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 나열된 특정 선도 서열이 없는 SEQ ID NO:Y를 포함하는 폴리펩티드이다. 본 발명의 조성물은 또한, 약학적 조성물을 포함하는, 이러한 두 개의 구체예를 포함하는 조성물을 포함한다. 더욱이, 가공된 알부민 융합 단백질의 분비를 촉진시키기 위해 2의 컬럼 4 및/또는 11에 나열된

신호 서열을 본 명세서에 후에 기술되는 것과 같은 다양한 신호 서열로 대체하는 것은 당업자의 능력에 속한다.

<89> 일곱번째 컬럼 "SEQ ID NO:X"는 소정의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 유래될 수 있는 선조 핵산 서열을 제공한다. 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 유도될 수 있는 선조 핵산 서열은 표 1의 치료 단백질을 엔코딩하는 야생형 유전자 서열을 포함한다. 대안적 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 유도될 수 있는 선조 핵산 서열은 표 1에 도시된 치료 단백질을 엔코딩하는 야생형 유전자 서열의 변이체 또는 유도체, 예를 들어 치료 단백질을 엔코딩하는 야생형 유전자 서열의 합성 코돈 최적화된 변이체를 포함한다.

<90> 여덟 번째 컬럼 "SEQ ID NO:Z"는 선조 핵산 서열(SEQ ID NO:X)의 예상 전사를 제공한다. 이러한 선조 서열은 특정 작제물 선조 단백질의 성숙한 부분, 야생형 단백질의 변이체 또는 단편, 또는 기술된 작제물을 생성하기 위해 사용될 수 있는 인공 서열을 유도하기 위해 사용되는 전장의 선조 단백질일 수 있다. 당업자는 소정의 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 아미노산 잔기가 치료 단백질에 의해 제공되었는지 결정하기 위해 SEQ ID NO:Z에 도시된 아미노산 서열을 이용할 수 있다. 더욱이, 동렬에 기술된 작제물을 유도하기 위해 SEQ ID NO:Z에 도시된 서열을 사용하는 것은 당업자의 능력에 속한다. 예를 들어, SEQ ID NO:Z가 전장의 단백질에 해당하나 단백질의 일부만이 특정 CID 생성시키기 위해 사용되는 경우, 특정 단편을 증폭시키기 위해 분자 생물학적 기술, 예를 들어 PCR을 이용하고, 적당한 벡터로 이를 클로닝시키는 것은 당업자의 기술에 속한다.

<91> 컬럼 9 및 10에 각각 제공된 증폭 프라이머인 "SEQ ID NO:A" 및 "SEQ ID NO:B"는 소정의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하거나 이로 구성된 폴리뉴클레오티드를 생성하기 위해 사용되는 예시적 프라이머이다. 본 발명의 한 구체예에서, 컬럼 9 및/또는 10(SEQ ID NOS:A 및/또는 B)에 도시된 서열을 지니는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 주형 DNA로서 상응하는 열의 컬럼 7에 제공된 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:X)을 포함하거나 이로 구성된 핵산 분자를 이용하여 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 PCR 증폭시키기 위해 사용된다. PCR 방법은 당 분야에 잘 확립되어 있다. 추가의 유용한 프라이머 서열은 당업자에 의해 용이하게 구상되고 이용될 수 있다.

<92> 대안적 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 프라이머는 주형 DNA 서열 내에 돌연변이를 생성시키기 위해 오버래핑(overlapping) PCR 반응에 사용될 수 있다. PCR 방법은 당 분야에 공지되어 있다.

<93> 표 3에 나타난 바와 같이, 본 명세서에 기술된 특정 알부민 융합 작제물은 ATCC®에 수탁되었다.

<94> **표 3**

작제물 ID	작제물 이름	ATCC Deposit 번호/날짜
2249	pSAC35:IFNa2-HSA 또한 pSAC23:IFNa2-HSA 로 명명	PTA-3763 Oct. 4, 2001
2343	pSAC35.INV-IFNA2.HSA	PTA-3940 Dec. 19, 2001
2381	pC4:HSA-IFNa2(C17-E181)	PTA-3942 Dec. 19, 2001
2382	pC4:IFNa2-HSA	PTA-3939 Dec. 19, 2001
3165	pSAC35:HSA.IFNa 또한 CID 3165, pSAC35:HSA.INFa 으로 명명	PTA-4670 Sept. 16, 2002

<95> 당업에 공지되고 본원의 다른 곳(예를 들어, 실시예 10)에 기술된 기술에 의해 수탁으로부터 소정의 알부민 융합 작제물을 회수하는 것이 가능하다. ATCC는 미국 버지니아주 20110-2209 매너서스 10801 유니버시티 불러바드에 위치하고 있다. ATCC® 수탁은 특허 절차의 목적상 미생물의 수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약에 따라 이루어진다.

- <97> 본 발명의 추가의 구체예에서, (1) 소정의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, (2) 선도 서열, (3) 프로모터 영역, 및 (4) 전사 종결자중 하나 이상을 포함하거나 이로 구성된 "발현 카세트"는 한 벡터에서 또 다른 벡터로 이동되거나 "서브클로닝"될 수 있다. 서브클로닝되는 단편은 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 PCR 증폭(예를 들어, SEQ ID NO:A 또는 B에 도시된 서열을 지니는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용함), 및/또는 제한 효소 분해에 의해 생성될 수 있다.
- <98> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 표 1의 해당하는 열에 나열된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질의 치료 활성 및/또는 생물학적 활성에 해당하는 치료 활성 및/또는 생물학적 활성을 지닐 수 있다. 추가 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적으로 활성인 단백질 부분은 표 2의 SEQ ID NO:X에 도시된 서열에 의해 엔코딩된 단백질의 단편 또는 변이체이고, 치료 단백질에 해당하는 치료 활성 및/또는 생물학적 활성을 지닐 수 있다.
- <99> 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 단편 및 변이체
- <100> **단편**
- <101> 본 발명은 추가로 표 1에 기술된 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 알부민 본 발명의 알부민 융합 단백질의 단편에 관한 것이다.
- <102> 본 발명은 또한 표 1에 기술된 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 단편을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- <103> 단백질의 N-말단으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실이 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 하나 이상의 생물학적 기능이 변형되거나 손실되더라도, 기타 치료 활성 및/또는 기능성 활성(예를 들어, 생물학적 활성, 다중화 능력, 리간드에 결합하는 능력)은 여전히 유지될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 완전하거나 성숙한 형태를 인지하는 항체를 유도하고/하거나 이에 결합하기 위한 N-말단 결실을 지닌 폴리펩티드의 능력은 완전한 폴리펩티드 잔기의 과반수 이하가 N-말단으로부터 제거되는 경우 유지될 수 있다. 완전한 폴리펩티드의 N-말단 잔기가 결핍된 특정 폴리펩티드가 상기 면역학적 활성을 유지하는지의 여부는 본원에 기술되고 당 분야에 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 다수의 N-말단 아미노산 잔기가 결실된 뮤테인이 몇몇 생물학적 또는 면역학적 활성을 보유할 수 있는 것이 바람직하다. 사실, 6개의 아미노산만큼 적은 아미노산으로 구성된 펩티드가 종종 면역 반응을 야기시킬 수 있다.
- <104> 따라서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질의 단편은 전장 단백질뿐만 아니라 참조 폴리펩티드의 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드(즉, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분)를 포함한다. 특히, N-말단 결실은 일반식 m 대 q 로 기술될 수 있고, 여기서 q 는 참조 폴리펩티드(예를 들어, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 또는 표 2에 기술된 폴리펩티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분)에서의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이고, m 은 2 내지 $q-6$ 중 임의의 정수로 정의된다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.
- <105> 추가로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 해당하는 혈청 알부민 폴리펩티드의 단편은 전장 단백질뿐만 아니라 참조 폴리펩티드(즉, 혈청 알부민, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 혈청 알부민 부분)아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, N-말단 결실은 일반식 m 대 585로 기술될 수 있고, 여기서 585는 성숙한 인간 혈청 알부민(SEQ ID NO:1)의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이고, m 은 2 내지 579중 임의의 정수로 정의된다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다. 추가의 구체예에서, N-말단 결실은 일반식 m 대 609로 기술될 수 있고, 여기서 609는 전장의 인간 혈청 알부민(SEQ ID NO:3)의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이고, m 은 2 내지 603중 임의의 정수로 정의된다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.
- <106> 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 단편은 전장의 알부민 융합 단백질뿐만 아니라 알부민 융합 단백질(예를 들어, 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질; 또는 표 2의 컬럼 6에 기술된 아미노산 서열을 지니는 알부민 융합 단백질)의 아미노말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 특히, N-말단 결실은 일반식 m 대 q 로 기술될 수 있고, 여기서 q 는 알부민 융합 단백질의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이고, m 은 2 내지 $q-6$ 중 임의의 정수로 정의된다. 이

러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<107> 또한, 상기에서 언급된 바와 같이, 참조 폴리펩티드(예를 들어, 치료 단백질; 혈청 알부민 단백질; 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질)의 N-말단 또는 C-말단으로부터 하나 이상의 아미노산이 결실되어 단백질의 하나 이상의 생물학적 기능이 변형되거나 손실되더라도, 기타 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성, 다중화 능력, 리간드에 결합하는 능력) 및/또는 치료 활성은 여전히 유지될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 완전하거나 성숙한 형태를 인지하는 항체를 유도하고/하거나 결합하기 위한 C-말단 결실을 지니는 폴리펩티드의 능력은 일반적으로 완전하거나 성숙한 폴리펩티드의 잔기의 과반수 이하가 C-말단으로부터 제거되는 경우에 유지될 것이다. 참조 펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단 잔기가 결핍된 특정 폴리펩티드가 치료 활성을 유지하는지의 여부는 당 분야에 기술되고/되거나 달리 당 분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<108> 본 발명은 추가로 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분(예를 들어, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분)에 해당하는 치료 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드를 제공한다. 특히, C-말단 결실은 일반식 1 대 n 으로 기술될 수 있고, 여기서 n 은 6 내지 $q-1$ 중 임의의 정수이고, q 는 참조 폴리펩티드(예를 들어, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분)의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<109> 추가로, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분(예를 들어, 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 혈청 알부민 또는 알부민 단백질 부분에 해당하는 알부민 단백질의 아미노산 서열의 카르복시 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드를 제공한다. 특히, C-말단 결실은 일반식 1 대 n 으로 기술될 수 있고, 여기서, n 은 6 내지 584중 임의의 정수이고, 584는 성숙한 인간 혈청 알부민(SEQ ID NO:1)의 아미노산 잔기의 전체 수-1을 나타내는 정수이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다. 특히, C-말단 결실은 일반식 1 대 n 으로 기술될 수 있고, 여기서 n 은 6 내지 608중 임의의 정수이고, 608은 혈청 알부민(SEQ ID NO:3)의 아미노산 잔기의 전체 수-1을 나타내는 정수이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<110> 더구나, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 카르복시 말단으로부터 하나 이상의 잔기가 결실된 폴리펩티드를 제공한다. 특히, C-말단 결실은 일반식 1 대 n 으로 기술될 수 있고, 여기서 q 는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 아미노산 잔기의 전체 수를 나타내는 정수이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<111> 추가로, 상기 기술된 N- 또는 C-말단 결실중 어떠한 것도 N- 및 C-말단 결실된 참조 폴리펩티드를 생성하기 위해 조합될 수 있다. 본 발명은 또한 아미노 및 카르복실 말단 둘 모두로부터 하나 이상의 아미노산이 결실된 폴리펩티드를 제공하고, 이는 참조 폴리펩티드(예를 들어, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 치료 단백질 부분, 또는 혈청 알부민(예를 들어, SEQ ID NO:1), 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 단백질 부분, 또는 알부민 융합 단백질, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질)의 잔기 m 내지 n 을 지니는 것으로 일반적으로 기술될 수 있고, 여기서 n 및 m 은 상기 기술된 바와 같은 정수이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<112> 본 출원은 또한 본원에 나열된 참조 폴리펩티드(예를 들어, 표 1에 언급된 치료 단백질, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 치료 단백질 부분, 또는 혈청 알부민(예를 들어, SEQ ID NO: 1), 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분, 또는 표 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 단백질 부분, 또는 알부민 융합 단백질, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질) 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%로 동일한 폴리펩티드 또는 이의 단편을 함유하는 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 출원은 상기 기술된 바와 같은 N- 및 C-말단 결실의 아미노산 서열을 지니는 참조 폴리펩티드와 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한 폴리펩티드를 포함하는 단백질에 관한 것이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

- <113> 본 발명의 폴리펩티드 단편은 아미노산 서열이 단편인 치료 단백질 또는 혈청 알부민 단백질의 폴리펩티드 서열의 치료 활성 및/또는 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성)을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 단편이다.
- <114> 다른 폴리펩티드 단편은 생물학적으로 활성인 단편을 포함한다. 생물학적으로 활성인 단편은 본 발명의 폴리펩티드의 활성과 유사하나, 반드시 동일하지는 않는 활성을 나타내는 단편이다. 단편의 생물학적 활성은 개선된 효능 활성, 또는 감소된 바람직하지 않은 활성을 포함할 수 있다.
- <115> **변이체**
- <116> "변이체"는 참조 핵산 또는 폴리펩티드와 다르지만, 이의 본질적인 특징을 보유하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 의미한다. 일반적으로, 변이체는 참조 핵산 또는 폴리펩티드와 전반적으로 유사하고, 많은 영역에서 이와 동일하다.
- <117> 본원에서 사용되는 "변이체"는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분, 또는 치료 단백질(예를 들어, 표 1의 "치료" 컬럼 참조), 알부민 단백질, 및/또는 알부민 융합 단백질 각각과 서열에서 상이하나 본원 다른곳에 기술되거나 달리 당 분야에 공지된 하나 이상의 기능적 및/또는 치료 특징을 보유하는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 관한 것이다. 일반적으로, 변이체는 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질, 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 해당하는 알부민 단백질, 및/또는 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열과 전반적으로 매우 유사하고, 많은 영역에서 이와 동일하다. 이러한 변이체를 엔코딩하는 핵산이 또한 본 발명에 포함된다.
- <118> 본 발명은 또한, 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질(예를 들어, 표 1에 기술된 치료 단백질:X의 아미노산 서열; 또는 표 1 및 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분의 아미노산 서열, 또는 이들의 단편 또는 변이체), 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 해당하는 알부민 단백질(표 1 및 2에 기술된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분의 아미노산 서열; SEQ ID NO:1에 도시된 아미노산 서열, 또는 이들의 단편 또는 변이체), 및/또는 알부민 융합 단백질의 아미노산과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성된 단백질에 관한 것이다. 이러한 폴리펩티드의 단편이 또한 제공된다(예를 들어, 본원에 기술된 단편). 본 발명에 의해 포함되는 추가의 폴리펩티드는 엄격한 하이브리드화 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 염화나트륨/시트르산 나트륨(SSC)중에서 DNA가 결합된 필터로 하이브리드화시킨 후, 약 50-65°C에서 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상 세척), 매우 엄격한 조건(예를 들어, 약 45°C에서 6X 염화나트륨/시트르산 나트륨(SSC)중에서 DNA가 결합된 필터로 하이브리드화시킨 후, 약 68°C에서 0.1X SSC, 0.2% SDS에서 1회 이상 세척), 당업자에게 공지된 기타 엄격한 하이브리드화 조건(see, for example, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989 *Current protocol in Molecular Biology*, Green publishing associates, Inc., and John Wiley & Sons Inc., New York, at pages 6.3.1 - 6.3.6 and 2.10.3) 하에서 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자의 보충물에 대해 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드이다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.
- <119> 예를 들어, 문의(query) 아미노산 서열에 대해 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드는, 대상 폴리펩티드 서열이 문의 아미노산 서열의 100개의 아미노산 당 5개 이상의 아미노산 변경을 포함할 수 있다는 것을 제외하고, 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열이 문의 서열과 동일한 것을 의미한다. 달리 말하면, 문의 아미노산 서열과 95% 이상의 동일한 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드를 수득하기 위해, 대상 서열의 아미노산 잔기의 5% 이하가 삽입되거나, 결실되거나, 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 참조 서열의 이러한 변경은 참조 아미노산 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치 또는 상기 말단 위치 사이의 아무곳에서 발생할 수 있고, 참조 서열의 잔기 사이에서 개별적으로 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 연속적 그룹에 산재할 수 있다.
- <120> 실제로, 임의의 특정 폴리펩티드가, 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 단편(예를 들어, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분 또는 알부민 융합 단백질의 알부민 부분)의 아미노산 서열과 80% 이상, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%가 동일한지의 여부는 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 전역 서열 정렬로도 언급되는, 문의 서열(본 발명의 서열)과 대상 서열 사이의 최적의 전체 매치를 결정하기 위한 방법은 브루트래그 등(Brutlag et al.)(Comp. App. Biosci.6:237-245 (1990))의 알고리즘에 기초한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬에서, 문의 및 대상 서열은 둘 모두 뉴클레오티드 서열 또는 둘 모두 아미노산 서열이다. 상기 전역 서열 정렬의 결과는 퍼센트 동일성으로 나

타난다. FASTDB 아미노산 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 매트릭스=PAM 0, k-터플(tuple)=2, 미스매치 패널티=1, 집합 패널티=20, 무작위화 그룹 길이=0, 컷오프 스코어=1, 윈도우 크기=서열 길이, 갭 패널티=5, 갭 크기 패널티=0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상 아미노산 서열의 길이이고, 어느 것이나 보다 작았다.

<121> 대상 서열이 내부 결실 때문이 아니라 N- 또는 C-말단 결실로 인해 문의 서열보다 짧은 경우, 상기 결과에 대해 수동 교정이 이루어져야 한다. 이는 FASTDB 프로그램은 전역 퍼센트 동일성을 계산하는 경우, 대상 서열의 N- 및 C-말단 트렁케이션을 고려하지 않기 때문이다. 문의 서열에 비하여 N- 및 C-말단에서 트렁케이션된 대상 서열에서, 퍼센트 동일성은 해당하는 대상 잔기와 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 N- 및 C-말단인 문의 서열의 잔기의 수를 문의 서열의 전체 염기의 퍼센트로서 계산함으로써 정정된다. 잔기가 매치/정렬되는 지의 여부는 FASTDB 서열 정렬의 결과에 의해 결정된다. 이후, 이러한 백분율은 퍼센트 동일성으로부터 감해지고, 특정 파라미터를 이용하여 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산되어 최종 퍼센트 동일성 스코어에 도달하게 된다. 이러한 최종 퍼센트 동일성 스코어가 본 발명의 목적에 사용되는 것이다. 문의 서열과 매치/정렬되지 않는 대상 서열의 N- 및 C-말단에 대한 잔기들 만이 퍼센트 동일성 스코어를 수동 조절하기 위한 목적에 고려된다. 즉, 단지 문의 잔기는 대상 서열의 가장 먼 N- 및 C-말단 잔기 외부에 위치한다.

<122> 예를 들어, 퍼센트 동일성을 결정하기 위해 90개의 아미노산 잔기의 대상 서열은 100개의 잔기의 문의 서열과 정렬된다. 결실은 대상 서열의 N-말단에서 발생하고, 따라서 FASTDB 정렬은 N-말단에서의 최초의 10개의 잔기의 매치/정렬을 나타내지 않는다. 10개의 쌍을 이루지 못한 잔기는 서열의 10%(매치되지 않은 N- 및 C-말단에서의 잔기의 수/문의 서열의 잔기의 전체수)로 나타나고, 10%는 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 퍼센트 동일성 스코어로부터 감해진다. 잔여 90개의 잔기가 완전하게 매치되는 경우, 최종 퍼센트 동일성은 90%가 될 것이다. 또 다른 예에서, 90개 잔기의 대상 서열은 100개 잔기의 문의 서열과 비교된다. 이 때, 결실은 내부 결실이어서, 대상 서열의 N- 또는 C-말단에서 잔기가 존재하지 않아 문의 서열과 매치/정렬되지 않는다. 이 경우에서, FASTDB에 의해 계산된 퍼센트 동일성은 수동 정정되지 않는다. 또 다시, FASTDB 정렬에서 나타난 바와 같이, 단지 잔기가 대상 서열의 N- 및 C-말단 외부에 위치하는 경우, 문의 서열과 매치/정렬되지 않아 수동 정정되지 않는다. 본 발명의 목적을 위해 기타 수동 정정이 이루어지지 않았다.

<123> 변이체는 보통 정상 길이의 HA 또는 변이체와 동일한 길이인 치료 단백질과 75% 이상(예를 들어, 80% 이상, 90%, 95% 또는 99%)의 서열 동일성을 지닐 것이다. 누클레오타이드 또는 아미노산 서열 수준에서의 상동성 또는 동일성은 서열 유사성 검색을 위해 제작된 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx (본원에 참조로서 포함된 Karlin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) 및 Altschul, J. Mol. Evol. 36: 290-300 (1993))에 의해 사용된 알고리즘을 이용한 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 분석에 의해 결정된다.

<124> BLAST 프로그램에 의해 사용된 방법은 먼저 문의 서열 및 데이터베이스 서열 사이의 유사한 부분을 고려한 후, 확인되는 모든 매치의 통계적 유의성을 평가하고, 최종적으로 사전선택된 유의성 한계를 만족시키는 매치들만을 요약하는 것이다. 서열 데이터베이스의 유사성 검색에서의 기본적 문제를 논의하기 위해서는, 본원에 참조로서 완전히 포함된 문헌[Altschul *et al.*, (Nature Genetics 6: 119-129 (1994))]이 참조된다. 막대그래프, 기재 사항, 정렬, 기대치(즉, 데이터베이스 서열에 대한 매치를 보고하기 위한 통계적 유의성 한계), 컷오프, 매트릭스 및 필터는 디폴트 세팅에 있다. blastp, blastx, tblastn, 및 tblastx에 의해 사용된 디폴트 스코어링 매트릭스는 BLOSUM62 매트릭스(Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992), 본원에 참조로써 전체로서 삽입됨)이다. blastn에 대해서는, 스코어링 매트릭스는 M(즉, 매칭되는 잔기쌍에 대한 보상 스코어) 대 N(즉, 미스매칭되는 잔기에 대한 패널티 스코어)의 비에 의해 세팅되고, 여기서 M 및 N에 대한 디폴트 값은 각각 5 및 -4이다. 네개의 blastn 파라미터는 하기와 같이 조정될 수 있다: Q=10 (갭 생성 패널티); R=10 (갭 연장 패널티); wink=1 (문의 서열 사이의 매 윈크쓰(winkth) 위치에서 워드 적중을 발생시킴); 및 갭=16 (갭이 생성된 정렬이 발생하는 범위 내의 윈도우 폭을 세팅). 상응하는 Blastp 파라미터 세팅은 Q=9; R=2; wink=1; 및 gapw=32이었다. GCG 패키지 버전 10.0으로 시판되는, 서열 사이의 최적적합(Bestfit) 비교는 DNA 파라미터 GAP=50 (갭 생성 패널티) 및 LEN=3 (갭 연장 패널티)를 사용하고, 단백질 비교에서의 상응하는 세팅은 GAP=8 및 LEN=2이다.

<125> 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역, 또는 둘 모두에 변형을 함유할 수 있다. 본 발명의 구체에는 사일런트 치환, 첨가, 또는 결실을 생성하는 변형을 포함하나, 엔코딩된 폴리펩티드의 특성 또는 활성이 변화되지 않는 폴리뉴클레오타이드 변이체이다. 유전 부호의 변성으로 인한 사일런트 치환에 의해 생성된 뉴클레오타이드 변이체가 본 발명의 구체예이다. 더욱이, 50개 미만, 40개 미만, 30개 미만, 20개 미만, 10개 미만, 또는 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, 또는 1-2개의 아미노산이 임의의 조합으로 치환되거나, 결실되거나, 첨

가된 폴리펩티드 변이체가 또한 본 발명의 구체예이다. 폴리뉴클레오티드 변이체가 다양한 이유, 예를 들어 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화시키기 위해 생성될 수 있다(인간 mRNA의 코돈을 세균 숙주, 예를 들어 효모 또는 대장균에 바람직한 코돈으로 변경).

<126> 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 알부민 부분을 엔코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 효모 또는 포유동물 세포에서의 발현에 최적화된다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 효모 또는 포유동물 세포에서의 발현에 최적화된다. 또 다른 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 효모 또는 포유동물 세포에서의 발현에 최적화된다.

<127> 대안적 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 엄격한 하이브리드화 조건하에서 치료 단백질을 엔코딩하는 야생형 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화되지 않는다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 알부민 부분을 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 엄격한 하이브리드화 조건하에서 알부민 단백질을 엔코딩하는 야생형 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 엄격한 하이브리드화 조건하에서 치료 단백질 부분 또는 알부민 단백질 부분을 엔코딩하는 야생형 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화되지 않는다.

<128> 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 치료 단백질의 자연 발생 서열을 포함하거나 이로 구성되지 않는다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 알부민 단백질의 자연 발생 서열을 포함하거나 이로 구성되지 않는다. 대안적 구체예에서, 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 치료 단백질 부분 또는 알부민 단백질 부분의 자연 발생 서열을 포함하거나 이로 구성되지 않는다.

<129> 자연 발생 변이체는 "대립형질 변이체"로 언급되고, 이는 유기체의 염색체에 주어진 유전자좌를 차지하는 유전자의 여러 교대 형태중 하나를 의미한다(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). 이러한 대립형질 변이체는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 수준에서 다양할 수 있고, 본 발명에 포함된다. 대안적으로, 비-자연 발생 변이체는 돌연변이유발 기술 또는 직접적 합성에 의해 생성될 수 있다.

<130> 단백질 공학 및 재조합 DNA 기술을 이용하여, 변이체는 본 발명의 폴리펩티드의 특성을 개선시키거나 변화시키도록 생성될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 기능의 실질적 손실 없이 하나 이상의 아미노산이 본 발명의 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 예로서, 문헌[Ron et al. (J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993))]에는 변이체 KGF 단백질이 3, 8 또는 27개의 아미노-말단 아미노산 잔기가 결실된 후에도 효과적인 결합 활성을 지니는 것으로 보고되어 있다. 유사하게, 인터페론 감마는 이 단백질의 카르복시 말단으로부터 8-10개의 아미노산 잔기가 결실된 후에도 10배 이하의 보다 높은 활성을 나타내었다(Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)).

<131> 더욱이, 다양한 증거가 변이체가 종종 자연 발생 단백질의 활성과 유사한 생물학적 활성을 보유함을 입증한다. 예를 들어, 게일 및 동료(J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993))는 인간 사이토카인 IL-1a의 광범위한 돌연변이 분석을 수행하였다. 이들은 무작위 돌연변이 유발을 이용하여 분자의 전장에 걸쳐 변이체 당 평균 2.5개의 아미노산 변화를 지닌 3,500개 이상의 개별적 IL-1a 돌연변이를 생성시켰다. 다중 돌연변이는 매 가능한 아미노산 위치에서 시험되었다. 연구자들은 "대부분의 분자가 결합 또는 생물학적 활성에 거의 영향이 없이 변경되었음"을 확인하였다. 사실상, 시험된 3,500개 이상의 뉴클레오티드 서열중 단지 23개의 유일무이한 아미노산 서열이 야생형의 활성과는 현저하게 다른 단백질을 생성시켰다.

<132> 더구나, 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실이 하나 이상의 생물학적 기능의 변형 또는 손실을 일으키더라도, 기타 생물학적 활성은 여전히 유지될 수 있다. 예를 들어, 분비된 형태의 잔기의 과반수 미만이 N-말단 또는 C-말단으로부터 제거되는 경우에 분비된 형태를 인지하는 항체를 유도하고/하거나 이에 결합하기 위한 결실 돌연변이의 능력이 유지될 것이다. 단백질의 N- 또는 C-말단 잔기가 결핍된 특정 폴리펩티드가 상기 면역학적 활성을 유지하는지의 여부는 본원에 기술되고 달리 당분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<133> 따라서, 본 발명은 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성 및/또는 치료 활성)을 지니는 폴리펩티드 변이체를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명은 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질의 하나 이상의 생물학적 및/또는 치료 활성에 해당하는 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성 및/또는 치료

활성)을 지니는 알부민 융합 단백질의 변이체를 제공한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질의 하나 이상의 생물학적 및/또는 치료 활성에 해당하는 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성 및/또는 치료 활성)을 지니는 알부민 융합 단백질의 변이체를 제공한다. 이러한 변이체는 활성에 거의 영향이 없도록 결실, 삽입, 역위, 반복, 및 당 분야에 공지된 일반적 방식에 따라 선택된 치환을 포함한다. 이러한 변이체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<134> 일부 구체예에서, 본 발명의 변이체는 보존적 치환을 지닌다. "보존적 치환"은 족내에서의 교환, 예를 들어 지방족 또는 소수성 아미노산인 Ala, Val, Leu 및 Ile의 교체; 히드록실 잔기인 Ser 및 Thr의 교체; 산성 잔기인 Asp 및 Glu의 교체; 아미드 잔기인 Asn 및 Gln의 교체; 염기성 잔기인 Lys, Arg, 및 His의 교체; 방향족 잔기인 Phe, Tyr, 및 Trp의 교체; 및 소규모 아미노산인 Ala, Ser, Thr, Met, 및 Gly의 교체를 의미한다.

<135> 표현형적으로 변화가 없는 아미노산을 제조하는 방법과 관련된 지침은, 예를 들어 문헌[Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990)]에 제공되고, 여기서 저자는 변화에 대한 아미노산 서열의 허용을 연구하기 위해 두 개의 주요 방법이 있음을 기술한다.

<136> 첫 번째 방법은 진화의 과정 동안 자연 선택에 의한 아미노산 치환의 허용을 이용한다. 상이한 종에서 아미노산 서열을 비교함으로써, 보존된 아미노산이 확인될 수 있다. 이러한 보존된 아미노산은 단백질 기능에 중요할 것이다. 대조적으로, 자연 선택에 의해 치환이 허용된 아미노산 위치는 이러한 위치가 단백질 기능에 중요하지 않다는 것을 나타낸다. 따라서, 아미노산 치환을 허용하는 위치는 단백질의 생물학적 활성을 여전히 유지하면서 변형될 수 있다.

<137> 두 번째 방법은 단백질 기능에 중요한 영역을 확인하기 위해 클로닝된 유전자의 특정 부위에서 아미노산 변화를 유도하는 유전공학을 이용한다. 예를 들어, 부위 특이적 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발(분자의 매 잔기에 단일의 알라닌 돌연변이를 도입)이 사용될 수 있다. 문헌[Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)]이 참조된다. 생성된 돌연변이 분자는 이후 생물학적 활성에 대해 시험될 수 있다.

<138> 저자들이 언급한 바와 같이, 이들 두 방법은 단백질이 아미노산 치환에 놀라운 허용을 나타내었다. 저자들은 아미노산 변화가 단백질의 특정 아미노산 위치에서 허용될 수 있음을 추가로 기술한다. 예를 들어, 대부분의 매몰된(단백질의 3차 구조 내에 매몰) 아미노산 잔기는 비극성 측쇄를 필요로 하는 반면에, 표면 측의 사슬의 몇몇 특징은 일반적으로 보존되어 있다. 더욱이, 허용되는 보존 아미노산 치환은 지방족 또는 소수성 아미노산인 Ala, Val, Leu 및 Ile의 교체; 히드록실 잔기인 Ser 및 Thr의 교체; 산성 잔기인 Asp 및 Glu의 교체; 아미드 잔기인 Asn 및 Gln의 교체; 염기성 잔기인 Lys, Arg, 및 His의 교체; 방향족 잔기인 Phe, Tyr, 및 Trp의 교체; 소규모 아미노산인 Ala, Ser, Thr, Met, 및 Gly의 교체를 포함한다. 보존성 아미노산 치환 이외에, 본 발명의 변이체는 (i) 치환된 아미노산 잔기가 유전 부호에 의해 엔코딩된 것이거나 엔코딩되지 않은 것인 하나 이상의 비-보존성 아미노산 잔기의 치환을 함유하는 폴리펩티드, 또는 (ii) 치환기를 지니는 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 함유하는 폴리펩티드, 또는 (iii) 또 다른 화합물, 예를 들어 폴리펩티드의 안정성 및/또는 용해성을 증가시키는 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)과 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이션된 폴리펩티드, (iv) 추가의 아미노산, 예를 들어 IgG Fc 융합 영역 펩티드를 함유하는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 변이체 폴리펩티드는 당 분야의 범위, 본원의 교시로부터의 분야 내에 해당하는 것으로 생각된다.

<139> 예를 들어, 하전된 아미노산의 또 다른 하전된 아미노산 또는 중성 아미노산으로의 아미노산 치환을 함유하는 폴리펩티드 변이체는 개선된 특성, 예를 들어 집성을 지니는 단백질을 생성할 수 있다. 약학적 포몰레이션의 집성은 활성을 감소시키고 집성체의 면역원성 활성으로 인한 청소율을 증가시킨다. 문헌[Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)]이 참조된다.

<140> 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 알부민 융합 단백질의 아미노산 서열, 치료 단백질 및/또는 인간 혈청 알부민의 아미노산 서열의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이로 구성되고, 여기서 단편 또는 변이체는 참조 아미노산 서열과 비교하는 경우에 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 또는 50-150개의 아미노산 잔기 첨가, 치환, 및/또는 결실을 지닌다. 다른 구체예에서, 아미노산 치환은 보존되어 있다. 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산이 또한 본 발명에 포함된다.

<141> 본 발명의 폴리펩티드는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 아미노산, 즉 펩티드 동배체로 구성될 수 있고, 20개의 유전자 엔코딩된 아미노산과는 다른 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는 자

연적 과정, 예를 들어 번역후 과정 또는 당 분야에 널리 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기본서 및 보다 상세한 전공논문, 뿐만 아니라 풍부한 연구 문헌에 잘 기술되어 있다. 변형은 펩티드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여 폴리펩티드의 어느 곳에서도 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 소정의 폴리펩티드의 여러 부위에서 동일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있음이 인식될 것이다. 또한, 소정의 폴리펩티드는 많은 유형의 변형을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어 유비퀴틴화의 결과로서 분지될 수 있고, 이들은 고리형이거나, 분지를 지니거나 지니지 않을 수 있다. 고리형, 분지형, 및 분지된 고리형 폴리펩티드는 번역후 자연 과정으로부터 발생할 수 있거나, 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 결합, 헴 부분의 공유 결합, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 포스포티딜이노시톨의 공유 결합, 가교, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 당화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스틸화, 산화, 페길화, 단백질 분해성 가공, 포스포틸화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 설파화, 단백질에 대한 아미노산의 전달-RNA 매개성 첨가, 예를 들어 아르기닐화, 및 유비퀴틴화를 포함한다(예를 들어, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifler et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992) 참조).

<142> 기능적 활성

<143> "기능적 활성을 지니는 폴리펩티드"는 전장의 치료 단백질의 프로-단백질, 및/또는 성숙한 형태와 관련된 하나 이상의 공지된 기능적 활성을 나타낼 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 기능적 활성은 생물학적 활성, 항원성[항-폴리펩티드 항체에 결합(또는 폴리펩티드와 결합에 대해 경쟁)하는 능력], 면역원성(본 발명의 특정 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발생시키는 능력), 본 발명의 폴리펩티드를 지닌 중합체를 형성하는 능력, 및 폴리펩티드에 대한 수용체 또는 리간드에 결합하는 능력을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<144> "생물학적 활성을 지니는 폴리펩티드"는 용량 의존성을 지니거나 지니지 않고 특정 생물학적 검정으로 측정되는 경우 성숙한 형태를 포함하는 본 발명의 치료 단백질의 활성과 유사하지만 필수적으로 동일하지는 않는 활성을 나타내는 폴리펩티드를 의미한다. 용량 의존성이 존재하는 경우, 폴리펩티드의 용량 의존성과 동일할 필요는 없으나, 본 발명의 폴리펩티드에 비교하는 경우 소정의 활성에서의 용량-의존성과 실질적으로 유사할 필요는 있다(즉, 후보자 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드와 비교하여 보다 큰활성을 나타내거나 약 25배 미만의 활성, 한 구체예에서는 약 10배 미만의 활성, 추가 구체예에서는 약 3배 미만의 활성을 나타낼 것이다).

<145> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 알부민과 융합되지 않는 경우에 치료 단백질 부분(또는 이의 단편 또는 변이체)과 관련된 하나 이상의 생물학적 및/또는 치료학적 활성을 가진다.

<146> 추가 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 융합되지 않은 상태에서 치료 단백질 부분(또는 이의 단편 또는 변이체)과 비교하여 증가된 혈장 안정성을 지닌다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 융합되지 않은 치료 단백질 부분의 혈장 안정성은 당 분야에 공지된 검정법 또는 통상적으로 변경된 검정법을 이용하여 검정될 수 있다.

<147> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 당 분야에 공지된 검정법 또는 통상적으로 변형된 검정법, 뿐만 아니라 본원에 기술된 검정법을 이용하여 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성)에 대해 검정될 수 있다. 추가로, 당업자는 표 1의 해당열(예를 들어, 표 1의 컬럼 3)에 참조된 검정법을 이용하여 활성에 대해 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질의 단편을 통상적으로 검정할 수 있다. 추가로, 당업자는 당 분야에 공지된 검정법 및/또는 하기 실시예 섹션에 기술된 검정법을 이용하여 활성에 대해 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분에 해당하는 알부민 단백질의 단편을 통상적으로 검정할 수 있다.

<148> 예를 들어, 항-치료 폴리펩티드 항체 및/또는 항-알부민 항체에 결합하기 위한 치료 단백질에 결합하거나 이와 경쟁하기 위한 알부민 융합 단백질의 능력을 검정하는 한 구체예에서, 당 분야에 공지된 방사선면역검정법, ELISA(효소면역측정법), "샌드위치" 면역검정법, 면역방사측정법, 겔 확산 침강 반응, 면역확산 검정법, 인 시튜 면역검정법(예를 들어, 콜로이드성 금, 효소 또는 방사성동위원소 라벨을 이용함), 웨스턴 블로팅, 침강 반응, 응집 검정법(예를 들어, 겔 응집 검정법, 적혈구응집 검정법), 보체 결합 검정법, 면역형광검사, 단백질 A 검정법, 및 면역전기이동 검정법 등과 같은 기술을 이용하는 경쟁적 및 비경쟁적 검정 시스템을 포함하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 구체예에서, 항체 결합은 일차 항체에 대한 라벨을 검출함으로써 검

출된다. 또 다른 구체예에서, 일차 항체는 이차 항체 또는 일차 항체에 대한 작용제의 결합을 검출함으로써 검출된다. 추가의 구체예에서, 이차 항체는 라벨링된다. 면역검정에서의 결합을 검출하기 위한 많은 방법이 당 분야에 공지되어 있고, 이는 본 발명의 범위에 포함된다.

- <149> 한 구체예에서, 치료 단백질의 결합 파트너(예를 들어, 수용체 또는 리간드)가 확인되는 경우, 융합체의 치료 단백질 부분과 같은 치료 단백질을 포함하는 알부민 융합 단백질에 의해 결합 파트너에 결합하는 것이, 예를 들어 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 환원성 및 비-환원성 겔 크로마토그래피, 단백질 친화성 크로마토그래피, 및 친화성 블로팅에 의해 검정될 수 있다. 문헌[Phizicky et al., Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995)]이 참조된다. 또 다른 구체예에서, 융합체의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 폴리펩티드의 기질에 결합하는 알부민 융합 단백질의 생리적 상관 능력이 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 통상적으로 검정될 수 있다.
- <150> 대안적 구체예에서, 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 환원성 및 비-환원성 겔 크로마토그래피, 단백질 친화성 크로마토그래피, 및 친화성 블로팅에 의해 알부민 융합 단백질이 중합화되는 능력이 평가되고, 중합체의 기타 성분과의 회합이 검정될 수 있다. 상기 문헌[Phizicky et al.]이 참조된다.
- <151> 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 전부 또는 일부를 포함하는 알부민 융합 단백질은 알부민과 융합되지 않는 경우 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체와 관련된 하나 이상의 생물학적 및/또는 치료적 활성(예를 들어, 폴리펩티드 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 활성)을 지닌다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 전부 또는 일부를 포함하는 알부민 융합 단백질의 생물학적 활성 및/또는 치료 활성은 치료 단백질에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 폴리펩티드와 관련된 생물학적 활성 및/또는 치료 활성중 하나 이상의 억제(즉, 길항작용) 또는 활성화(즉, 작용)이다.
- <152> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 다양한 방법으로 특성규명될 수 있다. 특히, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 본원에 기술된 기술 또는 당 분야에 공지된 통상적으로 변형된 기술을 이용하여 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 검정될 수 있다.
- <153> 특이적 단백질 또는 에피토프에 (특이적으로)결합하는 알부민 융합 단백질(예를 들어, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 것)의 능력에 대한 검정은 용액 중에서(예를 들어, Houghten, Bio/Techniques 13:412-421(1992)), 비드 상에서(예를 들어, Lam, Nature 354:82-84 (1991)), 칩 상에서(예를 들어, Fodor, Nature 364:555-556 (1993)), 세균에서(예를 들어, 미국 특허 제 5,223,409호), 포자상에서(예를 들어, 특허 제 5,571,698; 5,403,484; 및 5,223,409호), 플라스미드 상에서(예를 들어, Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 (1992)) 또는 파아지 상에서(예를 들어, Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990) 수행될 수 있다; (Devlin, Science 249:404-406 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382 (1990); and Felici, J. Mol. Biol. 222:301-310 (1991))(이들 참조문헌의 각각은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된다). 치료 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 또한 본원에 기술된 기술된 검정법 또는 통상적으로 변형된 기술 또는 달리 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 특정 단백질 또는 에피토프에 대해 이들의 특이성 및 친화성이 검정될 수 있다.
- <154> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 기타 항원(예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 분자(들)과 함께 서열/구조 보존성을 지니는 분자)을 이용하여 교차-반응성이 검정될 수 있다.
- <155> (면역특이적) 결합 및 교차-반응성을 검정하기 위해 웨스턴 블로팅, 방사선면역검정법, ELISA (효소면역측정법), "샌드위치" 면역검정법, 면역침강 검정법, 침강 반응, 겔 확산 침강 반응, 면역확산 검정법, 응집 검정법, 보체-결합 검정법, 면역방사 검정법, 형광 면역검정법, 및 단백질 A 면역검정법과 같은 기술을 이용하는 경쟁 및 비-경쟁 검정 시스템을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 검정법은 통상적으로 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, which is incorporated by reference herein in its entirety 참조). 예시적 면역검정법은 하기에 간단히 기술되어 있다(그러나, 이에 제한하고자 하는 것은 아니다).
- <156> 면역침강 프로토콜은 일반적으로 RIPA 완충용액과 같은 용해 완충용액(pH 7.2의 1% 트라시롤(Trasyol)에서 1% NP-40 또는 Triton X-100, 1% 나트륨 테옥시콜레이트, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산 나트륨)에서 세포

집단을 용해시키고, 단백질 포스파타아제 및/또는 프로테아제 억제제(예를 들어, EDTA, PMSF, 아프로티닌, 나트륨 바나데이트)를 보충하고, 세포 용해질에 본 발명의 알부민 융합 단백질을 첨가하고(예를 들어, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함함), 40℃에서 일정 기간(예를 들어, 1 내지 4시간) 동안 인큐베이팅시키고, 세포 용해질에, 예를 들어 항-알부민 항체에 결합하는 세파로오즈 비드를 첨가하고, 40℃에서 약 1시간 이상 동안 인큐베이팅시키고, 용해 완충용액에서 비드를 세척하고, SDS/샘플 완충용액에서 비드를 재현탁시키는 것을 포함한다. 특정 항원을 면역침강시키는 알부민 융합 단백질의 능력은 예를 들어 웨스턴 블로팅 검정법에 의해 평가될 수 있다. 당업자는 항원에 대한 알부민 융합 단백질의 결합을 증가시키고 백그라운드를 감소시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터를 인지할 것이다(예를 들어, 세파로오즈 비드를 이용하여 세포 용해질을 예비 세척함). 면역침강 프로토콜에 관한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1]이 참조된다.

<157> 웨스턴 블로팅 검정법은 일반적으로 단백질 샘플을 제조하고, 폴리아크릴아미드 겔(예를 들어, 항원의 분자량에 따라 8%-20% SDS-PAGE)에서 단백질 샘플을 전기영동시키고, 폴리아크릴아미드 겔로부터의 단백질 샘플을 막, 예를 들어 니트로셀룰로오즈, PVDF 또는 나일론에 옮기고, 블로킹 용액(예를 들어, 3% BSA 또는 탈지방유)에서 막을 블로킹시키고, 세척 완충용액(예를 들어, PBS-Tween 20)에서 막을 세척하고, 막에 본 발명의 알부민 융합 단백질(블로킹 완충용액중에서 희석됨)을 적용시키고, 세척 완충용액중에서 막을 세척하고, 블로킹 완충용액 중에 희석된 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제) 또는 방사성 분자(예를 들어, ³²P 또는 ¹²⁵I)에 컨쥬게이션된 이차 항체(알부민 융합 단백질, 예를 들어 항-인간 혈청 알부민 항체)를 인지함)를 적용시키고, 세척 완충용액중에서 막을 세척하고, 항원의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 당업자는 검출되는 신호를 증가시키고 백그라운드 노이즈를 감소시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터를 인지할 것이다. 웨스턴 블로팅 프로토콜에 관한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1]이 참조된다.

<158> ELISA는 항원을 제조하고, 항원을 이용하여 96-웰 미세역가 플레이트를 코팅시키고, 웰에 결합하지 않는 항원을 세척하고, 웰에 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제)와 같은 검출가능한 화합물에 컨쥬게이션된 본 발명의 알부민 융합 단백질(예를 들어, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함함)을 첨가하고, 일정 기간 동안 인큐베이팅시키고, 결합되지 않거나 특이적으로 결합되지 않은 알부민 융합 단백질을 세척하고, 웰을 코팅하는 항원에 특이적으로 결합된 알부민 융합 단백질의 존재를 검출하는 것을 포함한다. ELISA에서, 알부민 융합 단백질은 검출가능한 화합물에 컨쥬게이션되지 않고, 대신 검출가능한 화합물에 컨쥬게이션된 이차 항체(알부민 융합 단백질을 인지함)가 웰에 첨가될 수 있다. 추가로, 항원을 이용하여 웰에 코팅하는 대신, 알부민 융합 단백질은 웰에 코팅될 수 있다. 이 경우, 검출가능한 분자는 검출가능한 화합물, 예를 들어 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제)에 컨쥬게이션된 항원일 수 있다. 당업자는 검출되는 신호 및 당 분야에 공지된 ELISA의 기타 변형을 증가시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터를 인지할 것이다. ELISA에 관한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1]이 참조된다.

<159> 단백질, 항원, 또는 에피토프에 대한 알부민 융합 단백질의 결합 친화성 및 알부민 융합 단백질-단백질/항원/에피토프 상호작용의 오프-레이트(off-rate)는 경쟁적 결합 검정법에 의해 결정될 수 있다. 경쟁적 결합 검정법의 한 예는 증가된 양의 라벨링되지 않은 항원의 존재하에서 본 발명의 알부민 융합 단백질과 라벨링된 항원(예를 들어, ³H 또는 ¹²⁵I)의 인큐베이션, 및 라벨링된 항원에 결합된 항체의 검출을 포함하는 방사선면역측정법이다. 특정 단백질, 항원, 또는 에피토프에 대한 알부민 융합 단백질의 친화성 및 결합 오프-레이트는 스캐차드 플롯 분석에 의한 데이터로부터 결정될 수 있다. 알부민 융합 단백질과 같은 동일한 단백질, 항원 또는 에피토프에 결합하는 이차 단백질과의 경쟁은 방사선면역측정법을 이용하여 결정될 수 있다. 이 경우, 단백질, 항원 또는 에피토프는 본 발명의 알부민 융합 단백질과 같은 동일한 단백질, 항원, 또는 에피토프에 결합하는 라벨링되지 않은 이차 단백질의 증가된 양의 존재하에서 라벨링(예를 들어, ³H 또는 ¹²⁵I)되지 않은 화합물에 컨쥬게이션된 알부민 융합 단백질과 인큐베이션된다.

<160> 한 구체예에서, BIAcore 동역학 검정은 단백질, 항원 또는 에피토프에 대한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 결합 및 오프-레이트를 결정하는데 사용된다. BIAcore 동역학 분석은 표면에 특정 폴리펩티드, 항원 또는 에피토프 또는 알부민 융합 단백질이 각각 고정된 칩으로부터 알부민 융합 단백질, 또는 특정 폴리펩티드, 항원 또는

에피토프의 결합 및 해리를 분석하는 것을 포함한다.

<161> 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 치료 단백질에 결합하는 항체는 또한 소정의 단백질 또는 항원, 예를 들어 항체들이 특이적으로 결합하는 항원에 대한 결합 친화성에 관하여 기술되거나 특정될 수 있다. 결합 친화성은 $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$, $10^{-3} M$, $5 \times 10^{-4} M$, $10^{-4} M$ 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것을 포함한다. 다른 친화성은 $5 \times 10^{-5} M$, $10^{-5} M$, $5 \times 10^{-6} M$, $10^{-6} M$, $5 \times 10^{-7} M$, $10^{-7} M$, $5 \times 10^{-8} M$ 또는 $10^{-8} M$ 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것이다. 더욱 더 바람직한 결합 친화성은 $5 \times 10^{-9} M$, $10^{-9} M$, $5 \times 10^{-10} M$, $10^{-10} M$, $5 \times 10^{-11} M$, $10^{-11} M$, $5 \times 10^{-12} M$, $10^{-12} M$, $5 \times 10^{-13} M$, $10^{-13} M$, $5 \times 10^{-14} M$, $10^{-14} M$, $5 \times 10^{-15} M$, 또는 $10^{-15} M$ 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것이다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 알부민 융합 단백질(치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함함)의 원자가 및 상응하는 항체의 원자가를 고려하여 치료 단백질에 결합하는 항체(알부민에 융합되지 않음)에 해당하는 것과 유사한 소정의 단백질 또는 에피토프에 대한 친화성을 지닌다. 게다가, 본원(실시예 및 표 1을 참조)에 기술되고 당 분야에 널리 공지된 검정법은 통상적으로 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분 및/또는 알부민 부분과 관련된 생물학적 활성 및/또는 치료 활성(시험관내 또는 생체내)을 유도하기 위한 알부민 융합 단백질 및 이의 단편, 변이체 및 유도체의 능력을 측정하기 위해 적용될 수 있다. 기타 방법은 당업자에게 공지되어 있을 것이고, 이는 본 발명의 범위에 속한다.

<162> 알부민

<163> 상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 예를 들어 유전적 융합에 의해 서로 회합되는 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함한다.

<164> 추가의 구체예는 화학적 컨주게이션에 의해 서로 결합된 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함한다.

<165> 용어 인간 혈청 알부민(HSA) 및 인간 알부민(HA)는 본원에서 교환하여 사용될 수 있다. 용어 "알부민" 및 "혈청 알부민"은 보다 광범위하고, 인간 혈청 알부민(및 이의 단편 및 변이체) 뿐만 아니라 기타 종으로부터의 알부민(이의 단편 및 변이체)를 포함한다.

<166> 본원에서 사용되는 "알부민"은 집합적으로 알부민의 하나 이상의 기능적 활성(예를 들어, 생물학적 활성)을 지니는 알부민 단백질 또는 아미노산 서열, 또는 알부민 단편 또는 변이체를 의미한다. 특히, "알부민"은 인간 알부민 또는 이의 단편(예를 들어, EP 201 239, EP 322 094 WO 97/24445, W095/23857 참조), 특히 도 1 및 SEQ ID NO:1에 도시된 인간 알부민의 성숙한 형태, 또는 기타 척추동물로부터의 알부민 또는 이의 단편, 또는 이들 분자의 유사체 또는 변이체 또는 이의 단편을 의미한다.

<167> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 사용되는 인간 혈청 알부민 단백질은 SEQ ID NO:1에 참조된 하기의 점 돌연변이의 세트 중 하나 또는 둘 모두를 함유한다: Ala으로의 Leu-407의 돌연변이, Val으로의 Leu-408의 돌연변이, Ala으로의 Val-409의 돌연변이 및 Ala으로의 Arg-410의 돌연변이; 또는 Ala으로의 Arg-410의 돌연변이, Gln으로의 Lys-413의 돌연변이 및 Gln으로의 Lys-414의 돌연변이(예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 국제 출원 번호 W095/23857 참조). 다른 구체예에서, 점 돌연변이의 상기 기술된 세트 중 하나 또는 둘 모두를 함유하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 효모 숙주 세포에서 발현되는 재조합 알부민 융합 단백질의 생성을 증가시키는 효모 Yap3p 단백질 분해에 대한 개선된 안정성/내성을 지닌다.

<168> 본원에서 사용되는 바와 같이, 치료 단백질의 치료 활성 또는 혈장 안정성 또는 반감기를 연장시키기에 충분한 알부민의 부분은 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분의 반감기 또는 혈장 안정성은 융합되지 않은 상태의 반감기 또는 혈장 안정성과 비교하여 연장되거나 늘어나기 위한 단백질의 치료 활성 또는 혈장 안정성을 안정시키거나 연장시키기 위한 길이 또는 구조에 충분한 알부민의 부분을 의미한다. 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 상기 기술된 바와 같은 전장의 HA 서열을 포함하거나, 치료 활성을 안정화시키거나 연장시킬 수 있는 이의 하나 이상의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 단편은 10개 또는 그 초과인 아미노산 길이일 수 있거나, HA 서열로부터의 약 15, 20, 25, 30, 50개 또는 그 초과인 연속적 아미노산을 포함할 수 있거나, HA의 특정 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 최초 두 개의 면역글로불린 유사 도메인을 스패닝하는 HA의 하나 또는 그 초과인 단편이 사용될 수 있다. 한 구체예에서, HA 단편은 HA의 성숙한 형태이다.

<169> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 정상적인 HA의 변이체일 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 또한 본원에 기술된 바와 같은 치료 단백질의 변이체일 수 있다. 용어 "변이체"는 보

존성이거나 비보존성인 삽입, 결실 및 치환을 포함하고, 이러한 변화는 치료 단백질의 치료 활성을 수여하는 알부민, 또는 활성 부위, 또는 활성 도메인의 중앙, 유용한 리간드-결합 및 비-면역원성 특성 중 하나 이상을 실질적으로 변경시키지 않는다.

<170> 특히, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 자연 발생하는 인간 알부민의 다형 변이체 및 인간 알부민의 단편, 예를 들어 EP 322 094(즉, HA(Pn), 여기서 n는 369 내지 419임)에 기술된 인간 알부민의 단편을 포함한다. 알부민은 임의의 척추동물, 특히 임의의 포유동물, 예를 들어 인간, 소, 양, 또는 돼지로부터 유래될 수 있다. 비-포유동물 알부민은 닭 및 연어를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 치료 단백질보다 다양한 동물로부터 유래될 수 있다.

<171> 일반적으로 말하면, HA 단편 또는 변이체는 100개 이상의 아미노산 길이, 예를 들어 150개 이상의 아미노산 길이일 것이다. HA 변이체는 하나 이상의 전체 도메인의 HA, 예를 들어 도메인 1(SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-194), 도메인 2(SEQ ID NO: 1의 아미노산 195-387), 도메인 3(SEQ ID NO: 1의 아미노산 388-585), 도메인 1 및 2((SEQ ID NO: 1의 1-387), 도메인 2 및 3(SEQ ID NO: 1의 195-585), 또는 도메인 1 및 3(SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-194 및 SEQ ID NO: 1의 아미노산 388-585)으로 구성되거나 이를 포함할 수 있다. 각각의 도메인은 그 자체가 잔기 Lys106 내지 Glu119, Glu292 내지 Val 315 및 Glu492 내지 Ala511을 포함하는 유연성이 있는 서브도메인간 링커 영역을 지닌 두 개의 상동 서브도메인, 즉 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 및 512-585로 구성된다.

<172> 한 측면에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 부분은 HA의 하나 이상의 서브도메인 또는 도메인 또는 이의 보존적 변이체를 포함한다. 융합체가 서브도메인에 기초하는 경우, 인접한 링커의 일부 또는 전부는 치료 단백질 부분에 링크되기 위해 사용될 수 있다.

<173> 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 치료 단백질이다.

<174> 본 발명은 또한 표 1에 기술된 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 용어 "치료 단백질"은 치료 단백질(예를 들어, 표 1의 컬럼 1에 기술된 것) 및 이의 단편 및 변이체에 결합하는 항체를 포함하는 것으로 특히 간주된다. 따라서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체, 및/또는 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 함유할 수 있다.

<175> **항체 구조 및 백그라운드**

<176> 기본 항체 구조 단위는 테트라머를 포함하는 것으로 공지되어 있다. 각각의 테트라머는 각각의 사슬이 하나의 "경쇄"(약 25kD) 및 하나의 "중쇄"(약 50-70kD)를 지니는, 폴리펩티드 사슬의 두 개의 동일한 쌍으로 구성된다. 각각의 사슬의 아미노 말단 부분은 항원 인지를 주로 책임지는 약 100 내지 110 또는 그 초과 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 사슬의 카복시 말단 부분은 효과기 기능을 주로 책임지는 불변영역으로 정의된다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파, 또는 엡실론으로 분류되고, 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, and IgE로 항체의 동형으로 정의된다. 문헌[Fundamental Immunology Chapters 3-5 (Paul, W., ed., 4th ed. Raven Press, N.Y. (1998))]이 참조된다(모든 목적에 대해 전체 내용이 참조로서 포함됨). 각각의 경쇄/중쇄쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다.

<177> 따라서, 본래의 IgG 항체는 두 개의 결합 부위를 지닌다. 이작용성 또는 이중특이적 항체를 제외하고, 두 개의 결합 부위는 동일하다.

<178> 사슬은 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 언급되는 세계의 고변이 부위에 의해 결합된 비교적 보존된 골격 영역(framework region: FR)의 일반 구조를 나타낸다. 일반적으로, CDR 영역은 항원과 접촉하게 되고 이의 특이성을 결정하는 항체의 일부이다. 각각의 쌍의 중쇄 및 경쇄로부터의 CDR은 특이적 에피토프에 결합을 가능하게 하는 골격 영역에 의해 정렬된다. N-말단 내지 C-말단으로부터, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 둘 모두는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 가변 영역은 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에 연결된다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 지정은 문헌[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))], 또는 [Chothia & Lesk J Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)]의 정의에 따른다.

<179> 본원에서 사용되는 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 부분, 즉 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자(예를 들어, 항체의 하나 이상의 CDR 영역을 함유하는 분자)를 의미한다. 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응할 수 있는 항체는 모노클로날, 다중특이적,

인간, 인간화되거나 키메라 항체, 단일 사슬 항체(예를 들어, 단일 사슬 Fvs), Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입(항-ID) 항체(예를 들어, 본 발명의 항체에 특이적인 항-ID 항체를 포함함), 및 상기중 임의의 에피토프-결합 단편(예를 들어, VH 도메인, VL 도메인, 또는 하나 이상의 CDR 영역)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<180> **치료 단백질에 결합하는 항체**

<181> 본 발명은 치료 단백질(예를 들어, 표 1에 기술된 것) 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다.

<182> 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체는 새 및 포유동물을 포함하는 임의의 동물로부터 유래될 수 있다. 항체는 인간, 뮤린(예를 들어, 마우스 및 래트), 원숭이, 양, 토끼, 염소, 기니아피그, 낙타, 말, 또는 닭 항체일 수 있다. 한 구체예에서, 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용되는 "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 지니는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리 및 인간 항체를 생성하기 위해 유전학적으로 설계된 제노마우스(xenomice) 및 기타 유기체로부터 단리된 항체를 포함한다.

<183> 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체 분자는 IgG1이다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 면역글로불린 분자는 IgG2이다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질에 해당할 수 있는 면역글로불린 분자는 IgG4이다.

<184> 한 구체예에서, 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 본 발명의 인간 항원-결합 항체 단편이고, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단일-사슬 Fvs(scFv), 단일-사슬 항체, 이황화물-결합된 Fvs(sdFv) 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단일-사슬 항체를 포함하는 항원-결합 항체 단편은 가변 영역(들) 단독 또는 경첩 부위, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 전체 또는 일부와의 조합을 포함할 수 있다. 추가 항원 결합 단백질은 치료 단백질 또는 알부민 융합 단백질에 결합될 수 있는데, 이 추가 항원 결합 단백질은 예를 들어 Small Modular ImmunoPharmaceuticals(SMIPsTM)(참조, 예를 들어, 미국 공개 특허 출원 제 20050202534호).

<185> 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 비특이적이거나, 이중특이적이거나, 삼중특이적이거나 그 이상의 다중특이성일 수 있다. 다중특이적 항체는 치료 단백질의 다양한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 치료 단백질뿐만 아니라 이중성 에피토프, 예를 들어 이중성 폴리펩티드 또는 고형물 지지 물질에 대해 특이적일 수 있다. 예를 들어, PCT 출원 WO 93/17715호; WO 92/08802호; WO 91/00360호; WO 92/05793호; 문헌[Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991)]; 미국 특허 제 4,474,893호; 4,714,681호; 4,925,648호; 5,573,920호; 5,601,819호; [Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)]가 참조된다.

<186> 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체는 이중특이적이거나 이작용성일 수 있고, 이는 항체가 두개의 상이한 중쇄/경쇄쌍 및 두개의 상이한 결합 부위를 지니는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 결합을 포함하는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J Immunol.* 148:1547-1553 (1992)]가 참조된다. 추가로, 이중특이성 항체는 "디아바디(diabody)"(Holliger et al. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)) 또는 "야누신(Janusin)"(Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) and Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int JCancer Suppl* 17:51-52 (1992))으로 형성될 수 있다.

<187> 본 발명은 또한 본원에 기술되거나 당 분야에 널리 공지된 항체의 단편 또는 변이체(유도체를 포함함)를 포함하는 알부민 융합 단백질을 제공한다. 본 발명의 분자를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 유도하기 위해, 예를 들어 아미노산 치환을 발생시키는 부위-특이적 돌연변이유발 및 PCR-매개성 돌연변이유발을 포함하는 당업자에게 공지된 표준 기술이 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 변이체(유도체를 포함함)는 참조 VH 도메인, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VL 도메인, VLCDR1, VLCDR2, 또는 VLCDR3에 비해 50개 미만의 아미노산 치환, 40

개 미만의 아미노산 치환, 30개 미만의 아미노산 치환, 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 엔코딩한다. 특정 구체예에서, 변이체는 VHCDR3의 치환을 엔코딩한다. 한 구체예에서, 변이체는 하나 이상의 예상된 비-필수 아미노산 잔기에서 보존적 아미노산 치환을 지닌다.

<188> 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 이들이 인지하거나 특이적으로 결합하는 치료 단백질의 에피토프(들) 또는 부분(들)에 관해 기술되거나 특정될 수 있다. 치료 단백질 또는 치료 단백질의 특이적 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체가 또한 포함된다. 따라서, 본 발명은 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고, 동일한 것을 제외하는 것이 허용된다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질 항체 그 자체의 융합되지 않은 단편 또는 변이체와 같은 에피토프에 결합한다.

<189> 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 또한 이들의 교차-반응성에 관해 기술되거나 특정될 수 있다. 치료 단백질의 임의의 기타 유사체, 오소로그, 또는 동족체에 결합하지 않는 항체가 포함된다. 치료 단백질에 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 65% 이상, 60% 이상, 55% 이상, 50% 이상의 서열 동일성(당 분야에 공지되고 본원에 기술된 방법을 이용하여 계산됨)을 지닌 폴리펩티드에 결합하는 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 특정 구체예에서, 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 인간 단백질 및 이의 상응하는 에피토프의 뮤린, 래트 및/또는 토끼 동족체와 교차-반응한다. 치료 단백질에 대해 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 및 50% 미만의 서열 상동성(당 분야에 공지되고 본원에 기술된 방법을 이용하여 계산됨)을 지니는 폴리펩티드에 결합하지 않는 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 특정 구체예에서, 상기 기술된 교차-반응성은 임의의 단일 특이적 항원성 또는 면역원성 폴리펩티드, 또는 본원에 기술된 특정 항원 및/또는 면역원성 폴리펩티드의 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 조합에 관한 것이다. 추가 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 특정 항체 그 자체의 단편 또는 변이체에 비해 유사하거나 실질적으로 동일한 교차 반응 특성을 지닌다.

<190> 본 발명에 추가로 포함되는 것은 엄격한 하이브리드화 조건(본원에 기술된 바와 같음)하에서 치료 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 하이브리드되는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드에 결합하는 항체이다. 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 또한 본 발명의 폴리펩티드에 대한 이들의 결합 친화성과 관련하여 기술되거나 특정될 수 있다. 다른 결합 친화성은 $5 \times 10^{-2} \text{M}$, 10^{-2}M , $5 \times 10^{-3} \text{M}$, 10^{-3}M , $5 \times 10^{-4} \text{M}$, 10^{-4}M 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것이다. 다른 결합 친화성은 $5 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6} \text{M}$, 10^{-6}M , $5 \times 10^{-7} \text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 또는 10^{-8}M 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것이다. 다른 결합 친화성은 $5 \times 10^{-9} \text{M}$, 10^{-9}M , $5 \times 10^{-10} \text{M}$, 10^{-10}M , $5 \times 10^{-11} \text{M}$, 10^{-11}M , $5 \times 10^{-12} \text{M}$, 10^{-12}M , $5 \times 10^{-13} \text{M}$, 10^{-13}M , $5 \times 10^{-14} \text{M}$, 10^{-14}M , $5 \times 10^{-15} \text{M}$, 또는 10^{-15}M 미만의 해리상수 또는 Kd를 지니는 것이다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 알부민 융합 단백질(치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함함)의 원자가 및 상응하는 항체의 원자가를 고려하여 치료 단백질에 결합하는 항체(알부민에 융합되지 않음)에 해당하는 것과 유사한 소정의 단백질 또는 에피토프에 대한 친화성을 지닌다.

<191> 본 발명은 또한 경쟁적 결합을 결정하기 위한 당 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 본원에 기술된 면역검정법에 의해 결정된 바와 같은 치료 단백질의 에피토프에 대한 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체를 제공한다. 일부 구체예에서, 항체는 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 또는 50% 이상으로 에피토프에 대한 결합을 경쟁적으로 억제한다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 치료 단백질의 에피토프에 대한 이차 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다. 기타 추가 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 또는 50% 이상으로 치료 단백질의 에피토프에 대한 이차 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다.

<192> 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 치료 단백질의 작용제 또는 길항제로 작용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 부분적으로 또는 완전히 본 발명의 폴리펩티드와 수용체/리간드 상호작용을 중단시키는 항체를 포함한다. 본 발명은 수용체-특이적 항체 및 리간드-특이

적 항체 둘 모두에 특징이 있다. 본 발명은 또한 리간드 결합을 방지하지 않으나 수용체 활성화를 방지하는 수용체-특이적 항체에 특징이 있다. 수용체 활성화(즉, 신호)는 본원에 기술되거나 당 분야에 널리 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 수용체 활성화는 수용체의 인산화(예를 들어, 티로신 또는 세린/트레오닌) 또는 면역침강후 웨스턴 블로팅 분석법(예를 들어, 상기 기술된 바와 같은 분석법)에 의한 수용체의 기질을 검출함으로써 결정될 수 있다. 특정 구체예에서, 항체의 부재하에서 활성의 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 또는 50% 이상으로 리간드 활성 또는 수용체 활성을 억제하는 항체가 제공된다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 치료 단백질에 결합하는 항체의 융합되지 않은 단편 또는 변이체와 비교하여 리간드 결합의 방지 및/또는 수용체 활성화의 방지에 관하여 유사하거나 실질적으로 유사한 특성을 지닌다.

<193> 본 발명은 또한 리간드 결합 및 수용체 활성화를 차단하는 수용체-특이적 항체뿐만 아니라 수용체 리간드 복합체를 인식하고 결합되지 않은 리간드 또는 결합되지 않은 수용체를 특이적으로 인식하지 않는 항체에 특징이 있다. 마찬가지로, 리간드에 결합하여 수용체에 대한 리간드의 결합을 방지하는 중화 항체뿐만 아니라 리간드에 결합하여 수용체 활성화를 방지하지만 수용체에 대한 리간드의 결합을 방지하지 않는 항체가 본원에 포함된다. 수용체를 활성화시키는 항체가 본원에 추가로 포함된다. 이들 항체는, 예를 들어 수용체의 이합체화를 유도시킴으로써 리간드-매개된 수용체 활성화의 생물학적 활성의 전부 또는 서브셋을 효력을 더하거나 활성화시킴으로써 수용체 작용제로서 작용할 수 있다. 항체는 치료 단백질(예를 들어 표 1에 기술된 것)의 특정 생물학적 활성을 포함하는 생물학적 활성에 대해 작용제, 길항제 또는 역작용제로 특정될 수 있다. 상기 항체 작용제는 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 문헌[PCT 공개 WO 96/40281호; 미국 특허 제 5,811,097호; Deng et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4):755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20 (1996)]가 참조된다. 일부 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 치료 단백질에 결합하는 항체의 융합되지 않은 단편 또는 변이체와 유사하거나 실질적으로 동일한 작용제 또는 길항제 특성을 지닌다.

<194> 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는, 예를 들어 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 방법 둘 모두를 포함하여 치료 단백질을 정제하고, 검출하고, 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 생물학적 샘플에서 치료 단백질의 수준을 정성적 및 정량적으로 측정하기 위한 면역 검정법에 사용된다. 예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 문헌[Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]을 참조된다. 마찬가지로, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은, 예를 들어 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 방법 둘 모두를 포함하여 치료 단백질을 정제하고, 검출하고, 표적화하기 위해 사용될 수 있다.

<195> 치료 단백질에 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 항체에 대한 임의의 타입의 분자의 공유 결합에 의해 변형되는 유도체를 포함한다. 예를 들어, 항체 유도체는 당화, 아세틸화, 페닐화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/블로킹기에 의한 유도, 단백질 분해, 세포내 리간드 또는 기타 단백질 등에 의해 변형된 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 임의의 다양한 화학적 변형이 특이적 화학적 분해, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비고전 아미노산을 함유할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 상기 기술된 바와 같이 변형될 수 있다.

<196> **치료 단백질에 결합하는 항체를 제조하는 방법**

<197> 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 당 분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 생성될 수 있다. 관심 항원에 대한 폴리클로날 항체는 당 분야에 널리 공지된 다양한 공정에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 치료 단백질은 항원에 대해 특이적인 폴리클로날 항체를 함유하는 혈청의 생성을 유도하기 위해 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 숙주 동물로 투여될 수 있다. 프로인트(완전 및 불완전), 미네랄 겔, 예를 들어 알루미늄 히드록사이드, 표면 활성 물질, 예를 들어 리소lesi틴, 플루론산 폴리올, 다음이온(polyanion), 펩티드, 오일 에멀션, 열쇠구멍자조개

해모시아닌, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 인간 애쥬번트, 예를 들어 BCG(칼메트-게랑 간균) 및 코리네 박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*)을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 애쥬번트가 숙주 종에 따른 면역학적 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 애쥬번트는 또한 당 분야에 널리 공지되어 있다.

<198> 모노클로날 항체는 하이브리도마, 제조합, 및 파지 표시 기술, 또는 이들의 조합의 이용을 포함하는 당 분야에 공지된 광범위한 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 당 분야에 공지되고, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 문헌[Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]에 교시된 것을 포함하는 하이브리도마 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체에 제한되지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진핵세포, 원핵세포, 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래되는 항체를 의미하고, 이것이 생성되는 방법은 아니다.

<199> 하이브리도마 기술을 이용하여 특정 항체를 생성하거나 스크리닝하는 방법은 통상적이고 당 분야에 널리 공지되어 있다. 비제한적인 예에서, 마우스는 치료 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체, 알부민 융합 단백질, 또는 이러한 치료 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체 또는 알부민 융합 단백질을 발현하는 세포로 면역화될 수 있다. 면역 반응이 검출되자마자, 예를 들어, 항원 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되자마자, 마우스 비장이 수거되고 비장세포가 단리된다. 다음에, 상기 비장세포는 널리 공지된 기술에 의해 임의의 적합한 골수종 세포, 예를 들어 ATCC로부터 입수가 가능한 세포주 SP20으로부터의 세포로 융합된다. 하이브리도마가 선택되고 제한적인 희석에 의해 클로닝된다. 그 다음에, 하이브리도마 클론은 본 발명의 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 당 분야에 공지된 방법에 의해 검정된다. 높은 수준의 항체를 일반적으로 함유하는 복수는 마우스를 양성 하이브리도마 클론으로 면역화시킴으로써 생성될 수 있다.

<200> 따라서, 본 발명은 모노클로날 항체를 생성하는 방법뿐만 아니라 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법에 의해 생성된 항체를 제공하고, 여기서 예를 들어 하이브리도마는 본 발명의 항원을 이용하여 면역화된 마우스로부터 단리된 비장세포와 골수종 세포를 융합시킨 후, 본 발명의 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대한 융합으로부터 생성된 하이브리도마를 스크리닝함으로써 생성된다.

<201> 폴리클로날 및 모노클로날 인간 B 세포주 둘 모두를 생성하기 위한 또 다른 널리 공지된 방법은 엡스타인 바 바이러스(EBV)를 이용하는 형질전환이다. EBV-형질전환된 B 세포주를 생성하기 위한 프로토콜은, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[*Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., 1994, John Wiley & Sons, NY]의 7.22장에 개시된 프로토콜과 같이 통상적으로 당 분야에 공지되어 있다. 형질전환을 위한 B세포원은 통상적으로 인간 말초혈액이나, 형질전환을 위한 B 세포는 또한 림프절, 편도, 비장, 종양 조직 및 감염된 조직을 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 공급원으로부터 유래될 수 있다. 조직은 일반적으로 EBV 형질전환에 앞서 단일 세포 현탁액으로 만들어진다. 추가로, B 세포 함유 샘플 중의 T 세포를 물리적으로 제거하거나 비활성화(예를 들어, 시클로스포린 A(cyclosporin A)를 처리함)시키는 단계가 이루어지는데, 이는 항-EBV 항체에 대한 개별적 양성혈청반응으로부터의 T 세포가 EBV에 의한 B 세포 불멸화를 억제할 수 있기 때문이다.

<202> 일반적으로, 인간 B 세포를 함유하는 샘플은 EBV로 접종되고, 3-4주 동안 배양된다. EBV의 통상적인 공급원은 B95-8 세포주(ATCC #VR-1492)의 배양 상층액이다. EBV 형질전환의 물리적 징후는 일반적으로 3-4주의 배양 기간의 종료 가까이에서 관찰될 수 있다. 위상차 현미경에 의해, 형질전환된 세포는 크고, 선명하고, 털모양(hairy)으로 보일 수 있고, 이는 빈틈없는 군집의 세포로 집합하는 경향이 있다. 처음으로, EBV 세포주는 일반적으로 폴리클로날이다. 그러나, 세포 배양의 기간이 연장됨에 따라, EBV 세포주는 특정 B 세포 클론의 선택적 성장의 결과로서 모노클로날 또는 폴리클로날이 될 수 있다. 대안적으로, 폴리클로날 EBV 형질전환 세포주는 적절한 융합 파트너에 서브클로닝(예를 들어, 제한 희석 배양에 의함)되거나 융합될 수 있고, 모노클로날 B 세포주를 수득하기 위해 제한 희석으로 플레이팅될 수 있다. EBV 형질전환된 세포주에 대한 적절한 융합 파트너는 마우스 골수종 세포주(예를 들어, SP2/0, XG3-Ag8.653), 헤테로골수종(heteromyeloma) 세포주(인간 × 마우스; 예를 들어, SPAM-8, SBC-H20, 및 CB-F7), 및 인간 세포주(예를 들어, GM 1500, SKO-007, RPMI 8226, 및 KR-4)를 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 인간 B 세포의 EBV-형질전환을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 인간 항체를 생성하는 방법을 제공한다.

<203> 특정 에피토프를 인지하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인(Fab 단편을 생성시킴) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 생성시킴)과 같은 효소를 이용하여 면

역글로불린 분자의 단백질 분해성 분해에 의해 생성될 수 있다. F(ab')₂ 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유한다.

<204> 예를 들어, 치료 단백질에 결합하는 항체는 또한 당 분야에 공지된 다양한 파지 표시 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 파지 표시 방법(phage display method)에서, 기능성 항체 도메인이 이들을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지니는 파지 입자의 표면에 표시된다. 특정 구체예에서, 이러한 파지는 레퍼토리(repertoire) 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 무린)로부터 발현된 항원 결합 도메인을 표시하기 위해 사용될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들어 표지된 항원 또는 고형의 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 이용하여 선택되거나 이로 확인될 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 파지는 통상적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 이항화물 안정화 Fv 항체 도메인을 지닌 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 섬유상 파지이다. 치료 단백질에 결합하는 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파지 표시 방법의 예는 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT 출원 번호 PCT/GB91/01134호; PCT 공개 번호 WO 90/02809호; WO 91/10737호; WO 92/01047호; WO 92/18619호; WO 93/11236호; WO 95/15982호; WO 95/20401호; 및 미국 특허 제5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호 및 제5,969,108호]에 기재된 것을 포함한다.

<205> 상기 참조에 기재된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터의 항체 코딩 영역이 단리될 수 있고, 인간 항체, 또는 임의의 기타 요망되는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이는 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균, 예를 들어 하기에 상세하게 기재되는 것을 포함하는 임의의 요망되는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생성하기 위한 기술이 또한 문헌[PCT 공개 번호 WO 92/22324호; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); and Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); 및 Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (이들의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함됨)]에 기재된 것과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 사용될 수 있다.

<206> 단일-사슬 Fv 및 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예는 문헌[미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); and Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)]에 기재된 것을 포함한다. 인간 및 시험관내 검출 분석에서의 항체의 생체내 용도를 포함하는 몇몇 용도에 대해, 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체가 사용될 수 있다. 키메라 항체는 항체의 다양한 부분이 다양한 동물 종으로부터 유래된 분자, 예를 들어 무린 모노클로날 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 지니는 항체이다. 키메라 항체를 생성하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호]를 참조하라. 인간화된 항체는 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 골격(framework) 영역을 지니는 요망되는 항원에 결합하는 비-인간 종 항체로부터의 항체 분자이다. 종종, 인간 골격 영역 내의 골격 잔기는 항원 결합을 변화, 예를 들어 개선시키기 위해 CDR 공여 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이러한 골격 치환은 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 특정 위치에서 이상한 골격 잔기를 확인하기 위한 항원 결합 및 서열 비교에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위한 CDR과 골격 잔기의 상호작용의 모델링(modeling)에 의해 확인된다(예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된 문헌[Queen et al., 미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)] 참조). 항체는, 예를 들어 CDR-이식(EP 239,400호; PCT 공개 번호 WO 91/09967호; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing)(EP 592,106호; EP 519,596호; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)), 및 사슬 셔플링(shuffling)(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 당 분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 인간화될 수 있다.

<207> 전적으로, 인간 항체는 인간 환자의 치료에 대해 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용하는 상기 기재된 파지 표시 방법을 포함하는 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[미국 특허 제4,444,887

호 및 제4,716,111호; 및 PCT 공개 번호 WO 98/46645호, WO 98/50433호, WO 98/24893호, WO 98/16654호, WO 96/34096호, WO 96/33735호, 및 WO 91/10741호]을 참조하라.

<208> 인간 항체는 또한 기능적 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없으나, 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체는 무작위적으로 또는 상동 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포로 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변 영역, 불변 영역, 및 다양성 영역은 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기 세포로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동 재조합에 의해 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 별개로 또는 동시에 비-기능적이 되도록 할 수 있다. 특히, JH 영역의 동형접합 결실은 내인성 항체 생성을 방지한다. 변형된 배아 줄기 세포는 포배로 확장되고 미세주입되어 키메라 마우스를 생성시킨다. 이후, 키메라 마우스는 개량되어 인간 항체를 발현하는 동형접합 자손을 생성시켰다. 트랜스제닉 마우스는 선택된 항원, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 이용하여 일반적인 방식으로 면역화된다. 항원에 대해 특이적인 모노클로날 항체는 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 면역화된 트랜스제닉 마우스로부터 수득될 수 있다. 인간 면역글로불린 형질전환 유전자(transgene)는 B 세포 분화 동안 트랜스제닉 마우스 재배열에 의해 잠복되고, 이후 종류 전환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 이러한 기술을 이용하여, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생성하는 것이 가능하다. 인간 항체를 생성하기 위한 이러한 기술의 개관은 문헌 [Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]을 참조하라. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체를 위한 이러한 기술 및 이러한 항체를 생성하기 위한 프로토콜의 상세한 논의를 위해서는, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[PCT 공개 번호 WO 98/24893호; WO 92/01047호; WO 96/34096호; WO 96/33735호; 유럽 특허 제0 598 877호; 미국 특허 제5,413,923호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,569,825호; 제5,661,016호; 제5,545,806호; 제5,814,318호; 제5,885,793호; 제5,916,771호; 제5,939,598호; 제6,075,181호; 및 제6,114,598호]을 참조하라. 게다가, 알제닉스, 인크(Abgenix, Inc., Fremont, CA) 및 젠팜(Genpharm, San Jose, CA)사와 같은 회사가 상기 기재된 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대해 특이적인 인간 항체를 제공할 수 있다.

<209> 전적으로, 선택된 에피토프를 인지하는 인간 항체는 "가이드드 셀렉션(guided selection)"으로 언급되는 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 이 방법에서, 선택된 비-인간 모노클로날 항체, 예를 들어 마우스 항체는 동일한 에피토프를 완전하게 인지하는 인간 항체의 선택을 유도하기 위해 사용된다(Jespersen et al., Bio/technology 12:899-903 (1988)).

<210> 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드

<211> 본 발명은 항체 및 이의 단편을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같이 엄격하거나 대안적으로 덜 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 항체, 예를 들어 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 한 구체예에서는 표 2의 "SEQ ID NO:Z" 컬럼에 기재된 "치료 단백질:X"의 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드에 결합하는 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 하이브리드되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

<212> 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 폴리뉴클레오티드가 수득될 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 결정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 뉴클레오티드 서열이 공지된 경우, 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 요컨대, 항체를 엔코딩하는 서열의 일부를 함유하는 오버래핑 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 이들 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 라이게이션 후, 라이게이션된 올리고뉴클레오티드를 PCR에 의해 증폭시키는 것을 포함하는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 문헌[Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)]에 기재됨)로부터 어셈블링될 수 있다.

<213> 대안적으로, 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 적절한 공급원으로부터의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 특정 항체를 엔코딩하는 핵산을 함유하는 클론을 구입가능하지 못하나, 항체 분자의 서열이 공지되어 있는 경우, 면역글로불린을 엔코딩하는 핵산은 서열의 3' 말단 및 5' 말단에 하이브리드가능한 합성 프라이머를 이용한 PCR 증폭 또는, 예를 들어 항체를 엔코딩하는 cDNA 라이브러리로부터의 cDNA 클론을 확인하기 위한 특정 유전자 서열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하는 클로닝에 의해 화학적으로 합성되거나 적절한 공급원(예를 들어, 항체를 발현하기 위해 선택된 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 생성된 항체 cDNA 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리, 또는 상기 조직 또는 세포로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리 A+ RNA)으로부터 수득될 수 있다. PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산은 이후 당 분야에 널리 공지된 임의의 방법을 이용하여 복제가능한 클로닝 벡터로 클로닝될 수 있다(실시예 65 참조).

- <214> 항체의 뉴클레오타이드 서열 및 상응하는 아미노산 서열이 결정되면, 항체의 뉴클레오타이드 서열은 다양한 아미노산 서열을 지니는 항체를 생성하기 위해, 예를 들어 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 생성하기 위해 뉴클레오타이드 서열의 조작을 위해 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기술, 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR 등을 이용하여 조작될 수 있다(예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY]에 기재된 기술 참조).
- <215> 특정 구체예에서, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 서열 과변이의 영역을 결정하기 위한 기타 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 공지된 아미노산 서열에 대한 비교에 의해 상보성 결정 영역(CDR)의 서열을 확인하기 위해 검사될 수 있다. 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여, CDR중 하나 이상이 골격 영역, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이 비-인간 항체를 인간화시키기 위해 인간 골격 영역으로 삽입될 수 있다. 골격 영역은 자연 발생 또는 콘센서스 골격 영역, 예를 들어 인간 골격 영역일 수 있다(예를 들어, 인간 골격 영역의 목록에 대해서는 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)] 참조). 한 양태에서, 골격 영역과 CDR의 조합에 의해 생성된 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 엔코딩한다. 또 다른 양태에서, 상기 논의된 바와 같이, 하나 이상의 아미노산의 치환이 골격 영역 내에서 이루어질 수 있고, 예를 들어 아미노산 치환은 항원에 대한 항체의 결합을 개선시킨다. 추가로, 이러한 방법은 하나 이상의 사슬내 이황화 결합이 결핍된 항체 분자를 생성하기 위해 사슬내 이황화 결합에 관여하는 하나 이상의 가변 영역 시스테인 잔기의 아미노산 치환 또는 결실을 이루도록 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 기타 변경은 본 발명 및 당 분야에 포함된다.
- <216> 게다가, 적절한 생물 활성의 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 스플라이싱시킴으로써 "키메라 항체"의 생성을 위해 개발된 기술이 사용될 수 있다(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985)). 상기에 기재된 바와 같이, 키메라 항체는 다양한 부분이 다양한 동물 종으로부터 유래된 분자, 예를 들어 뮤린 mAb으로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 지니는 분자, 예를 들어 인간화된 항체이다.
- <217> 대안적으로, 단일 사슬 항체의 생성을 위해 기재된 기술(미국 특허 제4,946,778호; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); and Ward et al., Nature 334:544-54 (1989))이 단일 사슬 항체를 생성하기 위해 적용될 수 있다. 단일 사슬 항체는 단일 사슬 폴리펩티드를 생성시키는 아미노산 브리지(bridge)를 통해 Fv 영역의 중쇄 및 경쇄 단편을 연결시킴으로써 형성된다. 대장균에서의 기능적 Fv 단편의 어셈블링을 위한 기술이 또한 사용될 수 있다(Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).
- <218> **항체의 재조합 발현**
- <219> 항체 또는 이의 단편, 유도체 또는 유사체(예를 들어, 항체의 중쇄 또는 경쇄 또는 단일 사슬 항체)의 재조합 발현은 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 작제물을 필요로 한다. 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 일부(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 함유함)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 수득되면, 당 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 재조합 DNA 기술에 의해 항체 분자의 생성을 위한 벡터가 생성될 수 있다. 따라서, 항체 엔코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법이 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 작제하기 위해 사용될 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전적 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 항체 분자, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 86/05807호; PCT 공개 번호 WO 89/01036호; 및 미국 특허 제5,122,464호 참조), 항체 분자의 가변 도메인은 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위한 벡터로 클로닝될 수 있다.
- <220> 발현 벡터는 통상적인 기술에 의해 숙주 세포로 이동되고, 이후 트랜스펙션된 세포는 항체를 생성하기 위한 통상적인 기술에 의해 배양된다. 따라서, 본 발명은 이중유래 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 항체, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 단일 사슬 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포를 포함

한다. 이중-사슬 항체의 발현을 위한 일부 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 둘 모두를 엔코딩하는 벡터는 하기에 상세하게 기재되는 바와 같이 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위한 숙주 세포에서 공동발현될 수 있다.

<221> 본 발명의 항체 분자를 발현시키기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 코딩 서열이 생성된 후 정제될 수 있는 비히클을 나타내고, 또한 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열이 형질전환되거나 트랜스펙션되는 경우 정위(in situ)에서 본 발명의 항체 분자를 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이는 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균(예를 들어, 대장균, 고초균)과 같은 미생물; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스, 피키아); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추 모자이크바이러스, CaMV; 담배 모자이크병 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 유전체(예를 들어, 금속티오네인(metallothionein) 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기(late) 프로모터; 우두 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래된 프로모터를 함유하는 재조합 발현 작제물을 포함하는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 양태에서, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해 세균 세포, 예를 들어 대장균, 한 추가 양태에서 진핵 세포가 재조합 항체 분자의 발현을 위해 사용된다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로 바이러스로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 성분(major intermediate early gene promoter element)과 같은 벡터와 결합된 포유동물 세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 세포(CHO)는 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

<222> 세균 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 항체 분자를 위한 용도에 따라 이롭게 선택될 수 있다. 예를 들어, 매우 다량의 이러한 단백질이 생성되는 경우, 항체 분자의 약학적 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제되는 융합 단백질의 높은 수준의 발현과 관련된 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는 항체 코딩 서열이 lac Z 코딩 영역을 지닌 벡터로 인 프레임(in frame)으로 개별적으로 라이게이션되어 융합 단백질이 생성될 수 있는 대장균 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), pIN 벡터(Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST)를 지닌 융합 단백질로서 외부 폴리펩티드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 매트릭스 글루타티온-아가로오스 비드에 대한 흡수 및 결합 후 자유 글루타티온의 존재하에서 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 분해 부위를 포함하도록 고안되어 있어, 클로닝된 표적 유전자 생성물은 GST 부분으로부터 방출될 수 있다.

<223> 곤충 시스템에서, 핵다각체병 핵 폴리헤드론 형성 바이러스(Autographa californial nuclear polyhedrosis virus)(AcNPV)가 외부 유전자를 발현시키기 위한 벡터로 사용된다. 바이러스는 스포도프테라 프루지페르다(Spodoptera frugiperda) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)으로 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 조절하에 위치될 수 있다.

<224> 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기재 발현 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로 사용되는 경우, 관심 항체 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 셋으로 나뉜 선도 서열로 라이게이션될 수 있다. 이후, 이러한 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 유전체로 삽입될 수 있다. 바이러스 유전체의 비-필수 영역(예를 들어, E1 또는 E3) 내의 삽입은 가변적이고 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 발생시킬 것이다(예를 들어, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984) 참조). 특정 개시 신호가 또한 삽입된 항체 코딩 서열의 효과적인 번역을 위해 필요할 수 있다. 이러한 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 더욱이, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위한 요망되는 코딩 서열의 관독들과 일치하여야 한다. 이러한 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성의 다양한 발생원일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 성분, 전사 종결자 등의 포함에 의해 향상될 수 있다(Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987) 참조).

<225> 또한, 숙주 세포주는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 요망되는 특정 방식으로 유전자 생성물을 변경하고 가공하도록 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 당화) 및 가공(예를 들어, 분해)은 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 다양한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 가공 및 변형에 대해 특정

적이고 특정한 메커니즘을 지닌다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 선택될 수 있다. 이를 위해서, 일차 전사체의 적당한 가공, 당화, 및 유전자 생성물의 인산화를 위한 세포내 기구를 소유하는 진핵세포 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, 및 특히 유방암 세포주, 예를 들어 BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상적인 유선 세포주, 예를 들어 CRL7030 및 Hs578Bst를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<226> 한 구체예에서, 재조합 단백질의 장기간의 고수율 생성을 위해, 상기 단백질은 안정적으로 발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주가 고안될 수 있다. 바이러스 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 이용하기 보다, 숙주 세포는 적절한 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 아데닐중합체형성 부위 등)에 의해 조절되는 DNA, 및 선택 마커를 이용하여 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 고안된 세포는 보강 배지에서 1-2일 동안 성장하게 한 후, 선택 배지로 전환될 수 있다. 재조합 플라스미드의 선택 마커는 선택에 대한 내성을 수여하고, 세포가 이들의 염색체 내로 플라스미드를 안정적으로 통합하도록 하고, 차례로 클로닝되고 세포주내로 확장될 수 있는 유전자좌를 형성하도록 성장시킨다. 이러한 방법은 항체 분자를 발현하는 세포주를 고안하기 위해 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 고안된 세포주는 항체 분자와 직접적 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물의 스크리닝 및 평가에 특이 유용할 수 있다.

<227> 각각 tk-, hgprr- 또는 aprt-세포에 사용될 수 있는 단순헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제(Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라아제(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), 및 아데닌 포스포리보실트랜스페라아제(Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) 유전자를 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 선택 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성이 하기의 유전자에 대한 선택의 기초로 사용될 수 있다: 메토크렉세이트에 내성을 수여하는 dhfr(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); 미코페놀린산에 내성을 수여하는 gpt(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); 아미노글리코시드 G-418에 내성을 수여하는 neo(Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215 (1993)); 및 히그로마이신에 내성을 수여하는 hygro(Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). 재조합 DNA 기술의 당 분야에 일반적으로 공지된 방법이 요망되는 재조합 클론을 선택하기 위해 통상적으로 적용될 수 있고, 이러한 방법은, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)]에 기재되어 있다.

<228> 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(개관을 위해 문헌[Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)]) 참조). 항체를 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 억제제의 수준의 증가는 마커 유전자의 복제의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 관련되어 있으므로, 항체의 생성이 또한 증가할 것이다(Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

<229> 선택 마커로서 글루타민 합성효소(GS) 또는 DHFR을 사용하는 벡터는 각각 약물 메티오닌 설폰시민 또는 메토크렉세이트의 존재하에서 증폭될 수 있다. 글루타민 합성효소 기제 벡터의 장점은 글루타민 합성효소 음성인 세포주(예를 들어, 무린 골수종 세포주, NS0)에서의 이용가능성이다. 글루타민 합성효소 발현 시스템은 또한 내인성 유전자의 기능을 방지하기 위한 추가의 억제제를 제공함으로써 글루타민 합성효소 발현 세포(예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포)에서 작용할 수 있다. 글루타민 합성효소 발현 시스템 및 이의 성분은 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 PCT 공개 번호 W087/04462호; W086/05807호; W089/01036호; W089/10404호; 및 W091/06657호에 상세하기 기재되어 있다. 추가로, 본 발명에 따라 사용될 수 있는 글루타민 합성효소 발현 벡터는, 예를 들어 론자 바이오로지스, 인크(Lonza Biologics, Inc., Portsmouth, NH)사를 포함하는 공급업체에서 시판된다. 무린 골수종 세포의 GS 발현 시스템을 이용하는 모노클로날 항체의 발현 및 생성은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992)] 및 [Biblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995)]에 기재되어 있다.

<230> 숙주 세포는 본 발명의 두개의 발현 벡터, 즉 중쇄 유래 폴리펩티드를 엔코딩하는 첫번째 벡터 및 경쇄 유래 폴

리펩티드를 엔코딩하는 두번째 벡터와 함께 공동-트랜스펙션될 수 있다. 두개의 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드들 모두를 엔코딩하고, 이의 발현을 가능하게 하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 경쇄는 과량의 유독한 자유 중쇄를 회피하기 위해 중쇄 앞에 위치되어야 한다(Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 유전체 DNA를 포함할 수 있다.

<231> 본 발명의 항체 분자가 동물에 의해 생성되거나, 화학적으로 합성되거나, 재조합적으로 발현된 후, 이는 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성, 특히 단백질 A 후의 특이적 항원에 대한 친화성 크로마토그래피, 및 크기 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 용해도차, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 기타 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 또한, 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체 또는 이의 단편은 정제를 촉진하기 위해 본원에 기재되거나 당 분야에 널리 공지된 이중유래 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

<232> **항체의 변형**

<233> 치료 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합하는 항체는 마커 서열, 예를 들어 정제를 촉진하는 펩티드에 융합될 수 있다. 다른 구체예에서, 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드, 예를 들어 pQE 벡터에 제공된 태그(tag)(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 등이고, 이들 중 다수는 시판된다. 예를 들어, 문헌[Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)]에 기재된 헥사-히스티딘이 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 기타 펩티드 태그는 인플루엔자 적혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 적혈구응집소 태그("HA 태그"로도 언급됨)(Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) 및 "플래그(flag)" 태그를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

<234> 본 발명은 추가로 진단제 또는 치료제에 컨쥬게이션된 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 항체는, 예를 들어 소정의 치료법의 효력을 결정하기 위한 임상 시험 과정의 일부로서 종양의 발달 또는 진행을 모니터링하는데 진단적으로 사용될 수 있다. 항체를 검출가능한 물질에 커플링시킴으로써 검출이 촉진될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보조 분자족, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자방출 단층촬영을 이용하는 양전자방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출가능한 물질은 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 항체(또는 이의 단편)에 직접적으로 커플링 또는 컨쥬게이션되거나, 중간물질(예를 들어, 당 분야에 공지된 링커)을 통해 간접적으로 항체(또는 이의 단편)에 커플링 또는 컨쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 진단법으로 사용하기 위해 항체와 컨쥬게이션될 수 있는 금속 이온에 대해서는 미국 특허 제4,741,900호를 참조하라. 적절한 효소의 예는 호스라디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린스테라아제를 포함하고; 적절한 보조 분자족 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적절한 형광 물질의 예는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시페라아제, 루시페린, 및 애큐오린을 포함하고; 적절한 방사성 물질의 예는 125I, 131I, 111In 또는 99Tc를 포함한다. 검출가능한 물질의 기타 예는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.

<235> 추가로, 본 발명의 항체는 치료 부분, 예를 들어 세포독소, 예를 들어 세포증식 억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어 알파-방출기, 예를 들어 213Bi에 컨쥬게이션될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 이의 예는 파클리탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로파놀올, 및 퓨로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료제는 항대사물질(예를 들어, 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴, 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 악티노마이신(이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 유사분열 억제제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나, 이에 제한되지

는 않는다.

- <236> 본 발명의 컨쥬게이트는 소정의 생물학적 반응을 변형시키기 위해 사용될 수 있고, 치료제 또는 약물 부분은 고전적인 화학적 치료제에 제한되는 것으로 간주되는 것은 아니다. 예를 들어, 약물 부분은 요망되는 생물학적 활성을 지니는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 독소, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자, 알파-인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 아포토시스 작용제, 예를 들어 TNF-알파, TNF-베타, AIM I(국제 공개 번호 WO 97/33899호 참조), AIM II(국제 공개 번호 WO 97/34911호 참조), Fas 리간드(Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF(국제 공개 번호 WO 99/23105호 참조), 혈전용해제 또는 항혈관형성제, 예를 들어 안지오테스틴 또는 엔도스테틴; 또는 생물학적 반응 조절물질, 예를 들어 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 집락 자극인자("GM-CSF"), 과립구 집락 자극인자("G-CSF"), 또는 기타 성장 인자를 포함할 수 있다.
- <237> 항체는 또한 표적 항원의 면역검정 또는 정제에 특히 유용한 고형의 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고형의 지지체는 유리, 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- <238> 항체에 대한 이러한 치료 부분을 컨쥬게이션시키는 기술은 널리 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)]을 참조하라.
- <239> 대안적으로, 항체는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Segal, 미국 특허 제4,676,980호]에 기재된 바와 같이 항체 헤테로컨쥬게이트를 형성하기 위해 이차 항체에 컨쥬게이션될 수 있다.
- <240> 단독으로 투여되거나 세포독성 인자(들) 및/또는 사이토카인과 조합되어 투여될 수 있는, 치료 부분이 컨쥬게이션되거나 컨쥬게이션되지 않은 항체가 치료제로 사용될 수 있다.
- <241> **항체-알부민 융합**
- <242> 치료 단백질에 결합하고 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당할 수 있는 항체는 표 1의 "치료 단백질 X" 컬럼에 기재된 치료 단백질에 결합하는 항체, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- <243> 특정 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VH 도메인을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 하나, 두개 또는 세개의 VH CDR을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VH CDR1을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VH CDR2를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VH CDR3를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다.
- <244> 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VL 도메인을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 하나, 두개 또는 세개의 VL CDR을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VL CDR1을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합

단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VL CDR2를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 VL CDR3를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다.

<245> 다른 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 하나, 두개, 세개, 네개, 다섯개, 또는 여섯개의 VH 및/또는 VL CDR을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다.

<246> 일부 구체예에서, 치료 단백질에 면역특이적으로 결합하고 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 해당하는 항체의 단편 또는 변이체는 (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO:4)와 같은 펩티드 링커에 의해 치료 항체의 VL 도메인에 결합된 치료 항체의 VH 도메인을 포함하는 scFv를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된다.

<247> 면역표현형검사

<248> 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 세포주 및 생물학적 샘플의 면역표현형검사에 사용될 수 있다. 본 발명의 치료 단백질은 세포-특이적 마커, 더욱 특히 특정 세포 유형의 분화 및/또는 성숙의 다양한 단계에서 다양하게 발현되는 세포내 마커로서 유용할 수 있다. 특정 에피토프, 또는 에피토프의 조합물에 대한 모노클로날 항체(또는 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질)는 마커를 발현하는 세포 집단의 스크리닝을 가능하게 한다. 마커(들)을 발현하는 세포 집단의 스크리닝을 위해 모노클로날 항체(또는 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질)를 이용하는 다양한 기술이 사용될 수 있고, 이는 항체-코팅된 자기 비드를 이용하는 자기 분리, 고정 매트릭스(즉, 플레이트)에 부착된 항체를 이용한 "패닝(panning)", 및 유세포 분석을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제5,985,660호; 및 문헌[Morrison *et al.*, *Cell*, 96:737-49 (1999)] 참조).

<249> 이들 기술은 혈액학적 암(즉, 급성 백혈병 환자의 최저잔류병(MRD)) 및 이식-대-숙주병(GVHD)을 방지하기 위한 이식에서의 "비-자기(non-self)" 세포를 이용하여 발견될 수 있는 바와 같은 세포의 특정 집단의 스크리닝을 가능하게 한다. 대안적으로, 이들 기술은 인간 체대혈에서 발견될 수 있는 바와 같은 증식 및/또는 분화를 겪을 수 있는 조혈간세포 및 프로제니터 세포의 스크리닝을 가능하게 한다.

<250> 치료 단백질에 결합하는 항체 및 치료 단백질에 결합하는 항체의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질의 특성규명

<251> 본 발명의 항체 또는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 다양한 방법으로 특성규명될 수 있다. 특히, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본원에 기재된 기술 또는 당 분야에 공지된 통상적으로 변형된 기술을 이용하여 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 결합하는 항체에 상응하게 치료 단백질에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 검정될 수 있다.

<252> 특정 단백질 또는 에피토프에 (특이적으로) 결합하는 본 발명의 항체 또는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 능력에 대한 검정은 용액 중(예를 들어, Houghten, *Bio/Techniques* 13:412-421(1992)), 비드 상(예를 들어, Lam, *Nature* 354:82-84 (1991)), 칩 상(예를 들어, Fodor, *Nature* 364:555-556 (1993)), 세균(예를 들어, 미국 특허 제 5,223,409호), 포자(예를 들어, 미국 특허 제5,571,698호; 제5,403,484호; 및 제5,223,409호), 플라스미드(예를 들어, Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869 (1992)) 또는 파지(예를 들어, Scott and Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin, *Science* 249:404-406 (1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1990); 및 Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991))(각각의 전체 내용은 참조로 본원에 포함됨)에서 수행될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 본원에 기재되거나 당 분야에 달리 공지된 기술 또는 통상적으로 변형된 상기 기술을 이용하여 특정 단백질 또는 에피토프에 대한 이들의 특이성 및 친화성에 대해 검정될 수 있다.

<253> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 기타 항원(예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분과 상응하게 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 분자(들)과

서열/구조 보존성을 지니는 분자)과의 교차-반응성에 대해 검정될 수 있다.

<254> (면역특이적) 결합 및 교차-반응성을 검정하기 위해 사용될 수 있는 면역검정법은 웨스턴 블로팅, 방사선면역측정법, ELISA(효소 면역측정법), "샌드위치" 면역검정법, 면역침강 검정법, 침강 반응, 겔 확산 침강 반응, 면역 확산 검정법, 응집 검정법, 보체-결합 검정법, 면역방사 검정법, 형광 면역검정법, 및 단백질 A 면역검정법 등과 같은 기술을 이용하는 경쟁적 및 비-경쟁적 검정 시스템을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 검정법은 통상적이고 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York] 참조). 예시적 면역검정법은 하기에 간단히 기재되어 있다(이에 제한되지는 않는다).

<255> 면역침강 프로토콜은 일반적으로 용해 완충용액, 예를 들어 단백질 포스파타아제 및/또는 프로테아제 억제제(예를 들어, EDTA, PMSF, 아프로티닌, 소듐 바나데이트)로 보충된 RIPA 완충용액(1% NP-40 또는 Triton X-100, 1% 소듐 테옥시콜레이트, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M 인산나트륨(pH 7.2), 1% 트라실롤)중에 세포 집단을 용해시키고, 세포 용해물에 본 발명의 항체 또는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 용합 단백질을 첨가하고, 40℃에서 일정 기간(예를 들어 1 내지 4시간) 동안 인큐베이팅시키고, 단백질 A 및/또는 단백질 G 세파로오즈 비드(또는 알부민 용합 단백질이 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 경우 적절한 항-이디오타입 항체 또는 항-알부민 항체로 코팅된 비드)를 세포 용해물에 첨가하고, 40℃에서 약 1시간 이상 인큐베이팅시키고, 용해 완충용액에서 비드를 세척하고, SDS/샘플 완충용액에서 비드를 재현탁시키는 것을 포함한다. 특정 항원을 면역침강시키는 본 발명의 항체 또는 알부민 용합 단백질의 능력은, 예를 들어 웨스턴 블로팅 검정에 의해 측정될 수 있다. 당업자는 항원에 대한 항체 또는 알부민 용합 단백질의 결합을 증가시키고 백그라운드를 감소시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터를 인지할 것이다(예를 들어, 세파로오즈 비드를 이용한 세포 용해물의 사전-세척). 면역침강 프로토콜에 대한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1]을 참조하라.

<256> 웨스턴 블로팅 검정은 일반적으로 단백질 샘플을 준비하고, 폴리아크릴아미드 겔(예를 들어, 항원의 분자량에 따라 8%-20% SDS-PAGE)에서 단백질 샘플을 전기영동시키고, 폴리아크릴아미드 겔로부터의 단백질 샘플을 막, 예를 들어 니트로셀룰로오스, PVDF 또는 나일론으로 이동시키고, 블로킹 용액(예를 들어, 3% BSA 또는 무지방유를 지니는 PBS)에서 막을 블로킹시키고, 세척 완충용액(예를 들어, PBS-Tween 20)에서 막을 세척하고, 본 발명의 항체 또는 알부민 용합 단백질(블로킹 완충용액에 희석됨)을 막에 적용시키고, 세척 완충용액에서 막을 세척하고, 블로킹 완충용액에 희석된 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제) 또는 방사성 분자(예를 들어, ³²P 또는 ¹²⁵I)에 컨쥬게이션된 이차 항체(알부민 용합 단백질을 인지함, 예를 들어 항-인간 혈청 알부민 항체)를 적용시키고, 완충 용액중에서 막을 세척하고, 항원의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 당업자는 검출되는 신호를 증가시키고 백그라운드 노이즈를 감소시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터를 인지할 것이다. 웨스턴 블로팅 프로토콜에 대한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1]을 참조하라.

<257> ELISA는 항원으로 96-웰 미세역가 플레이트의 웰을 코팅시키고, 웰에 결합하지 않는 항원을 세척하고, 검출가능한 화합물, 예를 들어 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제)에 컨쥬게이션된 본 발명의 항체 또는 알부민 용합 단백질(치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함함)을 웰에 첨가하고, 일정 기간 동안 인큐베이팅시키고, 결합되지 않거나 비-특이적으로 결합된 알부민 용합 단백질을 세척하고, 웰을 코팅하는 항원에 특이적으로 결합된 항체 또는 알부민 용합 단백질의 존재를 검출하는 것을 포함한다. ELISA에서, 항체 또는 알부민 용합 단백질은 검출가능한 화합물에 컨쥬게이션되지 않고, 대신 검출가능한 화합물에 컨쥬게이션된 이차 항체(항체 또는 알부민 용합 단백질을 각각 인지함)가 웰에 첨가될 수 있다. 추가로, 항원으로 웰을 코팅하는 것 대신, 항체 또는 알부민 용합 단백질이 웰에 코팅될 수 있다. 이 경우, 검출가능한 분자는 검출가능한 화합물, 예를 들어 효소 기질(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제)에 컨쥬게이션된 항원일 수 있다. 당업자는 검출되는 신호를 증가시키기 위해 변형될 수 있는 파라미터뿐만 아니라 당 분야에 공지된 ELISA의 기타 변형을 인지할 것이다. ELISA에 대한 추가의 논의는, 예를 들어 문헌[Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1]을 참조하라.

<258> 단백질, 항원 또는 에피토프에 대한 알부민 용합 단백질의 결합 친화성 및 항체 또는 알부민 용합 단백질과 단

백질/항원/에피토프 상호작용의 분리 속도(off-rate)는 경쟁적 결합 검정에 의해 결정될 수 있다. 경쟁적 결합 검정의 한 예는 증가되는 양의 표지되지 않은 항원의 존재하에서 표지된 항원(예를 들어, ^3H 또는 ^{125}I)과 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질을 인큐베이션하고, 표지된 항원에 결합된 항체를 검출하는 것을 포함하는 방사면역측정법이다. 특정 단백질, 항원 또는 에피토프에 대한 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질의 친화성 및 결합 분리 속도는 스캐차드 플롯 검정(Scatchard plot analysis)에 의한 데이터로부터 결정될 수 있다. 항체 또는 알부민 융합 단백질과 동일한 단백질, 항원 또는 에피토프에 결합하는 이차 단백질과의 경쟁은 또한 방사면역측정법을 이용하여 결정될 수 있다. 이 경우, 단백질, 항원 또는 에피토프는 본 발명의 알부민 융합 단백질과 동일한 단백질, 항원 또는 에피토프에 결합하는 증가되는 양의 표지되지 않은 이차 단백질의 존재하에서 표지된 화합물(예를 들어, ^3H 또는 ^{125}I)에 컨쥬게이션된 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질과 인큐베이션된다.

<259> 한 구체예에서, BIAcore 동역학 검정은 단백질, 항원 또는 에피토프에 대한 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질의 결합 및 분리 속도를 결정하기 위해 사용될 수 있다. BIAcore 동역학 검정은 표면에 특정 폴리펩티드, 항원 또는 에피토프, 항체 또는 알부민 융합 단백질이 각각 고정된 칩으로부터 항체, 알부민 융합 단백질, 또는 특정 폴리펩티드, 항원 또는 에피토프의 결합 및 해리를 검정하는 것을 포함한다.

<260> 치료 용도

<261> 본 발명은 추가로 기재된 질병, 장애 또는 질환중 하나 이상을 치료하기 위해 동물, 예를 들어 포유동물 또는 인간 환자에게 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질(또는 이의 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물)을 투여하는 것을 포함하는 항체-기초 요법에 관한 것이다. 본 발명의 치료 화합물은 본 발명의 항체(본원에 기재된 이의 단편, 유사체 및 유도체를 포함함), 본 발명의 항체(본원에 기재된 이의 단편, 유사체 및 유도체, 및 항이디오타입 항체를 포함함)를 엔코딩하는 핵산, 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질, 및 이러한 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본원에 기재된 질병, 장애 또는 질환중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 장애 또는 질환을 치료하거나, 억제하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 장애 또는 질환의 치료 및/또는 예방은 상기 질병, 장애 또는 질환과 관련된 증상을 완화시키는 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 약학적으로 허용되는 조성물로 제공될 것이다.

<262> 특정 구체예에서, 본 발명은 신경 장애, 면역계 장애, 근 장애, 생식 장애, 위장 장애, 폐 장애, 심혈관 장애, 신장 장애, 증식성 장애, 및/또는 암성 질병 및 질환, 및/또는 본원의 다른 곳에 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 질병, 장애 또는 질환을 치료하기 위해 동물, 예를 들어 포유동물 또는 인간 환자에게 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 항체-기초 요법에 관한 것이다. 본 발명의 치료 화합물은 본 발명의 항체(예를 들어, 포유동물 세포의 세포 표면에서 발현된 전장의 단백질에 대한 항체; 치료 단백질의 에피토프에 대한 항체) 및 본 발명의 항체(본원에 기재된 바와 같이, 이의 단편, 유사체 및 유도체, 및 항-이디오타입 항체를 포함함)를 엔코딩하는 핵산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 항체는 본원에 기재된 질병, 장애 또는 질환중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 장애 또는 질환을 치료하거나, 억제하거나, 예방하기 위해 사용될 수 있다. 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 장애 또는 질환의 치료 및/또는 예방은 상기 질병, 장애 또는 질환과 관련된 증상을 완화시키는 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 약학적으로 허용되는 조성물로 제공될 수 있다.

<263> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 치료적으로 사용될 수 있는 방법의 개요는 체내에 치료 단백질을 국소적으로 또는 전신적으로 결합시키거나, 예를 들어 보체(CDC) 또는 효과기 세포(ADCC)에 의해 매개되는 바와 같은 항체의 직접적인 세포 독성에 의해 결합시키는 것을 포함한다. 이들 방법중 일부는 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다. 본원에 제공된 교시에 의해, 당업자는 과도한 실험 없이 진단, 모니터 또는 치료 목적을 위해 치료 단백질에 결합하는 항

체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질을 사용하는 방법을 인지할 것이다.

<264> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 알부민 융합 단백질은 유리하게는 예를 들어 항체와 상호작용하는 효과기 세포의 수 또는 활성을 증가시킬 수 있는 기타 모노클로날 또는 키메라 항체, 또는 림포카인 또는 조혈 성장 인자(예를 들어, IL-2, IL-3 및 IL-7)와 함께 사용될 수 있다.

<265> 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 단독으로 또는 기타 유형의 치료(예를 들어, 방사선 요법, 화학 요법, 호르몬 요법, 면역요법 및 항-종양제)과 조합되어 투여될 수 있다. 일반적으로, 환자의 종과 동일한 종인 종 기원 또는 종 반응성(항체의 경우)의 생성물이 투여될 수 있다. 따라서, 한 구체예에서, 인간 항체, 이의 단편, 유도체, 유사체, 또는 핵산이 치료 또는 예방을 위해 인간 환자에게 투여된다.

<266> 한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 및 이들의 단편과 관련된 면역검정 및 장애의 요법을 위해 치료 단백질, 이의 단편 또는 영역에 대한 고 친화성이고/이거나 생체내에서 효능있는 억제 및/또는 중화 항체(또는 이와 관련된 알부민 융합 단백질)가 사용된다. 이러한 항체, 단편, 또는 영역은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 및 이들의 단편에 대해 친화성을 지닐 것이다. 결합 친화성은 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M 미만의 해리상수 또는 Kd를 포함한다. 다른 결합 친화성은 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M 또는 10^{-8} M 미만의 해리상수 또는 Kd를 지닌 것을 포함한다. 또 다른 결합 친화성은 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, 또는 10^{-15} M 미만의 해리상수 또는 Kd를 지니는 것을 포함한다.

<267> 유전자 요법

<268> 특정 구체예에서, 치료 단백질에 결합하는 항체 또는 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 서열을 포함하는 핵산이 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병 또는 장애를 치료하거나, 억제하거나, 예방하기 위해 유전자 요법의 방식으로 투여된다. 유전자 요법은 발현되거나 발현가능한 핵산을 피검체에 투여함으로써 수행되는 요법을 의미한다. 본 발명의 구체예에서, 핵산은 치료 효과를 매개하는 이들의 엔코딩된 단백질을 생성한다.

<269> 당 분야에서 이용가능한 유전자 요법에 대한 임의의 방법이 본 발명에 사용될 수 있다. 예시적 방법은 본 출원의 다른 곳에 보다 상세하게 기재되어 있다.

<270> 치료 또는 예방 활성의 입증

<271> 본 발명의 화합물 또는 약학적 조성물은 인간에게 사용되기 이전에 요망되는 치료 또는 예방 활성에 대해 시험관내에서 시험된후, 생체내에서 시험된다. 예를 들어, 화합물 또는 약학적 조성물의 치료 또는 예방 용도를 입증하기 위한 시험관내 검정은 세포주 또는 환자 조직 샘플에 대한 화합물의 효과를 포함한다. 세포주 및/또는 조직 샘플에 대한 화합물 또는 조성물의 효과는 로제트(rossette) 형성 검정 및 세포 용해 검정을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 결정될 수 있다. 본 발명에 따르면, 특정 화합물의 투여가 징후를 나타내는지의 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있는 시험관내 검정은 환자 조직 샘플이 배양되어 성장되고, 달리 투여된 화합물에 노출되어, 조직 샘플에 대한 화합물의 효과가 관찰되는 시험관내 세포 배양 검정을 포함한다.

<272> 치료/예방 투여 및 조성물

<273> 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물 또는 약학적 조성물, 예를 들어 알부민 융합 단백질 또는 이의 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 피검체에 투여함으로써 치료하고, 억제하고, 예방하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 화합물은 실질적으로 정제(예를 들어, 효과를 제한하거나 요망되지 않는 부작용을 일으키는 물질을 실질적으로 제거)된다. 피검체는 소, 돼지, 말, 닭, 고양이, 개 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 동물이고, 한 구체예에는 포유동물이고, 또 다른 구체예에는 인간일 수 있다.

<274> 화합물이 핵산 또는 면역글로불린을 포함하는 경우 사용될 수 있는 포몰레이션 및 투여 방법은 하기에 기재되어

있고; 추가의 적절한 포물레이션 및 투여 경로는 본원의 하기에 기재된 것으로부터 선택될 수 있다.

- <275> 다양한 전달 시스템, 예를 들어 리포솜내 피막형성, 미세입자, 미세캡슐, 화합물을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내이입(예를 들어, 문헌[Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)] 참조), 레트로바이러스 또는 기타 바이러스의 일부로서 핵산의 작제 등이 본 발명의 화합물을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 도입 방법은 피내, 근내, 복막내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외, 및 구강 경로를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 화합물 또는 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사에 의하거나, 상피 또는 점막피부 내막(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통해 투여될 수 있고, 기타 생물학적 활성체와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적 또는 국소적일 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 화합물 또는 조성물을 뇌실 내 및 수막강내 주사를 포함하는 임의의 적절한 경로에 의해 중추신경계로 도입시키는 것이 바람직할 수 있고; 뇌실내 주사는 뇌실내 카테터, 예를 들어 저장소, 예를 들어 옴마야(Ommaya) 저장소에 부착된 카테터에 의해 촉진될 수 있다. 폐 투여는 또한, 예를 들어 흡입기 또는 분무기, 및 분무제를 지닌 포물레이션의 사용에 의해 이용될 수 있다.
- <276> 특정 구체예에서, 본 발명의 약학적 화합물 또는 조성물이 치료를 요하는 부위에 국소적으로 투여되는 것이 요망될 수 있고; 이는, 예를 들어 수술중 국소 주입, 예를 들어 수술 후의 상처 드레싱과 관련한 국소 적용, 주사, 카테터, 좌약, 임플란트(이는 시알라스틱(sialastic) 막과 같은 막을 포함하는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질, 또는 섬유임)에 의해 달성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 본 발명의 항체를 포함하는 단백질이 투여되는 경우, 단백질이 사용하는 물질에 흡수되지 않도록 주의해야 한다.
- <277> 또 다른 구체예에서, 화합물 또는 조성물은 비히클, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다(문헌[Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*] 참조).
- <278> 또 다른 구체예에서, 화합물 또는 조성물은 조절 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 구체예에서, 펌프가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)] 참조). 또 다른 구체예에서, 중합 물질이 사용될 수 있다(문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); see also Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)] 참조). 또 다른 구체예에서, 조절 방출 시스템이 치료 표적, 예를 들어 뇌의 부근에 위치될 수 있어, 단지 전신 용량의 일부만 필요할 수 있다(예를 들어, 문헌[Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)] 참조).
- <279> 기타 조절 방출 시스템이 문헌[Langer (Science 249:1527-1533 (1990))]의 개관에 논의되어 있다.
- <280> 본 발명의 화합물이 단백질을 엔코딩하는 핵산인 특정 구체예에서, 레트로바이러스 바이러스(미국 특허 제4,980,286호 참조)의 사용에 의하거나, 직접 주사에 의하거나, 미세입자 봄바드먼트(bombardment)(예를 들어, 유전자총(gene gun); 바이오리스틱(Biolistic), 듀폰(Dupont)), 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 트랜스펙션 작용제를 이용한 코팅의 사용에 의하거나, 핵산을 핵으로 진입시키는 것으로 공지된 호메오박스-유사 펩티드(homeobox-like peptide)(문헌[Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868(1991) 참조] 등과 관련하여 투여함으로써 세포내에 존재하게 하기 위하여, 핵산은 이를 적절한 핵산 발현 바이러스의 일부로서 작제하고, 이를 투여함으로써 핵산의 엔코딩되는 단백질의 발현을 촉진시키기 위해 생체내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 세포내로 도입되어 발현을 위해 상동 재조합에 의해 숙주 세포 DNA 내로 통합될 수 있다.
- <281> 본 발명은 또한 약학적 조성물, 예를 들어 알부민 융합 단백질을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성된 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 치료적 유효량의 화합물(예를 들어, 알부민 융합 단백질), 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 특정 구체예에서, 용어 "약학적으로 허용되는"은 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 동물, 더욱 특히 인간에 대해 미국 약전 또는 기타 일반적으로 승인된 약전에 기재된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 애췌번트, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어 물 및 오일, 예를 들어 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일, 예를 들어 낙화생유, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등일 수 있다. 한 구체예에서, 물은 약학적 조

성물이 정맥내로 투여되는 경우에 담체이다. 염수 용액 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액은 또한, 특히 주사용 액체를 위한 액체 담체로 사용될 수 있다. 적절한 약학적 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 곡분, 초크, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조된 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 요망되는 경우, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 에멀션화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 에멀션, 정제, 환약, 캡슐, 분말, 지효성 방출 포물레이션 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 결합제 및 담체, 예를 들어 트리글리세라이드와 함께 좌약으로 포물레이팅될 수 있다. 경구용 포물레이션은 표준 담체, 예를 들어 약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카르보네이트 등을 포함할 수 있다. 적절한 약학적 담체의 예는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기재되어 있다. 이러한 조성물은, 환자에게 투여하기에 적절한 형태를 제공하기 위해 적절한 양의 담체와 함께 예를 들어 정제된 형태의 치료적 유효량의 화합물을 함유할 것이다. 포물레이션은 투여 방식에 적합해야 한다.

<282> 한 구체예에서, 조성물은 통상적인 방법에 따라 인간에게 정맥내 투여되기에 적합한 약학적 조성물로 포물레이팅된다. 통상적으로, 정맥 투여용 조성물은 멸균된 등장상의 수성 완충용액이다. 필요시, 조성물은 또한 가용 화제 및 주사 부위의 동통을 완화시키기 위한 국소 마취제, 예를 들어 리그노카인을 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 개별적으로, 또는 단위 복용 형태, 예를 들어 밀봉된 용기, 예를 들어 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사케트(sachette) 내의 동결건조된 분말 또는 물이 제거된 농축물과 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 이는 멸균된 약학적 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입병으로 조제될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플은 성분이 투여전에 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

<283> 본 발명의 화합물은 중성 또는 염 형태로 포물레이팅될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 음이온과 함께 형성된 염, 예를 들어 염산, 포스포르산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 염 및 양이온과 함께 형성된 염, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 염을 포함한다.

<284> 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병 또는 장애의 치료, 억제 및 예방에 유효할 본 발명의 화합물의 양은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 게다가, 시험관내 검정법이 적절한 용량 범위의 확인을 보조하기 위해 임의로 사용될 수 있다. 포물레이션에 사용되기 위한 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질병 또는 장애의 중증도에 좌우될 것이고, 의사의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.

<285> 항체에 대해서는, 환자에게 투여되는 용량은 통상적으로 환자 체중 kg당 0.1 mg 내지 100 mg이다. 한 구체예에서, 환자에게 투여되는 용량은 환자 체중의 kg당 0.1 mg 내지 20 mg이다. 또 다른 구체예에서, 투여량은 환자 체중 kg당 1 mg 내지 10 mg이다. 일반적으로, 인간 항체는 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 기타 종으로부터의 항체 보다 인간 체내에서 긴 반감기를 지닌다. 따라서, 인간 항체의 보다 낮은 용량 및 덜 빈번한 투여가 종종 가능하다. 추가로, 본 발명의 항체의 투여의 용량 및 빈도는 변형, 예를 들어 지질화(lipidation)에 의해 항체의 흡수 및 조직투과(예를 들어, 뇌로의 투과)를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

<286> 진단 및 영상

<287> 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)에 결합하는 표지된 항체 및 이의 유도체 및 유사체(치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질도 포함함)는 치료 단백질의 이상 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 장애 및/또는 질환을 검출하거나, 진단하거나, 모니터링하기 위한 진단 목적에 사용될 수 있다. 본 발명은 (a) 관심 폴리펩티드에 특이적인 하나 이상의 항체를 이용하여 개체의 세포 또는 체액 내의 치료 단백질의 발현을 검정하고, (b) 유전자 발현의 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하고, 이에 의해 표준 발현 수준에 비한 검정된 치료 단백질 발현 수준의 증가 또는 감소가 이상 발현의 표시임을 포함하는, 치료 단백질의 이상 발현의 검출이 제공된다.

<288> 본 발명은 (a) 치료 단백질에 특이적인 하나 이상의 항체 또는 치료 단백질에 특이적인 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 이용하여 개체의 세포 또는 체액에서 치료 단백질의 발현을 검정하고, (b) 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하고, 이에 의해 표준 발현 수준에 비한 검정된 치료 단백질 발현 수준의 증가 또는 감소가 특정 장애의 표시임을 포함하는, 장애를 진단하기 위한 진단 검정법을 제공한다. 암에 대해서, 개체로부터의 생검된 조직에서의 비교적 과다한 양의 전사체의 존재는 질병의

발달에 대한 소인을 나타낼 수 있거나, 실제 임상 증상의 출현에 앞서 질병을 검출하기 위한 수단을 제공할 수 있다. 이러한 유형의 보다 명확한 진단은 건강 전문가로 하여금 보다 이른 예방 방법 또는 적극적인 치료를 가능하게 하여 암의 발달을 예방하거나 추가의 진행을 예방하게 한다.

<289> 본 발명의 항체 또는 치료 단백질에 특이적인 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 당업자에게 공지된 고전적인 면역조직학적 방법을 이용하여 생물학적 샘플에서의 단백질 수준을 검정하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)] 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하기 위해 유용한 기타 항체-기체 방법은 면역검정법, 예를 들어 효소면역측정법(ELISA) 및 방사면역측정법(RIA)을 포함한다. 적절한 항체 검정 표지는 당 분야에 공지되어 있고, 효소 표지, 예를 들어 글루코오스 옥시다아제; 방사성동위원소, 예를 들어 요오드(¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 트리튬(³H), 인듐(¹¹²In), 및 테크네튬(⁹⁹Tc); 발광 표지, 예를 들어 루미놀; 및 형광 표지, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 비오틴을 포함한다.

<290> 본 발명의 하나의 일면은 동물, 예를 들어 포유동물 또는 인간의 치료 단백질의 이상 발현과 관련된 질병 또는 장애의 검출 및 진단이다. 한 구체예에서, 진단은 a) 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 표지된 분자의 유효량을 피검체에 투여(예를 들어, 비경구, 피하, 또는 복막내 투여)하고, b) 투여 후 표지된 분자가 치료 단백질이 발현되는 피검체의 부위에 우선적으로 농축되도록(및 결합되지 않은 표지된 분자가 백그라운드 수준으로 청소되도록) 허용되는 기간 동안 기다리고, c) 백그라운드 수준을 결정하고, d) 피검체의 표지된 수준을 검출하여, 백그라운드 수준 이상의 표지된 분자의 검출이 피검체가 치료 단백질의 이상 발현과 관련된 특정 질병 또는 장애를 지님을 나타내는 것을 포함한다. 백그라운드 수준은 특정 시스템에 대해 미리 결정된 표준값에 대해 검출된 표지된 분자의 양을 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

<291> 피검체의 크기 및 사용되는 영상 시스템이 진단 영상을 생성하기 위해 필요한 영상 부분의 양을 결정하게 되는 것을 당업자는 이해할 것이다. 인간 피검체에 대한 방사성동위원소 부분의 경우에서, 주입되는 방사성동위원소의 양은 일반적으로 약 5 내지 20 밀리큐리의 ^{99m}Tc 범위일 것이다. 표지된 항체, 항체 단편 또는 치료 단백질에 결합하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 이후 특정 치료 단백질을 함유하는 세포의 위치에 우선적으로 축적될 것이다. 생체내 종양 영상은 문헌[S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))]에 기재되어 있다.

<292> 사용되는 표지의 유형 및 투여 방식을 포함하는 여러 변수에 따라, 투여 후의 표지된 분자가 피검체의 부위에 우선적으로 농축되고, 결합되지 않은 표지된 분자가 백그라운드 수준으로 제거되도록 하는 시간 간격은 6 내지 48시간 또는 6 내지 24시간 또는 6 내지 12시간이다. 또 다른 구체예에서, 투여 후의 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.

<293> 한 구체예에서, 질병 또는 장애의 모니터링은, 예를 들어 최초 진단 후 1개월, 최초 진단 후 6개월, 최초 진단 후 1년 등에 질병 또는 장애를 진단하기 위한 방법을 반복함으로써 수행된다.

<294> 표지된 분자의 존재는 생체내 스캐닝에 대해 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 환자에서 검출될 수 있다. 이들 방법은 사용되는 표지의 유형에 좌우된다. 당업자는 특정 표지를 검출하기 위한 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명의 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는 전산화 단층촬영법(CT), 전신 스캔, 예를 들어 양전자 방출 단층촬영(PET), 자기공명영상(MRI), 및 초음파촬영술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<295> 특정 구체예에서, 분자는 방사성동위원소를 이용하여 표지되고, 방사선 반응 외과 기구를 이용하여 환자에서 검출된다(Thurston et al., 미국 특허 제5,441,050호). 또 다른 구체예에서, 분자는 형광 화합물로 표지되고, 형광 반응 스캐닝 기구를 이용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구체예에서, 분자는 양전자 방출 금속으로 표지되고, 양전자방출 단층촬영을 이용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구체예에서, 분자는 상자성체 표지로 표지되고, 자기공명영상(MRI)를 이용하여 환자에서 검출된다. 알부민 융합 단백질을 특이적으로 검출하나 알부민 또는 치료 단백질 단독을 검출하지 않는 항체가 바람직한 구체예이다. 이는 본 명세서를 통해 기재된 알부민 융합 단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

<296> 키트

<297> 본 발명은 상기 방법에 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 한 구체예에서, 키트는 하나 이상의 용기 내에 항체, 예를 들어 정제된 항체를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 키트는 키트 내에 포함된 항체와 특이적으로

면역반응되는 에피토프를 포함하는 실질적으로 단리된 폴리펩티드를 함유한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 키트는 관심 폴리펩티드와 반응하지 않는 조절 항체를 추가로 포함한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 키트는 관심 폴리펩티드에 대한 항체의 결합을 검출하는 수단을 함유한다(예를 들어, 항체는 검출가능한 기질, 예를 들어 형광 화합물, 효소 기질, 방사성 화합물 또는 발광 화합물에 컨주게이션될 수 있거나, 제1의 항체를 인지하는 제2의 항체가 검출가능한 기질에 컨주게이션될 수 있다).

<298> 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 키트는 증식성 및/또는 양성 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 함유하는 혈청의 스크리닝에 사용하기 위한 진단 키트이다. 이러한 키트는 관심 폴리펩티드와 반응하지 않는 대조군 항체를 포함할 수 있다. 이러한 키트는 하나 이상의 항-폴리펩티드 항원 항체와 특이적으로 면역반응되는 에피토프를 포함하는 실질적으로 단리된 폴리펩티드 항원을 포함할 수 있다. 추가로, 이러한 키트는 항원에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 수단을 포함한다(예를 들어, 항체는 유세포분석에 의해 검출될 수 있는 형광 화합물, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민에 컨주게이션될 수 있다). 특정 구체예에서, 키트는 재조합적으로 생성되거나 화학적으로 합성된 폴리펩티드 항원을 포함할 수 있다. 키트의 폴리펩티드 항원은 또한 고형 지지체에 부착될 수 있다.

<299> 더욱 특정 구체예에서, 상기 기재된 키트의 검출 수단은 폴리펩티드 항원이 부착되는 고형 지지체를 포함한다. 이러한 키트는 또한 비-부착성의 리포터-표지된 항-인간 항체를 포함할 수 있다. 이 구체예에서, 폴리펩티드 항원에 대한 항체의 결합은 상기 리포터 표지된 항체의 결합에 의해 검출될 수 있다.

<300> 추가의 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 항원을 함유하는 혈청 스크리닝에 사용하기 위한 진단 키트를 포함한다. 진단 키트는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 항원과 특이적으로 면역반응하는 실질적으로 단리된 항체, 및 항체에 대한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 결합을 검출하기 위한 수단을 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 고형 지지체에 부착된다. 특정 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체일 수 있다. 키트의 검출 수단은 제2의 표지된 모노클로날 항체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 검출 방법은 표지된 경쟁 항원을 포함할 수 있다.

<301> 한 진단 형태에서, 시험 혈청은 본 발명의 방법에 의해 수득된 표면-결합된 항원을 지니는 고상 시약과 반응된다. 시약에 대한 특정 항원 항체의 결합 및 세척에 의한 결합되지 않은 혈청 성분의 제거 후, 시약은 고형 지지체에 결합된 항-항원 항체의 양에 비례하여 시약에 리포터를 결합시키기 위한 리포터-표지된 항-인간 항체와 반응된다. 시약은 결합되지 않은 표지된 항체를 제거하기 위해 다시 세척되고, 시약과 관련된 리포터의 양이 결정된다. 통상적으로, 리포터는 적절한 방사성, 발광 또는 비색 기질(Sigma, St. Louis, MO)의 존재하에서 고상을 인큐베이팅시킴으로써 검출되는 효소이다.

<302> 상기 검정의 고형 표면 시약은 고형 지지체 물질, 예를 들어 중합 비드, 딥 스틱(dip stick), 96-웰 플레이트 또는 필터 물질에 단백질 물질을 부착시키기 위한 공지된 기술에 의해 제조된다. 이러한 부착 방법은 일반적으로 지지체에 대한 단백질의 비-특이적 흡착 또는 통상적으로 자유 아민기를 통한 고형 지지체 상의 화학적 반응기, 예를 들어 활성화된 카르복실, 히드록실 또는 알데히드기에 대한 단백질의 공유적 부착을 포함한다. 대안적으로, 스트렙타비딘 코팅된 플레이트가 비오티닐화된 항원(들)와 함께 사용될 수 있다.

<303> 따라서, 본 발명은 이러한 진단 방법을 수행하기 위한 검정 시스템 또는 키트를 제공한다. 키트는 일반적으로 표면-결합된 재조합 항원, 및 표면-결합된 항-항원 항체를 검출하기 위한 리포터-표지된 항-인간 항체를 지닌 지지체를 포함한다.

<304> 알부민 융합 단백질

<305> 본 발명은 일반적으로 알부민 융합 단백질 및 질병 또는 장애를 치료하거나, 예방하거나, 개선하는 방법에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 "알부민 융합 단백질"은 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자에 대한 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자의 융합에 의해 형성된 단백질을 의미한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 예를 들어 유전적 융합(즉, 알부민 융합 단백질은 치료 단백질의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 알부민의 전부 또는 일부를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드와 인-프레임(in-frame) 연결된 핵산의 전사에 의해 생성됨)에 의해 서로 연결되거나 다른 하나에 연결되는 치료 단백질의 하나 이상의 단편 또는 변이체 및 인간 혈청 알부민의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함한다. 알부민 융합 단백질의 일부인 치료 단백질 및 알부민 단백질은 각각 알부민 융합 단백질의 "일부", "영역" 또는 "부분"으로 언급될 수 있다.

<306> 한 구체예에서, 본 발명은 표 1 또는 표 2에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 알부민 융합 작제물에 의해 엔코딩

된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 이러한 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<307> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 구체예는 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 인-프레임 연결된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 핵산 분자; 표 1, 표 2 또는 실시예에 기재된 바와 같이 생성된 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 인-프레임 연결된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 핵산 분자; 또는, 예를 들어 (1) 기능적 자가-복제 벡터(서플 벡터, 발현 벡터, 통합 벡터, 및/또는 복제 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않음), (2) 전사 개시 영역(예를 들어, 프로모터 영역, 예를 들어 조절성 또는 유도성 프로모터, 지속적(constitutive) 프로모터), (3) 전사 종결 영역, (4) 선택 서열 및 (5) 선택 마커 중 하나 이상의 요소를 추가로 포함하는, 치료 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 인-프레임 연결된 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)의 하나 이상의 분자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 핵산 분자에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<308> 한 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질(예를 들어, 표 1에 기재된 것) 및 혈청 알부민 단백질을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질 및 혈청 알부민 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 변이체를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 일부 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 혈청 알부민 단백질 성분은 혈청 알부민의 성숙한 부분이다.

<309> 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 변이체를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 일부 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 치료 단백질의 성숙한 부분이다.

<310> 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편 또는 변이체, 및 혈청 알부민의 생물학적으로 활성이고/이거나 치료적으로 활성인 단편 또는 변이체를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 치료 단백질의 성숙한 부분 및 혈청 알부민의 성숙한 부분을 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 알부민 융합 단백질을 제공한다.

<311> 한 양태에서, 알부민 융합 단백질은 N-말단 부분으로서 HA, 및 C-말단 부분으로서 치료 단백질을 포함한다. 대안적으로, C-말단 부분으로서 HA, 및 N-말단 부분으로서 치료 단백질을 포함하는 알부민 융합 단백질이 또한 사용될 수 있다.

<312> 다른 구체예에서, 알부민 융합 단백질은 알부민의 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 융합된 치료 단백질을 지닌다. 한 구체예에서, N- 및 C-말단에 융합된 치료 단백질은 동일한 치료 단백질이다. 대안적인 구체예에서, N- 및 C-말단에 융합된 치료 단백질은 상이한 치료 단백질이다. 또 다른 구체예에서, N- 및 C-말단에 융합된 치료 단백질은 동일하거나 관련된 질병, 장애, 또는 질환(예를 들어, 표 1의 "적응증:Y" 컬럼에 나열된 것)을 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있는 상이한 치료 단백질이다. 또 다른 구체예에서, N- 및 C-말단에 융합된 치료 단백질은, 통상적으로 동시에, 동반하여, 또는 연속적으로 환자에게서 발생하는 것으로 당 분야에 공지되거나, 또 다른 질병 또는 장애와 관련하여 통상적으로 환자에게서 발생하는 질병 또는 장애(예를 들어, 표 1의 "적응증:Y" 컬럼에 나열된 것)을 치료하거나, 개선하거나, 예방하기 위해 사용될 수 있는 상이한 치료 단백질이다.

<313> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 N- 또는 C-말단, 및/또는 알부민 또는 이의 변이체의 N- 및/또는 C-말단에 융합된 소정의 치료 단백질 X 또는 이의 변이체의 하나, 두개, 세개, 네개 또는 그 이상의 분자를 함유하는 단백질을 포함한다. 소정의 치료 단백질 X 또는 이의 변이체의 분자는 '헤드 투 헤드(head to head)' 배향(예를 들어, 치료 단백질 X의 하나의 분자의 N-말단이 치료 단백질 X의 또 다른 분자의 N-말단에 융합됨), 또는 '헤드 투 테일(head to tail)' 배향(예를 들어, 치료 단백질 X의 하나의 분자의 C-말단이 치료 단백질 X의 또 다른 분자의 N-말단에 융합됨)을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 수의 배향으로 존재할 수 있다.

- <314> 한 구체예에서, 하나, 두개, 세개 또는 그 이상의 탠덤(tandem)으로 배향된 치료 단백질 X 폴리펩티드(또는 이의 단편 또는 변이체)는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 N- 또는 C-말단, 및/또는 알부민 또는 이의 변이체의 N- 및/또는 C-말단에 융합된다.
- <315> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 N- 또는 C-말단, 및/또는 알부민 또는 이의 변이체의 N- 및/또는 C-말단에 융합된 소정의 치료 단백질 X 또는 이의 변이체의 하나, 두개, 세개, 네개, 또는 그 이상의 분자를 함유하는 단백질을 추가로 포함하며, 상기 분자는 펩티드 링커를 통해 연결된다. 예로서 미국 특허 제5,073,627호(참조로서 본원에 포함됨)에 기재된 펩티드 링커를 포함한다. 펩티드 링커에 의해 분리된 다수의 치료 단백질 X 폴리펩티드를 포함하는 알부민 융합 단백질은 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 링커는 큰 HSA 분자에 작은 펩티드가 융합되는 경우 특히 중요하다. 펩티드 그 자체가 펩티드의 탠덤 카피의 융합에 의한 링커일 수 있거나, 기타 공지된 링커가 사용될 수 있다. 링커가 포함된 작제물이 표 2에 기재되어 있고, 이는 SEQ ID NO:Y를 시험하는 경우에 명백하다.
- <316> 추가로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 분자내 및/또는 분자간 중합체 형태가 형성되도록 하기 위한 방식으로 알부민 또는 이의 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단에 치료 단백질 X 또는 이의 변이체를 융합시킴으로써 생성될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질은 단량체 또는 중합체 형태(즉, 이량체, 삼량체, 사량체 및 그 이상의 중합체)일 수 있다. 본 발명의 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 단량체 형태 또는 중합체 형태(즉, 이량체, 삼량체, 사량체 및 그 이상의 중합체)일 수 있다. 특정 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분은 중합체 형태(즉, 이량체, 삼량체, 사량체 및 그 이상의 중합체)이고, 알부민 단백질 부분은 단량체 형태이다.
- <317> 알부민 부분이 치료 단백질 부분의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합되는 알부민 융합 단백질 이외에, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 치료 단백질 또는 관심 펩티드(예를 들어, 표 1에 기재된 치료 단백질 X, 또는 치료 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합하는 항체)를 HA의 내부 영역으로 삽입시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, HA 분자의 단백질 서열 내에는 이황화결합에 의해 안정화되는 다수의 루프 또는 턴이 α -나선의 말단 및 시작 사이에 존재한다. 대부분의 부분에 대해 HA(PDB 인식자 1A06, 1BJ5, 1BKE, 1BM0, 1E7E 내지 1E71 및 1UOR)의 결정 구조로부터 결정된 루프는 분자의 본체로부터 넓게 펼쳐져 있다. 이들 루프는 특정 생물학적 활성을 지닌 알부민 분자를 본질적으로 생성하기 위해 치료적으로 활성 펩티드, 특히 기능성이 되기 위해 이차 구조를 요하는 치료적으로 활성인 펩티드, 또는 치료 단백질의 삽입, 또는 내부 융합에 유용하다.
- <318> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 생성하기 위해 펩티드 또는 폴리펩티드가 삽입될 수 있는 인간 알부민 구조의 루프는 Val154-Asn61, Thr76-Asp89, Ala92-Glu100, Gln170-Ala176, His247-Glu252, Glu266-Glu277, Glu280-His288, Ala362-Glu368, Lys439-Pro447, Val462-Lys475, Thr478-Pro486, 및 Lys560-Thr566을 포함한다. 추가 구체예에서, 펩티드 또는 폴리펩티드는 성숙한 인간 알부민(SEQ ID NO:1)의 Val154-Asn61, Gln170-Ala176, 및/또는 Lys560-Thr566 루프로 삽입된다.
- <319> 삽입되는 펩티드는 특정 생물학적 활성에 대해 스크리닝된 파지 표시 또는 합성 펩티드 라이브러리 또는 요망되는 기능을 지닌 분자의 활성 부분으로부터 유래될 수 있다. 추가로, 무작위 펩티드 라이브러리가 특정 루프 내에서 또는 HA 분자의 특정 루프로 무작위화된 펩티드의 삽입에 의해 생성될 수 있고, 이는 아미노산의 모든 가능한 조합을 나타낸다.
- <320> 이러한 라이브러리(들)은 하기의 방법중 하나 이상에 의해 HA 또는 HA의 도메인 단편에 대해 생성될 수 있다:
- <321> HA 또는 HA 도메인 단편의 하나 이상의 펩티드 루프 내에 무작위로 아미노산을 돌연변이 시킴. 루프 내의 하나 내지 모든 잔기가 이러한 방식으로 성숙될 수 있음;
- <322> HA 또는 HA 도메인 단편의 하나 이상의 루프 내로(즉, 내부 융합) 길이 Xn의 무작위화 펩티드(들)의 대체 또는 삽입(X는 아미노산이고, n은 잔기의 수이다);
- <323> (a) 및/또는 (b)에 더하여 N-, C- 또는 N- 및 C-말단 펩티드/단백질 융합체의 첨가.
- <324> HA 또는 HA 도메인 단편은 또한 다양한 표적에 대한 다양한 루프의 다양한 스크리닝으로부터 유래된 펩티드를 동일한 HA 또는 HA 도메인 단편으로 이식함으로써 다기능성이 될 수 있다.
- <325> 일부 구체예에서, 인간 혈청 알부민의 루프 내로 삽입된 펩티드는 표 1에 기재된 펩티드 단편 또는 치료 단백질의 펩티드 변이체이다. 더욱 특히, 본 발명은 인간 혈청 알부민의 루프 내로 삽입된 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개

이상, 35개 이상 또는 40개 이상의 아미노산 길이의 펩티드 단편 또는 펩티드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 인간 혈청 알부민의 N-말단에 융합된 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 35개 이상, 또는 40개 이상의 아미노산의 펩티드 단편 또는 펩티드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 본 발명은 또한 인간 혈청 알부민의 C-말단에 융합된 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 35개 이상, 또는 40개 이상의 아미노산의 펩티드 단편 또는 펩티드 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 표 1 및 2에 기재된 짧은 펩티드(예를 들어, 치료 Y)가 알부민 루프 내로 삽입될 수 있다.

<326> 일반적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 하나의 HA 유래 영역 및 하나의 치료 단백질 유래 영역을 지닐 수 있다. 그러나, 각각의 단백질의 다수의 영역이 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 치료 단백질이 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 단백질은 HA의 N- 및 C-말단 둘 모두에 융합될 수 있다. 이러한 형태에서, 치료 단백질 부분은 동일하거나 상이한 치료 단백질 분자일 수 있다. 이작용성 알부민 융합 단백질의 구조는 X-HA-Y 또는 Y-HA-X로 나타낼 수 있다.

<327> 예를 들어, 항-BLyS™ scFv-HA-IFN α-2b 융합체가 항-BLyS™ scFv에 의한 IFN α-2b에 대한 면역 반응을 조절하여 제조될 수 있다. 대안은 작용성, 반감기 등에 따라 다양한 비로 HA-융합체, 예를 들어 HA-항-BLyS™ scFv 융합체와 혼합된 HA-IFN α-2b 융합체 또는 기타 HA-융합체 이작용성(또는 다중작용성) 용량을 제조하는 것이다.

<328> 이작용성 또는 다중작용성 알부민 융합체 단백질은 또한 HA의 반대 말단에서 단백질 또는 펩티드를 통해 표적 기관 또는 세포 유형으로 융합체의 치료 단백질 부분을 표적화시켜 제조될 수 있다.

<329> 공지된 치료 분자의 융합체에 대한 대안으로서, 펩티드가 통상적으로, 6, 8, 12, 20 또는 25개 또는 Xn(여기서, X는 아미노산(aa)이고, n은 잔기의 수와 동일함)의 아미노산의 모든 가능한 조합이 포함되는 무작위화 아미노산의 HA의 N-, C- 또는 N- 및 C-말단, 또는 HA의 도메인 단편에 대한 융합체로 작제된 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 이러한 방법의 특정 이점은 펩티드가 HA 분자에 대해 정위(in situ)에서 선택될 수 있고, 이에 따라 펩티드의 특성이 이후 HA에 부착되는 임의의 기타 방법에 의해 유래된 펩티드에 대한 경우에서 변형될 수 있는 것 보다 잠재적으로 덜 변형되어 선택될 수 있다는 점이다.

<330> 추가로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 융합된 부분 사이에 링커 펩티드를 포함하여 부분 사이의 물리적 분리를 크게 함으로써 치료 단백질 부분의 접근성, 예를 들어 이의 동종 수용체로의 결합에 대한 접근성을 최대화시킬 수 있다. 링커 펩티드는 아미노산으로 구성되어 유연할 수 있거나 보다 단단할 수 있다.

<331> 링커 서열은 프로테아제에 의하거나 화학적으로 분해되어 성장 호르몬 관련 부분을 생성할 수 있다. 한 양태에서, 프로테아제는 숙주에 의해 자연적으로 생성되는 것, 예를 들어 효모(*S. cerevisiae*) 프로테아제 *kex2* 또는 상응하는 프로테아제이다.

<332> 따라서, 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 화학식 R1-L-R2; R2-L-R1; 또는 R1-L-R2-L-R1을 지닐 수 있고, 여기서 R1은 하나 이상의 치료 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열이고, 이들은 동일한 치료 단백질일 필요는 없으며, L은 링커이고, R2는 혈청 알부민 서열이다.

<333> 일부 구체예에서, 치료 단백질을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 알부민에 융합되지 않는 경우의 동일한 치료 단백질의 혈장 안정성에 비해 보다 높은 혈장 안전성을 지닌다. 통상적으로 혈장 안전성은 치료 단백질이 생체내에 투여되어 혈류 내로 운반되는 경우와 치료 단백질이 분해되어 혈류로부터 청소되어 기관, 예를 들어 신장 또는 간으로 운반되어 최종적으로 신체로부터 치료 단백질이 제거되는 경우 사이의 기간을 의미한다. 혈장 안정성은 혈류 내에서의 치료 단백질의 반감기에 의해 계산된다. 혈류 내의 치료 단백질의 반감기는 당 분야에 공지된 통상적인 검정법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<334> 일부 구체예에서, 치료 단백질을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 알부민에 융합되지 않은 동일한 치료 단백질의 저장 수명에 비해 연장된 저장 수명을 지닌다. 저장 수명은 통상적으로 용액 또는 몇몇 기타 저장 포물레이션에서의 치료 단백질의 치료 활성이 치료 활성의 과도한 손실 없이 안정적인 기간을 의미한다. 다수의 치료 단백질은 이들의 융합되지 않은 상태에서 고도로 불안정하다. 하기에 기재되는 바와 같이, 이들 치료 단백질의 통상적인 저장 수명은 본 발명의 알부민 융합 단백질로의 통합에 따라 현저하게 연장된다.

<335> "연기(prolonged)"되거나 "연장(extended)"된 저장 수명을 지닌 본 발명의 알부민 융합 단백질은 동일한 저장

및 처리 조건에 적용된 표준에 비해 보다 높은 치료 활성을 나타낸다. 표준은 융합되지 않은 전장의 치료 단백질일 수 있다. 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 부분이 유사체, 변이체이거나, 달리 변형되거나 상기 단백질에 대한 완전한 서열을 포함하지 않는 경우, 치료 활성의 연장은 대안적으로 유사체, 변이체, 변형된 펩티드 또는 불완전한 서열의 융합되지 않은 동등물에 비교될 수 있다. 예로써, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 소정의 시각에서 비교하는 경우 표준과 동일한 저장 및 처리 조건에 적용되는 경우 표준의 약 100% 초과 치료 활성, 또는 약 105%, 110%, 120%, 130%, 150% 또는 200% 초과 치료 활성을 보유할 것이다.

<336> 저장 수명은 또한 저장이 시작되는 경우의 치료 활성에 표준화된, 저장 후에 잔여하는 치료 활성에 의해 평가될 수 있다. 연기되거나 연장된 치료 활성으로 나타나는 바와 같은 연기되거나 연장된 저장 수명을 지닌 본 발명의 알부민 융합 단백질은 동일한 조건에 적용되는 동등한 융합되지 않은 치료 단백질의 치료 활성의 약 50% 초과 치료 활성, 약 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상의 치료 활성을 보유할 수 있다.

<337> 융합 단백질의 발현

<338> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 효모, 미생물, 예를 들어 세균, 또는 인간 또는 동물 세포주로부터의 분비에 의한 재조합 분자로서 생성될 수 있다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 숙주 세포로부터 분비된다.

<339> 본 발명의 특정 구체예는 효모에서의 직접적인 분비를 위해 효과적인 신호 서열, 특히 효모 유래 신호 서열(특히 숙주 효모에 상동인 것), 및 본 발명의 첫번째 양태의 융합된 분자를 엔코딩하는 DNA 작제물을 포함하고, 여기에는 신호 서열과 성숙한 폴리펩티드 사이에 효모 유래 프로(pro) 서열이 없다.

<340> 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 역전효소 신호는 효모 유래 신호 서열의 예이다.

<341> 별개로 제조된 폴리펩티드가 화학적 가교에 의해 결합된 문헌[Poznansky *et al.*, (FEBS Lett. 239:18 (1988))]에 의해 제조된 종류의 컨쥬게이트는 고려되지 않는다.

<342> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키기 위해 형질전환된 세포, 예를 들어 효모 세포를 포함한다. 형질전환된 숙주 세포 그 자체에 더하여, 본 발명은 또한 영양 배지 중의 이들 세포의 배양물, 예를 들어 모노클로날(클론적으로 균질한) 배양물, 또는 모노클로날 배양물로부터 유래된 배양물이 고려된다. 폴리펩티드가 분비되는 경우, 배지는 세포와 함께, 또는 여과되거나 원심분리된 경우 세포 없이 폴리펩티드를 함유할 것이다. 세균(예를 들어, 대장균 및 고초균), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애, 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 사상 진균(예를 들어, 아스페르길루스), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함하는 많은 발현 시스템이 공지되어 있고, 사용될 수 있다.

<343> 알부민 융합 단백질의 생성에 사용되는 효모 균주의 예는 D88, DXY1 및 BXP10이다. D88[*leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4*]은 선조 균주 AH22his⁺의 유도체이다(DB1로도 공지되어 있음; 예를 들어, 문헌[Sleep *et al.* Biotechnology 8:42-46 (1990)] 참조). 균주는 LEU2 유전자를 함유하는 2 마이크로-기체 플라스미드의 영양요구 선택을 가능하게 하는 *leu2* 돌연변이를 함유한다. D88은 또한 글루코오스 과량에서 PRB1의 탈억제를 나타낸다. PRB1 프로모터는 글루코오스 수준 및 성장 단계를 모니터링하는 두개의 체크포인트에 의해 정상적으로 조절된다. 프로모터는 글루코오스 고갈에 따라 야생형 효모에서 활성화되고 정지기로 진입한다. 균주 D88은 글루코오스에 의한 억제를 나타내나, 정지기로의 진입에 따른 유도를 유지한다. PRA1 유전자는 ER에 국한되는 효모 공포(vacuolar) 프로테아제, YscA 엔도프로테아제 A를 엔코딩한다. UBC4 유전자는 유비퀴틴화 경로에 존재하고, 유비퀴틴 의존 분해에 대한 단생 및 비정상 단백질의 표적화와 관련된다. 이러한 *ubc4* 돌연변이의 단리는 세포 내의 발현 플라스미드의 카피 수를 증가시키고, 플라스미드로부터 발현된 요망되는 단백질의 발현의 수준을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로서 포함되는 국제 공개 번호 W099/00504호 참조).

<344> D88의 유도체인 DXY1는 하기의 유전형을 지닌다: [*leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3::yap3*]. D88에서 단리된 돌연변이에 더하여, 이러한 균주는 또한 YAP3 프로테아제의 녹아웃을 지닌다. 이러한 프로테아제는 대개 이염기 잔기(RR, RK, KR, KK)의 분해를 야기하나, 단백질의 단일 염기 잔기에서의 분열도 촉진할 수 있다. 이러한 *yap3* 돌연변이의 단리는 보다 높은 수준의 전장 HSA 생성을 발생시킨다(예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,965,386호 및 문헌[Kerry-Williams *et al.*, Yeast 14:161-169 (1998)] 참조).

<345> BXP10는 하기의 유전형을 지닌다: *leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3, yap3::URA3, lys2, hsp150::LYS2, pmt1::URA3*. DXY1에서 단리된 돌연변이에 더하여, 이러한 균주는 또한 PMT1 유전자 및 HSP150

유전자의 녹아웃을 지닌다. PMT1 유전자는 돌리칠(dolichyl)-포스페이트-D-만노오스 단백질 O-만노실트랜스페라아제(Pmts)의 진화적으로 보존된 패밀리의 일원이다. Pmt1p의 막횡단 토폴로지(topology)는 O-결합 당화에서 역할을 하는 소포체의 통합 막단백질임을 암시한다. 이러한 돌연변이는 HSA 융합체의 O-결합 당화를 감소/제거한다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 국제 공개 번호 W000/44772호 참조). 여러 연구들은 Hsp150 단백질이 이온 교환 크로마토그래피에 의해 rHA로부터 효과적이지 않게 분리되는 것을 밝혀내었다. HSP 150 유전자에서의 돌연변이는 표준 정제 기술에 의해 제거되기 어려운 것으로 판명된 잠재적 오염원을 제거한다. 예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 제5,783,423호를 참조하라.

<346> 요망되는 단백질은 통상적인 방법, 예를 들어 숙주 염색체 또는 자유 플라스미드에 삽입된 코딩 서열로부터 생성된다. 효모는 보통의 방법중 임의의 방법, 예를 들어 전기 천공으로 요망 단백질에 대한 코딩 서열로 형질 전환된다. 전기 천공에 의한 효모의 형질전환 방법은 문헌[Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182]에 기재되어 있다.

<347> 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 발명의 DNA 작제물을 함유하는 세포는 널리 공지된 기술에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 발현 작제물의 도입으로부터 생성된 세포는 성장되어 요망되는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 세포는 수거되어 용해될 수 있고, 이들의 DNA 함량은 문헌[Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 또는 Berent *et al.* (1985) *Biotech.* 3, 208]에 기재된 것과 같은 방법을 이용하여 DNA의 존재에 대해 시험될 수 있다. 대안적으로, 상층액에서의 단백질의 존재는 항체를 이용하여 검출될 수 있다.

<348> 유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403-406 및 pRS413-416를 포함하고, 일반적으로 스트라타진 클로닝 시스템(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA)에서 시판된다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406는 효모 통합 플라스미드(YIp)이고, 효모 선택 마커 HIS3, 7RP1, LEU2 및 URA3를 포함한다. 플라스미드 pRS413-416는 효모 동원체 플라스미드(Ycp)이다.

<349> 효모에서의 발현을 위한 알부민 융합 단백질을 제조하기 위한 벡터의 예는 실시예 1에 상세하게 기재되어 있는 pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA, 및 pC4:HSA를 포함한다. 도 2는 치료 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 클로닝되어 HA-융합체를 형성시킬 수 있는 기본 벡터로 사용될 수 있는 pPPC0005 플라스미드의 맵을 나타낸다. 이는 *PRB1* S.세레비지에 프로모터(PRB1p), 융합체 선도 서열(FL), DNA 엔코딩 HA (rHA) 및 *ADH1* S.세레비지에 종결자 서열을 함유한다. 융합체 선도 서열의 서열은 인간 혈청 알부민의 신호 서열(SEQ ID NO:3)의 최초 19개 아미노산 및 교배 인자 알파 1 프로모터의 마지막 5개의 아미노산(SLDKR, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 EP-A-387 319 참조)으로 구성된다.

<350> 플라스미드 pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA, 및 pC4:HSA는 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209)에 2001년 4월 11일에 수탁되었고, 각각 등록 번호 ATCC PTA-3278, PTA-3276, PTA-3279, 및 PTA-3277이 주어졌다. 효모에서의 알부민 융합 단백질 발현에 유용한 또 다른 벡터는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Sleep *et al.*, *BioTechnology* 8:42 (1990)]에 기재된 pSAC35 벡터이다.

<351> 알부민 융합 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있는 효모 프로모터는 MET25 프로모터이다. 예를 들어, 문헌[Dominik Mumburg, Rolf Muller and Martin Funk. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 25, pp. 5767-5768]을 참조하라. Met25 프로모터는 383개의 염기 길이(염기 -382 내지 -1)이고, 이러한 프로모터에 의해 발현된 유전자는 또한 Met15, Met17, 및 YLR303W으로 공지되어 있다. 한 구체예에서는 하기 서열을 사용하고, 하기 서열의 5' 말단에서 클로닝에서 사용되는 Not 1 부위에 밑줄이 있고, 3' 말단에서 ATG 시작 코돈에 밑줄이 있다:

GCGGCCGCGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTGGCTTTTCTCTTGAGGTCACATGATCGCA
AAATGGCAAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAAGTGTGGTGGTGGCAATGACTAATTAAGTTAGTCAAG
GCGCCATCCTCATGAAAAGTGTGAACATAATAACCGAAGTGTGCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACGCT
CGATGAAAAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAAGGAAGTTTTCCTTTTCTTGTCTCTCT
TGTCTTTTCTACTATTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCTGCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCATCCATA
CAATG (SEQ ID NO:5)

<352>

<353> 효모에서 알부민 융합 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있는 추가의 프로모터는 하기를 포함한다:

<354>

a) cbh1 프로모터:

TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTG
CGAACCCGGAGAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAG
AAATTCTGGAGACGGCTTGTGTAATCATGGCGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAGCGTTCGGTCGCAGTAGC
AGGCACTCATTTCCGAAAAAACTCGGAGATTCTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATAATAAGGCAAT
ACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCCGTACCCACCTC
TTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTACGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGAC
CGGACGTGTTTTGCCCTTCATTGGAGAAATAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCTTGACCGACTG
GGGCTGTTCGAAGCCCGAATGTAGGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGT
CGGGCAGGACACGCCTCGAAGGTTACGGCAAGGGAACCAACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGT
AAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAATAACAAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAG
AAGTCATATACAGCGGCTAATAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTTGT
GGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAGGCCCACTTCCCCACGTTTGTTCCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGG
TGATCCCCCAATTGGGTCGCTTGTGTTTCCGGTGAAGTGAAAGAAGACAGAGGTAAGAATGCTGACTC
GGAGCGTTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAAATGTTGACATTCAAGGAGTATTTAG
CCAGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGAGGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCT
GGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAAACTGCCTAAG
ATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAGTGTGGTAG
GATCGAACACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAATGTTCAAGGGCCACTGC
ATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAAACGGAAT
GAGCTAGTAGGCAAAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGGTTGAGGTCCTGCTCCCTCATGCTCTCCC
CATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGACACCATCTTTGAGGCACAGAAACCAATAGTC
AACCGCGGACTGGCATC (SEQ ID NO:113)

<355>

<356>

b) *아스페길루스 니둘란스(Aspergillus nidulans)*로부터의 cysD 프로모터:

AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCCTCGATCCCCCTCTTAGCCGCATGAGATTCTACCATTT
ATGTCCTATCGTTTACGGTCTTATTGGACCGCTAGAAATAGACTCTGCTCGATTTGTTTCCATTATTCACGC
AATTACGATAGTATTTGGCTCTTTTCGTTTGGCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCAGCCATTGTGG
CCGCCGGCGTTGTGCTGCTGCTATTCCCCGCATATAAAACAACCCCTCCACCAGTTCGTTGGGCTTTGCGAAT
GCTGTACTCTATTTCAAGTTGTCAAAAGAGAGGATTCAAAAAATTATACCCAGATATCAAAGATATCAAA
GCCATC (SEQ ID NO:114)

<357>

<358> c) 하기 서열을 지니는 변형된 *cbh1* 프로모터:

TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTG
CGAACC CGGAGAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAG
AAATTCTGGAGACGGCTTGTGAATCATGGCGTTCCATTCTCGACAAGCAAAGCGTTCCGTCGCAGTAGC
AGGCACTCATTTCCGAAAAAACTCGGAGATTCTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATAATAGGCAAT
ACATTGAGTTGCCTCGACGGTTGCAATGCAGGGGTAAGTCTGAGCTTGGACATAACTGTTCCGTACCCACCTC
TTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTGAGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGAC
CGGACGTGTTTTGCCCTTCATTGGAGAAATAATGTCTATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCTTGACCGACTG
GGGCTGTTCGAAGCCCGAATGTAGGATTGTTATCCGAACCTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGT
CGGGCAGGACACGCCTCGAAGGTTACGGCAAGGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGT
AAAGCCGAATGCAGCATCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAG
AAGTCATATACCGCGGCTAATAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTTGT
GGGGTTGCAGAAAGCAACGGCAAGGCCCACTTCCCCACGTTTGTCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGG
TGATCCCCCAATTGGGTCGCTTGTGTTCGGGTGAAGTGAAAGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTC
GGAGCGTTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAAATGTTGACATTCAAGGAGTATTAG
CCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAAGGAGTTTGTCTGCCGATACGACGAATACGTATAGTCACTTCT
GGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAAACTGCCTAAG
ATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTGTGCTCCGGGCAATGCAAGTGTGGTAG
GATCGAACACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAATGTTGAGGGGCACTGC
ATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCCTGCAGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGA
TTTGTTTGCAAAAAGAAACAAAAGTGA AAAAACCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCTATTGATTGCGAG
CTTCCAATTTCGTACACAACAAGGTCCTAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTA
AACGGAATGAGCTAGTAGGCAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGGTTGAGAGTCCGTGCCTCCCTCA
TGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCTCCAGGAGACTTGTACACCATCTTTGAGGCACAGAAAC
CCAATAGTCAACCGCGGACTGGCATC (SEQ ID NO:115)

<359>

<360> d) 하기 서열을 지니는 *아스페길루스 니돌란스*로부터의 *cysD* 프로모터:

AGATCTGGTTCTTGAGTACATCTACCGATGCGCCTCGATCCCCCTTTAGCCGCATGAGATTCCTACCAT
TATGTCTATCGTTACGGGTCCTATTGGACCGCTAGAAATAGACTCTGCTCGATTGTTTCCATTATTAC
GCAATTACGATAGTATTGGCTCTTTTCGTTTGGCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCACGCCATTG
TGGCCGCGCGGCTGCAGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGAATTTGTTGCAAAAAGAA
CAAAAGTGA AAAAACCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCTATTGATTGCAGCTTCCAATTTCGTACA
CAACAAGGTCCTACGCCGGCGTTGTGCTGCTGCTATTCCCCGCATATAACAACCCCTCCACCAGTTCGTT
GGGCTTTGCGAATGCTGTAATTTCAAGTTGTCAAAAAGAGAGGATTCAAAAATTATACCCAGATAT
CAAAGATATCAAAGCCATC (SEQ ID NO:116)

<361>

<362> 상보성 접착 말단을 통해 DNA를 벡터에 작동가능하게 연결시키는 다양한 방법이 개발되었다. 예를 들어, 상보성 동중중합체 트랙트(tract)가 DNA 세그먼트에 첨가되어 벡터 DNA로 삽입될 수 있다. 이후, 벡터 및 DNA 세그먼트는 상보성 동중중합체 꼬리 사이의 수소 결합에 의해 연결되어 제조합 DNA 분자를 형성한다.

<363> 하나 이상의 제한 부위를 함유하는 합성 링커는 DNA 단편을 벡터로 결합시키는 대안적 방법을 제공한다. 엔도뉴클레아제 제한 절단에 의해 생성된 DNA 세그먼트는 박테리오파지 T4 DNA 중합효소 또는 대장균 DNA 중합효소 I, 프로트루딩(protruding)을 제거하는 효소, 3' 5'-엑소뉴클레아제 활성을 지닌 감마-단일-가닥 말단으로 처리되고, 중합 활성을 지닌 리세싱(recessing)된 3'-말단이 채워진다.

<364> 따라서, 이들 활성의 조합은 블런트(blunt)-말단의 DNA 세그먼트를 생성한다. 블런트-말단의 단편은 이후 블런트-말단의 DNA 분자의 라이게이션을 촉매할 수 있는 효소, 예를 들어 박테리오파지 T4 DNA 리가아제의 존재하에서 매우 과량의 물의 링커 분자와 함께 인큐베이션된다. 따라서, 반응의 생성물은 이들의 말단에 중합 링커 서열을 지니는 DNA 세그먼트이다. 이후, 이들 DNA 세그먼트는 적절한 제한 효소로 분해되고, DNA 세그먼트의 제한 부위와 양립하는 말단을 생성하는 효소로 분해된 발현 벡터로 라이게이션된다.

<365> 다양한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 함유하는 합성 링커는 인터내셔널 바이오테크놀로지스 인크(International Biotechnologies Inc, New Haven, CT, USA)를 포함하는 다수의 공급원에서 시판된다.

<366> 예를 들어, HA 변이체가 제조되어야 하는 경우, 본 발명에 따른 DNA를 변형시키는 바람직한 방법은 문헌[Saiki *et al.* (1988) *Science* 239, 487-491]에 기재된 중합효소 연쇄반응을 이용하는 것이다. 이 방법에서, 효소적

으로 증폭되는 DNA는 스스로 증폭된 DNA로 통합되는 두개의 특정 올리고뉴클레오티드 프라이머에 의해 플랭킹(flanking)된다. 특정 프라이머는 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 발현 벡터의 클로닝을 위해 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 인지 부위를 함유할 수 있다.

<367> 알부민 융합 단백질을 발현하기 위한 숙주로서 본 발명의 실시예에 사용되기에 유용한 것으로 생각되는 효모의 예시적 종류는 피키아(*Pichia*(*Hansenula*)), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 캔디다(*Candida*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 토룰라스포라(*Torulaspora*), 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 시테로마이세스(*Citeromyces*), 파키솔렌(*Pachysolen*), 데바로마이세스(*Debaromyces*), 메추니코비아(*Metschnikowia*), 로도스포리둠(*Rhodospiridium*), 류코스포리둠(*Leucosporidium*), 보트리오아스쿠스(*Botryosaccharum*), 스포리디오볼루스(*Sporidiobolus*), 엔도마이코시스(*Endomycopsis*) 등이다. 바람직한 종류는 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피키아(*Pichia*) 및 토룰라스포라(*Torulaspora*)로 구성된 군으로부터 선택된 것이다. 사카로마이세스 종의 예는 *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*), *S. 이탈리아*(*S. italicus*) 및 *S. 루시*(*S. rouxii*)이다.

<368> 클루이베로마이세스 종의 예는 *K. 프라길리스*(*K. fragilis*), *K. 락티스*(*K. lactis*) 및 *K. 마르크시아누스*(*K. marxianus*)이다. 적절한 토룰라스포라 종은 *T. 델브루에키*(*T. delbrueckii*)이다. 피키아(*Hansenula*) 종의 예는 *P. 앙구스타*(*P. angusta*(이전에는 *H. polymorpha*)), *P. 아노말라*(*P. anomala*(이전에는 *H. anomala*)) 및 *P. 파스토리스*(*P. pastoris*)이다. *S. 세레비지애*의 형질전환의 방법은 일반적으로 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 EP 251 744호, EP 258 067호 및 WO 90/01063호에 교시되어 있다.

<369> 사카로마이세스의 예시적 종은 *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*), *S. 이탈리아*(*S. italicus*), *S. 디아스타티쿠스*(*S. diastaticus*), 및 지고사카로마이세스 루시(*Zygosaccharomyces rouxii*)를 포함한다. 클루이베로마이세스의 예시적 종은 *K. 프라길리스*(*K. fragilis*) 및 *K. 락티스*(*K. lactis*)이다. 한세놀라의 예시적 종은 *H. 폴리모르파*(*H. polymorpha*(현재 *Pichia angusta*)), *H. 아노말라*(*H. anomala*(현재 *Pichia anomala*)), 및 피키아 캡슐라타(*Pichia capsulata*)이다. 피키아의 추가의 예시적 종은 *P. 파스토리스*(*P. pastoris*)를 포함한다. 아스퍼길루스의 예시적 종은 *A. 니게르*(*A. niger*) 및 *A. 니들란스*(*A. nidulans*)를 포함한다. 야로이아(*Yarrowia*)의 예시적 종은 *Y. 리폴리티카*(*Y. lipolytica*)를 포함한다. 다수의 효모 종은 ATCC로부터 입수가 가능하다. 예를 들어, 하기의 효모 종은 ATCC로부터 입수가 가능하고, 알부민 융합 단백질의 발현에 유용하다: 사카로마이세스 세레비지애(*Hansen*), 유성생식형 균주 BY4743 yap3 돌연변이(ATCC 등록 번호 4022731); 사카로마이세스 세레비지애(*Hansen*), 유성생식형 균주 BY4743 hsp150 돌연변이(ATCC 등록 번호 4021266); 사카로마이세스 세레비지애(*Hansen*), 유성생식형 균주 BY4743 pmt1 돌연변이(ATCC 등록 번호 4023792); 사카로마이세스 세레비지애(*Hansen*), 유성생식형(ATCC 등록 번호 20626; 44773; 44774; 및 62995); 사카로마이세스 디아스타티쿠스(*Andrews et Gilliland ex van der Walt*), 유성생식형(ATCC 등록 번호 62987); 클루이베로마이세스 락티스(*Dombrowski*)(*van der Walt*), 유성생식형(ATCC 등록 번호 76492); 피키아 앙구스타(*Teunissen et al.*)(*Kurtzman*), 한세놀라 폴리모르파(*de Moraes et Maia*)로 수탁된 유성생식형, 유성생식형(ATCC 등록 번호 26012); 아스퍼길루스 니게르(*van Tieghem*), 무성생식형 (ATCC 등록 번호 9029); 아스퍼길루스 니게르(*van Tieghem*), 무성생식형 (ATCC 등록 번호 16404); 아스퍼길루스 니들란스(*Eidam*)(*Winter*), 무성생식형(ATCC 등록 번호 48756); 및 야로이아 리폴리티카(*Wickerham et al.*)(*van der Walt et von Arx*), 유성생식형 (ATCC 등록 번호 201847).

<370> *S. 세레비지애*를 위한 적절한 프로모터는 PGKI 유전자, GAL1 또는 GAL10 유전자, CYC1, PH05, TRP1, ADH1, ADH2, 글리세랄데히드-3-포스페이트 데히드로게나아제, 헥소키나아제, 피루베이트 데카르복실라아제, 포스포프루토키나아제, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 포스포글루코오스 이소머라아제, 글루코키나아제, 알파-교배 인자 페로몬, [교배 인자 페로몬]에 대한 유전자와 관련된 프로모터, PRBI 프로모터, GLUT2 프로모터, GPDI 프로모터, 및 5' 조절 영역의 부분과 기타 프로모터의 5' 조절 영역의 부분 또는 업스트림 활성화 부위의 하이브리드를 포함하는 하이브리드 프로모터(예를 들어, EP-A-258 067의 프로모터)를 포함한다.

<371> 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)에 사용하기 위한 편리한 조절성 프로모터는 문헌[Maudreil (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10857-10864]에 기재된 nmt 유전자로부터의 티아민-억제성 프로모터이고, 문헌[Hoffman & Winston (1990) *Genetics* 124, 807-816]에 기재된 글루코오스 억제성 jbp1 유전자이다.

<372> 외래 유전자의 발현을 위해 피키아(*Pichia*)를 형질전환시키는 방법은, 예를 들어 문헌[Cregg et al. (1993)], 및 다양한 필립스 특허(예를 들어, 참조로서 본원에 포함되는 US 4 857 467호)에 교시되어 있고, 피키아 발현

키트는 인비트로젠(Invitrogen BY, Leek, Netherlands)사, 및 인비트로젠 코프.(Invitrogen Corp., San Diego, California)사에서 시판된다. 적절한 프로모터는 AOX1 및 AOX2를 포함한다. 문헌[Gleeson *et al.* (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465]에는 한세놀라(*Hansenula*) 벡터 및 형질전환에 대한 정보, MOX1 및 FMD1인 적절한 프로모터가 포함되어 있는 반면; 문헌[EP 361 991, Fleer *et al.* (1991)] 및 Rhone-Poulenc Rorer로부터의 기타 간행물에는 *클루이베로마이세스* 중에서 외래 단백질을 발현시키기 위한 방법, PGKI인 적절한 프로모터가 교시되어 있다.

- <373> 예시적인 전사 종결 신호는 전사 종결 및 아데닐중합체형성에 대한 적절한 신호를 함유하는 진핵세포 유전자의 3' 플랭킹 서열을 포함한다. 적절한 3' 플랭킹 서열은, 예를 들어 사용되는 발현 조절 서열에 자연적으로 연결된 유전자의 서열, 즉 프로모터에 해당할 수 있는 서열일 수 있다. 대안적으로, 이들은 종결 신호가 *S. 세레비시*에 ADHI 유전자인 경우 다양할 수 있다.
- <374> 요망되는 알부민 융합 단백질은 선택된 효모에서 효과적인 임의의 선도 서열일 수 있는 분비 선도 서열로 최초로 발현될 수 있다. 효모에서 유용한 선도 서열은 하기를 포함한다:
- <375> a) MPIF-1 신호 서열(예를 들어, 유전자 은행 등록번호 AAB51134의 아미노산 1-21) MKVSVAAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO:6)
- <376> b) 스타니오킬신(stanniocalcin) 신호 서열(MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO:7)
- <377> c) HSA 신호 서열의 프레-프로(pre-pro) 영역(예를 들어, MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR, SEQ ID NO:8)
- <378> d) HSA 신호 서열의 프레 영역(예를 들어, MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO:9) 또는 이의 변이체, 예를 들어 MKWVSFISLLFLFSSAYS, (SEQ ID NO:10)
- <379> e) 역전효소 신호 서열(예를 들어, MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO:11)
- <380> f) 효모 교배 인자 알파 신호 서열(예를 들어, MRFPSIFTAVLAF AASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTIAAIAKEEGVSLEKR, SEQ ID NO:12 또는 MRFPSIFTAVLAF AASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTTIAAIAKEEGVSLDKR, SEQ ID NO:12)
- <381> g) *K. 락티스*(*K. lactis*) 킬러(killer) 독소 선도 서열
- <382> h) 하이브리드 신호 서열(예를 들어, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO:13)
- <383> i) HSA/MF-1 하이브리드 신호 서열(HSA/kex2로도 공지됨)(예를 들어, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO:14)
- <384> j) *K. 락티스* 킬러/MF-1 융합 선도 서열(예를 들어, MNIFYIFLFLSFVQGSLEDKR, SEQ ID NO:15)
- <385> k) 면역글로불린 Ig 신호 서열(예를 들어, MGWSCIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO:16)
- <386> l) 피볼린 B 전구물질 신호 서열(예를 들어, MERAAPSRVRPLPLLLGGLALLAAGVDA, SEQ ID NO:17)
- <387> m) 클러스테린(clusterin) 전구물질 신호 서열(예를 들어, MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG, SEQ ID NO:18)
- <388> n) 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4 신호 서열(예를 들어, MLPLCLVAALLLAAGPGPSLG, SEQ ID NO:19)
- <389> o) HSA 신호 서열의 프레-프로-영역의 변이체, 예를 들어
- <390> MKWVSFISLLFLFSSAYSRGVFRR (SEQ ID NO:20),
- <391> MKWVTFISLLFLFAGVLG (SEQ ID NO:21),
- <392> MKWVTFISLLFLFSGVLG (SEQ ID NO:22),
- <393> MKWVTFISLLFLFGGVLG (SEQ ID NO:23),
- <394> 변형된 HSA 선도 HSA #64 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO:24);
- <395> 변형된 HSA 선도 HSA #66 - MKWVTFISLLFLFGGVSG (SEQ ID NO:25);
- <396> 변형된 HSA (A14) 선도 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO:26);

- <397> 변형된 HSA (S14) 선도 (변형된 HSA #65로도 공지됨) - MKWVTFISLLFLFSGVSG (SEQ ID NO:27),
- <398> 변형된 HSA (G14) 선도 - MKWVTFISLLFLFGGVSG (SEQ ID NO:28), 또는 MKWVTFISLLFLFGGVLGDLHKS (SEQ ID NO:29)
- <399> p) 콘센서스 신호 서열(MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG, SEQ ID NO:30)
- <400> q) 산 포스파타아제(PH05) 선도 (예를 들어, MFKSVVYSILAASLANA SEQ ID NO:31)
- <401> r) MFoz-1의 프레-서열
- <402> s) O 글루카나아제의 프레-서열(BGL2)
- <403> t) 킬러 독소 선도
- <404> u) 킬러 독소의 프레-서열
- <405> v) *K. 락티스* 킬러 독소 프레프로(29개 아미노산; 프레의 16개 아미노산 및 프로의 13개 아미노산) MNIFYIFLLFSFVQGLEHTRRGSLDKR (SEQ ID NO:32)
- <406> w) *S. 디아스타티쿠스*(*S. diastaticus*) 글루코아밀라아제 II 분비 선도 서열
- <407> x) *S. 칼스버그렌시스*(*S. carlsbergensis*) α-갈락토시다아제(MEL1) 분비 선도 서열
- <408> y) *캔디다* 글루코아밀라아제 선도 서열
- <409> z) EP-A-387 319에 기재된 하이브리드 선도 서열(본원에 참조로서 포함됨)
- <410> aa) gp67 신호 서열(배콜로바이러스 발현 시스템과 관련됨)(예를 들어, 유전자 은행 등록번호 AAA72759의 아미노산 1-19) 또는
- <411> bb) 치료 단백질 X의 자연 선도;
- <412> cc) JP 62-096086에 기재된 *S. 세레비지에* 역전효소(SUC2) 선도(본원에 참조로서 포함된 승인된 특허 911036516); 또는
- <413> dd) 이눌리나아제(Inulinase) - MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR (SEQ ID NO:33).
- <414> ee) 변형된 TA57 프로펩티드 선도 변이체 #1 - MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNL MADDTESAFATQINSGLD VVGLISMAKR (SEQ ID NO:34)
- <415> ff) 변형된 TA57 프로펩티드 선도 변이체 #2 - MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNL MADDTESAFATQINSGLD VVGLISMAEEGEPKR (SEQ ID NO:35)
- <416> gg) 콘센서스 신호 펩티드 - MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA (SEQ ID NO:111)
- <417> hh) 변형된 HSA/kex2 신호 서열 - MKWVSFISLLFLFSSAYSGSLDKR (SEQ ID NO:112)
- <418> ii) 콘센서스 신호 펩티드 #2 - a) MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG (SEQ ID NO:105)
- <419> 알부민 융합 단백질의 제조법 및 합성 생성의 추가 방법
- <420> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터, 숙주 세포, 및 합성 및 제조법 기술에 의한 알부민 융합 단백질의 생성에 관한 것이다. 벡터는, 예를 들어 파지, 플라스미드, 바이러스, 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 복제 적격 또는 복제 결손일 수 있다. 후자의 경우에서, 바이러스 증식은 일반적으로 상보성 숙주 세포에서만 발생할 것이다.
- <421> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 숙주에서의 증식을 위한 선택 마커를 함유하는 벡터에 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물, 예를 들어 칼슘 포스페이트 침전물로 도입되거나, 하전된 지질과의 복합체로 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 이는 적절한 패키징 세포주를 이용하여 시험관내에서 패키징되어 이후 숙주 세포로 도입될 수 있다.
- <422> 폴리뉴클레오티드 삽입은 적절한 프로모터, 예를 들어 파지 람다 PL 프로모터, 대장균 *lac*, *trp*, *phoA* 및 *tac* 프로모터, SV40 초기(early) 및 후기(late) 프로모터 및 레트로바이러스 LTRs의 프로모터 등에 작동가능하게 연결되어야 한다. 기타 적절한 프로모터는 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 발현 작제물은 추가로 전사 개시,

종결을 위한 부위, 및 전사된 영역에 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 전사체의 코딩 부분은 번역되는 폴리펩티드의 말단에 적절하게 위치한 시작 및 종결 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)에 번역 개시 코돈을 포함할 것이다.

<423> 기재된 바와 같이, 발현 벡터는 하나 이상의 선택 마커를 포함할 것이다. 이러한 마커는 디히드로폴레이트 환원효소, G418, 글루타민 합성효소, 또는 진핵세포 배양을 위한 네오마이신 내성, 및 대장균 및 기타 세균을 배양하기 위한 테트라사이클린, 카나마이신 또는 앰피실린 내성 유전자를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적 예는 세균 세포, 예를 들어 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 진균 세포, 예를 들어 효모 세포(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지에 또는 피키아 파스토리스(ATCC 등록 번호 201178)); 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도테라(Spodoptera) Sf9 세포; 동물 세포, 예를 들어 CHO, COS, NSO, 293, 및 보웬스(Bowes) 흑색종 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 적절한 배양 배지 및 상기 기재된 숙주 세포를 위한 조건은 당 분야에 공지되어 있다.

<424> 세균에 사용하기 위한 예시적인 벡터는 키아젠, 인크(QIAGEN, Inc.)사에서 시판되는 pQE70, pQE60 및 pQE-9; 스트라타진 클로닝 시스템즈, 인크(Stratagene Cloning Systems, Inc.)사에서 시판되는 pBluescript 벡터, Phagescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 파르마시아 바이오테크, 인크(Pharmacia Biotech, Inc.)사에서 시판되는 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5를 포함한다. 예시적인 진핵세포 벡터는 스트라타진사에서 시판되는 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 및 파르마시아사에서 시판되는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL이다. 효모 시스템에서 사용하기 위한 예시적인 발현 벡터는 pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, 및 PA0815(모두 인비트로젠(Carlsbad, CA)사에서 시판됨)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 기타 적절한 벡터는 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

<425> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 원핵세포 또는 진핵세포의 특정 구획으로 본 발명의 단백질을 국소화시키고/시키거나 원핵세포 또는 진핵세포로부터 본 발명의 단백질을 분리시키기 위한 신호 서열에 융합될 수 있다. 예를 들어, 대장균에서 신호서열은 원형질막 주위공간에 대한 단백질의 발현을 위한 것일 수 있다. 세균의 원형질막 주위공간에 대한 폴리펩티드의 직접적 발현을 위해 융합될 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대한 신호 서열 또는 단백질(또는 이의 단편)의 예는 *peIB* 신호 서열, 말토오스 결합 단백질(MBP) 신호 서열, MBP, *ompA* 신호 서열, 원형질막 대장균 열-민감 장독소 B-서브유닛, 및 알칼라인 포스파타아제의 신호 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단백질을 국소화시키는 융합 단백질의 작제를 위해, 여러 벡터가 시판된다. 예를 들어, 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)사에서 시판되는 pMAL 벡터 시리즈(특히, pMAL-p 시리즈). 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 폴리뉴클레오티드는 그람-네거티브 세균의 폴리펩티드의 발현 및 정제의 효율을 증가시키는 *peIB* 펙테이트 리아제(lyase) 신호 서열에 융합될 수 있다. 예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,576,195호 및 제5,846,818호를 참조하라.

<426> 포유동물 세포에서의 분비를 위한 본 발명의 알부민 융합 단백질에 융합될 수 있는 신호 펩티드의 예는 하기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다:

<427> a) MPIF-1 신호 서열(예를 들어, 유전자 은행 등록번호 AAB51134의 아미노산 1-21) MKVSVAALSCLMLVTALGSQA (SEQ ID NO:6)

<428> b) 스타니오킨 신호 서열 (MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO:7)

<429> c) HSA 신호 서열의 프레-프로 영역 (예를 들어, MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR, SEQ ID NO:8)

<430> d) HSA 신호 서열의 프레 영역 (예를 들어, MKWVTFISLLFLFSSAYS, SEQ ID NO:9) 또는 이의 변이체, 예를 들어 MKWVSFISLLFLFSSAYS, (SEQ ID NO:10)

<431> e) 역전효소 신호 서열 (예를 들어, MLLQAFLFLLAGFAAKISA, SEQ ID NO:11)

<432> f) 효모 교배 인자 알파 신호 서열 (예를 들어, MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFPFSNSTNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKR, SEQ ID NO:12 또는 MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFPFSNSTNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLDKR, SEQ ID NO:12)

<433> g) *K. 라티스* 킬러 독소 선도 서열

- <434> h) 하이브리드 신호 서열 (예를 들어, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR, SEQ ID NO:13)
- <435> i) HSA/MF α -1 하이브리드 신호 서열 (HSA/kex2로도 공지됨) (예를 들어, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEDKR, SEQ ID NO:14)
- <436> j) *K. 락티스* 킬러/MF α -1 융합 선도 서열 (예를 들어, MNIFYIFLFLLSFVQGSLEDKR, SEQ ID NO:15)
- <437> k) 면역글로불린 Ig 신호 서열 (예를 들어, MGWSCIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO:16)
- <438> l) 피볼린 B 전구물질 신호 서열 (예를 들어, MERAAPSRVRPLPLLLGGLALLAAGVDA, SEQ ID NO:17)
- <439> m) 클러스테린 전구물질 신호 서열 (예를 들어, MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG, SEQ ID NO:18)
- <440> n) 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4 신호 서열 (예를 들어, MLPLCLVAALLAAGPGPSLG, SEQ ID NO:19)
- <441> o) HSA 신호 서열의 프레-프로-영역의 변이체, 예를 들어
- <442> MKWVSFISLLFLFSSAYSRGVFRR (SEQ ID NO:20),
- <443> MKWVTFISLLFLFAGVLG (SEQ ID NO:21),
- <444> MKWVTFISLLFLFSGVLG (SEQ ID NO:22),
- <445> MKWVTFISLLFLFGGVLG (SEQ ID NO:23),
- <446> 변형된 HSA 선도 HSA #64 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO:24);
- <447> 변형된 HSA 선도 HSA #66 - MKWVTFISLLFLFGGVSG (SEQ ID NO:25);
- <448> 변형된 HSA (A14) 선도 - MKWVTFISLLFLFAGVSG (SEQ ID NO:26);
- <449> 변형된 HSA (S14) 선도 (변형된 HSA #65로도 공지됨) - MKWVTFISLLFLFSGVSG (SEQ ID NO:27),
- <450> 변형된 HSA (G14) 선도 - MKWVTFISLLFLFGGVSG (SEQ ID NO:28), 또는 MKWVTFISLLFLFGGVLGDLHKS (SEQ ID NO:29)
- <451> p) 콘센서스 신호 서열 (MPTWAWWLFLVLLALWAPARG, SEQ ID NO:30)
- <452> q) 산 포스파타아제 (PH05) 선도 (예를 들어, MFKSVVYSILAASLANA SEQ ID NO:31)
- <453> r) MFoz-1의 프레-서열
- <454> s) O 글루카나제(BGL2)의 프레-서열
- <455> t) 킬러 독소 선도
- <456> u) 킬러 독소의 프레서열
- <457> v) *K. 락티스* 킬러 독소 프레프로 (29 아미노산; 프레의 16개 아미노산 및 프로의 13개 아미노산) MNIFYIFLFLLSFVQGLEHTRRGSLDKR (SEQ ID NO:32)
- <458> w) *S. 디아스타티쿠스* 글루코아밀라아제 II 분비 선도 서열
- <459> x) *S. 칼스버젠시스* α -갈락토시다아제 (MEL1) 분비 선도 서열
- <460> y) *캔디다* 글루코아밀라아제 선도 서열
- <461> z) EP-A-387 319에 기재된 하이브리드 선도 (참조로서 본원에 포함됨)
- <462> aa) gp67 신호 서열 (배칼로바이러스 발현 시스템과 관련됨) (예를 들어, 유전자 은행 등록번호 AAA72759의 아미노산 1-19) 또는
- <463> bb) 치료 단백질 X의 자연 선도;
- <464> cc) JP 62-096086에 기재된 S.세레비지에 역전효소(SUC2) 선도(본원에 참조로서 포함된 승인된 특허 911036516); 또는
- <465> dd) 인슐리나아제 - MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR (SEQ ID NO:33).
- <466> ee) 변형된 TA57 프로펩티드 선도 변이체 #1 -

MKLKTVRSVAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQINSGLDVVGLISMAKR (SEQ ID NO:34)

<467> ff) 변형된 TA57 프로펩티드 선도 변이체 #2 -
MKLKTVRSVAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQINSGLDVVGLISMAEEGEPKR (SEQ ID NO:35)

<468> gg) 콘센서스 신호 펩티드 - MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA (SEQ ID NO:111)

<469> jj) 변형된 HSA/kex2 신호 서열 - MKWVSFISLLFLFSSAYSGLDKR (SEQ ID NO:112)

<470> kk) 콘센서스 신호 펩티드 #2 - MRPTWAWWLFLVLLALWAPARG (SEQ ID NO:105)

<471> 한 구체예에서, 변형된 HSA/kex2 신호 서열 (SEQ ID NO:112)은 본원에 기재된 바와 같은 알부민 및 치료 단백질을 포함하는 융합 단백질, 뿐만 아니라 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 W093/15199호; W097/24445호; W003/60071호; W003/59934호; 및 PCT/US04/01369호에 기재된 알부민 융합 단백질을 포함하는 알부민 융합 단백질의 아미노 말단에 융합된다. 변형된 HSA/kex2 신호 서열은, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Sleep et al., Biotechnology 1990, vol. 8, pp. 42-46]; 및 미국 특허 제5,302,697호에 기재된 HSA/kex2 신호 서열 (SEQ ID NO:14)에 기초한다. 본원에 기재된 변형된 HSA/kex2 선도 서열은 선조 신호 펩티드의 잔기 19에 비-보존적 아미노산 치환(Arg에서 Gly)을 함유한다. 변형된 HSA/kex2 신호 펩티드는 효모에서 발현되는 경우 변형되지 않은 HSA/kex2 신호 서열보다 알부민 융합 단백질의 예상치 않은 보다 나은 발현량 및/또는 보다 나은 분해 효율을 생성하는 것으로 밝혀졌다. 변형된 HSA/kex2 신호 펩티드의 변이체가 또한 본 발명에 포함된다. 특히, SEQ ID NO:112의 위치 19에서의 Gly 잔기는 Pro 잔기로 치환될 수 있다. 변형된 HSA/kex2 신호 서열의 기타 보존적인 치환이 또한 고려된다. SEQ ID NO:112의 변형된 HSA/kex2 신호 서열을 엔코딩하는 핵산, 뿐만 아니라 이의 보존적 치환 변이체가 또한 본 발명에 포함된다.

<472> 선택 마커로서 글루타민 합성효소(GS) 또는 DHFR를 사용하는 벡터는 각각 약제 메티오닌 선택시민 또는 메토크세이트의 존재하에서 증폭될 수 있다. 글루타민 합성효소 기재 벡터의 이점은 글루타민 합성효소 네거티브인 세포주(예를 들어, 무린 골수종 세포주, NSO)의 이용가능성이다. 글루타민 합성효소 발현 시스템은 또한 내인성 유전자의 기능화를 예방하기 위한 추가의 억제제를 제공함으로써 글루타민 합성효소 발현 세포(예를 들어, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포)에서 작용할 수 있다. 글루타민 합성효소 발현 시스템 및 이의 성분은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 PCT 공개 번호 W087/04462호; W086/05807호; W089/01036호; W089/10404호; 및 W091/06657호에 상세하게 기재되어 있다. 추가로, 글루타민 합성효소 발현 벡터는 론자 바이오로지스, 인크(Lonza Biologics, Inc., Portsmouth, NH)사로부터 취득될 수 있다. 무린 골수종 세포에서 GS 발현 시스템을 이용한 모노클로날 항체의 발현 및 생성은 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992) and in Biblia and Robinson *Biotechnol. Prog.* 11:1 (1995)]에 기재되어 있다.

<473> 본 발명은 또한 본원에 기재된 상기 기재된 벡터 작제물을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이고, 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 하나 이상의 이중유래 조절 영역(예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)과 작동적으로 관련된 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 함유하는 숙주 세포를 추가로 포함한다. 숙주 세포는 보다 고등한 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포(예를 들어, 인간 유래 세포), 또는 보다 저등한 진핵 세포, 예를 들어 효모 세포일 수 있거나, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 세균 세포일 수 있다. 숙주 군주는 요망되는 특정 방식으로 삽입된 유전자 서열의 발현을 조절하거나, 유전자 산물을 변형시키고 가공되도록 선택될 수 있다. 특정 프로모터로부터의 발현은 특정 유도인자의 존재하에서 상승될 수 있고; 이에 따라 유전공학 처리된 폴리펩티드의 발현이 조절될 수 있다. 더욱이, 다양한 숙주 세포는 단백질의 번역 및 번역후 가공 및 변형(예를 들어, 인산화, 분해)에 대한 특징적이고 특정한 메커니즘을 지닌다. 발현되는 외래 단백질의 요망되는 변형 및 가공을 보장하는 적절한 세포주가 선택될 수 있다.

<474> 본 발명의 핵산 및 핵산 작제물의 숙주 세포로의 도입은 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-텍스트란 매개 트랜스펙션, 양이온 지질-매개 트랜스펙션, 전기 천공, 형질도입, 감염, 또는 기타 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 다수의 표준 실험 매뉴얼, 예를 들어 문헌[Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)]에 기재되어 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 사실상 재조합 벡터가 결핍된 숙주 세포에 의해 발현될 수 있는 것이 특히 고려된다.

<475> 본원에 기재된 벡터 작제물을 함유하는 숙주 세포를 포함하는 것 이외에, 본 발명은 또한 내인성 유전적 물질을 결실시키거나 대체(예를 들어, 치료 단백질에 해당되는 코딩 서열은 치료 단백질에 해당하는 알부민 융합 단백질로 대체될 수 있음)하고/하거나 유전적 물질을 포함(예를 들어, 이중유래 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어 치료 단백질에 해당하는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 포함될 수 있음)하도록 공학처리된 척추동물, 특히 포

유동물 유래의 일차, 이차, 및 무한증식 숙주 세포를 포함한다. 내인성 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 관련된 유전적 물질은 내인성 폴리뉴클레오티드를 활성화, 변경, 및/또는 증폭시킬 수 있다.

- <476> 또한, 당 분야에 공지된 기술이 동종 재조합을 통해 이중유래 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 알부민 단백질, 또는 이의 단편 또는 변이체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드) 및/또는 이중유래 조절 영역(예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)와 치료 단백질을 엔코딩하는 내인성 폴리뉴클레오티드 서열을 작동적으로 관련시키는데 사용될 수 있다(예를 들어, 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 미국 특허 제5,641,670호, 1997년 6월 24일에 반포; 국제 공개 번호 WO 96/29411호; 국제 공개 번호 WO 94/12650호; Koller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); 및 Zijlstra *et al.*, *Nature* 342:435-438 (1989) 참조).
- <477> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 히드록시라파타이트(hydroxylapatite) 크로마토그래피, 소수성 전하 상호작용 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수되고 정제될 수 있다. 또 다른 양태에서, 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC")가 정제에 사용된다.
- <478> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 Q-세파로오스, DEAE 세파로오스, 포로스(poros) HQ, 포로스 DEAE, 토요펠(Toyopearl) Q, 토요펠 QAE, 토요펠 DEAE, 리소스(Resource)/소스(Source) Q 및 DEAE, 프락토겔(Fractogel) Q 및 DEAE 컬럼을 포함하나 이에 제한되지 않는 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <479> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 SP-세파로오스, CM 세파로오스, 포로스 HS, 포로스 CM, 토요펠 SP, 토요펠 CM, 리소스/소스 S 및 CM, 프락토겔 S 및 CM 컬럼 및 이들의 동등물 및 유사한 물질을 포함하나 이에 제한되지 않는 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <480> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 페닐, 부틸, 메틸, 옥틸, 헥실-세파로오스, 포로스 페닐, 부틸, 메틸, 옥틸, 헥실, 토요펠 페닐, 부틸, 메틸, 옥틸, 헥실 리소스/소스 페닐, 부틸, 메틸, 옥틸, 헥실, 프락토겔 페닐, 부틸, 메틸, 옥틸, 헥실 컬럼 및 이들의 동등물 및 유사한 물질을 포함하나 이에 제한되지 않는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <481> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 세파로오스 S100, S200, S300, 수퍼덱스(superdex) 레진 컬럼 및 이들의 동등물 및 유사한 물질을 포함하나 이에 제한되지 않는 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <482> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 HSA 또는 "융합 표적" 분자에 선택적인 유사 염료(Mimetic Dye) 친화성, 펩티드 친화성 및 항체 친화성 컬럼을 포함하나 이에 제한되지 않는 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제된다.
- <483> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 상기 나열된 하나 이상의 크로마토그래피를 이용하여 정제된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 크로마토그래피 컬럼, Q 세파로오스 FF 컬럼, SP 세파로오스 FF 컬럼, Q 세파로오스 고성능 컬럼, 블루 세파로오스 FF 컬럼, 블루 컬럼, 페닐 세파로오스 FF 컬럼, DEAE 세파로오스 FF, 또는 메틸 컬럼중 하나 이상을 이용하여 정제된다.
- <484> 또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 PCT 국제 공개 번호 WO 00/44772 호에 기재된 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 당업자는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 정제에 사용하기 위해 상기 기재된 방법을 용이하게 변형시킬 수 있다.
- <485> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 화학적 합성 방법의 생성물; 및 예를 들어 세균, 효모, 보다 고등한 식물, 곤충, 및 포유동물 세포를 포함하는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물로부터 회수될 수 있다. 재조합 생성 방법에서 사용되는 숙주에 따라, 본 발명의 폴리펩티드는 당화되거나 당화되지 않을 수 있다. 게다가, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 몇몇 경우에서 숙주-매개 공정의 결과로서 초기 변형된 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 따라서, 번역 초기 코돈에 의해 엔코딩된 N-말단 메티오닌이 모든 진핵 세포에서 번역후 임의의 단백질로부터 고효율로 제거되는 것이 당 분야에 널리 공지되어 있다. 대부분의 단백질에서의 N-말단 메티오닌이 또한 대부분의 원핵생물에서 효과적으로 제거되는 반면, 몇몇 단백질에 대해서는 N-말단 메티오닌이 공유적으로 결합된 아미노산의 특성에 따라 원핵생물 제거 공정이 비효율적이다.
- <486> 한 구체예에서, 효모 *피키아 파스토리스*가 진핵생물 시스템에서 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키기 위해 사용된다. *피키아 파스토리스*는 이의 유일한 탄소원으로서 메탄올을 물질 대사시킬 수 있는 메탄올자화 효

모이다. 메탄올 물질대사 경로에서의 주요 단계는 O_2 를 이용한 메탄올에서 포름알데히드로의 산화이다. 이러한 반응은 효소 알코올 옥시다아제에 의해 촉매된다. 유일한 탄소원으로서 메탄올을 물질대사하기 위하여, *피키아 파스토리스*는 부분적으로 O_2 에 대한 알코올 옥시다아제의 비교적 낮은 친화성으로 인해 고수준의 알코올 옥시다아제를 생성시켜야 한다. 그 결과로서, 주 탄소원으로서 메탄올에 의존한 성장 배지에서, 두개의 알코올 옥시다아제 유전자중 하나(*AOX1*)의 프로모터 영역은 고도로 활성이다. 메탄올의 존재하에서, *AOX1* 유전자로부터 생성된 알코올 옥시다아제는 *피키아 파스토리스*에서의 전체 가용성 단백질의 약 30% 이하를 포함한다. 문헌 [Ellis, S.B., et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:1111-21 (1985); Koutz, P.J., et al., *Yeast* 5:167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., *Nucl. Acids Res.* 15:3859-76 (1987)]을 참조하라. 따라서, *AOX1* 조절 서열의 전부 또는 일부의 전사 조절하에서, 이중유래 코딩 서열, 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 메탄올의 존재하에서 *피키아* 효모 성장에서 예외적으로 고수준으로 발현된다.

<487> 한 예에서, 플라스미드 벡터 pPIC9K는 문헌["*Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology," D.R. Higgins and J. Cregg, eds. The Human Press, Totowa, NJ, 1998]에 기재된 바와 같이 본질적으로 *피키아* 효모 시스템에서 본원에 배열된 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA를 발현시키기 위해 사용된다. 이러한 발현 벡터는 다중 클로닝 부위의 업스트림에 위치한 *피키아 파스토리스* 알칼라인 포스파타아제(PHO) 분비 신호 펩티드(즉, 선도 서열)에 연결된 강한 *AOX1* 프로모터에 의해 본 발명의 폴리펩티드의 발현 및 분비를 가능하게 한다.

<488> 제안된 발현 작제물이 필요에 따라 인-프레임 AUG를 포함하여 전사, 번역, 분비(요망되는 경우) 등을 위한 적절히 위치한 신호를 제공하는 한, pPIC9K 대신에 당업자가 용이하게 인식할 수 있는 많은 기타 효모 벡터, 예를 들어 pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, 및 PA0815가 사용될 수 있다.

<489> 또 다른 구체예에서, 이중유래 코딩 서열, 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 고수준의 발현은 본 발명의 이중유래 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터, 예를 들어 pGAPZ 또는 pGAPZ알파로 클로닝하고, 메탄올의 부재하에서 효모 배양물을 성장시킴으로써 달성될 수 있다.

<490> 게다가, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y., and Hunkapiller et al., *Nature*, 310:105-111 (1984)] 참조). 예를 들어, 폴리펩티드의 단편에 해당하는 폴리펩티드는 펩티드 합성기의 사용에 의해 합성될 수 있다. 더욱이, 요망되는 경우, 비고전(nonclassical) 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체가 치환 또는 폴리펩티드 서열로의 첨가로서 도입될 수 있다. 비고전 아미노산은 통상적인 아미노산의 D-이성질체, 2,4-디아미노부티르산, α-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, g-Abu, e-Ahx, 6-아미노 헥사논산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테인산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, b-알라닌, 플루오로-아미노산, 변조 아미노산, 예를 들어 b-메틸 아미노산, Ca-메틸 아미노산, Na-메틸 아미노산, 및 대체로 아미노산 유사체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 더욱이, 아미노산은 D(우선회) 또는 L(좌선회)일 수 있다.

<491> 본 발명은, 예를 들어 당화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호기/블로킹기에 의한 유도, 단백질 분해, 항체 분자 또는 기타 세포 리간드에 대한 결합 등에 의해 번역 동안 또는 번역 후에 특이적으로 변형되는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 포함한다. 임의의 다수의 화학적 변형이 브롬화 시아노젠, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8 프로테아제, $NaBH_4$ 에 의한 특이적 화학 분해; 아세틸화, 포르밀화, 산화, 환원; 투니카마이신의 존재하에서의 물질대사 합성; 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다.

<492> 본 발명에 포함되는 추가의 번역후 변형은, 예를 들어 N-결합 또는 O-결합 탄수화물 사슬, N-말단 또는 C-말단의 가공, 아미노산 백본에 대한 화학 부분의 부착, N-결합 또는 O-결합 탄수화물 사슬의 화학적 변형, 및 원핵 생물 숙주 세포 발현의 결과로서 N-말단 메티오닌 잔기의 첨가 또는 결실을 포함한다. 알부민 융합 단백질은 또한 검출가능한 표지, 예를 들어 단백질의 검출 및 단리를 가능하게 하는 효소, 형광, 동위원소 또는 친화성 표지로 변형될 수 있다.

<493> 적절한 효소의 예는 호스라디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린 스테라아제를 포함하고; 적절한 보조군의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적절한 형광 물질의 예는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플

루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시페라아제, 루시페린, 및 애큐오린을 포함하고; 적절한 방사성 물질의 예는 요오드(¹²¹I, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 트리튬(³H), 인듐(¹¹¹In, ¹²¹In, ^{113m}In, ^{115m}In), 테크네튬(⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), 티타늄(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³Pd), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 크세논(¹³³Xe), 플루오르(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, 및 ⁹⁷Ru를 포함한다.

<494> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체는 폴리펩티드에 대해 ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁶⁶Ho 및 ¹⁵³Sm를 포함하나 이에 제한되지 않는 방사성금속 이온과 회합된 거대고리 킬레이트제에 부착된다. 한 구체예에서, 거대고리 킬레이트제와 회합된 방사성금속 이온은 ¹¹¹In이다. 또 다른 구체예에서, 거대고리 킬레이트제와 회합된 방사성금속 이온은 ⁹⁰Y이다. 특정 구체예에서, 거대고리 킬레이트제는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 기타 특정 구체예에서, DOTA는 링커 분자에 의해 본 발명의 항체 또는 이의 단편에 부착된다. 폴리펩티드에 DOTA를 컨쥬게이션시키는데 유용한 링커 분자의 예는 당 분야에 통상적으로 공지되어 있고, 예를 들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 (1998); Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7 (1999); and Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50 (1999)]을 참조하라.

<495> 언급된 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 자연적인 공정, 예를 들어 번역후 공정, 또는 당 분야에 널리 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 동일한 유형의 변형이 소정의 폴리펩티드의 여러 부위에서 동일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있음이 인식될 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어 유비퀴틴화의 결과로서 분지될 수 있고, 이들은 분지를 지니거나 지니지 않는 고리형일 수 있다. 고리형, 분지형, 및 분지된 고리형 폴리펩티드는 번역후 자연 공정으로부터 생성될 수 있거나, 합성 방법에 의해 이루어질 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아마이드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 부분의 공유 부착, 누클레오티드 또는 누클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜노지톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 이황화결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 당화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스틸화, 산화, 폐길화, 단백질분해 공정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 술폰화, 아르기닐화와 같은 단백질에 대한 아미노산의 트랜스퍼-RNA 매개 첨가, 및 유비퀴틴화를 포함한다(예를 들어, 문헌[PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)] 참조).

<496> 치료 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체에 결합하는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 항체는 정제를 촉진하는 펩티드와 같은 마커 서열에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 마커 아미노산 서열은 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 등에서 제공된 태그와 같은 헥사-히스티딘 펩티드이고, 이들 중 다수는 시판된다. 문헌[Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 위해 제공된다. 정제에 유용한 기타 펩티드 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 "HA" 태그(Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) 및 "플래그" 태그를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<497> 추가로, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료 부분, 예를 들어 세포독소, 예를 들어 세포증식 억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출기, 예를 들어 ²¹³Bi에 컨쥬게이션될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 예로서 파클리탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료제는 항대사물질(예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로에타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이

전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 항유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- <498> 본 발명의 컨주게이트는 소정의 생물학적 반응을 변형시키기 위해 사용될 수 있고, 치료제 또는 약물 부분은 고전 화학 치료제에 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 부분은 요망되는 생물학적 활성을 소유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 독소, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자, 알파-인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 아포토시스 작용제, 예를 들어 TNF-알파, TNF-베타, AIM I(국제 공개 WO 97/33899 참조), AIM II(국제 공개 번호 WO 97/34911 참조), Fas 리간드(Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGI(국제 공개 번호 WO 99/23105 참조), 혈전 작용제 또는 항혈관형성 작용제, 예를 들어 안지오테닌 또는 엔도스타틴; 또는 생물학적 반응 변형제, 예를 들어 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 집락 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 집락 자극 인자("G-CSF"), 또는 기타 성장 인자를 포함할 수 있다. 이러한 치료 부분을 단백질(예를 들어, 알부민 융합 단백질)에 컨주게이팅시키는 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있다.
- <499> 알부민 융합 단백질은 또한 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 이는 특히 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 결합되었거나, 이에 결합하거나, 이와 회합된 폴리펩티드의 면역검정 또는 정제를 위해 유용하다. 이러한 고체 지지체는 유리, 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- <500> 단독으로 또는 세포독성 인자(들) 및/또는 시토카인(들)과 조합하여 투여된, 이에 컨주게이트된 치료학적 부분을 지니거나 지니지 않은 알부민 융합 단백질이 치료제로서 사용될 수 있다.
- <501> 본 발명의 알부민 융합 단백질이 치료 단백질을 결합시키는 항체의 VH 도메인만을 포함하는 구체예에서, VH-알부민 융합 단백질 및 VL 단백질이 번역후에 (공유 또는 비공유적으로) 회합되도록 치료 단백질을 결합시키는 동일한 항체의 VL 도메인과 융합 단백질을 동시 발현시키는 것이 필수적이고/거나 요망될 수 있다.
- <502> 본 발명의 알부민 융합 단백질이 치료 단백질을 결합시키는 항체의 VL 도메인만을 포함하는 구체예에서, VL-알부민 융합 단백질 및 VH 단백질이 번역후에 (공유 또는 비공유적으로) 회합되도록, 치료 단백질을 결합시키는 동일한 항체의 VH 도메인과 융합 단백질을 동시 발현시키는 것이 필수적이고/거나 요망될 수 있다.
- <503> 몇몇 치료학적 항체에는 이중 특이성 항체가 있는데, 이는 치료 단백질을 결합시키는 항체가 두개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 두개의 상이한 결합 사이트를 갖는 인공 혼성 항체임을 의미한다. 치료 단백질에 상응하는 알부민 융합 단백질을 생성시키기 위하여, 알부민 단백질 부분의 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 융합된 scFv 단편을 갖는 알부민 융합 단백질을 생성시킬 수 있다. 더욱 구체적으로, 알부민의 N-말단에 융합된 scFv는 치료 단백질을 결합시키는 본래 항체의 중쇄/경쇄 (VH/VL) 쌍 중 하나에 상응할 것이며, 알부민의 C-말단에 융합된 scFv는 치료 단백질을 결합시키는 본래 항체의 다른 중쇄/경쇄 (VH/VL) 쌍에 상응할 것이다.
- <504> 또한 본 발명은 폴리펩티드의 용해도, 안정성 및 순환 시간의 증가, 또는 면역원성의 감소와 같은 추가적인 장점들을 제공할 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 화학적으로 개질된 유도체를 제공한다[참조, 미국특허 번호 4,179,337호]. 유도체화(derivitization)를 위한 화학적 부분은 수용성 폴리머, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 코폴리머, 카르복시메틸셀룰로즈, 텍스트란, 폴리비닐 알코올 등으로부터 선택될 수 있다. 알부민 융합 단백질은 분자내의 랜덤 위치에서, 또는 분자내의 사전결정된 위치에서 개질될 수 있고, 한개, 두개, 세개 이상의 부착된 화학적 부분을 포함할 수 있다.
- <505> 폴리머는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지되거나 비분지될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜에 대하여, 분자량은 용이하게 조작하고 제조하기 위하여, 약 1 kDa 내지 약 100 kDa일 수 있다(용어 "약"은 폴리에틸렌 글리콜의 제조에서, 몇몇 분자가 기술된 분자량 보다 높거나 약간 낮은 분자량을 가짐을 나타낸다.). 요망되는 치료학적 프로필(요망되는 지연 방출 시간, 임의의 경우 생물학적 활성의 효과, 조작의 용이성, 항원성의 정도 또는 결여, 및 치료 단백질 또는 유사체에 대한 폴리에틸렌 글리콜의 다른 알려진 효과)에 따라, 다른 크기들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 약 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10,000, 10,500, 11,000, 11,500, 12,000, 12,500, 13,000, 13,500, 14,000, 14,500, 15,000, 15,500, 16,000, 16,500, 17,000, 17,500, 18,000, 18,500, 19,000, 19,500, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000, 45,000, 50,000, 55,000,

60,000, 65,000, 70,000, 75,000, 80,000, 85,000, 90,000, 95,000, 또는 100,000 kDa의 평균분자량을 가질 수 있다.

<506> 상기에 기술된 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜은 분지된 구조를 가질 수 있다. 분지된 폴리에틸렌 글리콜은 예를 들어 미국특허번호 5,643,575호; 및 문헌[Morpurgo *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); and Caliceti *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10:638-646 (1999)]에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 포함된다.

<507> 폴리에틸렌 글리콜 분자 (또는 다른 화학적 부분)는 단백질의 기능적 또는 항원성 도메인에 대한 효과를 고려하여 단백질에 부착될 것이다. 당업자에게 입수가능한 여러 부착 방법, 예를 들어 EP 0 401 384호에 기술된 방법 (G-CSF에 PEG를 커플링)이 존재하며, 이는 본원에 참조로서 포함된다[참조, Malik *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (1992), 트레실 클로라이드를 이용하여 GM-CSF의 페그화(pegylation)를 기술함]. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 자유 아미노 또는 카르복실기와 같은 반응성 기에 의해 아미노산 잔기를 통해 공유 결합될 수 있다. 반응성 기는 활성화된 폴리에틸렌 글리콜 분자가 결합될 수 있는 기이다. 자유 아미노기를 갖는 아미노산 잔기는 라이신 잔기 및 N-말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며; 자유 카르복실기를 가진 잔기는 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기 및 C-말단 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 설프히드릴 기는 또한 폴리에틸렌 글리콜 분자를 부착시키기 위한 반응성 기로서 사용될 수 있다. 치료학적 목적을 위하여, 아미노 기에, 예를 들어 N-말단 또는 라이신 기에 부착이 이루어질 수 있다.

<508> 상기에 제시된 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜은 임의의 다수의 아미노산 잔기에 대한 연결에 의해 단백질에 부착될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 라이신, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인 잔기에 대한 공유 결합에 의해 단백질에 연결될 수 있다. 하나 이상의 반응 화학이 단백질의 특정 아미노산 잔기 (예를 들어, 라이신, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 시스테인) 또는 단백질의 한계를 초과하는 타입의 아미노산 잔기 (예를 들어, 라이신, 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인 및 이들의 조합)에 폴리에틸렌 글리콜을 부착시키기 위해 사용될 수 있다.

<509> 상세하게는 N-말단이 화학적으로 개질된 단백질이 요망될 수 있다. 본 조성물의 실례로서 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여, 다양한 폴리에틸렌 글리콜 분자 (분자량, 분기 등에 따라), 반응 혼합물 중에서 단백질 (폴리펩티드) 분자에 대한 폴리에틸렌 글리콜 분자의 비, 수행되는 페그화 반응의 타입, 및 선택된 N-말단 페그화된 단백질을 얻는 방법으로부터 선택될 수 있다. N-말단이 페그화된 제조물을 얻기 위한 방법 (즉, 필요한 경우, 다른 모노 페그화된 부분으로부터 이러한 부분을 분리시킴)은 페그화된 단백질 분자의 집단으로부터 N-말단이 페그화된 물질의 정제에 의한 것일 수 있다. N-말단 개질에서 화학적으로 개질된 선택적 단백질은 특히 단백질을 유도체화하기 위해 입수가능한 상이한 타입의 1차 아미노 기(라이신 대 N-말단)의 차별적인 반응성을 이용하는 환원성 알킬화에 의해 달성될 수 있다. 적절한 반응 조건 하에서, 카르보닐기 함유 폴리머로의 N-말단에서 단백질의 실질적인 선택적 유도체화가 달성된다.

<510> 상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 페그화는 임의의 수의 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 직접적으로 또는 중개 링커에 의해 알부민 융합 단백질에 부착될 수 있다. 단백질에 폴리에틸렌 글리콜을 부착시키기 위한 링커부재 시스템은 문헌[Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992); Francis *et al.*, *Intern. J. of Hematol.* 68:1-18 (1998)]; 및 미국특허번호 제 5,349,052호; WO 95/06058호; 및 WO 98/32466호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 포함된다.

<511> 중개 링커 없이 단백질의 아미노산 잔기에 폴리에틸렌 글리콜을 직접 부착시키기 위한 하나의 시스템은 트레실화된 MPEG를 사용하며, 이는 트레실클로라이드 ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$)를 이용하여 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜 (MPEG)을 개질시킴으로써 형성된다. 단백질과 트레실화된 MPEG와의 반응시에, 폴리에틸렌 글리콜은 단백질의 아민 기에 직접 부착된다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 단백질을 2,2,2-트리플루오로에탄 설포닐기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 분자와 반응시킴으로써 형성된 단백질-폴리에틸렌 글리콜 컨주게이트를 포함한다.

<512> 폴리에틸렌 글리콜은 또한 여러 상이한 중개 링커를 이용하여 단백질에 부착될 수 있다. 예를 들어, 미국특허번호 제 5,612,460호 (전체 내용이 본원에 참조로서 포함됨)에는 단백질에 폴리에틸렌 글리콜을 연결시키기 위한 우레탄 링커가 기재되어 있다. 폴리에틸렌 글리콜이 링커에 의해 단백질에 부착된 단백질-폴리에틸렌 글리콜 컨주게이트는 또한 단백질을 MPEG-숙신이미딜숙시네이트, 1,1'-카르보닐디이미다졸로 활성화된 MPEG, MPEG-2,4,5-트리클로로페닐카르보네이트, MPEG-p-니트로페닐카르보네이트, 및 다양한 MPEG-숙시네이트 유도체와 같은 화합물과 반응시킴으로써 형성될 수 있다. 여러 추가적인 폴리에틸렌 글리콜 유도체, 및 단백질에 폴리에틸렌

글리콜을 부착시키기 위한 반응 화학은 국제특허공개번호 WO 98/32466호에 기술되어 있으며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에 기술된 반응 화학을 이용하여 형성된 페그화된 단백질 생성물은 본 발명의 범위내에 포함된다.

<513> 본 발명의 각 알부민 융합 단백질에 부착된 폴리에틸렌 글리콜 부분의 수(즉, 치환도)는 또한 변경될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 페그화된 단백질은 평균 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20개 또는 그 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자에 연결될 수 있다. 유사하게는, 평균 치환도는 단백질 분자 당 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 또는 18-20개의 폴리에틸렌 글리콜 부분과 같은 범위내에 존재한다. 치환도를 결정하는 방법은 예를 들어 문헌[Delgado et al., *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992)]에 기술되어 있다.

<514> 본 발명의 폴리펩티드는 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로즈 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 히드록실인회석 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 표준 방법에 의한 재조합 세포 배양 및 화학적 합성으로부터 회수되고 정제될 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, 고성능 액체크로마토그래피("HPLC")가 정제를 위해 사용된다. 단백질의 재접힘(refolding)을 위한 널리 알려진 기술은 폴리펩티드가 분리 및/또는 정제 동안에 변성될 때 활성 형태를 재생시키기 위해 사용될 수 있다.

<515> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 존재 및 양은 당해 분야에 널리 알려진 면역 검정인 ELISA를 이용하여 결정될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질을 검출/정량화하기 위해 유용한 하나의 ELISA 프로토콜에서, ELISA 플레이트를 항-인간 혈청 알부민 항체로 코팅하고, 비특이적 결합을 방지하기 위하여 플레이트를 블로킹하고, ELISA 플레이트를 세척하고, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 함유한 용액을 (하나 이상의 상이한 농도로) 첨가하고, (본원에 기술되거나 그밖에 당해 분야에 알려진) 검출가능한 라벨에 커플링된 2차 항-치료 단백질 특이적 항체를 첨가하고, 2차 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 프로토콜의 대안적인 버전에서, ELISA 플레이트는 항-치료 단백질 특이적 항체로 코팅될 수 있으며, 라벨링된 2차 시약은 항-인간 알부민 특이적 항체일 수 있다.

<516> 폴리뉴클레오티드의 용도

<517> 본원에서 동정된 폴리뉴클레오티드 각각은 수많은 방법에서 시약으로서 사용될 수 있다. 하기 설명은 대표적인 것으로서, 공지된 기술들을 사용할 수 있다.

<518> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 형성하기에 유용하다. 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (엔코딩 알부민 융합 단백질)는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질에 의해 엔코딩된 알부민 융합 단백질을 발현시키는 세포, 세포주, 또는 조직을 제조하기 위해 유전공학에서 유용한 재조합 DNA 방법에서 사용될 수 있다.

<519> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 유전자 치료에서 유용하다. 유전자 치료의 하나의 목적은 유전학적 결함을 바로 잡기 위한 노력으로, 결함있는 유전자를 갖는 유기체에 정상 유전자를 삽입하기 위한 것이다. 본 발명에 기술된 폴리뉴클레오티드는 매우 정확한 방식으로 이러한 유전학적 결함을 타겟화하는 수단을 제공한다. 다른 목적은 숙주 계통에 존재하지 않는 새로운 유전자를 삽입하기 위한 것으로서, 이에 의해 숙주 세포에 새로운 형질을 형성시킨다. 본 발명에 의해 완수되는 유전자 치료법의 추가적인 비제한적 예는 본원의 다른 곳에서 더욱 상세히 기술되어 있다[참조, "유전자 치료"로 분류된 섹션, 및 실시예 61 및 62].

<520> 폴리펩티드의 용도

<521> 본원에서 동정된 각 폴리펩티드는 수많은 방법에서 사용될 수 있다. 하기 설명은 대표적인 것으로서, 공지된 기술을 이용할 수 있다.

<522> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 조직(들)의 분화적 동정(differential identification)을 위한 면역학적 프로프(예를 들어, 면역조직화학 검정, 예를 들어 ABC 면역과염색법 (Hsu et al., *J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580 (1981)), 또는 세포 타입(들) (예를 들어, 면역세포화학 검정)을 제공하는데 유용하다.

<523> 알부민 융합 단백질은 당업자에게 알려진 고전적인 면역조직학적 방법을 이용하여 생물학적 샘플 중의 폴리펩티드의 수준을 검정하는데 사용될 수 있다[예를 들어, Jalkanen, et al., *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)]. 단백질 유전자 발현을 검출하는데 유용한 다른 방법들은 면역 검정, 예를 들어 효소 연결된 면역흡착제 검정 (ELISA) 및 방사면역 검정 (RIA)을 포함한다. 적합

한 검정 라벨은 당해 분야에 알려져 있고, 효소 라벨, 예를 들어 글루코즈 옥시다제; 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드 (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), 및 테크네튬 (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 티타늄 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga , ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브덴 (^{99}Mo), 제논 (^{133}Xe), 불소 (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ; 발광 라벨, 예를 들어, 루미놀(luminol); 형광 라벨, 예를 들어 플루오레세인(fluorescein) 및 로다민(rhodamine), 및 바이오틴(biotin)을 포함한다.

<524> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 영상화(imaging)에 의해 생체내에서 검출될 수 있다. 단백질의 생체내 영상화를 위한 라벨 또는 마커는 X-방사선촬영, 핵자기공명 (NMR) 또는 전자스핀폴립 (electron spin relaxtion, ESR)에 의해 검출가능한 것들을 포함한다. X-방사선촬영을 위하여, 적합한 라벨로는 바륨 또는 세슘과 같은 방사성 동위원소를 포함하며, 이는 피검체에 공공연하게 해를 끼치지 않는 검출가능한 방사선을 방출시킨다. NMR 및 ESR를 위해 적합한 마커로는 검출가능한 특징적인 스핀, 예를 들어 중수소를 지닌 마커를 포함하며, 이는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키는 세포주에 제공된 영양소를 라벨링함으로써 알부민 융합 단백질에 도입될 수 있다.

<525> 적절한 검출가능한 영상화 부분, 예를 들어 방사성 동위원소 (예를 들어, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), 및 테크네튬 (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 티타늄 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga , ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브덴 (^{99}Mo), 제논 (^{133}Xe), 불소 (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , 방사선 비투과성 물질, 또는 핵자기공명에 의해 검출가능한 물질로 라벨링된 알부민 융합 단백질은 포유동물에 (예를 들어, 비경구적으로, 피하로 또는 복막내로) 도입되어 면역 시스템 질환에 대해 시험된다. 피검체의 크기 및 사용된 영상화 시스템이 진단 이미지를 형성시키기 위해 필요로 하는 영상화 부분의 양을 결정하는 것으로 당해 분야에서 이해될 것이다. 인간 피검체에 대한 방사성 동위원소 부분의 경우에서, 주입된 방사선활성의 양은 대개 약 5 내지 20 밀리퀴리(millicurie)의 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 범위일 것이다. 라벨링된 알부민 융합 단백질은 이후 우선적으로 하나 이상의 수용체, 리간드 또는 물질(본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용되는 치료 단백질의 물질에 해당함)이 위치한 신체(예를 들어, 기관, 세포, 세포외공간 또는 세포외기질)의 적소에 축적될 것이다. 대안적으로, 알부민 융합 단백질이 치료학적 항체의 적어도 단편 또는 변이체를 포함하는 경우에, 라벨링된 알부민 융합 단백질은 이후 우선적으로 (본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하기 위해 사용되는) 치료학적 항체에 의해 결합된 것과 상응하는 폴리펩티드/에피토프가 위치한 신체(예를 들어, 기관, 세포, 세포외공간 또는 세포외기질)의 적소에 축적될 것이다. 생체내 종양 영상화는 문헌[S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))]에 기술되어 있다. 여기에 기술된 프로토콜은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 이용하기 위해 당업자에 의해 용이하게 변형될 수 있다.

<526> 한 구체예에서, 본 발명은 이중유래의 폴리펩티드 또는 핵산과 회합된 본 발명의 알부민 융합 단백질(예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 항체를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 폴리펩티드)을 투여함으로써 세포에 본 발명의 알부민 융합 단백질을 특이적으로 전달하는 방법을 제공한다. 일 예에서, 본 발명은 표적화된 세포 내로 치료 단백질을 전달하는 방법을 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 표적화된 세포 내로 단일 가닥의 핵산(예를 들어, 안티센스 또는 리보자임) 또는 이중 가닥의 핵산(예를 들어, 세포의 게놈으로 통합되거나 에피솜으로 복제될 수 있고, 전사될 수 있는 DNA)을 전달하는 방법을 제공한다.

<527> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 독소 또는 세포독성 전구약물과 관련하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 투여함으로써 세포의 특이적 파괴(예를 들어, 종양 세포의 파괴)하는 방법을 제공한다.

<528> "독소"는 내인성 세포독성 효과기(effector) 시스템, 방사성 동위원소, 홀로톡신(holotoxin), 변형된 독소, 독소의 촉매 서브유닛, 또는 규정된 조건하에서 세포 사멸을 야기하는 세포의 표면 내 또는 표면 상에 일반적으로 존재하지 않는 임의의 분자 또는 효소에 결합하고 활성화시키는 하나 이상의 화합물을 의미한다. 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있는 독소는 당해 분야에 공지된 방사성 동위원소, 화합물, 예를 들어내인성 세포독성 효과기 시스템에 선천적으로 결합하거나 이를 유도하는 항체(또는 이의 부분을 함유하는 보체 결합 항체), 티미딘 키나아제, 엔도뉴클레아제, RNase, 알파 독소, 리신, 아브린, 슈도모나스 엑소톡신 A, 디프테리아 독소,

사포린, 모모르딘, 겔로닌, 역새폴 항바이러스 단백질, 알파-사르신 및 콜레라 독소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "독소"는 또한 세포증식 억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어알파-방출기, 예를 들어 ^{213}Bi , 또는 다른 방사성 동위원소, 예를 들어, ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{이트륨}$, $^{117}\text{주석}$, $^{186}\text{레늄}$, $^{166}\text{홀름}$, 및 $^{188}\text{레늄}$; 발광 라벨, 예를 들어루미놀; 및 형광 라벨, 예를 들어플루오레세인 및 로다민, 및 바이오틴을 포함한다. 특정한 한 구체예에서, 본 발명은 방사성 동위원소 ^{90}Y 와 공동으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 항체를 투여함으로써 세포를 특이적으로 파괴(예를 들어, 종양 세포의 파괴)하는 방법을 제공한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 방사성 동위원소 ^{111}In 과 공동으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 항체를 투여함으로써 세포를 특이적으로 파괴(예를 들어, 종양 세포의 파괴)하는 방법을 제공한다. 추가의 특정 구체예에서, 본 발명은 방사성 동위원소 ^{131}I 와 공동으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 항체를 투여함으로써 세포를 특이적으로 파괴(예를 들어, 종양 세포의 파괴)하는 방법을 제공한다.

<529> 본 발명의 폴리펩티드를 라벨링하기 위한 당해 분야에 공지된 기술이 적용될 수 있다. 이러한 기술들은 이작용성 컨쥬게이팅 제제의 사용을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다[예를 들어, 미국특허번호 제 5,756,065호; 제 5,714,631호; ㄱ제 5,696,239호; 제 5,652,361호; 제 5,505,931호; 제 5,489,425호; 제 5,435,990호; 제 5,428,139호; 제 5,342,604호; 제 5,274,119호; 제 4,994,560호; 및 제 5,808,003호, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로서 포함됨].

<530> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 포유동물, 예를 들어 인간에서 다양한 질환의 진단, 치료, 예방 및/또는 예후에 유용하다. 이러한 질환은 본원에서 "생물학적 활성"의 섹션에 기술된 질환들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

<531> 따라서, 본 발명은 (a) 본 발명의 알부민 융합 단백질을 이용하여 개체의 세포 또는 체액에서의 특정 폴리펩티드의 발현 수준을 검정하고, (b) 검정된 폴리펩티드 발현 수준을 표준 폴리펩티드 발현 수준과 비교하고, 이에 의해 표준 발현 수준에 대한 검정된 폴리펩티드 발현 수준의 증가 또는 감소가 질환을 나타내는 것을 포함하여, 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 암과 관련하여, 개체로부터의 생검 조직에서의 비교적 높은 양의 전사체의 존재는 질병의 발달에 대한 소인을 나타낼 수 있거나, 실제 임상적 증상의 출현에 앞서 질병을 검출하기 위한 수단을 제공할 수 있다. 이러한 유형의 보다 명확한 진단은 건강 전문가로 하여금 예방적 측정 또는 보다 이른 적극적인 치료를 가능하게 하여 암의 발달 또는 추가 진행을 막을 수 있다.

<532> 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 신경 질환(neural disorder), 면역계 질환(immune system disorder), 근 질환(muscular disorder), 생식 질환(reproductive disorder), 위장 질환(gastrointestinal disorder), 폐 질환(pulmonary disorder), 심혈관 질환(cardiovascular disorder), 신장 질환(renal disorder), 증식성 질환(proliferative disorder), 및/또는 암 질환(cancerous disease) 및 병태와 같은 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드(예를 들어, 인슐린)의 부재 또는 감소된 수준을 대체하기 위해, 다양한 폴리펩티드(예를 들어, 헤모글로빈 B에 대한 헤모글로빈 S, SOD, 카탈라아제, DNA 복구 단백질)의 부재 또는 감소된 수준을 보충하기 위해, 폴리펩티드(예를 들어, 종양유전자 또는 종양 억제제)의 활성을 억제하기 위해, 폴리펩티드의 활성을 활성화시키기 위해(예를 들어, 수용체에 대한 결합에 의해), 자유 리간드(예를 들어, 염증을 감소시키는데 사용되는 가용성 TNF 수용체)에 대해 이를 경쟁시킴으로써 막 결합 수용체의 활성을 감소시키기 위해, 또는 요망되는 반응(예를 들어, 혈관 성장 억제, 증식성 세포 또는 조직에 대한 면역 반응의 향상)을 초래하기 위한 노력으로 본 발명의 폴리펩티드가 환자에게 투여될 수 있다.

<533> 특히, 치료 항체의 하나 이상의 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질이 또한 질환(상기 기술된 것, 및 본원의 어딘가에 기술된 것)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 항체의 적어도 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질의 투여는 알부민 융합 단백질에 특이적으로 결합시키기 위해 사용되는 치료 항체에 폴리펩티드를 결합시키고/거나 중화시킬 수 있고/있거나, 알부민 융합 단백질을 특이적으로 결합시키기 위해 사용되는 치료 단백질에 대한 폴리펩티드의 과잉 생산을 감소시킬 수 있다. 유사하게, 치료 항체의 적어도 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질의 투여는 막(수용체)에 결합된 폴리펩티드에 결합시킴으로써, 알부민 융합 단백질을 특이적으로 결합시키기 위해 사용된 치료 항체에 대해 폴리펩티드를 활성화시킬 수 있다.

<534> 적어도, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 당업자에게 널리 공지된 방법을 이용하는 SDS-PAGE 겔 또는 분자체 겔

여과 컬럼 상에서 분자량 마커로서 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 항체를 증가시키기 위해 사용될 수 있고, 차례로 이는 숙주 세포, 또는 생물학적 샘플의 형질전환을 평가하는 방법으로서, 재조합 세포로부터 본 발명의 치료 단백질, 알부민 단백질, 및/또는 알부민 융합 단백질의 단백질 발현을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본원에 기술된 생물학적 활성을 시험하기 위해 사용될 수 있다.

<535> 진단 검정

<536> 본 발명의 화합물은 포유동물, 바람직하게는 인간의 다양한 질환의 진단, 치료, 예방 및/또는 예후에 유용하다. 이러한 질환은 표 1의 해당열의 각각의 치료 단백질에 대해 기술되고, 본원에 "면역 활성," "혈액 관련 질환," "과증식 질환," "신장 질환," "심혈관 질환," "호흡기 질환," "항-혈관형성 활성," "세포 수준에서의 질환," "상처 치유 및 상피 세포 증식," "신경 활성 및 신경계 질병," "내분비 질환," "생식계 질환," "감염성 질환," "재생," 및/또는 "위장 질환" 등의 제목의 섹션에 기술된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<537> 다수의 질환에 대해, 유전자 발현의 실질적으로 변화(증가 또는 감소)된 수준은 "표준" 유전자 발현 수준, 즉 질환을 지니지 않는 개체로부터의 조직 또는 체액에서의 발현 수준에 비교하여, 이러한 질환을 지니는 개체로부터 수득한 조직, 세포 또는 체액(예를 들어, 혈청, 혈장, 뇨, 정액, 윤활액 또는 척수액)에서 검출될 수 있다. 본 발명은 개체로부터의 조직, 세포 또는 체액에서 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하고, 측정된 유전자 발현 수준을 표준 유전자 발현 수준과 비교하고, 이에 의해 표준에 대한 유전자 발현의 수준(들)의 증가 또는 감소가 질환을 나타냄을 포함하는, 질환의 진단 동안 유용한 진단 방법을 제공한다. 이러한 진단 검정법은 생체내 또는 시험관내, 예를 들어, 혈액 샘플, 생검 조직 또는 부검 조직에서 수행될 수 있다.

<538> 본 발명은 또한 예후 지시제(prognostic indicator)로서 유용하고, 이에 의해 향상되거나 감소된 유전자 발현을 나타내는 환자는 보다 나쁜 임상 결과를 경험할 것이다.

<539> "폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자의 발현 수준을 검정함"은 일차 생물학적 샘플에서 직접적으로(예를 들어, 순수 단백질 수준 또는 mRNA 수준을 결정하거나 측정함) 또는 상대적으로(예를 들어, 이차 생물학적 샘플의 폴리펩티드 수준 또는 mRNA 수준을 비교함) 특정 폴리펩티드(예를 들어, 표 1에 기술된 치료 단백질에 해당하는 폴리펩티드)의 수준 또는 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 수준을 정성적으로 또는 정량적으로 측정하거나 추정하는 것을 의미한다. 한 구체예에서, 일차 생물학적 샘플에서의 폴리펩티드 발현 수준 또는 mRNA 수준이 측정되거나 추정되고, 표준 폴리펩티드 수준 또는 mRNA 수준과 비교되며, 여기서 표준은 질환을 지니지 않는 개체로부터 수득된 이차 생물학적 샘플로부터 수득되거나 질환을 지니지 않는 개체의 집단으로부터의 수준을 평균화함으로써 결정된다. 당해 분야에서 인지되는 바와 같이, 표준 폴리펩티드 수준 또는 mRNA 수준이 공지되면, 이는 비교를 위한 표준으로 반복적으로 사용될 수 있다.

<540> "생물학적 샘플"은 개체로부터 수득된 임의의 생물학적 샘플, 세포주, 조직 배양물, 또는 본 발명의 폴리펩티드(이의 부분을 포함함) 또는 mRNA를 함유하는 기타 공급원을 의미한다. 기술된 바와 같이, 생물학적 샘플은 체액(예를 들어, 혈청, 혈장, 뇨, 윤활액 및 척수액) 및 폴리펩티드 또는 mRNA의 전장 또는 이의 단편을 발현하는 것으로 밝혀진 조직원을 포함한다. 포유동물로부터 조직 생검 및 체액을 수득하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 생물학적 샘플이 mRNA를 포함하는 경우, 이는 조직 생검으로부터 얻어질 수 있다.

<541> 전체 세포 RNA는 임의의 적합한 기술, 예를 들어 문헌[Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)]에 기술된 단일-단계 구아니디늄-티오시아네이트-페놀-클로로포름 방법을 이용하여 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 수준은 이후 임의의 적절한 방법을 이용하여 검정된다. 이는 노던 블로팅 분석(Northern blot analysis), S1 뉴클레아제 맵핑(mapping), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 중합효소 연쇄 반응과 조합된 역전사(RT-PCR), 및 리가아제 연쇄 반응과 조합된 역전사(RT-LCR)를 포함한다.

<542> 본 발명은 또한 진단 검정, 예를 들어 폴리펩티드의 정상 및 비정상 수준의 결정을 포함하여, 생물학적 샘플(예를 들어, 세포 및 조직)에서 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합되거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 수준을 검출하기 위한 정량 및 진단 검정법에 관한 것이다. 따라서, 예를 들어, 정상 대조군 조직 샘플과 비교하여 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 비정상적 발현을 검출하기 위한 본 발명에 따른 진단 검정법은 종양의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 숙주로부터 유래된 샘플 내의 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있는 검정 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 검정 방

법은 방사면역검정, 경쟁적-결합 검정, 웨스턴 블로팅 분석(Western Blot analysis) 및 ELISA 검정을 포함한다. 생물학적 샘플에서 폴리펩티드 수준을 검정하는 것은 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

- <543> 생물학적 샘플 내의 폴리펩티드 수준을 검정하는 것은 다양한 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 조직에서의 폴리펩티드 발현은 고전적인 면역조직화 방법(Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell . Biol. 105:3087-3096 (1987))으로 연구될 수 있다. 폴리펩티드 유전자 발현을 검정하기에 유용한 다른 방법은 면역검정, 예를 들어 효소 연결된 면역흡착제 검정(ELISA) 및 방사면역검정(RIA)을 포함한다. 적합한 항체 검정 라벨은 당해 분야에 공지되어 있고, 효소 라벨, 예를 들어 글루코오스 옥시다아제, 및 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드(^{125}I , ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 트리튬(^3H), 인듐(^{112}In), 및 테크네튬($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 및 형광 라벨, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 바이오틴을 포함한다.
- <544> 분석되는 조직 또는 세포 유형은 일반적으로 고려되는 유전자(예를 들어, 암)를 발현시키는 것으로 공지되거나 추측되는 것을 포함할 것이다. 본원에서 사용되는 단백질 단리 방법은, 예를 들어 문헌[Harlow and Lane (Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)]에 기술된 것일 수 있으며, 이러한 문헌은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된다. 단리된 세포는 세포 배양물 또는 환자로부터 유래될 수 있다. 배양물로부터 수득된 세포의 분석은 세포-기재 유전자 요법 기술의 일부로서 사용될 수 있는 세포의 평가에서 필요한 단계이거나, 대안적으로 유전자의 발현에 대한 화합물의 효과를 시험하기 위해 필요한 단계일 수 있다.
- <545> 예를 들어, 알부민 융합 단백질은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 존재를 정량적으로 또는 정성적으로 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어광학 현미경, 유세포분석, 또는 형광측정 검출과 커플링된 형광적으로 라벨링된 알부민 융합 단백질을 이용하는 면역형광 기술에 의해 달성될 수 있다.
- <546> 한 구체예에서, 적어도 본원에 기술된 치료 단백질(예를 들어, 표 1에 기술된 치료 단백질) 또는 그밖에 당해 분야에 공지된 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 적어도 단편 또는 변이체를 포함하는 알부민 융합 단백질은 유전자 생성물 또는 보존된 변이체 또는 이의 펩티드 단편의 존재를 정량적 또는 정성적으로 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어 광학 현미경, 유세포분석, 또는 형광측정 검출과 커플링된 형광적으로 라벨링된 항체를 이용하는 면역형광 기술에 의해 달성될 수 있다.
- <547> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 추가로 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 인시튜(in situ) 검출을 위해 면역형광, 면역전자 현미경 검사 또는 비-면역학적 검정과 같이 조직학적으로 사용될 수 있다. 인시튜 검출은 환자로부터의 조직학적 견본을 제거하고, 여기에 본 발명의 라벨링된 항체 또는 폴리펩티드를 적용시킴으로써 달성될 수 있다. 알부민 융합 단백질은 바람직하게는 생물학적 샘플상에 라벨링된 알부민 융합 단백질을 오버레이함(overlying)으로써 적용될 수 있다. 이러한 과정의 이용을 통해, 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드의 존재뿐만 아니라, 시험되는 조직에서의 이의 분포도 결정하는 것이 가능하다. 본 발명을 이용하여, 당업자는 임의의 광범위한 조직학적 방법(예를 들어, 염색 과정)이 인시튜 검출을 달성하기 위해 변형될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다.
- <548> 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드를 검출하는 면역검정법 및 비-면역검정법은 통상적으로 유전자 생성물 또는 보존된 변이체 또는 이의 펩티드 단편에 결합할 수 있는 검출 가능한 라벨링된 항체의 존재하에서 샘플, 예를 들어 생물학적 유체, 조직 추출물, 새로이 수거된 세포, 또는 세포 배양물에서 인큐베이팅된 세포의 용해질을 인큐베이팅하고, 당해 분야에 널리 공지된 임의의 다수의 기술에 의해 결합된 항체를 검출하는 것을 포함할 것이다.
- <549> 생물학적 샘플은 고형상 지지체 또는 담체, 예를 들어 니트로셀룰로오스, 또는 세포, 세포 입자 또는 가용성 단백질을 고정시킬 수 있는 기타 고형 지지체와 접촉되고 이에 고정될 수 있다. 지지체는 이후 적절한 완충용액으로 세척된 후, 본 발명의 검출가능하게 라벨링된 알부민 융합 단백질로 처리된다. 고형상 지지체는 이후 결합되지 않은 항체 또는 폴리펩티드를 제거하기 위해 두번째로 완충용액으로 세척될 수 있다. 임의적으로, 항체는 후속하여 라벨링된다. 고형 지지체 상에 결합된 라벨의 양은 이후 통상적인 수단에 의해 검출될 수 있다.
- <550> "고형상 지지체 또는 담체"는 폴리펩티드(예를 들어, 알부민 융합 단백질, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드)에 결합할 수 있는 임의의 지지체를 의미한다.

널리 공지된 지지체 또는 담체는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라아제, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 반려암(gabbros), 및 자철광(magnetite)을 포함한다. 담체의 특성은 본 발명의 목적상 다소 가용성이거나 불용성일 수 있다. 지지체 물질은 실질적으로 커플링된 분자가 폴리펩티드에 결합할 수 있는 한 임의의 가능한 구조 형태를 지닐 수 있다. 따라서, 지지체 형태는 비드와 같이 구형이거나 시험관의 내면 또는 막대의 외면과 같이 원통형일 수 있다. 대안적으로, 표면은 시트, 검사대 등과 같이 편평할 수 있다. 대표적인 지지체는 폴리스티렌 비드를 포함한다. 당업자는 항체 또는 항원을 결합시키기 위한 다수의 기타 적합한 담체를 인지할 것이고, 통상적인 실험을 이용하여 이를 확인할 수 있을 것이다.

<551> 제공된 다수의 알부민 융합 단백질의 결합 활성은 널리 공지된 방법에 따라 결정될 수 있다. 당업자는 통상적인 실험을 수행함으로써 각각의 결정을 위한 작용적 및 최적의 검정 조건을 결정할 수 있을 것이다.

<552> 개체로부터 수득된 생물학적 샘플에서의 폴리펩티드 수준을 검정하는 것 이외에, 폴리펩티드는 또한 영상화에 의해 생체내에서 검출될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 병들거나 신생물 세포를 영상화하기 위해 사용된다.

<553> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 생체내 영상화를 위한 라벨 또는 마커는 X-방사선촬영, NMR, MRI, CAT-스캔 또는 ESR에 의해 검출가능한 것을 포함한다. X-방사선촬영에 대해, 적합한 라벨은 검출가능한 방사선을 방출하나 피검체에게 명백하게 해롭지 않은 방사성 동위원소, 예를 들어 바륨 또는 세슘을 포함한다. NMR 및 ESR을 위한 적합한 마커는 고안된 세포주(또는 세균 또는 효모 균주)의 영양소의 라벨링에 의해 알부민 융합 단백질로 도입될 수 있는 검출가능한 특징적 스핀, 예를 들어 중수소를 지닌 것을 포함한다.

<554> 추가적으로, 이의 존재가 검출될 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 투여될 수 있다. 예를 들어, 방사선 비투과 화합물 또는 기타 적절한 화합물로 라벨링된 본 발명의 알부민 융합 단백질은 라벨링된 항체에 대해 상기에 기술된 바와 같이 생체내로 투여되어 시각화될 수 있다. 추가로, 이러한 폴리펩티드는 시험관내 진단 방법에 사용될 수 있다.

<555> 적절한 검출가능한 영상화 부분, 예를 들어 방사성 동위원소(예를 들어, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 방사선 비투과 물질, 또는 핵자기공명에 의해 검출가능한 물질로 라벨링된 폴리펩티드 특이적 항체 또는 항체 단편은 질환에 대해 시험되는 포유동물 내로 (예를 들어, 비경구적으로, 피하로 또는 복막내로) 도입된다. 피검체의 크기 및 사용되는 영상화 시스템이 진단 영상을 생성하기 위해 필요한 영상화 부분의 양을 결정하는 것이 당해 분야에서 인지될 것이다. 방사성 동위원소 부분의 경우, 인간 피검체에 대해, 주입되는 방사능의 양은 일반적으로 약 5 내지 20 밀리퀴리 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 의 범위일 것이다. 라벨링된 알부민 융합 단백질은 이후 우선적으로 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하거나 이에 의해 결합되거나 이와 회합되는 폴리펩티드 또는 기타 물질을 함유하는 신체 내의 위치에 축적될 것이다. 생체내 종양 영상화는 문헌[S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))]에 기술되어 있다.

<556> 본 발명의 알부민 융합 단백질이 검출가능하게 라벨링될 수 있는 방법중 하나는 이를 리포터 효소에 연결하고 효소 면역검정법(EIA)에서 연결된 생성물을 이용하는 것이다[Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD]; Voller et al., *J. Clin. Pathol.* 31:507-520 (1978); Butler, J.E., *Meth. Enzymol.* 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL.; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo]. 항체에 결합되는 리포터 효소는, 예를 들어 분광 광도 분석, 형광측정법 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 부분을 생성하기 위한 방식으로 적절한 기질, 바람직하게는 발색성 기질과 반응할 것이다. 항체를 검출가능하게 라벨링하기 위해 사용될 수 있는 리포터 효소는 말레이트 데히드로게나아제, 포도구균 뉴클레아제, 텔타-5-스테로이드 이소머라아제, 효모 알코올 데히드로게나아제, 알파-글리세로포스페이트, 데히드로게나아제, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 호스라디쉬(horseradish) 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아스파라기나아제, 글루코오스 옥시다아제, 베타-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라아제, 글루코오스-6-포스페이트 데히드로게나아제, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린스테라아제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가적으로, 검출은 리포터 효소에 대한 발색성 기질을 사용하는 비색 방법에 의해 달성될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준물과 비교하여 기질의 효소 반응의 범위의 시각적 비교에 의해 달성될 수 있다.

<557> 알부민 융합 단백질은 또한 방사선 라벨링되고, 임의의 다양한 기타 면역검정법에 사용될 수 있다. 예를 들어,

알부민 융합 단백질을 방사선 라벨링시킴으로써, 방사면역검정(RIA)에서 알부민 융합 단백질을 이용하는 것이 가능하다(예를 들어, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 이는 본원에 참조로서 포함됨). 방사성 동위원소는 감마 계측기, 신틸레이션(scintillation) 계측기, 또는 자가방사선술을 포함하나 이에 제한되지 않는 수단에 의해 검출될 수 있다.

<558> 추가적으로, 킬레이트제 분자는 당해 분야에 공지된 것으로서, 알부민 융합 단백질을 라벨링하기 위해 사용될 수 있다. 킬레이트제 분자는 방사선헤중 또는 형광 라벨을 포함하는 금속 이온으로 본 발명의 알부민 융합 단백질의 라벨링을 촉진시키기 위해 상기 단백질에 부착될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Subramanian, R. and Meares, C.F., "Bifunctional Chelating Agents for Radiometal-labeled monoclonal Antibodies," in *Cancer Imaging with Radiolabeled Antibodies* (D. M. Goldenberg, Ed.) Kluwer Academic Publications, Boston; Saji, H., "Targeted delivery of radiolabeled imaging and therapeutic agents: bifunctional radiopharmaceuticals." *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16:209-244 (1999); Srivastava S.C. and Mease R.C., "Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies." *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 18:589-603 (1991); and Liu, S. and Edwards, D.S., "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals." *Bioconjug. Chem.* 12:7-34 (2001)]을 참조하라. 상기 알부민 융합 단백질에 공유 결합될 수 있는 임의의 킬레이트제가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 킬레이트제는 추가로 알부민 융합 단백질에 킬레이트 부분을 연결하는 링커 부분을 포함할 수 있다.

<559> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 비환형 킬레이트제, 예를 들어 디에틸렌 트리아민-N,N,N',N'',N'''-펜타아세트산(DPTA), DPTA의 유사체, 및 DPTA의 유도체에 부착된다. 비제한적인 예로서, 킬레이트제는 2-(p-이소티오시아네이트벤질)-6-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(1B4M-DPTA, MX-DPTA로도 공지됨), 2-메틸-6-(로-니트로벤질)-1,4,7-트리아자헵탄-N,N,N',N'',N'''-펜타아세트산(니트로-1B4M-DTPA 또는 니트로-MX-DTPA); 2-(p-이소티오시아네이트벤질)-시클로헥실디에틸렌트리아민펜타아세트산(CHX-DTPA), 또는 N-[2-아미노-3-(로-니트로페닐)프로필]-트랜스-시클로헥산-1,2-디아민-N,N',N'''-펜타아세트산(니트로-CHX-A-DTPA)일 수 있다.

<560> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 비환형 테르피리딘 킬레이트제, 예를 들어 6,6"-비스[[N,N,N',N'''-테트라(카르복시메틸)아미노]메틸]-4'-(3-아미노-4-메톡시페닐)-2,2':6',2"-테르피리딘(TMT-아민)에 부착된다.

<561> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부착되는 거대고리 킬레이트제는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 다른 특정 구체예에서, DOTA는 링커 분자를 통해 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부착된다. 폴리펩티드에 DOTA를 컨쥬게이팅시키기 위해 유용한 링커 분자의 예는 당해 분야에 통상적으로 공지되어 있다[예를 들어, DeNardo *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 4(10):2483-90, 1998; Peterson *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7, 1999; and Zimmerman *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50, 1999, 이들은 본원에 전체 내용이 참조로서 포함됨]. 또한, 미국특허 제5,652,361호 및 제5,756,065호에는 항체에 컨쥬게이팅될 수 있는 킬레이트제, 및 이를 제조하고 이를 이용하는 방법이 기술되어 있으며, 이들 특허는 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된다. 미국특허 제5,652,361호 및 제5,756,065호는 항체에 킬레이트제를 컨쥬게이팅시키는 것에 초점을 두고 있지만, 당업자는 다른 폴리펩티드에 킬레이트제를 컨쥬게이팅시키기 위해 여기에 기술된 방법을 용이하게 개조시킬 수 있다.

<562> 컨쥬게이션이 활성화된 암(activated arm), 또는 작용기를 통해 리간드의 탄소 주쇄에 부착되는 거대고리 리간드를 기초로 한 이작용성 킬레이트제가 문헌[M. Moi *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 49:2639 (1989) (2p-nitrobenzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid); S. V. Deshpande *et al.*, *J. Nucl. Med.* 31:473 (1990); G. Ruser *et al.*, *Bioconj. Chem.* 1:345 (1990); C. J. Broan *et al.*, *J. C. S. Chem. Comm.* 23:1739 (1990); and C. J. Anderson *et al.*, *J. Nucl. Med.* 36:850 (1995)]에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다.

<563> 한 구체예에서, 거대고리 킬레이트제, 예를 들어 하나 이상의 카르복시, 아미노, 히드록사메이트, 포스포네이트, 또는 포스페이트기를 임의로 함유하는 폴리아자거대고리 킬레이트제가 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부착된다. 또 다른 구체예에서, 킬레이트제는 DOTA, DOTA의 유사체, 및 DOTA의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<564> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부착될 수 있는 적합한 킬레이트제 분자는 DOXA (1-옥사-

4,7,10-트리아자시클로데칸트리아세트산), NOTA (1,4,7-트리아자시클로노난트리아세트산), TETA (1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸테트라아세트산), 및 THT (4'-(3-아미노-4-메톡시-페닐)-6,6"-비스(N',N'-디카르복시메틸-N-메틸히드라지노)-2,2':6',2"-테르피리딘), 및 이들의 유사체 및 유도체를 포함한[예를 들어, Ohmono *et al.*, *J. Med. Chem.* 35: 157-162 (1992); Kung *et al.*, *J. Nucl. Med.* 25: 326-332 (1984); Jurisson *et al.*, *Chem. Rev.* 93:1137-1156 (1993); 및 미국특허번호 제 5,367,080호]. 다른 적합한 킬레이트제는 미국특허번호 제 4,647,447호; 제 4,687,659호; 제 4,885,363호; EP-A-71564; W089/00557; 및 EP-A-232751에 기술된 킬레이트 제제를 포함한다.

<565> 또 다른 구체예에서, 본 발명에 사용될 수 있는 적합한 거대고리 카르복실산 킬레이트제는 1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA); 1,4,8,12-테트라아자시클로펜타데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (15N4); 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산 (9N3); 1,5,9-트리아자시클로데칸-N,N',N''-트리아세트산 (12N3); 및 6-브로모아세트아미도-벤질-1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (BAT)을 포함한다.

<566> 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부착될 수 있는 대표적인 킬레이트제는 MeO-DOTA-NCS로도 공지된 α-(5-이소티오시아네이트-2-메톡시페닐)-1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-1,4,7,10-테트라아세트산이다. α-(5-이소티오시아네이트-2-메톡시페닐)-1,4,7,10-테트라아자시클로데칸-1,4,7,10-테트라아세트산의 염 또는 에스테르가 또한 사용될 수 있다.

<567> 기술된 것과 같은 킬레이트제가 공유적으로 부착될 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료, 진단, 또는 치료 및 진단 둘 모두의 목적에 적합한 방사선헌종으로 (킬레이트제의 배위 부위를 통해) 라벨링될 수 있다. 적절한 금속의 예는 Ag, At, Au, Bi, Cu, Ga, Ho, In, Lu, Pb, Pd, Pm, Pr, Rb, Re, Rh, Sc, Sr, Tc, Tl, Y, 및 Yb를 포함한다. 진단 목적에 사용되는 방사선헌종의 예는 Fe, Gd, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, 또는 ⁶⁸Ga이다. 또 다른 구체예에서, 진단 목적에 사용되는 방사선헌종은 ¹¹¹In 또는 ⁶⁷Ga이다. 치료 목적에 사용되는 방사선헌종의 예는 ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁵Dy, ⁹⁰Y, ^{115m}In, ⁵²Fe, 또는 ⁷²Ga이다. 한 구체예에서, 진단 목적에 사용되는 방사선헌종은 ¹⁶⁶Ho 또는 ⁹⁰Y이다. 치료 및 진단 둘 모두의 목적에 사용되는 방사선헌종의 예는 ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁷⁵Yb, 또는 ⁴⁷Sc를 포함한다. 한 구체예에서, 방사선헌종은 ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁵Yb, 또는 ¹⁵⁹Gd이다.

<568> 대표적인 금속 방사선헌종은 ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Ga, ⁵¹Cr, ^{177m}Sn, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁷Tm, ⁹⁷Ru, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁹Au, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Ga, ⁵¹Cr, ^{177m}Sn, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁷Tm, ⁹⁵Ru, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁹Au, ²⁰³Pb 및 ¹⁴¹Ce를 포함한다.

<569> 특정 구체예에서, 킬레이트제가 공유적으로 부착될 수 있는 알부민 융합 단백질은 ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, ²¹⁵Bi, 및 ²²⁵Ac로 이루어진 군으로부터 선택된 금속 이온으로 라벨링될 수 있다.

<570> 더욱이, γ-방출 방사선헌종, 예를 들어 ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, 및 ¹⁶⁹Yb가 진단 영상화를 위해 승인되거나 연구 중에 있으며, β-방출기, 예를 들어 ⁶⁷Cu, ¹¹¹Ag, ¹⁸⁶Re, 및 ⁹⁰Y가 종양 요법에 적용하기에 유용하다. 또한, 다른 유용한 방사선헌종은 γ-방출기, 예를 들어 ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, 및 ¹⁶⁹Yb, 및 β-방출기, 예를 들어 ⁶⁷Cu, ¹¹¹Ag, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re 및 ⁹⁰Y, 뿐만 아니라 기타 고려되는 방사선헌종, 예를 들어 ²¹¹At, ²¹²Bi, ¹⁷⁷Lu, ⁸⁶Rb, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ¹⁹⁸Au, ¹⁴⁹Pm, ⁸⁵Sr, ¹⁴²Pr, ²¹⁴Pb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁶⁶Ho, ²⁰⁸Tl, 및 ⁴⁴Sc를 포함한다. 킬레이트제가 공유적으로 부착되는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 상기 기술된 방사선헌종으로 라벨링될 수 있다.

<571> 또 다른 구체예에서, 킬레이트제에 공유적으로 부착되는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 21-29, 42, 43, 44, 또는 57-71개의 원자수를 지니는 금속과 같은 전이 금속 및 란탄족 금속의 이온, 특히 Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu의 이온을 포함하는 상자성 금속 이온으로 라벨링될 수 있다. 자기 공명 영상화를 위한 조성물에 사용되는 상자성 금속은 22 내지 29, 42, 44 및 58-70개의 원자수를 지니는 원소를 포함한다.

<572> 또 다른 구체예에서, 킬레이트제에 공유적으로 부착되는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 란탄족, 특히 La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu (예를 들어, ¹⁵²Eu), Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu를 포함하는 형광 금속 이온으로 라벨링될 수 있다.

- <573> 또 다른 구체예에서, 킬레이트체에 공유적으로 부착되는 본 발명의 알부민 융합 단백질은 Mo, Bi, Si, 및 W의 원소를 포함할 수 있는 중금속 함유 리포터로 라벨링될 수 있다.
- <574> 형광 화합물로 알부민 융합 단백질을 라벨링시키는 것이 또한 가능하다. 형광으로 라벨링된 항체가 적절한 파장의 빛에 노출되는 경우, 이의 존재는 이후 형광으로 인해 검출될 수 있다. 가장 통상적으로 사용되는 형광 라벨링 화합물은 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 옵트알데히드 및 플루오레카민이다.
- <575> 알부민 융합 단백질은 또한 형광 방출 금속, 예를 들어 ¹⁵²Eu, 또는 기타 란타넘 계열을 이용하여 검출가능하게 라벨링될 수 있다. 이러한 금속은 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)과 같은 금속 킬레이트 기를 이용하여 항체에 부착될 수 있다.
- <576> 알부민 융합 단백질은 또한 이를 화학발광 화합물에 커플링시킴으로써 검출가능하게 라벨링될 수 있다. 화학발광-태그된 알부민 융합 단백질의 존재는 이후 화학 반응의 과정 동안 발생하는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 특히 유용한 화학발광 라벨링 화합물의 예는 루미놀, 이소루미놀, 테로마틱(theromatic) 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르이다.
- <577> 마찬가지로, 생물발광 화합물이 본 발명의 알부민 융합 단백질을 라벨링시키기 위해 사용될 수 있다. 생물발광은 촉매 단백질이 화학발광 반응의 효율을 증가시키는 생물학적 시스템에서 발견된 화학발광의 유형이다. 생물발광 단백질의 존재는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 라벨링의 목적상 중요한 생물발광 화합물은 루시페린, 루시페라아제 및 애큐오린(aequorin)이다.
- <578> 트랜스제닉 유기체(Transgenic Organisms)
- <579> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키는 트랜스제닉 유기체가 또한 본 발명에 포함된다. 트랜스제닉 유기체는 재조합, 외인성 또는 클로닝된 유전 물질이 전달된 유전적으로 변형된 유기체이다. 이러한 유전적 물질은 종종 형질전환 유전자(transgene)로 언급된다. 형질전환 유전자의 핵산 서열은 하나 이상의 전사 조절 서열 및 기타 핵산 서열, 예를 들어 최적의 발현 및 엔코딩된 단백질의 분비를 위해 필요할 수 있는 인트론(intron)을 포함할 수 있다. 형질전환 유전자는 유기체 및 유기체에 의해 생성된 생성물, 예를 들어 유기체의 밀크, 혈액, 뇨, 알, 모발 또는 종자로부터 이의 회수를 촉진하는 방식으로 엔코딩된 단백질의 발현을 지시하도록 고안될 수 있다. 형질전환 유전자는 표적 동물의 종과 동일한 종 또는 상이한 종의 계통으로부터 유래된 핵산으로 이루어질 수 있다. 형질전환 유전자는 특정 핵산 서열이 달리 일반적으로 밝혀지지 않은 계통의 유전자좌(locus) 또는 형질전환 유전자에 대해 정상 유전자좌에 통합될 수 있다.
- <580> 용어 "생식 세포주 트랜스제닉 유기체"는 유전적 변화 또는 유전적 정보가 생식 세포로 도입되고, 이에 의해 후손에게 유전적 정보를 전달하는 능력을 트랜스제닉 유기체에 부여하는 트랜스제닉 유기체를 의미한다. 이러한 후손이 실제로 이러한 변경 또는 유전적 정보를 갖는 경우, 이들 역시 트랜스제닉 유기체이다. 변화 또는 유전적 정보는 수용체가 속하는 유기체의 종에 대해 외래이거나, 특정 개체 수용체에 대해서만 외래일 수 있거나, 수용체에 의해 이미 소유된 유전적 정보일 수 있다. 후자의 경우, 변화되거나 도입된 유전자는 본래 유전자와는 다르게 발현될 수 있다.
- <581> 트랜스제닉 유기체는 트랜스제닉 동물 또는 트랜스제닉 식물일 수 있다. 트랜스제닉 동물은 배아 줄기 세포 및 재조합 바이러스 및 레트로바이러스 감염에서의 트랜스펙션, 전기천공, 미세주입, 유전자 표적화(gene targeting)를 포함하는 매우 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[미국특허번호 4,736,866; 미국특허번호 5,602,307; Mullins *et al.* (1993) Hypertension 22(4):630-633; Brenin *et al.* (1997) Surg. Oncol. 6(2):99-110; Tuan (ed.), *Recombinant Gene Expression Protocols*, Methods in Molecular Biology No. 62, Humana Press (1997)]) 참조). 재조합 적격 포유동물 세포로의 핵산 단편의 도입 방법은 다중 핵산 분자의 공동 형질전환을 촉진하는 임의의 방법일 수 있다. 트랜스제닉 동물을 생성하기 위한 상세한 과정은 미국특허 제5,489,743호 및 미국특허 제5,602,307호의 기술을 포함하여 당업자에 의해 용이하게 이용가능하다.
- <582> 다수의 재조합 또는 트랜스제닉 마우스가 활성화된 중앙유전자 서열을 발현시키고(미국특허 제4,736,866호); 원숭이(simian) SV40 T-항원을 발현시키고(미국특허 제5,728,915호); 인터페론 조절 인자 1(IRE-1)이 결핍되고(미국특허 제5,731,490호); 도파민 기능 장애를 나타내고(미국특허 제5,723,719호); 혈압 조절에 관여하는 하나 이상의 인간 유전자를 발현시키고(미국특허 제5,731,489호); 자연 발생 알츠하이머병 질환에 존재하는 병태와 매우 큰 유사성을 나타내고(미국특허 제5,720,936호); 세포 부착을 매개하는데 감소된 능력을 지니고(미국특허 제5,602,307호); 우 성장 호르몬 유전자를 지니는(Clutter *et al.* (1996) Genetics 143(4):1753-1760) 것을 포함

하도록 생성되었거나, 이는 전체 인간 항체 반응을 발생시킬 수 있다(McCarthy (1997) *The Lancet* 349(9049):405).

<583> 마우스 및 래트가 대부분의 트랜스제닉 실험을 위한 선택 동물이지만, 몇몇 예에서는 대안적 동물 종을 사용하는 것이 바람직하거나 필수적이다. 트랜스제닉 과정은 양, 염소, 돼지, 개, 고양이, 원숭이, 침팬지, 햄스터, 토끼, 소 및 기니아 피그를 포함하는 다양한 비-뮤린 동물을 성공적으로 이용하였다(예를 들어, 문헌[Kim *et al.* (1997) *Mol. Reprod. Dev.* 46(4):515-526; Houdebme 099)) xeprod. *Nutr. Dev.* 35(6):609-617; Petters (1994) *Reprod. Fertil. Dev.* 6(5):643-645; Schnieke *et al.* (1997) *Science* 278(5346):2130-2133; and Amoah (1997) *J. Animal Science* 75(2):578-585]) 참조).

<584> 트랜스제닉 포유동물의 밀크 내로 본 발명의 형질전환 유전자 엔코딩된 단백질의 분비를 지시하기 위하여, 포유동물 상피 세포에서 우선적으로 활성화되는 프로모터의 조절하에 둘 수 있다. 밀크 단백질을 엔코딩하는 유전자를 조절하는 프로모터, 예를 들어 카세인, 베타 락토글로불린, 유장 산 단백질, 또는 락타부민에 대한 프로모터가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[DiTullio (1992) *BioTechnology* 10:74-77; Clark *et al.* (1989) *BioTechnology* 7:487-492; Gorton *et al.* (1987) *BioTechnology* 5:1183-1187; and Soulier *et al.* (1992) *FEES Letts.* 297:13]) 참조). 선택된 트랜스제닉 포유동물, 예를 들어 염소, 소, 낙타 또는 양은 보다 큰 부피의 밀크를 생성할 것이고, 긴 수유 기간을 지닐 것이다.

<585> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 트랜스제닉 식물, 예를 들어 DNA 형질전환 유전자가 핵 또는 플라스티드 게놈(plastidic genome)에 삽입된 식물에서 발현될 수 있다. 식물 세포 또는 원형질체에 외래 핵산을 도입하기 위해 사용되는 식물 형질전환 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[예를 들어, *Methods in Enzymology* Vol. 153 ("Recombinant DNA Part D") 1987, Wu and Grossman Eds., Academic Press 및 유럽특허출원 EP 693554]. 유전적으로 고안된 식물의 생성 방법은 미국특허 제5,283,184호, 미국특허 제5,482,852호, 및 유럽 특허 출원 EP 693 554호에 추가로 기술되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다.

<586> 약제학적 또는 치료 조성물

<587> 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 포물레이션은 비경구(예를 들어, 피하 또는 근내) 주사 또는 정맥내 주입을 포함하는 임의의 통상적인 방법에 의해 투여될 수 있다. 치료는 단일 용량 또는 일정 기간에 걸친 다수의 용량으로 이루어진다.

<588> 본 발명의 알부민 융합 단백질이 단독으로 투여되는 것이 가능하나, 이는 하나 이상의 허용되는 담체와 함께 약제학적 포물레이션으로서 존재할 수 있다. 담체(들)은 알부민 융합 단백질과 양립가능하고 이의 수용자에 대해 유해하지 않다는 측면에서 "허용가능"하여야 한다. 통상적으로, 담체는 멸균되거나 발열부재인 물 또는 염수일 것이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 이들의 용액에서의 연장된 저장 수명으로 인해 수성 담체, 예를 들어 멸균된 발열부재 물, 염수 또는 기타 등장성 용액에서 포물레이팅하기에 특히 적합하다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은, 예를 들어 투여되기 수주 또는 수개월 전 또는 그 이상의 기간 전에 사전에 수성 형태로 포물레이팅될 수 있다.

<589> 예를 들어, 알부민 융합 단백질을 함유하는 포물레이션은 알부민 융합 단백질의 연장된 저장 기간을 고려하여 수성 포물레이션으로 제조될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 다수의 이러한 치료 단백질의 저장 기간은 HA에 융합 후 현저하게 증가되거나 연장된다.

<590> 에어로졸 투여가 적합한 경우, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 표준 과정을 이용하여 에어로졸로 포물레이팅될 수 있다. 용어 "에어로졸"은 세기관지 또는 비내(nasal) 통로로 흡입될 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 임의의 가스-함유 현탁상을 포함한다. 특히, 에어로졸은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 작은 물방울의 가스-함유 현탁액을 포함하고, 이는 계량된 용량 흡입기 또는 네불라이저, 또는 연무 스프레이기에서 생성될 수 있다. 에어로졸은 또한 흡입 장치로부터의 흡입법에 의해 전달될 수 있는 공기 또는 기타 담체 가스에 현탁된 본 발명의 화합물의 건조 분말 조성물을 포함한다[Ganderton & Jones, *Drug Delivery to the Respiratory Tract*, Ellis Horwood (19 87); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313; and Raeburn *et al.*, (1992) *Pharmacol. Toxicol. Methods* 27:143-159].

<591> 본 발명의 포물레이션은 또한 통상적으로 알부민 융합 단백질의 성분의 용도가 적절한 종으로부터 유래되기 때문에 부분적으로 비-면역원성이다. 예를 들어, 인간 용도에 대해, 알부민 융합 단백질의 치료 단백질 및 알부민 부분 둘 모두는 통상적으로 인간에게 이용될 것이다. 몇몇 경우에서, 성분이 비 인간-유래인 경우, 이 성분은 특정 에피토프가 인간 면역계에 대해 외래가 아니라 본래 인간에 존재하는 것으로 나타나도록 하기 위해 중

요 아미노산의 치환에 의해 인간화(humanize)될 수 있다.

- <592> 포물레이션은 편리하게는 단위 복용 형태로 존재할 수 있고, 약학 분야의 당업자에게 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 알부민 융합 단백질을 하나 이상의 부수 성분을 구성하는 담체와 함께 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 포물레이션은 활성 성분을 액체 담체 또는 미세하게 분쇄된 고형 담체, 또는 둘 모두와 균일하고 밀접하게 회합시킨 후, 필요한 경우 생성물을 형상화시킴으로써 제조된다.
- <593> 비경구 투여에 적합한 포물레이션은 항산화제, 완충용액, 제균제 및 포물레이션을 의도된 수용체에게 적합하게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 포물레이션은 단위-용량 또는 다용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플, 바이알 또는 주사기에 존재할 수 있고, 사용하기 직전에 멸균수 담체, 예를 들어 주사용 물의 첨가만을 필요로 하는 냉동-건조된(동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 임시 주사액 및 현탁액이 멸균 분말로부터 제조될 수 있다. 투약 포물레이션은 본 발명의 다수의 알부민 융합 단백질에 의해 나타나는 연장된 혈청 저장 기간이 주어진 치료 단백질에 대하여 융합되지 않은 표준 포물레이션에 비해 보다 낮은 몰 농도 또는 보다 낮은 용량으로 치료 단백질을 함유할 수 있다.
- <594> 일 예로써, 본 발명의 알부민 융합 단백질이 치료 단백질 영역중 하나 이상으로 표 1의 "치료 단백질:X" 컬럼에 기술된 단백질 중 하나를 포함하는 경우, 복용 형태는 천연 치료 단백질과 비교하여 알부민 융합 단백질의 연장된 혈청 반감기 및 저장 기간을 고려하여, 치료 단백질 단독의 효능에 대한 알부민 융합 단백질의 효능을 기초로 계산될 수 있다. 예를 들어, 치료 단백질이 통상적으로 0.3 내지 30.0 IU/kg/주, 또는 0.9 내지 12.0 IU/kg/주로 투여되는 경우, 1년에 3 또는 7회로 분배된 용량 또는 그 이상으로 주어진다. 치료 단백질에 융합된 전장의 HA로 구성된 알부민 융합 단백질에서, 단위와 관련된 동등한 용량은 보다 무거운 중량의 작용제를 지닐 것이나, 복용 빈도는, 예를 들어 1주일에 2회, 1주일에 1회 또는 그 미만으로 감소될 것이다.
- <595> 본 발명의 포물레이션 또는 조성물은 알부민 융합 단백질 성분의 연장된 저장 기간을 언급하는 설명서 또는 패키지 삽입물과 함께 패키징되거나 이를 지닌 키트에 포함될 것이다. 예를 들어, 이러한 설명서 또는 패키지 삽입물은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 연장된 저장 기간을 고려하여 시간, 온도 및 빛과 같은 권장 저장 조건을 다룰 것이다. 이러한 설명서 또는 패키지 삽입물은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 특정 이점, 예를 들어 제어된 병원, 임상 또는 연구실 조건의 외부의 현장에서의 이용을 필요로 할 수 있는 포물레이션에 대한 저장의 용이성을 다룰 것이다. 상기 기술된 바와 같이, 본 발명의 포물레이션은 수성 형태일 수 있고, 치료 활성의 현저한 손실 없이 덜 이상적인 환경하에서 저장될 수 있다.
- <596> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 또한 기능성 식품(nutraceutical)에 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 알부민 융합 단백질은 알부민 융합 단백질을 발현시키는 트랜스제닉 포유동물로부터 얻어진 밀크 또는 유제품을 포함하는 천연 제품에 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 또한 알부민 융합 단백질을 발현시키는 트랜스제닉 식물로부터 얻어진 식물 또는 식물 제품을 포함할 수 있다. 알부민 융합 단백질은 또한 기타 공지된 첨가제, 담체, 충전제 및 희석제와 함께 또는 이를 포함하지 않는 분말 또는 정제 형태로 제공될 수 있다. 기능성 식품은 문헌[Scott Hegenhart, *Food Product Design*, Dec. 1993]에 기술되어 있다.
- <597> 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 담체 내의 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드("알부민 융합 폴리뉴클레오티드")의 유효량을 피검체에게 투여함으로써 질병 또는 질환(예를 들어, 본원에 기술된 질병 또는 질환 중 임의의 하나 이상)을 치료하고/하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- <598> 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 개별적 환자의 임상적 상태(특히, 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드 단독 치료의 부작용), 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 전문의에게 알려진 기타 요인을 고려하여, 양호한 의학적 실시와 일치하는 방식으로 포물레이팅되고 투여될 것이다. 따라서, 본 발명의 목적상 "유효량"은 이러한 고려사항에 의해 결정된다.
- <599> 일반적 제안으로서, 용량 당 비경구적으로 투여되는 알부민 융합 단백질의 전체 약제학적 유효량은 환자 체중의 약 1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10 mg/kg/일 의 범위일 것이나, 상기 기술된 바와 같이 이는 치료적 판단에 따를 것이다. 한 구체예에서, 이러한 용량은 적어도 0.01 mg/kg/일 이고, 다른 구체예에서, 인간에 대해 호르몬에 대해 약 0.01 내지 1 mg/kg/일 이다. 연속적으로 제공되는 경우, 알부민 융합 단백질은 통상적으로, 예를 들어 미니-펌프를 이용하여 매일 1 내지 4회의 주사 또는 연속적 피하 주입에 의해 약 1 $\mu\text{g/kg/시간}$ 내지 약 50 $\mu\text{g/kg/시간}$ 의 용량속도로 투여된다. 정맥내 백 용액이 또한 사용될 수 있다. 치료 후에 발생하는 반응에 대한 변화 및

간격이 관찰되기에 필요한 치료 기간은 요망되는 효과에 따라 다양하다.

<600>

상기 기술된 바와 같이, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료 단백질 부분(또는 이의 단편 또는 변이체) 단독에 비해 보다 높은 혈장 안정성을 지닌다. 혈장 안정성의 이러한 증가는 용량 당 투여되는 알부민 융합 단백질의 유효량 및 용량 투여 스케줄을 결정하는 경우 고려되어야 한다. 특히, 보다 높은 혈장 안정성은 알부민 융합 단백질이 동일한 투여 빈도에서 보다 낮은 용량으로 투여되도록 하거나, 대안적으로 알부민 융합 단백질이 보다 적은 복용량으로 투여되도록 한다. 보다 높은 안정성은 본 발명의 알부민 융합 단백질이 보다 적은 복용량으로 투여되게 할 수 있다. 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질은 2주에 한번 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 알부민 융합 단백질은 알부민 융합 단백질의 약동력학에 따라 3주, 4주, 5주, 또는 그 이상의 주에 한번씩 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 약동력학은 2 내지 4주 또는 그 이상에 한번의 복용 요법, 및 4주 또는 4주 이상의 간격으로 투약함을 지지한다.

<601>

용량 당 투여될 수 있는 치료학적 유효량의 알부민 융합 단백질은 또한 용량 당 제공된 전체 포플레이팅 알부민 융합 단백질(total formulated albumin fusion protein concentration)로서 나타낼 수 있다. 한 구체예에서, 용량 당 환자에게 투여되는 전체 포플레이팅 알부민 융합 단백질 농도는 약 10 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 범위로 존재한다. 한 구체예에서, 전체 농도는 약 100 μg /용량 내지 약 1000 μg /용량, 또는 대안적으로는 약 1000 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량 또는 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 범위로 존재한다.

<602>

특정한 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 복용된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도, 및 또 다른 구체예에서, 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 복용된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 600 μg /용량, 720 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, 또는 2400 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 복용된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)의 전체 포플레이팅 용량은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)의 전체 포플레이팅 용량은 하나, 두개, 세개, 네개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물들, 예를 들어 리바비린과 조합하여 투여된다.

<603>

추가적인 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)의 전체 포플레이팅 농도는 HCV에 감염된 환자를 치료하기 위해 투여된다. 특정한 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 리바비린과 조합하여 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로, 및 또 다른 구체예에서, 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 경험이 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 600 μg /용량, 720 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량 또는 2400 μg /용량의 전체 포플레이팅 농도로 경험이 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다.

- <604> 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 전체 포물레이팅 농도는 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 경험에 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 또 다른 구체예에서 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 경험에 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 600 μg /용량, 720 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, 또는 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 경험에 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다.
- <605> 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로, 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도, 및 다른 구체예에서, 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 유효량의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 600 μg /용량, 720 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, 또는 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다.
- <606> 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량, 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도, 및 추가의 구체예에서 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 600 μg /용량, 720 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, 또는 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다.
- <607> 알부민 융합 단백질의 전체 포물레이팅 농도 및 알부민 융합 단백질이 투여되는 투약 간격은 요망되는 효과 및 투여되는 특정 치료 단백질에 따라 변경될 것이다. 한 구체예에서, 용량 당 환자에게 투여되는 포물레이팅된 전체 알부민 융합 단백질 농도는 1주에 한번, 2주에 한번, 3주에 한번, 4주 이상에 한번씩 약 10 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 범위일 것이다. 다른 구체예에서, 전체 농도는 1주에 한번, 2주에 한번, 3주에 한번, 4주 이상에 한번씩, 약 100 μg /용량 내지 약 1000 μg /용량의 범위, 또는 대안적으로는 1주에 한번, 2주에 한번, 3주

에 한번, 4주 이상에 한번, 약 1000 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량 또는 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 범위로 존재한다.

<608>

특정한 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 및 다른 구체예에서, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 μg /용량 to 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 복용된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질 (예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 약 600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 800 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 900 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 1000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 1200 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 1500 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 1600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 1800 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 2100 μg /용량; 또는 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주에 한번씩 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주에 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도, 및 또 다른 구체예에서 2주에 한번씩 1200 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도, 4주에 한번씩 1200 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도, 또는 4주에 한번씩 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)의 전체 포물레이팅 용량은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)의 전체 포물레이팅 용량은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 투여된다.

<609>

특정 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV를 지닌 환자에게 투여된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 리바비린을 포함하는 항바이러스 화합물과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 또 다른 구체예에서, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 800 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1500 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1800 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2100 μg /용량; 또는 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주

마다 한번씩 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<610>

특정 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296)은 하나 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1개, 2개, 3개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린 및 임의적으로 다른 항바이러스 화합물과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 및 또 다른 구체예에서, 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 800 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1500 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1600 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1800 μg /용량; 또는 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2100 μg /용량; 또는 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<611>

추가적 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 2주에 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 및 다른 구체예에서, 2주에 한번씩 1200 μg /용량; 4주에 한번씩 1200 μg /용량; 또는 4주에 한번씩 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 다른 구체예에서, 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<612>

또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 적어도 24주 동안 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 또 다른 구체예에서, 24주 동안 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 24주 동안 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 24주 동안 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독으로 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다. 한 구체예에서, 치료경험이 없는 HCV 환자는 HCV 유전자형 2 또는 3으로 감염된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 적어도 48주 동안 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 또 다른 구체예에서, 적어도 48주 동안 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 적어도 48주 동안 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 적어도 48주 동안 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독으로 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다. 한 구체예에서, 치료경험이 없는 HCV 환자는 HCV 유전자형 1로 감염된다.

<613>

상기에 기술된 바와 같이, 4주 치료에서의 급속 바이러스 반응 (RVR)은 지속적 바이러스 반응 (SVR)의 포지티브

예측체로서 식별된다. 더욱이, 12주 치료를 통한 HCV RNA 음성의 유지는 SVR의 추가적인 포지티브 예측체로서 입증된다. 결국, 4주에 HCV RNA 음성을 달성하고, 12주 내내 이러한 음성을 지속하는 환자들은 치료 요법을 완결한 후 HCV RNA 음성을 거의 유지할 것이다. 따라서, IFN-알파-HSA 단독으로 또는 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 항바이러스제, 예를 들어 리바비린과 조합하여 치료한 후 4주에 HCV RNA 음성을 달성하고, 12주 내내 이러한 음성을 지속하는 HCV 환자의 수를 최대화하는 것일 필요하다. 따라서, 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량; 2주 및 4주마다 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량; 2주 및 4주마다 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 및 또 다른 구체예에서, 2주 및 4주를 조합하여 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독으로 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다.

<614>

추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 600 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 800 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1200 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1500 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1600 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1800 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 2000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 2100 μg /용량; 또는 2주 및 4주를 조합하여 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독으로 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주, 및 다른 구체예에서 48주의 기간 동안, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가적인 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 2로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<615>

한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 about 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 남지 치료 기간 동안 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주, 및 한 구체예에서 48주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 2 또는 3으로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<616>

추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 600 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1600 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, 또는 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로

치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안에 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한 것이다. 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 전체 포물레이팅 농도는 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 또는 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주의 기간, 및 또 다른 구체예에서 48주의 기간 동안 1개, 2개, 3개 또는 4개의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 2 또는 3으로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다.

<617>

추가적인 특정 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 90 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2000 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2400 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2100 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2000 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로; 및 다른 구체예에서 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로, 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 600 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 800 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1000 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1500 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1600 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 2000 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 2100 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주마다 한번씩 약 2400 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<618>

다른 특정 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 90 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2000 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2400 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2100 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 2000 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로; 및 다른 구체예에서, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 내지 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$ 의 전체 포물레이팅 농도로; 또는 또 다른 구체예에서, 2주마다 한번씩 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 600 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 800 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 900 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1000 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1200 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1500 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1600 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 1800 $\mu\text{g}/\text{용량}$; 1주, 2주, 3주, 4주

또는 5주마다 한번씩 약 2000 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2100 μg /용량; 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주마다 한번씩 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<619> 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 단독으로 또는 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 한 구체예에서, 2주마다 한번씩 1200 μg /용량의 전체 농도로, 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 유효량의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 다른 구체예에서 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<620> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 적어도 24주 동안 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 일부 구체예에서 적어도 24주 동안 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 적어도 24주 동안 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 적어도 24주 동안 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한다. 한 구체예에서, 치료경험이 있는 HCV 환자는 HCV 유전자형 2 또는 3으로 감염된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 적어도 48주 동안에 2주마다 한번씩 900 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로, 및 다른 구체예에서, 적어도 48주 동안에 2주마다 한번씩 1200 μg /용량, 적어도 48주 동안에 4주마다 한번씩 1200 μg /용량, 또는 적어도 48주 동안에 4주마다 한번씩 1800 μg /용량의 전체 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 리바비린과 조합한다. 한 구체예에서, 치료경험이 있는 HCV 환자는 HCV 유전자형 1로 감염된다.

<621> 상기에서 기술된 바와 같이, 4주 치료에서의 급속 바이러스 반응 (RVR)은 지속적 바이러스 반응 (SVR)의 포지티브 예측제로서 식별된다. 더욱이, 치료 12주 내내 HCV RNA의 유지는 SVR의 또 다른 포지티브 예측제로서 확립된다. 결국, 4주에 HCV RNA 음성을 달성하고, 12주 내내 이러한 음성을 지속하는 환자는 거의 치료 요법의 완결 후에 HCV RNA 음성을 유지할 것이다. 따라서, IFN-알파-HSA 단독으로 또는 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 항바이러스제, 예를 들어 리바비린과 조합하여 치료한 후에 4주에 HCV RNA 음성을 달성하고 12주내내 이러한 음성을 지속하는 HCV 환자의 수를 최대화하는 것일 필요하다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 2100 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 2000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 1200 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로; 및 일부 다른 구체예에서, 2주 및 4주를 조합하여 약 1200 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한 것이다.

<622> 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 2주 및 4주를 조합하여 약 600 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 800 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 900 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1200 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1500 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1600 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 1800 μg /용량; 2주 및 4주를

조합하여 약 2000 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 2100 μg /용량; 2주 및 4주를 조합하여 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개 또는 4개의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주, 및 추가의 구체예에서 48주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물과 조합하여 유전자형 2 또는 3으로 감염된 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<623>

한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 90 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안에 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 900 μg /용량 내지 약 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안에 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법 초기에 2주마다 2회씩 약 900 μg /용량 내지 약 1800 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 기간 동안에 4주마다 IFN-알파-HSA로 치료된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주, 및 다른 구체예에서 48주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 항바이러스 화합물과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물과 조합하여 유전자형 2 또는 3으로 감염된 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<624>

추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질(예를 들어, CID 2249, 2343, 2366, 2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476, 3960, 4290, 4291, 4292, 4295, 또는 4296에 의해 형성됨)은 치료 요법의 초기에 2주마다 2회씩 약 600 μg /용량, 800 μg /용량, 900 μg /용량, 1000 μg /용량, 1200 μg /용량, 1500 μg /용량, 1600 μg /용량, 1800 μg /용량, 2000 μg /용량, 2100 μg /용량, or 2400 μg /용량의 전체 포물레이팅 농도로 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여되고, 이후 나머지 치료 기간 동안에 4주마다 IFN-알파-HSA 융합 단백질로 치료된다. 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 이러한 투여는 단독이거나 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합한 것이다. 한 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질의 전체 포물레이팅 농도는 1200 μg /용량 또는 1800 μg /용량이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 적어도 24주, 및 또 다른 구체예에서 48주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개 또는 4개 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여 유전자형 1로 감염된 치료경험이 없는 HCV 환자에게 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 IFN-알파-HSA 융합 단백질은 24주의 기간 동안에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 항바이러스 화합물, 예를 들어 리바비린과 조합하여, 유전자형 2 또는 3으로 감염된 치료경험이 있는 HCV 환자에게 투여된다.

<625>

알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 경구, 직장, 비경구, 수조내, 질내, 복막내, 국소(예를 들어, 분말, 연고, 젤, 점적 또는 경피 패치), 구강, 또는 경구 또는 비내 스프레이로서 투여될 수 있다. "약제학적으로 허용되는 담체"는 비-독성 고형물, 반고형물 또는 액체 충전제, 희석제, 인캡슐레이팅 물질 또는 임의의 포물레이션 보조물을 칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구"는 정맥내, 근내, 복막내, 복장내, 피하 및 관절내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 칭한다.

<626>

본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 또한 지효성 방출 시스템에 의해 적절하게 투여된다. 지효성 방출 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드의 예는 경구, 직장, 비경구, 수조내, 질내, 복막내, 국소(분말, 연고, 젤, 점적 또는 경피 패치), 구강, 또는 경구 또는 비내 스프레이로 투여된다. "약제학적으로 허용되는 담체"는 비-독성 고형물, 반고형물 또는 액체 충전제, 희석제, 인캡슐레이팅 물질 또는 임의의 유형의 보조 포물레이션을 칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구"는 정맥내, 근내, 복막내, 복장

내, 피하 및 관절내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 칭한다. 지효성 방출 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드의 추가의 예는 적절한 중합 물질(예를 들어, 형상화된 물품 형태의 반투과성 중합 기질, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐), 적절한 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일의 에멀션) 또는 이온 교환 레진, 및 난용성 유도체(예를 들어, 난용성 염)를 포함한다.

<627> 지효성 방출 기질은 폴리락티드(미국 특허 번호 제 3,773,919호, EP 58,481), L-글루탐산 및 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., Biopolymers 22:547-556 (1983)), 폴리(2-히드록시에틸 메타크릴레이트)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981), and Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer et al., Id.) 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산(EP 133,988)을 포함한다.

<628> 지효성 방출 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 또한 본 발명의 리포솜에 의해 엔트래핑(entrapping)된 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다(예를 들어, 문헌[Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 317-327 and 353-365 (1989)] 참조). 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 리포솜은 문헌[DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese Pat. Appl. 83-118008; 미국 Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324]에 공지된 방법에 의해 제조된다. 보통, 리포솜은 지질의 함량이 최적의 치료를 위해 조정된 선택된 비율인 약 30몰% 콜레스테롤 초과와 작은(약 200-800Å) 단층 유형이다.

<629> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 펌프에 의해 전달된다(문헌[Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)] 참조).

<630> 기타 조절되는 방출 시스템은 문헌[Langer (Science 249:1527-1533 (1990))]의 개관에 논의되어 있다.

<631> 비경구 투여를 위해, 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 요망되는 순도로 약제학적으로 허용되는 담체, 즉 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 비-독성이고 포물레이션의 기타 성분과 양립되는 담체와 함께 주사가 가능한 단위 복용 형태(용액, 현탁액, 또는 에멀션)로 혼합시킴으로써 포물레이팅된다. 예를 들어, 포물레이션은 바람직하게는 치료에 유독한 것으로 공지된 산화제 및 기타 화합물을 포함하지 않는다.

<632> 일반적으로, 포물레이션은 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고형 담체 또는 둘 모두와 접촉시킴으로써 제조된다. 이후, 필요시 생성물은 요망되는 포물레이션으로 형상화된다. 바람직하게는, 담체는 비경구 담체, 더욱 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장성인 용액이다. 이러한 담체 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 및 텍스트로오스 용액을 포함한다. 비수성 비히클, 예를 들어 고정된 오일 및 에틸 올리에이트, 뿐만 아니라 리포솜이 또한 본원에서 유용하다.

<633> 담체는 소량의 첨가제, 예를 들어 등장력 및 화학적 안전성을 향상시키는 물질을 함유한다. 이러한 물질은 사용되는 복용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 숙시네이트, 아세트산, 및 기타 유기산 또는 이들의 염; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드, 예를 들어 폴리알라닌 또는 트리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루탐산, 아스파르트산, 또는 알라닌; 당류, 이당류, 및 셀룰로오스 또는 이의 유도체, 글루코오스, 만노오스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 설탕 알코올, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 카운터이온, 예를 들어 나트륨; 및/또는 비이온성 표면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트(예를 들어, 트윈-20 포함), 폴록사머, 또는 PEG를 포함한다.

<634> 알부민 융합 단백질은 통상적으로 약 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml, 바람직하게는 1-10 mg/ml의 농도, 약 3 내지 8의 pH에서 상기 비히클내로 포물레이팅된다. 전술한 특정 부형제, 담체, 또는 안정화제의 사용이 폴리펩티드 염의 형성을 초래하는 것으로 이해될 것이다.

<635> 치료 투여를 위해 사용되는 임의의 약물은 멸균될 수 있다. 멸균은 멸균 여과막(예를 들어, 0.2 마이크로미터)을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다. 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 멸균 접근 포트, 예를 들어 피하주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 스톱퍼(stopper)를 지니는 정맥내 용액 백 또는 바이

알을 지니는 용기에 위치된다.

- <636> 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 보통 재구성을 위한 수용액 또는 동결건조된 포물레이션으로서 단위 또는 다용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 또는 바이알에 저장될 것이다. 동결건조된 포물레이션의 예로서, 10 ml 바이알은 5 ml의 멸균 여과된 1%(w/v) 수성 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드 용액으로 채워지고, 생성된 혼합물은 동결건조된다. 주입 용액은 정균성 워터-포-인젝션(Water-for-Injection)을 이용하여 동결건조된 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 재구성시킴으로써 제조된다.
- <637> 특정한 한 구체예에서, 알부민 융합 단백질 포물레이션은 0.01 M 인산나트륨, 0.15 mM 염화나트륨, 0.16 마이크로몰의 나트륨 옥타노에이트/밀리리터의 융합 단백질, 15 µg/ml 폴리소르베이트 80(pH 7.2)를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 알부민 융합 단백질 포물레이션은 0.01 M 인산나트륨, 0.15 mM 염화나트륨, 0.16 마이크로몰 나트륨 옥타노에이트/밀리그램의 융합 단백질, 15 µg/ml 폴리소르베이트 80(pH 7.2)로 구성된다. pH 및 완충용액은 생리학적 환경과 매치되는 것으로 선택되고, 염은 토니시피어(tonicifier)로서 첨가된다. 나트륨 옥타노에이트는 용액에서의 단백질의 열 안정성을 증가시키는 이의 보고된 능력으로 인해 선택된다. 최종적으로, 폴리소르베이트는 용액의 표면 장력을 낮추고 용기 폐쇄 시스템에 대한 알부민 융합 단백질의 비-특이적 흡수를 낮추는 일반명 표면활성제이다.
- <638> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드의 성분중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 이러한 용기(들)와 관련하여 인간 투여에 대한 제조, 용도 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영하는 것으로 공지되는 약제학적 또는 생물학적 제품의 제조, 용도 또는 판매를 통제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태로 공지될 수 있다. 게다가, 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 기타 치료 화합물과 함께 사용될 수 있다.
- <639> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 단독으로 또는 어주번트와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 어주번트는 백반(alum), 백반 + 데옥시콜레이트(ImmunoAg), MTP-PE(Biocine Corp.), QS21(Genentech, Inc.), BCG(예를 들어, THERACYS®), MPL 및 코리네파테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*)의 무생육성 제조물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 백반과 함께 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 QS-21과 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 추가의 어주번트는 모노포스포릴 지질 면역조절 물질, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, 알루미늄염, MF-59, 및 바이로솜 어주번트 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 백신은 MMR(홍역, 머프스, 풍진), 폴리오, 수두, 파상풍/디프테리아, A형 간염, B형 간염, 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) B, 백일해, 폐렴, 인플루엔자, 라임병, 로타바이러스, 콜레라, 황열병, 일본 뇌염, 회색질척수염, 광견병, 장티푸스, 및 백일해에 대한 보호에 관련된 백신을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 조합물은 동시에, 예를 들어 배합물로서 별도로, 동시에; 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 이는 결합된 작용제가 치료 혼합물로서 함께 투여되는 프레젠테이션, 및 결합된 작용제가 개별적으로 투여되나 동시에, 예를 들어 동일한 개체로 별개의 정맥주사선을 통해 투여되는 공정을 포함한다. "조합되는" 투여는 추가로 소정의 제1 화합물 또는 작용제중 하나의 별개의 투여 후, 제2 화합물 또는 작용제중 하나의 별개의 투여를 포함한다.
- <640> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 단독으로 또는 기타 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 조합되어 투여될 수 있는 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드 작용제는 화학요법제, 항생제, 스테로이드성 및 비-스테로이드성 항염증제, 통상적인 면역요법제, 및/또는 하기 기술된 치료적 치료법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 조합물은 동반하여, 예를 들어 혼합물, 개별적이지만 동시에 또는 동시에 투여될 수 있거나; 순차적으로 투여될 수 있다. 이는 조합된 작용제가 치료 혼합물로서 함께 투여되는 프레젠테이션, 및 조합된 작용제가 개별적이지만 동시에, 예를 들어 동일한 개체로 별개의 정맥주사선을 통해 투여되는 방법을 포함한다. "조합되는" 투여는 추가로 소정의 제1 화합물 또는 작용제중 하나의 별개의 투여 후, 제2 화합물 또는 작용제중 하나의 별개의 투여를 포함한다.
- <641> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 항응고제와 함께 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 항응고제는 헤파린, 저분자량 헤파린, 와파린 나트륨(예를 들어, COUMADIN®), 디쿠마롤, 4-히드록시쿠마린, 아니스인디온(예를 들어, MIRADON™), 아세노쿠마롤(예를 들어, 니쿠말론, SINTHROME™), 인단-1,3-디온, 펜프로쿠몬(예를 들어, MARCUMAR™), 에틸 비스쿠마세테이트(예를 들어,

TROMEXANTM), 및 아스피린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 와파린과 함께 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 와파린과 함께 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 와파린 및 아스피린과 함께 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 헤파린과 함께 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및 아스피린과 함께 투여된다.

<642> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 혈전용해 약물과 함께 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 혈전용해 약물은 플라스미노겐, lys-플라스미노겐, 알파2-항플라스민, 스트렙토키나아제(예를 들어, KABI KINASETM), 안티레스플레이스(antiresplase)(예를 들어, EMINASETM), 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA, 알테바아제(altevas), ACTIVASETM), 우로키나아제(예를 들어, ABBOKINASETM), 사우루플라아제(sauruplase), (프로우로키나아제, 단일 사슬 우로키나아제), 및 아미노카프로산(예를 들어, AMICARTM)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 조직 플라스미노겐 활성화제 및 아스피린과 조합되어 투여된다.

<643> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 항혈소관 약물과 조합되어 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 항혈소관 약물은 아스피린, 디피리다몰(예를 들어, PERSANTINETM), 및 티클로피딘(예를 들어, TICLIDTM)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<644> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 조합된 항응고제, 혈전용해 및/또는 항혈소관 약물의 사용은 혈전증, 동맥 혈전증, 정맥 혈전증, 혈전색전증, 폐색전증, 죽상경화증, 심근경색증, 일과성 허혈 발작, 불안전형 협심증의 예방, 진단 및/또는 치료에 고려된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 조합된 항응고제, 혈전용해 약물 및/또는 항혈소관 약물의 사용은 혈관성형술 과정에 수반될 수 있는 주변절차(periprocedural)상 혈전증의 위험을 감소시키고, 비류마티스 심방세동을 포함하는 심방세동을 지닌 환자에서의 뇌졸중의 위험을 감소시키고, 기계적 심판막 및 승모판막 질병과 관련된 색전증의 위험을 감소시키기 위해 두령 이식의 폐색의 방지에 대해 고려된다. 본 발명의 치료제 단독 또는 항혈소관제, 항응고제, 및/또는 혈전용해 약물과의 조합에 대한 기타 용도는 체외 장치(예를 들어, 혈액투석 환자에서의 혈관내 삽입관, 혈관통로 선트, 및 심폐기)에서의 폐색의 방지를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<645> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 안티레트로바이러스 제제, 뉴클레오시드/뉴클레오티드 역전사효소 억제제(NRTI), 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제(NNRTI), 및/또는 프로테아제 억제제(PI)와 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 NRTI는 RETROVIRTM (지도부딘/AZT), VIDEXTM (디다노신/ddI), HIVIDTM (잘시타빈/ddC), ZERITTM (스타부딘/d4T), EPIVIRTM (라미부딘/3TC), 및 COMBIVIRTM (지도부딘/라미부딘)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 NNRTI는 VIRAMUNETM (네비라핀), RESCRIPTORTM (델라비르딘), 및 SUSTIVATM (에파비렌즈)를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 프로테아제 억제제는 CRIXIVANTM (인디나버), NORVIRTM (리토나버), INVIRASETM (사퀴나버), 및 VIRACEPTTM (넬피나버)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 특정 구체예에서, 안티레트로바이러스 제제, 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제 및/또는 프로테아제 억제제는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 어떠한 조합으로 사용되어 AIDS를 치료하고/거나 HIV 감염증을 예방 또는 치료할 수 있다.

<646> 추가의 NRTI는 LODENOSINETM (F-ddA; 산-안전성 아데노신 NRTI; Triangle/Abbott; COVIRACILTM (엠티리사이타빈/FTC; 구조적으로 라미부딘(3TC)와 관련있지만, 시험관내에서 3- 내지 10-배 더 큰 활성을 지님; Triangle/Abbott); dOTC (BCH-10652, 라미부딘과 역시 구조적으로 관련이 있지만, 라미부딘 내성 분리체의 실질적인 부분에 대해서 활성을 보유함; Biochem Pharma); 아데포버(Adefovir: FDA에 의해서 항-HIV 치료제로 승인 거절; Gilead Sciences); PREVEON®(아데포버 디피복실(Adefovir Dipivoxil), 아데포버의 활성 프로드러그; 이의 활성형은 PME-pp이다); TENOFOVIRTM (비스-POC PMPA, PMPA 프로드러그; Gilead); DAPD/DXG (DAPD의 활성 대사체; Triangle/Abbott); D-D4FC (3TC와 연관됨, AZT/3TC-내성 바이러스에 대해서 활성을 지님); GW420867X

(Glaxo Wellcome); ZIAGEN™ (아바카버/159U89; Glaxo Wellcome Inc.); CS-87 (3'아지도-2',3'-디데옥시우리딘; WO 99/66936); 및 β -L-FD4C 및 β -L-FddC의 S-아실-2-티오에틸 (SATE)-함유 프로드러그 형태 (WO 98/17281)를 포함한다.

<647> 추가의 NNRTI는 COACTINON™ (에미비린/MKC-442, HEPT 류의 효능적 NNRTI; Triangle/Abbott); CAPRAVIRINE™ (AG-1549/S-1153, K103N 돌연변이를 함유하는 바이러스에 대해 활성을 지니는 차세대 NNRTI; Agouron); PNU-142721 (선행 텔라비르딘 보다 20- 내지 50-배 더 큰 활성을 지니며 K103N 돌연변이에 대해서 활성임; Pharmacia & Upjohn); DPC-961 및 DPC-963 (K103N 돌연변이를 지니는 바이러스에 대해서 활성이도록 고안된 제 2 세대 에파비렌즈(efavirenz) 유도체; DuPont); GW-420867X (HBY097에 비해서 25-배 더 큰 활성을 지니며 K103N 돌연변이체에 대해서 활성임; Glaxo Wellcome); CALANOLIDE A (라텍스(latex) 나무로부터의 천연 제제; Y181C 및 K103N 돌연변이 중 하나 또는 둘 모두를 함유하는 바이러스에 대해서 활성); 및 프로폴리스 (Propolis)(WO 99/49830)를 포함한다.

<648> 추가의 프로테아제 억제제는 LOPINAVIR™ (ABT378/r; Abbott Laboratories); BMS-232632 (아자웹티드; Bristol-Myres Squibb); TIPRANAVIR™ (PNU-140690, 비웹티드성 디히드로피론; Pharmacia & Upjohn); PD-178390 (비웹티드성 히드로피론; Parke-Davis); BMS 232632 (아자웹티드; Bristol-Myers Squibb); L-756,423 (인디나버(indinavir) 유사체; Merck); DMP-450 (시클릭 우레아 화합물; Avid & DuPont); AG-1776 (프로테아제 억제제 내성 바이러스에 대해서 시험관내 활성을 나타내는 웹티도의태체; Agouron); VX-175/GW-433908 (엠프레나버의 포스페이트 프로드러그; Vertex & Glaxo Wellcome); CGP61755 (Ciba); 및 AGENERASE™ (애프레나버; Glaxo Wellcome Inc.)를 포함한다.

<649> 추가의 안티레트로바이러스 제제는 융합 억제제/gp41 결합제를 포함한다. 융합 억제제/gp41 결합제는 T-20(이의 휴지 상태에서 gp41에 결합하며 용해성 상태로의 변형을 방지하는 HIV gp41 경막 단백질 엑토도메인의 잔기 643-678로부터의 웹티드; Trimeris) 및 T-1249(제2 세대 융합 억제제; Trimeris)를 포함한다.

<650> 추가의 안티레트로바이러스 제제는 융합 억제제/케모킨 수용체 길항제를 포함한다. 융합 억제제/케모킨 수용체 길항제는 CXCR4 길항제, 예컨대, AMD 3100(바이시클람), SDF-1 및 이의 유사체, 및 ALX40-4C (양이온 웹티드), T22(18 아미노산 웹티드; Trimeris) 및 T22 유사체 T134 및 T140; CCR5 길항제, 예컨대, RANTES (9-68), AOP-RANTES, NNY-RANTES, 및 TAK-779; 및 CCR5/CXCR4 길항제, 예컨대, NSC 651016 (디스타마이신 유사체)를 포함한다. 또한, CCR2B, CCR3, 및 CCR6 길항제가 포함된다. 케모킨 수용체 효능제, 예컨대, RANTES, SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β , 등은 또한 융합을 억제할 수 있다.

<651> 추가의 안티레트로바이러스 제제는 인테그라제 억제제를 포함한다. 인테그라제 억제제는 디카페오일퀸산(dicaffeoylquinic (DFQA) acid); L-키코르산(L-chicoric acid)(디카페오일타르타르산: DCTA); 퀴날리자린(quinalizarin: QLC) 및 이와 관련된 안트라퀴논; ZINTEVIR™ (AR 177, 진정한 인테그라제 억제제이기 보다는 아마도 세포 표면에서 작용하는 올리고뉴클레오티드; Arondex); 및 나프톨, 예컨대, WO 98/50347호에 개시된 나프톨)을 포함한다.

<652> 추가의 안티레트로바이러스 제제는 히드록시우레아 유사 화합물, 예컨대, BCX-34 (퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; Biocryst); 리보뉴클레오티드 리덕타제 억제제, 예컨대, DIDOX™(건강용 분자); 이노신 모노포스페이트 데히드로게나제(IMPDH) 억제제, 예컨대, VX-497 (Vertex); 및 마이코폴산, 예컨대, CellCept (마이코페놀레이트 모페틸: mycophenolate mofetil; Roche)을 포함한다.

<653> 추가의 안티레트로바이러스 제제는 바이러스 인테그라제의 억제제, 바이러스 게놈 핵 전좌 억제제, 예컨대, 아릴렌 비스(메틸케톤) 화합물; HIV 유입 억제제, 예컨대, AOP-RANTES, NNY-RANTES, RANTES-IgG 융합 단백질, RANTES와 글리코사미노글리칸(GAG)의 가용성 복합체, 및 AMD-3100; 뉴클레오텍시드 아연 핑거 억제제, 예컨대, 디티안 화합물; HIV Tat 및 Rev의 표적; 및 파마코인헨서(pharmacoenhancer), 예컨대, ABT-378을 포함한다.

<654> 다른 안티레트로바이러스 치료제 및 부가 치료제는 시토킨 및 림포킨, 예컨대, MIP-1 α , MIP-1 β , SDF-1 α , IL-2, PROLEUKIN™(알테스류킨/L2-7001; Chiron), IL-4, IL-10, IL-12, 및 IL-13; 인터페론, 예컨대, IFN-알파2a, IFN-알파2b, 또는 IFN-베타; TNF, NF κ B, GM-CSF, M-CSF, 및 IL-10의 길항제; 시클로스포린 및 프레트니손과 같이 면역 활성화를 조절하는 제제; 백신, 예컨대, Remune™ (HIV 면역원), APL 400-003 (Apollon), 재조합

gp120 및 이의 단편, 바이발런트(bivalent) (B/E) 재조합 엔벨로프 당단백질, rgp120CM235, MN rgp120, SF-2 rgp120, gp120/가용성 CD4 복합체, 델타 JR-FL 단백질, 불연속 gp120 C3/C4 도메인으로부터 유래된 분지형 합성 펩티드, 융합-경쟁 면역원, 및 Gag, Pol, Nef, 및 Tat 백신; 유전자-기재 치료제, 예컨대, 유전 억제 요소 (genetic suppressor element: GSE; WO 98/54366), 및 인트라킨(새롭게 합성된 CCR5의 표면 발현을 차단하도록 ER에 대해 표적된 유전적으로 변형된 CC 케모킨(Yang *et al.*, *PNAS* 94:11567-72 (1997); Chen *et al.*, *Nat. Med.* 3:1110-16 (1997)); 항체, 예컨대, 안티-CXCR4 항체 12G5, 안티-CCR5 항체 2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PA11, PA12, 및 PA14, 안티-CD4 항체 Q4120 및 RPA-T4, 안티-CCR3 항체 7B11, 안티-gp120 항체 17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-D 및 50.1, 안티-Tat 항체, 안티-TNF- α 항체, 및 모노클로날 항체 33A; 아릴 탄화수소 (AH) 수용체 효능제 및 길항제, 예컨대, TCDD, 3,3',4,4',5-펜타클로로바이페닐, 3,3',4,4'-테트라클로로바이페닐, 및 α -나프토플라본 (WO 98/30213); 및 항산화제, 예컨대, γ -L-글루타밀-L-시스테인 에틸 에스테르 (γ -GCE; WO 99/56764)를 포함한다.

<655> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 항바이러스제와 함께 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 두개 이상의 항바이러스제와 조합하여 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 3개 이상의 항바이러스제와 조합하여 투여된다.

<656> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 항바이러스제는 바이러스 효소의 소분자 억제제, RNA 폴리머라제의 소분자 억제제, 핵산 계열 항바이러스제, 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제, 티아졸리드, 항바이러스 항체, 신규한 면역조절제, 시클로필린 억제제, 간보호제, 및 인터페론 인핸서(enhancer)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 항바이러스제는 아시클로버, 리바비린, 리바비린 유사체, 아만타딘, 레만티딘, 맥사민, 또는 티말파신을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 상세하게는, 인터페론 알부민 융합 단백질은 임의의 이러한 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 더욱이, 인터페론 알과 알부민 융합 단백질은 또한 임의의 이러한 제제와 함께 투여될 수 있으며, 한 구체예에서, 인터페론 알과 2a 또는 2b 알부민 융합 단백질은 임의의 이러한 제제와 함께 투여될 수 있다. 더욱이, 인터페론 베타 알부민 융합 단백질은 또한 임의의 이러한 제제와 함께 투여될 수 있다. 추가적으로, 임의의 IFN 혼성 알부민 융합 단백질은 임의의 이러한 제제와 조합하여 투여될 수 있다.

<657> 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체와 조합하여 투여된다. 또 다른 구체예에서, 인터페론 알부민 융합 단백질과 조합하여 투여될 수 있는 리바비린 또는 리바비린 유사체는 COPEGUS[®] (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), REBETOL[®] (Schering Corp., Kenilworth, N.J.), VIRAZOLE[®] (Valeant, Costa Mesa, CA), RIBAVIN (Lupin, Baltimore, MD), RIBAZID[™] (Epla, Kirachi, Pakistan), 트리바비린(tribavirin), VIRAMIDINE[®] (Valeant, Costa Mesa, CA), RIBASPHERE[™] (Three Rivers Pharmaceuticals, Cranberry Township, PA)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 인터페론 알과 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체와 조합하여 투여된다. 또 다른 구체예에서, 인터페론 알과 2a 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체와 조합하여 투여된다. 또 다른 구체예에서, 인터페론 알과 2b 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체와 조합하여 투여된다. 또 다른 구체예에서, 혼성 인터페론 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체와 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 인터페론 알부민 융합 단백질은 리바비린 또는 리바비린 유사체, 및 하나 이상의 추가적인 항바이러스제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 인터페론 알부민 융합 단백질, 및 리바비린 또는 리바비린 유사체와 함께 조합하여 투여되는 추가적인 항바이러스제는 바이러스 효소의 소분자 억제제, RNA 폴리머라제의 소분자 억제제, 핵산 계열 항바이러스제, 안티센스 올리고뉴클레오티드 억제제, 티아졸리드, 항바이러스 항체, 신규한 면역조절제, 시클로필린 억제제, 간보호제, 및 인터페론 인핸서를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<658> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 바이러스 감염증을 치료하기 위하여 단독으로 또는 하나 이상의 항바이러스제와 조합하여 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 인터페론-알부민 융합 단백질은 하나 이상의 항바이러스제와 조합하여 투여될 수 있다. 추가의 구체예에서, 바이러스 감염증은 간염 바이러스로의 감염증으로부터 얻어진다. 다른 구체예에서, 간염 바이러스는 C형 간염 바이러스(HCV)이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 항바이러스제는

바이러스 효소의 소분자 억제제, RNA 폴리머라제의 소분자 억제제, 핵산 계열 항바이러스제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제, 티아졸리드, 항바이러스 항체, 신규한 면역조절제, 시클로필린 억제제, 간보호제, 및 인터페론 인헨서를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<659> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 효소 억제제는 VX-950 (프로테아제 억제제, Vertex, Cambridge, MA), VX-497 (메리메포디브(merimepodib), 경구 IMPDH 억제제, Vertex, Cambridge, MA), BILB 1941 (프로테아제 억제제, Boehringer Ingelheim, Germany), SCH7 (프로테아제 억제제, Schering Corp., Kenilworth, N.J.), MX-3253 (셀고시비르(celgosivir), α-글루코시다제 억제제, Migenix, Vancouver, BC), IDN-6556 (카스파제 억제제, Pfizer, New York, NY), UT231B (글루코시다제 억제제, United Therapeutics, Silver Spring, MD), R1626 (바이러스 프로테아제 억제제, F. Hoffman-La Roche, Switzerland), ITMN-B (ITMN-191, 프로테아제 억제제, InterMune, Brisbane, CA), SCH 503034 (프로테아제 억제제, Schering Corp., Kenilworth, N.J.), ACH 806 (GS9132, 경구 프로테아제 억제제, Achillion, New Haven, CT / Gilead Sciences, Foster City, CA)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<660> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 폴리머라제 억제제는 뉴클레오시드 유사체 또는 비-뉴클레오시드 억제제 (NNI)일 수 있다. 한 구체예에서, 항바이러스 폴리머라제 억제제는 HCV RNA 폴리머라제를 억제한다. 한 구체예에서, 항바이러스 폴리머라제 억제제는 NM283 (23'-C-메틸-시티딘의 경구 전구약물, Idenix, Cambridge, MA), R1626 (F. Hoffman-La Roche, Switzerland), 및 2'-C-메틸 뉴클레오시드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 뉴클레오시드 유사체일 수 있다. 다른 구체예에서, 항바이러스 폴리머라제 억제제는 JTK-103, JTK-003, 및 JTK-109 (Japan Tobacco, Tokyo, Japan), R803 (Rigel, South San Francisco, CA), HCV-371, HCV-086, 및 HCV-796 (ViroPharm, Exton, PA / Wyeth, Madison, NJ), XTL-2125 (BC2125, XTLbio, New York, NY), A-831 (Arrow Therapeutics, London, United Kingdom)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 비-뉴클레오시드 억제제일 수 있다. 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 추가적인 항바이러스 폴리머라제 억제제는 MK-0608 (Merck, Whitehouse Station, NJ), NS5a (경구 비-뉴클레오시드 폴리머라제 억제제, Genelabs, Redwood City, CA), NS5b (경구 뉴클레오시드 폴리머라제 억제제, Genelabs, Redwood City, CA), 및 ANA025-1 (폴리머라제 억제제, Anadys Pharmaceuticals, San Diego, CA)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<661> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 핵산 계열 제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 및 siRNA 또는 짧은 헤어핀(hairpin) RNA (shRNA)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제는 NEUGENE® AVI-4065 (AVI Biopharma, Portland, OR)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<662> 또 다른 구체예에서, 티아졸리드는 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 티아졸리드는 ALINIA®(nitazoxanide, Romark Laboratories, L.C., Tampa, FL)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<663> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 면역조절제는 ZADAXIN®(티모신 알파 1, 티말파신, SciClone Pharmaceuticals Int'l, Hong Kong)를 포함하며, 톨-유사 수용체 (toll-like receptor)(TLR)는 ANA245 (TLR-7 작용제, Anadys Pharmaceuticals, San Diego, CA), ANA975 (ANA245의 경구 전구약물, Anadys Pharmaceuticals, San Diego, CA), 및 CPG-10101 (ACTILON™ TLR-9 작용제, Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 시클로필린 억제제는 Debio-025 (Debiopharm Group, Lausanne, Switzerland)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 간 보호제는 NOV-205 (Novelos Therapeutics, Newton, MA)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<664> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 인터페론 인헨서는 EMZ702 (Transition Therapeutics, Toronto, Ontario)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 투여될 수 있는 항바이러스 항체는 Tarvacin (bavituximab, 종양 내피 세포의 표면 상에 포스포타디세린을 타겟화하는 인간화된 모노클론 항체, Peregrine

Pharmaceuticals, Inc., Tustin, CA)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<665>

한 구체예에서, 본 발명에 의해 포함되는 하나 이상의 항바이러스 제제와 조합하여 또는 단독으로 투여될 수 있는 알부민 융합 단백질은 인터페론-알부민 융합 단백질이다. 추가의 구체예에서, 인터페론-알부민 융합 단백질의 인터페론 부분은 인터페론 알파이다. 본 발명에 의해 포함되는 인터페론 알파의 비제한적인 예는 표 1의 치료 단백질 컬럼에 기술된 인터페론 알파 단백질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구체예에서, 인터페론 알파 부분은 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-2c, 콘센서스(consensus) 인터페론, 인터페론 알파콘-1, 인터페론 알파-n1, 인터페론 알파-n3, 인터페론 알파의 임의의 상업적으로 입수가 가능한 형태, 예를 들어 INTRON[®] A (Schering Corp., Kenilworth, N.J.), ROFERON[®] A (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), Berofer 알파 인터페론 (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn.), OMNIFERON[™] (Viragen, Inc., Plantation, FL), MULTIFERON[™] (Viragen, Inc., Plantation, FL) WELLFERON[®] (GlaxoSmithKline, London, Great Britain), INFERGEN[®] (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA), SUMIFERON[®] (Sumitomo, Japan), BELEROFON[®] (Nautilus Biotech, France), MAXY-ALPHA[™] (Maxygen, Redwood City, CA / Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), 또는 임의의 정제된 인터페론 알파 제품 또는 이들의 단편으로 이루어지거나 대안적으로 이를 포함한다. 다른 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분은 연장되거나 조절된 방출을 위해 개질되거나 포물레이팅된 인터페론 알파로 이루어지거나 대안적으로 이를 포함한다. 예를 들어, 인터페론 알파 부분은 인터페론-알파-XL (Flamel Technologies, France) 및 LOCTERON[™] (BioLex Therapeutics/OctoPlus, Pittsboro, NC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 상업적으로 입수가 가능한 연장된 방출 또는 조절된 방출 인터페론 알파로 이루어지거나, 대안적으로 이를 포함한다. 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파는 화학적 부분의 부착에 의해 개질될 수 있다. 예를 들어 인터페론 알파 부분은 페그화에 의해 개질될 수 있다. 따라서, 추가의 구체예에서, IFN-알파-HSA 융합 단백질의 인터페론 알파 부분은 인터페론 알파-2a, 2b, 또는 콘센서스 인터페론의 페그화된 형태로 이루어지거나, 대안적으로 이를 포함하며, 상업적으로 입수가 가능한 페그화된 인터페론 알파, 예를 들어 PEG-INTRON[®] (Schering Corp., Kenilworth, N.J.), PEGASYS[®] (Hoffman-La Roche, Nutley, N.J.), PEG-OMNIFERON (Viragen, Inc., Plantation, FL) 또는 이들의 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가의 구체예에서, 알부민 융합 단백질의 인터페론 부분은 인터페론 알파 2a 또는 2b 인터페론이며, 인터페론 알부민 융합 단백질은 임의의 이러한 제제들과 조합하여 투여될 수 있다. 더욱이, 다른 구체예에서, 인터페론-알부민 융합 단백질의 인터페론 부분은 인터페론 베타 또는 인터페론 혼성이다. 또 다른 구체예에서, 인터페론-알부민 융합 단백질의 비융합된 인터페론 부분은 단독으로 또는 본 발명에 의해 포함되는 하나 이상의 항바이러스 제제와 조합하여 사용될 수 있다.

<666>

다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 안티-기회 감염 제제와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 안티-기회 감염 제제는 트리메토프림-설파메톡사졸[™] (TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE[™]), 답손[™] (DAPSONE[™]), 펜타미딘[™] (PENTAMIDINE[™]), 아토바쿠온[™] (ATOVAQUONE[™]), 이소니아지드[™] (ISONIAZID[™]), 리팜핀[™] (RIFAMPIN[™]), 피라진아미드[™] (PYRAZINAMIDE[™]), 에탐부톨[™] (ETHAMBUTOL[™]), 리파부틴[™] (RIFABUTIN[™]), 클라리트로마이신[™] (CLARITHROMYCIN[™]), 아지트로마이신[™] (AZITHROMYCIN[™]), 간시클로버[™] (GANCICLOVIR[™]), 포스카르네트[™] (FOSCARNET[™]), 시도포버[™] (CIDOFOVIR[™]), 플루코나졸[™] (FLUCONAZOLE[™]), 이트라코나졸[™] (ITRACONAZOLE[™]), 케토코나졸[™] (KETOCONAZOLE[™]), 아시클로버[™] (ACYCLOVIR[™]), 팜시콜버[™] (FAMCICOLVIR[™]), 피리메타민[™] (PRIMETHAMINE[™]), 류코보린[™] (LEUCOVORIN[™]), 뉴포젠[™] (NEUPOGEN[™]) (필그라스티: filgrastim/G-CSF), 및 류킨[™] (LEUKINE[™]) (사르그라마스티: sargramostim/GM-CSF)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 트리메토프림-설파메톡사졸[™] (TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE[™]), 답손[™] (DAPSONE[™]), 펜타미딘[™] (PENTAMIDINE[™]) 및/또는 아토바쿠온[™] (ATOVAQUONE[™])와 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*) 폐 감염을 예방적으로 치료하거나 방지한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 이소니아지드[™] (ISONIAZID[™]), 리팜핀[™] (RIFAMPIN[™]), 피라진아미드[™] (PYRAZINAMIDE[™]), 및/또는 에탐부톨[™] (ETHAMBUTOL[™])과

어떠한 조합으로 사용되어 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*) 복합 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 리파부틴TM (RIFABUTINTM), 클라리트로마이신TM (CLARITHROMYCINTM), 및/또는 아지트로마이신TM (AZITHROMYCINTM)과 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 간시클로버TM (GANCICLOVIRTM), 포스카르네트TM (FOSCARNETTM), 및/또는 시도포버TM (CIDOFOVIRTM)과 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 사이토메갈로바이러스 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 플루코나졸TM (FLUCONAZOLETM), 이트라코나졸TM (ITRACONAZOLETM), 및/또는 케토코나졸TM (KETOCONAZOLETM)과 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 진균 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 아시클로버TM (ACYCLOVIRTM) 및/또는 팜시클로버TM (FAMCICOLVIRTM)와 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 및/또는 타입 II 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 피리메타민TM (PYRIMETHAMINETM) 및/또는 류코보린TM (LEUCOVORINTM)과 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 톡소플라즈마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 감염을 예방적으로 처리하거나 방지할 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 류코보린TM (LEUCOVORINTM) 및/또는 뉴포젠TM (NEUPOGENTM)과 어떠한 조합으로 사용되어 기회적 박테리아 감염을 예방적으로 처리하거나 방지한다.

<667> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 항생제와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 사용될 수 있는 항생제는 아목시실린(amoxicillin), 베타-락타마제, 아미노글리코시드, 베타-락탐(글리코펩티드), 베타-락타마제, 클린다마이신(Clindamycin), 클로람페니콜, 세팔로스포린, 시프로플록사신, 에리트로마이신, 플루오로퀴놀론, 마크롤리드(macrolide), 메트로니다졸(metronidazole), 페니실린, 퀴놀론, 라파마이신, 리팜핀, 스트렙토마이신, 설펜아미드, 테트라사이클린, 트리메토프림(trimethoprim), 트리메토프림-설파메톡사졸, 및 반코마이신(vancomycin)을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

<668> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 면역자극제와 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 면역자극제는 레바미솔(예를 들어, ERGAMISOLTM), 이소프리노신(예를 들어, INOSIPLEXTM), 인터페론(예를 들어, 인터페론 알파), 및 인터루킨(예를 들어, IL-2)를 포함하지만, 이로 한정되는 것을 아니다.

<669> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 면역억제제와 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 면역억제제는 스테로이드, 시클로스포린, 시클로스포린 유사체, 시클로포스파미드 메틸프레드니손, 프레드니손, 아자티오프린, FK-506, 15-데옥시시스페르구알린, 및 반응하는 T 세포의 작용을 억제함으로써 작용하는 그 밖의 면역억제제를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 다른 면역 억제제는 프레드니솔론, 메토타렉세이트, 탈리도미드, 메톡살렌, 라파마이신, 레플루노미드, 미조리빈(BREDININTM), 브레퀴나르(brequinar), 데옥시시페르구알린, 및 아자스피란(SKF 105685), 오르토클론 OKT[®] 3(ORTHOCLONE OKT[®] 3) (무로모나브-CD3: muromonab-CD3), 산디문TM (SANDIMMUNETM), 뉴랄TM (NEORALTM), 상다이아TM (SANGDYATM) (시클로스포린), 프로그래프[®] (PROGRAF[®]) (FK506, 타크로리무스: tacrolimus), 셀셉트[®] (CELLCEPT[®]) (마이코페놀레이트 모테필: mycophenolate mofetil, 이의 활성 대사체는 마이코페놀산이다), 이무란TM (IMURANTM) (아자티오프린), 글루코코르티코스테로이드, 부신피질 스테로이드, 예컨대, 델타손TM (DELTASONETM) (프레드니손) 및 하이델트라솔TM (HYDELTRASOLTM) (프레드니솔론), 폴렉스TM (FOLEXTM) 및 메세이트TM (MEXATETM) (메토타렉세이트), 옥소소랄렌-울트라TM (OXSORALEN-ULTRATM) (메톡살렌) 및 라파문TM (RAPAMUNETM) (시롤리무스)를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, 면역억제제는 기관 또는 골수 이식의 거부를 억제하는데 사용될 수 있다.

- <670> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 단독으로 또는 하나 이상의 정맥내 면역 글로불린 제제와 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 함께 투여될 수 있는 정맥내 면역 글로불린 제제는 감마르™ (GAMMAR™), 이베감™ (IVEEGAM™), 산도글로불린™ (SADOGLOBULIN™), 감마가드 S/D™ (GAMMAGARD S/D™), 아트감™ (ATGAM™)(안티티모사이트 글루불린), 및 가미문™ (GAMIMUNE™)을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 이식 치료법(예, 골수 이식)에서 정맥내 면역 글로불린 제제와 함께 투여된다.
- <671> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 단독으로 또는 조합 치료의 일부로서, 암의 치료를 위한 환자에 대한 생체내 또는 세포에 대한 시험관내 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 알부민 융합 단백질, 특히, IL-2-알부민 융합 단백질은 암의 수동 면역치료, 예컨대, 본원에 참조로서 포함되고 있는 문헌[Dudley et al., Science Express, 19 September 2002., at www.scienceexpress.org]에 기재된 전이성 흑색종에 대한 입양 세포전달 치료 동안 반복적으로 투여된다.
- <672> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 단독으로 또는 소염제와 함께 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 함께 투여될 수 있는 소염제는 코르티코스테로이드(예, 베타메타손, 부데소니드, 코르티손, 텍사메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손 및 트리암시놀론), 비스테로이드성 소염약(예, 디클로페낙, 디플루니살, 에토돌락, 페노프로펜, 플룩타페닌, 플루르비프로펜, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 메클로페나메이트, 메페남산, 멜록시캄, 나부메톤, 나프록센, 옥사프로진, 페닐부타존, 피록시캄, 설린다, 테녹시캄, 티아프로펜산, 및 톨메틴) 뿐만 아니라 항히드타민, 아미노아릴카르복실산 유도체, 아릴아세트산 유도체, 아릴부티르산 유도체, 아릴카르복실산, 아릴프로피온산 유도체, 피라졸, 피라졸론, 살리실산 유도체, 티아진카르복사미드, e-아세타미도카프로산, S-아테노실메티오닌, 3-아미노-4-히드록시부티르산, 아믹세트린, 벤다작, 벤지다민, 부콜롬, 디펜피라미드, 디타졸, 에모르파존, 구아이아줄렌, 나부메톤, 니메솔리드, 오르코테인, 옥사세프롤, 피라닐린, 페리속살, 피폭심, 프로쿠아존, 프록사졸, 및 테니답을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.
- <673> 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 항혈관형성제와 함께 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 항혈관형성제는 안지오스타틴(Angiostatin) (Entremed, Rockville, MD), 트로포닌(Troponin-1) (Boston Life Sciences, Boston, MA), 항침습인자(anti-Invasive Factor), 레티노산 및 이의 유도체, 파클리탁셀 (택솔: Taxol), 수라민(Suramin), 메탈로프로테이나제-1의 조직 억제제, 메탈로프로테이나제-2의 조직 억제제, VEGI, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1, 플라스미노겐 활성화제 억제제-2, 및 "d-그룹" 경 전이금속의 다양한 형태를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.
- <674> "d 그룹" 경 전이금속은, 예를 들어, 바나듐, 몰리브덴, 텅스텐, 티탄, 니오븀, 및 탄탈 중을 포함한다. 그러한 전이금속종은 전이금속 착물을 형성할 수 있다. 상기 전이금속종의 적합한 착물은 옥소(oxo) 전이금속 착물을 포함한다.
- <675> 바나듐 착물의 대표적인 예는 옥소 바나듐 착물, 예컨대, 바나데이트 및 바나딜 착물을 포함한다. 적합한 바나데이트 착물은 메타바나데이트 및 오르토바나데이트 착물, 예컨대, 암모늄 메타바나데이트, 소듐 메타바나데이트, 및 소듐 오르토바나데이트를 포함한다. 적합한 바나딜 착물은, 예를 들어, 바나딜 아세틸아세토네이트 및 바나딜 설페이트 모노- 및 트리하이드레이트와 같은 바나딜 설페이트 하이드레이트를 포함한 바나딜 설페이트를 포함한다.
- <676> 텅스텐 및 몰리브덴 착물의 대표적인 예는 또한 옥소 착물을 포함한다. 적합한 옥소 텅스텐 착물은 텅스테이트 및 텅스텐 산화물 착물을 포함한다. 적합한 텅스테이트 착물은 암모늄 텅스테이트, 칼슘 텅스테이트, 소듐 텅스테이트 디하이드레이트, 및 텅스텐산을 포함한다. 적합한 텅스텐산화물은 텅스텐(IV) 산화물 및 텅스텐(VI) 산화물을 포함한다. 적합한 옥소 몰리브덴 착물은 몰리브데이트, 몰리브덴 산화물, 및 몰리브데닐 착물을 포함한다. 적합한 몰리브데이트 착물은 암모늄 몰리브데이트 및 이의 수화물, 소듐 몰리브데이트 및 이의 수화물, 및 칼륨 몰리브데이트 및 이의 수화물을 포함한다. 적합한 몰리브덴 산화물은 몰리브덴(VI) 산화물, 몰리브덴(VI) 산화물, 및 몰리브덴산을 포함한다. 적합한 몰리브데닐 착물은, 예를 들어, 몰리브데닐 아세틸아세토네이트를 포함한다. 다른 적합한 텅스텐 및 몰리브덴 착물은, 예를 들어, 글리세롤, 타르타르산, 및 당으로부터 유도된 히드록소 유도체를 포함한다.
- <677> 광범위하게 다양한 다른 항혈관형성 인자가 또한 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다. 대표적인 예는 혈소판 인자 4; 프로타민 설페이트; 설페이트화된 키틴 유도체(퀸 크랩 껍질로부터 제조됨), (Murata et al., Cancer

Res. 51:22-26, (1991)); 설페이트화된 폴리사카라이드 펩티도글리칸 복합체 (SP-PG) (이러한 화합물의 작용은 스테로이드, 예컨대, 에스트로겐, 및 타목시펜 시트레이트의 존재하에 증진될 수 있다); 스타우로스포린; 예를 들어, 프롤린 유사체, 시스히드록시프롤린, d,L-3,4-데하이드로프롤린, 티아프롤린, 알파,알파-디피리딜, 아미노프로피오니트릴 푸마레이트를 포함한 매트릭스 대사 조절제; 4-프로필-5-(4-피리디닐)-2(3H)-옥사졸론; 메토틱세이트; 미톡산트론; 헤파린; 인터페론; 2 마크로글로불린-혈청; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992)); 키모스타틴(Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, (1992)); 시클로텍스트린 테트라데카설페이트; 에포네마이신; 캄프토테신; 푸마길린 (Ingber et al., Nature 348:555-557, (1990)); 골드 소듐 티오말레이트 ("GST"; Matsubara and Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, (1987)); 항콜라게나제-혈청; 알파2-안티플라스민 (Holmes et al., J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, (1987)); 비스안트렌(National Cancer Institute); 로벤자리트 디소듐 (N-(2)-카르복시페닐-4-클로로안트로닐산 디소듐 또는 "CCA"; (Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, (1992)); 및 메탈로프로테이나제 억제제, 예컨대, BB94를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

<678> 본 발명의 범위내에서 사용될 수 있는 추가의 항혈관형성 인자는 탈리도미드, (Celgene, Warren, NJ); 혈관억제 스테로이드; AGM-1470 (H. Brem and J. Folkman *J Pediatr. Surg.* 28:445-51 (1993)); 인테그린 알파 v 베타 3 길항제 (C. Storgard et al., *J Clin. Invest.* 103:47-54 (1999)); 카르복시나미도미다졸 (carboxynaminomidazole); 카로복시아미도트리아졸(CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD); 콘브레타스타틴 A-4(Conbretastatin A-4: CA4P) (OXiGENE, Boston, MA); 스쿠알아민 (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA); TNP-470, (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, IL); ZD-0101 아스트라제네카(ZD-0101 AstraZeneca) (London, UK); APRA (CT2584); 베네펜, 비로스타틴-1(Byrostatin-1) (SC339555); CGP-41251 (PKC 412); CM101; 텍스라족산 (ICRF187); DMXAA; 엔도스타틴; 플라보프리디올; 제네스테인(Genestein); GTE; ImmTher; 이레사(Iressa) (ZD1839); 옥트레오티드(Octreotide) (Somatostatin); 판레틴(Panretin); 페나실아민 (Penacillamine); 포토포인트(Photopoint); PI-88; 프리노마스타트(Prinomastat) (AG-3340) 푸르리티틴 (Purlytin); 수라디스타(Suradista) (FCE26644); 타목시펜(Tamoxifen)(Nolvadex); 타자로텐(Tazarotene); 테트라티오몰리브데이트(Tetrathiomolybdate); 젤로다(Xeloda) (Capecitabine); 및 5-플루오로우라실을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

<679> 본 발명의 화합물과 조합하여 투여될 수 있는 항혈관형성제(anti-angiogenic agents)는 이로 한정되는 것은 아니지만 세포의 매트릭스의 단백질 분해를 억제하고, 내피 세포-세포의 매트릭스 유착 분자의 작용(function)을 차단하고, 혈관형성 유도자, 예컨대, 성장인자의 작용에 길항작용하고, 내피 세포를 증식시키는데 발현된 인테그린 수용체를 억제함을 포함하는 다양한 메카니즘을 통해서 작용할 수 있다. 세포의 매트릭스 단백질 분해를 방해하고 본 발명의 조성물과 조합하여 투여될 수 있는 항혈관형성 억제제의 예는 AG-3340(Agouron, La Jolla, CA), BAY-12-9566(Bayer, West Haven, CT), BMS-275291(Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), CGS-27032A(Novartis, East Hanover, NJ), 마리마스타트(Marimastat)(British Biotech, Oxford, UK), 및 메타스타트(Metastat)(Aeterna, St-Foy, Quebec)를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 내피세포-세포의 매트릭스 유착 분자의 작용을 차단함에 의해 작용하며 본 발명의 조성물과 조합하여 투여될 수 있는 항혈관형성 억제제의 예는 EMD-121974(Merck KgaA Darmstadt, Germany) 및 비탁신(Vitaxin)(Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD)을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 혈관형성 유도자를 직접적으로 길항화하거나 억제함으로써 작용하고 본 발명의 조성물과 조합하여 투여될 수 있는 항혈관형성제의 예는 이로 한정되는 것은 아니지만 안지오자임(Angiozyme)(Ribozyne, Boulder, CO), 항-VEGF 항체(Genentech, S. San Francisco, CA), PTK-787/ZK-225846(Novartis, Basel, Switzerland), SU-101(Sugen, S. San Francisco, CA), SU-5416(Sugen/Pharmacia Upjohn, Bridgewater, NJ), 및 SU-6668(Sugen)를 포함한다. 그 밖의 항혈관형성제는 혈관형성을 간접적으로 억제하도록 작용한다. 본 발명의 조성물과 조합하여 투여될 수 있는 간접적인 혈관형성 억제제의 예는 IM-862(Cytran, Kirkland, WA), 인터페론-알파, IL-12(Roche, Nutley, NJ), 및 펜토산 폴리설페이트(Georgetown University, Washington, DC)를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

<680> 특정 구체예에서, 항혈관형성제와 조합하여 본 발명의 조성물을 사용하는 것은 자가면역질환, 예컨대, 본원에 기재된 자가면역질환을 치료, 예방, 및/또는 완화시키기 위한 것이다.

<681> 특정 구체예에서, 항혈관형성제와 조합하여 본 발명의 조성물을 사용하는 것은 관절염을 치료, 예방, 및/또는 완화시키기 위한 것이다. 또 다른 구체예에서, 항혈관형성제와 조합하여 본 발명의 조성물을 사용하는 것은 류머티스 관절염을 치료, 예방, 및/또는 완화시키기 위한 것이다.

<682> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 혈관형성 단백질, 또는 혈관형성

단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드와 조합하여 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 혈관형성 단백질의 예는 산성 및 염기성 섬유아세포 성장 인자, VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3, 표피성장 인자 알파 및 베타, 혈소판 유도된 내피세포 성장인자, 혈소판 유도된 성장 인자, 종양 괴사인자 알파, 간세포 성장 인자, 인슐린 유사 성장인자, 콜로니 자극인자, 대식세포 콜로니 자극인자, 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자, 및 산화질소 합성효소를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

<683> 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 화학치료제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 용합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 화학치료제는 알킬화제, 예컨대, 질소 머스타드(예를 들어, 메클로르에타민, 시클로포스파미드, 시클로포스파미드 이포스파미드, 멜팔란(L-사르콜린), 및 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(예를 들어, 헥사메틸멜라민 및 티오테파), 알킬 설포네이트(예를 들어, 부설판), 니트로소우레아(예를 들어, 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 세무스틴(메틸-CCNU), 및 스트렙토조신(스트렙토조토신)), 트리아젠(예를 들어, 다카르바진(DTIC; 디메틸트리아제노이미다졸카르복사미드)), 폴산 유사체(예를 들어, 메토틱세이트(아메토프테린)), 피리미딘 유사체(예를 들어, 플루오로우라실(5-플루오로우라실; 5-FU), 플록스우리딘(플루오로데옥시우리딘; FudR), 및 사이타라빈(시토신 아라비노시드)), 퓨린 유사체 및 이와 관련된 억제제(예를 들어, 머캅토푸린(6-머캅토푸린; 6-MP), 티오구아닌(6-티오구아닌; TG), 및 펜토스타틴(2'-데옥시코포르마이신)), 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴(VLB, 빈블라스틴 설페이트)) 및 빈크리스틴(빈크리스틴 설페이트)), 에피도도필로톡신(예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신(다우노마이신; 루비도마이신), 독소루비신, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신), 및 미토마이신(미토마이신 C), 효소(예를 들어, L-아스파라기나제), 생물학적 반응 개질제(예를 들어, 인터페론-알파 및 인터페론-알파-2b), 백금 배위 화합물(예를 들어, 시스플라틴(시스-DDP) 및 카르보플라틴), 안트라센디온(미복산트론), 치환된 우레아(예를 들어, 히드록시우레아), 메틸히드라진 유도체(예를 들어, 프로카르바진(N-메틸히드라진; MIH), 아드레코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손), 프로게스틴(예를 들어, 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론, 메트록시프로게스테론 아세테이트, 및 메게스트롤 아세테이트), 에스트로겐(예를 들어, 디에틸stil베스트롤(DES), 디에틸stil레스트롤 디포스페이트, 에스트라디올, 및 에티닐 에스트라디올), 항에스트로겐(예를 들어, 타목시펜), 안드로겐(테스토스테론 프로피리오네이트, 및 플루옥시메스테론), 항안드로겐(예를 들어, 플루타미드), 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체(예를 들어, 류프롤리드), 그 밖의 호르몬 및 호르몬 유사체(예를 들어, 메틸테스토스테론, 에스트라무스틴, 에스트라무스틴 포스페이트 소듐, 클로로트리아니센, 및 테스토라톤), 및 그 밖의 물질(예를 들어, 디카르바진, 글루탐산 및 미토탄)을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

<684> 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 다음 약물과 조합하여 투여된다: 인플릭시맵(infliximab)(또한, 레미케이드TM(remicadeTM)으로 공지됨, Centocor, Inc.), 트로케이드(Trocade)(Roche, RO-32-3555), 레플루노미드(Leflunomide)(또한, 아라바TM(AravaTM)로도 공지됨, Hoechst Marion Roussel), 키네레트TM(KineretTM)(아나킨라(Anakinra)로 공지된 IL-I 수용체 길항제, Amgen, Inc.).

<685> 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 CHOP(시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니손)과 함께, 또는 CHOP 성분 중 하나 이상의 조합과 조합하여 투여된다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 항-CD20 항체, 사람 모노클로날 항-CD20 항체와 조합하여 투여된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 항-CD20 항체 및 CHOP, 항-CD20 항체 및 CHOP 성분중 하나 이상의 어떠한 조합, 특히, 시클로포스파미드 및/또는 프레드니손과 조합하여 투여된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 리툭시맵(Rituximab)과 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 리툭시맵 및 CHOP, 또는 리툭시맵 및 CHOP 성분 중 하나 이상의 어떠한 조합, 특히 시클로포스파미드 및/또는 프레드니손과 조합하여 투여된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 토시투모맵(tositumomab)과 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 토시투모맵 및 CHOP, 또는 토시투모맵 및 CHPO 성분 중 하나 이상의 조합, 특히, 시클로포스파미드 및/또는 프레드니손과 조합하여 투여된다. 항-CD20 항체는 방사성동위원소, 독신 또는 세포독성 전구약물과 임의적으로 연관될 수 있다.

<686> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 ZevalinTM과 조합하여 투여된다. 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 ZevalinTM 및 CHOP, 또는 ZevalinTM 및 CHPO 성분중 하나 이상의 조합, 특히, 시클로포스파미드 및/또는 프레드니손과 조합하여 투여된다. ZevalinTM은 하나 이상의 방사성동위원소와 연관될 수 있다. 특히 바람직한 방사성동위원소는 ⁹⁰Y 및 ¹¹¹In이다.

- <687> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 시토킨과 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 시토킨은 IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, 항-CD40, CD40L, IFN-감마 및 TNF-알파를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 IL-1 알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, 및 IL-21을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 어떠한 인터루킨과 함께 투여될 수 있다.
- <688> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 TNF 패밀리의 구성원과 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 TNF, TNF-관련된 또는 TNF-유사 분자는 TNF-알파의 가용형, 림포톡신-알파(LT-알파, TNF-베타로도 공지됨), LT-베타(복합 헤테로 트리머 LT알파2-베타에서 발견됨), OPG, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-감마(국제공개 WO96/14328호), AIM-I(국제공개 WO 97/33899호), 엔도킨-알파(국제공개 WO 98/07880호), OPG, 및 뉴트로킨-알파(국제공개 WO 98/18921호, OX40, 및 신경성장 인자(NGF), 및 Fas, CD30, CD27, CD40 및 4-1BB의 가용형, TR2(국제공개 WO 96/34095호), DR3(국제공개 WO 97/33904호), DR4(국제공개 WO 98/32856호), TR5(국제공개 WO 98/30693호), TRANK, TR9(국제공개 WO 98/56892호), TR10(국제공개 WO 98/54202호), 312C2(국제공개 WO 98/06842호), 및 TR12, 및 가용형 CD154, CD70, 및 CD153을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.
- <689> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 혈관신생 단백질과 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 혈관 신생 단백질로는, 유럽 특허 EP-399816에 기술된 바와 같은 글리오마 유래된 성장 인자(Glioma Derived Growth Factor(GDGF)); 유럽 특허 EP-682110에 기술된 바와 같은 혈소판 유래된 성장 인자-A(PDGF-A); 유럽 특허 EP-282317에 기술된 바와 같은 혈소판 유래된 성장 인자-B(PDGF-B); 국제 특허 출원 공개 WO 92/06194에 기술된 바와 같은 태반 성장 인자(PIGF); 문헌(Hauser et al., Growth Factors, 4:259-268(1993))에 기술된 바와 같은 태반 성장 인자-2(PIGF-2); 국제 특허 출원 공개 WO 90/13649에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자; 유럽 특허 EP-506477에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자-A(VEGF-A); 국제 특허 출원 공개 WO 96/39515에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자-2(VEGF-2); 혈관 내피 성장 인자 B(VEGF-3); 국제 특허 출원 공개 WO 96/26736에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자 B-186(VEGF-B186); 국제 특허 출원 공개 WO 98/02543에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자-D(VEGF-D); 국제 특허 출원 공개 WO 98/07832에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자-D(VEGF-D); 및 독일 특허 DE 19639601에 기술된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자-E(VEGF-E)가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 언급된 문헌은 그 전체가 본원에서 참고 문헌으로 인용된다.
- <690> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 섬유아세포 성장 인자와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 섬유아세포 성장 인자로는 FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, 및 FGF-15가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- <691> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 조혈 성장 인자와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 조혈 성장 인자로는, 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자(GM-CSF)(사르그라마스틴(sargramostim), LEUKINETM, PROKINETM), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)(필그라스틴(filgrastim), NEUPOGENTM), 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF, CSF-1), 에리트로포이에틴(erythropoietin)(에포에틴 알파(epoetin alfa), EPOGENTM, PROCITTM), 줄기 세포 인자(SCF, c-키트 리간드, 스틸(steel) 인자), 거핵구 콜로니 자극 인자, PIXY321 (GMCSF/IL-3 융합 단백질), 인터루킨, 특히 IL-1 내지 IL-12 중 하나 이상, 인터페론-감마 또는 트롬보포이에틴(thrombopoietin)이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- <692> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 아드레날린 차단제, 예를 들어, 아세부톨(acebutolol), 아테놀롤(atenolol), 베타솔롤(betaxolol), 비소프롤롤(bisoprolol), 카르테올롤(carateolol), 라베탈롤(labetalol), 메토프롤롤(metoprolol), 나돌롤(nadolol), 옥스프레놀롤(oxprenolol), 펜부톨롤(penbutolol), 핀돌롤(pindolol), 프로프라놀롤(propranolol), 소탈롤(sotalol) 및 티몰롤(timolol)과 조합하여 투여된다.
- <693> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 항부정맥 약물(예컨대, 아테노

신(adenosine), 아미도아론(amidoarone), 브레틸륨(bretylium), 디지탈리스(digitalis), 디곡신(digoxin), 디기톡신(digitoxin), 딜리아젠펙(diliazem), 디소피라미드(disopyramide), 에스몰롤(esmolol), 플레카이니드(flecainide), 리도카인(lidocaine), 맥실레틴(mexiletine), 모리시진(moricizine), 페니토인(phenytoin), 프로카인아미드(procainamide), N-아세틸 프로카인아미드, 프로파페논(propafenone), 프로프라놀롤(propranolol), 퀴니딘(quinidine), 소탈롤(sotalol), 토카이니드(tocainide) 및 베라파밀(verapamil))과 조합하여 투여된다.

<694> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 이뇨제, 예를 들어, 탄산 탈수효소 억제제(예컨대, 아세타졸아미드, 디클로르펜아미드 및 메타졸아미드), 삼투 이뇨제(예컨대, 글리세린, 이소소르비드, 만니톨 및 우레아), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 공수송을 억제하는 이뇨제 (예컨대, 푸로세미드(furosemide), 부메타니드(bumetanide), 아조세미드(azosemide), 피레타니드(piretanide), 트리파미드(tripamide), 에타크린산(ethacrynic acid), 무졸리민(muzolimine), 및 토르세미드(torsemide)), 티아지드 및 티아지드 유사 이뇨제(예컨대, 벤드로플루메티아지드, 벤즈티아지드, 클로로티아지드, 히드로클로로티아지드, 히드로플루메티아지드, 메티클로티아지드, 폴리티아지드, 트리크로메티아지드, 클로르탈리돈(chlorthalidone), 인다파미드(indapamide), 메톨라존(metolazone), 및 퀴에타존(quinethazone)), 포타슘 보존성 이뇨제(예컨대, 아밀로리드(amiloride) 및 트리암테렌(triamterene)), 및 미네랄코르티코이드 수용체 길항제(예컨대, 스피로놀락톤(spironolactone), 칸레논(canrenone) 및 포타슘 칸레노에이트(potassium canrenoate))와 조합하여 투여된다.

<695> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 내분비 및/또는 호르몬 불균형 질환의 치료제와 조합하여 투여된다. 내분비 및/또는 호르몬 불균형 질환 치료제로는 ^{127}I , ^{131}I 및 ^{123}I 와 같은 요오드의 방사선 동위원소; 재조합 성장 호르몬, 예컨대 HUMATROPETM(재조합 소마트로핀(recombinant somatotropin)); 성장 호르몬 유사체, 예컨대 PROTROPINTM(소마트렘(somatrem)); 도파민 길항제, 예컨대 PARLODELTM(브로모크립틴(bromocriptine)); 소마토스타틴 유사체, 예컨대 SANDOSTATINTM(옥트레오티드(octreotide)); 성선자극호르몬(gonadotropin) 제제, 예컨대, PREGNYLTM, A.P.L.TM 및 PROFASPTM(융모성 성선자극호르몬(CG)), PERGONALTM(메노트로핀스(menotropins)), 및 METRODINTM(우로폴리트로핀(urofollitropin) (uFSH)); 합성 사람 성선자극호르몬 방출 호르몬 제제, 예컨대 FACTRELTM 및 LUTREPULSETM(고나도렐린 히드로클로라이드(gonadorelin hydrochloride)); 합성 성선자극호르몬 길항제, 예컨대, LUPRONTM(류프롤리드 아세테이트), SUPPRELINTM(히스트렐린 아세테이트(histrelin acetate)), SYNARELTM(나파렐린 아세테이트(nafarelin acetate)), 및 ZOLADEXTM(고세렐린 아세테이트(goserelin acetate)); 갑상선자극호르몬 방출 호르몬의 합성 제제, 예컨대, RELEFACT TRHTM 및 THYPINONETM(프로티렐린(protirelin)); 재조합 사람 TSH, 예컨대 THYROGENTM; 갑상선 호르몬의 천연 이성질체의 나트륨 염의 합성 제제, 예컨대, L-T₄TM, SYNTHROIDTM 및 LEVOTHROIDTM(레보티록신 나트륨(levothyroxine sodium)), L-T₃TM, CYTOMELTM 및 TRIOSTATTM(리오티로인 나트륨(liothyroine sodium)), 및 THYROLARTM(리오트릭스(liotrix)); 항갑상선 화합물, 예컨대 6-n-프로필티오우라실(프로필티오우라실), 1-메틸-2-머캅토이미다졸 및 TAPAZOLETM(메티마졸(methimazole)), NEO-MERCAZOLETM(카르비마졸(carbimazole)); 베타-아드레날린 수용체 길항제, 예컨대, 프로프라놀롤 및 에스몰롤; Ca^{2+} 채널 차단제; 텍사메타손 및 요오드화된 방사선 콘트라스트제(contrast agent), 예컨대 TELEPAQUETM(이오파노익산) 및 ORAGRAFINTM(나트륨 이포데이트)가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<696> 내분비 및/또는 호르몬 불균형 질환의 추가 치료제로는 에스트로겐 또는 진주게이트된 에스테르젠, 예컨대, ESTRACETM(에스트라디올), ESTINYLTM(에티닐 에스트라디올), PREMARINTM, ESTRATABTM, ORTHO-ESTTM, OGENTM 및 에스트로피페이트(에스트론), ESTROVISTM(퀸에스트론), ESTRADERMTM(에스트라디올), DELESTROGENTM 및 VALERGENTM(에스트라디올 발레레이트), DEPO-ESTRADIOL CYPIONATETM 및 ESTROJECT LATM(에스트라디올 시피오네이트); 항에스트로겐, 예컨대 NOLVADEXTM(타목시펜(tamoxifen)), SEROPHENETM 및 CLOMIDTM(클로미펜(clomiphene)); 프로게스테론, 예컨대 DURALUTINTM(히드록시프로게스테론 카프로에이트), MPATM 및 DEPO-PROVERATM(메드록시프로게스테론 아

세테이트), PROVERA™ 및 CYCRIN™ (MPA), MEGACE™ (메게스트롤 아세테이트), NORLUTIN™ (노레틴드론), 및 NORLUTATE™ 및 AYGESTIN™ (노레틴드론 아세테이트); 프로게스테론 임플란트, 예컨대 NORPLANT SYSTEM™ (노메게스트렐의 피하 임플란트); 항프로게스틴, 예컨대 RU 486™ (미페프리스톤(mifepristone)); 호르몬 피임약, 예컨대 ENOVID™ (노르에티노드렐(norethynodrel) + 메스트랄놀(mestranol)), PROGESTASERT™ (프로게스테론을 방출하는 자궁내 장치), LOESTRIN™, BREVICON™, MODICON™, GENORA™, NELONA™, NORINYL™, OVACON-35™ 및 OVACON-50™ (에티닐 에스트라디올/노르에틴드론), LEVLEN™, NORDETTE™, TRI-LEVLEN™ 및 TRIPHASIL-21™ (에티닐 에스트라디올/레보노르게스트렐(levonorgestrel)) LO/OVRAL™ 및 OVRAL™ (에티닐 에스트라디올/노르게스트렐), DEMULEN™ (에티닐 에스트라디올/에티노디올 디아세테이트), NORINYL™, ORTHO-NOVUM™, NORETHIN™, GENORA™, 및 NELOVA™ (노르에틴드론/메스트랄놀), DESOGEN™ 및 ORTHO-CEPT™ (에티닐 에스트라디올/데소게스트렐(desogestrel)), ORTHO-CYCLEN™ 및 ORTHO-TRICYCLEN™ (에티닐 에스트라디올/노르게스티메이트), MICRONOR™ 및 NOR-QD™ (노르에틴드론(norethindrone)), 및 OVRETTE™ (노르게스트렐)이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<697>

내분비 및/또는 호르몬 불균형 질환의 추가 치료제로는 테스토스테론 에스테론, 예컨대 메테놀론 아세테이트 및 테스토스테론 운데카노에이트; 비경구 및 경구 안드로겐, 예컨대, TESTOJECT-50™ (테스토스테론), TESTEX™ (테스토스테론 프로피오네이트), DELATESTYL™ (테스토스테론 에난테이트), DEPO-TESTOSTERONE™ (테스토스테론 시피오네이트), DANOCRINE™ (다나졸), HALOTESTIN™ (플루옥시메스테론), ORETON METHYL™, TESTRED™ 및 VIRILON™ (메틸 테스토스테론), 및 OXANDRIN™ (옥산드로론); 테스토스테론 경피 시스템, 예컨대 TESTODERM™; 안드로겐 수용체 길항제 및 5-알파-환원효소 억제제, 예컨대 ANDROCUR™ (시프로테론 아세테이트), EULEXIN™ (플루타미드), 및 PROSCAR™ (피나스테리드(finasteride)); 부신피질자극 호르몬 제제, 예컨대 CORTROSYN™ (코신티로핀(cosyntropin)); 부신피질 스테로이드 및 이들의 합성 유사체, 예컨대 ACLOVATE™ (알클로메타손 디프로피오네이트(alclometasone dipropionate)), CYCLOCORT™ (암시노니드(aminonide)), BECLOVENT™ 및 VANCERIL™ (베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate)), CELESTONE™ (베타메타손(betamethasone), BENISON™ 및 UTICORT™ (베타메타손 벤조에이트), DIPROSONE™ (베타메타손 디프로피오네이트), CELESTONE PHOSPHATE™ (베타메타손 소듐 포스페이트), CELESTONE SOLUSPAN™ (베타메타손 소듐 포스페이트 및 아세테이트), BETA-VAL™ 및 VALISON™ (베타메타손 발레레이트), TEMOVATE™ (클로베타솔 프로피오네이트(clobetasol propionate)), CLODERM™ (클로코르톨론 피발레이트(clocortolone pivalate)), CORTEF™ 및 HYDROCORTONE™ (코르티솔(하이드로코르티손)(cortisol(hydrocortisone))), HYDROCORTONE ACETATE™ (코르티솔(하이드로코르티손)아세테이트), LOCOID™ (코르티솔(하이드로코르티손)부티레이트), HYDROCORTONE PHOSPHATE™ (코르티솔(하이드로코르티손) 소듐 포스페이트), A-HYDROCORT™ 및 SOLU CORTEF™ (코르티솔(하이드로코르티손) 소듐 석시네이트), WESTCORT™ (코르티솔(하이드로코르티손) 발레레이트), CORTISONE ACETATE™ (cortisone acetate)), DESOWEN™ 및 TRIDESILON™ (데소니드(desonide)), TOPICORT™ (데속시메타손(desoximetasone)), DECADRON™ (덱사메타손(dexamethasone)), DECADRON LA™ (덱사메타손 아세테이트), DECADRON PHOSPHATE™ 및 HEXADROL PHOSPHATE™ (덱사메타손 소듐 포스페이트), FLORONE™ 및 MAXIFLOR™ (디플로라손 디아세테이트(diflorasone diacetate)), FLORINEF ACETATE™ (플루드로코르티손 아세테이트), AEROBID™ 및 NASALIDE™ (플루니솔리드(flunisolide), FLUONID™ 및 SYNALAR™ (플루오시놀론 아세토니드(fluocinolone acetonide)), LIDEX™ (플루오시노니드(fluocinonide)), FLUOR-OP™ 및 FML™ (플루오로메톨론(fluorometholone)), CORDRAN™ (플루란드레놀리드(flurandrenolide)), HALOG™ (할시노니드(halcinonide)), HMS LIZUIFILM™ (메드리손(medrysone)), MEDROL™ (메틸프레드니솔론(methylprednisolone)), DEPO-MEDROL™ 및 MEDROL ACETATE™ (메틸프레드니손 아세테이트(methylprednisone acetate)), A-METHAPRED™ 및

SOLUMEDROLTM (메틸프레드니솔론 소듐 석시네이트), ELOCONTM (모메타손 푸로에이트(mometasone furoate)), HALDRONETM (파라메타손 아세테이트(paramethasone acetate)), DELTA-CORTEFTM (프레드니솔론(prednisolone)), ECONOPREDTM (프레드니솔론 아세테이트), HYDELTRASOLTM (프레드니솔론 소듐 포스페이트), HYDELTRA-T.B.ATM (프레드니솔론 테부테이트), DELTASONETM (프레드니손(prednisone)), ARISTOCORTTM 및 KENACORTTM (트리암시놀론(triamcinolone)), KENALOGTM (트리암시놀론 아세토니드(triamcinolone acetonide)), ARISTOCORTTM 및 KENACORT DIACETATETM (트리암시놀론 디아세테이트), 및 ARISTOSPANTM (트리암시놀론 헥사아세토니드); 부신피질 스테로이드의 생합성 및 작용 억제제, 예컨대 CYTADRENTM (아미노글루테티미드(aminoglutethimide)), NIZORALTM (케토콘아졸(ketoconazole)), MODRASTANETM (트릴로스탄(trilostane)), 및 METOPIRONETM (메티라폰(metyrapone)); 소, 돼지 또는 사람 인슐린 또는 이의 혼합물; 인슐린 유사체; 재조합 사람 인슐린, 예컨대 HUMULINTM 및 NOVOLINTM; 경구용 혈당강하제, 예컨대 ORAMIDETM 및 ORINASETM (톨루부타미드(tolbutamide)), DIABINESETM (클로르프로파미드(chlorpropamide)), TOLAMIDETM 및 TOLINASETM (톨라자미드(tolazamide)), DYMELORTM (아세트헥사미드(acetohexamide), 글리벤클라미드(glibenclamide)), MICRONASETM, DIBETATM 및 GLYNASETM (글리부리드(glyburide)), GLUCOTROLTM (글리피지드(glipizide)), 및 DIAMICRONTM (글리클라지드(gliclazide)), GLUCOPHAGETM (메트포르민(metformin)), 시글리타존(ciglitazone), 피오글리타존(pioglitazone), 및 알파-글리코시다제 억제제; 소 또는 돼지 글루카곤; 소마토스타틴, 예컨대 SANDOSTATINTM (옥트레오티드(octreotide)); 및 디아зок시드(diazoxide), 예컨대 PROGLYCEMTM (디아족시드가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<698> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 자궁 운동성 질환 치료제와 조합하여 투여된다. 자궁 운동성 질환 치료제로는, 에스트로겐 약물, 예컨대 컨쥬게이트된 에스트로겐(예를 들어, PREMARIN[®] 및 ESTRATAB[®]), 에스트라디올(예를 들어, CLIMARA[®] 및 ALORA[®]), 에스트로피페이트, 및 클로로트리아니센(chlorotrianisene); 프로게스틴 약물(예를 들어, AMEN[®] (메트록시프로게스테론(medroxyprogesterone), MICRONOR[®] (노르에티드론 아세테이트(norethidrone acetate)), PROMETRIUM[®] 프로게스테론 및 메게스트롤 아세테이트); 및 에스트로겐/프로게스테론 병합 치료제, 예컨대 컨쥬게이트된 에스트로겐/메트록시프로게스테론(예를 들어, PREMPROTM 및 PREMPHASE[®]) 및 노르에티드론 아세테이트/에티닐 에스트라디올(예를 들어, FEMHRTTM)가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<699> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 철분 결핍증 및 저색소성 빈혈을 치료하는 데 효과적인 약물과 함께 투여되며, 이러한 약물로는 황산 제1철(황산철, FEOSOLTM), 푸마르산철(예를 들어, FEOSTATTM), 글루콘산철(예를 들어, FERGONTM), 폴라사카라이드-철 착물(예를 들어, NIFEREXTM), 철 텍스트란 주사물(예를 들어, INFEDTM), 황산구리, 피록시딘(pyroxidine), 리보플라빈(riboflavin), 비타민 B₁₂, 시아노코발라민 주사물(예를 들어, REDISOLTM, RUBRAMIN PCTM), 히드록소코발라민, 폴산(예를 들어, FOLVITETM), 류코보린(폴린산, 5-CHOH4PteGlu, 시트로보룸(citrovorum) 인자) 또는 WELLCOVORIN (류코보린의 칼슘 염), 트랜스페린(transferrin) 또는 페리틴(ferritin)이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<700> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 정신과 질환을 치료하는 데 사용되는 작용제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 정신과 약물로는, 항정신병 약물(예를 들어, 클로르프로마진(chlorpromazine), 클로프프로티센(chlorprothixene), 클로자핀(clozapine), 플루페나진(fluphenazine), 할로페리돌(haloperidol), 록사핀(loxapine), 메소르다진(mesoridazine), 몰린돈(molindone), 올란자핀(olanzapine), 페르페나진(perphenazine), 피모지드(pimozide), 쿠에티아핀(quetiapine), 리스페리돈(risperidone), 티오리다진(thioridazine), 티오티센(thiothixene), 트리플루오페라진(trifluoperazine), 및 트리플루프로마진(triflupromazine)), 항조증 약물(예를 들어, 카르바마제핀(carbamazepine), 디발프로엑스 소듐(divalproex sodium), 리튬 카르보네이트, 및 리튬 시트레이트)), 항우울제(예를 들어, 아미트립틸린(amitriptyline), 아목사핀(amoxapine), 부프로피온(bupropion), 시탈로프람(citalopram), 클로미프라민(clomipramine), 데시프라민

(desipramine), 독세핀(doxepin), 플루복사민(flvoxamine), 플루옥세틴(fluxetine), 이미프라민(imipramine), 이소카르복사지드(isocarboxazid), 마프로틸린(maprotiline), 미르타자핀(mirtazapine), 네파조돈(nefazodone), 노르트립틸린(nortriptyline), 파록세틴(paroxetine), 페넬진(henelzine), 프로트립틸린(protriptyline), 세르트랄린(sertraline), 트라닐시프로민(tranlycypromine), 트라조돈(trazodone), 트리미프라민(trimipramine), 및 벤라팍신(venlafaxine)), 항불안제(예를 들어, 알프라졸람(alprazolam), 부스피론(buspiron), 클로르디아제폭시드(chlordiazepoxide), 클로라제페이트(clorazepate), 디아제팜(diazepam), 할라제팜(halazepam), 로라제팜(lorazepam), 옥사제팜(oxazepam), 및 프라제팜(prazepam)), 및 자극제(예를 들어, d-암페타민(d-amphetamine), 메틸페니데이트(methylphenidate), 및 페몰린(pemoline))이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<701> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 신경계 질환을 치료하는 데 사용된 작용제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 신경작용제로는 항간질제(예를 들어, 카르바마제핀(carbamazepine), 클로나제팜(clonazepam), 에토석시미드(ethosuximide), 페노바르비탈(phenobarbital), 페니토인(phenytoin), 프리미돈(primidone), 발프로산(valproic acid), 디발프로엑스 소듐(divalproex sodium), 펠바메이트(felbamate), 가바펜틴(gabapentin), 라모트리진(lamotrigine), 레벤티라세탐(levetiracetam), 옥스카르바제핀(oxcarbazepine), 티아가빈(tiagabine), 토피라메이트(topiramate), 조니사미드(zonisamide), 디아제팜(diazepam), 로라제팜(lorazepam), 및 클로나제팜(clonazepam)), 항파킨슨씨병 약물(예를 들어, 레보도파/카르비도파(levodopa/carbidopa), 셀레길린(selegiline), 아만티딘(amantidine), 브로모크립틴(bromocriptine), 페르골리드(pergolide), 로피니롤(ropinirole), 프라미펙솔(pramipexole), 벤즈트로핀(benzotropine); 비페리덴(biperiden); 에토프로파진(ethopropazine); 프로시클리딘(procyclidine); 트리헥시페니딜(trihexyphenidyl), 톨카폰(tolcapone)), 및 ALS 치료약(예를 들어, 릴루졸(riluzole))이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<702> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 혈관확장제 및/또는 칼슘 채널 차단제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 혈관확장제로는, 안지오텐신 전환 효소(Angiotensin Converting Enzyme (ACE)) 억제제(예를 들어, 파파베린(papaverine), 이소수프린(isoxsuprine), 베나제프릴(benazepril), 카프토프릴(captopril), 실라자프릴(cilazapril), 에날라프릴(enalapril), 에날라프릴레이트(enalaprilat), 포시노프릴(fosinopril), 리시노프릴(lisinopril), 모엑시프릴(moexipril), 페린도프릴(perindopril), 퀴나프릴(quinapril), 라미프릴(ramipril), 스피라프릴(spirapril), 트라돌라프릴(trandolapril), 및 닐리드린(nylidrin)), 및 질산염(예를 들어, 이소소르비드 디니트레이트(isosorbide dinitrate), 이소소르비드 모노니트레이트(isosorbide mononitrate), 및 니트로글리세린(nitroglycerin))이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 칼슘 채널 차단제의 예로는 아로디핀(amlodipine), 베프리딜(bepridil), 딜티아젠펜(diltiazem), 펠로디핀(felodipine), 플루아리진(flunarizine), 이스라디핀(isradipine), 니카르디핀(nicardipine), 니페디핀(nifedipine), 니모디핀(nimodipine), 및 베라파밀(verapamil)이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<703> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 위장관 질환 치료제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 위장관 질환 치료제로는, H₂ 히스타민 수용체 길항제(예를 들어, TAGAMETTM(시메티딘(cimetidine)), ZANTACTM(라니티딘(ranitidine)), PEPCIDTM(파모티딘(famotidine)), 및 AXIDTM(니자티딘(nizatidine))); H⁺, K⁺ ATPase의 억제제(예를 들어, PREVACIDTM(란소프라졸(lansoprazole)) 및 PRILOSECTM(오메프라졸(omeprazole))); 비스무트 화합물(예를 들어, PEPTO-BISMOLTM(비스무트 서브살리실레이트(subsalsicylate)) 및 DE-NOLTM(비스무트 서브시트레이트(subcitrate))); 여러 제산제; 수크랄페이트(sucralfate); 프로스타글란딘 유사체(prostaglandin analogs)(예를 들어, CYTOTECTM(미소프로스톨(misoprostol))); 무스카린 콜린성 길항제; 하제(예를 들어, 계면활성 하제, 자극성 하제, 염수 및 삼투성 하제); 지사제(예를 들어, LOMOTILTM(디페녹실레이트), MOTOFENTM(디페녹신(diphenoxin)), 및 IMODIUMTM(로페라미드 히드로클로라이드)), 소마토스타틴의 합성 유사체, 예컨대 SANDOSTATINTM(옥트레오티드(octreotide)), 진토제(예를 들어, ZOFRANTM(온단세트론), KYTRILTM(그란이세트론 히드로클로라이드), 트로피세트론(tropisetron), 둘라세트론(dolasetron), 메토클로프라미드(metoclopramide),

클로르프로마진(chlorpromazine), 페르페나진(perphenazine), 프로클로르페라진(prochlorperazine), 프로메타진(promethazine), 티에틸페라진(thiethylperazine), 트리플루프로마진(triflupromazine), 돔페리돈(domperidone), 할로페리돌(haloperidol), 드로페리돌(droperidol), 트리메토벤즈아미드(trimethobenzamide), 텍사메타손(dexamethasone), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 드로나비놀(dronabinol), 및 나빌론(nabilone)); D2 길항제(예를 들어, 메토클로프라미드(metoclopramide), 트리메토벤즈아미드(trimethobenzamide) 및 클로르프로마진(chlorpromazine)); 담즙 염; 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid); 우르소데옥시콜산(ursodeoxycholic acid); 및 판크레아틴 효소 제제, 예컨대 판크레아틴(pancreatin) 및 판클레리파제(pancrelipase)가 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

<704> 추가의 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 그 밖의 치료 또는 예방 섭생, 예를 들어 방사선 치료와 조합하여 투여된다.

<705> 또한, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 포함하는 약제 조성물의 하나 이상의 성분으로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 의약 팩 또는 키트를 제공한다. 임의적으로 이러한 용기에는 사람 투여를 위한 제조, 용도 또는 판매 기관에 의한 승인을 반영하는, 약품 또는 생물학적 제품의 제조, 용도 또는 판매를 규정하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 안내문이 동반될 수 있다.

<706> 유전자 치료

<707> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 작제물은 알부민 융합 단백질의 치료 유효 용량을 전달하는 유전자 치료 프로토콜의 일부로서 사용될 수 있다. 핵산을 세포에 생체내 도입하기 위한 바람직한 방법은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터를 사용하는 것이다. 바이러스 벡터에 의한 세포의 감염은 높은 비율의 표적화된 세포가 핵산을 수용할 수 있다는 이점을 갖는다. 추가로, 바이러스 벡터 내에, 예를 들어 바이러스 벡터에 함유된 cDNA에 의해 엔코딩된 분자는 바이러스 벡터 핵산이 도입된 세포에서 효과적으로 발현된다.

<708> 레트로바이러스 벡터 및 아데노 부속 바이러스 벡터는 생체내 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 외인성 핵산 분자의 운반을 위한 재조합 유전자 전달계로서 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 핵산을 세포와 효과적으로 전달하고, 전달된 핵산은 숙주의 염색체 DNA에 안정하게 통합된다. 복제 결핍 레트로바이러스만을 생성하는 특화된 세포주("패키징 세포"로 명명됨)의 개발은 유전 치료를 위해 레트로바이러스의 유용성을 증가시켰으며, 결핍 레트로바이러스는 유전 치료 목적을 위한 유전자 전달에 사용되도록 특화된다[참조예: Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:27-31]. 복제 결핍 레트로바이러스는 표준 기법에 의해 헬퍼 바이러스를 사용함으로써 표적 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있는 비리온(virion)으로 패키징될 수 있다. 재조합 레트로바이러스를 생성하고, 이러한 바이러스로 시험관내 또는 생체내 세포를 감염시키기 위한 프로토콜은 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14) 및 그 밖의 표준 실험 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다.

<709> 본 발명에 유용한 또 다른 바이러스 유전자 전달계는 아데노바이러스 유래된 벡터를 사용한다. 아데노바이러스의 계놈은 대상이 되는 유전자 생성물을 엔코딩하고 발현시키나, 정상적인 용해 바이러스 수명 사이클에서의 복제능에 대해서는 불활성화되도록 조작될 수 있다[참조예: Berkner et al., *BioTechniques* 6:616(1988); Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434(1991); and Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155(1992)]. 아데노바이러스 스트레인 Ad 타입 5 d1324로부터 또는 다른 아데노바이러스 스트레인으로 부터 유래된 적합한 아데노바이러스 벡터(예를 들어, Ad2, Ad3, Adz 등)가 당업자들에게 공지되어 있다. 재조합 아데노바이러스는 비분화 세포를 감염시킬 수 있고, 상피 세포를 포함하는 광범위 세포 타입을 감염시키는 데 사용될 수 있다는 점에서 특정 환경에서 유리할 수 있다[참조: 상기 인용된 Rosenfeld et al., (1992)]. 추가로, 바이러스 입자는 정제 및 농축에 대해 비교적 안정하고 순응적이며, 상기와 같이 감염 스펙트럼에 영향을 받도록 개질될 수 있다. 추가로, 도입된 아데노바이러스 DNA(및 그 안에 함유된 외래 DNA)는 숙주 세포의 계놈으로 통합되지 않고 에피솜(episomal)으로 남아 있으므로, 도입된 DNA가 숙주 계놈(예를 들어, 레트로바이러스 DNA)으로 통합되는 상황에서 삽입 돌연변이 유발의 결과로서 발생할 수 있는 잠재적 문제점을 피한다. 또한, 외래 DNA에 대한 아데노바이러스 계놈은 운반 용량은 다른 유전자 전달 벡터에 비해 크다(8킬로염기 이하로)[참조: Berkner et al., cited supra; Haj-Ahmand et al., *J. Virol.* 57:267 (1986)].

<710> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 비바이러스 유전자 전달계는 표적 세포에 의해 대상이 되는 뉴클레오티드 분자의 도입을 위한 세포내 경로에 의존한다. 이러한 타입의 유전자 전달계의 예로는 리포솜 유래계, 폴리-리신 킨 유계이트 및 합성 바이러스 엔벨로프(envelope)가 포함된다. 대표적 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백

질을 엔코딩하는 핵산 분자는 그 표면에 양전하를 지니고(예컨대, 리포펙틴), (임의로) 표적 조직의 세포 표면 항원에 대한 항체로 태그된(tagged) 리포솜에 포획될 수 있다[참조:Mizuno *et al.* (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; PCT 출원 공개 W091/06309호; 일본 특허 출원 1047381호; 및 유럽 특허 공개 EP-A-43075].

<711> 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 유전자에 대한 유전자 전달체는 다수의 방법에 의해 환자에게 도입될 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달체의 약제학적 제제는 예를 들어, 정맥내 주입에 의해 전신 도입될 수 있으며, 표적 세포내 단백질의 특이적 형질도입이 수용체 유전자의 발현을 조절하는 전사 조절 서열 또는 이의 조합으로 인해 유전자 전달 비히클, 세포 타입 또는 조직 타입 발현에 의해 제공된 트랜스펙션의 특이성으로부터 우세하게 일어난다. 다른 구체예에서, 재조합 유전자의 초기 전달은 상당히 편재화된 동물로의 도입으로 보다 제한된다. 예를 들어, 유전자 전달 비히클은 카테테르(참조: 미국 특허 제5,328,470호)에 의해, 또는 정위적 주입(Stereotactic injection)(예를 들어, Chen *et al.* (1994) *PNAS* 91: 3 054-3 05 7)에 의해 도입될 수 있다. 유전자 치료 약제물의 약제학적 제제는 필수적으로 허용되는 희석제 중의 유전자 전달체로 이루어지거나, 유전자 전달 비히클이 삽입된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 일부인 융합 단백질이 재조합 세포, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터로부터 온전하게 생성될 수 있는 경우, 상기 약제학적 제제는 일부인 융합 단백질을 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

<712> 추가적 유전자 치료 방법

<713> 또한, 질환, 질병 및 병태를 치료하거나 예방하는 유전자 치료 방법에 본 발명에 포함된다. 유전자 치료 방법은 핵산(DNA, RNA 및 안티센스 DNA 또는 RNA) 서열을 동물에게 도입하여 본 발명의 일부인 융합 단백질의 발현을 달성하는 것과 관련된다. 이 방법은 프로모터 및 표적 조직에 의한 융합 단백질의 발현에 필요한 그 밖의 유전 요소에 조작에 의해 연결된 본 발명의 일부인 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 필요로 한다. 이러한 유전자 치료 및 전달 기술은 예를 들어, 본원에 참고 문헌으로 인용된 WO 90/11092호에 공지되어 있다.

<714> 따라서, 예를 들어, 환자로부터의 세포는 생체외에서 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 조작에 의해 연결된 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)로 조작될 수 있으며, 이후, 조작된 세포는 본 발명의 융합 단백질로 처리되어야 하는 환자에게 제공된다. 이러한 방법은 당해 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에서 참고 문헌으로 인용되는 문헌(Belldegrun, A., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 207-216(1993); Ferrantini, M. *et al.*, *Cancer Research* 53: 1107-1112(1993); Ferrantini, M. *et al.*, *J. Immunology* 153: 4604-4615(1994); Kaido, T., *et al.*, *Int. J. Cancer* 60: 221-229(1995); Ogura, H., *et al.*, *Cancer Research* 50: 5102-5106(1990); Santodonato, L., *et al.*, *Human Gene Therapy* 7:1-10(1996); Santodonato, L., *et al.*, *Gene Therapy* 4:1246-1255(1997); 및 Zhang, J.-F. *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 3: 31-38(1996))을 참조하라. 한 구체예에서, 조작된 세포는 동맥 세포이다. 동맥 세포는 동맥, 동맥을 둘러싸고 있는 조직으로의 직접 주입을 통해 또는 카테테르 주입을 통해 환자에게 재도입될 수 있다.

<715> 하기에서 보다 자세히 논의되는 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 약제물은 동물의 세포에 주입가능한 물질을 전달하는, 예컨대 조직(심장, 근육, 피부, 폐, 간 등)의 사이질 공간으로 주입하는 임의의 방법에 의해 전달될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 약제물은 약제학적으로 허용되는 액체 또는 수정 담체로 전달될 수 있다.

<716> 한 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 네이키드(naked) 폴리뉴클레오티드로서 전달된다. 용어 "네이키드" 폴리뉴클레오티드, DNA 또는 RNA는 바이러스 서열, 바이러스 분자, 리포솜 포몰레이션, 리포펙틴(lipofectin) 또는 침전화제 등을 포함하는 세포로의 도입을 보조하거나 촉진하거나 용이하게 하는 전달 비히클을 함유하지 않는 서열을 말한다. 그러나, 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 리포솜 포몰레이션으로 전달될 수 있으며, 리포펙틴 포몰레이션 등은 당업자들에게 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 본원에서 참고 문헌으로 인용되는 미국 특허 제5,593,972호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호에 기술되어 있다.

<717> 유전자 치료 방법에 사용되는 폴리뉴클레오티드 벡터 약제물은 바람직하게는 숙주 게놈에 통합되지도 않고, 복제를 허용하는 서열을 함유하지도 않는 약제물이다. 적합한 벡터로는 스트라타진(Stratagene)사로부터 입수할 수 있는 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 파마시아(Pharmacia)사로부터 입수할 수 있는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL; 및 인비트로젠(Invitrogen)사로부터 입수할 수 있는 pEF1/V5, pcDNA3.1, 및 pRc/CMV2이 포함된다. 그 밖의 적합한 벡터는 당업자들에게 자명할 것이다.

<718> 당업자들에게 공지되어 있는 강력한 프로모터가 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 적합한 프로모터로는 아데노바이러스 프로모터, 예컨대, 아데노바이러스 메이저 레이트 프로모터(adenoviral major

late promoter); 이중 프로모터, 예컨대, 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터; 호흡기 합포체 바이러스(RSV) 프로모터; 유도성 프로모터, 예컨대 MMT 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터; 열쇼크 프로모터; 알부민 프로모터; ApoAI 프로모터; 사람 글로빈 프로모터; 바이러스 티미딘 키나제 프로모터, 예컨대, 단순포진 티미딘 키나제 프로모터; 레트로바이러스 LTR; b-악틴 프로모터; 및 사람 성장 호르몬 프로모터가 포함된다. 또한, 프로모터는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적인 단백질 부분에 상응하는 유전자에 대한 천연 프로모터일 수 있다.

<719> 다른 유전자 치료 기술과는 달리, 네이키드 핵산 서열을 표적 세포에 도입하는 것의 주요 이점중 하나는 세포내 폴리뉴클레오티드 합성의 일과성(transitory nature)이다. 연구로부터, 비복제 DNA 서열이 6개월 이하의 기간 동안 목적하는 폴리펩티드를 생성하기 위해 세포에 도입될 수 있는 것으로 나타났다.

<720> 폴리뉴클레오티드 작제물은 근육, 피부, 뇌, 폐, 간, 비장, 골수, 흉선, 심장, 림프, 혈액, 뼈, 연골, 췌장, 신장, 담낭, 위, 장, 고환, 난소, 자궁, 직장, 신경계, 눈, 선(gland), 및 연결 조직을 포함하는 동물내 조직의 간질 공간에 전달될 수 있다. 조직의 사이질 공간은 세포간 유체, 기관 조직의 세망 조직, 관 또는 챔버 벽내 탄성 섬유, 섬유상 조직의 콜라겐 섬유 사이에서 류코폴리사카라이드 매트릭스, 또는 연결 조직 초성 근육 세포 내에서 또는 뼈의 소공에서의 그러한 매트릭스를 포함한다. 순환계의 혈장 및 림프 채널의 림프액에 의해 점유되는 공간의 유사하다. 근육 조직의 사이질 공간으로의 전달은 하기 논의되는 이유로 바람직하다. 상기 작제물은 이들 세포를 포함하는 조직으로의 주입에 의해 용이하게 전달될 수 있다. 상기 작제물은, 전달 및 발현이 전혀 분화되지 않거나 덜 완전히 분화된 세포, 예를 들어, 혈액의 줄기 세포 또는 피부 섬유아세포에서 달성될 수 있기는 하지만, 바람직하게는 분화되는 지속적인 비분열 세포에 전달되고 발현된다. 생체내 근육 세포가 폴리뉴클레오티드의 도입 및 발현능에서 특히 유능하다.

<721> 네이키드 핵산 서열 주입을 위해, DNA 또는 RNA의 효과적인 투여량은 약 0.05mg/kg 체중 내지 약 50mg/kg 체중이다. 바람직하게는, 투여량은 약 0.005mg/kg 내지 약 20mg/kg, 보다 바람직하게는 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg이다. 물론, 당업자들에게 주입되는 조직 부위에 따라 상기 투여량이 달라질 것이라는 것은 자명하다. 핵산 서열의 적합하고 효과적인 투여량은 당업자들에게 용이하게 결정될 수 있으며, 처리되는 상태 및 투여 경로에 의존할 수 있다.

<722> 한 구체예에서, 투여 경로는 조직들의 사이질 공간에 비경구 경로로 주입하는 것이다. 그러나, 예컨대, 특히 폐 또는 기관지 조직, 목 또는 코의 점막으로의 전달을 위한 에어로졸 포플레이션의 흡입과 같은 그 밖의 비경구 경로도 사용될 수 있다. 또한, 네이키드 DNA 작제물은 상기 절차에 사용되는 카테테르에 의한 혈관성형술 동안에 동맥에 전달될 수 있다.

<723> 네이키드 폴리뉴클레오티드는 전달 부위에서의 직접적 니들 주사, 정맥 주사, 국부적(topical) 투여, 카테터 주입, 및 소위 "유전자 건(gene gun)"을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 전달된다. 이러한 전달 방법은 당 분야에 공지되어 있다.

<724> 또한, 작제물은 바이러스 서열, 바이러스 입자, 리포솜 제형, 리포펙틴, 침전제 등과 같은 전달 비히클을 사용하여 전달될 수 있다. 이러한 전달 방법은 당 분야에 공지되어 있다.

<725> 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 작제물은 리포솜 제형에서 복합체화된다. 본 발명에서 사용되는 리포솜 제형은 양이온성 (양으로 하전됨), 음이온성 (음으로 하전됨) 및 중성 제형을 포함한다. 그러나, 양이온 리포솜이 특히 바람직한데, 이는 양이온성 리포솜 및 다가음이온성 핵산 사이에 전하 복합체(charge complex)가 형성될 수 있기 때문이다. 양이온성 리포솜은 작용성 형태의 플라스미드 DNA(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416; 이는 본원에 참조로서 포함됨); mRNA(Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081; 이는 본원에 참조로서 포함됨); 및 정제된 전사 인자 (Debs et al., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192; 이는 본원에 참조로서 포함됨)의 세포내 전달을 매개하는 것으로 밝혀졌다

<726> 양이온성 리포솜은 용이하게 입수할 수 있다. 예를 들어, N[1-2,3-디올레일옥시]프로필]-N,N,N-트리에틸암모늄 (DOTMA) 리포솜이 특히 유용하며, 이는 킵코 비알엘(GIBCO, BRL, Grand Island, N.Y.)로부터 리포펙틴 (Lipofectin)이라는 상표명으로 입수할 수 있다(참조: Felgner et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416; 이는 본원에 참조로서 포함됨). 다른 시판되는 리포솜으로는 트랜스펙타세 (transfectase)(DDAB/DOPE) 및 DOTAP/DOPE(Boehringer)가 있다.

<727> 다른 양이온성 리포솜은 당해 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 입수할 수 있는 물질로부터 제조될 수 있다(DOTAP (1,2-비스(올레오일옥시)-3-(트리메틸암모니오)프로판) 리포솜의 합성에 관한 설명에 대해서는

PCT 공개공보 제WO 90/11092호를 참조하라; 이는 본원에 참조로서 포함됨). DOTMA 리포솜의 제조는 문헌에 설명되어 있다(참조: P. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417; 이는 본원에 참조로서 포함됨). 유사한 방법이 다른 양이온성 지질 물질로부터 리포솜을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

<728> 유사하게, 음이온성 및 중성 리포솜은 예를 들어 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids)(Birmingham, Al a.)로부터 용이하게 입수할 수 있거나, 용이하게 입수할 수 있는 물질을 사용하여 쉽게 제조될 수 있다. 이러한 물질로는 특히 포스파티딜, 콜린, 콜레스테롤, 포스파티딜 에탄올아민, 디올레오일포스파티딜 콜린(DOPC), 디올레오일포스파티딜 글리세롤(DOPG), 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE)이 있다. 또한, 이들 물질은 적절한 비로 DOTMA 및 DOTAP 출발 물질과 혼합될 수 있다. 이들 물질을 사용하여 리포솜을 제조하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

<729> 예를 들어, 시판되는 디올레오일포스파티딜 콜린(DOPC), 디올레오일포스파티딜 글리세롤(DOPG) 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE)은 콜레스테롤을 첨가하거나 첨가하지 않고 통상적인 리포솜을 제조하기 위해 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 DOPG/DOPC 소포는 질소 기체의 스트림하에 각각 50 mg의 DOPG 및 DOPC를 초음파처리 바이알내로 건조시킴으로써 제조될 수 있다. 샘플은 진공 펌프하에서 밤새 정치되고, 다음 날 탈이온수로 수화된다. 그 후, 샘플은, 배쓰(bath)가 15℃에서 순환되며 최대 세팅에서 반전된 컵(배쓰 유형) 프로브가 구비된 히트 시스템즈 모델(Heat Systems model) 350 초음파처리를 사용하여 마개를 씌운 바이알에서 2시간 동안 초음파처리된다. 또한, 음으로 하전된 소포는 다중소포를 생성시키도록 초음파처리 없이 제조될 수 있거나 별개의 크기의 단일층 소포를 생성시키도록 핵공(nucleopore) 막을 통한 압출에 의해 제조될 수 있다. 다른 방법들이 공지되어 있으며, 당업자는 이들 방법을 이용할 수 있다.

<730> 리포솜은 다층 소포(MLV), 작은 단일층 소포(SUV) 또는 커다란 단일층 소포(LUV)를 포함할 수 있으며, SUV가 바람직하다. 다양한 리포솜-핵산 복합체가 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 제조된다(참조: Straubinger et al., Methods of Immunology (1983), 101:512-527; 이는 본원에 참조로서 포함됨). 예를 들어, 핵산을 함유하는 MLV는 유리판의 벽상에 인지질의 박막을 침착시킨 후, 캡슐화시키려는 물질의 용액으로 수화시킴으로써 제조될 수 있다. SUV는 단일층 리포솜의 균질한 집단을 생성시키도록 MLV의 연장된 초음파처리에 의해 제조된다. 포획하려는 물질은 사전 형성된 MLV의 현탁액에 첨가된 후, 초음파처리된다. 양이온성 지질을 함유하는 리포솜을 사용하는 경우, 건조된 지질 막이 적합한 용액, 예를 들어 멸균수 또는 등장 완충 용액, 예를 들어 10 mM Tris/NaCl 중에 재현탁되고, 초음파처리된 후, 사전 형성된 리포솜이 DNA와 직접 혼합된다. 리포솜과 DNA는 양이온성 DNA에 대한 양으로 하전된 리포솜의 결합으로 인해 매우 안정한 복합체를 형성한다. SUV는 작은 핵산 단편과 관련하여 사용된다. LUV는 당 분야에 널리 공지된 다수의 방법에 의해 제조된다. 일반적으로 사용되는 방법은 Ca^{2+} -EDTA 킬레이트화(Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta(1975) 394:483; Wilson et al., Cell 17:77(1979)); 에테르 주사(Deamer, D. and Bangham, A., Biochim. Biophys. Acta 443:629(1976); Ostro et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:836(1977); Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348(1979)); 세정제 투석 (Enoch, H. and Strittmatter, P., Proc. Natl Acad. Sci. USA 76:145(1979)); 및 역상 증발(REV)(Fraley et al., J. Biol. Chem. 255:10431(1980); Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:145(1978); Schaefer-Ridder et al., Science 215:166(1982))를 포함하며, 이들은 본원에 참조로서 포함된다.

<731> 일반적으로, DNA 대 리포솜의 비는 약 10:1 내지 약 1:10 이다. 한 구체예에서, 비는 약 5:1 내지 약 1:5 이다. 또 다른 구체예에서, 비는 약 3:1 내지 약 1:3 이다. 또 다른 구체예에서, 비는 약 1:1 이다.

<732> 미국 특허 제5,676,954호 (본원에 참조로서 포함됨)에는 양이온성 리포솜 담체와 복합체화된 유전 물질을 마우스에 주입하는 것에 관해 보고되어 있다. 미국 특허 제4,897,355호, 제4,946,787호, 제5,049,386호, 제5,459,127호, 제5,589,466호, 제5,693,622호, 제5,580,859호, 제5,703,055호 및 국제 공개공보 제WO 94/9469호 (이들은 본원에 참조로서 포함됨)에는 세포 및 포유류내로 DNA를 트랜스펙션시키는데 사용되는 양이온성 지질이 제공되어 있다. 미국 특허 제5,589,466호, 제5,693,622호, 제5,580,859호, 제5,703,055호 및 국제 공개공보 제WO 94/9469호에는 DNA-양이온성 지질 복합체를 포유류에 전달하기 위한 방법이 제공되어 있다.

<733> 특정 구체예에서, 세포는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 서열을 포함하는 RNA를 함유하는 레트로 바이러스 입자를 사용하여 생체외 또는 생체내에서 공학처리된다. 레트로바이러스 플라스미드 벡터가 유래될 수 있는 레트로바이러스로는 비제한적으로 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney Murine Leukemia Virus), 비장 괴사 바이러스, 로우스 육종 바이러스(Rous sarcoma Virus), 하베이 육종 바이러스(Harvey Sarcoma Virus), 조류 백혈증 바이러스, 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus), 인간 면역결핍 바이러스, 골수

증식 육종 바이러스 및 유방 종양 바이러스가 있다.

- <734> 레트로바이러스 플라스미드 벡터가 패키징 세포주를 형질도입시켜서 프로듀서(producer) 세포주를 형성하기 위해 사용된다. 트랜스팩션될 수 있는 패키징 세포의 예로는 본원에 전체 내용이 참조로서 포함되어 있는 밀러(Miller)의 문헌 [*Human Gene Therapy* 1:5-14 (1990)]에 기재된 PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, 및 DAN 세포주가 있지만, 이들에 제한되지 않는다. 벡터는 당 분야에 공지된 임의의 수단을 통해 패키징 세포를 형질도입시킬 수 있다. 이러한 수단으로는 비제한적으로 일렉트로포레이션, 리포솜의 사용 및 CaPO_4 침전이 있다. 한 가지 대안에서, 레트로바이러스 플라스미드 벡터가 리포솜내로 캡슐화되거나 지질에 커플링된 후, 숙주에 투여될 수 있다.
- <735> 프로듀서 세포주는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자를 생성시킨다. 그 후, 이러한 레트로바이러스 벡터 입자는 시험관내 또는 생체내에서 진행 세포를 형질도입시키기 위해 사용될 수 있다. 형질도입된 진행 세포는 본 발명의 융합 단백질을 발현시킬 것이다.
- <736> 다른 특정 구체예에서, 세포는 아데노바이러스 벡터에 함유된 폴리뉴클레오티드를 사용하여 생체외 또는 생체내에서 공학처리된다. 아데노바이러스는 이것이 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하고 발현하는 동시에 정상적 용균성 바이러스 생활환에서 복제할 수 있는 능력면에서 비활성화되도록 조작될 수 있다. 아데노바이러스 발현은 숙주 세포 염색체내로 바이러스 DNA를 삽입시키지 않고 이루어지며, 이에 따라 삽입 돌연변이에 대한 우려를 완화시킨다. 또한, 아데노바이러스는 수 년간 우수한 안전성 프로파일을 나타내며 살아있는 장용 백신으로서 사용되어 왔다(Schwartz et al. *Am. Rev. Respir. Dis.* 109:233-238 (1974)). 최종적으로, 아데노바이러스 매개성 유전자 전달은 알파-1-항트립신 및 CFTR을 코튼 래트(cotton rat)의 폐로 전달하는 것을 포함하는 다수의 경우에서 입증되었다(Rosenfeld, M. A. et al. (1991) *Science* 252:431-434; Rosenfeld et al., (1992) *Cell* 68:143-155). 또한, 아데노바이러스를 인간 암에서 원인 물질로서 정립하려는 방대한 연구는 한결같이 부정적이었다(Green, M. et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:6606)
- <737> 본 발명에 유용한 적합한 아데노바이러스 벡터는 예를 들어 본원에 참조로서 포함되어 있는 문헌들[Kozarsky and Wilson, *Curr. Opin. Genet. Devel.* 3:499-503(1993); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155(1992); Engelhardt et al., *Human Genet. Ther.* 4:759-769(1993); Yang et al., *Nature Genet.* 7:362-369 (1994); Wilson et al., *Nature* 365:691-692(1993); 및 미국 특허 제5,652,224호]에 기재되어 있다. 예를 들어, 아데노바이러스 벡터 Ad2가 유용하고, 인간 293 세포에서 증식될 수 있다. 이러한 세포는 아데노바이러스의 E1 영역을 함유하고, E1a 및 E1b를 구성적으로 발현시키며, 이는 벡터로부터 결실된 유전자의 생성물을 제공함으로써 결손 아데노바이러스를 보완한다. Ad2 이외에, 그 밖의 다양한 아데노바이러스 (예를 들어, Ad3, Ad5 및 Ad7)가 또한 본 발명에서 유용하다.
- <738> 한 구체예에서, 본 발명에서 사용되는 아데노바이러스는 복제 결핍성이다. 복제 결핍성 아데노바이러스는 감염성 입자를 형성하기 위해 헬퍼 바이러스 및/또는 패키징 세포주의 도움을 필요로 한다. 생성되는 바이러스는 세포를 감염시킬 수 있고, 프로모터에 작동적으로 결합된 관심있는 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있지만, 대부분의 세포에서 복제될 수 없다. 복제 결핍성 아데노바이러스는 유전자 E1a, E1b, E3, E4, E2a, 또는 LI 내지 L5의 전부 또는 일부 중 하나 이상에서 결실될 수 있다.
- <739> 다른 특정 구체예에서, 세포는 아데노-관련 바이러스 (AAV)를 사용하여 생체외 또는 생체내에서 공학처리된다. AAV는 감염성 입자를 생성하기 위해 헬퍼 바이러스를 필요로 하는 천연 결손 바이러스이다(Muzyczka, N., *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.* 158:97(1992)). 또한, 이는 이의 DNA를 비분열 세포내로 삽입시킬 수 있는 몇 안되는 바이러스 중 하나이다. AAV의 300개의 적은 염기쌍을 함유하는 벡터는 패키징되고, 삽입될 수 있지만, 외인성 DNA에 대한 공간은 약 4.5 kb로 제한된다. 이러한 AAV를 생성하고 사용하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다[참조: 미국 특허 제5,139,941호, 제5,173,414호, 제5,354,678호, 제5,436,146호, 제5,474,935호, 제5,478,745호 및 제5,589,377호]
- <740> 예를 들어, 본 발명에 사용되는 적합한 AAV 벡터는 DNA 복제, 캡시드화 및 숙주 세포 삽입을 위해 필요한 모든 서열을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 작제물은 표준 클로닝 방법, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1989)]에서 발견되는 방법을 이용하여 AAV 벡터내로 삽입된다. 그 후, 재조합 AAV 벡터는 리포팩션, 일렉트로포레이션, 칼슘 포스페이트 침전 등을 포함하는 임의의 표준 기술을 이용하여 헬퍼 바이러스로 감염된 패키징 세포내로 트랜스팩션된다. 적합한 헬퍼 바이러스로는 아데노바이러스, 사이토메갈로바이러스, 백시니아 바이러스 또는 포진 바이러스가 있다. 패키징 세포가 트랜스

펙션되고 감염된 경우, 이들은 폴리뉴클레오티드 작제물을 함유하는 감염성 AAV 바이러스 입자를 생성시킨다. 그 후, 이러한 바이러스 입자는 생체외 또는 생체내에서 진핵 세포를 형질도입시키기 위해 사용된다. 형질도입된 세포는 이의 게놈내로 삽입된 폴리뉴클레오티드 작제물을 함유하며, 본 발명의 융합 단백질을 발현시킨다.

<741> 유전자 요법의 또 다른 방법은 상동 재조합에 의해 이중성 조절 영역 및 내인성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩함)을 작동적으로 결합시키는 것을 포함한다(참조: 1997년 6월 24일에 특허된 미국 특허 제5,641,670호; 1996년 9월 26일에 공개된 국제 공개공보 제WO 96/29411호; 1994년 8월 4일에 공개된 국제 공개공보 제WO 94/12650호; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989); 및 Zijlstra et al., Nature 342:435-438(1989); 이들은 본원에 참조로서 포함됨). 이러한 방법은 표적 세포에 존재하지만 세포에서 정상적으로 발현되지 않거나 요망되는 수준 보다 낮은 수준으로 발현되는 유전자를 활성화시키는 것을 포함한다.

<742> 프로모터와 이를 플랭킹(fanking)하는 표적화 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 작제물은 당 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 제조된다. 적합한 프로모터는 본 명세서에 기재되어 있다. 표적화 서열은 프로모터-표적화 서열이 내인성 서열과 상동 재조합될 수 있도록 내인성 서열과 충분히 상보적이다. 표적화 서열은 상동 재조합시에 프로모터가 내인성 서열과 작동적으로 결합되도록 요망되는 내인성 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 말단에 충분히 근접하게 위치한다.

<743> 프로모터 및 표적화 서열은 PCR을 이용하여 증폭될 수 있다. 한 구체예에서, 증폭된 프로모터는 5' 및 3' 말단 상에 별개의 제한 효소 부위를 함유한다. 바람직하게는, 제 1 표적화 서열의 3' 말단은 증폭된 프로모터의 5' 말단과 동일한 제한 효소 부위를 함유하고, 제 2 표적화 서열의 5' 말단은 증폭된 프로모터의 3' 말단과 동일한 제한 부위를 함유한다. 증폭된 프로모터 및 표적화 서열은 분해되고, 함께 연결된다.

<744> 프로모터-표적화 서열 작제물은 네이키드 폴리뉴클레오티드로서 또는 상기 더욱 상세히 설명되어 있는 리포솜, 바이러스 서열, 바이러스 입자, 전체 바이러스, 리포펙틴, 침전제 등과 같은 트랜스펙션 촉진제와 함께 세포로 전달된다. P 프로모터-표적화 서열이 임의의 방법에 의해 전달될 수 있으며, 이러한 방법으로는 니들 주사, 정맥 주사, 국부적 투여, 카테터 주입, 입자 가속기 등이 있다. 이러한 방법은 하기에서 더욱 상세히 설명된다.

<745> 프로모터-표적화 서열 작제물은 세포에 의해 흡수된다. 작제물과 내인성 서열 사이에 상동 재조합이 일어나서, 내인성 서열이 프로모터의 조절을 받게 된다. 그 후, 프로모터는 내인성 서열의 발현을 유도시킨다.

<746> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 단백질의 분비를 촉진하는 분비 신호 서열을 함유할 수 있다. 전형적으로, 신호 서열은 코딩 서열의 5' 말단쪽으로 또는 5' 말단에서 발현되도록 폴리뉴클레오티드의 코딩 영역에 위치해 있다. 신호 서열은 관심있는 폴리뉴클레오티드에 대해 동종성이거나 이중성일 수 있고, 트랜스펙션시키려는 세포에 대해 동종성이거나 이중성일 수 있다. 또한, 신호 서열은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다.

<747> 치료 효과를 제공하기에 충분한 양으로 하나 이상의 분자를 발현시키는 한은 상기 기재된 폴리뉴클레오티드 작제물 중 어느 하나의 임의의 투여 방식이 사용될 수 있다. 이는 직접적 니들 주사, 전신 주사, 카테터 주입, 바이오리스틱 인젝터(biolistic injector), 입자 가속기(즉, "유전자 건(gene gun)"), 겔포움 스폰지 디포트(gelfoam sponge depot), 그 밖의 시판되는 디포트 물질, 삼투 펌프(예를 들어, 알자 미니펌프(Alza minipump)), 경구 또는 좌제용 고형(정제 또는 알약) 약제 제형 및 수술 동안 디켄팅(decanting) 또는 국부 적용을 포함한다. 예를 들어, 네이키드 칼슘 포스페이트 침전된 플라스미드를 래트 간 및 래트 비장내로 직접 주입하거나 단백질 코팅된 플라스미드를 문맥내로 직접 주입하는 것은 래트 간에서 외래 유전자의 유전자 발현을 일으킨다(Kaneda et al., Science 243:375(1989)).

<748> 한 구체예에서, 국소 투여 방법은 직접 주사에 의한 것이다. 또 다른 구체예에서, 전달 비히클과 복합체화된 본 발명의 알부민 융합 단백질은 직접 주사에 의해 동맥의 영역내로 또는 동맥의 영역내에서 국소적으로 투여된다. 동맥의 영역내에서 국소적으로 조성물을 투여한다는 것은 조성물을 동맥내에서 센티미터, 바람직하게는 밀리미터로 주사하는 것을 의미한다.

<749> 또 다른 국소 투여 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 작제물을 수술 창상내에 또는 이 주위에 접촉시키는 것이다. 예를 들어, 환자는 수술을 받을 수 있고, 폴리뉴클레오티드 작제물은 창상 내부의 조직의 표면상에 코팅되거나 작제물은 창상 내부의 조직의 영역내로 주입될 수 있다.

<750> 전신 투여에 유용한 치료 조성물은 본 발명의 표적화된 전달 비히클에 복합체화된 본 발명의 융합 단백질을 포함한다. 전신 투여용으로 사용하기에 적합한 전달 비히클은 특정 부위에 비히클을 표적화시키기 위해 리간드를

포함하는 리포솜을 포함한다. 특정 구체예에서, 전신 투여용으로 사용되는 적합한 전달 비히클은 특정 부위에 비히클을 표적화시키기 위해 본 발명의 알부민 융합 단백질을 포함하는 리포솜을 포함한다.

<751> 한 구체예에서, 전신 투여 방법은 정맥 주사, 에어로졸, 경구 및 경피(국부) 전달을 포함한다. 정맥 주사는 당 분야의 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 에어로졸 전달이 당 분야의 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다(참조: Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992; 이는 본원에 참조로서 포함됨). 경구 전달은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 작제물을 동물의 장내의 소화 효소에 의한 분해를 견딜 수 있는 담체에 복합체화시킴으로써 이루어질 수 있다. 이러한 담체의 예로는 플라스틱 캡슐 또는 정제, 예를 들어 당 분야에 공지된 것들이 있다. 국부 전달은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 작제물을 피부내로 전달될 수 있는 친지성 시약(예를 들어, DMSO)과 혼합함으로써 이루어질 수 있다.

<752> 전달하려는 물질의 유효량을 결정하는 것은 예를 들어 물질의 화학 구조 및 생물학적 활성, 동물의 연령 및 체중, 치료를 필요로 하는 정확한 질환 및 이의 중증도, 및 투여 경로를 포함하는 다수의 인자에 좌우될 수 있다. 치료의 빈도는 다수의 인자, 예를 들어 용량 당 투여되는 폴리뉴클레오티드 작제물의 양 뿐만 아니라 피검체의 건강 및 병력에 좌우된다. 정확한 양, 투여 횟수 및 투여 시점은 주치의 또는 수의사에 의해 결정된다.

<753> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 동물, 바람직하게는 포유류 및 조류에 투여될 수 있다. 바람직한 포유류는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 말 및 돼지를 포함하며, 인간이 특히 바람직하다.

<754> 생물학적 활성

<755> 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 생물학적 활성을 시험하기 위한 검정에서 사용될 수 있다. 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드가 특정 검정에서 활성을 나타내는 경우, 이러한 융합 단백질에 상응하는 치료 단백질이 생물학적 활성과 관련된 질병에 관여할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 융합 단백질은 관련 질병을 치료하는데 사용될 수 있다.

<756> 일부 구체예에서, 본 발명은 치료, 예방 또는 개선이 요망되는 환자에게 표 1의 "치료 단백질 X" 컬럼 (표 1의 "바람직한 적응증 Y" 컬럼에 기재된 질병 또는 장애와 동일한 행에 존재함)에 기재된 치료 단백질에 상응하는 치료 단백질 부분을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 질병 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선하기에 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하여, 표 1의 "바람직한 적응증 Y" 컬럼에 기재된 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

<757> 추가의 구체예에서, 본 발명은 치료, 예방 또는 개선이 요망되는 환자에게 실시예에 나타나 있는 적응증과 관련 있는 치료 단백질에 상응하는 치료 단백질 부분을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 질병 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선하기에 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하여, 표 1의 "바람직한 적응증: Y" 컬럼에서 특정 치료 단백질에 대해 기재된 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

<758> 본 발명에 의해 특히 고려되는 것은 SEQ ID NO:Y를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩되는 경우 세포에 의해 생성되는 알부민 융합 단백질이다. 이러한 폴리뉴클레오티드가 세포로부터 엔코딩되는 단백질을 발현 시키는데 사용되는 경우, 세포의 천연 분비 및 프로세싱 단계는 표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 명시된 신호 서열이 결합된 단백질을 생성시킨다. 기재된 신호 서열의 특정 아미노산 서열은 본 명세서에 나타나 있거나 당 분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 가장 바람직한 구체예는 세포에 의해 생성된 알부민 융합 단백질을 포함한다 (이는 표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 나타나 있는 리더 서열이 결합되어 있음). 또한, 가장 바람직한 것은 표 2의 컬럼 4 및/또는 11에 기재된 특정 리더 서열없이 SEQ ID NO:Y를 포함하는 폴리펩티드이다. 약제 조성물을 포함하는 이러한 두 가지 바람직한 구체예를 포함하는 조성물이 또한 바람직하다. 이러한 알부민 융합 단백질은 표 1의 "바람직한 적응증: Y"에서 특정 치료 단백질에 대해 기재된 질병 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선시키기 위해 특히 고려된다.

<759> 일부 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 내분비계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "내분비 장애" 섹션을 참조하라), 신경계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "신경학적 장애" 섹션을 참조하라), 면역계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "면역 활성" 섹션을 참조하라), 호흡계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "호흡 장애" 섹션을 참조하라), 심혈관계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "심혈관 장애" 섹션을 참조하라), 생식계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "생식계 장애" 섹션을 참조하라), 소화계의 질병 및 장애(예를 들어, 하기 "위장 장애" 섹션을 참조하라), 세포 증식과 관련된 질병 및/또는 장애(하기, "과증식 장애" 섹션을 참조하라), 및/또는 혈액과 관련된 질병 또는 장애(예를 들어, 하기 "혈액 관련 장애" 섹션을 참조하라)와 관련된 질병 및/또는 장애의 진단, 예후, 예방 및/또는 치료에서 사용될 수 있다.

- <760> 어떤 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 본 발명의 융합 단백질의 치료 단백질 부분에 상응하는 유전자가 발현되는 조직(들)과 관련된 질병 및/또는 장애를 진단하고/하거나 예후하는데 사용될 수 있다.
- <761> 따라서, 본 발명의 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로호르몬(prohormone) 활성화, 신경전달물질 활성화, 세포 신호링, 세포 증식, 세포 분화 및 세포 이동을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 활성화와 관련된 질병 및/또는 장애의 진단, 검출 및/또는 치료에 유용하다.
- <762> 더욱 일반적으로, 본 발명의 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 하기 계통과 관련된 질병 및/또는 장애의 진단, 예후, 예방 및/또는 치료를 위해 유용할 수 있다.
- <763> **면역 활성화**
- <764> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 면역 세포의 증식, 분화 또는 동원(화학주성)을 활성화시키거나 억제함으로써 면역계의 질병, 장애 및/또는 질환을 치료, 예방, 진단 및/또는 예후하는데 유용할 수 있다. 면역 세포는 조혈로 일컬어지는 작용을 통해 분화하여, 다능성 줄기 세포로부터 골수 세포(혈소판, 적혈구, 호중구 및 대식구) 및 림프 세포(B 및 T 림프구)를 생성한다. 이러한 면역 질병, 장애 및/또는 질환의 병인은 유전적, 신체적(somatic), 예를 들어 암 및 일부 자기면역 질병, 후천적(예를 들어, 화학요법 또는 독소에 의함), 또는 감염적일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 특정 면역계 질병 또는 장애의 마커 또는 검출물질로서 사용될 수 있다.
- <765> 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역계의 질병 및 장애를 치료하고/하거나, 본 발명의 폴리펩티드가 발현되는 조직(들)과 관련된 세포에 의해 생성되는 면역 반응을 억제 또는 향상시키는데 사용될 수 있다.
- <766> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 선천성 및 후천성 면역결핍을 포함하는 면역결핍을 치료, 예방, 진단 및/또는 예후하는데 유용할 수 있다. 면역결핍으로 불린 수준 B 세포 기능 및/또는 B 세포 개수가 감소하는 B 세포 면역결핍의 예로는 X-연관된 무감마글로불린혈증(브루튼병), X-연관된 영아 무감마글로불린혈증, 과잉 IgM을 동반하는 X-연관된 면역결핍, 과잉 IgM을 동반하는 X-연관되지 않은 면역결핍, X-연관된 림프증식 증후군(XLP), 선천성 및 후천성 무감마글로불린혈증을 포함하는 무감마글로불린혈증, 성인 개시형 무감마글로불린혈증, 후기-개시형(late-onset) 무감마글로불린혈증, 이상감마글로불린혈증, 저감마글로불린혈증, 불특정형 저감마글로불린혈증, 열성 무감마글로불린혈증(스위스 유형), 선택적 IgM 결핍, 선택적 IgA 결핍, 선택적 IgG 서브클래스 결핍, IgG 서브클래스 결핍(IgA 결핍을 나타내거나 나타내지 않음), 증가된 IgM을 동반하는 Ig 결핍, 증가된 IgM을 동반하는 IgG 및 IgA 결핍, 정상 또는 상승된 Ig를 동반하는 항체 결핍, Ig 중쇄 결실, 카파 사슬 결핍, B 세포 림프증식 장애(BLPD), 공통 가변성(common variable) 면역결핍(CVID), 공통 가변성 면역결핍(CVI)(후천성), 및 영아기의 일시적 저감마글로불린혈증이 있다.
- <767> 특정 구체예에서, 모세혈관확장성 조화운동불능(ataxia-telangiectasia) 또는 조화운동불능과 관련된 질환이 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예후된다.
- <768> T 세포 및/또는 B 세포 기능 및/또는 개수가 감소하는 선천성 면역결핍의 예로는 비제한적으로 디조지 이상(DiGeorge anomaly), 중증 복합 면역결핍(SCID)(X-연관된 SCID, 보통염색체 열성 SCID, 아데노신 데아미나아제 결핍, 퓨린 뉴클레오티드 포스포릴라아제(PNP) 결핍, 클래스 II MHC 결핍(바르(Bare)림프구 증후군), 위스코트-알드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군 및 모세혈관확장성 조화운동불능을 포함하지만, 이들에 제한되지 않음), 흉선 형성부전(thymic hypoplasia), 제 3 및 제 4 인두낭 증후군, 22q11.2 결실, 만성 점막피부 칸디다증, 자연 살상 세포 결핍(NK), 특발성 CD4+ T-림프구감소증, T 세포 결함이 우세한 면역결핍(불특정형) 및 세포 매개성 면역의 불특정형 면역결핍이 있다.
- <769> 특정 구체예에서, 디조지 이상 및 디조지 이상과 관련된 질환은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예후된다.
- <770> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예후될 수 있는 다른 면역결핍으로는 비제한적으로 만성 육아종 질병, 체디악-히가시(Chediak-Higashi) 증후군, 골수세포형과산화효소 결핍, 백혈구 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소 결핍, X-

연관된 림프증식 증후군(XLP), 백혈구 부착 결핍, 보체 성분 결핍(C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 및/또는 C9 결핍을 포함함), 세망이형성증(reticular dysgenesis), 흉선 림프조직무형성-무형성, 흉선종을 동반하는 면역결핍, 중증 선천성 백혈구감소증, 면역결핍을 동반하는 형성이상, 신생아 호중성백혈구감소증, 단지 난장이증(short limbed dwarfism) 및 Igs를 동반하는 네젤로프 증후군 합병성 면역결핍이 있다.

<771> 한 구체예에서, 면역결핍 및/또는 상기 언급된 면역결핍과 관련된 질환은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예후된다.

<772> 한 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역결핍 개체들 사이에서 면역반응성을 증강시키기 위한 작용제로서 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 B 세포 및/또는 T 세포 면역결핍 개체들 사이에서 면역반응성을 증강시키기 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

<773> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 자기면역 장애를 치료, 예방, 진단 및/또는 예후하는데 유용할 수 있다. 다수의 자기면역 장애는 면역 세포가 스스로(self)를 외래 물질로서 부적절하게 인식하는 데에서 비롯된다. 이러한 부적절한 인식은 면역 반응을 일으켜서 숙주 조직의 파괴를 초래한다. 따라서, 면역 반응, 특히 T 세포의 증식, 분화 또는 화학주성을 억제할 수 있는 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 투여는 자기면역 장애를 예방하는 데 있어서 효과적인 요법일 수 있다.

<774> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 치료, 예방, 진단 및/또는 예후될 수 있는 자기면역 질병 또는 장애로는 비제한적으로 전신성 홍반 루푸스, 류마티스 관절염, 강직 척추염, 다발성 경화증, 자기면역 갑상선염, 하시모토 갑상선염, 자기면역 용혈성 빈혈, 용혈성 빈혈, 저혈소판증, 자기면역 저혈소판증 자색반, 자기면역 신생아 저혈소판증, 특발성 저혈소판증 자색반, 자색반(예를 들어, 헨로치-스코엔레인(Henloch-Schoenlein) 자색반), 자기면역혈구감소증, 굿패스처(Goodpasture) 증후군, 보통 천포창, 중증 근무력증, 그레이브(Grave)병(갑상선과다증) 및 인슐린 내성 당뇨병이 있다.

<775> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 치료, 예방 및/또는 진단될 수 있는 자기면역 성분을 지니는 것으로 여겨지는 추가의 장애로는 비제한적으로 타입 II 콜라겐-유도된 관절염, 항인지질 증후군, 피부염, 알레르기성 뇌척수염, 심근염, 재발성 다발성골염, 류마티스성 심장병, 신경염, 포도막염 안염, 다중내분비병증(polyendocrinopathy), 레이터(Reiter) 병, 스티프-만(Stiff Man) 증후군, 자기면역 폐 염증, 자폐증, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 인슐린 의존성 당뇨병, 및 자기면역 염증성 안구 장애가 있다.

<776> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료, 예방, 진단 및/또는 예견할 수 있는 자가면역 성분을 지니는 것으로 추정되는 부가적인 질환으로는, 이들에 한정되는 것은 아니나, 항-콜라겐 항체에 의한 피부경화(예를 들어, 핵소체 및 기타 핵 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 혼합 결합 조직병(예를 들어, 추출가능한 핵 항원(예를 들어, 리보뉴클레오타이드)에 대한 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 다발근육염(예를 들어, 비-히스톤 ANA에 의해서 종종 특징되기도 함), 악성 빈혈(예를 들어, 항-벽세포, 마이크로쥬 및 내인 인자 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 특발성 에디슨 병(예를 들어, 체액 및 세포 매개된 부신 세포독성에 의해서 종종 특징되기도 함), 불임증(예를 들어, 항-정자 항체에 의해서 특징되기도 함), 사구체신염(예를 들어, 사구체 기저막 항체 또는 면역 복합체에 의해서 종종 특징되기도 함), 유사 물질증(예를 들어, 기저막에서의 IgG 및 보체에 의해서 종종 특징되기도 함), 쇼그렌 증후군(예를 들어, 다발 조직 항체, 및/또는 특이적인 비-히스톤 ANA(SS-B)에 의해서 종종 특징되기도 함), 당뇨병(예를 들어, 세포 매개된 및 체액성 섬세포 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 및 아드레날린 약물 내성(천식 또는 낭종 섬유증에 대한 아드레날린 약물 내성을 포함함)(예를 들어, 베타-아드레날린 수용체 항체에 의해서 종종 특징되기도 함)이 있다.

<777> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료, 예방, 진단 및/또는 예견될 수 있는 자가면역 성분을 지니는 것으로 추정되는 부가적인 질환으로는, 이들에 한정되는 것은 아니나, 만성 활성 간염(예를 들어, 평활근 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 원발성 쓸개관 경화증(예를 들어, 미토콘드리아 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 기타 내분비샘 이상(예를 들어, 일부 경우에 특이적인 조직 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 백반증(예를 들어, 멜라닌세포 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 혈관염(예를 들어, 혈관 벽에서의 Ig 및 보체 및/또는 저혈청 보체에 의해서 종종 특징되기도 함), 후(post)-MI(예를 들어, 심근 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 심장절개 증후군(예를 들어, 심근 항체에 의

해서 종종 특징되기도 함), 두드러기(예를 들어, IgE에 대한 IgG 및 IgM 항체에 의해서 종종 특징되기도 함), 아토피성 피부염(예를 들어, IgE에 대한 IgG 및 IgM에 의해서 종종 특징되기도 함), 천식(예를 들어, IgE에 대한 IgG 및 IgM에 의해서 종종 특징되기도 함), 및 다수의 기타 염증성, 육아종, 퇴행성 및 위축성 질환이 있다.

- <778> 한 구체예에서, 상기 언급된 질환 및 질병과 관련된 자가면역 질환 및 질병 및/또는 증상은, 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예견된다. 특정의 바람직한 한 구체예에서, 류마티스성 관절염이 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방 및/또는 진단된다.
- <779> 또 다른 특정의 바람직한 구체예에서, 전신 홍반 루푸스가 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방 및/또는 진단된다. 또 다른 특정의 바람직한 구체예에서, 특발성 저혈소판증 자색반병이 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방 및/또는 진단된다.
- <780> 또 다른 특정의 바람직한 구체예에서, IgA 신장병증이 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방 및/또는 진단된다.
- <781> 한 구체예에서, 상기 인용된 질환 및 질병과 관련된 자가면역 질환 및 질병 및/또는 증상은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예견된다.
- <782> 일부 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역억제제로서 사용된다.
- <783> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 조혈 세포의 질환, 질병 및/또는 증상을 치료, 예방, 예견 및/또는 진단하는 데 유용할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 백혈병, 호중성백혈구 감소증, 빈혈 및 저혈소판증을 포함하나 이들에 한정되지 않는 특정(또는 다수의) 유형의 조혈 세포의 감소와 관련된 그러한 질환, 질병 및/또는 증상을 치료 또는 예방하기 위해, 다기능성 줄기 세포를 포함하는 조혈 세포의 분화 및 증식을 증가시키는 데 사용될 수 있었다. 택일적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 조직구증을 포함하나 이에 한정되지 않는 특정(또는 다수의) 유형의 조혈 세포의 증가와 관련된 그러한 질환, 질병 및/또는 증상을 치료 또는 예방하기 위해, 다기능성 줄기 세포를 포함하는 조혈 세포의 분화 및 증식을 증가시키는 데 사용될 수 있었다.
- <784> 천식(특히 알레르기성 천식) 또는 기타 호흡 문제와 같은 알레르기성 반응 및 증상은 또한 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예견될 수도 있다. 또한, 이들 분자는 아나필락시스, 항원 분자에 대한 과민증 또는 세포 그룹 부적합증을 치료, 예방, 예견 및/또는 진단하는 데 사용될 수 있다.
- <785> 추가적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 IgE-매개된 알레르기성 반응을 치료, 예방, 진단 및/또는 예견하는 데 사용될 수도 있다. 이러한 알레르기성 반응에는 이들에 한정되는 것은 아니나, 천식, 류마티스 및 습진이 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 시험관내 또는 생체내에서 IgE 농도를 조절하는 데 사용될 수도 있다.
- <786> 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 염증 질환을 진단, 예견, 예방 및/또는 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 염증 반응과 관련된 세포의 활성화, 증식 및/또는 분화를 억제할 수 있기 때문에, 이들 분자는 만성 및 급성 염증 질환을 예방 및/또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 그러한 염증 질환으로는 이들에 한정되는 것은 아니나, 예를 들어, 감염과 관련된 염증(예를 들어, 패혈 쇼크, 패혈증, 또는 전신 염증 반응 증후군), 허혈성 재관류 손상, 내독소 치사, 보체 매개된 초급성 거부반응, 신장염, 시토킨 또는 케모킨 유발된 폐 손상, 염증성 장 질환, 크론씨 병, 시토킨 과다 생산(예를 들어, TNF 또는 IL-1), 호흡 이상(예를 들어, 천식 및 알레르기); 위장관 질환(예를 들어, 염증성 장 질환); 암(예를 들어, 위, 난소, 폐, 방광, 간 및 유방); CNS 질환(예를 들어, 다발 경화증, 허혈성 뇌 손상 및/또는 중풍, 외상성 뇌 손상, 신경퇴행성 질환(예를 들어, 파킨슨 병 및 알츠하이머 병); AIDS-관련된 치매; 및 프리온 병); 심혈관 질환(예를 들어, 죽상 경화증, 심근염, 심혈관 질환, 및 심폐 두름 합병증); 뿐만 아니라 염증으로 특징

되는 다수의 부가 질환, 증상 및 질병(예를 들어, 간염, 류마티스성 관절염, 통풍, 외상, 췌장염, 사르코이드증, 치매, 허혈성-재관류 손상 손상, 갑상선기능 항진증, 전신 홍반 루푸스, 당뇨병 및 동종이식 거부반응)이 있다.

<787> 염증은 기본적인 방어 메커니즘이기 때문에, 염증 질환은 사실상 신체의 임의 조직에 대해 작용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 이들에 한정되지 않으나 부신염, 폐포염, 혈관쫄개염, 충수염, 귀두염, 눈꺼풀염, 기관지염, 윤활낭염, 심장염, 연조직염, 자궁경부염, 쯤개염, 성대염, 달팽이염, 결장염, 결막염, 방광염, 피부염, 결주머니염, 너염, 심장너막염, 식도염, 귀인두관염, 섬유염, 모낭염, 위점막염, 위장염, 잇몸염, 설염, 간비장염, 각막염, 내이염, 후두염, 림프관염, 유방염, 중이염, 수막염, 자궁근염, 점액염, 심장근육염, 근육염, 고막염, 신장염, 신경염, 고환염, 뼈연골염, 귀염, 심장막염, 힘줄주위염, 복막염, 인두염, 정맥염, 회색질척수염, 전립샘염, 속질염, 망막염, 비염, 자궁관염, 공락맥락막염, 음낭염, 부비동염, 척추염, 지방조직염, 구내염, 윤활막염, 귀인두관염, 건염, 편도염, 요도염 및 질염이 있다.

<788> 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 장기 이식 거부반응 및 이식편-대-숙주병(graft versus host disease)을 진단, 예견, 예방 및/또는 치료하는 데 유용하다. 면역 반응을 통한 이식된 조직의 숙주 면역 세포 파괴에 의해 장기 거부 반응이 일어난다. 마찬가지로, 면역 반응은 GVHD와 관련되어 있으나, 이 경우 외래 이식된 면역 세포가 숙주 조직을 파괴시킨다. 면역 반응을 억제, 특히 T 세포를 활성화, 증식, 분화 또는 케모택싱(chemotaxing)시키는 본 발명의 폴리펩티드, 항체 또는 폴리뉴클레오티드, 및/또는 이의 효능제 또는 길항제는 장기 거부반응 또는 GVHD를 예방하는 데 있어 효과적인 치료제가 될 수 있다. 특정 구체예에서, 면역 반응을 억제, 특히 T 세포를 활성화, 증식, 분화 또는 케모택싱시키는 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 실험적인 알레르기성 및 초급성 이종이식 거부반응을 예방하는 데 있어 효과적인 치료제가 될 수 있다.

<789> 다른 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 혈청병, 연쇄구균 감염후 사구체 신염, 결절다발 동맥염, 및 면역 복합체 유발된 혈관염을 포함하나 이들에 한정되지 않는 면역 복합 질환을 진단, 예견, 예방 및/또는 치료하는 데 유용하다.

<790> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 감염체를 치료, 검출 및/또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응을 증가시킴으로써, 특히 B 및/또는 T 세포의 증식, 활성화 및/또는 분화를 증가시킴으로써, 감염성 질환이 치료, 검출 및/또는 예방될 수 있다. 면역 반응은 현존하는 면역 반응을 증가시키거나 새로운 면역 반응을 개시함으로써 증가될 수 있다. 택일적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역 반응을 필수적으로 유발시키지 않고, 감염체(감염체 등이 존재하는 적용 부분을 지칭함)를 직접 억제시킬 수도 있다.

<791> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 항원에 대한 면역 반응성을 증강시키는 백신 보조제로서 사용된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 종양 특이적인 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다.

<792> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 항-바이러스 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다. 보조제로서 본 발명의 조성물을 이용하여 증강될 수 있는 항-바이러스 면역 반응에는, 본원에 개시되거나 그렇지 않으면 당업계에 공지된 바이러스 및 바이러스 관련된 질환 또는 증상이 포함된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 AIDS, 수막염, 뎅기, EBV 및 간염(예를 들어, B형 간염)로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스, 질환 또는 증상에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 HIV/AIDS, 호흡기 세포융합 바이러스, 뎅기, 로타바이러스, B형 일본 너염, A형 및 B형 독감, 파라인플루엔자, 홍역, 거대세포 바이러스, 광견병, 쥬닌(Junin), 치쿤군야(Chikungunya), 리프트 밸리 열(Rift Valley fever), 단순 헤르페스 및 황열로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스, 질환 또는 증상에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다.

<793> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 항-세균 또는 항-진균 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다. 보조제로서 본 발명

의 조성물을 이용하여 증강될 수 있는 항-세균 또는 항-진균 면역 반응에는, 본원에 기술되거나 그렇지 않으면 당업계에 공지된 세균 또는 진균, 및 세균 또는 진균과 관련된 질환 또는 증상이 포함된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 파상풍, 디프테리아, 보툴리눔 독소증 및 B형 수막염으로 이루어지는 군으로부터 선택된 세균 또는 진균, 질병 또는 증상에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다.

<794> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 *비브리오 콜레라균*, *나병균*, *장티푸스균*, *파라티푸스균*, *뇌수막염균*, *페렴 연쇄구균*, *B군 연쇄구균*, *시겔라 종*, *창자독소생성 대장균*, *창자출혈 대장균* 및 *보렐리아균*으로 이루어지는 군으로부터 선택된 세균 또는 진균, 질병 또는 증상에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다.

<795> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 항-기생충 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다. 보조제로서 본 발명의 조성물을 사용하여 증강될 수 있는 항-기생충 면역 반응에는 본원에 기술되거나 그렇지 않으면 당업계에 공지된 기생충 및 기생충 관련된 질환 또는 증상이 포함된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 기생충에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 열원충(말라리아) 또는 리슈만 편모충에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보조제로서 사용된다.

<796> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 단핵 포식세포의 보충 및 활성화를 예방함으로써, 규소폐증, 사르코이드증, 및 특발성 폐 섬유증을 포함하는 감염성 질환을 치료하는데 사용될 수도 있다.

<797> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩티드에 대해 면역 매개된 반응을 억제시키거나 증강시키기 위한 항체 생성용 항원으로서 사용된다.

<798> 한 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 기니아 피그, 돼지, 초소형 돼지, 닭, 낙타, 염소, 말, 암소, 양, 개, 고양이, 사람을 제외한 영장류 및 사람, 사람이 가장 바람직함)에게 투여되어 하나 이상의 항체 (예를 들어, IgG, IgA, IgM 및 IgE)를 증가된 양으로 생성시키도록 면역 반응을 증강시켜, 그 결과 더욱 높은 친화도의 항체 생산 및 면역글로불린 급 전환 (예를 들어, IgG, IgA, IgM 및 IgE)을 유발시키고/거나 면역 반응을 증가시키게 된다.

<799> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 병원체에 대한 B 세포 반응성의 자극제로서 사용된다.

<800> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 T 세포의 활성화제로서 사용된다.

<801> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 면역억제 치료를 실시하기 전에 개체의 면역 상태를 증가시키는 제제로서 사용된다.

<802> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 보다 높은 친화도의 항체를 유발시키는 제제로서 사용된다.

<803> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 혈청 면역글로불린 농도를 증가시키는 제제로서 사용된다.

<804> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 면역약화된 개체의 회복을 촉진시키는 제제로서 사용된다.

<805> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 노령화된 집단 및/또는 신생아에서 면역반응성을 증강시키기 위한 제제로서 사용된다.

<806> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 골수 이식 및/또는 기타 이식(예를 들어, 동종 또는 이종 장기 이식) 전에, 동안에 또는 후에 면역체계 증강제로서 사용된다. 이식에 대해, 본 발명의 조성물은 이식 전에, 이식과 함께 및/또는 이식 후에 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 이식 후에, T-세포 집단의 회복이 개시되기 전에 투여된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 먼저, 이식 후, T 세포 집단의 회복이 개시된 후 및

B 세포 집단의 완전한 회복 전에 투여된다.

- <807> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 B 세포 기능이 후천적으로 손상된 개체 중에서의 면역반응성을 증강시키기 위한 제제로서 사용된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 투여함으로써 완화되거나 치료될 수 있는, B 세포의 후천적 기능 손상을 야기하는 증상에는 이들에 한정되는 것은 아니나 HIV 감염, AIDS, 골수 이식, 및 B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 있다.
- <808> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 일시적 면역 결핍증을 지닌 개체 중에서의 면역반응성을 증강시키기 위한 제제로서 사용된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 투여함으로써 완화되거나 치료될 수 있는, 일시적 면역 결핍증을 야기하는 증상에는 이들에 한정되는 것은 아니나, 바이러스(예를 들어, 인플루엔자) 감염으로부터의 회복, 영양실조와 관련된 증상, 감염성 단핵구증으로부터의 회복, 또는 스트레스와 관련된 증상, 홍역으로부터의 회복, 수혈로부터의 회복 및 수술로부터의 회복이 있다.
- <809> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 단핵구, 수지상 세포 및/또는 B 세포에 의한 항원 전달의 조절제로서 사용된다. 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 시험관내 또는 생체내에서의 항원 전달을 증강시키거나 항원 전달을 길항시킨다. 또한, 관련된 구체예에서, 항원 전달의 이러한 증강 작용 또는 길항 작용은 항-종양 치료제로서 또는 면역 체계를 조절하는 데 있어 유용할 수 있다.
- <810> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 TH1 세포 반응에 반대되는 체액성 반응(즉, TH2)의 진행에 대해 개체의 면역 체계를 유도하기 위한 제제로서 사용된다.
- <811> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 종양의 증식을 유도하여 항-종양제에 대해 더욱 감수성을 띠게 하는 수단으로서 사용된다. 예를 들어, 다발 골수종은 서서히 분할하는 질병이며, 이에 따라 사실상 모든 항-종양 요법에 대해 무반응이다. 이러한 세포가 더욱 신속하게 증식되도록 강요되는 경우, 이들의 감수성 프로파일은 쉽게 변화될 것이다.
- <812> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 AIDS, 만성 림프구 질환 및/또는 공통 가변성 면역결핍증과 같은 병리에서 B 세포 생산의 자극제로서 사용된다.
- <813> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 수술, 외상 또는 유전적 결함 후의 림프 조직의 생성 및/또는 재생을 위한 치료제로서 사용된다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 이식 전에 골수 샘플을 전처리하는 데 사용된다.
- <814> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 SCID 환자 중에서 확인된 것과 같은 면역-불완전/면역결핍을 유발시키는 유전병에 대한 유전자 기초 치료제로서 사용된다.
- <815> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 리슈만 편모충과 같은 단핵구에 작용하는 기생충에 의한 질병에 대해 방어하도록 단핵구/대식세포를 활성화시키는 수단으로서 사용된다.
- <816> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩티드에 의해 유발되는 분비된 시토카인을 제어하는 수단으로서 사용된다.
- <817> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 이들이 수의학 분야에 적용되는 경우에 본원에 기술된 하나 이상의 적용예로 사용된다.
- <818> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는

폴리뉴클레오타이드는 외래 물질 또는 자신에 대한 다양한 측면의 면역 반응을 차단하는 수단으로서 사용된다. 요망될 수 있는 특정 일면의 면역 반응을 차단하는 질병 또는 상태의 예들에는 루푸스 및 관절염과 같은 자가면역 질환, 및 피부 알레르기에 대한 면역반응성, 염증, 장 질환, 손상 및 병원체와 관련된 질환/질병이 포함된다.

- <819> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 특발성 혈소판감소 자색반병, 전신 홍반 루푸스 및 다발 경화증과 같은 자가면역 질환과 관련된 B 세포 증식 및 Ig 분비를 예방하기 위한 치료제로서 사용된다.
- <820> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 효능제 또는 길항제 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 내피 세포에서의 B 및/또는 T 세포 이동의 억제제로서 사용된다. 이러한 활성은 조직 구조 또는 인지 반응을 파괴시키므로, 예를 들어, 면역 반응을 파괴시키고 패혈증을 차단시키는 데 유용하다.
- <821> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 의미 불명 단클론성 감마병증(monoclonal gammopathy of undetermined significance: MGUS), 왈덴스트롬 병(Waldenstrom's disease), 관련된 특발 단클론성 감마병증 및 형질세포종과 같은 질병에서 확인되는 만성 고감마글로불린혈증에 대한 치료제로서 사용된다.
- <822> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 특정 자가면역 및 만성 염증 및 감염성 질환에서, 대식세포 및 이들의 전구체, 호중구, 호염기구, B 림프구 및 일부 T 세포 서브셋, 예를 들어, 활성화되고 CD8 세포독성을 띠는 T 세포 및 천연 킬러 세포의 폴리펩티드 케모타시스 및 활성화를 억제하는 데 사용될 수 있다. 자가면역 질환의 예로는 본원에 기술된 것과, 다발 경화증 및 인슐린 의존형 당뇨병이 있다.
- <823> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 또한, 예를 들어, 호산구 생산 및 이동을 예방함으로써 특발성 과-호산구 증후군을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- <824> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 보체 매개된 세포 용해를 증강시키거나 억제시키는 데 사용된다.
- <825> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 항체 의존적인 세포의 세포독성을 증강시키거나 억제시키는 데 사용된다.
- <826> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 동맥 벽에서 단백질 침윤을 예방함으로써 죽상경화증을 치료하기 위해 사용될 수도 있다.
- <827> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 성인의 호흡곤란 증후군 (ARDS)를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- <828> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 상처 및 조직 치유의 자극, 혈관형성의 자극, 및/또는 혈관 또는 림프관 질병 또는 질환의 치유를 자극하는 데 유용할 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 점막 표면의 재생을 자극하는 데 사용될 수 있다.
- <829> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 원발성 또는 후천적 면역결핍증, 결핍된 혈청 면역글로불린 생산, 재발되는 감염, 및/또는 면역 체계 기능이상에 의해 특징되는 질환을 진단, 예견, 치료 및/또는 예방하는 데 사용된다. 또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 관절, 뼈, 피부 및/또는 귀밀샘의 감염; 혈액 매개 감염(예를 들어, 패혈증, 수막염, 감염성 관절염 및/또는 골수염); 자가면역 질환(예를 들어, 본원에 기술된 것들); 염증 질환; 및 암; 및/또는 CVID, 기타 원발성 면역 결핍증, HIV 병, CLL, 재발성 기관지염, 부비동염, 중이염, 결막염, 폐렴, 간염, 수막염, 락 헤르페스(예를 들어, 중증 락 헤르페스), 및/또는 폐포자충을 포함하나 이들에 한정되지 않는, 이들 감염증, 질병, 질환 및 암과 관련된 임의의 질환 또는 질병 또는 증상;을 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 예방, 진단, 예견 및/또는 치료될 수 있는 기타 질환 및 질병에는 HIV 감염, HTLV-BLV 감염, 림프구 감소증, 포식세포 살균 기능이상 빈혈증, 저혈소판증 및 혈색소뇨증을 포함하

나 이들에 한정되지 않는다.

- <830> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 공통 가변성 면역결핍증("CVID"; 이것은 또한 "후천적 저감마글로불린 혈증"으로 공지되어 있음) 또는 이들 질환의 서브셋을 지닌 개체를 치료 및/또는 진단하는 데 사용된다.
- <831> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역 세포 또는 면역 조직 관련된 암 또는 종양을 포함하는 암 또는 종양을 진단, 예견, 예방 및/또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 예방, 진단 또는 치료될 수 있는 암 또는 종양의 예로는 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 호지킨 병, 비호지킨 림프종, 급성 림프구 빈혈증 (ALL), 만성 림프구 백혈병, 형질세포종, 다발골수종, 버킷 림프종, EBV-형질전환 병, 및/또는 본원에서 "과증식 질환"으로 명명된 부분에 기술된 질환 및 질병을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- <832> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 큰 B-세포 림프종의 세포 증식을 감소시키기 위한 치료제로서 사용된다.
- <833> 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 만성 골수성 백혈병과 관련된 B 세포 및 Ig의 병발을 감소시키는 수단으로서 사용된다.
- <834> 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은, 예를 들어, 부분적이거나 전체적으로 비장절제된 개체와 같은 B 세포 면역결핍된 개체 중에서 면역반응성을 증강시키는 제제로서 사용된다.
- <835> **혈액-관련 질병**
- <836> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 지혈(출혈 억제) 또는 혈전(혈액 덩어리의 용해) 활성을 조절하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 지혈 또는 혈전 활성을 증가시킴으로써, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 혈액 응고 질환, 질병 및/또는 증상(예를 들어, 무성유소원혈증, 인자 결핍증, 혈우병), 혈소판 질환, 질병 및/또는 증상(예를 들어, 저혈소판증), 또는 외상, 수술 또는 기타 요인에 의한 상처를 치료 또는 예방하는 데 사용할 수 있었다. 택일적으로, 지혈 또는 혈전 활성을 감소시킬 수 있는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 혈액 응고를 억제하거나 혈액 덩어리를 용해시키는 데 사용될 수 있었다. 이들 분자들은 심장 마비(경색증), 중풍 또는 흉터형성의 치료 또는 예방에 있어 중요할 수 있었다.
- <837> 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈전증, 동맥혈전증, 정맥혈전증, 혈전색전증, 폐혈전색전증, 아테롬경화증, 심근경색증, 일과성허혈발작, 불안전형 협심증을 예방하고, 진단하고, 예측하고, 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 복재이식의 협착을 예방하고, 혈관성형술 과정을 수행하는 경우 말초단계적 혈전증의 위험을 감소시키고, 비류마티스성 세정을 포함하는 심방 세정에 걸린 환자에게서 뇌졸중의 위험을 감소시키고, 기계적 심장 판막 및/또는 판막 질환과 관련된 색전증의 위험을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질에 대한 다른 용도는 체외 장비(예를 들어, 혈관내 캐놀라(canulas), 혈액투석 환자의 혈관진입분로, 혈액투석기, 및 심폐기)의 협착을 예방함을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <838> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈액 및/또는 본 발명의 폴리펩티드가 발견되는 조직과 관련된 혈액 형성 기관의 질병 및 질환을 예방하고, 진단하고, 예측하고, 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- <839> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 조혈활성(혈액세포의 형성)을 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈액세포, 예를 들어 적혈구, 림프구(B 또는 T 세포), 골수세포(예를 들어, 호염기구, 호산구, 호중구, 비만세포, 대식세포) 및 혈소판 모두 또는 서브셋(subset)의 양을 증가시키는데 사용될 수 있다. 혈액세포 또는 혈액세포의 서브셋의 양을 감소시키는 능력은 하기에 기술되는 빈혈 및 백혈구 감소증의 예방, 검출, 진단, 및/또는 치료에 유용할 것이다. 택일적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈액세포, 예를 들어 적혈구, 림프구(B

또는 T 세포), 골수세포(예를 들어, 호염기구, 호산구, 호중구, 비만세포, 대식세포) 및 혈소판 모두 또는 서브 세트의 양을 감소시키는데 사용될 수 있다. 혈액세포 또는 혈액세포의 서브세트의 양을 감소시키는 능력은 백혈구 감소증, 예를 들어 호산구증가증의 예방, 검출, 진단 및/또는 치료에서 유용할 것이다.

<840> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈액 질환(blood dyscrasia)을 예방하거나, 치료하거나 진단하는데 사용될 수 있다.

<841> 빈혈은 혈액 중 적혈구의 수 또는 헤모글로빈(산소를 운반하는 단백질)의 양이 정상 미만인 병태이다. 빈혈은 과다출혈, 감소된 적혈구 생산, 또는 증가된 적혈구 파괴(용혈현상)에 의해 야기될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 빈혈을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질에 의한 치료되거나, 예방되거나 진단되는 빈혈은 철결핍 빈혈, 저혈색소성 빈혈, 소적혈구 빈혈, 위황병, 유전성 철적모구성 빈혈, 특발성 면역성 철적모구성 빈혈, 적혈구 무형성, 거대 적아구성 빈혈(예를 들어, 악성 빈혈(비타민 B12 결핍) 및 엽산 결핍 빈혈), 재생불량성 빈혈, 용혈성 빈혈(예를 들어, 자가 면역 용혈성 빈혈, 미세맥관병성 용혈성 빈혈, 및 발작성 야간 혈색소뇨증)을 포함한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 전신성 홍반성 낭창, 암, 림프종, 만성 신장질환, 및 확장된 비장을 포함하나, 이에 제한되지 않는 질환과 관련된 빈혈을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 메틸도파, 다프손, 및/또는 술과약물과 관련된 약물 치료로부터 발생하는 빈혈을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용하다. 추가적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 유전성 구상적혈구증, 유전성 타원형 적혈구증, 글루코즈-6-포스페이트 디하이드로게나제 결핍, 및 겸상적혈구빈혈을 포함하나, 이에 제한되지 않는 비정상적 적혈구 구조와 관련된 빈혈을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용할 수 있다.

<842> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 헤모글로빈 이상(abnormality)(예를 들어, 겸상적혈구빈혈, 헤모글로빈 C 질환, 헤모글로빈 S-C 질환, 및 헤모글로빈 E 질환)을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용할 것이다. 추가적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 알파-탈라세미아 및 베타-탈라세미아의 주형태 및 부형태를 포함하나 이에 제한되지 않는 탈라세미아를 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<843> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 혈소판감소증(예를 들어, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 및 혈전성 혈소판감소성 자반병), 폰 빌리브란트 병, 유전성 혈소판 질환(예를 들어 체디아크-히가시 증후군 및 헤르만스키-푸들라크 증후군과 같은 기억돌 질환, 트롬복세인 A2 기능장애, 혈소판무력증, 베르나르-술리에 증후군), 용혈성-요독증 증후군, 혈우병 A 또는 인자 VII 결핍과 같은 혈우병, 및 크리스마스 질환 또는 인자 IX 결핍, 렌두 오슬러 웨버 병으로 불리우는 유전성 출혈성 말초혈관 확장증, 알레르기성 자반병(헤노흐-쑤라인 자반증) 및 과중성 혈관내 응고병증을 포함하나, 이제 제한되지 않는 출혈 질환을 진료하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<844> 혈액응고시간에 대한 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질의 효과는 전혈 부분트롬보플라스틴 시간(PTT), 활성 부분트롬보플라스틴 시간(aPTT), 활성 혈액응고시간(ACT), 재석회화된 활성 혈액응고시간, 또는 이-화이트(Lee-White) 혈액응고시간을 포함하나, 이에 제한되지 않는 당업계에서 공지된 임의의 혈액응고시간을 이용하여 모니터링될 수 있다.

<845> 여러 질환 및 다양한 약물은 혈소판 기능장애를 야기시킬 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 신장 질환, 백혈병, 다발성 골수종, 간경변증, 및 전신 홍반성 낭창을 수반하는 혈소판 기능이상, 및 아스피린, 티클로피딘, 비스테로이드성 항염증약물(관절염, 통증, 염좌용으로 이용됨), 및 고용량의 페니실린으로의 치료를 포함하는 약물 치료법과 관련된 혈소판 기능장애와 같은 후천성 혈소판 기능장애를 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<846> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 증가되거나 감소된 수의 백혈구에 의해 특정되거나 이와 관련된 질병 및 질환을 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다. 백혈병은 백혈구 수가 정상 미만으로 감소되는 경우 발생한다. 백혈병은 호중구감소증 및 림프구감소증을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 정상치와 비교하여 백혈구

수의 증가는 백혈구증가증으로서 알려져 있다. 신체는 감염 동안 증가된 백혈구 수를 발생시킨다. 따라서, 백혈구감소증은 단순히 감염을 반영한 정상 생리인자일 것이다. 대안적으로는, 백혈구감소증은 상해 또는 암과 같은 다른 질환의 척도일 수 있다. 백혈구감소증은 호산구증가증, 및 대식세포의 축진을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 백혈구증가증을 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 백혈구증가증을 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<847> 백혈구증가증은 모든 타입의 백혈구의 일반화된 감소를 나타내거나, 특정 타입의 백혈구의 특정 고갈일 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 호중구감소증으로 알려진 호중구 수의 감소를 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질에 의해 진단되고, 예측되고, 예방되고, 및/또는 치료될 수 있는 호중구감소증은 유아성 유전의 무과립세포증, 가족성 호중구감소증, 주기적 호중구감소증, 다이어트 결핍(예를 들어, 비타민 B12 결핍 또는 엽산 결핍)으로부터 초래되거나 이와 관련된 호중구감소증, 약물 치료법(예를 들어, 페니실린 치료, 숄폰아미드 치료, 항응고제 치료, 항경련제, 항갑상선 약물, 및 암 화학요법과 같은 항생물질 요법)으로부터 초래되거나 이와 관련된 호중구감소증, 및 일부 박테리아 또는 바이러스 감염, 알레르기성 질병, 자가면역 질환, 개개인이 확장된 비장을 갖는 병태(예를 들어, 펠티 증후군, 말라리아 및 유흥종증), 및 일부 약물 치료 요법과 관련하여 발생할 수 있는 증가된 호중구 파괴로부터 초래되는 호중구감소증을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<848> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 스트레스, 약물치료(예를 들어, 코르티코스테로이드, 암 화학치료 및/또는 방사선 치료와 함께 약물 치료), AIDS 감염 및/또는 예를 들어 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 만성 감염, 일부 바이러스 감염 및/또는 유전성 질환(예를 들어, 디조지 증후군, 비스코트올드리치 증후군, 심한 결합된 면역결핍, 혈관확장성 운동실조증)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 림프구감소증(감소된 수의 B 및/또는 T 림프구)를 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<849> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 고세병, 니만 피크병, 레테르시베병 및 한트슬러크리스찬병을 포함하나, 이에 제한되지 않는 대식세포 수 및/또는 대식세포 기능과 관련한 지병 및 질환을 진단하고, 예측하고, 예방하고 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<850> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 특발성 과호산성 증후군, 호산성-근통증 증후군, 및 한트슬러크리스찬병을 포함하나, 이에 제한되지 않는 호산구 수 및/또는 호산구 기능과 관련한 질병 및 질환을 진단하고, 예측하고, 예방하고 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<851> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 급성 림프성 백혈병(ALL), 급성 골수성(골수세포성, 골수원성, 골수아구, 또는 골수단구성) 백혈병, 만성 림프성 백혈병(예를 들어, B 세포 백혈병, T 세포 백혈병, 세자리 증후군, 및 모발세포 백혈병), 만성 골수세포성(골수성, 골수원성, 또는 과립구성) 백혈병, 호치킨 림프종, 비호치킨 림프종, 버킷 림프종, 및 용상식육종을 포함하나, 이에 제한되지 않는 백혈병 및 림프종을 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<852> 다른 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 형질 세포 질환, 모노클론 감마글로불린장애, 결정되지 않은 유의성의 모노클론 감마글로불린장애, 다발성 골수종, 매크로글로불린혈증, 왈덴스트롬 매크로글로불린혈증, 한냉글로불린혈증, 및 레이노 현상을 포함하나, 이에 제한되지 않는 형질 세포의 질환 및 질병을 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.

<853> 다른 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백질은 진성 다혈구증, 비교 적혈구증가증, 이차 적혈구증가증, 골수섬유증, 급성 골수섬유증, 특발성 골수섬유화증, 혈소판증가증(원발 및 이차 적혈구증가증 모두 포함) 및 만성 골수구백혈병을 포함하나, 이에 제한되지 않는 골수증식성 질환을 치료하고, 예방하고, 및/또는 진단하는데 유용할 수 있다.

<854> 다른 구체예에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 일부인 융합 단백

질은 외과수술 전치료법으로서 혈구 생성을 증가시키는데 유용할 수 있다.

- <855> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 호중구, 호산구 및 대식세포의 이동, 식세포작용, 초과산화물 생산, 항체 의존 세포독성을 개선시키기 위한 제제로서 유용할 수 있다.
- <856> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 줄기세포 분리술 전에 줄기세포의 수를 증가시키기 위한 제제로서 사용될 수 있다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 혈소판 분리술 전에 순환하는 줄기세포의 수를 증가시키기 위한 제제로서 유용할 수 있다.
- <857> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 시토킴 생성을 증가시키기 위한 제제로서 유용할 수 있다.
- <858> 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 원발 조혈질환을 예방하고, 진단하고, 및/또는 치료하는데 유용할 수 있다.
- <859> **과다증식성 질환**
- <860> 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 과다증식성 질환을 치료하거나 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 직접 또는 간접 상호작용을 통해 질환의 증식을 억제할 수 있다. 대안적으로는, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 과다증식성 질환을 억제할 수 있는 다른 세포를 증식시킬 수 있다.
- <861> 예를 들어, 면역 반응을 증가시키고, 구체적으로 과다증식성 질환의 항원양을 증가시키므로써, 또는 T-세포를 증식시키거나, 분화시키거나 이동시키므로써, 과다증식성 질환이 치료될 수 있다. 이러한 면역 반응은 현존하는 면역 반응을 향상시키거나, 신규한 면역 반응을 개시시키므로써 증가될 수 있다. 택일적으로는, 면역 반응의 감소는 화학요법 제제와 같은 과다증식성 질환을 치료하는 방법일 수 있다.
- <862> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 치료되거나 검출될 수 있는 과다증식성 질환의 예로는 대장, 복부, 뼈, 흉부, 소화기 계통, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 안구, 후두, 신경계(중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉곽, 및 비뇨생식기관에 위치하는 신생물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- <863> 유사하게, 다른 과다증식성 질환은 또한 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 치료되거나 검출될 수 있다. 이러한 과다증식성 질환의 예로는 상기 기관계에 위치한 신생물을 제외하고 급성 소아림프모구백혈병, 급성 림프모구백혈병, 급성 림프구백혈병, 급성 골수백혈병, 부신 길질암종, 성인(원발) 간세포성 암종, 성인(원발) 간암, 성인 급성 림프구백혈병, 성인 급성 골수백혈병, 성인 호치킨병, 성인 호치킨림프종, 성인 림프구백혈병, 성인 비호치킨림프종, 성인 원발 간암, 성인 연조직 육종, AIDS 관련 림프종, AIDS 관련 악성종양, 항문암, 성상세포종, 담관암, 방광암, 골수암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌종양, 유방암, 신우 및 수뇨관의 암, 중추신경계(원발) 림프종, 중추신경계 림프종, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종, 경부암, 유아(원발) 간세포성 암, 유아(원발) 간암, 유아 급성 림프모구백혈병, 유아 급성 골수성백혈병, 유아 뇌줄기 신경교종, 유아 소뇌 성상세포종, 유아 대뇌 성상세포종, 유아 두개의 생식세포 종양, 유아 호치킨 질환, 유아 호치킨 림프종, 유아 시상하부 및 시각경로 신경교종, 유아 림프모구백혈병, 유아 속질모세포종, 유아 비호치킨 림프종, 유아 송과체 및 천막위 원신경외배엽종양, 유아 원발 간암, 유아 횡문근육종, 유아 연조직 육종, 유아 시각경로 및 시상하부 신경교종, 만성 림프구백혈병, 만성 골수백혈병, 대장암, 피부 T-세포 림프종, 내분비성 췌장 소도세포 암종, 자궁내막암, 상피세포종, 상피암, 식도암, 유방암 및 관련된 종양, 외분비성 췌장암, 두개의 생식세포 종양, 고환외 배아세포종양, 간외담관암, 안구암, 여성 유방암, 고세병, 담낭암, 위암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 종양, 배아세포 종양, 임신성 영양막 종양, 모발세포 백혈병, 후두암, 간세포성 암, 호치킨병, 호치킨 림프종, 감마글로블린증가증, 하인두암, 장암, 안구 흑색종, 소도세포암종, 소도세포 췌장암, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 입술 및 경구암, 간암, 폐암, 림프증식성 질병, 마크로글로블린혈증, 남성 유방암, 악성 중피종, 악성 흉선종, 속질모세포종, 흑색종, 중피종, 전이성 참박원발 평편 경부암, 전이성 원발 편평경부암, 전이성 평편경부암, 다발성 골수종, 다발성 골수종/형질 세포 신생물, 골수 이형성 증후군, 골수원성백혈병, 골수성백혈병, 골수증식성 질환, 비장 및 부비강암, 비인두암, 신경모세포종, 임신중 비호치킨 림프종, 비흑색종 피부암, 비소세포 폐암, 잠재원발 전이성 편평 육암, 입인두암, 골-/악성 섬유

유 육종, 골육종/악성 섬유성 조직구종, 뼈의 골육종/악성 섬유성 조직구종, 난소상피암, 난소배아세포 종양, 난소 낮은 악성 잠재적 종양, 췌장암, 과라단백혈증, 자색반병, 부갑상선암, 음경암, 크롬친화모세포종, 뇌하수체 종양, 형질세포 신생물/다발성 골수종, 원발성 중추신경계 림프종, 원발성 간암, 전립선암, 직장암, 신장세포암, 신장 골반 및 요관암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘암, 사르코이드 육종, 세자리 증후군, 피부암, 소세포 폐암, 작은창자암, 연조직 육종, 평판 목암, 위암, 천막위 원시신경외배엽 및 송과체 종양, T-세포 림프종, 고환암, 가슴샘종, 갑상선암, 신장골반 및 요도관의 전이성 세포암, 전이성 신장골반 및 요도관암, 영양막 종양, 요도관 및 신장골반 세포암, 요도암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 시각경로 및 시상하부 신경아교종, 음문암, 왈덴스트롬 마크로글로불린혈증, 빌름스 종양, 및 임의의 기타 과다증식성 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<864> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질은 상술된 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는 전암성 병태를 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료하며, 이러한 종양 또는 악성 상태로의 진행을 예방하는데 사용된다. 이러한 용도는 신생물 또는 암으로의 진술한 진행으로 알려지거나 의심되는 병태, 구체적으로 증식증, 화생으로 구성된 비신생물 세포 성장, 또는 가장 구체적으로, 형성이상이 발생함에서 지시된다[비정상적 성장 병태의 리뷰; Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B.Saunders Co., Philadelphia, pp.68-79].

<865> 증식증은 조절된 세포 증식의 형태로서, 구조 또는 기능의 현저한 개조없이, 조직 또는 기관에서 세포의 수의 증가를 수반한다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질로 진단되고, 예측되고, 예방되고 및/또는 치료될 수 있는 증식증 질환은 혈관여포양 종격동 임파선증식증, 호산구 증가증을 동반한 혈관 림프관 과형성, 부정형 멜라닌 세포종증식증, 기저세포증식증, 양성 거대림프 임파선증식증, 시멘트질 증식증, 선천부신증식증, 선천피지증식증, 낭종증식증, 유방의 낭종증식증, 의치증식증, 담관증식증, 자궁내막증식증, 섬유근증식증, 국소상피 증식증, 잇몸증식증, 염증섬유 증식증, 염증유두모양 증식증, 혈관내유두모양 내피증식증, 전립선의 결절증식증, 결절제생증식증, 거짓상피종증식증, 노인피지증식증, 및 사마귀모양증식증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<866> 화생은 조절된 세포 성장의 형태로서, 한가지 타입의 성인 세포 또는 전부 분화된 세포는 다른 형태의 성인세포에 대해 치환한다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질로 진단되고, 예측되고, 예방되고 및/또는 치료될 수 있는 화생 질환은 원인불명골수화생, 아포크린화생, 비정형화생, 자동실질성 화생, 연결조직화생, 상피화생, 장화생, 화생성빈혈, 화생성 골화, 화생성 폴립, 골수화생, 원발성 골수화생, 이차 골수화생, 편형화생, 양막의 편평화생, 및 증상 골수화생을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<867> 형성이상은 종종 암의 선구체이며 주로 상피에서 발견되는데, 개개 세포 균일성 및 세포의 건축 배향의 손실을 포함하는, 비신생물 세포 성장의 가장 무질서한 형태이다. 형성이상 세포는 종종 비정상적으로 거대하며, 진하게 핵을 손상시키며, 다형태로 존재한다. 형성이상은 장기간 조사 또는 염증이 존재하는 경우에 특징적으로 발생한다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질로 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료될 수 있는 형성이상 질환은 무한성 외배엽형성이상, 안면형성이상, 질식 흉부형성이상, 손가락동맥형성이상, 기관지폐형성이상, 대뇌형성이상, 경부형성이상, 연골외배엽성형성이상, 쇄골 두개골형성이상, 선천성외배엽형성이상, 두개골간형성이상, 두개카르포타살형성이상, 두개중간뼈형성이상, 상아질형성이상, 골간형성이상, 외배엽형성이상, 사기질형성이상, 뇌-안구형성이상, 형성이상성 골단 반지증, 다발골간 형성이상, 골간점형성이상, 상피형성이상, 안면디지토생식기관형성이상, 턱의 가족섬유형성이상, 가족백색 주름형성이상, 섬유근형성이상, 뼈의 섬유형성이상, 개화성 뼈형성이상, 유전성 신장-망막형성이상, 발한외배엽형성이상, 땀저하외배엽형성이상, 림프구가슴생형성이상, 유방형성이상, 하악안면형성이상, 뼈몸통끝형성이상, 몬디니형성이상, 단일골형성이상, 점막상피형성이상, 다발성 골단형성이상, 안이척추형성이상, 안이지형성이상, 안이척추형성이상, 치원성형성이상, 눈근육하악형성이상, 치근단주위시멘트질형성이상, 다골섬유형성이상, 유사연골발육 척추사지골단형성이상, 망막형성이상, 코중격-안구형성이상, 척추사지골단형성이상, 및 심실방사형성이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<868> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엔코딩 알부민 융합 단백질로 진단하고, 예측하고, 예방하고, 및/또는 치료될 수 있는 추가적인 사전-신생물 질환은 악성 이상증식질환(예를 들어, 악성 종양, 섬유낭병태, 조직 비대, 장폴립, 결장폴립 및 식도형성이상), 백혈병, 각화증, 보웬병, 파머스 스킨, 광선입술염, 및 광선각화증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- <869> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 본 발명의 폴리펩티드가 발현되는 조직과 관련한 질환을 진단하고/거나 예측하는데 이용될 수 있다.
- <870> 또 다른 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같이 독소 또는 방사활성 동위원소에 결합된 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 본원에서 기술된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는 암 및 신생물을 치료하는데 사용될 수 있다. 추가의 바람직한 구체예에서, 본원에서 기술된 바와 같이 독소 또는 방사활성 동위원소에 결합된 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 급성 골수백혈병을 치료하는데 사용될 수 있다.
- <871> 추가적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 세포사멸에 영향을 미칠 수 있으며, 그러므로 증가된 세포 생존 또는 세포사멸 억제와 관련된 다수의 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 및/또는 길항제에 의해 진단되고, 예측되고, 예방되고, 및/또는 치료될 수 있는 증가된 세포 생존 또는 세포사멸의 억제와 관련된 질환은 암(예를 들어, 소포림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 및 결장암, 심장 종양, 췌장암, 흑색종, 망막아세포종, 신경교아세포종, 폐암, 장암, 고환암, 위암, 신경모세포종, 점액종, 근종, 림프종, 내피종, 뼈세포종, 파골세포종, 뼈육종, 연골육종, 섬유종, 유방암, 전립선암, 카포시육종, 및 난소암을 포함하는 호르몬-의존 종양); 자가면역질환, 예를 들어 다발성 경화증, 췌그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 당뇨병 간경변증, 베체트씨병, 크론병, 다발근육염, 전신 홍반루푸스, 및 면역관련 사구체 신염 및 류마티스성 관절염) 및 바이러스 감염(예를 들어, 허프스 바이러스, 포스 바이러스 및 아데노바이러스), 염증, 이식 대 숙주 질환, 급성 이식거부, 및 만성 이식거부를 포함한다.
- <872> 다른 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질은 암, 구체적으로 상기 기술된 암의 성장, 진행 및/또는 전이를 억제하는데 사용된다.
- <873> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 진단되고, 예측되고, 예방되고 및/또는 치료될 수 있는 증가된 세포 생존과 관련된 추가 질환 또는 병태는 백혈병(급성 백혈병(예를 들어, 림프구 백혈병, 급성 골수세포 백혈병(골수모백혈병, 꽃골수세포백혈병, 골수단핵구백혈병, 단핵구 백혈병, 및 적백혈병을 포함), 및 만성 백혈병(예를 들어 만성 골수세포(과립백혈구)백혈병, 및 만성 림프구백혈병)), 진성적혈구증가증, 림프종(예를 들어, 호치킨병 및 비호치킨병), 다발성골수종, 왈덴스트롬 마크로글로불린 혈증, 중쇄 질환, 및 섬유육종, 점액육종, 지질육종, 연질육종, 골원성육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관상피육종, 육활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 평편세포 암종, 기저세포 암종, 섬유암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두암종, 유두섬암종, 낭섬암종, 속질암종, 기관지유래암종, 신장세포 암종, 간암, 담즙관 암종, 맥락암종, 고환종, 배아암종, 빌립스 암종, 경부암, 고환종양, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광암종, 상피 암종, 신경아교종, 별아교세포종, 속질모세포종, 뇌실막세포종, 솔방울샘종, 혈관모세포종, 소리신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 및 망막모세포종을 포함하나 이에 제한되지 않는 암 및 관련된 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- <874> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 진단되고, 예측되고, 예방되고, 및/또는 치료될 수 있는 증가된 세포사멸과 관련된 질환은 AIDS; 신경퇴행성 질환(예를 들어, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근육무긴장 외측경화증, 색소망막염, 소뇌퇴행 및 뇌종양 또는 종래 관련된 질환); 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증, 췌그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 담즙 경화증, 베체트씨병, 크론병, 다발근육염, 전신홍반루푸스, 및 면역관련 사구체신염 및 류마티스성 관절염), 척수형성이상 증후군(예를 들어 무형성 빈혈), 이식 대 숙주 질환, 허혈손상(예를 들어, 심근 감염, 뇌졸중 및 재관류손상에 의해 야기되는 질환), 간손상(예를 들어, 간염관련 간손상, 허혈/재관류손상, 쓸개즙정체(담즙관 손상) 및 간암); 독소-유래 간 질환(예를 들어 알코올에 의해 야기되는 질환), 감염 쇼크, 약액질 및 식욕부진을 포함한다.
- <875> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 진단되고, 예측되고 및/또는 치료될 수 있는 과다증식성 질환 및 질병은 간, 복부, 가슴, 소화계, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 가슴샘, 갑상샘), 안구, 머리 및 목, 신경계(중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 가슴, 및 요로관에 위치하는 신생물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <876> 유사하게, 다른 과다증식성 질환은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 인코딩 알부민 융합 단백질에 의해 진단되고, 예측되고, 예방되고, 및/또는 치료될 수 있다. 이러한 과다증식성 질환의 예로는 신생물이외에 상술된 기관계에 위치하는 고감마글로불린혈증, 림프세포증식질환, 파라단백혈증, 자색반병,

사르코이드증, 세자리병, 왈덴스트롬 마크로글로불린 혈증, 고세병, 조직구증, 및 임의의 다른 과다증식성 질환을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- <877> 또 다른 바람직한 구체예는, 본 발명에서 사용하고 있는 유전자 치료에 의해, 비정상인 세포의 분화를 억제하기 위한 본 발명의 알부민 융합 단백질을 코딩화하고 있는 폴리뉴클레오티드 및/또는 그들의 단백질 융합 또는 조각들을 사용한다.
- <878> 따라서, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질이 엔코딩된 폴리뉴클레오타이드인 비정상적 증식 세포로의 삽입에 의한 세포 증식 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- <879> 본 발명의 또 다른 구체예는 비정상적인 증식 세포 또는 세포로 하나 이상의 본 발명의 활성 유전자 카피들을 투여하는 단계를 포함하는 개인의 세포 증식성 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드를 엔코딩하는 DNA 시퀀스를 효과적으로 발현하는 재조합 표현 벡터를 포함하는 DNA 구조물이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA 구조물은 리트로 바이러스 또는 보다 바람직하게는 아데노바이러스(adenoviral) 벡터를 사용하여 처리되도록 하기 위해 세포로 삽입된다(본원에 참조로서 포함되는, G J.Nabel, et.al., PNAS 1999 96: 324-326 을 참조). 가장 바람직한 구체예에서, 바이러스의 벡터는 불완전하고, 비증식성 세포로 변형되지 않는, 증식성 세포이다. 또한, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 증식세포 단독, 또는 다른 뉴클레오티드와 조합되고 융합된 증식세포로 삽입되고, 다음에 외부 자극(즉, 마그네틱, 특정의 작은 분자, 화학제 또는 약 투여 등)을 통해 조정될 수 있고, 그 다음 엔코딩된 단백질 제품의 표현을 유발하기 위해 상기 폴리뉴클레오티드의 상류 프로모터상에 작용한다. 본 발명의 유용한 치료적 효과와 같은 것은 상기 외부 자극에 근거하여 명백히 조정된다(즉, 본 발명의 증가, 감소 또는 억제 발현).
- <880> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 종양발생성 유전자 또는 항원의 발현을 억제하는데 유용할 수 있다. "종양발생성 유전자의 억제 발현"에 의해 유전자 전사의 억제, 상기 유전자 전사(프리-메시지 RNA)의 파괴, 접합의 억제, 메신저 RNA의 파괴, 단백질의 해독 후 변형의 금지, 단백질의 파괴 또는 단백질의 기본적 기능의 억제가 의도된다.
- <881> 비정상적인 증식 세포로의 국소 투여에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 제한되지는 않지만, 트랜스펙션, 전기 천공(electroporation), 셀의 현미 주사(microinjection), 또는 리포솜, 리포펙틴(lipofectin)과 같은 운반체에서, 또는 폴리뉴클레오티드 그대로를 포함하는 당업계에서 알려진 어떠한 방법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 제한되는 것은 아니지만, 당업계에 알려져 있는 리트로 바이러스 벡터(Gilboa, J. Virology 44: 845(1982); Hocke, Nature 320:275 (1986); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 미국A. 85: 3014), 우두 바이러스 시스템(Chakrabarty et al., Mol Cell Biol. 5: 3403 (1985) 또는 다른 효율적인 DNA 전달 시스템(Yates et al., Nature 313: 812(1985))과 같은 알려진 유전자 전달 시스템에 의해 전달될 수 있다. 이러한 참조문헌들은 단지 여기서 참조로서 예시된다. 비정상적 분열 및 여분의 분열하지 않는 세포를 특별히 전달하거나 전달 감염하기 위해, 당업계에서 잘 알려진 리트로 바이러스 또는 아데노바이러스(당업계에서 기재된 바와 같고 여기 어디선가 존재하는) 전달 시스템을 사용하는 것이 바람직하다. 호스트 DNA 복제가 통합하는 리트로 바이러스 DNA를 위해 필요하기 때문에, 리트로 바이러스는 그 라이프 사이클이 필요로 하는 리트로 바이러스 유전자의 부족으로 인해 스스로 복제할 수 없게 될 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 위한 리트로 바이러스 전달 시스템의 사용은 상기 유전자를 목표로 하고 비정상적 증식 세포를 구성하고 분열하지 않는 기준 세포를 면하게 한다.
- <882> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 내부 기관의 세포 증식성 질환/병 부위, 체강 및 이와 유사한 것들로 상기 병 부위로 직접적으로 주사 주입하는 가이드로 사용되는 영상 장치의 사용에 의해 직접적으로 전달될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 외과 간섭의 시점에서 병 부위로 투여될 수도 있다.
- <883> "세포 증식성 질환"은 기관의 어떤 하나 또는 어떤 조합, 텅 빈 구멍 또는 신체 일부에 영향을 미치는 모든 인간 또는 동물의 질병으로 의미되고, 그리고 그것은 유익하든지 해가 되든지 간에 세포, 세포의 군, 또는 조직의 단일 또는 다중의 국소 비정상적 증식을 특징으로 한다.
- <884> 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 어떤 양이라도 처리되는 세포의 증식에 생물학적 억제 효과를 나타내는 만큼 투여될 수 있다. 더구나, 같은 부위로 동시에 하나 이상의 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 투여가 가능하다. "생물학적 억제"는 세포의 증식 또는 성장의 속도가 감소하는 만큼 부분 또는 전체 성장의 억제를 의미한다. 생물학적 억제 용량은 조직 배양에서 악성 또는 비정상적 증식 세포 성장, 동물 및 세포 배양에서의 종양 성장, 또

는 당업계에서 일반적으로 알려진 어떤 다른 방법을 목표로 한 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 효과를 평가하는 것에 의해 결정될 수 있다.

<885> 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 엔코딩된 폴리뉴클레오티드는 단독으로, 융합 단백질, 또는 여기서 기재된 다른 폴리펩타이드들과 직접적 또는 간접적으로 조합되어, 증식성 세포 오티슈(ortissues)의 혈관 형성을 억제하는데 유용하게 된다. 가장 바람직한 구체예에서, 상기 항 혈관 형성 효과는, 예를 들어, 종양 관련 포식세포와 같은 조혈, 암 특유 세포의 억제를 통하여 간접적으로 달성될 수 있다(본원에 참조로서 포함되는, Joseph IB, et al. J Natl Cancer Inst, 90(21):1648-53 (1998)을 참조).

<886> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질이 엔코딩된 폴리뉴클레오티드는 세포사멸의 유도를 통해 증식 세포 또는 조직을 억제하는데 유용하게 될 수 있다. 이러한 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 사멸-도메인 수용체의 활성화에 있어서, 종양 괴사 인자(TNF) 수용체-1, CD95(Fas/APO-1), TNF-수용체-관련 세포사멸-매개 단백질(TRAMP) 및 TNF-관련 세포사멸-유도 리간드(TRAIL) 수용체-1 및 -2(본원에 참조로서 포함되는, Schulze-Osthoff K, et.al., Eur J Biochem 254(3):439-59 (1998)을 참조)와 같은 증식 세포 또는 조직의 세포 사멸을 유도하도록 직접 또는 간접적으로 작용할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 또 다른 구체예에서, 이러한 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 세포사멸을 활성화하는 다른 단백질의 활성화 또는 단독 또는 아포토닌(apoptonin), 갈락틴(galectins), 티오레독신, 항염증 단백질(본원에 참조로서 포함되는, Mutat Res 400(1-2):447-55 (1998), Med Hypotheses.50(5):423-33 (1998), Chem Biol Interact. Apr 24 111-112:23-34 (1998), J Mol Med.76(6):402-12 (1998), Int J Tissue React;20(1):3-15 (1998)를 참조)과 같은 작은 분자 약물 또는 보조제와 조합된 단백질들의 발현의 자극을 통한 것과 같은 메커니즘을 통해 세포사멸을 유도할 수 있다.

<887> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩한 폴리뉴클레오티드는 증식성 세포 또는 조직의 전이를 억제하는데 유용하다. 억제는 직접적으로 이러한 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 투여한 결과, 또는 예를 들어 알파 4 인테그린(integrins)(본원에 참조로서 포함되는, Curr Top Microbiol Immunol 1998;231:125-41을 참조)과 같은 전이를 억제하는 단백질의 발현을 활성화하는 것과 같은 간접적인 방법을 통해 일어날 수 있다. 본 발명의 치료적 효과는 단독 또는 작은 분자 약물 또는 보조제와 조합하여 달성될 수 있다.

<888> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합되고, 결합하고, 또는 연합하는 폴리펩타이드가 발현되는 세포를 목표로 하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 전달하는 방법을 제공한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 소수성, 친수성, 이온성 및/또는 공유결합을 통해 다른 종류 폴리펩타이드, 다른 종류 핵산, 독소 또는 약물의 전구체와 연합될 수 있다.

<889> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 직접적으로 만약 본 발명의 알부민 융합 단백질이 증식성 항원과 면역원에 반응하기 위해 "접종되거나", 또는 간접적으로, 언급된 항원과 면역원에 있어서 면역성의 응답(예를 들면, 케모카인)을 강화하는 것으로 알려진 단백질 발현의 활성화를 통해 증식세포 또는 조직의 면역원성 및/또는 항원성을 강화하는데 유용하다.

<890> 신장 질환

<891> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩한 폴리뉴클레오티드는 신장 시스템의 질환을 치료하고, 억제하고, 진단하고 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물로 진단, 예방, 억제, 및/또는 치료될 수 있는 신장 질환은, 제한되는 것은 아니지만, 신부전, 신장염, 신장의 혈관 질환, 대사 및 선천성 신장질환, 신장의 요로질환, 자가면역병, 경화증 및 탈저, 전해질 불균형, 및 신장암을 포함한다.

<892> 본 발명의 조성물로 진단, 예방, 억제, 및/또는 치료될 수 있는 신장 질환은, 제한되는 것은 아니지만, 급성 신부전, 만성 신부전, 죽종성색전 신부전(atheroembolic renal failure), 말기 신장 질환, 신장의 염증 질환(예를 들면, 급성 사구체 신장염, 감염후 사구체신염, 급속진행성 사구체신염, 신증후군, 막증식성 사구체신염, 가족성 신증후군, 막증식성 사구체신염 I 및 II, 혈관간세포증식 사구체신염, 만성 사구체신염, 급성 세뇨관간질신염, 만성 세뇨관간질신염, 급성 연쇄구균감염후 사구체신염(PSGN), 신우신염, 루푸스 신장염, 만성 신장염, 간질 신장염(interstitial nephritis), 및 급성 연쇄구균감염후 사구체신염), 신장의 혈관 질환(예를 들면, 신장 경색 형성, 죽종성색전(atheroembolic) 신장 질환, 피질 탈저, 악성 신장경화증, 신장 정맥 혈전증, 신장 저관류(underperfusion), 신장 망막증, 신장 허혈-재관류(renal ischemia-reperfusion), 신장 동맥 색전증, 및 신

동맥 협착), 및 신장 질환의 결과로 생기는 요로 질환(예를 들면, 신우신염, 수신증, 요석증(신장 담석증, 신석증), 역류성 신병증, 요로 감염, 요축적, 및 급성 또는 만성 한쪽 폐쇄성 요로병증)을 포함한다.

<893> 또한, 본 발명의 조성물은 대사 및 선천성 신장질환(예를 들면, 요독증, 신성 아밀로이드증, 신성 골이영양증, 신성 관형 아시도시스, 신 글루코시노, 신성 요붕증, 시스틴뇨, 팬코니 증후군, 신장 섬유 골화증(renal fibrocystic osteosis)(신성 구루병), 하아트넵병(Hartnup disease), 밴터 증후군(Banter's syndrome), 리들 증후군(Liddle's syndrome), 다낭신 병, 수질 낭성 신장, 수질성 해면신, 알포트 증후군(Alport's syndrome), 조갑 슬개골 증후군(nail-patella syndrome), 선천적인 신증후군, 크러쉬(CRUSH) 증후군, 마제형신, 당뇨병성 신증, 신성 요붕증, 진통제인성 신병증, 신장 결석, 및 막성 신증), 및 신장의 자가면역병(예를 들면, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 굿패스처 증후군, IgA 신병증, 및 IgM 혈관관 세포증식성 사구체신염)을 진단, 예방, 억제, 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.

<894> 본 발명의 조성물은 또한 신장의 괴사 질환(예를 들면, 사구체경화증, 당뇨병성 신증, 국소분절 사구체경화증(FSGS), 괴사 사구체신염, 및 신 유두 괴사), 신장암(예를 들면, 신종, 하이페메프롬아(hypemephroma), 신모세 포종, 신장 세포암, 변형 세포암, 신선암, 편평세포암, 및 윌름 종양(Wilm's tumor)), 및 전해질 불균형(예를 들면, 신석회증, 뇨뇨, 부종, 수신장염(hydronephritis), 단백뇨, 저나트륨혈증, 하이페마트레미아(hypematremia), 저칼륨혈증, 고칼륨혈증, 저칼슘혈증, 고칼슘 혈증, 저인산혈증, 및 과인산혈증)을 진단, 예방, 억제, 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.

<895> 본 발명의 조성물은, 제한되는 것은 아니지만, 전달 사이트에서의 직접적인 바늘 주입, 정맥 주사, 국소 투여, 도관 주입, 바이오리스팅(biolistic) 주사기, 입자 액셀러레이터, 젤폼 스폰지 데포, 다른 시판되는 데포 물질, 삼투 펌프, 경구 또는 좌약식 고체 제형, 수술하는 동안 따르거나 국소 적용, 에어로졸 전달을 포함하여 당업계에서 알려진 어떤 방법이든지 사용하여 투여할 수 있다. 어떤 방법들은 당업계에서 알려져 있다. 본 발명의 조성물은 하기에서 더욱 자세하게 설명되는 것처럼 치료적인 양의 부분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 전달하는 방법들은 여기서 더욱 자세하게 기술된다.

<896> **심혈관 질환**

<897> 본 발명의 알부민 용합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩한 폴리뉴클레오티드는 제한되는 것은 아니지만, 사지 허혈과 같은 말초 동맥 질환을 포함하는 심혈관 질환을 치료하고, 억제하고, 진단하고 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

<898> 심혈관 질환에는, 제한되는 것은 아니지만, 동맥-동맥 누공, 동정맥루, 뇌 동정맥 기형, 선천성 심장 결함, 폐 동맥폐쇄, 및 신월도 증후군과 같은 심혈관 이상을 포함한다. 선천성 심장 결함은, 제한되는 것은 아니지만, 대동맥 축착, 삼방심, 심장동맥 혈관의 기형, 십자형 심장, 우심증, 동맥관개존, 에브스타인 기형, 아이젠메거(Eisenmenger) 복합체, 좌심실 형성부전 증후군, 좌심증, 팔로사징후, 대혈관전위증, 양대 혈관 우실 기시증, 삼첨판 폐쇄, 동맥간 잔존, 및 대동맥 폐동맥 중격 결손, 심내막상 심실결손, 루템바커(Lutembacher's)의 증후군, 팔로삼징후(trilogy of fallot), 심실 심중격결손과 같은 심중격결손을 포함한다.

<899> 심혈관 질환은 또한, 제한되는 것은 아니지만, 부정맥, 카르시노이드 심장병, 높은 심장 출력, 낮은 심장 출력, 심낭 압전, 심내막염(박테리아를 포함하는), 심장 동맥류, 심장 정지, 충혈성 심부전, 울혈성 심근증, 발작성 호흡곤란, 심장의 부종, 심장 비대, 울혈성 심근증, 왼쪽 심실의 비대, 오른쪽 심실의 비대, 경색후 심장결손, 심실 중격결손, 심장 판막증, 심근 질환, 심근 허혈, 심장의 유출, 심낭염(협착성과 결핵성을 포함하는), 심막 기종, 심막절개후 증후군, 폐의 심장병, 류머티스성 심장병, 심실 기능 부전, 충혈, 심혈관의 임신 합병증, 신 월도 증후군, 심혈관 매독, 및 심혈관 결핵과 같은 심장 질환을 포함한다.

<900> 부정맥은, 제한되는 것은 아니지만, 동부정맥, 심방세동, 심방 조동, 서맥, 기외수축, 아담스 스톱스 증후군, 다발-가지 블록, 동방차단, 긴 QT 증후군, 부수축, 론-가농-레빈(Lown-Ganong-Levine) 증후군, 마하임 타입(Mahaim-type) 전자극 증후군, 울프-파킨슨-화이트 증후군, 아픈 공동 증후군, 심박 급속증, 및 심실 연축을 포함한다. 심박 급속증은 발작성 빈맥, 상실성 빈맥증, 가속 자발성 심실 율동, 방실 결절 재입 심박 급속증, 이소성 심방성 빈맥, 이소성 경계 심박 급속증, 동방 결절 재입 심박 급속증, 공동 심박 급속증, 토사데 드 포인트(Torsades De Pointes), 및 심실 심박 급속증을 포함한다.

<901> 심장 판막증은, 제한되는 것은 아니지만, 대동맥관 기능저하, 대동맥관 협착, 심장 잡음, 대동맥관 일탈, 승모판 탈출증, 삼첨판 탈출증, 승모판 폐쇄부전증, 승모판 협착증, 폐동맥폐쇄, 폐동맥관 폐쇄부전, 폐동맥관 협착, 삼첨판 폐쇄, 삼첨판 기능저하, 및 삼첨판 협착증을 포함한다.

- <902> 심근 질환은, 제한되는 것은 아니지만, 알코올성 심근병증, 울혈성 심근증, 비후형 심근병증, 대동맥 판막하부 협착, 폐의 판막하부 협착, 제한성 심근병증, 샤가스(Chagas) 심근병증, 심내막섬유 탄성증, 심근심내막 섬유증, 킴스(Keams) 증후군, 심근 재관류 손상, 및 심근염을 포함한다.
- <903> 심근 허혈은, 제한되는 것은 아니지만, 협심증, 관상 동맥류, 관상 동맥 경화, 관상 혈전증, 관상 혈관 경축, 심근 경색, 및 심근 스테닝(stunning)과 같은 관상 질환을 포함한다.
- <904> 심혈관 질환도, 동맥류, 혈관 이형성증, 혈관종증, 간균의 혈관종증, 히펠-린다우(Hippel-Lindau) 병, 클리펠-트레나우네이-웨버(Klippel-Trenaunay-Weber) 증후군, 스톨지-웨버(Sturge-Weber) 증후군, 혈관 신경성 부종, 대동맥 병, 다카야스 동맥염, 대동맥염, 레리체(Leriche) 증후군, 두개강내동맥폐쇄성 질환, 동맥염, 내동맥염 (enarteritis), 결절성 다발성 동맥염, 뇌혈관 장애, 당뇨병성 맥관장애, 당뇨병성 망막증, 혈전증, 홍색사지통 증, 지질, 간정맥폐쇄성 질환, 고혈압, 저혈압, 허혈, 말초혈관질환, 정맥염, 폐정맥폐색성 질환, 레이노병, 크레스트 증후군, 망막정맥 폐색, 신월도 증후군, 상대정맥 증후군, 말초혈관확장증, 실조 말초혈관확장증, 유전성 출혈 혈관확장, 정계정맥류, 하지 정맥류, 정맥류성 궤양, 혈관염, 및 정맥 기능부전과 같은 혈관질환을 포함한다.
- <905> 동맥류는, 제한되는 것은 아니지만, 박리 동맥류, 거짓 동맥류, 감염된 동맥류, 찢긴 동맥류, 대동맥 동맥류, 뇌 동맥류, 관상 동맥류, 심장 동맥류, 및 엉덩 동맥류를 포함한다.
- <906> 두개강내동맥폐쇄성 질환은, 제한되는 것은 아니지만, 동맥 경화, 간혈성 파행, 경동맥 협착, 섬유근성 형성장애, 창자간막 혈관 폐색, 모야모야병, 신장의 동맥 장애, 망막의 동맥 폐색, 및 폐쇄성 혈전혈관염을 포함한다.
- <907> 뇌혈관 장애는, 제한되는 것은 아니지만, 경동맥 질환, 뇌의 아밀로이드 혈관병증, 뇌의 동맥류, 대뇌 무산소증, 뇌동맥 경화, 뇌 동정맥 기형, 뇌의 동맥병, 뇌의 색전증 및 혈전증, 경동맥 혈전증, 공동 혈전증, 왈렌버그(Wallenberg) 증후군, 뇌출혈, 경막하혈종, 경막하혈종, 거미막밑 출혈, 뇌경색, 뇌허혈(일과성을 포함), 쇄골하동맥도류증후군, 뇌실 백질연화증(periventricular leukomalacia), 혈관성 두통, 군발 두통, 편두통, 및 척추골 뇌저동맥(기능)부전증을 포함한다.
- <908> 색전증은, 제한되는 것은 아니지만, 공기 색전증, 양수 색전증, 콜레스테롤 색전증, 푸른 발가락 증후군, 지방 색전증, 폐색전증, 항문 혈전색전증(ano thromboembolism)을 포함한다. 혈전증은, 제한되는 것은 아니지만, 관상동맥 혈전증, 간정맥 혈전증, 망막정맥 폐색, 경동맥 혈전증, 공동 혈전증, 왈렌버그(Wallenberg) 증후군, 및 혈전성정맥염을 포함한다.
- <909> 허혈성 질환은, 제한되는 것은 아니지만, 뇌허혈, 허혈성 대장염, 콤파트먼트(compartment) 증후군, 앞 콤파트먼트 증후군, 심근 허혈, 재관류 손상, 및 말초사지빈혈을 포함한다. 혈관염은, 제한되는 것은 아니지만, 대동맥염, 동맥염, 베체트 증후군, 척-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 피부점막담프절증후군, 폐쇄성 혈전혈관염, 과민증 혈관염, 쇼렐렌-헨녹(Schoenlein-Henoch) 자반병, 알레르기성 피부 혈관염, 및 베게너 육아종증을 포함한다.
- <910> 본 발명의 알부민 용합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩한 폴리뉴클레오티드는, 제한되는 것은 아니지만, 전달 사이트에서의 직접적인 바늘 주입, 정맥 주사, 국소 투여, 도관 주입, 바이오리스팅(biolistic) 주사기, 입자 액셀러레이터, 젤폼 스폰지 데포, 다른 시판되는 데포 물질, 삼투 펌프, 경구 또는 좌약식 고체 제형, 수술하는 동안 따르거나 국소 적용, 에어로졸 전달을 포함하여 당업계에서 알려진 어떤 방법 이든지 사용하여 투여할 수 있다. 어떤 방법들은 당업계에서 알려져 있다. 본 발명의 조성물은 하기에서 더욱 자세하게 설명되는 것처럼 치료적인 양의 부분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 전달하는 방법들은 여기서 더욱 자세하게 기술된다.
- <911> **호흡기 장애**
- <912> 본 발명의 알부민 용합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 호흡기 계통의 질병 및/또는 장애를 치료, 예방, 진단 및/또는 예후하기 위해 사용될 수 있다.
- <913> 호흡기 계통의 질병 및 장애로는 코 전정염, 비알레르기성 비염 (예를 들어, 급성 비염, 만성 비염, 위축 비염, 혈관운동 비염), 코 폴립(nasal polyp), 및 부비동염, 연소성 혈관섬유증, 코암 및 연소성 유두종, 성대 폴립, 결절 (가수 성대결절), 접촉성 궤양, 성대 마비, 후두낭종, 인두염 (바이러스 및 세균), 편도염, 편도 연조직염, 인두위턱 농양, 후두염, 후두낭종, 및 인후암 (예를 들어, 코인두암, 편도암, 후두암), 폐암 (예를 들어, 편평세포암, 소세포(small cell) (귀리 세포) 암종, 거대 세포(large cell) 암종, 및 선암종), 알레르기

성 장애 (호산성 폐렴, 과민성 폐렴 (예를 들어, 외인성 알레르기 폐포염, 알레르기 간질 폐렴, 유기 먼지 진폐증, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증, 천식, 베게너(Wegener) 육아종증 (육아종 혈관염), 굿패스처(Goodpasture) 증후군), 폐렴 (예를 들어, 세균성 폐렴 (예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) (폐렴구균성 폐렴), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) (포도상구균성 폐렴), 그람-음성 세균성 폐렴 (예를 들어, 클레브시엘라 종(*Klebsiella spp.*) 및 슈도마스 종(*Pseudomas spp.*)에 의해 유발됨), 미코플라스마 뉴모니에(*Mycoplasma pneumoniae*) 폐렴, 헤모필루스 인플루엔자 폐렴, 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*) (레지오넬라 질병), 및 클라미디아 시타시(*Chlamydia psittaci*) (앵무새병)), 및 바이러스성 폐렴 (예를 들어, 인플루엔자, 수두 (varicella)가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<914>

호흡기 계통의 추가의 질병 및 장애는 세기관지염, 소아마비 (회색질척수염), 크룹(croup), 호흡기 합포체 바이러스 감염, 볼거리, 감염 홍반 (제 5 병), 영아 장미진, 진행성 루벨라(rubella) 범뇌염, 풍진(german measles), 및 아급성 경화성 범뇌염), 진균성 폐렴 (예를 들어, 히스토플라스마증(Histoplasmosis), 콕시디오이데스진균증(Coccidioidomycosis), 분아균증(Blastomycosis), 면역계가 극심하게 억제된 사람에서의 진균 감염 (예를 들어, 크립토코커스 네오포만스(*Cryptococcus neoformans*)에 의해 야기된 크립토코쿠스증; 아스페르길루스 종(*Aspergillus spp.*)에 의해 야기되는 아스페르길루스증; 칸디다(*Candida*)에 의해 야기되는 칸디다증; 및 털곰팡이증)), 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*) (뉴모시스티스 폐렴), 비정형 폐렴 (예를 들어, 미코플라스마 종(*Mycoplasma spp.*) 및 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*)), 기회 감염 폐렴, 원내 폐렴, 화학적 폐렴, 및 흡인 폐렴, 흉막 장애 (예를 들어, 흉막염, 흉막 삼출, 기흉 (단순 자발성 기흉, 복합 자발성 기흉, 긴장성 기흉)), 기도 폐색 질병 (예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 폐기종, 만성 및 급성 기관지염), 직업성 폐 질환 (예를 들어, 규소폐증, 탄진폐(black lung) (광부의 진폐증), 석면증, 베릴륨증, 직업성 천식, 면폐증, 및 양성 진폐증), 침윤성 폐 질환 (예를 들어, 폐섬유증 (예를 들어, 경화성 폐포염, 일반적인 간질 폐렴), 특발성 폐 섬유증, 박리성(desquamative) 간질 폐렴, 림프 간질 폐렴, 조직구증 X (예를 들어, 레터러-시웨(Letterer-Siwe) 질병, 핸드-슐러-크리스찬(Hand-Schuller-Christian) 질병, 호산성 육아종), 특발성 폐 헤모시테린증, 사르코이드증 및 폐포 단백증), 급성 호흡 곤란 증후군 (또한, 성인성 호흡 곤란 증후군으로도 일컬어짐), 부종, 폐 색전증, 기관지염 (바이러스, 세균), 기관지확장증, 무기폐, 폐 농양 (예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스 또는 레지오넬라 뉴모필라에 의해 야기됨), 및 낭 섬유증(cystic fibrosis)이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<915>

항-혈관형성 활성

<916>

혈관형성의 내인성 자극제와 억제제 사이의 자연적 균형은 억제성 영향이 우세하다(Rastinejad *et al.*, *Cell* 56:345-355 (1989)). 신생혈관형성이 창상 치유, 기관 재생, 배아 발생 및 여성 생식 작용과 같은 정상적인 생리학적 조건하에서 일어나는 드문 경우에, 혈관형성은 엄격히 조절되며, 공간적 및 시간적으로 제약을 받는다. 고형 종양 성장을 특성화하는 것과 같은 병리학적 혈관형성의 조건하에서, 이러한 조절성 제어는 실패한다. 조절되지 않은 혈관형성은 병적인 것이 되어, 다수의 신생물성 및 비-신생물성 질병의 진행을 지속시킨다. 다수의 심각한 질병이 비정상적 신생혈관형성에 의해 지배되며, 이러한 질병으로는 고형 종양 성장 및 전이, 관절염, 일부 유형의 안구 장애 및 건선이 있다 [참조: Moses *et al.*, *Biotech.* 9:630-634 (1991); Folkman *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 333:1757-1763 (1995); Auerbach *et al.*, *J. Microvasc. Res.* 29:401-411 (1985); Folkman, *Advances in Cancer Research*, eds. Klein and Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985); Patz, *Am. J. Ophthalmol.* 94:715-743 (1982); 및 Folkman *et al.*, *Science* 221:719-725 (1983)]. 다수의 병리학적 조건에서, 혈관형성 작용은 질병 상태에 기여한다. 예를 들어, 고형 종양의 성장이 혈관형성에 의존적임을 제시하는 상당한 데이터가 축적되어 있다 (Folkman and Klagsbrun, *Science* 235:442-447 (1987)).

<917>

본 발명은 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 투여함으로써 신생혈관형성과 관련된 질병 또는 장애의 치료를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드, 또는 효능제 또는 길항제에 의해 치료될 수 있는 악성 및 전이성 질환으로는 악성종양, 고형 종양, 및 본 명세서에 기재된 암 및 기타 당 분야에 공지된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다(이러한 장애의 개관에 대해서는, 문헌[Fishman *et al.*, *Medicine*, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)]을 참조하라). 따라서, 본 발명은 혈관형성 관련 질병 및/또는 장애의 치료가 필요한 개체에게 치료적 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함하여, 혈관형성 관련 질병 및/또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 암 또는 종양을 치료적으로 처리하기 위해 다양한 추가의 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질

을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료될 수 있는 암으로는 전립선, 폐, 유방, 난소, 위, 췌장, 후두, 식도, 고환, 간, 귀밑샘, 담관, 결장, 직장, 자궁경부, 자궁, 자궁내막, 신장, 방광, 갑상선암을 포함하는 고형 종양; 원발성 종양 및 전이; 흑색종; 아교모세포종; 카포시 육종; 평활근육종; 비-소세포 폐암; 결장직장암; 진행된 악성종양; 및 혈액성 종양, 예를 들어 백혈병이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 피부암, 두경부 종양, 유방 종양 및 카포시 육종과 같은 암을 치료하기 위해 국부적으로 전달될 수 있다.

<918> 다른 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 방광내 투여에 의해 표재형 방광암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 주사 또는 카테터에 의해 종양내로 직접 전달되거나 종양 부위의 근처에 전달될 수 있다. 물론, 당업자에게 인식될 것이지만, 적절한 투여 방식은 치료하고자 하는 암에 따라 달라질 것이다. 다른 전달 방식이 본 명세서에 논의되어 있다.

<919> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 암 이외에 혈관형성을 포함하는 그 밖의 장애를 치료하는데 유용할 수 있다. 이러한 장애로는 양성 종양, 예를 들어 혈관종, 청각 신경종(acoustic neuroma), 신경섬유종, 트라코마, 및 화농 육아종; 죽상경화성 플라크; 안구 혈관형성 질병, 예를 들어 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 황반 변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 수정체뒤 섬유증, 피부홍조, 망막모세포종, 눈의 포도막염(uveitis) 및 테리기아(Pterygia) (비정상적 혈관 성장); 류마티스 관절염; 건선; 지연된 창상 치유; 자궁내막증; 혈관신생; 육아; 비대 흉터 (켈로이드); 불유합 골절; 피부경화증; 트라코마; 혈관 유착; 심근 혈관형성; 관상 측부; 뇌 측부; 동정맥 기형; 허혈성 사지 혈관형성; 오스터-웨버(Oster-Webber) 증후군; 플라크 신생혈관형성; 모세혈관확장증; 혈우병환자 관절; 혈관섬유종; 섬유근육 형성이상; 창상 육아; 크론병; 및 죽상경화증이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<920> 예를 들어, 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 비대 흉터 또는 켈로이드에 투여하는 단계를 포함하여 비대 흉터 및 켈로이드를 치료하는 방법이 제공된다.

<921> 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비대 흉터 또는 켈로이드 병변의 진행을 억제하기 위해 비대 흉터 또는 켈로이드내로 직접 주입된다. 이러한 요법은 비대 흉터 및 켈로이드 (예를 들어, 화상)을 발생시키는 것으로 알려져 있는 질환의 예방적 처리에서 특히 가치를 지니며, 바람직하게는 증식기가 진행되도록 하는 시간이 지난 후 (최초 손상 후 약 14일째)이지만 비대 흉터 또는 켈로이드 발생 전에 개시된다. 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 예를 들어 각막 신생혈관형성, 신생혈관 녹내장, 증식성 당뇨병성 망막병증, 수정체뒤 섬유증 및 황반 변성을 포함하는 눈의 신생혈관 질병을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

<922> 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료될 수 있는 신생혈관형성과 관련된 안구 장애로는 신생혈관 녹내장, 당뇨병성 망막병증, 망막모세포종, 수정체뒤 섬유증, 포도막염, 미숙아 망막병증, 황반 변성, 각막 이식 신생혈관형성뿐만 아니라 다른 눈 염증 질병, 안구 종양 및 맥락막 또는 홍채 신생혈관형성과 관련된 질병이 있으나, 이에 제한되지는 않는다[참조: Waltman *et al.*, *Am. J. Ophthalmol.* 85:704-710 (1978) 및 Gartner *et al.*, *Surv. Ophthalmol.* 22:291-312 (1978)].

<923> 따라서, 본 발명의 한 양태에서, 혈관의 형성이 억제되도록 환자의 각막에 치료적 유효량의 화합물 (예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드)을 투여하는 단계를 포함하여, 각막 신생혈관형성 (각막 이식 신생혈관형성을 포함함)과 같은 눈의 신생혈관 질병을 치료하는 방법이 제공된다. 요약하면, 각막은 일반적으로 혈관이 없는 조직이다. 그러나, 특정한 병리학적 조건에서, 모세혈관이 가장자리의 각막주위 혈관 열기로부터 각막내로 신장될 수 있다. 각막에 혈관형성이 되는 경우, 이는 또한 혼탁하게 되어, 환자의 시력을 저하시킨다. 각막이 완전히 혼탁해진 경우 시력 손실이 완전해질 수 있다. 예를 들어 각막 감염 (예를 들어, 트라코마, 단순 포진 각막염, 리슈만편모충증 및 회선사상충증), 면역학적 작용 (예를 들어, 이식 거부 및 스티븐스-존슨 증후군), 알칼리 화상, 외상, 염증 (임의의 원인에 의한), 독성 및 영양 결핍 상태를 포함하는 광범위하게 다양한 장애가 각막 신생혈관형성을 일으킬 수 있고, 이러한 장애는 콘택트렌즈 착용으로 인한 합병증으로서 일어날 수 있다.

<924> 본 발명의 일부 구체예에서, 염수 내의 국소 투여용(안구 조제에서 통상적으로 사용되는 임의의 보존제 및 항미생물제와 함께 조합됨)으로 제조될 수 있고, 점안약 형태로 투여될 수 있다. 용액 및 현탁액은 이의 순수한 형

태로 제조될 수 있고, 매일 수회로 투여될 수 있다. 대안적으로, 상기 기술된 바와 같이 제조된 항-혈관형성 조성물이 또한 각막에 직접적으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-혈관형성 조성물은 각막에 결합하는 점막-점착 중합체와 함께 제조된다. 추가의 구체예에서, 항-혈관형성 인자 또는 항-혈관형성 조성물은 통상적인 스테로이드 요법에 대한 보조약으로 사용될 수 있다. 국소 요법이 또한 혈관형성 반응(예를 들어, 화학적 화상)을 유도할 가능성이 높은 것으로 공지된 각막 병변에 예방적으로 유용할 수 있다. 이러한 예에서, 아마 스테로이드와 조합되는 치료는 차후의 합병증을 예방하는데 직접적으로 도움을 줄 수 있을 것이다.

<925> 다른 구체예에서, 상기 기술된 화합물은 현미경 인도하에 안과의에 의해 각막 간질로 직접적으로 주사될 수 있다. 주사 부위는 개체 병변의 형태에 따라 다양할 것이나, 투여의 목표는 혈관구조(즉, 혈관 및 정상 각막 사이의 산재된 것)의 발달 전에 조성물을 배치시키는 것이다. 대부분의 경우, 이는 혈관 발달로부터 각막을 "보호"하기 위해 변연전 각막 주사를 포함할 것이다. 이 방법은 또한 각막 신생혈관증식을 예방적으로 방지하게 위해 각막 손상 직후 사용될 수 있다. 이 상황에서, 물질은 각막 병변과 이의 요망되지 않는 잠재적 변연계 혈액 공급 사이에 산재된 변연전 각막에 주사될 수 있다. 이러한 방법은 또한 이식된 각막의 모세관 침입을 방지하기 위해 유사한 방식으로 사용될 수 있다. 지효성 방출 형태에서, 주사는 1년에 2-3회만을 요한다. 스테로이드가 또한 주사 그 자체로부터 생성되는 염증을 감소시키기 위해 주사 용액으로 첨가될 수 있다.

<926> 본 발명의 또 다른 양태에서, 환자에게 치료적 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 안구에 투여하여, 혈관의 생성이 억제되는 단계를 포함하는 신생혈관 녹내장을 치료하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 화합물은 신생혈관 녹내장의 초기 형태를 치료하기 위해 안구에 국소적으로 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 전방각의 영역으로 주사에 의해 주입될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 또한 화합물이 방수로 지속적으로 방출되는 임의의 위치로 배치될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 환자에게 치료적 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 안구에 투여하여 혈관의 생성이 억제되는 단계를 포함하는 증식성 당뇨망막변증을 치료하기 위한 방법이 제공된다.

<927> 본 발명의 일부 구체예에서, 증식성 당뇨망막변증은 망막에서의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 길항제 및/또는 효능제의 국소적 농도를 증가시키기 위해 방수 또는 유리체로 주사에 의해 치료될 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 치료는 광응고를 요하는 심각한 질병의 취득 전에 개시되어야 한다.

<928> 본 발명의 또 다른 양태에서, 환자에게 치료적 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 안구에 투여하여 혈관의 생성이 억제되는 단계를 포함하는 수정체후부섬유증증식을 치료하는 방법이 제공된다. 화합물은 유리체내 및/또는 안내 이식물을 통해 국부적으로 투여될 수 있다.

<929> 추가로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료될 수 있는 장애는 혈관종, 관절염, 건선, 혈관섬유종, 죽상경화관, 지연 상처 치유, 과립화, 혈우병성 접합부, 비후성 반흔, 불유합 골절, 오슬러-웨버 증후군(Osler-Weber syndrome), 화농육아종, 공피증, 트라코마, 및 관 유착을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<930> 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료, 예방, 진단, 및/또는 예측될 수 있는 장애 및/또는 상태는 고형 종양, 혈액 유래 종양, 예를 들어 백혈병, 종양 전이, 카포시 육종, 양성 종양, 예를 들어 혈관종, 청신경종, 신경섬유종, 트라코마, 및 화농육아종, 류마티스 관절염, 건선, 안구 혈관형성 질병, 예를 들어 당뇨망막병증, 미숙아망막병증, 황반변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 수정체후부섬유증, 피부홍조, 망막모세포종, 및 포도막염, 지연 상처 치유, 자궁내막증, 혈관형성, 과립화, 비후성 반흔(켈로이드), 불유합 골절, 공피증, 트라코마, 관 유착, 심근 혈관형성, 심장동맥 측부, 대뇌 측부, 동정맥 기형, 허혈 사지 혈관형성, 오슬러-웨버 증후군, 플라크 혈관신생, 모세혈관확장, 혈우병 접합부, 혈관섬유종 섬유근육 형성이상, 상처 과립화, 크론병, 죽상경화증, 배아 착상 조절 월경에 필요한 혈관형성 방지에 의한 산아제한제, 병리학적 예후, 예를 들어 묘소병(Rochel minimalia quintosa), 궤양(Helicobacter pylori)으로서 혈관형성을 지니는 병, 바르토넬라증 및 세균성혈관종증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<931> 산아 제한 방법의 한 양태에서, 배아 착상을 차단하기에 충분한 화합물의 양이 성교 및 수정이 발생하기 전 또는 후에 투여되어, 산아 제한의 효과적인 방법, 혹은 "모닝 애프터(morning after)" 방법을 제공한다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 월경을 조절하기 위해 사용되거나, 복막내 세척액 또는 자궁내막증의 치료에서의 복막 이식을 위해 투여될 수 있다.

- <932> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 봉합 육아종을 예방하기 위해 외과술 봉합사로 혼합될 수 있다.
- <933> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 광범위한 외과적 처치에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 양태에서, 조성물(예를 들어, 스프레이 또는 필름 형태)은 악성 조직으로부터 정상적인 주위 조직을 단리시키고/시키거나 주위 조직으로의 질병의 확산을 예방하기 위해, 종양의 제거 전에 그 부위를 코팅하거나 분무하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 기타 양태에서, 조성물(예를 들어, 스프레이의 형태)은 종양을 코팅하거나 요망되는 장소의 혈관형성을 억제하기 위해 내시경 처치를 통해 전달될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 항-혈관형성 조성물로 코팅된 외과용망이 외과용망이 사용되어야 하는 임의의 과정에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 구체예에서, 항-혈관형성 조성물이 적재된 외과용망은 구조를 지지하고, 항-혈관형성 인자의 양을 방출시키기 위해 복부암 절제술(예를 들어, 결장 절제 후) 동안 사용될 수 있다.
- <934> 본 발명의 추가의 양태에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 절제 후 종양의 절제 가장자리에 투여함으로써, 이 부위에서의 암의 국소적 재발 및 새로운 혈관의 형성이 억제되는 것을 포함하는 종양 절제 부위를 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 한 구체예에서, 항-혈관형성 화합물은 종양 절제 부위로 직접적으로 투여(예를 들어, 종양의 절제 가장자리를 항-혈관형성 화합물로 도포하거나, 술로 칠하거나 달리 코팅시킴으로써 적용됨)된다. 대안적으로, 항-혈관형성 화합물은 투여 전에 공지된 외과용 페이스트로 혼합될 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, 항-혈관형성 화합물은 악성에 대한 간 절제술 후, 및 신경외과 수술 후에 적용된다.
- <935> 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 유방 종양, 결장 종양, 뇌종양 및 간 종양을 포함하는 광범위한 종양의 절제 가장자리로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 구체예에서, 항-혈관형성 화합물은 절제 후 신경학적 종양 부위로 투여되어, 이 부위에서의 새로운 혈관의 형성을 억제할 수 있다.
- <936> 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 기타 항-혈관형성 인자와 함께 투여될 수 있다. 기타 항-혈관형성 인자의 대표적 예는 항-침습 인자, 레티노산 및 이의 유도체, 파클리탁셀, 수라민, 금속단백분해효소-1의 조직 억제제, 금속단백분해효소-2의 조직 억제제, 플라스미노겐 활성제 억제제-1, 플라스미노겐 활성제 억제제-2, 및 보다 가벼운 "d 그룹" 전이금속의 다양한 형태를 포함한다.
- <937> 보다 가벼운 "d 그룹" 전이금속은, 예를 들어 바나듐, 몰리브덴, 텅스텐, 티타늄, 니오븀, 및 탄탈륨 종을 포함한다. 이러한 전이금속종은 전이금속 착물을 형성할 수 있다. 상기 언급된 전이금속종의 적절한 착물은 옥소 전이금속 착물을 포함한다.
- <938> 바나듐 착물의 대표적 예는 옥소 바나듐 착물, 예를 들어 바나데이트 및 바나딜 착물을 포함한다. 적절한 바나데이트 착물은 메타바나데이트 및 오르토바나데이트 착물, 예를 들어 암모늄 메타바나데이트, 나트륨 메타바나데이트, 및 나트륨 오르토바나데이트를 포함한다. 적절한 바나딜 착물은, 예를 들어 바나딜 아세틸아세토네이트 및 바나딜 설페이트 히드레이트를 포함하는 바나딜 설페이트, 예를 들어 바나딜 설페이트 모노- 및 트리히드레이트를 포함한다.
- <939> 텅스텐 및 몰리브덴 착물의 대표적 예는 또한 옥소 착물을 포함한다. 적절한 옥소 텅스텐 착물은 텅스테이트 및 텅스텐 옥시드 착물을 포함한다. 적절한 텅스테이트 착물은 암모늄 텅스테이트, 칼슘 텅스테이트, 나트륨 텅스테이트 디히드레이트, 및 텅스텐산을 포함한다. 적절한 텅스텐 옥시드는 텅스텐(IV) 옥시드 및 텅스텐(VI) 옥시드를 포함한다. 적절한 옥소 몰리브덴 착물은 몰리브데이트, 몰리브덴 옥시드, 및 몰리브데닐 착물을 포함한다. 적절한 몰리브데이트 착물은 암모늄 몰리브데이트 및 이의 수화물, 나트륨 몰리브데이트 및 이의 수화물, 및 칼륨 몰리브데이트 및 이의 수화물을 포함한다. 적절한 몰리브덴 옥시드는 몰리브덴(VI) 옥시드, 몰리브덴(VI) 옥시드, 및 몰리브덴산을 포함한다. 적절한 몰리브데닐 착물은, 예를 들어 몰리브데닐 아세틸아세토네이트를 포함한다. 기타 적절한 텅스텐 및 몰리브덴 착물은, 예를 들어 글리세롤, 타르타르산, 및 당으로부터 유래된 히드록소 유도체를 포함한다.
- <940> 광범위한 기타 항-혈관형성 인자가 또한 본 발명의 상황에서 사용될 수 있다. 대표적 예는 혈소판 인자 4; 프로타민 설페이트; 황산화된 키틴 유도체(대개 겔질로부터 제조됨), (Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, 1991); 황산화된 폴리사카라이드 펩티도글리칸 착물(SP-PG) (이 화합물의 기능은 스테로이드, 예를 들어 에스트

로겐, 및 타목시펜 시트레이트에 의해 향상될 수 있음); 스타우로스포린; 기질 대사의 조절제, 예를 들어 프롤린 유사체, 시스히드록시프롤린, d,L-3,4-데히드로프롤린, 티아프롤린, 알파,알파-디피리딜, 아미노프로피오니트릴 푸마레이트; 4-프로필-5-(4-피리디닐)-2(3H)-옥사졸론; 메토티렉세이트; 미톡산트론; 헤파린; 인터페론; 2 매크로글로불린-혈청; ChIMP-3(Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992)); 키모스타틴(Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, (1992)); 시클로렉스트린 테트라데카실페이트; 에포네마이신; 캄프토테신; 퓨마길린(Ingber et al., Nature 348:555-557, 1990); 금 나트륨 티오말레이트("GST"; Matsubara and Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, (1987)); 항콜라게나아제-혈청; 알파2-항플라스민(Holmes et al., J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, (1987)); 비산트렌(National Cancer Institute); 로벤자리트 디소듐 (N-(2)-카르복시페닐-4-클로로안트로닐산 디소듐 또는 "CCA"; Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, (1992)); 탈리도미드; 혈관형성억제 스테로이드; AGM-1470; 카르복시나미놀미다졸; 및 금속단백분해효소 억제제, 예를 들어 BB94를 포함한다.

<941> **세포 수준에서의 질병**

<942> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방, 진단, 및/또는 예측될 수 있는 증가된 세포 생존 또는 아포토시스의 억제와 관련된 질병은 암(예를 들어, 소포림프종, p53 돌연변이를 지니는 암종, 및 결장암, 심장 종양, 췌장암, 흑색종, 망막모세포종, 교모세포종, 폐암, 장암, 고환암, 위암, 신경모세포종, 점액종, 근종, 림프종, 내피종, 골모세포종, 파골세포종, 골육종, 연골육종, 샘종, 유방암, 전립선암, 카포시 육종 및 난소암을 포함하나 이에 제한되지 않는 호르몬-의존성 종양); 자가면역 장애(예를 들어, 다발성 경화증, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 담즙성 간경변, 베체트병, 크론병, 다발근육염, 전신홍반루푸스 및 면역-관련 사구체신염 및 류마티스 관절염) 및 바이러스 감염(예를 들어, 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스 및 아데노바이러스), 염증, 이식 대 숙주병, 급성 이식 거부, 및 만성 이식 거부를 포함한다.

<943> 일부 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 암, 특히 상기 기술된 암의 성장, 진행, 및/또는 전이를 억제하기 위해 사용된다.

<944> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 치료되거나 검출될 수 있는 증가된 세포 생존과 관련된 추가의 질병 또는 질환은 악성 종양 및 관련 장애, 예를 들어 백혈병(급성 백혈병(예를 들어, 급성 림프성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병(골수모구, 전골수구, 골수단핵구, 단핵구, 및 적백혈병을 포함함)을 포함함) 및 만성 백혈병(예를 들어, 만성 골수성(과립구) 백혈병 및 만성 림프성 백혈병)), 진성적혈구증가증, 림프종(예를 들어, 호지킨병 및 비-호지킨병), 다발골수종, 왈덴스트림 마크로글로불린혈증, 증쇄병, 및 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤향막종, 중피종, 유잉 육종, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 육종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암종, 샘암종, 한선암종, 모지선암종, 유두암종, 유두상 선암종, 낭샘암종, 속질암종, 기관기원성 암종, 신세포암종, 간암, 담관암종, 융모막암종, 고환종, 배아암종, 율름 종양, 자궁경부암, 고환종양, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종을 포함하나 이에 제한되지 않는 고형 종양의 진행, 및 또는 전이를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<945> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료, 예방, 진단 및/또는 예측될 수 있는 증가된 아포토시스와 관련된 질병은 AIDS; 신경변성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 색소성 망막염, 소뇌 변성 및 뇌종양 또는 이전에 관련된 질병); 자가면역 장애(예를 들어, 다발성 경화증, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 담즙성 간경변, 베체트병, 크론병, 다발성근염, 전신홍반루푸스 및 면역-관련 사구체신염 및 류마티스 관절염) 골수형성이상 증후군(예를 들어, 재생불량빈혈), 이식 대 숙주병, 허혈 손상(예를 들어, 심근경색, 뇌졸중 및 재관류 손상에 의해 야기된 것), 간 손상(예를 들어, 간염 관련 간 손상, 허혈/재관류 손상, 담즙울체(담관 손상) 및 간암); 독소 유발 간 질병(예를 들어, 알코올에 의한 것), 패혈 쇼크, 악액질 및 식욕부진을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<946> **상처 치유 및 상피세포 증식**

<947> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 치료 목적상, 예를 들어 상처 치유의 목적상 상피세포 및 기본 각질세포 증식을 자극하고, 모낭 생성 및 피부 상처의 치유를 자극하기 위해 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알

부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하는 방법이 제공된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 외과적 상처, 절제 상처, 진피 및 표피의 손상을 포함하는 깊은 상처, 안구 조직 상처, 치아 조직 상처, 구강 상처, 당뇨병성 궤양, 피부 궤양, 욕창, 동맥성 궤양, 정맥 울혈 궤양, 열 또는 화학물질 노출로부터의 화상, 및 기타 비정상적 상처 치유 상태, 예를 들어 요독증, 영양실조, 스테로이드의 전신적 치료와 관련된 비타민 결핍 및 합병증, 방사선 요법 및 항신생 약물 및 항대사물질을 포함하는 상처 치유를 자극시키기 위해 임상적으로 유용할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 피부 손실 이후의 피부 재형성을 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

<948> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상처 바탕에 대한 피부 이식편의 부착을 증가시키고, 상처 바탕으로부터의 재-상피화를 자극하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상처 바탕에 대한 부착을 증가시키기 위해 자가 이식, 인공피부, 동종 이식, 자가피부 이식, 자가표피 이식, 무혈관 이식, 블레어-브라운(Blair-Brown) 이식, 골 이식, 배대조직 이식, 피부 이식, 지연 이식, 식피, 표피 이식, 근막 이식, 전층피부 이식, 이종 이식, 이종 이식, 동종 이식, 증식성 이식, 표층 이식, 그물피부 이식, 점막 이식, 올리에르-티르쉬 이식, 그물막 이식, 첩부 이식, 경상 이식, 전층 이식, 부분층 식피술, 틱 스플릿(thick split) 이식과 같은 이식 유형에 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 피부 강도를 촉진시키고 노화된 피부의 외형을 개선시키기 위해 사용될 수 있다.

<949> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 간세포 증식, 및 폐, 유방, 췌장, 위, 소장, 및 대장의 상피세포 증식에서 변화를 일으킬 것으로 믿어진다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상피세포, 예를 들어 피지세포, 모낭, 간세포, 과립하파리세포, 뮤신 생성 술잔 세포, 및 기타 상피 세포 및 피부, 폐, 간, 및 위장관 내에 함유된 이들의 전구물질의 증식을 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 내피세포, 각질세포, 및 기저 각질세포의 증식을 촉진할 수 있다.

<950> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 방사선, 화학요법 치료 또는 바이러스 감염으로부터 생성된 장 독성의 부작용을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 소장 점막에 대한 세포보호 효과를 지닐 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 화학요법 및 바이러스 감염으로부터 생성된 점막염(구강 궤양)의 치유를 자극할 수 있다.

<951> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화상을 포함하는 전체 및 부분적 두께 피부 결함에서의 피부의 완전한 재생(즉, 모낭, 땀샘, 및 모지선의 재증식), 기타 피부 결함, 예를 들어 건선의 치료에 추가로 이용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 재-상피화를 가속화시킴으로써 수포성 포피박리증, 및 빈번하고, 개방되고, 고통스러운 수포를 발생시키는 근원적인 진피에 대한 표피의 부착 결함을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 위궤양 및 십이지장 궤양을 치료하고, 점막 내층의 반흔 형성 및 점액샘 및 십이지장 점막 내층의 보다 신속한 재생에 의한 치유를 원조하기 위해 사용될 수 있다. 염증성 창자병, 예를 들어 크론병 및 궤양대장염은 각각 소장 또는 대장의 점막표면의 파괴를 일으키는 질병이다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 보다 신속한 치유를 원조하고 염증성 창자병의 진행을 방지하기 위한 점막표면의 재생을 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용한 치료는 위장관을 통한 점액의 생성에 현저한 영향을 지니는 것으로 예상되고, 섭취되는 유해한 물질 또는 이후의 외과술로부터 창자 점막을 보호하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현하에서 관련된 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

<952> 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 다양한 병리학적 상태로 인한 폐에 대한 손상을 예방하고 치유하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 증식 및 분화를 자극하고, 급

성 또는 만성 폐 손상을 예방하거나 치료하기 위해 파리와 세기관지 상피의 복구를 촉진할 수 있다. 예를 들어, 세기관지 상피 및 파리의 괴사를 야기하는 파리의 점진적 손실, 및 흡입 손상을 일으키는, 즉 연기 흡입 및 화상으로부터 발생하는 폐기종은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 효능제 또는 길항제를 이용하여 효과적으로 치료될 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 파립허파파리세포의 증식 및 분화를 자극할 수 있고, 이는 미성숙한 유아에서의 질병, 예를 들어 유리질막병, 예를 들어 유아 호흡곤란증후군 및 기관지허파 형성이상의 치료 또는 예방을 원조할 수 있다.

<953> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 간세포의 증식 및 분화를 자극하여, 간 질병 및 병리, 예를 들어 경화증에 의해 야기된 전격 간부전, 바이러스간염 및 독소 물질(예를 들어, 아세트아미노펜, 사염화탄소 및 당 분야에 공지된 기타 간독소)에 의해 야기된 간 손상을 완화시키거나 치료하기 위해 사용될 수 있다.

<954> 게다가, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 당뇨병의 발병을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 새로이 진단된 타입 I 및 II 당뇨병을 지닌 환자에서, 약간의 섬세포 기능이 잔류하는 경우, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 질병의 영구 소견을 완화하거나, 지연시키거나 예방하기 위해 섬세포 기능을 유지하도록 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 섬세포 기능을 개선시키거나 촉진시키기 위해 섬세포 이식에서 보조제로 사용될 수 있다.

<955> **신경 활성 및 신경학적 질병**

<956> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뇌 및/또는 신경계의 질병, 장애, 손상 또는 상처의 진단 및/또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물(예를 들어, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드)로 치료될 수 있는 신경계 장애는 신경계 손상, 및 축삭의 분리, 뉴런의 감소 또는 퇴행, 또는 말리집탈락을 일으키는 질병 또는 장애를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 방법에 따라 환자(인간 및 비-인간 포유동물 환자를 포함함)에서 치료될 수 있는 신경계 병변은 (1) 뇌경색증 또는 허혈, 또는 척수 경색 또는 허혈을 포함하는 신경 손상 또는 사멸을 일으키는, 신경계의 일부에서의 산소 결핍인 허혈성 병변; (2) 물리적 손상 또는 외과술 관련, 예를 들어 신경계의 일부를 절단하는 병변, 또는 압박 손상에 의해 야기되는 병변을 포함하는 외상성 병변; (3) 신경계의 일부가 신경계 관련 악성종양 또는 비-신경계 조직으로부터 유래된 악성종양인 악성 조직에 의해 파괴되거나 손상되는 악성 병변; (4) 신경계의 일부가 농양 또는 감염의 결과, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스, 대상 포진, 또는 단순포진 바이러스에 의한 감염 또는 라임병, 결핵, 또는 매독에 의한 감염의 결과로서 파괴되거나 손상되는 감염성 병변; (5) 신경계의 일부가 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤 무도병, 또는 근위축성 측삭 경화증(ALS)와 관련된 퇴행을 포함하나 이에 제한되지 않는 퇴행 과정의 결과로서 파괴되거나 손상되는 퇴행성 병변; (6) 신경계의 일부가 비타민 B12 결핍, 엽산 결핍, 베르니케병, 담배-알코올 약시, 마르키아파바-비나미 병(뇌량의 원발성 퇴행), 및 알코올성 소뇌 퇴행을 포함하나 이에 제한되지 않는 영양장애 또는 물질대사의 장애에 의해 파괴되거나 손상되는, 영양 질병 또는 장애와 관련된 병변; (7) 당뇨병(당뇨병 신경병증, 벨안면신경마비), 전신홍반루푸스, 암종, 또는 사코이드증을 포함하나 이에 제한되지 않는 전신성 질병과 관련된 신경계 병변; (8) 알코올, 납, 또는 특정 신경독소를 포함하는 독성 물질에 의해 야기된 병변; 및 (9) 신경계의 일부가 다발성 경화증, 인간 면역결핍 바이러스 관련 척수병증, 횡단척수병증 또는 다양한 병인, 진행성 다발성 백질뇌병증, 및 뇌교 중심부 수초용해증을 포함하나 이에 제한되지 않는 말리집탈락병에 의해 파괴되거나 손상된 탈수초 병변과 같은 중추(척수, 뇌 포함)신경계 또는 말초신경계의 병변을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<957> 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 저산소증의 손상 효과로부터 신경 세포를 보호하기 위해 사용된다. 한 추가 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뇌저산소증의 손상 효과로부터 신경 세포를 보호하기 위해 사용된다. 이 구체예에 따르면, 본 발명의 조성물은 뇌저산소증과 관련된 신경 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 이 구체예의 하나의 비제한적인 양태에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 대뇌 허혈과 관련된 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 이 구체예의 또 다른 비제한적인 양태에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뇌경색증과 관

련된 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.

- <958> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뇌졸중과 관련된 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뇌졸중과 관련된 대뇌 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.
- <959> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 심장부전과 관련된 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 심장부전과 관련된 대뇌 신경 세포 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.
- <960> 신경계 장애를 치료하거나 예방하기에 유용한 본 발명의 조성물은 뉴런의 생존 또는 분화를 촉진하는 생물학적 활성에 대한 시험에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 하기의 효과중 하나를 유도하나 이에 제한되지 않는 본 발명의 조성물은 본 발명에서 유용할 수 있다: (1) 저산소증 또는 저산소 질환의 존재 또는 부재하에서의 배양물에서 뉴런의 생존 기간을 증가시키거나; (2) 배양물 또는 생체내에서 뉴런의 발아를 증가시키거나; (3) 배양물 또는 생체내에서 뉴런-관련 분자, 예를 들어 운동 뉴런에 대한 콜린 아세틸트랜스퍼라아제 또는 아세틸콜린 스테라아제의 생성을 증가시키거나; (4) 생체내 뉴런 기능장애의 증상을 감소시킴. 이러한 효과는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 몇몇 비제한적인 구체예에서, 뉴런의 증가된 생존은 본원에 기재되거나 당 분야에 달리 공지된, 예를 들어 문헌[Zhang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3637-42 (2000) or in Arakawa *et al.*, *J. Neurosci.*, 10:3507-15 (1990)]에 기재된 방법을 이용하여 통상적으로 측정될 수 있고; 뉴런의 증가된 발아는 당 분야에 공지된, 예를 들어 문헌[Pestronk *et al.*, *Exp. Neurol.*, 70:65-82 (1980), or Brown *et al.*, *Ann. Rev. Neurosci.*, 4:17-42 (1981)]에 기재된 방법에 의해 검출될 수 있고; 뉴런-관련 분자의 증가된 생성은 당 분야에 공지된 기술을 이용하고 측정되는 분자에 따라 생물학적검정, 효소성 측정법, 항체 결합, 노던 블로팅 검정 등에 의해 측정될 수 있고; 운동 뉴런 기능장애는 운동 뉴런 장애의 물리적 표현, 예를 들어 약함, 운동 뉴런 전도 속도, 또는 기능적 무력에 의해 측정될 수 있다.
- <961> 특정 구체예에서, 본 발명에 따라 치료될 수 있는 운동 뉴런 장애는 경색증, 감염, 독소에 대한 노출, 외상, 외과적 손상, 운동 뉴런뿐만 아니라 신경계의 기타 성분에 영향을 줄 수 있는 퇴행 질병 또는 악성종양, 뿐만 아니라 진행성 척수성 근위축증, 진행연수마비, 원발성 측삭경화증, 영아형 근위축증 및 연소성 근위축, 유아의 진행연수마비(Fazio-Londe syndrome), 회색질척수염 및 소아마비후 증후군, 및 유전운동감각신경병증(Charcot-Marie-Tooth Disease)을 포함하나 이에 제한되지 않는 근위축성 측삭 경화증과 같은 선택적으로 뉴런에 영향을 주는 장애와 같은 장애를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- <962> 추가로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 뉴런 생존; 시냅스 형성; 전도도; 뉴런 분화 등에서 중요한 역할을 할 것이다. 따라서, 본 발명의 조성물(본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함함)은 학습 및/또는 인지 장애를 포함하나 이에 제한되지 않는, 이들의 역할과 관련된 질병 또는 장애를 진단하고/하거나 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 신경변성 질병 상태 및/또는 행동 장애의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 이러한 신경변성 질병 상태 및/또는 행동 장애는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 뚜렛 증후군, 정신분열병, 조증, 치매, 편집증, 강박장애, 공황장애, 학습장애, ALS, 정신병, 자폐증, 및 급식, 수면양상, 균형 및 지각의 장애를 포함하는 변경 행동(altered behavior)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 게다가, 본 발명의 조성물은 또한 배아 발달과 관련된 발달 장애, 또는 성-관련 장애의 치료, 예방 및/또는 검출에서 중요한 역할을 할 것이다.
- <963> 추가로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 경동맥 질병(예를 들어, 경동맥 혈전증, 경동맥 협착, 또는 모야모야병), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 뇌동맥류, 뇌무산소증, 뇌동맥경화증, 대뇌 동정맥 기형, 대뇌동맥병, 뇌색전증 및 혈전증(예를 들어, 경동맥 혈전증, 정맥 굴혈전증, 또는 왈렌버그 증후군), 뇌내출혈(예를 들어, 경막외 또는 경막하 혈종, 또는 거미막하출혈), 뇌경색증, 대뇌허혈(예를 들어, 일과성뇌허혈증, 쇄골하동맥도류증후군, 또는 척추골 뇌저동맥기능부전증), 혈관치매(예를 들어, 다발경색), 백질연화증, 뇌실주위, 및 혈관성 두통(예를 들어, 군발두통 또는 편두통)을 포함하나 이에 제한되지 않는 뇌혈관 장애와 관련된 질병, 손실, 장애, 또는 손상으로부터 신경 세포를 보호하는데 유용할 수 있다.
- <964> 본 발명의 한 추가의 양태에 따르면, 치료 목적상, 예를 들어 신경학적 세포 증식 및/또는 분화를 자극하기 위

하여 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하는 방법이 제공된다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 신경학적 질병을 치료하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특정 신경계 질병 또는 장애의 마커 또는 검출자로 사용될 수 있다.

<965> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료되거나 검출될 수 있는 신경학적 질병의 예는 페닐케톤뇨증, 예를 들어 모성 페닐케톤뇨증, 피루베이트 카르복실라아제 결핍, 피루베이트 데히드로게나아제 복합체 결핍, 베르니케 뇌병증, 뇌부종, 뇌 신생물, 예를 들어 소뇌 신생물, 예를 들어 척막하 신생물, 뇌실 신생물, 예를 들어 맥락막층 신생물, 시상하부 신생물, 천막위 신생물, 카나반병, 소뇌병, 예를 들어 소뇌조화운동불능, 예를 들어 척수소뇌변성, 예를 들어 모세혈관확장성조화운동불능, 소뇌근육협동장애, 프리이드리히 운동실조, 마카도-조셉병, 올리브다리소뇌위축, 소뇌 신생물, 예를 들어 천막하 신생물, 광범위뇌경화증, 예를 들어 뇌염 축삭, 공세포백색질장애, 이염색백색질장애 및 아급성 경화성 범뇌염을 포함하는 대사성 뇌 질병과 같은 뇌 질병을 포함한다.

<966> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료되거나 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 뇌혈관 장애(예를 들어, 경동맥 혈전증, 경동맥 협착 및 모야모야병을 포함하는 경동맥 질병), 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 뇌동맥류, 뇌무산소증, 뇌동맥경화증, 대뇌 동정맥 기형, 대뇌동맥병, 뇌색전증 및 혈전증, 예를 들어 경동맥 혈전증, 정맥동혈전증 및 왈렌버그 증후군, 뇌내출혈, 예를 들어 경막외혈종, 경막하혈종 및 거미막하출혈, 뇌경색증, 대뇌허혈, 예를 들어 일과성뇌허혈증, 쇄골하동맥도류증후군 및 척추골 뇌저동맥기능부전증, 혈관 치매, 예를 들어 다발경색치매, 뇌실주위 백질연화증, 혈관성 두통, 예를 들어 군발성두통 및 편두통을 포함한다.

<967> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료되거나 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 치매, 예를 들어 AIDS 치매 복합체, 초로성 치매, 예를 들어 알츠하이머병 및 크로이츠펔트-야콥 증후군, 노인 치매, 예를 들어 알츠하이머병 및 진행성 상핵마비, 혈관 치매, 예를 들어 다발경색치매, 뇌염, 예를 들어 뇌염 축삭, 바이러스성 뇌염, 예를 들어 유행뇌염, 일본뇌염, 세인트루이스 뇌염, 진드기매개뇌염 및 서니일 열, 급성 파종성 뇌척수염, 수막뇌염, 예를 들어 포도막수막뇌염 증후군, 뇌염후 파킨슨병 및 아급성경화범뇌염, 뇌연화증, 예를 들어 뇌실주위 백색연화증, 간질, 예를 들어 전신간질, 예를 들어 영아연축, 결신발작, 간대성근경련간질, 예를 들어 MERRF 증후군, 긴장성-간대성 간질, 부분간질, 예를 들어 복합 부분간질, 전두엽간질 및 측두엽간질, 외상후간질, 간질지속증, 예를 들어 지속부분간질, 및 할러포르텐-스파츠 증후군을 포함한다.

<968> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 치료되거나 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 수두증, 예를 들어 댄디워커 증후군 및 정상압수두증, 시상하부 병, 예를 들어 시상하부 신생물, 뇌말라리아, 허탈발작을 포함하는 기면증, 연수성 회백척수염, 대뇌 가성종양, 레트 증후군, 라이 증후군, 시상병, 대뇌톡소포자충증, 두개내결핵증 및 젤베거증후군, 중추신경계 감염, 예를 들어 AIDS 치매 복합체, 뇌농양, 경막하출혈, 뇌척수염, 예를 들어 말뇌척수염, 베네주엘라말뇌척수염, 괴사출혈뇌척수염, 비스나, 및 뇌말라리아를 포함한다.

<969> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료 또는 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 수막염, 예를 들어 거미막염, 무균 수막염, 예를 들어 바이러스 수막염, 예를 들어 림프구 맥락수막염, 세균 수막염, 예를 들어 헤모필루스 메닝지티디스(*Haemophilus Meningitis*), 리스테리아 메닝지티디스(*Listeria Meningitis*), 수막구균 메닝지티디스(*Meningococcal Meningitis*), 예를 들어 워터하우스 프리데릭센 증후군, 폐렴구균 메닝지티디스(*Pneumococcal Meningitis*) 및 수막 결핵, 진균 수막염, 예를 들어 크립토코쿠스 메닝지티디스(*Cryptococcal Meningitis*), 경막하 삼출, 수막뇌염, 예를 들어 우베 수막뇌염 증후군, 척수염, 예를 들어 횡단 척수염, 신경매독, 예를 들어 척수 매독, 회색질척수염, 예를 들어 연수 회색질척수염 및 회색질척수염후 증후군, 프리온 질병(예를 들어, 크로이츠펔트-야콥 증후군, 소 갯송형 뇌병증, 저스트만-스트라우슬러 증후군, 쿠루병, 변양떨림병), 및 뇌 톡소포자충증을 포함한다.

<970> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료 또는 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 중추신경계 신생물, 예를 들어 뇌 신생물, 예를 들어 소뇌 신생물, 예를 들어 소뇌천막막 신생물, 뇌실 신생물, 예를 들어 맥락 어기 신생물, 시상하부 신생물 및 천막위 신생물, 수막 신생물, 척수 신생물, 예를 들어 경막외 신생물, 탈수초성 질환, 예를 들어 카나반 질병, 광범위 뇌경화증, 예

를 들어 부신 백질 이영양증, 축삭주위 뇌염, 구양세포 백질이영양증, 광범위 뇌경화증, 예를 들어 이염성의 백혈구 영양 실조, 알레르기성 뇌척수염, 괴사 출혈성 뇌척수염, 진행성 다발성 백질뇌증, 다발성 경화증, 중심 다리뇌 마이엘린 용해, 횡단성 척수염, 지속 신경수염, 스크라피, 척추 만곡증, 만성 피로 증후군, 비스나, 고압 신경 증후군, 수막자극증, 척수 질병, 예를 들어 선천성 근무긴장증, 근위축성 측색 경화증, 척수 근육 소모증, 예를 들어 베르드니히-호프만 병, 척수 압축, 척수 신생물, 예를 들어 경막외 신생물, 척수 공동증, 척수 매독, 스티프-만 증후군, 정신 지체, 예를 들어 앙겔만 증후군, 묘성 증후군, 드 란지 증후군, 다운 증후군, 강글리오사이드증, 예를 들어 강글리오사이드증 G(M1), 샌드호프 병, 데이-삭스 병, 하아트늄병, 호모시스테인뇨증, 로렌스-문-비에들 증후군, 레쉬-니안 증후군, 메이플 시럽 소변 병, 무코리피도시스, 예를 들어 푸코사이드 축적증, 신경세포 세로이드 지질갈색조증, 안뇌신 증후군, 페닐케톤뇨증, 예를 들어 모성 페닐케톤뇨증, 프라더-윌리 증후군, 레트 증후군, 루빈스타인-테이비 증후군, 결절 경화증, WAGR 증후군, 신경계 이상, 예를 들어 전전뇌증, 신경관 결함, 예를 들어 무뇌증, 예를 들어 하이드란젠세팔리(hydrangencephaly), 아놀드-체어리 변형, 뇌류, 수막류, 수막척수류, 척추후궁미봉증, 예를 들어 낭상이분척추 및 잠재이분척추를 포함한다.

<971>

본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료 또는 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병은 유전성 운동 및 감각 신경병증, 예를 들어 카르콧-마리 병, 유전성 시각 이상증, 레프섬 병, 유전성 연속성 대마비, 베르드니히-호프만 병, 유전성 감각 및 자율신경 신경병증, 예를 들어 선천적인 무통 및 가족성 자율신경실조증, 신경학적 소견, 예를 들어 인식불능증, 예를 들어 저스트만 증후군, 기억상실, 예를 들어 역행 기억상실, 행위상실증, 신경성 방광, 탈력 발작, 외사소통 장애, 예를 들어 청력 장애, 예를 들어 난청, 부분적인 청력 손실, 음량 동원 및 이명, 언어 장애, 예를 들어 언어 상실증, 예를 들어 쓰기언어상실증, 명칭언어상실증, 브로카 언어상실증 및 베르니케 언어상실증, 난독증, 예를 들어 획득 난독증, 언어 발달 장애, 말하기 장애, 예를 들어 언어 상실증, 예를 들어 명칭언어상실증, 브로카 언어상실증 및 베르니케 언어상실증, 발음 장애, 의사소통 장애, 예를 들어 말하기 장애, 예를 들어 말더듬증, 반향언어증, 무언증 및 말더듬, 음성 장애, 예를 들어 발성불능증 및 권소리, 대뇌제거 상태, 섬망, 속장화, 환각, 수막증, 행동 장애, 예를 들어 앙겔만 증후군, 운동 실조, 아테토시스, 무도병, 근긴장이상, 운동저하증, 근육 긴장저하, 간대성근경련증, 틱, 사경 및 떨림, 과다근육긴장증, 예를 들어 근육 경축, 예를 들어 스티프-만 증후군, 근육 경직, 마비, 예를 들어 안면 마비, 예를 들어 귀뿔헤르페스, 위마비, 반신불수, 안근마비, 예를 들어 복시, 두안 증후군, 호르너 증후군, 만성 진행성 외안근마비, 예를 들어 캘런스 증후군, 연수 마비, 열대 연속성 대부전 마비, 대마비, 예를 들어 브라운-씨퀴드 증후군, 사지마비, 호흡 마비 및 성대 마비, 부전 마비, 환상 수족, 미각 장애, 예를 들어 무미각증 및 미각 이상, 시각 장애, 예를 들어 약시, 시각상실, 색각 결함, 복시, 반맹증, 암점 및 아정상 시각, 수면 장애, 예를 들어 수면 과다, 예를 들어 클레인-레빈 증후군, 불면증 및 몽유증, 연축, 예를 들어 개구장애, 무의식, 예를 들어 혼수, 지속 식물 상태 및 실신 및 현기증, 신경근육 질병, 예를 들어 선천성 근무긴장증, 근위축성 측색 경화증, 람베르트-이튼 근무력 증후군, 운동 뉴런 질환, 근육 소모증, 예를 들어 척수의 근육 소모증, 카르콧-마리 병 및 베르드니히-호프만 질병, 회색질척수염후 증후군, 근위축증, 중증근무력증, 위축성 근긴장증, 선천성 근긴장증, 네말린 근증, 가족성 주기적인 마비, 다양한 파라미토콜로니스, 열대 연속성 대부전마비 및 스티프-만 증후군, 말초 신경계 병, 예를 들어 선단 동통, 아밀로이드 신경장애, 자율신경계 병, 예를 들어 아디 증후군, 바레-뢰오 증후군, 가족성 자율신경실조증, 호너 증후군, 반사성의 교감신경성 이영양증 및 사이-드래거 증후군, 두개 신경 질병, 예를 들어 음향 신경 병, 예를 들어 음향 신경증, 예를 들어 신경섬유종증 2, 안면 신경 질병, 예를 들어 안면 신경통, 멜커슨-로센탈 증후군, 안구운동 장애, 예를 들어 약시, 안구진탕, 동안신경 마비, 안근마비, 예를 들어 두안 증후군, 호너 증후군, 만성 진행성 외안근마비, 예를 들어 컨스 증후군, 사시 동안신경, 예를 들어 내사시 및 외사시, 눈돌림 신경 마비, 광학 신경 질병, 예를 들어 광학 위축, 예를 들어 유전성 광학 위축, 광학 디스크 결정강, 광학 신경염, 예를 들어 시각 신경척수염, 유두부종, 삼차신경통, 성대 마비, 말이집탈력 질병, 예를 들어 시각 신경척수염 질병 및 당뇨 신경병증, 예를 들어 당뇨병 발을 포함한다.

<972>

본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치료 또는 검출될 수 있는 추가의 신경학적 질병으로는 신경 압축 증후군, 예를 들어 수근터널 증후군, 족근관 증후군, 아래 가슴문 증후군, 예를 들어 목의 늑골 증후군, 척골 신경 압축 증후군, 신경통, 예를 들어 작열통, 목-위팔 신경통, 안면 신경통 및 삼차신경통, 신경염, 예를 들어 실험알레르기성 신경염, 시신경염, 다발성 신경염, 급성특발 다발성 신경염 및 신경근염, 예를 들어 다발성신경근염, 유전성 운동 및 감각 신경병증, 예를 들어 카르콧-마리 병, 유전성 광학 위축, 레프섬 질병, 유전성 연속성 대마비 및 베르드니히-호프만 병, 유전성 감각 및 자율신경 신경병증, 예를 들어 선천적인 무통 및 가족성 자율신경실조증, POEMS 증후군, 좌골신경통, 미각성 발한 및 강직을 포함한다.

- <973> **내분비 질환**
- <974> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 호르몬 불균형과 관련된 장애 및/또는 질병, 및/또는 내분비계의 장애 또는 질병을 치료, 예방, 진단 및/또는 예지하는데 사용될 수 있다.
- <975> 내분비계 샘플에서 분비되는 호르몬은 물리적 성장, 성 기능, 대사 및 다른 기능을 조절한다. 장애는 호르몬 생성에서의 장애, 및 호르몬에 반응하는 조직의 불능의 두 가지 방식으로 분류될 수 있다. 상기 호르몬 불균형 또는 내분비계 질병, 장애 또는 질환의 병인은 유전적이거나, 암 및 몇몇 자가면역 질환과 같이 신체적이거나, 후천적이거나 (예를 들어, 화학치료, 상해 또는 독소에 의한), 감염성일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 내분비계 및/또는 호르몬 불균형과 관련된 특정 질병 또는 장애의 마커 또는 디텍터로서 이용될 수 있다.
- <976> 내분비계 및/또는 호르몬 불균형 및/또는 질병은 임신 및 분만 합병증 (예를 들어, 조기 분만, 만기후 임신, 자간증, 및 느리거나 정지된 분만)을 포함하나 이에 제한되지 않는 자궁 운동성 장애; 및 월경 주기의 장애 및/또는 질병 (예를 들어, 생리통 및 자궁 내막증)을 포함한다.
- <977> 내분비계 및/또는 호르몬 불균형 장애 및/또는 질병은 췌장의 장애 및/또는 질병, 예를 들어 당뇨병, 요붕증, 선천적인 췌장 무형성, 갈색세포종-도세포 종양 증후군; 부신의 장애 및/또는 질병, 예를 들어 애디슨병, 코르티코스테로이드 결핍, 남성화 질병, 다모, 쿠싱 증후군, 고알도스테론증, 갈색세포종; 뇌하수체의 장애 및/또는 질병, 예를 들어 뇌하수체 기능항진증, 뇌하수체 기능저하증, 뇌하수체성 소인증, 뇌하수체 선종, 뇌하수체기능저하증, 말단 비대증, 거인증; 갑상선 기능항진증, 갑상선 기능저하증, 플러머 병, 그레이브 병(독성 확산 갑상선종), 독성 결절갑상선종, 갑상선염(하시모토 갑상선염, 아급성 육아종성 갑상선염 및 무증상 림프구 갑상선염), 팬드레드 증후군, 점액부종, 크레틴병, 갑상선종독증, 갑상선의 호르몬 연결 결함, 흉선 형성 부전증, 갑상선의 허슬 세포 종양, 갑상선 암, 갑상선암종, 골수의 갑상선암종을 포함하나 이로 제한되지 않는 갑상선의 장애 및/또는 질병; 부갑상선의 장애 및/또는 질병, 예를 들어 부갑상선 기능항진증, 부갑상선 기능저하증; 시상하부의 장애 및/또는 질병을 포함한다.
- <978> 또한, 내분비계 및/또는 호르몬 불균형 장애 및/또는 질병은 암을 포함하는 고환 또는 난소의 장애 및/또는 질병을 포함할 수 있다. 고환 또는 난소의 다른 장애 및/또는 질병으로는 예를 들어 난소암, 다낭 난소 증후군, 클린펠터 증후군, 고환소멸 증후군(양쪽 무고환증), 라이디그 세포의 선천적인 부재, 잠복 고환증, 누난 증후군, 근긴장성 이영양증, 고환의 모세관 혈관종(양성), 고환 및 신-고환의 신생물을 추가로 포함한다.
- <979> 더욱이, 내분비계 및/또는 호르몬 불균형 장애 및/또는 질병은 예를 들어 다선성 부족 증후군, 갈색세포종, 신경모세포종, 다발성 내분비 신생물, 및 내분비 조직의 장애 및/또는 암과 같은 장애 및/또는 질병을 포함할 수 있다.
- <980> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 알부민 단백질의 치료적 단백질 부분에 상응하는 치료적 단백질이 발현되는 조직(들)과 관련된 내분비 질병 및/또는 장애를 진단, 예지, 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.
- <981> **생식계 질병**
- <982> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 생식계의 질병 및/또는 장애를 진단, 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 생식계 장애로는 생식계 상처, 감염, 신생물 질환, 선천적인 결함, 및 불임, 임신, 산통 또는 분만 합병증 및 산후 어려움을 유발하는 질병 또는 장애가 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- <983> 생식계 장애 및/또는 질병은 고환위축, 고환 여성화, 잠복고환증(한쪽 및 양쪽), 무고환증, 고환 전위, 부고환염과 고환염(통상적으로, 예를 들어 임질, 이하선염, 결핵 및 매독과 같은 감염으로부터 초래됨), 고환 꼬임, 결절 정관염, 생식세포종 (예를 들어, 정상피종, 배아 세포 암종, 기형암종, 융모막암종, 난황낭 종양 및 기형종), 간질의 종양 (예를 들어, 레이디히 세포 종양), 수류, 혈종, 정계정맥류, 정액류, 서혜부 탈장 및 정자 생산의 장애 (예를 들어, 섬모 기능부전 증후군, 무정자증, 아스테노정자증, 무정자증, 정자부족증 및 기형정자증)를 포함하는 고환의 질병 및/또는 장애를 포함한다.
- <984> 생식계 장애는 또한 전립선의 장애를 포함하며, 예를 들어 급성 비세균성 전립선염, 만성 비세균성 전립선염, 급성 세균성 전립선염, 만성 세균성 전립선염, 전립선근육긴장이상, 프로스타토시스, 육아조직성 전립선염, 연

화관증, 양성 전립선 비대 또는 과형성, 및 전립선 신생물 장애, 예를 들어 선암종, 이행세포암종, 관암, 및 편평세포암종을 포함한다.

<985> 추가적으로, 본 발명의 조성물은 음경 및 요도의 장애 또는 질병의 진단, 치료 및/또는 예방에 유용할 수 있으며, 이는 염증성 질환, 예를 들어 귀두포피염, 폐색 건성 귀두염, 포경, 감돈포경, 매독, 단순 포진 바이러스, 임질, 비임균성 요도염, 클라미디아, 미코플라스마, 트리코모나스, HIV, AIDS, 레이터스 증후군, 첨규 콘딜로마, 편평 콘딜로마 및 진주 음경 구진; 요도의 이상, 예를 들어 요도하열, 요도 상열 및 포경; 전암성 병변, 예를 들어 큐이레트의 홍색형성증, 보웬 병, 보웬양상 파플로시스, 부스크-로웬스타인의 거대 콘딜로마 및 사마귀모양 암종; 음경 암, 예를 들어 편평세포암종, 상피내암종, 사마귀모양 암종 및 파종된 음경 암종; 요도 신생물 장애, 예를 들어 음경 요도 암종, 망울막 요도 암종 및 전립선 요도 암종; 및 발기 장애, 예를 들어 지속발기증, 페이로니 병, 발기 기능 부전 및 발기불능을 포함한다.

<986> 더욱이, 정관의 질병 및/또는 장애로는 혈관염 및 CBAVD(정관의 선천적인 양쪽 부재)가 있고; 추가로, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포충병, 선천적인 염화물 설사 및 다낭신병을 포함하는 정관의 질병 및/또는 장애를 진단, 치료 및/또는 예방하는데 사용될 수 있다.

<987> 남성 생식계의 다른 장애 및/또는 질병으로는 예를 들어 클린펠터 증후군, 영 증후군, 조루증, 당뇨병, 남성 섬유증, 카르타게너 증후군, 고열, 다발성 경화증 및 여성유방증을 포함한다.

<988> 추가로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 질 및 음문의 질병 및/또는 장애를 진단, 치료 및/또는 예방하는데 사용될 수 있는데, 이는 세균성 질증, 칸디다균 질염, 단순 포진 바이러스, 연성하감, 서혜육아종, 성병성 림프육아종, 음, 인간의 유두종 바이러스, 질의 외상, 음문 외상, 샘증, 클라미디아 질염, 임질, 트리코모나스 질염, 첨규 콘딜로마, 매독, 전염성 연속종, 위축성 질염, 파제트 병, 경화 태선, 편평 태선, 음문통증, 유독한 쇼크 증후군, 질경련, 음문질염, 음문전정염, 및 신생물 질환, 예를 들어 편평세포 과형성, 명세포암, 기저세포암, 멜라노마, 바르톨린 샘의 암 및 음문 상피내 신생물을 포함한다.

<989> 자궁의 장애 및/또는 질병으로는 월경통, 후경 자궁, 자궁 내막증, 섬유증, 선근증, 무배란 출혈, 무월경, 쿠싱 증후군, 포상기태, 아서만 증후군, 조기 폐경, 성조숙, 자궁의 폴립, 기능부전성 자궁출혈 (예를 들어, 비정상적인 호르몬의 신호에 의한), 및 신생물 장애, 예를 들어 선암종, 평활근육종 및 육종을 포함한다. 추가로, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 선천적인 자궁 이상, 예를 들어 자궁두뿔증, 사이막 자궁, 단순 뿔 자궁, 비공동성 잔유 뿔을 지니는 뿔 자궁, 무교통 공동성 잔유 뿔을 지니는 뿔 자궁, 교통 공동성 뿔을 지니는 뿔 자궁, 궁상 자궁, 자궁 디텔퍼스, 및 T 형태의 자궁의 유용한 마커 또는 디텍터일뿐만 아니라 이들을 진단, 치료 및/또는 예방하는데 유용할 수 있다.

<990> 난소 질병 및/또는 장애로는 무배란, 다낭포 난소증후군(스테인-레벤탈 증후군), 난소낭, 난소 기능저하, 성선 자극 호르몬에 대한 난소의 무감응, 남성 호르몬의 난소 생산 과잉, 오른쪽 난소정맥증후군, 무월경, 히루티즘 및 난소암 (일차 및 이차 암 성장, 세르톨리-레이디크 종양, 난소의 자궁내막 유사 암종, 난소의 유두상 장액성 선암, 난소의 점액성 선암 및 그리고 난소의 크로켄베르그 종양을 포함하나 이로 제한되지 않음)을 포함한다.

<991> 경부 질병 및/또는 장애로는 자궁 경부염, 만성 자궁경관염, 점액농성의 자궁 경부염, 경부의 형성 이상, 경부의 폴립, 나보티안 낭포, 경부의 침식, 경부의 무능력 및 경부의 신생물(예를 들어, 자궁경부암, 편평상피화생, 편평세포암종, 아테노편평세포 신생물 및 원주형 세포 신생물을 포함함)을 포함한다.

<992> 추가적으로, 생식계의 질병 및/또는 장애로는 조기 유산, 후기 유산, 자연 유산, 유도 유산, 치료 유산, 절박 유산, 계류 유산, 불완전 유산, 완전 유산, 습관 유산, 계류 유산 및 패혈 유산과 같은 유산 및 사산을 포함하는 임신의 장애 및/또는 질병; 자궁외 임신, 빈혈, Rh 부적합, 임신 동안 질 출혈, 임신당뇨병, 자궁내의 성장 지연, 양수과다, HELLP 증후군, 태반조기박리, 전치태반, 입덧, 자간전증, 자간증, 임신 헤르페스, 및 임신 두드러기를 포함한다. 추가로, 본 발명의 일부인 융합 단백질 및/또는 본 발명의 일부인 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 심장병, 심장마비, 류머티스성의 심장병, 선천적인 심장병, 승모판탈출증, 높은 혈압, 빈혈, 신장병, 감염성 질병 (예를 들어, 풍진, 거대세포 바이러스, 톡소포자충증, 전염성 간염, 클라미디아, HIV, AIDS 및 생식기 헤르페스), 당뇨병, 그레이브 병, 갑상선염, 갑상선 기능저하증, 하시모토 갑상선염, 만성 활동성 간염, 간 경변, 원발성 담즙성 간경변, 천식, 전신성 홍반 루푸스, 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 충수염, 난소낭, 담낭 질병, 및 장폐쇄를 포함하는 임신에 수반될 수 있는 질병의

진단, 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.

- <993> 산통 및 분만과 관련된 합병증으로는 막 파열, 조기 산통, 만기후 임신, 과숙, 너무 천천히 진행되는 분만, 태아절박가사(예를 들어, 비정상적인 심박수(태아 또는 모체), 호흡 곤란 및 비정상적인 태위), 견갑 난산, 탕출 탈출, 양수 색전증 및 비정상인 자궁출혈을 포함한다.
- <994> 추가적으로, 분만후 기간의 질병 및/또는 장애로는 자궁내막염, 자궁 근층염, 자궁주위염, 복막염, 골반 혈전성 정맥염, 폐의 색전증, 내독소혈증, 신우신염, 잠재 혈전성정맥염, 유선염, 방광염, 산후 출혈 및 역 자궁을 포함한다.
- <995> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 진단, 치료 및/또는 예방될 수 있는 여성 생식계의 다른 장애 및/또는 질병으로는 예를 들어 터너 증후군, 가성 반음양, 월경 전 증후군, 골반의 염증성 병, 골반 울혈(맥관의 충혈), 냉감증, 불감증, 성교 불쾌증, 자궁관 파열 및 미텔슈미츠를 포함한다.
- <996> **감염성 질병**
- <997> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 감염성 작용제를 치료하거나 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응, 특히 B 및/또는 T 세포의 증식 및 분화를 증가시킴에 의해 감염성 질병을 치료할 수 있다. 면역 반응은 존재하는 면역 반응을 향상시키거나 새로운 면역 반응을 개시함에 의해 증가될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역 반응을 반드시 유도하지 않으면서도 감염성 작용제를 직접 억제할 수 있다.
- <998> 바이러스는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 치료 또는 검출될 수 있는 질병 또는 증후군을 야기할 수 있는 감염성 작용제의 한 예이다. 바이러스의 예는 하기 DNA 및 RNA 바이러스 및 바이러스 패밀리를 포함하나 이로 제한되지 않는다: 아르보바이러스, 아데노비리데, 아레나비리데, 아르테리바이러스, 비르나비리데, 부니아비리데, 칼리시비리데, 쉼코비리데, 코로나비리데, 뎅기, EBV, HIV, 플라비비리데, 헤파드나비리데 (간염), 헤르페스비리데 (예를 들어, 거대세포 바이러스, 단순포진, 헤르페스 조스터), 모노네가바이러스 (예를 들어, 파라믹소비리데, 모르빌바이러스, 라브도비리데), 오르토크소비리데 (예를 들어, 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 파라인플루엔자), 파필로마 바이러스, 파포바비리데, 파르보비리데, 피코르나비리데, 폭스비리데 (예를 들어, 스몰폭스 또는 백시니아), 레오비리데 (예를 들어, 로타바이러스), 레트로비리데 (HTLV-I, HTLV-II, 렌티바이러스) 및 토가비리데 (예를 들어, 루비바이러스). 상기 패밀리에 속하는 바이러스는 관절염, 세기관지염, 호흡기 융합 바이러스, 뇌염, 눈 감염(예를 들어, 결막염, 각막염), 만성 피로 증후군, 간염(A, B, C, E, 만성 황성, 델타), 일본 B 뇌염, 주닌(Junin), 치쿤군야, 금 계곡 열, 황열병, 수막염, 기회성 감염(예를 들어, AIDS), 폐렴, 버키트 림프종, 수두, 출혈성 열, 홍역, 이하선염, 파라인플루엔자, 광견병, 감기, 소아마비, 백혈병, 풍진, 성교 감염증, 피부병(예를 들어, 카포시, 사마귀) 및 바이러스혈증을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 질병 또는 증후군을 야기할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 증후군 또는 질병을 치료하거나 검출하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 수막염, 뎅기열, EBV 및/또는 간염(예를 들어, 간염 B)을 치료하는데 사용된다. 추가의 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 시판되는 다른 간염 백신에 반응을 나타내지 않는 환자를 치료하는데 사용된다. 추가의 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 AIDS 또는 HIV, 또는 HIV 감염과 조합된 간염 감염(예를 들어, 만성 C 형 간염)을 치료하는데 사용된다.
- <999> 유사하게, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 치료되거나 검출될 수 있는 질병 또는 증후군을 야기할 수 있는 세균 및 진균 작용제로는 하기 그람-음성 및 그람-양성 세균, 세균 패밀리와 진균이 있으나, 이에 제한되지 않는다: 방선균(예를 들어, 노르카르디아), 아시네토박터(Acinetobacter), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 바실라세(예를 들어, 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)), 박테로이드(예를 들어, 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*)), 분아균증, 보르데텔라, 보렐리아(예를 들어, 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)), 브루셀라, 칸디다, 캄필로박터, 클라미디아, 클로스트리듐(예를 들어, 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium butulinum*), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 퍼프린

젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 코시디오이드, 코리네박테리움(예를 들어, 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*)), 크립토코커스, 더마토사이코시스, 대장균(예를 들어, 창자독소생성 대장균 및 창자출혈 대장균), 엔테로박터(예를 들어, 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)), 엔테로박테리아세(클레브시엘라, 살모넬라(예를 들어, 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*)), 세라티아, 예르시니아, 시겔라), 에리시켈로트릭스, 헤모필루스(예를 들어, 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*) 타입 B), 헬리코박터, 레지오넬라(예를 들어, 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*)), 랩토스피라, 리스테리아(예를 들어, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)), 미코플라스마, 미코박테리움(예를 들어, 미코박테리움 레프레(*Mycobacterium leprae*) 및 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)), 비브리오(예를 들어, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)), 네이세리아세아(예를 들어, 네이세리아 고노르헤아(*Neisseria gonorrhea*), 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*)), 파스퇴렐라세아, 프로테우스, 슈도모나스(예를 들어, 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)), 리케치아세아, 스피로케테스(예를 들어, 트레포네마 종(*Treponema* spp.), 랩토스피라 종(*Leptospira* spp.), 보렐리아 종(*Borrelia* spp.), 시겔라 종(*Shigella* spp.), 스탕필로코커스(예를 들어, 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)), 메닌지오코커스, 폐렴구균 및 스트렙토코커스(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 및 그룹 A, B 및 C 스트렙토코커스) 및 우레아플라즈마. 상기 세균, 기생충 및 진균 패밀리는 하기를 포함하나 이로 제한되지 않는 질병 또는 증후군을 야기할 수 있다: 항생제-내성 감염, 균혈증, 심내막염, 폐혈증, 눈 감염(예를 들어, 결막염), 포도막염, 결핵, 치은염, 세균성 설사, 기회성 감염(예를 들어, AIDS 관련 감염), 조갑주위염, 보철 관련 감염, 치아 우식증, 레이터 병, 호흡기 감염, 예를 들어 백일해기침 또는 농흉, 폐혈증, 라임병, 고양이 급히병, 이질, 파라티푸스, 식중독, 레지오넬라 병, 만성 및 급성염증, 홍반, 효모 감염, 장티푸스, 폐렴, 임질, 수막염(예를 들어, 수막염 타입 A 및 B), 클라미디아, 매독, 디프테리아, 나병, 브루셀라증, 소화성 궤양, 탄저병, 자연 유산, 기형아, 폐렴, 폐 감염, 귀 감염, 난청, 실명, 기면증, 권태감, 구토, 만성 설사, 크론병, 대장염, 질증, 불임, 골반 염증 질환, 칸디다증, 파라결핵증, 결핵, 루푸스, 보툴리누스 중독, 괴저, 파상풍, 농가진, 류머티즘 열, 스칼렛 열, 성교 감염증, 피부병(예를 들어, 봉소염, 피부병), 독혈증, 요로 감염, 상처 감염, 병원내 감염. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 임의의 상기 증후군 또는 질병을 치료 또는 검출하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 파상풍, 디프테리아, 보툴리눔독소증 및/또는 수막염 타입 B를 치료하는데 사용된다.

<1000> 더욱이, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 치료, 예방 및/또는 진단될 수 있는 질병 또는 증후군을 야기하는 기생충으로는 하기 패밀리 또는 클래스가 있으나 이로 제한되지 않는다: 아메바병, 바베시아증, 콕시디아증, 크립토스포리듐증, 이핵아메바병, 교역, 외부 기생충, 편모충증, 연충증, 레슈마니아증, 스킴스티소마, 범안열원충증, 톡소포자충증, 트리파노소마증 및 트리코모나스 및 스포로조안(예를 들어, 플라스모듐 비락스(*Plasmodium virax*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모듐 말라리아(*Plasmodium malariae*) 및 플라스모듐 오발레(*Plasmodium ovale*)). 상기 기생충은 음, 쓰쓰가부시병, 눈 감염, 장질환(예를 들어, 이질, 편모충증), 간 질환, 폐 병, 기회성 감염(예를 들어, AIDS 관련), 말라리아, 임신 합병증 및 톡소포자충증을 포함하나 이로 제한되지 않는 다양한 질병 또는 증후군을 야기할 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 임의의 상기 증후군 또는 질병을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 말라리아를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 사용된다.

<1001> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 유효량의 본 발명의 알부민 융합 단백질을 환자에게 투여하거나, 환자로부터 세포를 제거하고, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 세포에 제공하고, 공학처리된 세포를 환자에게 반환시킴(생체외 요법)에 의해 적용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 감염성 질병에 대한 면역 반응을 일으키기 위한 백신에서 항원으로서 사용될 수 있다.

<1002> **재생**

<1003> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 조직의 재생을 유도하기 위해 세포를 분화, 증식 및 유인하는데 사용될 수 있다 (참조, Science 276:59-87(1997)). 조직의 재생은 선천적인 결함, 외상(상처, 화상, 절개 또는 궤양), 나이, 병(예를 들어, 골다공증, 골관절염, 치

주질환, 간 기능부전), 미용 성형 수술을 포함하는 수술, 섬유화, 재관류 손상 또는 전신의 사이토킨 손상에 의해 손상된 조직을 수복, 교체 또는 보호하는데 사용될 수 있었다.

<1004> 본 발명을 이용하여 재생될 수 있는 조직은 기관(예를 들어, 췌장, 간, 창자, 신장, 피부, 내피), 근육(평활근, 골격근 또는 심근), 맥관(관 및 림프관 포함), 신경, 조혈 및 골격(뼈, 연골, 힘줄, 및 인대) 조직을 포함한다. 한 구체예에서, 재생이 흉터없이 또는 흉터형성을 감소시키며 발생한다. 재생은 또한 혈관신생을 포함할 수 있다.

<1005> 또한, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 치료하기 어려운 조직의 재생을 증가시킬 수 있다. 예를 들어 증가된 힘줄/인대 재생이 손상 후 회복 시간을 촉진할 것이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 손상을 회피하기 위해 예방학적으로 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 특정 질병은 힘줄염, 손목굴 증후군 및 다른 힘줄 또는 인대 결함을 포함한다. 비치유성 상처의 조직 재생의 추가의 예는 압력 궤양, 맥관 기능부족과 관련된 궤양, 수술 및 외상 상처를 포함한다.

<1006> 유사하게, 신경 및 뇌 조직이 신경 세포를 증식 및 분화시키는 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 재생될 수 있다. 상기 방법을 사용하여 치료될 수 있는 질병은 중추 및 말초 신경계 질병, 신경병증 또는 기계적 및 외상 장애(예를 들어, 척수 장애, 두부 외상, 뇌혈관 질환 및 뇌졸중)를 포함한다. 구체적으로, 말초 신경 상처와 관련된 질환, 말초신경병증(예를 들어, 화학 요법 또는 다른 의학 치료에서 초래됨), 국소 신경병증 및 중추 신경계 질환(예를 들어, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 헌팅턴 무도병, 근위축성 측색 경화증 및 샤이-드래거 증후군)은 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 모두 치료될 수 있다.

<1007> 위장 장애

<1008> 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 염증성 질병 및/또는 질환, 감염, 암(예를 들어, 장의 신생물(소장의 카르시노이드 종양, 소장의 비호지킨 림프종, 소장 림프종) 및 궤양, 예를 들어 소화 궤양을 포함하는 위장 장애를 치료, 예방, 진단 및/또는 예지하는데 사용될 수 있다.

<1009> 위장 장애는 연하곤란, 연하통, 식도의 염증, 소화성식도염, 위의 역류, 부점막 섬유화 및 협착, 말로리-바이스 병변, 평활근증, 지방증, 표피암, 생암증, 위 축적 장애, 위장관염, 위 위축, 위(gastric)/위(stomach) 암, 위의 폴립, 악성 빈혈과 같은 자가면역 질병, 유문협착증, 위염(세균, 바이러스, 호산구, 스트레스성, 만성 미란, 위축, 혈장 세포 및 메네트리아) 및 복막질환(예를 들어, 카일로페리오늄, 혈복강, 장간막낭, 장간막림프절염, 장간막의 맥관 폐색, 지방층염, 신생물, 복막염, 기복증, 횡경막하 농양)을 포함한다.

<1010> 위장 장애는 또한 소장과 관련된 장애, 예를 들어 흡수장애 증후군, 팽창, 민감성 장 증후군, 당류 불관용, 만성소화장애증, 십이지장 궤양, 십이지장염, 열대성 스푸루, 위플 병, 장림프관 확장증, 크론 병, 충수염, 회장 폐쇄, 맥켈 게실, 다발성 게실, 소장 및 대장의 완전 회전 실패, 림프종, 및 세균 및 기생충 질병(예를 들어, 여행자 설사, 장티푸스 및 파라티푸스, 콜레라, 회충(아스카리아시스 룬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*)), 구충(안실로스토마 듀오테날(*Ancylostoma duodenale*)), 요충(엔테로비우스 베르미쿨라리스(*Enterobius vermicularis*)), 조충(타에니아 사기나타(*Taenia saginata*)), 에치노코커스 그라눌로서스(*Echinococcus granulosus*), 디필로보트륨 종(*Diphyllobothrium* spp.) 및 타에니아 솔륨(*T. solium*))에 의한 감염을 포함한다.

<1011> 간 질병 및/또는 장애는 간내 담즙 울체(알라질 증후군, 담즙성 간경변증), 지방간(알코올성 지방간, 레이 증후군), 간 정맥 혈전증, 간렌즈핵 변성, 간종, 간허파 증후군, 간신 증후군, 문맥 고혈압(식도 및 위 정맥류), 간 농양(아메바성 간 농양), 간경화(알코올성, 담즙성 및 실험성), 알코올성 간 질병(지방간, 간염, 경화증), 기생충(간 포낭충증, 간질증, 아메바성 간 농양), 황달(용혈성, 간세포성 및 담즙성), 담즙 정체, 문맥 고혈압, 간 비대, 복수, 간염(알코올성 간염, 동물성 간염, 만성 간염(자가면역, 간염 B, 간염 C, 간염 D, 약물 유도), 독성 간염, 바이러스 인간 간염(간염 A, 간염 B, 간염 C, 간염 D, 간염 E)), 윌슨병, 육아종성 간염, 이차 담즙성 간경변증, 간성 뇌증, 문맥 고혈압, 정맥류, 간성 뇌증, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성담관염, 간세포성 선종, 혈관종, 담즙 돌, 간 기능부전(간성 뇌증, 급성 간 기능부전) 및 간 신생물(혈관 근육 지방종, 석회성 간 전이, 포낭성 간 전이, 상피성 종양, 섬유표층 간암, 국소 결절성 과형성, 간 샘종, 간담즙성 낭선종, 간모세포종, 간 세포암, 간암, 간 암, 간 혈관내피종, 중간엽 과오종, 간의 중간엽 종양, 결절성 재생 과형성, 양성 간

종양(간장 포낭 [단순 포낭, 다낭포간 병, 간담즙성 낭선종, 총담관낭], 중간엽 종양 [중간엽 과오종, 유아의 혈관내피종, 혈관종, 간자반병, 지방종, 염증성 가종양, 미셀라너스], 상피 종양 [담관 상피 (담관 과오종, 담관 선종), 간세포(선종, 국소 결절성 과형성, 결절성 재생 과형성)], 악성 간 종양 [간세포성, 간모세포종, 간세포암, 담관세포, 담관암종, 낭선암종, 혈관의 종양, 맥관육종, 카포시 육종, 혈관내피종, 기타 종양, 배아 육종, 섬유육종, 평활근육종, 횡문근 육종, 암육종, 테라토마, 유암종, 인편장 암, 일차 림프종], 간자반병, 적혈구간성 포르피린증, 간, 포르피린증(급성 간혈성 포르피린증, 만발성 피부포르피린증), 켈웨거 증후군)을 포함한다.

<1012> 췌장 질병 및/또는 장애는 급성 췌장염, 만성 췌장염(급성 괴사 췌장염, 알코올성 췌장염), 신생물(췌장의 생암종, 낭선암종, 인슐리노마, 다발성 위궤양 및 글루카곤종양, 포낭성 신생물, 도세포 종양, 췌장모세포종), 및 기타 췌장 질환(예를 들어, 낭성 섬유증, 포낭(췌장 가성낭포, 췌장 셋길, 기능부족))을 포함한다.

<1013> 담낭 질병은 담석(담석증 및 총담관 결석증), 담낭절제후 증후군, 담낭 계실, 급성 담낭염, 만성 담낭염, 담관 종양 및 점액류를 포함한다.

<1014> 대장의 질병 및/또는 질환은 항생제 관련 대장염, 계실염, 궤양성 대장염, 후천성 거대결장증, 농양, 진균 및 세균 감염, 항문직장 장애(예를 들어, 틈새, 치질), 결장 질환(대장염, 결장 신생물 [결장암, 샘종 결장 폴립 (예를 들어, 용모 샘종), 결장 암종, 결장직장 암], 결장 계실염, 결장 계실증, 거대결장증 [허쉬스프링 병, 독성 거대결장증]; 구불창자 질병[직장결장염, 시그모인 신생물]), 변비, 크론병, 설사(영아 설사, 이질), 십이지장 질병(십이지장 신생물, 십이지장 폐쇄, 십이지장 궤양, 십이지장염), 장염(소장결장염), HIV 장병증, 회장 질환(회장 신생물, 회장염), 면역중식성 소장 질환, 선천적인 장 질병(궤양성 대장염, 크론병), 장 폐쇄, 기생충 질병(아니사키스증, 발란티듬증, 주머니배 감염, 크립토스포리듬증, 이핵아메바증, 아메바성 이질, 편모충증), 장루(직장루), 장의 신생물(맹장 신생물, 결장 종양, 십이지장 신생물, 회장 신생물, 장 폴립, 공장 신생물, 직장 신생물), 장의 폐쇄(구심성 고리 증후군, 십이지장 폐쇄, 매복 대변, 장의 유사 폐쇄 [맹장의 장축염전증], 중적), 장의 천공, 장의 폴립(결장 폴립, 가드너 증후군, 퓨츠-제거스 증후군), 공장 질병(공장 신생물), 흡수 장애 증후군(눈먼 고리 증후군, 소아만성소화장애증, 락토오스 불관용증, 작은창자 증후군, 열대성 스푸루, 위플 병), 장간막의 맥관 폐색, 장벽낭상기종, 단백질-손실 장병증(장 림프확대), 직장 질병(항문 병, 분실금, 치질, 직장염, 직장루, 직장탈, 직장류), 소화성 궤양(십이지장 궤양, 소화성식도염, 출혈, 천공, 위궤양, 졸링거-엘리슨 증후군), 위절제후 증후군(담팽 증후군), 위 질병(예를 들어, 무위산증, 위십이지장 역류(담즙 역류), 위 진정 맥관 확장증, 위루, 위날문 폐쇄, 위염(위축성 또는 비후성이다), 위 마비, 위 팽창, 위 계실, 위 신생물(위암, 위의 폴립, 위의 선암종, 증식성 위의 폴립), 위 과열, 위 궤양, 위염전), 결핵, 내장하수증, 구토(예를 들어, 토혈, 임신 입덧, 수술후 욕지기 및 구토) 및 출혈성 결장염을 포함한다.

<1015> 위장 시스템의 추가의 질병 및/또는 장애는 담도 질환(예를 들어, 위벽과열, 누공(예를 들어, 담도루공, 식도루, 위루, 장루, 췌루), 신생물(예를 들어, 담도 신생물, 식도 신생물, 예를 들어 식도의 샘암종, 식도 편평세포암종, 위장 신생물, 췌장 신생물, 예를 들어 췌장의 선암종, 췌장의 점액 포낭성 신생물, 췌장 포낭성 신생물, 쓸개모세포종 및 복막 신생물), 식도 질병(예를 들어, 수포성 병, 칸디다증, 글리코겐의 극세포증, 궤양화, 바렛 식도 정맥류, 폐쇄증, 포낭, 계실(예를 들어, 췌관 계실), 누공(예를 들어, 기관식도루), 운동성 질병(예를 들어, CREST 증후군, 연하 장애, 아카라시아, 경련, 위 식도의 역류), 신생물, 천공(예를 들어, 비르하브 증후군, 말로리-바이스 증후군), 협착, 식도염, 횡격막의 탈장(예를 들어, 틈새 헤르니아), 위장 질병, 예를 들어 위장관염(예를 들어, 급성 위장염, 노르윅 바이러스 감염), 출혈(예를 들어, 토혈, 흑색변, 소화성 궤양 출혈), 위 신생물(위의 암, 위의 폴립, 위의 선암종, 위암), 탈장(예를 들어, 선천적인 횡격막 탈장, 대퇴탈장, 서혜부 탈장, 폐쇄공 탈장, 탱줄 탈장, 복부 탈장) 및 장 질환(예를 들어, 맹장 질환(충수염, 맹장의 신생물))을 포함한다.

<1016> 화학주성

<1017> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화학주성 활성을 지닐 수 있다. 화학주성 분자는 세포(예를 들어, 단핵구, 섬유모세포, 호중구, T-세포, 비만 세포, 호산구, 상피 및/또는 내피 세포)를 신체의 특정 부위, 예를 들어 염증, 감염 또는 과증식 부위로 유인하거나 이동시킨다. 이동된 세포는 이후 특정 외상 또는 비정상과 싸우고/거나 치료한다.

<1018> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특정 세포의 화학주성을 증가시킬 수 있다. 상기 화학주성 분자는 이후 신체내 특정 부위에 표적화된 세포의 수를 증가시킴에 의해 염증, 감염, 과증식 장애 또는 임의의 면역계 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어,

화학주성 분자는 손상된 부위에 면역 세포를 유인하여 상처 및 조직에 대한 다른 외상을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 화학주성 분자는 또한 상처를 치료하는데 사용될 수 있는 섬유모세포를 유인할 수 있다.

<1019> 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화학주성 활성을 억제할 수 있는 것으로 또한 고려된다. 상기 분자는 또한 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 화학주성의 억제제로서 사용될 수 있다.

결합 활성

<1021> 본 발명의 융합 단백질은 융합 단백질의 치료적 단백질 부분에 결합하는 분자 또는 융합 단백질의 치료적 단백질 부분이 결합되는 분자를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 융합 단백질 및 분자의 결합은 융합 단백질 또는 결합된 분자의 활성을 활성화(예를 들어, 효능제, 부분적 효능제 등), 증가, 억제(예를 들어, 길항제, 부분적 길항제 등) 또는 감소시킬 수 있다. 그러한 분자의 예로는 항체, 올리고뉴클레오티드, 단백질(예를 들어, 수용체) 또는 소 분자가 있다.

<1022> 한 구체예에서, 분자는 본 발명의 융합 단백질의 치료적 단백질 부분의 천연 리간드, 예를 들어 리간드의 단편, 천연 기질, 리간드, 구조적 또는 기능적 모방체(mimetic)와 밀접하게 관련이 있다. [참조: Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5 (1991)]. 유사하게, 분자는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분이 결합하는 천연 수용체, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분에 의해 결합될 수 있는 적어도 수용체의 단편(예를 들어, 활성 부위)과 밀접하게 관련될 수 있다. 어느 쪽이든, 분자는 공지된 기술을 사용하여 적절하게 고안될 수 있다.

<1023> 한 구체예에서, 상기 분자의 스크리닝은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현시키는 적합한 세포의 생성을 수반하는 것이 바람직하다. 예시적인 세포는 포유동물, 효모, 드로소필라 또는 대장균으로부터의 세포를 포함한다.

<1024> 검정은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대한 후보 화합물의 결합을 단순히 시험해볼 수 있는데, 이 때 결합은 라벨에 의해 검출되거나 라벨링된 경쟁자와의 경쟁을 포함하는 검정으로 검출된다. 추가로, 검정은 후보 화합물이 융합 단백질과의 결합에 의해 생성된 시그널을 초래하는지를 검사할 수 있다.

<1025> 대안적으로, 검정은 무-세포 제조물, 고정 지지체에 고정된 융합 단백질/분자, 화학 라이브러리 또는 천연 생성물 혼합물을 사용하여 수행될 수 있다. 검정은 또한 단순히 후보 화합물을 알부민 융합 단백질을 함유하는 용액과 혼합시키는 단계, 융합 단백질/분자 활성 또는 결합을 측정하는 단계, 및 표준과 융합 단백질/분자 활성 또는 결합을 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

<1026> 한 구체예에서, ELISA 검정으로 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 이용하여 샘플(예를 들어, 생물학적 샘플)에서 융합 단백질의 레벨 또는 활성을 측정할 수 있다. 항체는 알부민 융합 단백질에 직접 또는 간접적으로 결합하거나, 기질에 대해 알부민 융합 단백질을 경쟁시킴에 의해 융합 단백질의 레벨 또는 활성을 측정할 수 있다.

<1027> 추가로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분이 결합하는 수용체는 당업자에게 공지된 수많은 방법, 예를 들어 리간드 패닝 및 FACS 분류 (Coligan, et al., Current Protocols in Immun., 1(2), Chapter 5, (1991))에 의해 동정될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 치료적 단백질 부분이 FGF에 반응하는 경우, 알부민 융합 단백질에 반응성인 세포, 예를 들어 FGF 패밀리 단백질에 대한 다중 수용체를 함유하는 것으로 공지되어 있는 NIH3T3 세포, 및 SC-3 세포로부터 폴리아데닐화된 RNA가 제조되고 이 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리가 풀로 나뉘어 COS 세포 또는 알부민 융합 단백질에 반응하지 않는 다른 세포를 트랜스펙션하는데 사용되는 발현 클로닝이 적용될 수 있다. 유리 슬라이드에서 성장된 트랜스펙션된 세포를 라벨링한 후 본 발명의 알부민 융합 단백질에 노출시킨다. 알부민 융합 단백질은 부위-특이적 단백질 키나아제에 대한 인식 부위의 요오드화 또는 봉입을 포함하는 다양한 방법에 의해 라벨링될 수 있다.

<1028> 고정 및 인큐베이션 후, 슬라이드를 자동-방사선 분석한다. 포지티브 풀을 동정하고, 서브-풀을 제조하고 반복적인 서브-풀링 및 제스크리닝 과정을 이용하여 제트랜스펙션시켜 실제로 추정되는 수용체를 엔코딩하는 단일 클론을 수득한다.

<1029> 수용체 동정에 관한 대안적인 접근법으로서, 라벨링된 알부민 융합 단백질을 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 성분에 대한 수용체 분자를 발현시키는 세포막 또는 추출 제조물과 광친화성 연결시킬 수 있고,

연결된 물질은 PAGE 분석에 의해 분석되어 X-레이 필름에 노출될 수 있다. 융합 단백질의 수용체를 함유하는 라벨링된 복합체는 절제, 펩티드 단편에 용해 및 단백질 마이크로시퀀싱될 수 있다. 마이크로시퀀싱으로 수득된 아미노산 서열은 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 일련의 축퇴 올리고뉴클레오타이드 프로브를 고안하는데 사용되어 추정되는 수용체를 엔코딩하는 유전자를 동정할 것이다.

<1030> 더욱이, 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링 및/또는 코돈-서플링(총괄하여 "DNA 서플링"으로 언급함)의 기술은 융합 단백질, 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분 또는 알부민 성분의 활성을 조절하는데 적용되어 본 발명의 알부민 융합 단백질의 효능제 및 길항제를 효과적으로 생성할 수 있다. [참조, 일반적으로 미국 특허 번호 제5,605,793호, 제5,811,238호, 제5,830,721호, 제5,834,252호, 및 제5,837,458호, and Patten, P. A., et al., *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33 (1997); Harayama, S. *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998); Hansson, L. O., et al., *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999); and Lorenzo, M. M. and Blasco, R. *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998); 상기 특허 및 공개문헌의 각각은 본원에 참조로서 포함됨]. 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 변경, 및 그에 의해 엔코딩되는 알부민 융합 단백질이 DNA 서플링에 의해 달성될 수 있다. DNA 서플링은 동형, 또는 부위 특이적 재조합에 의해 둘 이상의 DNA 세그먼트를 요망되는 분자에 어셈블링하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 그에 의해 엔코딩되는 알부민 융합 단백질이 재조합 이전에 에러-프론 PCR, 랜덤 뉴클레오타이드 삽입 또는 다른 방법에 의해 랜덤 변이됨으로써 변경될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등은 하나 이상의 이형 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 이형 분자는 패밀리 멤버이다. 추가의 구체예에서, 이형 분자는 성장 인자, 예를 들어 혈소판-유래된 성장 인자(PDGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF-I), 형질전환 성장 인자(TGF)-알파, 표피 성장 인자(EGF), 섬유모세포 성장 인자(FGF), TGF-베타, 골 형태형성 단백질(BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, 액티빈 A 및 B, 데카펜타플렉스(dpp), 60A, OP-2, 도르살린, 성장 분화 인자(GDFs), 결절, MIS, 인히빈-알파, TGF-베타1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타5, 및 아교세포-유래된 항신경 인자(GDNF)이다.

<1031> 다른 예시적인 단편은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분 및/또는 알부민 성분의 생물학적으로 활성인 단편이다. 생물학적으로 활성인 단편은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분 및/또는 알부민 성분의 활성과 반드시 동일할 필요는 없으나 유사한 활성을 나타내는 것들이다. 단편의 생물학적 활성은 개선된 요망되는 활성, 또는 감소된 요망되지 않는 활성을 포함할 수 있다.

<1032> 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 작용을 조절하는 것들을 동정하는 화합물을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 그러한 검정의 예는 섬유모세포가 정상적으로 증식하는 세포 배양 조건하에 포유동물 섬유모세포, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 스크리닝되는 화합물 및 ³[H] 티미딘을 조합시키는 것을 포함한다. 대조군 검정은 스크리닝되는 화합물의 부재하에 수행될 수 있고, 이것을 화합물의 존재하에 이루어진 섬유모세포 증식 정도와 비교하는데 ³[H] 티미딘의 흡수를 측정함에 의해 각 경우에 화합물이 증식을 자극하는지를 결정한다. 섬유모세포 증식 정도는 ³[H] 티미딘의 혼입을 측정하는 액체 섬광 크로마토그래피에 의해 측정된다. 효능제 및 길항제 화합물 둘 모두가 상기 공정에 의해 동정될 수 있다.

<1033> 또 다른 방법에서, 본 발명의 융합 화합물의 치료적 단백질 성분에 대한 수용체를 발현시키는 포유동물 세포 또는 막 제조물을 화합물의 존재하에 본 발명의 라벨링된 융합 단백질과 함께 인큐베이션한다. 이후 이러한 상호작용을 증진시키거나 차단하는 화합물의 능력을 측정할 수 있다. 대안적으로, 스크리닝되는 화합물의 상호작용 이후 공지된 제2 메신저 시스템의 반응 및 수용체가 결정되며, 수용체에 결합하여 제2 메신저 반응을 유도하는 화합물의 능력을 측정하여 화합물이 잠재적인 융합 단백질인지를 결정한다. 이러한 제2 메신저 시스템은 cAMP 구아닐레이트 사이클라제, 이온 채널 또는 포스포이노시타이드 가수분해를 포함하나 이로 제한되지 않는다.

<1034> 이러한 상기 검정은 모두 진단 또는 예후 마커로서 사용될 수 있다. 상기 검정을 이용하여 발견된 분자는 질병을 치료하거나, 융합 단백질/분자를 활성화시키거나 억제하여 환자에게서 특정 결과(예를 들어, 혈관 성장)를 초래하는데 이용될 수 있다. 더욱이, 상기 검정은 적합하게 조작된 세포 또는 조직으로부터 본 발명의 알부민 융합 단백질의 생성을 억제 또는 향상시킬 수 있는 작용제를 발견할 수 있다.

<1035> 따라서, 본 발명은 (a) 후보 결합 화합물을 본 발명의 알부민 융합 단백질과 함께 인큐베이션시키는 단계; 및 (b) 결합이 발생하였는지를 측정하는 단계를 포함하는, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하는 화합물을 동정하는 방법을 포함한다. 또한, 본 발명은 (a) 후보 화합물을 본 발명의 알부민 융합 단백질과 함께 인큐베이션

선시키는 단계, (b) 생물학적 활성을 검정하는 단계, 및 (c) 융합 단백질의 생물학적 활성이 변경되었는지를 측정하는 단계를 포함하는, 효능제/길항제를 동정하는 방법을 포함한다.

표적 전달

또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 성분에 대한 수용체를 발현시키는 표적 세포에 조성물을 전달하는 방법을 제공한다.

본원에서 논의된 대로, 본 발명의 융합 단백질(예를 들어, 알부민 융합 단백질)은 소수성, 친수성, 이온성 및/또는 공유 상호작용을 통해 이중 폴리펩티드, 이중 핵산, 독소 또는 전구약물에 결합될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 이중 폴리펩티드 또는 핵산과 결합된 본 발명의 융합 단백질(항체 포함)을 투여함에 의해 본 발명의 조성물을 세포에 특이적으로 전달하는 방법을 제공한다. 한 예에서, 본 발명은 치료 단백질을 표적 세포에 전달하는 방법을 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 단일 가닥 핵산(예를 들어, 안티센스 또는 리보자임) 또는 이중 가닥 핵산(예를 들어, 세포의 게놈에 통합되거나 에피솜으로 복제될 수 있고 전사될 수 있는 DNA)을 표적 세포에 전달하는 방법을 제공한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질(예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 항체)을 독소 또는 세포독성 전구약물과 함께 투여함에 의해 세포를 특이적으로 파괴(예를 들어, 종양 세포의 파괴)하는 방법을 제공한다.

"독소"란 내인성 세포독성 이펙터 시스템에 결합하여 활성화되는 화합물, 방사성동위원소, 홀로독신(holotoxin), 개질된 독소, 독소의 촉매적 서브유닛, 또는 규정된 조건하에 세포 치사를 야기하는 세포의 표면에 또는 표면에 일반적으로 존재하지 않는 임의의 분자 또는 효소를 의미한다. 본 발명의 방법에 따라 이용될 수 있는 독소로는 당 분야에 공지된 방사성동위원소, 예를 들어 고유의 또는 유도된 내인성 세포독성 이펙터 시스템과 결합하는 항체(또는 이의 일부를 함유하는 보체 결합)와 같은 화합물, 티미딘 키나제, 엔도뉴클레아제, RNase, 알파 독소, 리신, 아브린, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A, 디프테리아 독소, 사포린, 모모르딘, 게로닌, 역세포 항바이러스 단백질, 알파-사르신 및 콜레라 독소가 있으나, 이에 제한되지 않는다. "세포독성 전구약물"이란 세포에 정상적으로 존재하는 효소에 의해 세포독성 화합물로 전환되는 비독성 화합물을 의미한다. 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있는 세포독성 전구약물에는 벤조산 머스타드 알킬화제의 글루타미드 유도체, 에토포사이드 또는 미토마이신 C의 인산염 유도체, 사이토신 아라비노사이드, 다우노루비신 및 독소루비신의 페녹시아세트아미드 유도체가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

약물 스크리닝

본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분에 상응하는 단백질의 활성을 개질시키는 분자를 스크리닝하기 위한 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 상기 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도가 또한 고려된다. 상기 방법은 융합 단백질을 길항제 또는 효능제 활성을 지닐 것으로 여겨지는 선택된 화합물(들)과 접촉시키고 결합 이후 융합 단백질의 활성을 검정하는 것을 포함할 것이다.

본 발명은 특히 다양한 약물 스크리닝 기술 중 어느 하나에서 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 결합 단편을 사용하여 치료적 화합물을 스크리닝하는데 유용하다. 상기 시험에 적용되는 알부민 융합 단백질은 고체 지지체에 고정되거나 용액 없이 세포 표면상에서 발현되거나 세포내에 정위된다. 약물 스크리닝의 한 방법은 알부민 융합 단백질을 발현시키는 재조합 핵산으로 안정하게 형질전환되는 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 사용하는 것이다. 경쟁적인 결합 검정에서 상기 세포를 배양하여 수득된 형질전환된 세포 또는 상청액에 대해 약물이 스크리닝된다. 예를 들어 시험되는 작용제와 본 발명의 알부민 융합 단백질 사이의 복합체의 형성을 측정할 수 있다.

따라서, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 매개되는 활성에 영향을 주는 약물 또는 임의의 다른 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 작용제를 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 단편과 접촉시키고 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 작용제와 알부민 융합 단백질 또는 이의 단편 사이의 복합체의 존재를 검정하는 것을 포함한다. 상기 경쟁적인 결합 검정에서, 스크리닝을 위한 작용제는 통상적으로 라벨링된다. 인큐베이션 후, 유리 작용제를 결합된 형태로 존재하는 것으로부터 분리하며, 유리 라벨 또는 복합되지 않은 라벨의 양이 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하는 특정 작용제의 능력치이다.

약물 스크리닝에 대한 또 다른 기술은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대해 적합한 결합 친화력을 지니는 화합물에 대한 높은 처리량의 스크리닝을 제공하며, 이것은 본원에 참조로서 포함되고 1984년 9월 13일 공개된 유럽 특허 출원 84/03564호에 매우 상세히 기술되어 있다. 간단히 언급하자면, 많은 수의 상이한 소형 펩티드 시험

화합물을 플라스틱 핀 또는 몇몇 다른 표면과 같은 고체 기질상에서 합성한다. 펩티드 시험 화합물을 본 발명의 알부민 융합 단백질과 반응시키고 세척한다. 결합된 펩티드를 이후 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 검출한다. 정제된 알부민 융합 단백질은 상기 언급된 약물 스크리닝 기술에 사용되는 플레이트에 직접 코팅될 수 있다. 또한, 비중화 항체가 펩티드를 포획하여 고체 지지체상에 이것을 고정시키는데 사용될 수 있다.

<1046> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질과 결합할 수 있는 중화 항체가 알부민 융합 단백질 또는 이의 단편에 결합하는 시험 화합물과 특이적으로 결합하는 경쟁적인 약물 스크리닝 검정의 사용을 고려한다. 이러한 방식으로, 항체는 하나 이상의 항원성 에피토프를 본 발명의 알부민 융합 단백질과 공유하는 임의의 펩티드의 존재를 검출하는데 사용된다.

<1047> 결합 펩티드 및 기타 분자

<1048> 본 발명은 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질과 결합하는 폴리펩티드 및 비폴리펩티드를 동정하는 방법, 및 그에 의해 동정된 결합 분자를 포함한다. 이러한 결합 분자는 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질의 효능제 및 길항제로서 유용하다. 상기 효능제 및 길항제는 본 발명에 따라 하기 상세하게 기술된 치료 구체예에 사용될 수 있다.

<1049> 상기 방법은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 다수의 분자와 접촉시키는 단계; 및 알부민 융합 단백질과 결합된 분자를 동정하는 단계를 포함한다.

<1050> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 다수의 분자와 접촉시키는 단계는 여러 가지 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 한 방법은 알부민 융합 단백질을 고체 지지체상에 고정시키고 다수의 분자의 용액을 고정된 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 고려해 볼 수 있다. 이러한 절차는 친화력 매트릭스가 본 발명의 고정된 알부민 융합 단백질로 구성된 친화력 크로마토그래피 공정과 유사할 것이다. 알부민 융합 단백질에 대해 선택적인 친화력을 지니는 분자는 이후 친화력 선별에 의해 정제될 수 있다. 고체 지지체, 고체 지지체에 알부민 융합 단백질의 부착 공정, 용매 및 친화력 분리 또는 선별 조건의 특징은 매우 통상적인 것이며 당업자에게 널리 공지되어 있다.

<1051> 대안적으로, 다수의 폴리펩티드를 개별적인 폴리펩티드의 서브셋을 포함하는 실질적으로 분리된 분획으로 분리할 수 있다. 예를 들어, 다수의 폴리펩티드를 겔 전기영동, 컬럼 크로마토그래피 또는 폴리펩티드의 선별을 위해 당업자에게 공지된 유사한 방법에 의해 분리할 수 있다. 개별적인 폴리펩티드는 또한 숙주 세포 외부 표면에 또는 그 부근에 발현(예를 들어, 재조합 파지)되는 방식으로 형질전환된 숙주 세포에 의해 생성될 수 있다. 개별적인 분리물은 이후, 발현에 필요한 유도인자의 존재 또는 부재하에 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 "프로빙(probed)"될 수 있으며, 이는 임의의 선택적인 친화력 상호작용이 알부민 융합 단백질과 개별적인 클론간에 발생하는지를 결정한다. 알부민 융합 단백질을 개별적인 폴리펩티드를 포함하는 각 분획과 접촉시키기 전에, 폴리펩티드는 먼저 부가적인 편의를 위해 고체 지지체로 옮겨질 수 있다. 상기 고체 지지체는 단순히 필터 막의 한 조각, 예를 들어 니트로셀룰로오스 또는 나일론으로 제조된 것일 수 있다. 이러한 방식으로, 포지티브 클론이 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대해 선택적인 친화력을 지니는 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA 작제물을 포함하는 발현 라이브러리의 형질전환된 숙주 세포의 수집물로부터 동정될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대해 선택적인 친화력을 지니는 폴리펩티드의 아미노산 서열은 통상적인 방법에 의해 직접 결정될 수 있거나, 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA의 코딩 서열은 종종 보다 편리하게 결정될 수 있다. 일차 서열은 이후 상응하는 DNA 서열로부터 추론될 수 있다. 아미노산 서열이 폴리펩티드 자체로부터 결정되는 경우, 마이크로시퀀싱 기술을 이용할 수 있다. 시퀀싱 기술은 질량 분광학을 포함할 수 있다.

<1052> 특정 경우에, 선택적인 친화력 상호작용의 존재를 결정하거나 검출하기 전에 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 다수의 폴리펩티드의 혼합물로부터 임의의 결합되지 않은 폴리펩티드를 세척하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 세척 단계는 특히 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 다수의 폴리펩티드가 고체 지지체상에 결합되는 경우에 바람직할 수 있다.

<1053> 상기 방법에 따라 제공된 다수의 분자는 다양한 라이브러리, 예를 들어 본 발명의 알부민 융합 단백질과 특이적으로 결합하는 분자에 대해 스크리닝될 수 있는 랜덤 또는 조합 펩티드 또는 비펩티드 라이브러리에 의해 제공될 수 있다. 사용될 수 있는 많은 라이브러리, 예를 들어 화학적으로 합성된 라이브러리, 재조합(예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리) 및 시험관내 번역-기재 라이브러리가 당 분야에 공지되어 있다. 화학적으로 합성된 라이브러리의 예가 문헌[Fodor et al., Science 251:767-773 (1991); Houghten et al., Nature 354:84-86 (1991); Lam et al., Nature 354:82-84 (1991); Medynski, Bio/Technology 12:709-710 (1994); Gallop et al., J. Medicinal Chemistry 37(9):1233-1251 (1994); Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90:10922-10926 (1993); Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426 (1994); Houghten et al., Biotechniques 13:412 (1992); Jayawickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618 (1994); Salmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712 (1993); PCT Publication No. WO 93/20242; and Brenner and Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383 (1992)]에 기재되어 있다.

<1054> 펩티드 디스플레이 라이브러리의 예가 문헌[Scott et al., Science 249:386-390 (1990); Devlin et al., Science, 249:404-406 (1990); Christian et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:711-718 (1992); Lenstra, J. Immunol. Meth. 152:149-157 (1992); Kay et al., Gene 128:59-65 (1993); and PCT Publication No. WO 94/18318 dated Aug. 18, 1994]에 기재되어 있다.

<1055> 시험관내 번역-기재 라이브러리가 문헌[PCT Publication No. WO 91/05058 dated Apr. 18, 1991; and Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026 (1994)]에 기재되어 있으나 이에 제한되지 않는다.

<1056> 비펩티드 라이브러리의 예로서, 벤조디아제핀 라이브러리(참조, 예를 들어 Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 (1994))가 사용되기에 적합될 수 있다. 펩티드 라이브러리(Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371 (1992))가 또한 사용될 수 있다. 펩티드 중 아미드 작용기가 과메틸화되어 화학적으로 형질전환된 조합 라이브러리를 생성하는 사용될 수 있는 라이브러리의 또 다른 예가 문헌 [Ostresh et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142 (1994)]에 기재되어 있다.

<1057> 본 발명에서 유용한 비펩티드 라이브러리의 종류는 많다. 예를 들어 엑커(Ecker) 및 크루키(Crooke)의 문헌 [Bio/Technology 13:351-360 (1995)]에는 다양한 라이브러리의 기초를 형성하는 화학 종 중에서도 벤조디아제핀, 하이단토인, 피페라진디온, 비페닐, 당류 유사체, 베타-메르캅토케톤, 아릴아세트산, 아실피페리딘, 벤조피란, 쿠반, 크산틴, 아민이미드 및 옥사졸론이 나열되어 있다.

<1058> 비펩티드 라이브러리는 크게 두 유형으로 분류될 수 있다: 데코레이션된 단량체 및 올리고머. 데코레이션된 단량체 라이브러리는 다양한 작용기가 첨가된 비교적 단순한 골격 구조를 이용한다. 종종 골격은 공지된 유용한 약리 활성을 지니는 분자일 것이다. 예를 들어, 골격은 벤조디아제핀 구조일 수 있다.

<1059> 비펩티드 올리고머 라이브러리는 단량체의 순서에 따라 신규한 형태를 생성하는 방식으로 함께 어셈블링되는 많은 수의 단량체를 이용한다. 단량체 유닛 중에서 사용되는 것은 카르바메이트, 피롤리논 및 모르폴리논이다. 측쇄가 알파 탄소가 아닌 알파 아미노기에 부착되는 펩티드, 펩티드-유사 올리고머는 비펩티드 올리고머 라이브러리의 또 다른 변형의 기초를 형성한다. 첫번째 비펩티드 올리고머 라이브러리는 단일 유형의 단량체를 사용하였으므로 반복적인 백본을 함유하였다. 최근의 라이브러리는 하나 이상의 단량체를 사용하여, 유연성이 부가된 라이브러리를 제공한다.

<1060> 라이브러리를 스크리닝하는 것은 통상적으로 공지된 다양한 방법 중 어느 하나에 의해 달성될 수 있다. [예를 들어, 펩티드 라이브러리의 스크리닝을 기술하고 있는 하기 참조문헌 참조: Parmley et al., Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218 (1989); Scott et al., Science 249:386-390 (1990); Fowlkes et al., BioTechniques 13:422-427 (1992); Oldenburg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397 (1992); Yu et al., Cell 76:933-945 (1994); Staudt et al., Science 241:577-580 (1988); Bock et al., Nature 355:564-566 (1992); Tuerk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992 (1992); Ellington et al., Nature 355:850-852 (1992); 미국 특허 번호 제 5,096,815호, 미국 특허 번호 제 5,223,409호, 및 미국 특허 번호 제 5,198,346호, all to Ladner et al.; Rebar et al., Science 263:671-673 (1993); 및 국제 공개 번호 제 WO 94/18318호].

<1061> 한 특정 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 결합하는 분자를 동정하기 위한 스크리닝은 라이브러리 멤버를 고체상에 고정된 본 발명의 알부민 융합 단백질과 접촉시키고 알부민 융합 단백질과 결합된 라이브러리 멤버를 수집함에 의해 수행된다. "패닝(panning)" 기술로서 언급되는 상기 스크리닝 방법의 실시예가 문헌 [Parmley et al., Gene 73:305-318 (1988); Fowlkes et al., BioTechniques 13:422-427 (1992); PCT Publication No. WO 94/18318; 및 본원에 인용된 참조문헌]에 예로서 기재되어 있다.

<1062> 또 다른 구체예에서, 효모에서 상호작용하는 단백질을 선별하기 위한 2-하이브리드 시스템[Fields et al., Nature 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582 (1991)]이 본 발명의 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 분자를 동정하기 위해 사용될 수 있다.

<1063> 결합 분자가 폴리펩티드일 때, 폴리펩티드는 랜덤 펩티드 라이브러리, 조합 펩티드 라이브러리 또는 바이어싱된 펩티드 라이브러리를 포함하는 임의의 펩티드 라이브러리로부터 편리하게 선택될 수 있다. "바이어싱된"이란

용어는 라이브러리를 생성하는 방법을 조작함에 의해 이 경우의 펩티드에서 분자의 생성된 수집물의 다양성을 좌우하는 하나 이상의 파라미터를 제한함을 의미하기 위해 본원에서 사용된다.

<1064> 따라서, 정확한 랜덤 펩티드 라이브러리는 펩티드의 소정의 위치에서 특정 아미노산을 발견할 확률이 모든 20개의 아미노산에 대해 동일한 펩티드의 수집물을 생성할 것이다. 그러나, 예를 들어 라이신이 모든 다섯번째 아미노산에 존재하거나 단지 아르기닌만을 포함하도록 고정된 데카펩티드 라이브러리의 4, 8 및 9 위치에 존재하도록 특정함에 의해 바이어스가 라이브러리에 도입될 수 있다. 명백하게, 많은 유형의 바이어스가 고려될 수 있고, 본 발명은 임의의 특정 바이어스에 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명은 과거 디스플레이된 펩티드 라이브러리 및 람다 과거 벡터와 함께 DNA 삽입을 포함하는 DNA 구성물을 이용하는 것과 같이, 특정 유형의 펩티드 라이브러리를 고찰한다.

<1065> 상기 언급된 대로, 폴리펩티드인 결합 분자의 경우에, 폴리펩티드는 약 6개 내지 약 60개 미만의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 6개 내지 약 10개의 아미노산 잔기, 및 추가로 약 6개 내지 약 22개의 아미노산 잔기를 지닐 수 있다. 또 다른 구체예에서, 결합 폴리펩티드는 15-100개 아미노산, 또는 20-50개 아미노산을 지닌다.

<1066> 선택된 결합 폴리펩티드는 화학적 합성 또는 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다.

<1067> 기타 활성

<1068> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 혈전증, 동맥경화증 및 기타 심혈관 질환과 같은 다양한 질환에 기인한 허혈 조직의 재혈관신생을 자극하는 치료에 적용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 상기 논의된 혈관형성 및 사지 재생을 자극하는데 이용될 수 있다.

<1069> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 섬유모세포 및 골격근 세포와 같은 상이한 기원의 다양한 세포에 대해 분열촉진성이어서 손상되거나 질병에 걸린 조직의 수복 또는 대체를 촉진시키기 때문에 상해, 화상, 수술후 조직 복원 및 궤양으로 인한 상처를 치료하는데 이용될 수 있다.

<1070> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 신경세포 성장을 자극하여 알츠하이머병, 파킨슨병, 및 AIDS 관련 합병증과 같은 특정 신경세포 장애 또는 신경-퇴행성 질환에서 발생하는 신경세포 손상을 치료하고 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 연골세포 성장을 자극할 수 있어서, 뼈 및 치주 재생을 향상시키고 조직 이식 또는 뼈 이식을 돕는데 사용될 수 있다.

<1071> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 각질세포 성장을 자극하여 일광화상으로 인한 피부 노화를 예방하는데 사용될 수 있다.

<1072> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 탈모를 예방하는데 사용될 수 있다. 동일 범주에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 다른 사이토킨과 함께 사용되는 경우 조혈 세포 및 뼈 골수 세포의 성장 및 분화를 촉진하는데 적용될 수 있다.

<1073> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 이식 전에 기관을 유지하거나 일차 조직의 세포 배양을 지지하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 조기 배낭에서 분화하는 중배엽 기원의 조직을 유도하는데 사용될 수 있다.

<1074> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 상기 언급된 바와 같이 조혈 계통 이외에 배아 줄기 세포의 분화 또는 증식을 증가시키거나 감소시킬 수 있다.

<1075> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물의 특징, 예를 들어 신장, 체중, 헤어 컬러, 눈 컬러, 피부, 지방 조직의 비율, 색소 침착, 크기 및 형상(예를 들어, 미용 수술)을 조절하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 이화작용, 동화작용, 프로세싱, 이용, 및 에너지의 저장에 영향을 미치는 포유동물의 대사를 조절하는데 사용될 수 있다.

<1076> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바이오

리듬, 하루주기 리듬, 우울증(우울 장애 포함), 폭력 경향, 통증에 대한 내성, 생식능(바람직하게는 액티빈 또는 인히빈-유사 활성화에 의한), 호르몬 또는 엔도크린 레벨, 식욕, 성욕, 기억, 스트레스 또는 다른 인지능에 영향을 미침에 의해 포유동물의 정신 상태 또는 물리적 상태를 변화시키는데 이용될 수 있다.

<1077> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 저장능, 지방 함량, 지질, 단백질, 탄수화물, 비타민, 미네랄, 보조인자 또는 다른 영양 성분을 증가시키거나 감소시키기 위한 것과 같은 식품 첨가제 또는 방부제로서 사용될 수 있다.

<1078> 상기 언급된 적용들은 광범한 종류의 숙주에서 사용된다. 상기 숙주로는 사람, 무린, 래빗, 염소, 기니아 피그, 낙타, 말, 마우스, 래트, 햄스터, 돼지, 마이크로-피그, 닭, 염소, 소, 양, 개, 고양이, 비사람 영장류 및 사람이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 숙주는 마우스, 래빗, 염소, 기니아 피그, 닭, 래트, 햄스터, 돼지, 양, 개 또는 고양이이다. 일부 구체예에서, 숙주는 포유동물이다. 다른 구체예에서, 숙주는 사람이다.

<1079> 본 발명을 일반적으로 기술하였으며, 이는 제한하려는 의도가 아니라 설명을 위해 제공된 하기 실시예를 참조로 하여 보다 용이하게 이해될 것이다.

<1080> 추가의 설명 없이도, 당업자는 진술한 상세한 설명 및 하기 예시적인 실시예를 이용하여 본 발명에서 유추되는 변경을 수행하여 이용하고 청구된 방법을 실시할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서, 하기 실시예는 본 발명의 구체예를 구체적으로 나타내는 것이며 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 고려되지 않는다.

실시예

<1081> 실시예 1: pScNHSA 및 pScCHSA의 생성

<1082> 벡터 pScNHSA (ATCC 등록 번호: PTA-3279) 및 pScCHSA (ATCC 등록 번호: PTA-3276)는 pPPC0005 (ATCC 등록 번호: PTA-3278)의 유도체이며, 사람 혈청 알부민 "HSA"를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 번역 프레임에 근접하게 및 그 번역 프레임에 치료적 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편 또는 변이체가 삽입되는 클로닝 벡터로서 이용된다. pScCHSA는 치료적 단백질-HSA 융합체를 생성하는데 이용될 수 있는 반면, pScNHSA는 HSA-치료적 단백질 융합체를 생성하는데 이용될 수 있다.

<1083> pScCHSA의 생성: 치료적 부분에 대한 알부민 잔기 C-말단과의 알부민 융합체

<1084> 성숙 알부민 단백질을 엔코딩하는 DNA에 대한 치료적 단백질 N-말단을 엔코딩하는 클로닝 DNA를 촉진하는 벡터를 pPPC0005에서 키메라 HSA 시그널 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 변경시켜 *Xho* I 및 *Cla* I 제한 부위를 포함시킴에 의해 제조하였다.

<1085> 먼저, pPPC0005 (*ADH1* 말단 서열의 3'쪽에 위치)에 고유한 *Xho* I 및 *Cla* I 부위는 pPPC0005를 *Xho* I 및 *Cla* I 로 절단하고, T4 DNA 중합효소를 지니는 점착성 말단으로 메우고 블런트 말단을 재결합시켜 pPPC0006을 생성함에 의해 제거되었다.

<1086> 둘째로, *Xho* I 및 *Cla* I 제한 부위는 2 라운드의 PCR을 이용하여 pPPC0006 중 HSA의 시그널 펩티드(HSA 리더 및 메이팅 인자 알파 "MAF"로부터의 *kex2* 부위의 키메라)를 엔코딩하는 핵산 서열로 공학처리되었다. PCR의 첫 번째 라운드에서, SEQ ID NO: 36 및 SEQ ID NO: 37로 표시된 프라이머를 이용하여 증폭을 수행하였다. 서열이 SEQ ID NO: 36인 프라이머는 HSA의 시그널 펩티드 서열의 일부, 메이팅 인자 알파 리더 서열로부터의 *kex2* 부위 및 HSA의 성숙 형태의 아미노-말단의 일부를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 네 개의 점 돌연변이가 서열에 도입되어 키메라 시그널 펩티드 및 HSA의 성숙 형태의 접합점에서 발견되는 *Xho* I 및 *Cla* I 부위를 생성한다. 상기 네 개의 돌연변이는 하기 도시된 서열에 밑줄로 표시된다. pPPC0005에서, 상기 네 위치의 뉴클레오티드는 5' 내지 3'으로 T, G, T 및 G이다.

<1087> 5'-GCCTCGAGAAAAAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGATTAAAGATTGGG-3' (SEQ ID NO:36) 및 5'-AATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCTTTTCTCGAGGCTCTGGAATAAGC-3' (SEQ ID NO:37). 이후 두번째 라운드의 PCR을 업스트림 플랭킹 프라이머 5'-TACAACTTAAGAGTCCAATTAGC-3' (SEQ ID NO:38) 및 다운스트림 플랭킹 프라이머 5'-CACTTCTCTAGAGTGGTTTCATATGTCTT-3' (SEQ ID NO:39)를 이용하여 수행하였다. 그 다음, 생성된 PCR 생성물을 정제하고 *Aft* II and *Xba* I로 절단하고 pPPC0006의 동일 부위에 결합시켜 pScCHSA를 생성하였다. 생성된 플라스미드는 시그널 서열로 공학처리된 *Xho* I and *Cla* I 부위를 지닌다. *Xho* I 부위의 존재는 LEKR에서 LEKR로 시그널 서열의 말단에 단일 아미노산의 변화를 생성한다. D에서 E로의 변화는, 5' *Sal* I 부위 (이는

Xho I 부위에 적합함) 및 3' *Cla* I 부위를 지나는 알부민 융합 단백질의 치료적 부분을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열이 pScCHSA의 *Xho* I 및 *Cla* I 부위에 결합되는 경우 최종 알부민 융합 단백질 발현 플라스미드에 존재하지 않을 것이다. *Xho* I에 대한 *Sal* I의 결합은 시그널 펩티드 서열의 최초 아미노산 서열을 복원한다. 알부민 융합 단백질의 치료적 부분을 엔코딩하는 DNA는 Kex2 부위(Kex2는 시그널 펩티드의 말단에서 이염기 아미노산 서열 KR 이후를 절단한다) 뒤 및 *Cla* I 부위 앞에 삽입될 수 있다.

<1088> pScNHSA의 생성: 치료적 부분에 대한 알부민 잔기 N-말단과의 알부민 융합체

<1089> 성숙 알부민 단백질을 엔코딩하는 DNA에 대한 치료적 단백질 부분 C-말단을 엔코딩하는 클로닝 DNA를 촉진하는 벡터를 3, 8-염기-쌍 제한 부위를 pScCHSA에 첨가함에 의해 제조하였다. *Asc* I, *Fse* I, 및 *Pme* I 제한 부위를 성숙 HSA 단백질을 엔코딩하는 핵산 서열의 말단에서 *Bsu36* I 및 *Hind* III 부위 사이에 첨가하였다. 이는 밑줄로 표시된 *Asc* I, *Fse* I, 및 *Pme* I 제한 부위를 함유하는 두 개의 상보적인 합성 프라이머를 사용하여 달성되었다 (SEQ ID NO:40 및 SEQ ID NO:41).

<1090> 5'-AAGCTGCCTTAGGCTTATAATAAGGCGCGCCGGCCGGCGGCGTTAACTAAGCTTAATTCT-3' (SEQ ID NO:40) 및 5'-AGAATTAAGCTTAGTTTAAACGGCCGGCCGGCGCGCCTTATTATAAGCCTAAGGCAGCTT-3' (SEQ ID NO:41). 상기 프라이머는 어닐링되고 *Bsu36* I 및 *Hind* III으로 절단되고 pScCHSA의 동일 부위에 결합되어 pScNHSA를 생성하였다.

<1091> 실시예 2: 효모 형질전환을 위한 일반적인 작제물 생성

<1092> 벡터 pScNHSA 및 pScCHSA를 치료적 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편 또는 변이체가 성숙 사람 혈청 알부민 "HSA"를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 인접하게 삽입된 클로닝 벡터로서 이용할 수 있다. pScCHSA는 치료적 단백질-HSA 융합체를 생성하기 위해 사용되는 반면, pScNHSA는 HSA-치료적 단백질을 융합체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

<1093> HSA-치료적 단백질 융합 생성물을 포함하는 알부민 융합 작제물의 생성

<1094> 치료적 부분을 엔코딩하는 DNA (예를 들어, SEQ ID NO:X에 도시되거나 당 분야에 공지된 서열)를 융합 작제물의 생성을 촉진시키는 (예를 들어, 제한 부위의 첨가, 무봉합 융합체의 엔코딩, 링커 서열의 엔코딩 등에 의해) 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시킬 수 있다. 예를 들어, 당업자는 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA의 5' 말단상에 HSA의 성숙 형태의 마지막 네 개의 아미노산을 엔코딩하는 (및 *Bsu36*I 부위를 함유하는) 폴리뉴클레오티드를 첨가시킨 5' 프라이머; 및 치료적 단백질 코딩 서열의 3' 말단상에 STOP 코돈 및 적합한 클로닝 부위를 첨가시킨 3' 프라이머를 고안할 수 있다. 예를 들어, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 증폭시키기 위해 사용된 정방향 프라이머는 서열 5'-aagctGCCTTAGGCTTA(N)₁₅-3' (SEQ ID NO:42)를 지니며, 여기에서 밑줄로 표시된 서열은 *Bsu36*I 부위이고, 상부 뉴클레오티드는 성숙 HSA 단백질의 마지막 네 개의 아미노산(ALGL)을 엔코딩하며, (N)₁₅는 관심있는 치료적 단백질을 엔코딩하는 처음 15개의 뉴클레오티드와 동일하다. 유사하게, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 증폭시키기 위해 사용된 역방향 프라이머는 서열 5'-GCGCGCGTTTAAACGGCCGGCCGGCGCGCCTTATTA(N)₁₅-3' (서열번호:43)을 지니고, 여기

에서 이탤릭체로 표시된 서열은 *Pme* I 부위이고, 이중 밑줄로 표시된 서열은 *Fse* I 부위이며, 단일 밑줄로 표시된 서열은 *Asc* I 부위이고, 박스로 표시된 뉴클레오티드는 두 개의 앞뒤 스톱 코돈의 역 상보체이며, (N)₁₅는 관심있는 치료적 단백질을 엔코딩하는 마지막 15개 뉴클레오티드의 역 상보체이다. 일단 PCR 생성물이 증폭되면, *Bsu36*I 및 (*Asc* I, *Fse* I, 또는 *Pme* I) 중 하나로 절단되고 pScNHSA로 결합된다.

<1095> HSA 키메라 리더 서열 중 *Xho* I 부위의 존재는 키메라 시그널 서열, 즉 HSA-kex2 시그널 서열의 말단에서 LDKR(SEQ ID NO:44)에서 LEKR(SEQ ID NO:45)로의 한 개의 아미노산 변경을 초래한다.

<1096> 유전자-NSA 융합 생성물을 포함하는 알부민 융합 작제물의 생성

<1097> 상기 기재된 방법과 유사하게, 하기 프라이머를 이용하여 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 PCR 증폭시킬 수 있다: 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA의 5' 말단상에 *Sal*I 부위를 함유하고 HSA 리더 서열의 마지막 세 개의 아미노산, DKR을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 첨가시킨 5' 프라이머; 및 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA의 3' 말단상에 *Cla* I 부위를 함유하는 성숙 HSA의 처음 몇개의 아미노산을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 첨가시킨 3' 프라이머. 예를 들어, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 증폭시키기 위해 사용된 정방향 프라이머는 서열 5'-aggagcgtcGACAAAAGA(N)₁₅-3' (SEQ ID NO:46)를 지니며, 여기에서 밑줄로 표시된 서열은 *Sal* I 부위이고,

상부 뉴클레오티드는 HSA 리더 서열의 마지막 세 개의 아미노산(DKR)을 엔코딩하며, (N)₁₅는 관심있는 치료적 단백질 엔코딩하는 처음 15개의 뉴클레오티드와 동일하다. 유사하게, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 증폭시키기 위해 사용된 역방향 프라이머는 서열 5'-CTTTAAATCGA TGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATC(N)₁₅-3'(SEQ ID NO:47)을 지니고, 여기에서 이탤릭체로 표시된 서열은 *Cla* I 부위이고, 밑줄로 표시된 뉴클레오티드는 HSA의 성숙 형태의 처음 9개 아미노산을 엔코딩하는 DNA의 역 상보체이며 (DAHKSEVAH, SEQ ID NO:48), (N)₁₅는 관심있는 치료적 단백질을 엔코딩하는 마지막 15개 뉴클레오티드의 역 상보체이다. 일단 PCR 생성물이 증폭되면, *Sa*I I 및 *Cla* I로 절단되고 *Xho* I 및 *Cla* I로 절단된 pScCHSA에 결합될 수 있다. 상이한 시그널 또는 리더 서열이 요구될 수 있고, 예를 들어 역전효소 "INV" (Swiss-Prot Accession P00724), 메이팅 인자 알파 "MAF" (Genbank Accession AAA18405), MPIF (Geneseq AAF82936), 피블린 B (Swiss-Prot Accession P23142), 클러스테린 (Swiss-Prot Accession P10909), 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 4 (Swiss-Prot Accession P22692), 및 HSA 리더 서열의 과돌연변이가 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 적합한 벡터로 서브클로닝될 수 있다.

효모(*S. cerevisiae*)에서 발현에 적합한 알부민 융합 단백질의 생성

pScNHS 또는 *pScCHSA*로부터 생성된 N-말단 또는 C-말단 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA를 함유하는 *Not* I 단편을 LEU2 선택 마커를 지니는 pSAC35의 *Not* I 부위로 클로닝할 수 있다. 이후 생성된 벡터를 효모(*S. cerevisiae*) 발현 시스템의 형질전환에 사용한다.

실시예 3: 효모(*S. cerevisiae*)에서 일반적인 발현

효모 발현에 적합한 발현 벡터를 리튬 아세테이트 형질전환, 일렉트로포레이션, 또는 당분야에 공지된 다른 방법 및/또는 문헌[Sambrook, Fritsch, and Maniatis. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition", volumes 1-3, and in Ausubel et al. 2000. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School "Current Protocols in Molecular Biology", volumes 1-4]의 일부에 기재된 대로 효모(*S. cerevisiae*)로 형질전환시킬 수 있다. 발현 벡터를 에스. 세레비지아(*S. cerevisiae*) 균주 DXY1, D88, 또는 BXP10에 형질전환에 의해 도입하고, 개별적인 형질전환체를 예를 들어 3일 동안 30°C로 10 mL YEPD (1% w/v 효모 추출물, 2% w/v, 펩톤, 2% w/v, 텍스트로스) 중에서 성장시킬 수 있으며, 세포를 60시간 성장시킨 후에 정지기에서 수집할 수 있다. 세포를 3000g에서 10분 동안 정화시켜 상청액을 수집하였다.

pSAC35 (Sleep et al., 1990, Biotechnology 8:42 및 참조 도 3)는 LEU2 선택 마커에 추가하여, 전체 효모 2 μ m 플라스미드를 포함하여 복제 기능, PRB1 프로모터 및 ADHI 말단 시그널을 제공한다.

실시예 4: 효모(*S. cerevisiae*)에서 알부민 융합체로부터 발현된 알부민 융합 단백질의 일반적인 정제

일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료적 단백질의 성숙 형태의 N- 또는 C-말단 또는 이의 일부 (예를 들어, 표 1에 나열된 치료적 단백질의 성숙 형태, 또는 표 2에 SEQ ID NO:Z로서 도시된 치료적 단백질의 성숙 형태)에 융합된 HSA의 성숙 형태를 포함한다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 발현을 위해 사용된 숙주의 분비 경로에서 초기 융합 폴리펩티드를 유도하는 시그널 서열을 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 시그널 서열에 의해 엔코딩되는 시그널 펩티드를 제거하고, 성숙 알부민 융합 단백질이 배양 배지에 직접 분비된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 MAF, INV, Ig, 피블린 B, 클러스테린, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 4, 키메라 HSA/MAF 리더 서열을 포함하나 이로 제한되지 않는 변이체 HSA 리더 서열, 또는 당 분야에 공지된 다른 이중 시그널 서열을 포함하나 이로 제한되지 않는 이중 시그널 서열(예를 들어, 특정 치료적 단백질의 비-천연 시그널 서열)을 포함할 수 있다. 예로는 표 2에 나열된 시그널 서열 및/또는 명세서의 상기 "융합 단백질의 발현" 및/또는 "알부민 융합 단백질의 재조합 및 합성 제조의 부가적인 방법"에 기술된 시그널 서열이 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함한다. 단편 및/또는 변이체를 포함하는 상기 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

상기 기술된 대로 효모에서 발현되는 알부민 융합 단백질을 하기와 같은 다이엑스(Dyax) 펩티드 친화력 컬럼상에서 소규모로 정제할 수 있다. 알부민 융합 단백질을 발현시키는 효모로부터의 상청액을 3 mM 인산염 완충액 pH 6.2, 20 mM NaCl 및 0.01% Tween 20에 대하여 정용여과시켜 부피를 감소시키고 안료를 제거한다. 이후 용액을 0.22 μ m 장치를 통해 여과한다. 여액을 다이엑스 펩티드 친화력 컬럼상에 적하시켰다. 컬럼을 100 mM Tris/HCl, pH 8.2 완충액으로 용리시켰다. 단백질을 함유하는 피크 분획을 수집하고 5배로 농축시킨 후 SDS-PAGE 상에서 분석하였다.

대규모 정제를 위하여, 하기 방법을 이용할 수 있다. 2 L 과량의 상청액을 정용여과하고 20 mM Tris/HCl pH

8.0 중에서 500 mL로 농축하였다. 농축된 단백질 용액을 미리-평형을 이룬 50 mL DEAE-세파로스 패스트 플로우 컬럼상에 적하시키고, 컬럼을 세척하고, 단백질을 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 중 0 내지 0.4 M NaCl의 NaCl의 선형 구배로 용리시켰다. 단백질을 함유하는 상기 분획을 푸울링하고, 0.5 M 인산나트륨(NaH_2PO_4)을 이용하여 pH 6.8로 조정하였다. 최종 농도의 0.9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 단백질 용액에 첨가하고, 전체 용액을 미리-평형을 이룬 50 mL Butyl650S 컬럼상에 적하시켰다. 단백질을 황산암모늄 (0.9 내지 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)의 선형 구배로 용리시켰다. 알부민 용합체를 지니는 상기 분획을 다시 푸울링하고, 10 mM Na_2HPO_4 /시트르산 완충액 pH 5.75에 대해 정용여과시키고, 미리-평형을 이룬 SP-세파로스 패스트 플로우 컬럼상에 적하시켰다. 단백질을 0 내지 0.5 M의 NaCl 선형 구배로 용리시켰다. 관심있는 단백질을 함유하는 분획을 합치고, 완충액을 아미콘(Amicon) 컨센트레이터를 이용하여 10 mM Na_2HPO_4 /시트르산 pH 6.25로 변경시켰으며, 전도도는 < 2.5 mS/cm이었다. 상기 단백질 용액을 15 mL의 미리-평형을 이룬 Q-세파로스 고성능 컬럼상에 적하시키고, 컬럼을 세척하고, 단백질을 0 내지 0.15 M NaCl의 NaCl 선형 구배로 용리시켰다. 정제된 단백질은 이후 완충액 교환에 의해 특정 완충 조성물에 제형화될 수 있다.

실시예 5: 포유동물 세포 형질전환을 위한 일반적인 작제물 생성

포유동물 세포주에서 발현에 적합한 알부민 용합 작제물의 생성

포유동물 세포 배양 시스템에 사용되는 발현 벡터에서 알부민 용합 작제물이 생성될 수 있다. 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA는 당 분야에 공지된 표준 방법(예를 들어, PCR 증폭, 제한 절단 및 결찰)에 의해 포유동물 발현 벡터에서 N-말단 또는 C-말단에서 HSA로 클로닝될 수 있다. 일단 발현 벡터가 구성되면, 포유동물 발현 시스템으로의 트랜스펙션이 진행될 수 있다. 적합한 벡터는 당 분야에 공지되어 있고, pC4 벡터, 및/또는 론자 바이올로지스, 인크.(Lonza Biologics, Inc., Portsmouth, NH)로부터 시판되는 벡터가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

사람 혈청 알부민을 엔코딩하는 DNA는 포유동물 배양 시스템에 적합한 pC4 벡터로 클로닝되어 플라스미드 pC4:HSA (ATCC 등록 # PTA-3277)를 생성한다. 상기 벡터는 메토틱세이트의 존재하에 선별이 가능한 유전자인 디하이드로폴레이트 환원효소, "DHFR"를 지닌다.

pC4:HSA 벡터는 CHO 세포에서 알부민 용합 단백질의 발현에 적합하다. 발현을 위해서, 다른 포유동물 발현 배양 시스템에서는, 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 DNA를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 단편을 대안적인 발현 벡터로 서브클로닝하는게 바람직할 수 있다. 예를 들어, 성숙 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 DNA를 포함하거나 대안적으로 이로 구성된 단편은 본원에 기재된 포유동물 발현 벡터 중 어느 하나를 포함하나 이로 제한되지 않는 또 다른 발현 벡터로 서브클로닝될 수 있다.

한 구체예에서, 알부민 용합 작제물을 엔코딩하는 DNA는 NSO 세포에서의 발현을 위해 당 분야에 공지된 절차에 따라 론자 바이올로지스, 인크.(Portsmouth, NH)에 의해 제공된 벡터로 서브클로닝된다.

HSA-치료적 단백질 용합 생성물을 포함하는 알부민 용합 작제물의 생성

pC4:HSA (ATCC 등록 # PTA-3277)를 이용하여, 치료적 단백질 부분이 성숙 알부민 서열에 대한 C 말단인 알부민 용합 작제물이 생성될 수 있다. 예를 들어, 벡터의 Bsu 36I 및 Asc I 제한 부위 사이에 치료적 단백질의 단편 또는 변이체를 엔코딩하는 DNA를 클로닝할 수 있다. Bsu 36I 및 Asc I로 클로닝되는 경우, 효모 벡터 시스템으로 클로닝될 때 사용된 동일한 프라이머 고안이 적용될 수 있다 (SEQ ID NO:42 및 43) (참조 실시예 2).

유전자-HSA 용합 생성물을 포함하는 알부민 용합 작제물의 생성

pC4:HSA (ATCC 수탁 # PTA-3277)을 이용하여, 치료적 단백질 부분이 N 말단에서 성숙 알부민 서열로 클로닝되는 알부민 용합 작제물이 생성될 수 있다. 예를 들어, pC4:HSA의 Bam HI (또는 Hind III) 및 Cla I 부위 사이에 고유의 시그널 서열을 지니는 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA를 클로닝할 수 있다. Bam HI 또는 Hind III 부위로 클로닝하는 경우, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA의 번역 개시 코돈 앞에 코작 서열(CGCCACCATG, SEQ ID NO:49)을 포함하는 것이 바람직하다. 치료적 단백질이 시그널 서열을 지니지 않는 경우, 치료적 단백질을 엔코딩하는 DNA는 pC4:HSA의 Xho I 및 Cla I 부위 사이에서 클로닝될 수 있다. Xho I 부위를 이용하는 경우, 하기 5'(SEQ ID NO:50) 및 3'(SEQ ID NO:51)의 예시적인 PCR 프라이머가 사용될 수 있다:

5'-CCGCCGCTCGAGGGGTGTGTTTCGTCGA(N)₁₈-3'(SEQ ID NO: 50)

<1118> 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATC(N)₁₈-3'(SEQ ID NO:51)

<1119> 5' 프라이머(SEQ ID NO:50)에서, 밑줄로 표시된 서열은 *Xho* I 부위이고; *Xho* I 부위 및 *Xho* I 부위 이후의 DNA는 천연 인간 혈청 알부민의 리더 서열의 마지막 7개 아미노산을 코딩한다. SEQ ID NO:50에서, "(N)₁₈"은 관심 있는 치료적 단백질을 엔코딩하는 초기 18개의 뉴클레오타이드와 동일하다. 3' 프라이머(SEQ ID NO:51)에서, 밑줄로 표시된 서열은 *Cla* I 부위이고; *Cla* I 부위 및 그 이후의 DNA는 성숙 HSA 단백질(SEQ ID NO:1)의 처음 10개의 아미노산을 엔코딩하는 DNA의 역 보체이다. SEQ ID NO:51에서, "(N)₁₈"은 관심있는 치료적 단백질을 엔코딩하는 마지막 18개의 뉴클레오타이드를 엔코딩하는 DNA의 역 보체이다. 상기 두 프라이머를 이용하여, 관심있는 치료적 단백질을 PCR 증폭시키고, PCR 생성물을 정제하고, 이것을 *Xho* I 및 *Cla* I 제한 효소로 절단하고, pC4:HSA 벡터 중 *Xho* I 및 *Cla* I 부위로 클로닝할 수 있다.

<1120> 대안적인 리더 서열이 요망되는 경우, 자생 알부민 리더 서열을 당 분야에 공지된 표준 방법에 의해 키메릭 알부민 리더, 즉 HSA-kex2 시그널 펩티드, 또는 대안적인 리더로 교체할 수 있다. (예를 들어, 당업자는 리딩 프레임 유지를 하면서 알부민 리더 대신 대안적인 리더를 통상적으로 PCR 증폭시키고 PCR 생성물을 알부민 융합 작제로서 서브클로닝할 수 있다).

<1121> 실시예 6: 포유동물 세포주에서의 일반적인 발현

<1122> 포유동물 세포주에서 발현에 적합한 발현 벡터에서 생성된 알부민 융합 작제는 인산칼슘 침전, 리포펙타민, 일렉트로포레이션, 또는 당 분야에 공지되고/거나 문헌[Sambrook, Fritsch, and Maniatis. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition" and in Ausubel et al. 2000. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School "Current Protocols in Molecular Biology", volumes 1-4]에 기술된 다른 트랜스펙션 방법에 의해 적합한 세포주로 트랜스펙션될 수 있다. 이후, 트랜스펙션된 세포를 존재 여부에 대해 또는 발현 벡터에서 선별적인 마커에 의해 결정된 선별제에 의해 선택한다.

<1123> pC4 발현 벡터(ATCC 수탁번호 209646)는 플라스미드 pSV2-DHFR(ATCC 수탁번호 37146)의 유도체이다. pC4는 로우스 육종 바이러스의 강한 프로모터 긴 말단 반복단위 "LTR"(Cullen et al., March 1985, Molecular and Cellular Biology, 438-447) 및 시토메갈로바이러스의 단편 "CMV"-인핸서(Boshart et al., 1985, Cell 41: 521-530)를 함유한다. 벡터는 또한 SV40 어얼리 프로모터의 조절하에 3' 인트론, 래트 프리프로인솔린 유전자의 폴리아데닐화 및 말단화 시그널, 및 마우스 DHFR 유전자를 함유한다. 차이나이스 햄스터 난소 "CHO" 세포 또는 활성 DHFR 유전자가 결여된 다른 세포주가 트랜스펙션에 이용된다. 공지된 방법에 의한 pC4 중 알부민 융합 작제의 CHO 세포로의 트랜스펙션은 CHO 세포에서 알부민 융합 단백질을 발현시킬 수 있을 것이고, 이후 리더 서열이 절단되고, 상청액으로 분리된다. 알부민 융합 단백질은 상청액으로부터 추가로 정제된다.

<1124> pEE12.1 발현 벡터는 론자 바이올로지스, 인크.(Portsmouth, NH)에 의해 제공되며 pEE6의 유도체이다(Stephens and Cockett, 1989, Nucl. Acids Res. 17: 7110). 이 벡터는 배지를 함유하는 선택적인 메티오닌 선택소이민에서 트랜스펙션된 세포를 선별할 목적으로 프로모터, 인핸서 및 인간 시토메갈로바이러스의 메이저 이미디어트 어얼리(Major Immediate Early) 유전자의 완전한 5'-비번역된 영역, "hCMV-MIE"(국제 공개 # WO89/01036), 관심있는 서열의 엽스트림, 및 글루타민 합성효소 유전자(Murphy et al., 1991, Biochem J. 227: 277-279; Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10:169-175; 미국 특허 제 5,122,464호)를 포함한다. 당 분야에 공지된 방법에 의한 pEE12.1 중 알부민 융합 단백질의 NSO 세포 (국제 공개 # WO86/05807)로의 트랜스펙션은 NSO 세포에서 알부민 융합 단백질을 발현시킬 수 있을 것이고, 이후 리더 서열이 절단되고 상청액으로 분리된다. 알부민 융합 단백질은 본원에 기술된 방법 또는 당 분야에 공지된 다른 방법에 의해 상청액으로부터 추가로 정제된다.

<1125> 알부민 융합 단백질의 발현은 예를 들어 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯, 역상 HPLC 분석, 또는 당 분야에 공지된 다른 방법에 의해 분석될 수 있다.

<1126> 알부민 융합 작제로서 트랜스펙션된 안정한 CHO 및 NSO 세포주가 당 분야에 공지된 방법(예컨대, 리포펙타민 트랜스펙션)에 의해 생성되고, 예를 들어 선택적인 마커로서 디하이드로폴레이트 리덕타아제 'DHFR' 유전자를 지니는 벡터에 대해 또는 글루타민의 부재하에 성장 동안 100 nM 메토타렉세이트를 이용하여 선택된다. 발현 수준은 예를 들어, 일차적으로 항-HSA 혈청을 일차 항체로서 이용하거나, 부차적으로 주어진 알부민 융합 단백질의 치료적 단백질 부분을 유도하는 항체를 함유하는 혈청을 일차 항체로서 이용하는 면역블롯팅에 의해 검사될 수 있다.

- <1127> 발현 수준은 항-HSA 혈청을 일차 항체로서 이용하는 면역블롯 검출에 의해 검사된다. 특정 생산율은 포획 항체가 알부민 융합체의 치료적 단백질 부분에 대한 모노클로날 항체일 수 있고 검출 항체가 모노클로날 항-HSA-비오티닐화된 항체(또는 반대로도 가능함)일 수 있는 ELISA에 이어, 제조자의 프로토콜에 따른 홍당무 과산화효소/스트렙타비딘 결합 및 분석을 통해 결정된다.
- <1128> 실시예 7: 포유동물 세포에서 알부민 융합 단백질의 발현
- <1129> 본 발명의 알부민 융합 단백질은 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 통상적인 포유동물 발현 벡터는 프로모터 엘리먼트를 함유하고, 이는 mRNA의 전사 개시, 단백질 코딩 서열, 및 전사의 종결 및 전사체의 폴리아데닐화에 요구되는 시그널을 조절한다. 추가적인 엘리먼트로는 인헨서, 코작 서열 및 RNA 스플라이싱에 대한 공여체 및 수용체에 의해 플랭크되는 개재 서열이 있다. 고도로 효과적인 전사가 SV40으로부터의 어얼리 및 레이트 프로모터, 로타바이러스, 예컨대 RSV, HTLV1, HIV1로부터의 긴 말단 반복단위(LTR) 및 시토크로마바이러스(CMV)의 어얼리 프로모터를 이용하여 달성된다. 그러나, 세포 엘리먼트가 또한 사용될 수 있다 (예컨대, 인간 액틴 프로모터).
- <1130> 본 발명을 실시하는데 사용되는 적합한 발현 벡터로는 예를 들어 벡터, 예컨대 pSVL 및 pMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146), pBC12M1(ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0, 및 pCMVSPORT 3.0이 있다. 사용될 수 있는 포유동물 숙주 세포로는 인간 Hela, 293, H9 및 Jurkat 세포, 마우스 NIH3T3 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV 1, quail QC1-3 세포, 마우스 L 세포 및 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포가 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- <1131> 택일적으로, 알부민 융합 단백질을 염색체에 통합된 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 안정한 세포주에서 발현될 수 있다. DHFR, gpt, 네오마이신 또는 하이그로마이신과 같은 선택적인 마커를 이용한 코-트랜스펙션으로 트랜스펙션된 세포를 동정하고 분리할 수 있다.
- <1132> 융합 단백질을 엔코딩하는 트랜스펙션된 폴리뉴클레오티드는 또한 많은 양의 엔코딩된 융합 단백질을 발현하도록 증폭될 수 있다. DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타아제) 마커는 관심있는 유전자의 수백 또는 심지어 수천 복사체를 지니는 세포주를 개발하는데 유용하다(참조, Alt et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); Hamlin et al., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990); Page et al., Biotechnology 9:64-68 (1991)). 또 다른 유용한 선별 마커는 효소 글루타민 합성효소(SC)이다(Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)). 상기 마커를 이용하여, 포유동물 세포는 선택적인 배지에서 성장하며 가장 높은 내성을 지닌 세포가 선택된다. 상기 세포주는 염색체에 통합된 증폭된 유전자(들)를 함유한다. 차이니스 햄스터 난소(CHO) 및 NSO 세포는 종종 단백질을 생성하기 위해 사용된다.
- <1133> 플라스미드 pSV2-dhfr(ATCC 수탁번호 37146), 발현 벡터 pC4(ATCC 수탁번호 209646) 및 pC6(ATCC 수탁번호 209647)의 유도체는 로우스 육종 바이러스의 강한 프로모터(LTR)(Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (March, 1985)) 및 CMV-인헨서(Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985))의 단편을 함유한다. 예컨대 제한 효소 절단 부위 BamHI, XbaI 및 Asp718을 지니는 다수의 클로닝 부위는 관심있는 유전자의 클로닝을 촉진시킨다. 벡터는 또한 SV49 초기 프로모터의 조절하에 3' 인트론, 래트 프리프로인솔린 유전자의 폴리아데닐화 및 종결 시그널, 및 마우스 DHFR 유전자를 함유한다.
- <1134> 구체적으로, 플라스미드 pC6는 예를 들어 적합한 제한 효소로 절단된 다음 당 분야에 공지된 공정에 의해 송아지 장 인산염을 이용하여 탈인산화되었다. 이후 벡터는 1% 아가로스 겔로부터 분리되었다.
- <1135> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 생성되고 상기 폴리뉴클레오티드는 당 분야에 공지된 PCR 기술을 이용하여 증폭된다. 천연 발생 시그널 서열이 본 발명의 융합 단백질을 제조하기 위해 사용되는 경우, 벡터는 제2의 시그널 펩티드를 필요로 하지 않는다. 대안적으로, 천연 발생 시그널 서열이 사용되지 않는 경우, 벡터는 이중 시그널 서열을 포함하도록 개질될 수 있다(참조, 예컨대, 국제 공개 WO 96/34891).
- <1136> 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하는 증폭된 단편이 시판되는 키트("Geneclean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.)를 이용하여 1% 아가로스 겔로부터 분리된다. 이후 단편을 적합한 제한 효소로 절단하고 다시 1% 아가로스 겔 상에서 정제한다.
- <1137> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 증폭된 단편을 동일한 제한 효소로 절단하고 1% 아가로스 겔 상에서 정제하였다. 분리된 단편 및 탈인산화된 벡터를 T4 DNA 리가아제로 절단하였다. 대장균(*E. coli*) HB 101

또는 XL-1 Blue 세포를 형질전환시키고 예를 들어 제한 효소 분석을 이용하여 플라스미드 pC6에 삽입된 단편을 함유하는 세균을 동정하였다.

<1138> 활성 DHFR 유전자가 결여된 차이나이스 햄스터 난소 세포를 트랜스펙션에 이용하였다. 5 μ g의 발현 플라스미드 pC6 또는 pC4를 리포펙틴을 이용하여 0.5 μ g의 플라스미드 pSVneo로 코트랜스펙션시켰다(Feigner et al., supra). 플라스미드 pSV2-neo는 G418을 포함하는 항생제 그룹에 대해 내성을 부여하는 효소를 엔코딩하는 Tn5로부터의 neo 유전자를 현저하게 선택적인 마커로서 함유한다. 세포를 1 mg/ml의 G418이 보충된 알파 마이너스 MEM에 시딩하였다. 2일 후, 세포를 트립신화하고, 10, 25, 또는 50 ng/ml의 메토틱세이트 및 1 mg/ml의 G418이 보충된 알파 마이너스 MEM에서 하이브리도마 클로닝 플레이트(Greiner, Germany)에 시딩하였다. 약 10 내지 14일 후, 단일 클론을 트립신화한 다음 6-웰 페트리 디쉬 또는 10ml 플라스크에 상이한 농도의 메토틱세이트(50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM)를 이용하여 시딩하였다. 가장 높은 농도의 메토틱세이트에서 성장한 클론을 보다 높은 농도의 메토틱세이트(1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 mM, 20 mM)를 함유하는 신규한 6-웰 플레이트로 옮겼다. 동일한 절차를 100 내지 200 μ M의 농도에서 성장한 클론이 수득될 때까지 반복하였다. 요망되는 융합 단백질의 발현을 예를 들어 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 또는 역상 HPLC 분석에 의해 분석하였다.

<1139> 실시예 8: 포유동물 세포주에서 알부민 융합 작제물로부터 발현되는 알부민 융합 단백질의 일반적인 정제

<1140> 일부 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 치료적 단백질 또는 부분의 성숙 형태의 N- 또는 C-말단에 융합된 HSA의 성숙 형태를 포함한다(예컨대, 표 1에 기술된 치료적 단백질의 성숙 형태, 또는 SEQ ID NO:Z로서 표 2에 도시된 치료적 단백질의 성숙 형태). 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 발현에 이용된 숙주의 분비 경로에서 미성숙 융합 폴리펩티드를 유도하는 시그널 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 시그널 서열에 의해 엔코딩되는 시그널 펩티드를 제거하고, 성숙 알부민 융합 단백질을 배양 배지에 직접 분비시킨다. 본 발명의 알부민 융합 단백질은 MAF, INV, Ig, 피블린 B, 클러스테린, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 4, 키메릭 HSA/MAF 리더 서열을 포함하나 이로 제한되지 않는 변이체 HSA 리더 서열, 또는 당 분야에 공지된 다른 이중 시그널 서열을 포함하나 이로 제한되지 않는 이중 시그널 서열(예컨대, 특정 치료적 단백질의 비자생 시그널 서열)을 포함하는 것이 바람직하다. 예시적인 시그널 서열은 표 2에 나열된 시그널 서열 및/또는 명세서의 상기 "융합 단백질의 발현" 및/또는 "알부민 융합 단백질의 재조합 및 합성 제조의 부가적인 방법"에 기술된 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함한다. 단편 및/또는 변이체를 포함하는 상기 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<1141> 포유동물 세포주 상청액으로부터의 알부민 융합 단백질을 사용된 발현 시스템에 따라 상이한 프로토콜에 따라 정제한다.

<1142> CHO 및 293T 세포주로부터의 정제

<1143> CHO 세포 상청액 또는 일시적으로 트랜스펙션된 293T 세포 상청액으로부터의 알부민 융합 단백질의 정제는, 인산나트륨 완충액 및 인산염 구배 용리액을 이용한 음이온성 HQ 수지로의 초기 포획에 이어, 염 구배 용리액을 이용한 블루 세포로스 FF 컬럼 상에서의 친화력 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 블루 세포로스 FF는 주된 BSA/페투인 오염물을 제거한다. 포로스 PI 50 수지상에서 인산염 구배를 이용한 추가의 정제로 내독소 오염물을 제거 및 저하시킬 뿐만 아니라 알부민 융합 단백질을 농축시킬 수 있다.

<1144> NSO 세포주로부터의 정제

<1145> NSO 세포 상청액으로부터 알부민 융합 단백질의 정제는 Q-세포로스 음이온 교환 크로마토그래피에 이어, 단계 용리액을 이용한 SP-세포로스 정제 및 단계 용리액을 이용한 페닐-650M 정제, 및 마지막으로 여과작용(diafiltration)을 포함할 수 있다.

<1146> 정제된 단백질은 이후 완충액 교환에 의해 제형화될 수 있다.

<1147> 실시예 9: 알부민 융합 단백질의 세균 발현

<1148> 세균 시그널 서열을 포함하는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 DNA 서열의 5' 및 3' 말단에 상응하는 PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 증폭시켜 삽입 단편을 합성하였다. 삽입물을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는데 사용된 프라이머는 프라이머의 5' 말단에 BamHI 및 XbaI와 같은 제한 부위를 바람직하게 함유하여 증폭된 생성물을 발현 벡터로 클로닝한다. 예를 들어 BamHI 및 XbaI는 세균 발현 벡터 pQE-9(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)상의 제한 효소 부위에 상응한다. 상기 플라스미드 벡터

는 항생제 내성(Amp^r), 복제의 세균 기원(ori), IPTG-조절가능한 프로모터/오퍼레이터(P/O), 리보솜 결합 부위(RBS), 6-히스티딘 태그(6-His), 및 제한 효소 클로닝 부위를 엔코딩한다.

<1149> pQE-9 벡터를 BamHI 및 XbaI로 절단하고, 증폭된 단편을 세균 RBS에서 개시된 리딩 프레임에 보유하는 pQE-9 벡터에 절찰시킨다. 절찰 혼합물을 이후 플라스미드 pREP4의 다중 복사체를 함유하고, lacI 리프레서를 발현시키며 또는 카나마이신 내성(Kan^r)을 부여하는 대장균(*E. coli*) 균주 M15/rep4(Qiagen, Inc.)를 형질전환시키는데 이용한다. 형질전환체는 LB 플레이트상에서 성장하는 능력에 의해 동정되며 암피실린/카나마이신 내성 콜로니가 선택된다. 플라스미드 DNA를 분리하고 제한 분석에 의해 확인한다.

<1150> 요망되는 구성물을 함유하는 클론을 Amp(100 ug/ml) 및 Kan(25 ug/ml) 둘 모두가 보충된 LB 배지에서 액체 배양물로 밤새(O/N) 성장시켰다. 1:100 내지 1:250의 대량 배양물을 접종하는데 O/N 배지를 이용하였다. 세포는 0.1 내지 0.6의 광학 밀도 600(O.D.⁶⁰⁰)로 성장시켰다. IPTG(이소프로필-B-D-티오갈락토 피라노시드)를 1 mM의 최종 농도로 첨가하였다. lacI 리프레서를 불활성화시키고 P/O를 정화시켜 증가된 유전자 발현을 유도함에 의해 IPTG를 유도하였다.

<1151> 세포를 추가로 3 내지 4시간 동안 성장시켰다. 이후 원심분리(6000Xg에서 20분)에 의해 세포를 수집하였다. 세포 펠릿을 카오트로픽제 6 몰의 구아니딘 HCl 또는 바람직하게는 8 M 우레아에 0.14 M 2-메르캅토에탄올 보다 높은 농도로 3 내지 4시간 동안 4°C에서 교반시킴에 의해 용해시켰다(참조, 예컨대 Burton et al., Eur. J. Biochem. 179:379-387 (1989)). 세포 조직파편을 원심분리에 의해 제거하고, 폴리펩티드를 함유하는 상청액을 니켈-니트릴로-트리-아세트산("Ni-NTA") 친화력 수지 컬럼(QIAGEN, Inc.에서 시판됨, *supra*)상에 부하시켰다. 높은 친화력으로 Ni-NTA에 결합된 6 x His 태그를 지니는 단백질을 단순 윈스텝 공정으로 정제할 수 있다(상세한 것은 하기 참조: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., *supra*).

<1152> 간단하게, 상청액을 6 M 구아니딘-HCl, pH 8의 컬럼상에 부하시킨다. 컬럼을 먼저 10 부피의 6 M 구아니딘-HCl, pH 8로 세척한 다음 10 부피의 6 M 구아니딘-HCl, pH 6으로 세척하고, 마지막으로 폴리펩티드를 6 M 구아니딘-HCl, pH 5를 이용하여 용리시킨다.

<1153> 정제된 단백질을 인산염-완충 염수(PBS) 또는 50 mM Na-아세테이트, pH 6 완충액 및 200 mM NaCl에 대해 투석시킴에 의해 원형재생시켰다. 태일적으로, 단백질을 Ni-NTA 컬럼상에 고정시켜서 성공적으로 재폴딩할 수 있다. 예시적인 조건은 하기와 같다: 프로테아제 억제제를 함유하는 500 mM NaCl, 20% 글리세롤, 20 mM Tris/HCl pH 7.4에서 선형 6M-1M 우레아 구배를 이용한 원형재생. 원형재생은 1.5시간 이상 동안 수행되어야 한다. 원형재생 이후, 단백질을 250 mM의 이미다졸을 첨가시켜 용리시켰다. PBS 또는 50 mM 나트륨 아세테이트 pH 6 완충액 및 200 mM NaCl에 대한 최종 투석 단계에 의해 이미다졸을 제거하였다. 정제된 단백질을 4°C로 저장하거나 -80 °C에서 냉동시켰다.

<1154> 상기 발현 벡터에 추가하여, 본 발명은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된 프로모터 엘리먼트 및 파지 오퍼레이터를 함유하는 소위 pHE4a(ATCC 수탁번호 209645, 1998년 2월 25일 수탁됨)를 발현 벡터로서 추가로 포함한다. 상기 벡터는 1) 선택적인 마커로서 네오마이신소스포트랜스퍼라제, 2) 복제의 대장균(*E. coli*) 기원, 3) T5 파지 프로모터 서열, 4) 두 lac 오퍼레이터 서열, 5) 샤인-델가노 서열, 및 6) 락토스 오페론 리프레서 유전자(lacIq)를 함유한다. 복제의 기원 (oriC)은 pUC19(LTI, Gaithersburg, MD)로부터 유래된다. 프로모터 및 오퍼레이터 서열은 합성에 의해 제조되었다.

<1155> DNA는 NdeI 및 XbaI, BamHI, XhoI, 또는 Asp718를 이용하여 벡터를 제한하고, 겔 상에서 제한된 생성물을 러닝시키고, 보다 큰 단편(스터퍼 단편은 약 310개의 염기쌍이어야 한다)을 분리함에 의해 pHE4a에 삽입될 수 있다. DNA 삽입물은 NdeI(5' 프라이머) 및 XbaI, BamHI, XhoI, 또는 Asp718(3' 프라이머)에 대한 제한 부위를 지니는 PCR 프라이머를 이용하여, 본원에 기술된 PCR 프로토콜 또는 당 분야에 공지된 다른 방법에 따라 생성된다. PCR 삽입물을 겔 정제하고 적합한 효소로 제한한다. 삽입물 및 벡터를 표준 프로토콜에 따라 절찰시킨다.

<1156> 공학처리된 벡터는 세균 시스템에서 단백질을 발현하기 위한 상기 프로토콜에 쓰일 수 있다.

<1157> 실시예 10: 수탁된 샘플로부터 선택된 cDNA 클론의 분리

<1158> 본 발명의 다수의 알부민 융합 작제물이 표 3에 도시된 대로 ATCC에 수탁되어 있다. 알부민 융합 작제물은 하기 발현 벡터 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 효모(*S. cerevisiae*) 발현 벡터 pSAC35, 포유동물 발현 벡터 pC4, 또는 포유동물 발현 벡터 pEEI2.1.

- <1159> pSAC35(Sleep *et al.*, 1990, Biotechnology 8:42), pC4(ATCC 수탁번호 209646; Cullen *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 438-447 (1985); Boshart *et al.*, Cell 41: 521-530 (1985)), 및 pEE12.1(Lonza Biologics, Inc.; Stephens and Cockett, Nucl. Acids Res. 17: 7110 (1989); 국제 공개 #W089/01036; Murphy *et al.*, Biochem J. 227: 277-279 (1991); Bebbington *et al.*, Bio/Technology 10:169-175 (1992); 미국 특허 제 5,122,464호; International Publication #W086/05807) 벡터는 세균 세포의 성장을 위한 암피실린 내성 유전자를 포함한다. 상기 벡터 및/또는 이들을 포함하는 알부민 융합 작제물은 스트라타젠 XL-1 블루(Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037)와 같은 대장균(*E. coli*) 균주로 형질전환될 수 있는데, 이 때 100 μ g/mL의 암피실린을 함유하는 루리아-브로쓰 아가 플레이트 상에 도포하고 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 성장시키는 하나한(Hanahan)과 같은 당 분야에 공지되어 있는 기술을 이용한다.
- <1160> 임의의 주어진 알부민 융합 작제물에 대해 표 3에 인용된 ATCC 수탁번호가 부여된 샘플의 수탁된 재료는 각각 상이한 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 하나 이상의 추가의 알부민 융합 작제물을 또한 함유할 수 있다. 따라서, 동일한 ATCC 수탁번호를 공유하는 수탁물은 적어도 표 3의 상응하는 열로 확인되는 알부민 융합 작제물을 함유한다.
- <1161> 표 3의 알부민 융합 작제물에 대해 인용된 플라스미드 DNA의 수탁된 샘플로부터 특정 알부민 융합 작제물을 분리하기 위해 두 가지 접근방법이 이용될 수 있다.
- <1162> 방법 1: 스크리닝
- <1163> 먼저, 알부민 융합 작제물을, 수탁된 플라스미드 DNA의 샘플을 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 스크리닝함에 의해 직접 분리할 수 있는데, 표 1의 개별적인 구성물 ID 번호에 대한 SEQ ID NO:X에 상응하는 폴리뉴클레오티드 프로브를 이용한다. 예를 들어, 30 내지 40개의 뉴클레오티드로 된 특정 폴리뉴클레오티드가 보고된 서열에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 DNA 합성기를 이용하여 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제를 이용하여 ^{32} P-y-ATP로 표지되고 통상적인 방법에 따라 정제될 수 있다(예컨대, Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). 주어진 ATCC 수탁물로부터의 알부민 융합 작제물이 벡터 공급업체에 의해 제공되는 것들 또는 상기 인용된 공개문헌 또는 특허와 관련하여 제공된 것들과 같은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 상기 언급된 적합한 숙주(예컨대 XL-1 블루(Stratagene))로 형질전환된다. 형질전환체를 플레이트 당 약 150 형질전환체(콜로니)의 밀도로 1.5% 아가 플레이트(적합한 선별제, 예컨대 암피실린 함유)상에 플레이트팅한다. 상기 플레이트를 세균 콜로니 스크리닝을 위해 통상적인 방법(예컨대, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edit., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pages 1.93 to 1.104), 또는 당업자에게 공지된 다른 기술에 따라 나일론 막을 이용하여 스크리닝한다.
- <1164> 방법 2: PCR
- <1165> 대안적으로, 주어진 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA를, 예를 들어 주어진 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA에 수탁된 알부민 융합 작제물 5' 및 3'을 하이브리드화하는 17 내지 20개의 뉴클레오티드로 구성된 두 개의 프라이머를 이용하여, SEQ ID NOSEQ ID NO된 알부민 융합 작제물의 샘플로부터 증폭시킬 수 있다. 폴리머라제 연쇄 반응을 통상적인 조건하에 수행하며, 예를 들어 상기 조건은 0.5 μ g의 상기 cDNA 주형을 지니는 25 μ l의 반응 혼합물이다. 편리한 반응 혼합물은 1.5-5 mM MgCl₂, 0.01%(w/v) 젤라틴, 각 20 μ M의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol의 각 프라이머 및 0.25 유닛의 Taq 폴리머라제이다. 퍼킨-엘머 세투스 자동화 열 사이클러(Perkin-Elmer Cetus automated thermal cycler)로 35주기의 PCR(94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 변성; 55 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 어닐링; 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 신장)을 수행하였다. 증폭된 생성물을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하고, 예측되는 분자량의 DNA 밴드를 절제하고 정제하였다. DNA 생성물의 서브클로닝 및 시퀀싱에 의해 PCR 생성물이 선택된 서열임을 입증하였다.
- <1166> 수탁된 클론에 존재하지 않을 유전자의 5' 또는 3' 비코딩 부분을 동정하기 위해 여러 가지 방법이 이용될 수 있다. 상기 방법은 필터 프로빙, 특정 프로브를 이용한 클론 부화, 및 당 분야에 공지된 5' 및 3' "RACE" 프로토콜과 유사하거나 동일한 프로토콜을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 5' RACE와 유사한 방법은 요망되는 전장 전사체에 없는 5' 말단을 생성하는데 이용될 수 있다 (Fromont-Racine *et al.*, Nucleic Acids Res., 21(7):1683-1684 (1993)).
- <1167> 간단하게, 특정 RNA 올리고뉴클레오티드는 전장 유전자 RNA 전사체를 함유할 수 있는 RNA의 개체의 5' 말단에 결합된다. 결합된 RNA 올리고뉴클레오티드에 특이적인 프라이머 및 관심있는 유전자의 공지된 서열에 특이적인

프라이머를 함유하는 프라이머 셋은 요망되는 전장 유전자의 5' 부분을 PCR 증폭하는데 사용된다. 상기 증폭된 생성물은 이후 시퀀싱되고 전장 유전자를 생성하는데 사용될 수 있다.

<1168> 폴리-A + RNA가 사용될 수 있으나, 상기 방법은 요망되는 출처로부터 분리된 총 RNA로 시작된다. 이후 퇴화되거나 손상된 RNA상에서 이후의 RNA 리가아제 단계를 방해할 수 있는 5' 인산염 그룹을 제거할 필요가 있는 경우 RNA 침전물을 포스파타제로 처리할 수 있다. 이후 포스파타제는 불활성화되고 RNA는 메신저 RNA의 5' 말단에 존재하는 캡 구조를 제거하기 위해 담배산 피로포스파타제로 처리된다. 상기 반응은 캡 절단된 RNA의 5' 말단에 5' 인산염 그룹을 남기며, 이것은 이후 T4 RNA 리가아제를 이용하여 RNA 올리고뉴클레오티드에 결합될 수 있다.

<1169> 이렇게 개질된 RNA 침전물은 유전자 특이적 올리고뉴클레오티드를 이용하는 제1 가닥 cDNA 합성을 위한 주형으로서 이용된다. 제1가닥 합성 반응물은 결합된 RNA 올리고뉴클레오티드에 특이적인 프라이머 및 관심있는 유전자의 공지된 서열에 특이적인 프라이머를 이용하는 요망되는 5' 말단의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 이용된다. 수득된 생성물을 시퀀싱하고 분석하여 5' 말단 서열이 요망되는 유전자를 소유함을 확인하였다.

<1170> 실시예 11: 다중융합 융합체

<1171> 알부민(또는 이의 단편 또는 변이체)에 융합된 알부민 융합 단백질(예컨대 치료적 단백질(또는 이의 단편 또는 변이체)을 함유)은 추가로 다른 단백질에 융합되어 "다중융합 단백질"을 생성할 수 있다. 다중융합 단백질은 다양한 적용을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, His-tag, HA-tag, 단백질 A, IgG 도메인 및 말토스 결합 단백질에 대한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 융합은 정제를 촉진시킨다(참조, 예컨대 EP A 394,827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). 본 발명의 폴리펩티드에 융합된 핵 국소화 시그널은 특정 아세포 국소화에 단백질을 표적화할 수 있는 반면, 공유 헤테로이합체 또는 호모이합체는 알부민 융합 단백질의 활성을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 더욱이, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 부가적인 단백질 서열을 융합시켜 융합 단백질의 가용성 및/또는 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다. 상기 기술된 융합 단백질은 당 분야에 공지된 기술을 이용하거나 통상적으로 개질시키고/거나 폴리펩티드의 융합체를 IgG 분자로 표시한 하기 프로토콜을 개질시켜 제조될 수 있다.

<1172> 간단하게, IgG 분자의 인간 Fc 부분을 하기 기술된 서열의 5' 및 3' 말단을 확대시킨 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시킬 수 있다. 상기 프라이머는 발현 벡터, 바람직하게는 포유동물 또는 효모 발현 벡터로의 클로닝을 촉진하는 편리한 제한 효소 부위를 지닐 것이다.

<1173> 예를 들어, pC4(ATCC 수탁번호 209646)를 이용하는 경우, 인간 Fc 부분은 BamHI 클로닝 부위에 결합될 수 있다. 3' BamHI 부위가 파괴됨을 주목한다. 다음으로, 인간 Fc 부분을 함유하는 벡터를 BamHI로 다시 제한하고, 벡터를 선형화시키고, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 (당 분야에 공지된 기술을 이용하여 생성 및 분리됨)를 상기 BamHI 부위에 결합시킨다. 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 스톱 코돈 없이 클로닝되며, 융합 단백질을 함유하는 Fc가 생성되지 않음을 주목한다.

<1174> 천연 발생 시그널 서열이 본 발명의 알부민 융합 단백질을 제조하는데 사용되는 경우, pC4는 제2의 시그널 펩티드를 필요로 하지 않는다. 대안적으로 천연 발생 시그널 서열이 사용되지 않으면 벡터는 이중 시그널 서열을 포함하도록 개질될 수 있다(참조, 예컨대 국제 공개 WO 96/34891.)

<1175> 인간 IgG Fc 영역:

```
GGGATCCGGAGCCCAATCTTCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTCGAGGGTGACCCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGAGCGTAAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACGAGCTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGTAAATGAGTGGCAGCGCCGCGACTCTAGAGGAT (서열번호:52)
```

<1176> 실시예 12: 알부민 융합 단백질로부터의 항체 생성

<1178> 하이드리도마 기술

<1179> 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부(예컨대 융합 단백질의 치료적 단백질 부분 또는 알부민 단백질)에 결합하는 항체는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(참조, Current Protocols,

Chapter 2.). 상기 방법의 한 예로서, 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부의 제조물을 제조하여 여기에 실질적으로 천연 오염물이 없도록 정제한다. 이후 상기 제조물을 동물에게 도입하여 보다 큰 특정 활성의 폴리클로날 항혈청을 생성한다.

<1180> 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부에 특이적인 모노클로날 항체를 하이브리도마 기술을 이용하여 제조한다(Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981)). 일반적으로, 동물(예를 들어 마우스)을 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부로 면역시킨다. 상기 마우스의 비장세포를 추출하여 적합한 골수종 세포주와 융합시킨다. 임의의 적합한 골수종 세포주가 본 발명에 따라 적용될 수 있으나; ATCC로부터 이용가능한 모체 골수종 세포주(SP20)가 사용될 수 있다. 융합 이후, 생성된 하이브리도마 세포를 HAT 배지에 선택적으로 유지시킨 다음 반즈 등(Wands et al., Gastroenterology 80:225-232 (1981))이 기술한 대로 희석을 제한하여 클로닝한다. 상기 선택을 통해 수득된 하이브리도마 세포를 검정하여 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부와 결합할 수 있는 항체를 분비하는 클론을 동정한다.

<1181> 택일적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부와 결합할 수 있는 추가의 항체가 항-유전형 항체를 이용하는 2단계 공정으로 제조될 수 있다. 상기 방법은 항체가 그 자체로 항원이므로 제2항체에 결합하는 항체를 수득할 수 있다는 사실을 이용한 것이다. 상기 방법에 따라, 단백질 특이적 항체를 동물, 바람직하게는 마우스를 면역시키는데 사용한다. 상기 동물의 비장세포를 하이브리도마 세포를 생성하는데 이용하며, 하이브리도마 세포를 스크리닝하여 본 발명의 알부민 융합 단백질(또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부)에 결합할 수 있는 항체를 생성하는 클론을 동정한다 - 특정 항체가 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부에 의해 차단될 수 있다. 상기 항체는 본 발명의 알부민 융합 단백질(또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부)에 대한 항-유전형 항체를 포함한다 - 특정 항체가 본 발명의 추가의 융합 단백질(또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부)의 형성을 유도하기 위해 동물을 면역시키는데 사용된다 - 특정 항체.

<1182> 인간에서 항체의 생체내 이용을 위해, 항체를 "인간화"시켰다. 이러한 항체는 상기 기술된 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포로부터 유래된 유전자 작제물을 사용하여 생성될 수 있다. 키메릭 항체 및 인간화된 항체를 생성하는 방법은 당해분야에 공지되어 있으며, 본원에서 논의되어 있다. (문헌[Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., 미국 특허 번호 제 4,816,567호; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., 국제 공개 공보 제 WO 8702671호; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985) 참조].

<1183> scFvs 라이브러리로부터의 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 일부에 대한 항체 단편의 분리. 인간 PBL로부터 단리된 자연적으로 발생하는 V-유전자를 도너가 노출되었거나 노출되지 않았던 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 일부에 대한 반응성을 갖는 항체 단편의 라이브러리로 작제시켰다 (본원에 참조로서 포함된 미국 특허 5,885,793 참조).

<1184> 라이브러리의 획득. scFvs 라이브러리를 국제 공개 번호 W092/01047에 기술된 바와 같이 인간 PBL의 RNA로부터 작제하였다. 항체 단편을 나타내는 파아지를 획득하기 위해, 파아지미드가 잠복된 약 10^9 대장균(*E. coli*)에 1% 글루코오스 및 100 µg/ml의 암피실린(2xTY-AMP-GLU)을 함유하는 50ml의 2xTY를 접종시키고, 진탕하면서 0.8의 O.D.로 성장시켰다. 5ml의 이러한 배양물에 50ml의 2xTY-AMP-GLU를 접종하고, 2x10⁸ TU의 델타 유전자 3 헬퍼(M13 델타 유전자 III, 국제공개 번호 WO 92/01047 참조)를 첨가하고, 배양물을 진탕하지 않고 37°C에서 45분 동안 인큐베이션하고, 진탕하면서 37°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 배양물을 10분 동안 4000r.p.m.으로 원심분리하고, 펠렛을 100 µg/ml 암피실린 및 50 µg/ml의 카나마이신을 함유하는 2리터의 2xTY에 재현탁시키고, 밤새 성장시켰다. 파아지를 국제공개번호 WO 92/01047에 기술된 바와 같이 제조하였다.

<1185> M13 델타 유전자 III을 하기와 같이 제조하였다: M13 델타 유전자 III 헬퍼 파아지는 유전자 III 단백질을 엔코딩하지 않으며, 따라서 항체 단편을 나타내는 파아지(미드)가 항원에 대한 더 큰 결합성을 갖는다. 감염성 M13 델타 유전자 III 입자는, 파아지 형성 동안 야생형 유전자 III 단백질을 공급하면서 pUC19 유도체가 잠복된 세포에서 헬퍼 파아지를 성장시킴으로써 제조하였다. 배양물을 1시간 동안 진탕하지 않고 37°C에서 인큐베이션시키고, 추가로 1시간 동안 37°C에서 진탕시키면서 인큐베이션시켰다. 세포를 스펀다운시키고(IEC-Centra 8,400

r.p.m. 10분), 100 μ g 암피실린/ml 및 25 μ g 카나마이신/ml(2xTY-AMP-KAN)을 함유하는 300ml 2xTY 브로스에 재현탁시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 진탕시키면서 밤새 성장시켰다. 파아지 입자를 두개의 PEG-침전(Sambrook et al., 1990)에 의해 배양 배지로부터 정제하여 농축시키고, 2ml PBS중에 재현탁시키고, 0.45 μ m 필터(Minisart NML; Satorius)를 통과시켜 약 10^{13} 형질도입 유닛/ml 최종 농도를 제공하였다(암피실린 내성 클론).

<1186>

라이브러리의 패닝. 면역튜브(Nunc)를 100 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 일부 4ml와 함께 PBS중에 밤새 코팅시켰다. 튜브를 2% Marvel-PBS로 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C하에 차단하고, PBS에서 3회 세척하였다. 약 10^{13} TU의 파아지를 튜브에 도포하고, 상하로 움직이는 턴테이블에서 텀블링시키면서 실온하에 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 1.5시간 동안 방치하였다. 튜브를 PBS 0.1% 트윈-20으로 10회 세척하고, PBS로 10회 세척하였다. 1ml의 100mM 트리에틸아민을 첨가하고, 상하로 움직이는 턴테이블에서 15분 동안 회전시킨 후, 용액을 즉시 0.5ml의 1.0M 트리스-HCl(pH 7.4)로 중화시켜 파아지를 용리시켰다. 이후, 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 박테리아와 용리된 파아지를 인큐베이션시킴으로써 파아지로 10ml의 미드-로그 대장균 TG1를 접종시켰다. 그 후, 대장균을 1% 글루코오스 및 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 TYE 플레이트상에 플레이트시켰다. 그 후, 생성된 박테리아 라이브러리를 후속 선택용 파아지를 제조하기 위한 상기 기술된 바와 같은 델타 유전자 3 헬퍼 파아지로 획득하였다. 그 후, 이러한 공정을 총 4회의 친화 정제 동안 반복하면서, 3회 및 4회 정제 동안 튜브-세척을 20회의 PBS, 0.1% 트윈-20 및 20회의 PBS로 증가시켰다.

<1187>

결합제 특성. 3회차 및 4회차 선택으로부터의 용리된 파아지로 대장균 HB 2151을 접종하고, 가용성 scFv를 검정을 위한 단일 클론으로부터 생성시켰다(Marks, et al., 1991). 50mM 중탄산염 pH 9.6에서 10pg/ml의 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 이의 일부로 코팅한 미세적정 플레이트로 ELISA를 수행하였다. ELISA에서 클론 포지티브를 PCR 핑거프린팅 (예를 들어, 국제공개 W092/01047 참조) 및 시퀀싱에 의해 추가로 특성 결정하였다. 이들 ELISA 포지티브 클론을 또한, 당해분야의 공지된 기법 예컨대, 예를 들어, 에피토프 맵핑, 결합 친화도, 수용체 시그널 변환, 항체/항원 결합의 차단력 또는 경쟁적 억제, 및 경쟁적인 작용성 또는 길항성에 의해 추가로 특성 결정할 수 있다.

<1188>

실시예 13: [^{3} H]-2-데옥시글루코오스 흡수 검정

<1189>

지방, 골격근 및 간은 인슐린-민감성 조직이다. 인슐린은 이들 조직으로의 글루코오스 흡수/이송을 자극할 수 있다. 지방 및 골격근의 경우, 인슐린은 시그널 변환을 개시하며 이는 실질적으로 특정화된 세포내 구획으로부터 세포 표면으로 글루코오스 트랜스포터 4 분자 즉, GLUT4의 전위를 유도한다. 일단 세포 표면으로 이동하면, GLUT4는 글루코오스 흡수/이송을 가능하게 한다.

<1190>

[^{3} H]-2-데옥시글루코오스 흡수

<1191>

지방 및 근육과 관련된 많은 세포주가 당뇨병 치료용으로 기술된 하나 이상의 치료학적 약물의 혼합물의 존재 또는 부재하의 글루코오스 흡수/이송 활성에 대한 시험에 사용될 수 있다. 특히, 3T3-L1 무린 섬유아세포 및 L6 무린 골격근 세포는 각각 3T3-L1 지방세포 및 근육대롱세포로 분화되어 [^{3} H]-2-데옥시글루코오스 흡수 검정에 대한 적합한 생체내 모델로서 작용한다(Urso et al., J Biol Chem, 274(43): 30864-73 (1999); Wang et al., J Mol Endocrinol, 19(3): 241-8 (1997); Haspel et al., J Membr Biol, 169 (1): 45-53 (1999); Tsakiridis et al., Endocrinology, 136(10): 4315-22 (1995)). 간단하게는, 2×10^5 세포/100 μ l의 지방세포 또는 분화된 L6 세포를 분화후 배지중의 96-웰 조직-배양(Tissue-Culture) "TC" 처리된 즉, 50 μ g/ml의 폴리-L-리신으로 코팅된 플레이트로 이동시키고, 밤새 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂하에 인큐베이션시켰다. 세포를 먼저 혈청 비함유 글루코오스 저함유 DMEM 배지로 1회 세척한 후, 1nM 인슐린의 부재 또는 존재하에 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 본 발명의 치료제 (예를 들어, SE ID NO:Y로 기술된 특이적 융합물 및 이의 단편 및 변이체)의 농도를 1nM, 10nM 및 100nM으로 증가시키면서, 100 μ l/웰의 동일한 배지 및 100 μ l/웰의 완충액 또는 당뇨병 치료용으로 기술된 치료학적 약물중 하나 이상의 혼합물로 절식시켰다. 플레이트를 100 μ l/웰의 HEPES 완충된 염수로 3회 세척하였다. 인슐린을 10 μ M 라벨링된 [^{3} H]-2-데옥시글루코오스(Amersham, #TRK672) 및 10 μ M 비라벨링된 2-데옥시글루코오스(SIGMA, D-3179)의 존재하에 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 HEPES 완충된 염수중에 1nM으로 첨가하였다. 대조군으로서 인슐린의 부재하에서 동일한 조건으로 수행하였다. 최종 농도 10 μ M 사이토칼라신 B (SIGMA, C6762)를 별도의 웰에서 100 μ l/웰로 첨가하여 비특이적 흡수를 측정하였다. 세포를 HEPES 완충된 염수로 3회 세척하였다. 라벨링된 즉, 10 μ M의 [^{3} H]-2-데옥시글루코오스 및 비라벨링된 즉, 10 μ M의 2-데옥시글루코오스를

10분 동안 실온에서 첨가하였다. 세포를 차가운 인산염 완충된 염수 "PBS"로 3회 세척하였다. 세포를 $150\mu\text{l}$ /웰의 0.2N NaOH를 첨가하여 용해시키고, 실온에서 20분 동안 진탕시키면서 후속 인큐베이션하였다. 그 후, 샘플을 섬광 바이알로 옮기고, 여기에 5mL의 섬광액을 첨가하였다. 바이알을 베타-섬광 계수계로 계수하였다. 이중 조건하의 흡수 즉, 인슐린의 존재 또는 부재하의 차이는 하기 식으로 측정하였다: [(분당 인슐린 수 "cpm" - 비특이적 cpm)/(비인슐린 cpm - 비특이적 cpm)]. 평균 반응은 지방세포 및 근관에 대한 대조군의 약 5배 및 3배 반응의 한도안에 있다.

<1192> 세포의 분화

<1193> 세포를 T-75 cm^2 플라스크에 완전히 컨플루언시하게 하였다. 배지를 제거하고, 48시간 동안 25mL의 분화전 배지로 교체하였다. 세포를 5% CO_2 에서 37°C 및 85% 습도하에 인큐베이션시켰다. 48시간 후, 분화전 배지를 제거하고, 48시간 동안 25mL의 분화 배지로 교체하였다. 세포를 다시 5% CO_2 에서 37°C 및 85% 습도하에 인큐베이션시켰다. 48시간 후, 배지를 제거하고, 30mL 분화후 배지로 교체하였다. 분화후 배지를 14-20일 동안 유지시키거나, 완전한 분화가 달성될 때까지 유지시켰다. 배지를 2-3일마다 교체하였다. 인간 지방세포는 젠-바이오, 인크(Zen-Bio, INC(#SA 1096))로부터 구입할 수 있다.

<1194> 실시예 14: 췌장 세포주로의 [^3H]-티미딘 혼입의 실험관내 검증

<1195> GLP-1이 아이슬렛 듀오더널 홈박스-1(IDX-1) 및 인슐린 mRNA 수준의 증가 (Hui et al., 2001, Diabetes, 50(4): 785-96)와 관련된 랫트 췌장관 상피 세포주 ARIP의 분화를 시간 및 용량 의존적으로 유도하는 것이 최근 밝혀졌다. 이어서 IDX-1은 GLP-1 수용체의 mRNA 수준을 증가시킨다.

<1196> 시험한 세포 유형

<1197> RIN-M 세포: 이들 세포는 아메리칸 타입 티슈 컬처 컬렉션(ATCC 세포주 제 CRL-2057호)로부터 입수가 가능하다. RIN-M 세포주는 방사선 유도된 이동가능한 랫트 섬세포 종양으로부터 유래된다. 이러한 세포주는 종양의 누드 마우스 이종이식으로부터 확립되었다. 세포는 아이슬렛 폴리펩티드 호르몬을 생성하고 분리하며, L-도파 디카르복실라아제(아민 전구체 흡수 및 디카르복실화, 또는 APUD 활성을 갖는 세포에 대한 마커)를 생성한다.

<1198> ARIP 세포: 이들은 아메리칸 타입 티슈 컬처 컬렉션(ATCC 세포주 제 CRL-1674호)으로부터 입수가 가능한 상피 세포 형태의 췌장 외분비 세포이다. 또한 문헌[Jessop, N.W. and Hay, R.J., "Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors," In Vitro 16: 212, (1980); Cockell, M. et al., "Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas," Mol. Cell. Biol. 9: 2464-2476, (1989); Roux, E., et al. "The cell-specific transcription factor PTFI contains two different subunits that interact with the DNA" Genes Dev. 3: 1613-1624, (1989); 및, Hui, H., et al., "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells," Diabetes 50: 785-796 (2001)] 참조.

<1199> 세포 제조

<1200> RIN-M 세포주를 10% 소태 혈청(HyClone, #SH30088.03)을 갖는 RPMI 1640 배지(Hyclone, #SH300027.01)중에 성장시키고, 1:3 내지 1:6의 비로 6 내지 8일마다 계대배양하였다. 배지를 3 내지 4일 마다 교환하였다.

<1201> ARIP(ATCC #CRL-1674) 세포주를 1.5g/L 중탄산나트륨 및 10% 소태 혈청을 함유하도록 조절된 2mM L-글루타민을 갖는 햄스(Ham's) F12K 배지(ATCC, #30-2004)에서 성장시켰다. ARIP 세포주를 주마다 2회 1:3 내지 1:6의 비로 계대 배양하였다. 배지를 3 내지 4일 마다 교환하였다.

<1202> 검정 프로토콜

<1203> 세포를 96-웰 플레이트에서 4000 세포/웰로 시딩하고, 48 내지 72시간 동안 50% 컨플루언시하게 배양하였다. 세포를 $100\mu\text{l}$ /웰에서 혈청 비함유 배지로 교체하였다. 48-72시간 인큐베이션 후, 혈청 및/또는 본 발명의 치료제(예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 이의 단편 및 변이체)를 웰에 첨가하였다. 추가로 36시간 동안 인큐베이션을 계속하였다. [^3H]-티미딘(5-20 Ci/mmol)(Amersham Pharmacia, #TRK120)을 1 마이크로퀴리스/5 마이크로리터로 희석시켰다. 36시간 인큐베이션 후, 웰당 5 마이크로리터를 추가로 24시간 동안 첨가하였다. 세포를 차가운 PBS로 1회 부드럽게 세척함으로써 반응을 종결시켰다. 그 후, 세포를 10% 빙냉 TCA 100 마이크로

로리터로 15분 동안 4℃에서 고정시켰다. PBS를 제거하고, 0.2N NaOH 200 마이크로리터를 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 진탕시키면서 인큐베이션시켰다. 용액을 섬광 바이알에 옮기고, 수용액과 혼화가능한 5mL의 섬광액을 첨가하고, 강하게 혼합하였다. 바이알을 베타 섬광 계수기에서 계수하였다. 음성 대조군으로서 완충액을 사용하였다. 양성 대조군으로서, 소태 혈청을 사용하였다.

<1204> 실시예 15: 당뇨의 검정

<1205> 당뇨(즉, 소변중의 과량의 당)는 용이하게 검정될 수 있어 당뇨병의 질환 상태 지수를 제공한다. 일반적인 환자 샘플과 비교하여 환자 샘플중의 과도한 소변은 IDDM 및 NIDDM의 징후이다. IDDM 및 NIDDM을 갖는 이러한 환자의 치료 효과는 소변중의 과량의 글루코오스의 양의 감소에 의해 나타내어진다. IDDM 및 NIDDM 모니터링에 대한 바람직한 구체예에서, 환자로부터의 소변 샘플은 당해분야에 공지된 기법을 이용하여 글루코오스 존재에 대해 검정된다. 인간의 당뇨는 100ml 당 100mg을 초과하는 비노 글루코오스 농도로 규정된다. 당뇨를 나타내는 이들 환자에서 과도한 당 수준은 혈액 샘플을 수득하고, 혈청 글루코오스를 검정함으로써 더욱 정확하게 측정될 수 있다.

<1206> 실시예 16: B 세포 증식 및 분화의 자극 또는 억제 검출 검정

<1207> 작용성 인간 면역 반응의 유도는 B-계통 세포와 이들의 미세환경간의 해석가능한 동종의 시그널을 요한다. 시그널은 B-계통 세포가 이의 프로그래밍된 성장이 계속되게 하는 포지티브 자극, 또는 세포가 이의 현재의 성장 경로를 억제하도록 지시하는 네거티브 자극을 부여할 수 있다. 오늘날까지, 다양한 자극 및 억제 시그널이 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-14 및 IL-15를 유도하는 B 세포 반응에 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게는, 이러한 시그널은 이들 자체는 약한 이펙터이나, 다양한 보조-자극 단백질과 혼합되어 B 세포 군집중의 활성화, 증식, 분화, 귀소, 내성 및 치사를 유도할 수 있다.

<1208> B-세포 보조-자극 단백질 부류의 가장 우수하게 연구된 부류중 하나는 TNF-슈퍼패밀리이다. 이러한 패밀리로는, CD40, CD27 및 CD30과 이들 각각의 리간드 CD154, CD70 및 CD153이 다양한 면역 반응을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 B-세포 군집 및 이들의 전구체의 증식 및 분화의 검출 및/또는 관찰을 가능하게 하는 검정은 증식 및 분화에 있어서 이들 B-세포 군집상에서 다양한 단백질이 가질 수 있는 효과를 측정하는 유용한 수단이다. 하기 리스트는 B-세포 군집 및 이들의 전구체의 분화, 증식 또는 억제를 검출하기 위해 고안된 두개의 검정이다.

<1209> 시험관내 검정 - 본 발명의 알부민 융합 단백질 (치료학적 단백질의 단편 또는 변이체 및/또는 알부민 또는 이의 단편 또는 변이체를 함유하는 융합 단백질을 포함)은 B-세포 군집 및 이들의 전구체에서 활성화, 증식, 분화 또는 억제 및/또는 치사를 유도할 수 있는 이들의 능력에 대해 평가될 수 있다. 0.1 내지 10,000ng/mL의 용량 범위를 정성적으로 초과하는 것으로 평가된 정제된 인간 편도선 B 세포에 대한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 활성화는 표준 B-림프구 보조자극 검정으로 평가되며, 여기서 정제된 편도선 B 세포는 프라이밍제로서 고정된 항-인간 IgM 항체 또는 포르말린 고정된 스태필로코커스 아우레우스 코완 I(Staphylococcus aureus Cowan I)(SAC)의 존재하에 배양된다. 이차 시그널 예컨대, IL-2 및 IL-5는 SAC 및 IgM 가교와 상승 작용하여 삼중수소화-티미딘 혼입에 의해 측정되는 B 세포 증식을 유도한다. 신규한 상승 작용체가 이러한 검정을 이용하여 용이하게 확인될 수 있다. 이러한 검정은 CD3-포지티브 세포의 마그네틱 비드(MACS) 고갈에 의해 인간 편도선 B 세포를 분리시키는 것을 포함한다. 생성된 세포 군집은 CD45R(B220)의 발현에 의해 평가할 경우 95% 초과 B 세포이다.

<1210> 다양하게 희석된 각각의 샘플을 96-웰 플레이트의 개개의 웰에 위치시키고, 여기에 총 150 μ l 부피 배양 배지 (10% FBS, 5 $\times$ 10⁻⁵M 2ME, 100U/ml 페니실린, 10ug/ml 스트렙토마이신, 및 SAC의 10⁻⁵ 희석물을 함유하는 RPMI 1640)중에 현탁된 10⁵ B-세포를 첨가하였다. 증식 또는 억제는 3H-티미딘(6.7 Ci/mM)으로의 20h 펄스에 의해 정량하고, 72h 후속 인자 첨가를 개시하였다. 포지티브 및 네거티브 대조군은 각각 IL2 및 배지이다.

<1211> 생체내 검정 - BALB/c 마우스를 완충액 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질 (치료학적 단백질의 단편 또는 변이체 및/또는 알부민 또는 이의 단편 또는 변이체를 함유하는 융합 단백질) 2mg/kg으로 매일 2회 접종(i.p.)시켰다. 마우스를 4일 연속해서 이렇게 처리하고, 그 후 이들을 희석시키고, 다양한 조직 및 혈청을 검정을 위해 모았다. 정상적인 비장 및 본 발명의 알부민 융합 단백질로 처리된 비장으로부터의 H&E 섹션의 비교는 비장 세포에 대한 융합 단백질의 활성화 결과 예컨대, 주위림프구집의 분포 및/또는 레드 펄프(red pulp) 영역의 유핵 세포질의 현저한 증가를 확인시켜 주며, 이는 B-세포 군집의 분화 및 증식 활성을 나타낼 수 있다. B 세포 마커인 안티-CD45R(B220)을 사용한 면역조직화학적 연구는 비장 세포에 대한 생리적 변화 예컨대, 비장 파괴가 성립

된 T-세포 영역을 침투하는 느슨하게 한정된 B-세포 구역내의 증가된 B-세포 표출로 인한 것인지의 여부를 측정하는데 사용된다.

<1212> 알부민 융합 단백질로 처리된 마우스로부터의 비장의 세포 표현형 검색이 알부민 융합 단백질이 대조군 마우스에서 관찰된 것 보다 ThB+, CD45R(B220) 둔한 B 세포의 비를 현저하게 증가시키는 지의 여부를 나타내기 위해 사용된다.

<1213> 마찬가지로, 생체내에서 증가된 성숙한 B-세포 표출의 예측된 결과는 혈청 Ig 역가의 상대적 증가이다. 따라서, 혈청 IgM 및 IgA 수준을 완충액 처리된 마우스와 융합 단백질 처리된 마우스간에 비교하였다.

<1214> 실시예 17: T 세포 증식 검정

<1215> CD3-유도된 증식 검정은 PBMC에서 수행되며, ³H-티미딘의 흡수에 의해 측정된다. 본 검정은 하기와 같이 수행된다. 96-웰 플레이트를 밤새 4℃에서 CD3(HIT3a, Pharmingen)에 대한 100μl/웰의 mAb 또는 이소타입-매칭된 대조군 mAb (B33.1)로 코팅한 후 (.05M 중탄산 완충액중의 1μg/ml, pH 9.5), PBS로 3회 세척하였다. PBMC를 인간 말초혈로부터 F/H 구배 원심분리에 의해 분리하고, 다양한 농도의 본 발명의 알부민 융합 단백질(치료학적 단백질의 단편 또는 변이체 및/또는 알부민 또는 알부민의 단편 또는 변이체를 함유하는 융합 단백질을 포함) (총 부피 200μl)의 존재하에 10% FCS 및 P/S를 함유하는 RPMI에서 mAb 코팅된 플레이트의 4중 웰(5 × 10⁴/well)에 첨가하였다. 관련 단백질 완충액 및 배지 단독으로 사용한 것이 대조군이다. 48시간 동안 37℃에서 배양시킨 후, 플레이트를 2분 동안 1000rpm에서 회전시키고, 100μl의 상청액을 제거하고, 증식에 대한 영향이 관찰되지 않았다면 IL-2(또는 기타 사이토카인)의 측정을 위해 -20℃에서 저장하였다. 웰을 채취하고, ³H-티미딘을 혼입하여 증식을 측정하는데 이용하였다. 항-CD3 단독은 증식에 대한 포지티브 대조군이다. IL-2(100U/ml)는 또한 증식을 증대시키는 대조군으로 사용하였다. T 세포의 증식을 유도하지 않는 대조군 항체는 본 발명의 융합 단백질의 효과에 대한 네거티브 대조군으로서 사용된다.

<1216> 실시예 18: MHC 클래스 II의 발현, 보조자극 및 부착 분자 및 모노사이트 및 모노사이트 유래된 인간 수지상 세포의 세포 분화에 대한 본 발명의 융합 단백질의 효과

<1217> 수지상 세포는 말초 혈액에서 발견된 전구체 증식 확장에 의해 생성된다: 부착 PBMC 또는 세정된 모노사이트 분획을 GM-CSF(50ng/ml) 및 IL-4(20ng/ml)과 함께 7-10일 동안 배양된다. 이러한 수지상 세포는 비성숙 세포의 특징적 표현형을 갖는다(CD1, CD80, CD86, CD40 및 MHC 클래스 II 항원의 발현). 활성화 인자 예컨대, TNF-α로의 처리는 표면 표현형의 신속한 변화를 초래한다(MHC 클래스 I 및 II, 보조자극 및 부착 분자의 증가된 발현, FCγRII의 하향조절, CD83의 상향조절). 이들 변화는 증가된 항원 표출 능력 및 수지상 세포의 작용성 성숙과 관련있다.

<1218> 표면 항원의 FACS 검정은 하기와 같이 수행하였다. 세포를 본 발명의 알부민 융합 단백질로 이의 농도를 증가시키면서 또는 LPS(포지티브 대조군)로 1-3일 처리하고, 1% BSA 및 0.02mM 소듐 아자이드를 함유하는 PBS로 세척한 후, 30분 동안 4℃에서 적합한 FITC- 또는 PE-라벨링된 모노클로날 항체의 1:20 희석물과 함께 인큐베이션하였다. 추가적인 세척 후, 라벨링된 세포를 FACScan(Becton Dickinson)에 대한 유세포분류에 의해 검정하였다.

<1219> 사이토카인의 생성에 대한 효과. 수지상 세포에 의해 생성된 사이토카인 특히, IL-12는 T-세포 의존성 면역 반응의 개시에 중요하다. IL-12는 Th1 헬퍼 T-세포 면역 반응의 발생에 영향을 끼치며, 세포독성 T 및 NK 세포 작용을 유도한다. ELISA는 하기와 같이 IL-12 방출을 측정하는데 사용된다. 수지상 세포(10⁶/ml)를 24시간 동안 본 발명의 알부민 융합 단백질의 농도를 증가시키면서 처리하였다. LPS(100ng/ml)를 포지티브 대조군으로서 세포 배양물에 첨가하였다. 세포 배양물로부터의 상청액을 모으고, 시중의 ELISA 키트(예를 들어, R & D 시스템 (Minneapolis, MN))를 사용하여 IL-12 함유물에 대해 검정하였다. 키트와 제공된 표준 프로토콜을 이용하였다.

<1220> MHC 클래스 II, 보조자극 및 부착 분자의 발현에 대한 효과. 모노사이트상에 세포 표면 항원의 세개의 주요 패밀리가 확인될 수 있다: 부착 분자, 항원 제시와 관련된 분자 및 Fc 수용체. MHC 클래스 II 항원 및 기타 보조자극 분자 예컨대, B7 및 ICAM-1의 발현 조절은 모노사이트의 항원 표출 능력 및 T 세포 활성화 유도 능력에서의 변화를 초래할 수 있다. Fc 수용체의 증가된 발현은 개선된 모노사이트 세포독성 활성화, 사이토카인 방출 및 식작용과 관련될 수 있다.

- <1221> FACS 검정은 하기와 같이 표면 항원을 시험하는데 사용된다. 모노사이트를 본 발명의 알부민 용합 단백질로 이의 농도를 증가시키면서 또는 LPS(포지티브 대조군)으로 1 내지 5일 처리하고, 1% BSA 및 0.02mM 소듐 아자이드를 함유하는 PBS로 세척한 후, 30분 동안 4℃에서 적합한 FITC- 또는 PE-라벨링된 모노클로날 항체의 1:20 희석물과 인큐베이션시켰다. 추가적으로 세척한 후, 라벨링된 세포를 FACScan(Becton Dickinson)에 대한 유세포분류에 의해 검정하였다.
- <1222> 모노사이트 활성화 및/또는 증가된 생존. 모노사이트를 활성화(또는 대안적으로 불활성화)시키고/거나 모노사이트 생존력을 증가(또는 대안적으로 모노사이트 생존력을 감소)시키는 분자에 대한 검정법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 본 발명의 분자가 모노사이트의 억제제 또는 활성화제로 작용하는지의 여부를 측정하는데 일정하게 적용될 수 있다. 본 발명의 알부민 용합 단백질은 하기 기술된 세 검정법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 이들 검정법 각각에 있어서, 말초혈 모노핵 세포(PBMC)는 단일 도너 류코팩(American Red Cross, Baltimore, MD)로부터 히스토파크 구배(Histopaque gradient)(Sigma)를 통해 원심분리에 의해 정제된다. 모노사이트를 역류 원심분리 유출에 의해 PBMC로부터 분리하였다.
- <1223> 모노사이트 생존 검정. 인간 말초혈 모노사이트는 혈청 또는 기타 자극제의 부재하에 배양될 경우 점진적으로 생존력을 잃게된다. 이들의 치사는 내부적으로 조정된 과정(아포토시스)로부터 기인한다. 배양물로의 활성화 인자 예컨대, TNF-알파와 첨가는 현저하게 세포 생존율을 증대시키고, DNA 단편화를 방지한다. 요오드화프로피듐(PI) 염색은 하기와 같이 아포토시스를 측정하는데 사용된다. 모노사이트는 100ng/ml TNF-알파의 존재하에 (네거티브 대조군) 및 다양한 농도의 시험할 용합 단백질의 존재하에 혈청 비함유 배지(포지티브 대조군)에서 프로필렌 튜브중에서 48시간 동안 배양하였다. 세포를 5μg/ml의 최종 농도로 PI를 함유하는 PBS중에 2 x 10⁶/ml로 현탁시키고, FACScan 검정 전에 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 본 실험적 범례에서 PI 흡수가 DNA 단편화와 관련있음이 입증되었다.
- <1224> 사이토카인 분비에 대한 효과. 모노사이트/마크로파아지의 중요한 작용은 자극 후 사이토카인 분비를 통한 면역 시스템의 기타 세포 군집화에 대한 조정 활동이다. 사이토카인 방출을 측정하기 위한 ELISA는 하기와 같이 수행하였다. 인간 모노사이트를 본 발명의 알부민 용합 단백질과 이의 농도를 증가시키면서 5 × 10⁵ 세포/ml의 밀도로 인큐베이션시키고, 용합 단백질의 부재하에 동일한 조건하에 인큐베이션시켰다. IL-12 생성에 있어서, 세포를 용합 단백질의 존재하에 IFN (100U/ml)으로 밤새 프라이밍하였다. 그 후, LPS (10ng/ml)를 첨가하였다. 24시간 후, 컨디셔닝된 배지를 모으고, 사용때까지 냉동 저장하였다. 그 후, 시중에서 입수가능한 ELISA 키트(예를 들어, R & D 시스템 (Minneapolis, MN))를 사용하고, 키트에 함께 제공된 표준 프로토콜에 따라 TNF-알파, IL-10, MCP-1 및 IL-8의 측정을 수행하였다.
- <1225> 산화 폭발(oxidative burst). 정제된 모노사이트를 2-1 x 10 세포/웰로 96웰 플레이트에 플레이팅시켰다. 본 발명의 알부민 용합 단백질의 농도를 증가시키면서 총 부피 0.2ml의 배양 배지(RPMI 1640 + 10% FCS, 글루타민 및 항체)의 웰에 첨가하였다. 3일 동안 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 원심분리하고, 배지를 웰로부터 제거하였다. 마크로파아지 단일층에 웰당 0.2ml의 페놀 레드 용액(140mM NaCl, 10mM 인산칼륨 완충액 pH 7.0, 5.5mM 텍스트로오스, 0.56mM 페놀 레드 및 19U/ml의 HRPO)을 자극제(200nM PMA)와 함께 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션시키고, 웰당 20μl의 1N NaOH를 첨가함으로써 반응을 중단시켰다. 흡수가 610nm에서 측정되었다. 마크로파아지에 의해 생성된 H₂O₂의 양을 측정하기 위해, 공지된 몰농도 H₂O₂ 용액의 표준 곡선을 각각의 실험에 대해 수행하였다.
- <1226> 실시예 19: 혈관내피세포의 성장에 대한 본 발명의 알부민 용합 단백질의 효과
- <1227> 1일째에, 인간 혈관내피세포 (HUVEC)를 4% 소태 혈청 (FBS), 16유닛/ml 헤파린 및 50유닛/ml 내피세포 성장 보충물 (ECGS, Biotechncique, Inc.)을 함유하는 M199 배지에서 2-5x10⁴ 세포/35mm 디쉬 밀도로 시딩하였다. 2일째에, 배지를 10% FBS, 8유닛/ml 헤파린을 함유하는 M199로 교체하였다. 본 발명의 알부민 용합 단백질 및 포지티브 대조군 예컨대, VEGF 및 염기성 FGF(bFGF)를 다양한 농도로 첨가하였다. 4일 및 6일째에, 배지를 교체하였다. 8일째에, 컬터 카운터(Coulter Counter)로 세포 수를 측정하였다.
- <1228> HUVEC 세포 수의 증가는 용합 단백질이 혈관내피세포를 증식시킬 수 있다는 것을 나타내는 반면, HUVEC 세포 수의 감소는 용합 단백질의 혈관내피세포를 방해한다는 것을 나타낸다.
- <1229> 실시예 20: 래트 각막 환부 회복 모델
- <1230> 본 동물 모델은 신혈관형성에 대한 본 발명의 알부민 용합 단백질의 효과를 보여준다. 실험 프로토콜을 다음을

포함한다:

<1231> 각막 중심으로부터 스트로마층으로 1-1.5mm 길이로 절개한다.

<1232> 눈의 외부 가장자리에 면하는 절개부의 언저리 아래로 압설자를 삽입한다.

<1233> 포켓을 만든다 (이의 기저부는 눈의 가장자리로부터 1-1.5mm에 있다).

<1234> 포켓내에 50ng-5 μ g의 알부민 용합 단백질을 함유하는 펠렛을 위치시킨다.

<1235> 본 발명의 알부민 용합 단백질을 갖는 처리물은 20mg-500mg의 용량 범위 (5일 동안 매일 처리)로 각막 환부로 국부적으로 도포될 수 있다.

<1236> 실시예 21: 당뇨병 마우스 및 글루코코르티코이드-손상된 환부 회복 모델

<1237> 당뇨병 db+/db+ 마우스 모델

<1238> 본 발명의 알부민 용합 단백질이 회복 과정을 가속화시킨다는 것을 입증하기 위해, 유전적으로 당뇨병을 갖는 환부 회복 마우스 모델을 사용하였다. db+/db+ 마우스에서 충분한 두께의 환부 회복 모델은 잘 특성화되고, 임상적으로 적절하고 재생가능한 손상된 환부 회복 모델이다. 당뇨병성 환부의 회복은 수축 보다는 육아 조직의 형성 및 재상피화에 의존적이다(Gartner, M.H. et al., J.Surg. Res. 52:389 (1992); Greenhalgh, D.G. et al., Am.J.Pathol. 136:1235 (1990)).

<1239> 당뇨병성 동물은 타입 II 당뇨병에서 관찰되는 많은 특징을 갖는다. 호모자이거스(db+/db+) 마우스는 이들의 정상적인 호모자이거스(db+/+m) 한배 새끼에 비해 비만이다. 변이성 당뇨병(db+/db+) 마우스는 크로모솜 4(db+)에 대한 단일 상염색체 열성 변이를 갖는다(Coleman et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:283-293 (1982)). 동물은 대식성, 조갈증 및 다뇨증을 나타낸다. 변이성 당뇨병 마우스 (db+/db+)는 증가된 혈중 글루코오스, 증가되거나 정상의 인슐린 수준, 및 억제된 세포-매개된 면역성을 갖는다(Mandel et al., J.Immunol. 120:1375 (1978); Debray-Sachs, M. et al., Clin.Exp. Immunol. 51(1):1-7 (1983); Leither et al., Am.J. of Pathol. 114:46-55 (1985)). 말초신경장애, 심근 합병증, 및 비정상적인 미세혈관 병변, 기저막 두께 및 사구체 여과율이 이러한 동물에서 나타나는 것으로 기술되었다(Norido, F. et al., Exp. Neurol. 83(2):221-232 (1984); Robertson et al., diabetes 29(1):60-67 91980); Giacomelli et al., Lab Invest. 40(4):460-473 (1979); coleman, D.L., Diabetes 31 (Suppl):1-6 (1982)). 이들 호모자이거스 당뇨병성 마우스는 고혈당증을 나타내며, 이는 인간 타입 II 당뇨병에 대한 인슐린 유사체에 대해 내성이다(Mandel et al., J.Immunol. 120:1375-1377 (1978)).

<1240> 이들 동물에서 관찰된 특징은 이러한 모델에서의 회복이 인간 당뇨병에서 관찰된 회복과 유사할 수 있음을 시사한다(Greenhalgh, et al., Am.J. of Pathol. 136:1235-1246 (1990)).

<1241> 유전적으로 당뇨병성인 암컷 C57BL/KsJ (db+/db+) 마우스 및 이의 비당뇨병성(db+/+m) 헤테로자이거스 한배 새끼를 본 연구에 사용하였다(Jackson Laboratories). 연구 시작시에 6주령 및 8주령된 동물을 구입하였다. 동물을 각각 수용시키고, 임의의 음식과 물을 공급하였다. 무균 기법을 이용하여 모든 조작을 수행하였다. 실험은 휴먼 게놈 사이언스, 인크.(Human Genome Sciences, Inc.), 인스티튜셔널 애니몰 케어 앤드 유스 코미테 앤드 더 가이드라인 퍼 더 케어 앤드 유스 오브 래보러토리 애니멀(Institutional Animal Care and Use Comittee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals)의 룰 및 가이드라인에 따라 수행하였다.

<1242> 상처 프로토콜은 이전에 보고된 방법에 따라 수행하였다 (Tsuboi, R. and Rifkin, D.B., J. Exp. Med. 172:245-251 (1990)). 간단하게는, 상처를 입히는 날에, 동물을 탈이온수에 용해시킨 아베르틴(0.01mg/mL), 2,2,2-트리브로모에탄올 및 2-메틸-2-부탄올을 복강내 주입으로 마취하였다. 동물의 등 영역을 면도하고, 피부를 70% 에탄올 용액 및 요오드로 세척하였다. 상처를 내기 전에 수술 부위를 멸균 거즈로 건조시켰다. 그후, 키스 조직 펀치(Keyes tissue punch)를 사용하여 8mm 전체 두께의 상처를 생성시켰다. 상처를 낸 직후, 주위 피부를 조심스럽게 스트레칭시켜 환부가 확대되는 것을 배제시켰다. 실험 동안 환부 왼쪽 부분을 개방하였다. 상처난 날부터 연속 5일 동안 국부적으로 치료하였다. 치료 전에, 환부를 멸균 염수 및 거즈 스폰지로 조심스럽게 세척하였다.

<1243> 환부를 시각적으로 검사하고, 수술일에 및 이를 후에 일정한 간격을 두고 사진을 촬영하였다. 환부 밀봉부를 1-5일 및 8일째에 매일 측정하여 평가하였다. 눈금측정 제임스 캘리퍼스를 이용하여 환부를 수직 및 수평으로 측정하였다. 육아조직이 시각적으로 더이상 관찰되지 않고, 환부가 연속 상피에 의해 커버링되는 경우 상처가

아문 것으로 간주하였다.

- <1244> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 비히클중으로 8일 동안 1일당 4mg 내지 500mg의 다양한 투여량으로 투여하였다. 비히클 대조군 그룹에는 50mL의 비히클 용액을 투여하였다.
- <1245> 8일째에 나트륨 펜토바르비탈(300mg/kg)의 복강내 주입에 의해 동물을 안락시켰다. 그 후, 환부 및 주위 피부를 조직학 및 면역조직화학을 위해 채취하였다. 조직 표본을 추가 처리를 위해 생검 스폰지간의 조직 카세트의 10% 중성 완충된 포르말린에서 방치시켰다.
- <1246> 각각 10마리 동물(당뇨병의 5마리 및 비당뇨병의 5마리 대조군)의 3 군을 평가하였다: 1) 비히클 위약 대조군, 2) 비처리된 군, 및 3) 처리된 군.
- <1247> 환부 밀봉을 수직 및 수평 축으로 영역을 평가하고, 환부의 총 면적을 수득함으로써 분석하였다. 그 후, 초기 환부 영역(0일째)과 처리후(8일째)의 환부 영역의 차이를 구하여 수축을 평가하였다. 1일째의 환부 영역은 64mm^2 이며, 이는 피부 편치의 크기와 상응한다. 하기 공식을 이용하여 계산하였다:
- <1248> a. [8일째의 개방 영역] - [1일째의 개방 영역] / [1일째의 개방 영역]
- <1249> 표본을 10% 완충된 포르말린중에서 고정시키고, 파라핀 함침된 블록을 환부 표면과 수직으로 절개하고(5mm), 라이세트-정 마이크로톰(Reichert-Jung microtome)을 사용하여 커팅하였다. 일정한 헤마톡실린-에오신(H & E) 염색을 이등분된 환부의 단면에서 수행하였다. 환부의 조직학적 연구를 이용하여 치료된 피부의 회복 과정 및 형태학적 외형이 본 발명의 알부민 융합 단백질의 처리에 의해 변형되었는지의 여부를 평가하였다. 이러한 평가는 세포 축적, 염증 세포, 모세관, 섬유아세포, 재상피화 및 표피 성숙의 확인을 포함한다(Greenhalgh, D.G. et al., Am. J. Pathol. 136:1235 (1990)). 블라인드 관찰자는 눈금측정 렌즈 마이크로미터를 사용하였다.
- <1250> 조직 절편을 또한 ABC 엘리트 검출 시스템을 사용하여 폴리클로날 래빗 항-인간 케라틴 항체로 면역조직화학적으로 염색하였다. 인간 피부를 포지티브 조직 대조군으로서 사용하고, 비면역 IgG를 네거티브 대조군으로서 사용하였다. 눈금측정 렌즈 마이크로미터를 사용하여 환부의 재상피화 범위를 평가함으로써 케라티노사이트 성장을 측정하였다.
- <1251> 피부 표본중의 증식 세포 핵 항원/시클린 (PCNA)는 ABC 엘리트 검출 시스템으로 항-PCNA 항체(1:50)를 사용하여 입증되었다. 인간 콜론 암은 포지티브 조직 대조군으로서 작용하며, 인간 뇌 조직은 네거티브 조직 대조군으로서 작용한다. 각각의 표면은 일차 항체가 탈락되고, 비면역 마우스 IgG로 대체된 절편을 포함한다. 이들 절편의 순위는 0 내지 8 등급의 증식 범위에 기초하며, 더 낮은 등급은 약간의 증식을 반영하며, 더 높은 등급은 강력한 증식을 반영한다.
- <1252> 실험 데이터는 독립표본 t-테스트를 이용하여 분석하였다. <0.05의 p 값은 현저한 것으로 간주된다.
- <1253> 스테로이드 손상 래트 모델
- <1254> 생체내 및 시험관내 스테로이드에 의한 환부 치유 억제제는 다양하게 증명되어 있다(Wahl, Glucocorticoids and Wound healing. In: Anti-Inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. 280-302 (1989); Wahl et al., J. Immunol. 115: 476-481 (1975); Werb et al., J. Exp. Med. 147:1684-1694 (1978)). 글루코코르티코이드는 혈관신생을 억제하고, 혈관투과((Ebert et al., An. Intern. Med. 37:701-705 (1952)), 섬유아세포 증식 및 콜라겐 합성 (Beck et al., Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978))을 억제하고, 모노사이트 순환의 일시적 감소를 유도하여 (Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", In: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280-302 (1989)) 상처 치유를 지연시킨다. 손상된 상처 치료에 대한 스테로이드의 전신 투여는 래트에서 잘 정립된 현상이다(Beck et al., Growth Factors. 5: 295-304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", In: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280-302 (1989); Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229-2233 (1989)).
- <1255> 본 발명의 알부민 융합 단백질이 치유 과정을 가속화시킬 수 있음을 입증하기 위해, 메틸프레드니솔론의 전신 투여에 의해 치유가 억제되는 래트에서 완전 두께의 절제 피부 환부에 대한 상기 융합 단백질의 다양한 국소 도포의 효과를 평가하였다.

- <1256> 250-300g의 성숙한 수컷 스프라그 도레이 래트(Charles River Laboratories)를 본 실시예에 사용하였다. 8주령된 동물을 구입하여, 연구 시작시에는 9주령이었다. 래트의 치유 반응은 상처 입힌 시점에 메틸프레드니솔론(17mg/kg/래트 근내)의 전신 투여에 의해 상실된다. 동물을 개별적으로 수용시키고, 임의로 음식과 물을 제공하였다. 모든 조작은 무균 기법을 이용하여 수행하였다. 본 연구는 휴먼 게놈 사이언스, 인크., 인스티튜셔널 애니몰 케어 앤드 유스 코미테 앤드 더 가이드라인 퍼 더 케어 앤드 유스 오브 래버로터리 애니멀의 룰 및 가이드라인에 따라 수행하였다.
- <1257> 상처 프로토콜은 이전에 보고된 방법에 따라 수행하였다. 상처를 입히는 날에, 동물을 케타민(50mg/kg) 및 자일라진(5mg/kg)을 근내 주입하여 마취하였다. 동물의 등 영역을 면도하고, 피부를 70% 에탄올 용액 및 요오드 용액으로 세척하였다. 상처를 내기 전에 수술 부위를 멸균 거즈로 건조시켰다. 그 후, 키스 조직 편치를 사용하여 8mm 전체 두께의 상처를 생성시켰다. 실험 동안 환부 왼쪽 부분을 개방하였다. 상처낸 후 메틸프레드니솔론 투여한 날부터 연속 7일 동안 국부적으로 치료 물질을 도포하였다. 치료 전에, 환부를 멸균 염수 및 거즈 스폰지로 조심스럽게 세척하였다.
- <1258> 환부를 시각적으로 검사하고, 상처낸 날 및 치료 마지막날에 일정한 간격을 두고 사진 촬영을 하였다. 환부 밑봉부를 1-5일 및 8일째에 매일 측정하여 평가하였다. 눈금측정 제임스 캘리퍼를 이용하여 환부를 수직 및 수평으로 측정하였다. 육아조직이 시각적으로 더이상 관찰되지 않고, 환부가 연속 상피에 의해 커버링되는 경우 상처가 아문 것으로 간주하였다.
- <1259> 본 발명의 알부민 용합 단백질을 비히클중으로 8일 동안 1일당 4mg 내지 500mg의 다양한 투여량으로 투여하였다. 비히클 대조군 그룹에는 50mL의 비히클 용액을 투여하였다.
- <1260> 8일째에 나트륨 펜토바르비탈(300mg/kg)의 복강내 주입에 의해 동물을 안락시켰다. 그 후, 환부 및 주위 피부를 조직연구를 위해 채취하였다. 조직 표본을 추가 처리를 위해 생검 스폰지간의 조직 카세트의 10% 중성 완충된 포르말린에서 방치시켰다.
- <1261> 각각 10마리 동물(5마리는 메틸프레드니솔론으로 처리하고, 5마리는 글루코코르티코이드로 처리하지 않음)의 3군을 평가하였다: 1) 비처리된 군, 2) 비처리된 군, 및 3) 처리된 군.
- <1262> 환부 밑봉을 수직 및 수평 축으로 영역을 평가하고, 환부의 총 면적을 수득함으로써 분석하였다. 그 후, 초기 환부 영역(0일째)과 처리후(8일째)의 환부 영역의 차이를 구하여 수축을 평가하였다. 1일째의 환부 영역은 64mm^2 이며, 이는 피부 편치의 크기와 상응한다. 하기 공식을 이용하여 계산하였다:
- <1263>
$$b. [8\text{일째의 개방 영역}] - [1\text{일째의 개방 영역}] / [1\text{일째의 개방 영역}]$$
- <1264> 표본을 10% 완충된 포르말린중에서 고정시키고, 파라핀 함침된 블록을 환부 표면과 수직으로 절개하고(5mm), 올림푸스 마이크로톰(Olympus microtome)을 사용하여 커팅하였다. 일정한 헤마톡실린-에오신(H & E) 염색을 이등분된 환부의 단면에서 수행하였다. 환부의 조직학적 연구를 이용하여 치료된 피부의 회복 과정 및 형태학적 외형이 본 발명의 알부민 용합 단백질의 처리에 의해 개선되었는지의 여부를 평가하였다. 블라인드 관찰자는 눈금측정 렌즈 마이크로미터를 사용하여 상처 겹의 간격을 측정하였다.
- <1265> 실험 데이터는 독립표본 t-테스트를 이용하여 분석하였다. <0.05의 p 값은 현저한 것으로 간주된다.
- <1266> 실시예 22: 림프부종(lymphedema) 동물 모델
- <1267> 본 실험의 목적은 래트 뒷다리에서 신생 림프관 형성 및 림프 순환 시스템의 재생립에서 본 발명의 알부민 용합 단백질의 치료학적 효과를 시험하는데 적합하고 일정한 림프부종 모델을 생성시키는 것이다. 효과는 감염된 다리의 종창 부피, 림프 혈관의 양의 정량, 총 혈장 단백질 및 조직병리학에 의해 측정된다. 급성 림프부종은 7-10일 동안 관찰된다. 아마도 더욱 중요하게는, 부종의 만성 진행이 3-4주까지 이어진다.
- <1268> 수술 전에, 혈액 샘플을 단백질 농도 분석을 위해 채취하였다. 약 ~350g의 수컷 래트에 펜토바르비탈을 투여하였다. 후속하여, 오른쪽 다리를 무릎에서 엉덩이까지 면도하였다. 면도한 영역을 70% EtOH로 적신 거즈로 닦아내었다. 혈청 총 단백질 시험을 위해 혈액을 채취하였다. 2개의 측정 레벨을 마킹한 후 (뒤꿈치 위로 0.5cm, 등과 발의 중간 지점) 발에 염료를 주입하기 전에 둘레 및 부피 측정을 수행하였다. 양 오른쪽 및 왼쪽 발 등에 0.05ml의 1% 에반스 블루(Evan's Blue)를 투여하였다. 이어서, 발에 염료를 투여한 후 둘레 및 부피 측정을 수행하였다.
- <1269> 랜드마크로서 뒤꿈치 관절을 이용하여, 다리 중간의 서혜부를 원주 모양으로 절개하여 페모랄 도관(femoral

vessel)이 위치할 수 있게 하였다. 포셉(forcep) 및 지혈겸자를 사용하여 피부 플랩을 절개하고 분리하였다. 페모랄 도관을 위치시킨 후, 림프관은 상기 도관을 따라 아래에서 흐르도록 위치한다. 그 후, 이 영역에서 주요 림프관을 전기적으로 응고시키거나 봉합 결찰시켰다.

<1270> 현미경을 이용하여, 다리 뒷쪽의 근육 (반건양근 및 전근 근처)을 절개하였다. 그 후, 오금림프절을 위치시켰다. 2개의 근접한 그리고, 2개의 원위의 림프관 및 원위 혈액 공급을 위한 오금림프절을 봉합에 의해 결찰시켰다. 그 후, 오금림프절 및 임의의 수반되는 지방 조직을 연결 조직을 절단함으로써 제거하였다.

<1271> 이러한 과정으로부터 완전한 출혈을 조정하기 위해 주의를 기울였다. 림프를 폐쇄한 후, 피부 플랩을 액체 피부(Vetbond)(AJ Buck)를 이용하여 봉합하였다. 분리된 피부 가장자리는 다리 주위에 ~0.5cm의 겹을 유지한채 안쪽 근육 조직으로 봉합시켰다. 또한, 필요에 따라 피부는 안쪽 근육과 봉합시켜 고정될 수 있다.

<1272> 감염을 피하기 위해, 동물을 개별적으로 (깔짚이 아니라) 메쉬가 구비된 우리에 수용시켰다. 동물을 회수하여 최적의 부종 피크를 매일 체크하고, 이는 전형적으로 5-7일에 발생한다. 그 후, 플레토 부종 피크를 관찰하였다. 림프부종의 강도를 측정하기 위해, 작업 전에 매일 7일 동안 각각의 발에 2개의 지정된 위치에서 둘레 및 부피를 측정하였다. 림프부종에서의 혈장 단백질의 효과를 측정하고, 단백질 분석이 유용한 둘레측정 테스트인 지의 여부를 연구하였다. 양 대조군 및 부종성 다리의 무게를 2 지점에서 평가하였다. 블라인드 방식으로 분석을 수행하였다.

<1273> 둘레 측정: 다리 움직임을 방지하기 위해 간단한 가스 마취하에, 클로스 테이프로 다리 둘레를 측정하였다. 2명이 발목 뼈 및 발등에서 측정하고, 이 측정값을 평균내었다. 상기 측정값은 대조군 및 부종 다리 둘 모두로부터의 값이다.

<1274> 부피 측정: 수술 당일에 동물을 펜토바르비탈로 마취시키고, 수술전에 시험하였다. 매일의 부피 측정을 위해, 동물을 간단하게 할로탄 마취시키고 (신속하게 고정화되고, 빠르게 회복됨), 양 다리를 면도하고, 다리에 방수 마커를 사용하여 똑같이 마킹하였다. 다리를 먼저 물에 담그고, 각각의 마킹된 수준까지 기구에 담그고, 벅스 코 부종 소프트웨어(Buxco edema software)(Chem/Victor)를 사용하여 측정하였다. 한 인간이 데이터를 기록하고, 다른 인간은 다리를 마킹된 영역까지 담그게 하였다.

<1275> 혈액-혈장 단백질 측정: 혈액을 채취하고, 회전시키고, 혈청을 수술전에 분리한 후, 최종적으로 총 단백질 및 Ca^{2+} 비교를 수행하였다.

<1276> 다리 무게 비교: 혈액을 채취한 후, 조직 수집을 위해 동물을 준비시켰다. 퀴리틴(quillitine)을 사용하여 다리를 절단한 후, 실험 다리 및 대조군 다리를 결찰부에서 절단하고 무게를 측정하였다. 경종 관절을 탈구시키고, 다리의 무게를 측정함으로써 이차 무게 측정을 수행하였다.

<1277> 조직학적 준비: 무릎(오금) 영역 아래에 위치한 황근을 절개하고, 금속 몰드에 위치시키고, 프리즈겔(freezeGel)로 충전시키고, 냉 메틸부탄에 함침시키고, 분할될 때까지 -80°C에서 라벨링된 샘플 백에 위치시켰다. 분할되면, 림프관에 대한 형광 현미경으로 근육을 관찰하였다.

<1278> 실시예 23: 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의한 TNF 알파-유도된 부착 분자 발현의 억제

<1279> 염증 및 혈관 신생 영역으로의 림프구의 집중은 림프구상의 세포 표면 부착 분자(CAM)와 혈관 내피세포간의 특이적 수용체-리간드 상호작용을 포함한다. 정상 및 병리학적 세팅에서 부착 과정은 내피 세포(EC)상의 세포간 부착 분자-1(ICAM-1) 및 혈관 세포 부착 분자-1(VCAM-1) 및 내피 백혈구 부착 분자-1(E-셀렉틴) 발현을 포함하는 다중-단계가 따른다. 혈관 내피세포상의 이들 분자 및 기타 분자의 발현이, 백혈구가 국소적 맥관에 부착하여, 염증 반응의 전개 동안 국부 조직으로의 내출혈시키는 능력을 결정한다. 사이토카인 및 성장 인자의 국소적 집중화는 이들 CAM의 발현 조절에 관여한다.

<1280> 종양 괴사 인자 알파(TNF- α) 즉, 단백질 전염증성 사이토카인은 내피 세포상의 세개 모든 CAM의 자극제이며, 다양한 염증 반응에 관여하여 병리학적 결과를 초래한다.

<1281> TNF- α 유도된 CAM 발현을 매개하는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 잠재력이 시험될 수 있다. 고형상 흡수제로서 EC를 사용하는 변형된 ELISA 검정은 FGF 패밀리의 단백질의 구성원으로 보조자극되는 경우 TNF- α 처리된 EC 상에서 CAM 발현의 양을 측정하는데 사용된다.

<1282> 실험을 수행하기 위해, 인간 혈관내피세포(HUVEC) 배양물을 폴딩된 코드 채취물로부터 수득하고, 5% CO₂를 함유하는 37°C의 습식 인큐베이터에서 10% FCS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 성장 배지(EGM-2;

Clonetics, San Diego, CA)에서 유지시켰다. HUVEC를 18-24시간 동안 또는 컨플루언시할때까지 37℃에서 EGM 배지중에서 1×10^4 세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 그 후, 모노층을 100U/ml 페니실린 및 100mg/ml 스트렙토마이신이 보충된 혈청 비함유 RPMI-1640 용액으로 3회 세척하고, 제공된 사이토카인 및/또는 성장 인자(들)로 24시간 동안 37℃에서 처리하였다. 인큐베이션 후, 세포를 CAM 발현을 위해 평가하였다.

<1283> 인간 혈관내피세포(HUVEC)를 표준 96 웰 플레이트에서 컨플루언시하게 성장시켰다. 성장 배지를 세포로부터 제거하고, 90 μ l의 199 배지(10% FBS)로 대체하였다. 시험 샘플 및 포지티브 또는 네거티브 대조군을 삼중(10 μ l 부피)으로 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 각각 5시간(셀렉틴 및 인테그린 발현) 또는 24시간(인테그린만 발현) 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 흡출시켜 배지를 제거하고, 100 μ l의 0.1% 파라포름알데히드-PBS(Ca^{++} 및 Mg^{++} 함유)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4℃에서 30분 동안 고정시켰다.

<1284> 그 후, 웰로부터 고정물을 제거하고, 웰을 PBS(+Ca,Mg)+0.5% BSA로 1회 세척하고 배수시켰다. 웰이 건조되지 않게 하였다. 10 μ l의 희석된 일차 항체를 시험 웰 및 대조군 웰에 첨가하였다. 안티-ICAM-1-바이오틴, 안티-VCAM-1-바이오틴 및 안티-E-셀렉틴-바이오틴을 10 μ g/ml(0.1mg/ml 원액 항체의 1:10 희석) 농도로 사용하였다. 세포를 습식 환경하에 30분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 웰을 PBS(+Ca,Mg)+0.5% BSA로 3회 세척하였다.

<1285> 그 후, 20 μ l의 희석된 엑스트라아비딘-알칼리성 포스파타아제 (ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase) (1:5,000 희석)를 각각의 웰에 첨가하고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS(+Ca,Mg)+0.5% BSA로 3회 세척하였다. p-니트로페놀 포스페이트 pNPP 1 타블렛을 5ml의 글리신 완충액 (pH 10.4)에 용해시켰다. 글리신 완충액중의 100 μ l의 pNPP 기질을 각각의 시험 웰에 첨가하였다. 글리신 완충액중의 엑스트라아비딘-알칼리성 포스파타아제의 작업 희석물로부터 표준 웰이 삼중으로 제조하였다: 1:5,000 (10^0)> $10^{-0.5}$ > 10^{-1} > $10^{-1.5}$. 5 μ l의 각각의 희석액을 삼중 웰에 첨가하였으며, 각각의 웰중의 생성된 AP 함량은 5.50ng, 1.74ng, 0.55ng, 0.18ng이다. 그 후, 100 μ l의 pNPP 시제를 각각의 표준 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 50 μ l 부피의 3M NaOH를 웰에 첨가하였다. 생성물을 405nm에서 플레이트 리더상에서 정량화하였다. 백그라운드 서브트랙션 옵션이 글리신 완충액으로만 충전된 블랭크에 사용된다. 템플레이트를 각각의 표준 웰에서 AP-컨쥬게이트의 농도를 나타내도록 셋팅하였다[5.50ng; 1.74ng; 0.55ng; 0.18ng]. 생성물은 각각의 샘플에서 결합된 AP-컨쥬게이트의 양으로서 나타내었다.

<1286> 실시예 24: GAS 리포터 작제물의 작제

<1287> 세포의 분화 및 증식에 관련된 한 시그널 변환 경로는 잭스-STAT 경로(Jaks-STATs pathway)로 불린다. 잭스-STAT 경로에서 활성화된 단백질은 많은 유전자의 프로모터에 위치하는 감마 활성화 부위 "GAS" 엘리먼트 또는 인터페론-감감 반응성 엘리먼트("ISRE")에 결합한다. 단백질의 이러한 엘리먼트로의 결합은 관련 유전자의 발현을 변형시킨다.

<1288> GAS 및 ISRE 엘리먼트는 시그널 트랜스듀서(Signal Transducer) 및 전사 활성화제(Activators of Transcription) 또는 "STAT"로 불리는 전사 인자 부류에 의해 인지된다. STAT 패밀리에서 6개의 구성원이 있다. Stat1 및 Stat3는 많은 세포 유형에 존재하며, Stat2 또한 그렇다(IFN-알파에 대한 반응이 널리 확산되기 때문에). Stat4는 더욱 제한적이며, 많은 세포 유형에 존재하는 것은 아니나, IL-12로의 처리 후 T 헬퍼 클래스 I 세포에서 발견되었다. Stat5는 원래 유방 성장 인자로서 불리나, 골수계 세포를 포함한 다른 세포에서 더욱 높은 농도로 발견되었다. 이는 많은 사이토키네 의해 조직 배양 세포에서 활성화될 수 있다.

<1289> STAT는 야누스 키나아제 ("Jaks") 패밀리로 공지된 키나아제 세트에 의한 티로신 포스포릴화시 활성화되어 세포 질로부터 핵으로 전위된다. 잭스는 가용성 티로신 키나아제의 별개의 패밀리를 나타내며, Tyk2, Jak1, Jak2 및 Jak3를 포함한다. 이들 키나아제는 현저한 서열 유사성을 나타내며, 일반적으로 생성된 세포에서 촉매적으로 불활성이다.

<1290> 잭스는 하기 표에 요약된 다양한 수용체에 의해 활성화된다 (Adapted from review by Schidler and Darnell, Ann. Rev. Biochem. 64:621-51 (1995)). 잭스를 활성화시킬 수 있는 사이토카인 수용체 패밀리는 두 그룹으로 나누어진다: (a) 클래스 1은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Epo, PRL, GH, G-CSF, GM-CSF, LIF, CNTF 및 트롬보포이에틴에 대한 수용체를 포함하며; (b) 클래스 2는 IFN- α , IFN-g, 및 IL-10를 포함한다. 클래스 I 수용체는 보존되는 시스테인 모티프(4개의 보존된 시스테인 및 하나의 트립토판으로 이루어진 세트) 및 WSXWS 모티프(Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (SEQ ID NO:53)을 엔코딩하는 막 인접 영역)을 포함한다.

<1291>

따라서, 수용체로의 리간드의 결합시 잭스는 활성화되며, 이어서 STAT를 활성화시키고, 이어서 전위되어 GAS 엘리먼트에 결합한다. 이러한 전체 과정은 잭스-STAT 시그널 변환 경로에 포함된다. 따라서, GAS 또는 ISRE 엘리먼트의 결합에 의해 반영된 잭스-STAT 경로의 활성화는 세포의 증식 및 분화에 관련된 단백질을 나타내는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 성장 인자 및 사이토카인은 잭스-STAT 경로를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다 (하기 표 4 참조). 이와 같이, 리포터 분자로 결합된 GAS 엘리먼트를 사용함으로써, 잭스-STAT 경로의 활성화제가 확인될 수 있다.

<1292>

표 4

<1293>

JAKs	STATS				GAS(엘리먼트) 또는 ISRE	
리간드	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3		
IFN 패밀리						
IFN- α /B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
Il-10	+	?	?	-	1,3	
gp130 패밀리						
IL-6(다면발현)	+	+	+	?	1,3	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
Il-11(다면발현)	?	+	?	?	1,3	
OnM(다면발현)	?	+	+	?	1,3	
LIF(다면발현)	?	+	+	?	1,3	
CNTF(다면발현)	-/+	+	+	?	1,3	
G-CSF(다면발현)	?	+	?	?	1,3	
IL-12(다면발현)	+	-	+	+	1,3	
g-C 패밀리						
IL-2(림프구)	-	+	-	+	1,3,5	GAS
IL-4(림프/골수)	-	+	-	+	6	GAS(IRF1=IFP>>Ly6)(IgH)
IL-7(림프구)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9(림프구)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13(림프구)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
gp140 패밀리						
IL-3(골수)	-	-	+	-	5	GAS(IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5(골수)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF(골수)	-	-	+	-	5	GAS
성장 호르몬 패밀리						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
수용체 티로신 키나아제						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS(IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS(비 IRF1)

<1294>

실시에 27-29에 기술된 생물학적 검정에 사용되는 프로모터 엘리먼트를 함유하는 합성 GAS를 삭제하기 위해서, PCR 기본 방법을 이용하여 GAS-SV40 프로모터 서열을 생성시켰다. 5' 프라이머는 IRF1 프로모터에서 발견되는 GAS 결합 부위의 4개의 직렬의 복사체를 함유하며, 기타 GAS 또는 ISRE 엘리먼트가 대신 사용될 수 있지만 사이토카인 범위내에서 유입시 STAT에 결합하는 것으로 이전에 입증되었다 (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)). 5' 프라이머는 또한 SV40 초기 프로모터 서열에 상보적인 18bp 서열을 함유하며, XhoI 부위로 플랜킹

된다. 5' 프라이머의 서열은 다음과 같다:

5':GCGCCTCGAGATTTCCTCGAAATCTAGATTTCCTCGAAATGATTTCCTCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG:

3' (SEQ ID NO:54)

다운스트림 프라이머는 SV40 프로모터에 상보적이며, Hind III 부위로 플랜킹된다:

5':GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC:3' (SEQ ID NO:55)

PCR 증폭은 클론테크(Clontech)로부터 수득된 B-gal:프로모터 플라스미드중에 존재하는 SV40 프로모터 주쇄를 사용하여 수행하였다. 생성된 PCR 단편은 XhoI/Hind III로 절단하고, BLSK2-로 서브클로닝하였다(Stratagene). 전방향 및 역방향 프라이머로의 시퀀싱으로 삽입부가 다음 서열을 함유한다는 것을 확인하였다:

5':CTCGAGATTTCCTCGAAATCTAGATTTCCTCGAAATGATTTCCTCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGC
AACCATAGTCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCGCCCCATTCTCGCCCCATGGCTGACTAATTTTT
TTATTTATGCAGAGCCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTT:3' (SEQ ID NO:56)

이러한 GAS 프로모터 엘리먼트를 SV40 프로모터에 연결시키고, 다음에 GAS:SEAP2 리포터 작제물을 조작하였다. 여기서, 리포터 분자는 분비된 알칼리성 포스파타아제 또는 "SEAP"이다. 그러나, 분명하게는 모든 리포터 분자가 본 실시예 또는 기타 다른 실시예에서 SEAP 대신에 사용될 수 있다. SEAP 대신에 사용될 수 있는 널리 공지된 리포터 유전자로는 클로르암페닐콜 아세틸트랜스퍼라아제 (CAT), 루시페라아제, 알칼리성 포스파타아제, B-갈락토시다아제, 그린 형광 단백질 (GFP), 또는 항체에 의해 검출가능한 단백질을 포함한다.

상기 서열 확인된 합성 GAS-SV40 프로모터 엘리먼트를, SV40 프로모터를 증폭된 GAS-SV40 프로모터 엘리먼트로 효과적으로 대체시키면서 HindIII 및 XhoI를 사용하여 클론테크로부터 수득한 pSEAP-프로모터 벡터로 서브클로닝하여 GAS-SEAP 벡터를 생성시켰다. 그러나, 이러한 벡터는 네오마이신 내성 유전자를 함유하지 않으며, 따라서 포유동물 발현 시스템에 바람직하지 않다.

따라서, GAS-SEAP 리포터를 발현하는 포유동물의 안정한 세포주를 생성시키기 위해, GAS-SEAP 카세트를 SalI 및 NotI을 사용하여 GAS-SEAP 벡터로부터 회수하여, 네오마이신 내성 유전자 예컨대, pGFP-1(클론테크)를 함유하는 주쇄 벡터로 다중 클로닝 부위에서의 이들의 제한 부위를 이용하여 삽입하여, GAS-SEAP/Neo 벡터를 생성시켰다. 이들 벡터가 포유동물 세포로 트랜스펙션되면, 이들 벡터는 실시예 27-29에 기술된 바와 같이 GAS 결합을 위한 리포터 분자로서 사용될 수 있다.

기타 작제물을 상기 설명을 이용하여 GAS를 다른 프로모터 서열로 대체하여 제조할 수 있다. 예를 들어, EGR 및 NF-KB 프로모터 서열을 함유하는 리포터 분자의 작제물은 실시예 27-31에 기술되어 있다. 그러나, 많은 다른 프로모터는 이들 실시예에 기술된 프로토콜을 사용하여 치환될 수 있다. 예를 들어, SRE, IL-2, NFAT 또는 오스테오칼신(Osteocalcin) 프로모터는 단독으로 또는 혼합되어(예를 들어, GAS/NF-KB/EGR, GAS/NF-KB, IL-2/NFAT 또는 NF-KB/GAS) 치환될 수 있다. 유사하게는, 기타 세포주 예컨대, HELA(상피세포), HUVEC(내피세포), Reh(B-세포), Saso-2(골아세포), HUVAC(대동맥) 또는 심근세포가 리포터 작제물 활성을 시험하는데 사용될 수 있다.

실시예 25: SEAP 활성화에 대한 검정

본원에 기재된 실시예에 기술된 검정을 위한 리포터 분자로서, SEAP 활성을 하기 일반적인 공정에 따라 트로픽스 포스포-라이트 키트(Tropix Phospho-light Kit)(Cat. BP-400)을 사용하여 검정하였다. 트로픽스 포스포-라이트 키트는 하기 사용된 회석, 검정 및 반응 완충액을 제공한다.

디스펜서에 2.5 x 회석 완충액을 준비하고, 15 μ l의 2.5x 회석 완충액을 본 발명의 알부민 용합 단백질을 함유하는 35 μ l 용액을 함유하는 옵티플레이트(Optiplate)에 분배하였다. 플레이트를 플라스틱 밀봉제로 밀봉하고, 30분 동안 65°C에서 인큐베이션하였다. 옵티플레이트를 떼어놓아 균일하게 가열되게 하였다.

샘플을 15분 동안 냉각시켰다. 디스펜서를 비우고, 검정 완충액을 준비하였다. 50ml의 검정 완충액을 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 디스펜서를 비우고, 반응 완충액(하기 표 참조)을 준비시켰다. 50

μ 의 반응 완충액을 첨가하고, 실온에서 20분동안 인큐베이션시켰다. 화학발광 시그널의 강도는 시간 의존적이기 때문에, 약 10분 동안 발광분석기상에서 5개의 플레이트를 해독하였으며, 따라서 5개의 플레이트를 각각의 시점에서 처리하여야 하며, 두번째는 10분 후에 개시하였다.

발광분석기에서 상대적 광을 해독하였다. H12를 블랭크로 하고, 결과를 프린팅하였다. 화학발광의 증가는 리포터 활성을 나타낸다.

표 5

플레이트 #	Rxn 완충 회석액 (ml)	CSPD (ml)	플레이트 #	Rxn 완충 회석액 (ml)	CSPD (ml)
10	60	3	31	165	8.25
11	65	3.25	32	170	8.5
12	70	3.5	33	175	8.75
13	75	3.75	34	180	9
14	80	4	35	185	9.25
15	85	4.25	36	190	9.5
16	90	4.5	37	195	9.75
17	95	4.75	38	200	10
18	100	5	39	205	10.25
19	105	5.25	40	210	10.5
20	110	5.5	41	215	10.75
21	115	5.75	42	220	11
22	120	6	43	225	11.25
23	125	6.25	44	230	11.5
24	130	6.5	45	235	11.75
25	135	6.75	46	240	12
26	140	7	47	245	12.25
27	145	7.25	48	250	12.5
28	150	7.5	49	255	12.75
29	155	7.75	50	260	13
30	160	8			

실시예 26: 뉴런 활성을 확인하기 위한 검정

세포가 분화 및 증식될 때, 유전자 군은 많은 다양한 시그널 변환 경로를 통해 활성화된다. 이들 유전자중 하나인 EGR1(초기 성장 반응 유전자 1)은 활성화시 다양한 조직 및 세포 유형에서 유도된다. EGR1의 프로모터는 이러한 유도에 대해 반응가능하다. 리포터 분자에 연결된 EGR1 프로모터를 사용하여, 세포를 활성화시키는 본 발명의 융합 단백질의 능력을 평가할 수 있다.

특히, 하기 프로토콜은 PC12 세포주에서 신경 활성을 평가하는데 사용된다. PC12 세포(라트 페노크로모사이트마 세포)는 많은 미토젠 예컨대, TPA(테트라데카노일 포르볼 아세테이트), NGF(신경 성장 인자) 및 EGF(표지 성장 인자)로의 활성화에 의해 증식되고/거나 분화하는 것으로 공지되어 있다. EGR1 유전자 발현은 이러한 처리 동안 활성화된다. 따라서, PC12 세포를 SEAP 리포터에 연결된 EGR 프로모터를 함유하는 작제물로 안정하게 트랜스펙션시키므로써, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의한 PC12 세포의 활성화를 평가할 수 있다.

EGR/SEAP 리포터 작제물은 하기 프로토콜에 의해 어셈블링될 수 있다. EGR-1 프로모터 서열(-633에서 +1)(Sakamoto K et al., Oncogene 6:867-871 (1991))은 하기 프라이머를 사용하여 인간 유전자 DNA로부터 PCR 증폭될 수 있다:

제 1 프라이머: 5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG-3' (SEQ ID NO:57)

제 2 프라이머: 5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3' (SEQ ID NO:58)

실시예 24에서 생성된 GAS:SEAP/Neo 벡터를 사용하여, EGR1 증폭된 생성물을 이들 벡터에 삽입할 수 있다. 제

한 효소 XhoI/HindIII를 사용하여 GAS:SEAP/Neo 벡터를 일렬화시키고, GAS/SV40 물질을 제거하였다. EGR1 증폭된 생성물을 이들 동일한 효소로 제한시켰다. 벡터와 EGR1 프로모터를 결합시켰다.

<1318> 세포 배양용 96-웰 플레이트를 준비하기 위해, 2ml의 코팅 용액(30% 에탄올 (필터 멸균됨)중의 1:30 콜라겐 유형 I의 희석물(Upstate Biotech Inc. Cat#08-115))을 하나의 10cm 플레이트에 첨가하거나, 96-웰 플레이트의 웰 당 50ml 첨가하고, 2시간 동안 공기 건조시켰다.

<1319> PC12 세포를 사전코팅된 10cm 조직 배양 접시에서 100유닛/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신으로 보충된 10% 말 혈청(JRH BIOSCIENCES, Cat. #12449-78P), 5% 열-불활성화된 소태 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI-1640(Bio Whittaker)에서 일정하게 성장시켰다. 1 내지 4회의 스플릿으로 매 3일 내지 4일에 수행하였다. 플레이트로부터 15회 초과로 피펫팅 업-다운하여 스크래핑하고 재현탁시키므로써 세포를 제거하였다.

<1320> EGR/SEAP/Neo 작제물을 당해분야에 공지된 기법을 이용하여 PC12에 트랜스펙션시켰다. EGR-SEAP/PC12 안정한 세포를 300 μ g/ml G418에서 세포를 성장시켜 수득하였다. G418-비함유 배지를 매 한달 내지 두달에 걸친 일정한 성장 동안 사용하고, 세포를 2회 계대배양 동안 300 μ g/ml G418로 재성장시켰다.

<1321> 신경 활성을 검정하기 위해, 약 70 내지 80% 컨플루언트하게 된 세포를 갖는 10cm 플레이트를 오래된 배지를 제거함으로써 스크리닝하였다. 세포를 PBS(포스페이트 완충된 염수)로 1회 세척하였다. 그 후, 세포를 저혈청 배지(1% 말 혈청 및 0.5% FBS와 항생제를 함유하는 RPMI-1640)중에서 밤새 절식시켰다.

<1322> 다음날 아침, 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 세척하였다. 플레이트로부터 세포를 스크래핑하고, 2ml의 저혈청 배지중의 세포 웰에 현탁시켰다. 세포 수를 계수하고, 더 많은 혈청 배지를 첨가하여 최종 세포 밀도가 5×10^5 세포/ml가 되게 하였다.

<1323> 200 μ l의 세포 현탁액을 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다(1×10^5 세포/웰 당량). 일련의 상이한 농도의 본 발명의 알부민 융합 단백질을 37 $^{\circ}$ C에서 48 내지 72시간 동안 첨가하였다. 포지티브 대조군으로서, EGR을 통해 PC12 세포를 활성화시키는 것으로 공지된 성장 인자 예컨대, 50ng/ μ l의 신경 성장 인자(NGF)가 사용될 수 있다. 포지티브 대조군 웰에서는 SEAP의 50배가 넘는 유입이 전형적으로 관찰되었다. SEAP 검정은 당해분야에 공지된 기법 및/또는 실시예 25에 기술된 비와 같이 일정하게 수행될 수 있다.

<1324> 실시예 27: T-세포 활성화에 대한 검정

<1325> 인자를 확인하고, 본 발명의 알부민 융합 단백질이 T-세포를 증식 및/또는 분화시키는지의 여부를 측정하는 하기 프로토콜을 사용하여 T-세포 활성을 평가하였다. 실시예 24에서 생성된 GAS/SEAP/Neo 작제물을 이용하여 T-세포 활성을 평가하였다. 이와 같이, SEAP 활성을 증가시키는 인자는 잭스-STATS 시그널 변환 경로를 활성화시키는 능력을 나타낸다. 본 검정에 사용된 T-세포는 주르캣(Jurkat) T-세포(ATCC 수탁 번호. TIB-152)이며, Molt-3 세포(ATCC 수탁 번호. CRL-1552) 및 Molt-4 세포(ATCC 수탁 번호. CRL-1582)가 또한 사용될 수 있다.

<1326> 주르캣 T-세포는 림프아구 CD4+ Th1 헬퍼 세포이다. 안정한 세포주를 생성시키기 위해, 약 2 백만 주르캣 세포를 DMRIE-C(라이프 테크놀로지)를 이용하여 GAS-SEAP/neo 벡터로 트랜스펙션시켰다(하기 기술된 트랜스펙션 공정). 트랜스펙션된 세포를 웰 당 약 20,000의 밀도로 시딩하고, 1mg/ml 젠티신에 내성인 트랜스펙트를 선택하였다. 내성 콜로니를 확장시키고, 인터페론 감마의 농도 증가에 대한 이들의 반응성을 시험하였다. 선택된 클론의 용량 반응을 입증하였다.

<1327> 특히, 하기 프로토콜은 200 μ l의 세포를 함유하는 75웰에 대해 충분한 세포를 생성시킬 것이다. 이와 같이, 다중 96 웰 플레이트에 대해 충분한 세포를 생성시키기 위해 스케일을 크게 하거나 여러번 수행한다. 주르캣 세포는 10% 혈청과 1% Pen-Strep를 갖는 RPMI에서 유지된다. 2.5ml의 OPTI-MEM(라이프 테크놀로지)와 10 μ g의 플라스미드 DNA를 T25 플라스크에서 혼합하였다. 50 μ l의 DMRIE-C를 함유하는 2.5ml의 OPTI-MEM을 첨가하고 15-45분 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

<1328> 인큐베이션 기간 동안, 세포 농도를 측정하고, 원하는 수의 세포(트랜스펙션당 10^7)를 회전 침전시키고, 이를 10^7 세포/ml의 최종 농도로 OPTI-MEM에 재현탁시켰다. 그 후, OPTI-MEM중에 1ml의 1×10^7 세포를 T25 플라스크에 첨가하고, 6시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 10ml의 RPMI + 15% 혈청을 첨가하였다.

<1329> 주르캣:GAS-SEAP 안정적인 리포터 라인을 RPMI + 10% 혈청, 1mg/ml 젠티신 및 1% Pen-Strep중에 유지시켰다.

이들 세포를 다양한 농도의 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질로 처리하였다.

<1330> 융합 단백질로의 처리일에, 세포를 세척하고, ml 당 500,000 세포의 밀도로 신선한 RPMI+10% 혈청에 재현탁시켰다. 요구되는 정확한 수의 세포는 융합 단백질의 수에 의존적이며, 상이한 농도의 융합 단백질의 수를 스크리닝하였다. 하나의 96 웰 플레이트에 있어서, 약 1억개의 세포(10 플레이트에 있어서, 10억개 세포)가 요망된다.

<1331> 융합 단백질로 처리된 주르캣 세포를 함유하는 웰 디쉬를 48시간 동안 인큐베이터에 위치시켰다(주목: 이 시간은 48-72시간으로 변동가능하다). 각 웰로부터 35 μ l 샘플을 12 채널 피펫을 사용하여 불투명 96 웰 플레이트로 이동시켰다. 불투명 플레이트를 커버링하고(셀로펜 커버를 사용), 실시예 25에 따라 SEAP 검정을 수행할 때 까지 -20℃에서 저장하였다. 나머지 처리된 세포를 함유하는 플레이트를 4℃에 위치시키고, 필요에 따라 특정 웰에서 검정을 반복하기 위한 재료의 공급원으로서 사용하게 하였다.

<1332> 포지티브 대조군으로서, 주르캣 T 세포를 활성화시키는 것으로 공지된 100유닛/ml 인터페론 감마를 사용할 수 있다. 30배에 걸친 유입이 포지티브 대조군 웰에서 전형적으로 관찰된다.

<1333> 상기 프로토콜은 일시적으로 트랜스펙션된 세포 또는 안정하게 트랜스펙션된 세포의 생성에 사용될 수 있으며, 이는 당업자에게 자명할 것이다.

<1334> 실시예 28: T-세포 활성화에 대한 검정

<1335> NF- κ B (핵 인자 KB)는 염증 사이토카인 IL-1 및 TNF, CD30 및 CD40, 림포톡신-알파 및 림포톡신-베타를 포함하는 다양한 제제에 의해, LPS 또는 트롬빈에 노출시킴으로써, 및 특정한 바이러스 유전자 생성물의 발현에 의해 활성화되는 전사 인자이다. 전사 인자로서, NF- κ B는 포유동물 세포 활성화, 아포토시스의 조절 (NF- κ B는 아포토시스로부터 세포를 방어하는 것으로 여겨짐), B 및 T-세포 발달, 항-바이러스 및 항-미생물 반응, 및 다중 스트레스 반응과 관련된 유전자의 발현을 조절한다.

<1336> 비자극 조건하에서, NF- κ B는 I- κ B(억제제 KB)를 갖는 세포질에서 보유된다. 그러나, 자극시, I- κ B는 포스포릴화되고, 분해되어 NF- κ B가 핵으로 왕복 이동하게 하여, 표적 유전자의 전사를 활성화시킨다. NF- κ B에 의해 활성화된 표적 유전자는 IL-2, IL-6, GM-CSF, ICAM-1 및 클래스 1 MHC를 포함한다.

<1337> 이의 중심적 역할 및 자극의 범위에 대한 반응 능력으로 인해, NF- κ B 프로모터 엘리먼트를 사용한 리포터 작제물은 융합 단백질을 스크리닝하는데 사용된다. NF- κ B의 활성화제 또는 억제제는 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용할 것이다. 예를 들어, NF- κ B의 억제제는 NF- κ B의 급성 또는 만성 활성화와 관련된 질환 예컨대, 류마티스 관절염을 치료하는데 사용될 수 있다.

<1338> NF- κ B 프로모터 엘리먼트를 함유하는 벡터를 작제하기 위해, PCR 기본 방법을 사용하였다. 업스트림 프라이머는 NF- κ B 결합 부위(GGGGACTTTCCC) (SEQ ID NO:59)의 4개의 일련의 복사체 즉, SV40 초기 프로모터 서열의 5' 말단부에 상보적인 18bp 서열을 함유하며, 이는 XhoI 부위로 플랭클링된다:

5':CGGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCATCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEQ ID NO:60)

<1339>

<1340> 다운스트림 프라이머는 SV40 프로모터의 3' 말단부에 상보적이며, Hind III 부위로 플랭클링된다:

5':GCGGCAAGCTTTTGTCAAAGCCTAGGC:3' (SEQ ID NO:55)

<1341>

<1342> PCR 증폭은 클로테크로부터 수득한 pB-gal:프로모터 플라스미드에 존재하는 SV40 프로모터 주쇄를 사용하여 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 XhoI 및 Hind III로 분해하여 BLSK2-로 서브클로닝하였다(스트라타진:Stratagene). T7 및 T3 프라이머로 시퀀싱하여 삽입물이 하기 서열을 함유하는지를 확인하였다:

5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3' (SEQ ID NO:61)

<1343>

<1344> 다음으로, pSEAP2-프로모터 플라스미드 (클로테크)에 존재하는 SV40 최소 프로모터 엘리먼트를 XhoI 및 HindIII

를 사용하여 상기 NF-KB/SV40 단편으로 대체시켰다. 그러나, 이러한 벡터를 네오마이신 내성 유전자를 함유하지 않으며, 따라서 포유동물 발현 시스템에는 바람직하지 않다.

<1345> 안정한 포유동물 세포주를 생성시키기 위해, NF-KB/SV40/SEAP 카세트를 제한 효소 SalI 및 NotI를 사용하여 상기 NF-KB/SEAP 벡터로부터 회수하고, 네오마이신 내성을 갖는 벡터에 삽입하였다. 특히, NF-KB/SV40/SEAP 카세트를, pGFP-1을 SalI 및 NotI로 제한한 후 GFP 유전자를 대체하여 pGFP-1 (클론테크)로 삽입하였다.

<1346> 하나의 NF-KB/SV40/SEAP/Neo 벡터를 생성시키고, 안정한 주르카트 T-세포를 생성시키고, 실시예 25에 기술된 프로토콜에 따라 유지시켰다. 유사하게는, 이러한 안정한 주르카트 T-세포를 갖는 융합 단백질을 검정하기 위한 방법이 또한 실시예 25에 기술되어 있다. 포지티브 대조군으로서, 외생성 TNF 알파 (0.1, 1, 10ng)을 웰 H9, H10, 및 H11에 첨가하면, 5 내지 10배의 활성화가 전형적으로 관찰된다.

<1347> 실시예 29: 골수 활성을 확인하기 위한 검정

<1348> 융합 단백질이 골수 세포를 증식하고/거나 분화시키는 지의 여부를 측정함으로써, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 골수 활성을 평가하기 위해 하기 프로토콜을 사용하였다. 골수 세포 활성화는 실시예 24에서 생성된 GAS/SEAP/Neo 작제물을 사용하여 평가하였다. 이와 같이, SEAP 활성을 증가시키는 인자는 잭스-STATS 시그널 변환 경로를 활성화시키는 능력을 나타낸다. 본 검정에 사용된 골수 세포는 U937 즉, 프리-모노사이트 세포주를 사용하였으며, TF-1, HL60 또는 KG1이 사용될 수 있다.

<1349> U937 세포를 실시예 24에서 생성된 GAS/SEAP/Neo 작제물로 일시적으로 트랜스펙션시키기 위해, DEAE-Dextran 방법(Kharbanda et al., 1994, Cell Growth & Differentiation, 5:259-265)를 사용하였다. 먼저, 2×10^7 U937 세포를 채취하고, PBS로 세척하였다. U937 세포를 100유닛/ml 페니실린 및 100mg/ml 스트렙토마이신으로 보충한 10% 열-불활성화된 소태 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 일반적으로 성장시켰다.

<1350> 다음으로, 0.5mg/ml DEAE-덱스트란, 8 μ g의 GAS-SEAP2 플라스미드 DNA, 140mM NaCl, 5mM KCl, 375 μ M Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1mM MgCl₂ 및 675 μ M CaCl₂를 함유하는 1ml의 20mM 트리스-HCl(pH7.4) 완충액에 현탁시켰다. 37°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다.

<1351> 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지로 세포를 세척하고, 10ml 완전배지에 재현탁시키고, 37°C에서 36시간 동안 인큐베이션하였다.

<1352> 상기 세포를 400ug/ml G418중에서 성장시킴으로써 GAS-SEAP/U937 안정한 세포를 수득하였다. 일정한 성장 동안 그러나, 매 한달 내지 두달 동안에 G418-비함유 배지를 사용하였으며, 세포를 2회 계대배양을 위해 400ug/ml G418중에 재성장시켰다.

<1353> 이들 세포를 1×10^8 세포(이는 10개의 96-웰 플레이트 검정에 충분함)를 채취함으로써 시험하고, PBS로 세척하였다. 세포를 상기 기술된 성장 배지 200ml중에 최종 밀도 5×10^5 세포/ml로 현탁시켰다. 96-웰 플레이트중에 웰당 200 μ l 세포를 플레이팅시켰다(또는 1×10^5 세포/웰).

<1354> 상이한 농도의 융합 단백질을 첨가하였다. 37°C에서 48 내지 72시간 동안 인큐베이션하였다. 포지티브 대조군으로서, U937 세포를 활성화시키는 것으로 공지된 100유닛/ml 인터페론 감마를 사용할 수 있다. 30배에 걸친 유입이 포지티브 대조군 웰에서 전형적으로 관찰된다. SEAP 검정은 실시예 25에 기술된 프로토콜 및/또는 당해 분야에 공지된 방법에 따라 상청액을 검정한다.

<1355> 실시예 30: 소분자 농도 및 막 투과성 변화를 확인하기 위한 검정

<1356> 수용체로의 리간드 결합은 소분자 예컨대, 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 pH의 세포내 수준을 변화시키고, 막 전위를 변화시키는 것으로 공지되어 있다. 이러한 변화는 특정 세포의 수용체에 결합하는 융합 단백질을 확인하는 검정으로 측정될 수 있다. 하기 프로토콜은 칼슘에 대한 검정을 기술하고 있지만, 본 프로토콜은 칼륨, 나트륨, pH, 막 전위, 또는 형광 프로브에 의해 검출가능한 기타 소분자에서의 변화를 검출하도록 용이하게 변형될 수 있다.

<1357> 하기 검정은 소분자에 결합하는 형광 분자(Molecular Probes)에서의 변화를 측정하기 위한 플루오메트릭 이미징 플레이트 리더 (Fluorometric Imaging Plate Reader ("FLIPR"))를 사용한다. 분명하게는, 소분자를 검출하는 형광 분자가 칼슘 형광 분자 즉, 본원에서 사용된 플루오-4(Molecular Probes, Inc.; 카달로그 넘버. F-14202)

대신에 사용될 수 있다.

<1358>

부착 세포에 있어서, 세포를 투명한 바닥을 갖는 코-스타 블랙 96-웰 플레이트에 10,000-20,000 세포/웰로 시딩하였다. 플레이트를 CO₂ 인큐베이터중에 20분 동안 인큐베이션하였다. 부착 세포를 바이오텍 워셔(Biotek washer)중에 200ul의 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)로 2회 세척하고 최종 세척 후 100ul의 완충액을 제거하였다.

<1359>

1mg/ml 플루오-4 스톡 용액을 10% 플루로닉산(pluronic acid) DMSO중에서 제조하였다. 세포를 플루오-4로 로딩시키기 위해, 50ul의 12ug/ml의 플루오-4를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 60분 동안 CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 바이오텍 워셔중에서 HBSS로 4회 세척하여 100ul의 완충액을 제거하였다.

<1360>

비부착 세포에 있어서, 세포를 배양 배지로부터 회전 침전시켰다. 세포를 50ml 원뿔형 튜브에서 HBSS로 2-5x10⁶ 세포/ml로 재현탁시켰다. 10% 플루로닉산 DMSO중의 4ul의 1mg/ml 플루오-4 용액을 각ml의 세포 현탁액에 첨가하였다. 그 후, 튜브를 30-60분 동안 37℃ 물에 위치시켰다. 세포를 HBSS로 2회 세척하고, 1x10⁶ 세포/ml에 재현탁시키고, 마이크로플레이트에 100ul/웰로 분산시켰다. 플레이트를 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 그 후, 플레이트를 덴레이 셀 워시(Denley Cell Wash)중에서 200ul로 1회 세척하고, 흡기 단계에 의해 100ul 최종 부피가 되게 하였다.

<1361>

비세포 기재 검정에 있어서, 각각의 웰은 형과 분자 예컨대, 플루오-4를 함유한다. 본 발명의 융합 단백질을 웰에 첨가하고, 형광 변화를 관찰하였다.

<1362>

세포내 칼슘의 형광성을 측정하기 위해, 하기 변수에 대해서 FLIPR을 세팅하였다: (1) 시스템 게인은 300-800mV이다; (2) 노출 시간은 0.4초이다; (3) 카메라 F/정지는 F/2이다; (4) 여기는 488nm이다; (5) 방출은 530nm이다; (6) 샘플 첨가량은 50ul이다. 530nm로의 방출 증가는 본 발명의 알부민 융합 단백질을 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 유도된 분자에 의한 세포의 시그널링 현상을 나타내며, 이는 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 증가시킨다.

<1363>

실시예 31: 티로신 키나아제 활성을 확인하기 위한 검정

<1364>

단백질 티로신 키나아제 (PTK)는 다양한 그룹의 트랜스메μβ레인 및 세포질 키나아제를 나타낸다. 수용체 단백질 티로신 키나아제(RPTK) 그룹에는 PDGF, FGF, EGF, NGF, HGF를 포함하는 세포분열 및 대사 성장 인자에 대한 수용체 및 인슐린 수용체 서브패밀리가 속한다. 또한, 상응하는 리간드는 공지되어 있지 않은 RPTK의 큰 패밀리가 있다. RPTK에 대한 리간드는 주로 분비된 소단백질을 포함하나, 또한 멤브레인-결합된 세포의 매트릭스 단백질을 포함한다.

<1365>

리간드에 의한 RPTK의 활성화는 리간드-매개된 수용체 이합체화를 수반하며, 이는 수용체 서브유닛의 트랜스포스포릴화 및 세포질 티로신 키나아제의 활성화를 유도한다. 세포질 티로신 키나아제는 src-패밀리(예를 들어, src, yes, lck, lyn, fyn)의 수용체 결합된 티로신 키나아제 및 비수용체 결합된 사이토졸릭 단백질 티로신 키나아제 예컨대, cck 패밀리를 포함하며, 이의 구성원은 수용체의 사이토카인 슈퍼패밀리(예를 들어, 인터루킨, 인터페론, GM-CSF 및 렙틴)에 의해 개시된 시그널 변환을 매개한다.

<1366>

티로신 키나아제 활성을 자극할 수 있는 넓은 범위의 공지된 인자로 인해, 본 발명의 알부민 융합 단백질 또는 본 발명의 융합 단백질에 의해 유도된 단백질이 티로신 키나아제 시그널 변환 경로를 활성화시킬 수 있는지의 여부를 확인하는 것이 관심을 끈다. 따라서, 하기 프로토콜은 티로신 키나아제 시그널 변환 경로를 활성화시킬 수 있는 이러한 분자를 확인하기 위해 고안하였다.

<1367>

표적 세포(예를 들어, 일차 케라티노사이트)를 Nalge Nunc (Naperville, IL)로부터 구입한 96 웰 로프로드 사일런트 스크린 플레이트(Loprodyne Silent Screen Plates)에서 웰 당 약 25,000 세포 밀도로 시딩하였다. 플레이트를 100% 에탄올로 30분 동안 2회 멸균시키고, 물로 린싱하고, 밤새 건조시켰다. 일부 플레이트를 시그마 케미칼스(St. Louis, MO)로부터 구입가능한 세포 배양 등급 타입 I 콜라겐 (50mg/ml), 젤라틴 (2%) 또는 폴리리신(50mg/ml) 또는 벡톤 디킨슨(Bedford, MA)로부터 구입한 10% 매트릭셀로 코팅시키고, PBS로 린싱하고, 4℃에서 저장하였다. 이러한 플레이트상에서의 세포 성장을, 성장 배지중에 5,000 세포/웰을 시딩하고, 48시간 후 제조업자 알라마르 바이오사이언스사(Alamar Biosciences, Inc.(Sacramento, CA))에 의해 기술된 바와 같은 알라마르블루(alamarBlue)를 사용하여 세포 수의 간접적인 정량화에 의해 검정하였다. 벡톤 디킨슨으로부터의 팔

콘 플레이트 커버 #3071을 사용하여 로프로딘 사일런트 스크린 플레이트로 커버링하였다. 팔콘 마이크로테스트 III 세포 배양 플레이트는 일부 증식 실험에 사용될 수 있다.

<1368> 추출물을 제조하기 위해, A431 세포를 로프로딘 플레이트의 나일론 멤브레인상에 시딩하고 (20,000/200ml/웰), 완전 배지중에서 밤새 배양하였다. 세포를 24시간 동안 혈청 비함유 염기성 배지중에서 인큐베이션시켜 작업 중단시켰다. EGF(60ng/ml) 또는 본 발명의 상이한 농도의 알부민 융합 단백질로 5-20분 처리한 후, 배지를 제거하고, 100ml의 추출 완충액(20mM HEPES pH7.5, 0.15M NaCl, 1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 2mM Na₃VO₄, 2mM Na₄P₂O₇ 및 비링거 만하임(Indianapolis, IN)으로부터 수득한 프로테아제 억제제(# 1836170)의 각테일)을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 5분 동안 4℃에서 회전 셰이커상에서 셰이킹시켰다. 그 후, 플레이트를 진공 트랜스퍼 메인폴드에 위치시키고, 하우스 진공을 이용하여 각 웰의 0.45mm 멤브레인 바닥을 통해 여과하였다. 추출물을 진공 메인폴드의 바닥의 96-웰 캐취/검정 플레이트에서 수집하고, 즉시 얼음위에 위치시켰다. 원심분리에 의해 정화된 추출물을 수득하기 위해, 5분 동안 세정제 가용해시킨 후, 각 웰의 내용물을 제거하고, 16,000 x g 로 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다.

<1369> 티로신 키나아제 활성 수준에 대해 여과된 추출물을 시험하였다. 티로신 키나아제 활성을 검출하는 많은 방법이 공지되어 있으나, 본원에서는 하나의 방법만 기술하였다.

<1370> 일반적으로, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 티로신 키나아제 활성은 특이적 기질 (바이오티닐화된 펩티드)상에서 티로신 잔기를 포스포릴화시킬 수 있는 이의 능력을 측정함으로써 평가된다. 이러한 목적을 위해 사용될 수 있는 바이오티닐화된 펩티드는 PSK1(세포 분할 키나아제 cdc2-p34의 아미노산 6-20에 상응) 및 PSK2(가스트린의 아미노산 1-17에 상응)를 포함한다. 이 두 펩티드는 티로신 키나아제에 대한 기질이며, 비링거 만하임으로부터 입수가능하다.

<1371> 티로신 키나아제 반응은 순차적으로 하기 성분을 첨가함으로써 준비하였다. 먼저, 10ul의 5uM 바이오티닐화된 펩티드를 첨가하고, 10ul ATP/Mg²⁺ (5mM ATP/50mM MgCl₂), 이어서 10ul의 5x 검정 완충액(40mM 이미다졸 히드로클로라이드, pH7.3, 40mM 베타-글리세로포스페이트, 1mM EGTA, 100mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 0.5mg/ml BSA), 그 후 5ul의 나트륨 바나테이트(1mM) 이어서 5ul의 물을 첨가하였다. 성분을 완만하게 혼합하고, 반응 혼합물을 30℃에서 2분 동안 사전인큐베이션하였다. 10ul의 대조군 효소 또는 여과된 상청액을 첨가하여 반응을 개시시켰다.

<1372> 그 후, 티로신 키나아제 검정 반응을 10ul의 120mM EDTA를 첨가하고, 반응물을 얼음상에 위치시킴으로써 종료시켰다.

<1373> 반응 혼합물의 50ul 분취물을 미세적정 플레이트(MTP) 모듈에 이동시키고, 37℃에서 20분 동안 인큐베이션시킴으로써 티로신 키나아제 활성을 측정하였다. 이는 96 웰 플레이트를 스트렙타비딘으로 코팅시켜 바이오티닐화된 펩티드와 결합시킨다. MTP 모듈을 300ul/웰의 PBS로 4회 세척하였다. 이어서, 호오스 래디쉬 퍼옥시다아제 (항-P-Tyr-POD(0.5u/ml))에 컨쥬게이션된 75ul의 항-포스포티로신 항체를 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 상기와 같이 세척하였다.

<1374> 이어서, 100ul의 퍼옥시다아제 기질 용액(비링거 만하임)을 첨가하고, 실온에서 5분 이상 동안 인큐베이션하였다(30분 이하). ELISA 리더를 사용하여 샘플을 405nm에서 샘플의 흡광도를 측정하였다. 결합된 퍼옥시다아제 활성 수준을 ELISA 리더로 정량화시키고, 이는 티로신 키나아제 활성의 수준을 반영한다.

<1375> 실시예 32: 포스포릴화 활성을 확인하는 검정

<1376> 실시예 31에 기술된 단백질 티로신 키나아제 활성의 검정에 대한 가능한 대체법 및/또는 보완법으로서, 주요 세포 내 시그널 변환 매개체의 활성화(포스포릴화)를 검출하는 검정법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 하기 기술된 바와 같이, 한 특정 검정법은 Erk-1 및 Erk-2 키나아제의 티로신 포스포릴화를 검출할 수 있다. 그러나, 기타 분자 예컨대, Raf, JNK, p38 MAP, Map 키나아제 키나아제(MEK), MEK 키나아제, Src, 근육 특이적 키나아제(MuSK), IRAK, Tec 및 야누스 및 기타 다른 포스포세린, 포스포티로신 또는 포스포트레오닌 분자의 포스포릴화가 이들 분자를 Erk-1 또는 Erk-2로 치환함으로써 하기 검정법으로 검출될 수 있다.

<1377> 특히, 96-웰 ELISA 플레이트의 웰을 0.1ml의 단백질 G(1ug/ml)로 2시간 동안 실온(RT)에서 코팅시킴으로써 검정 플레이트를 제조하였다. 그 후, 플레이트를 PBS로 린싱하고, 1시간 동안 실온에서 3% BSA/PBS로 차단하였다. 그 후, 단백질 G 플레이트를 Erk-1 및 Erk-2에 대한 2개의 통상의 모노클로날 항체(100ng/웰)로 처리하였다(실온에서 1시간)(Santa Cruz Biotechnology). (기타 분자를 검출하기 위해, 상기 기술된 분자를 검출하는 모노클

로날 항체를 치환함으로써 이러한 단계가 용이하게 변형될 수 있다.) PBS로 3-5회 린싱한 후, 플레이트를 사용 때까지 4℃에서 저장하였다.

<1378> A431 세포를 96-웰 로프로드인 필터플레이트에서 20,000/웰로 시딩하고, 밤새 성장 배지에서 배양시켰다. 그 후, 세포를 염기성 배지(DMEM)중에서 48시간 동안 절식시키고, EGF(6ng/웰) 또는 본 발명의 융합 단백질의 농도를 변화시키면서 5-20분 동안 처리하였다. 그 후, 세포를 용해시키고, 추출물을 검정 플레이트로 직접 여과시켰다.

<1379> 추출물을 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시킨 후, 웰을 다시 린싱하였다. 포지티브 대조군으로서, MAP 키나아제의 통상의 제조물(10ng/웰)을 A431 추출물 대신에 사용하였다. 그 후, 플레이트를 Erk-1 및 Erk-2의 포스포릴화된 에피토프를 특이적으로 인지하는 통상의 폴리클로날(래빗) 항체(1ug/ml)로 처리하였다(실온에서 1시간). 그 후, 항체를 표준 공정에 따라 바이오티닐화시켰다. 그 후, 결합된 폴리클로날 항체를 유로피움-스트렙타비딘 및 유로피움 형광 증진제와 왈락 DELFIA 장치(Wallac DELFIA instrument)에서 연속 인큐베이션에 의해 정량화하였다(시간에 따라 소멸되는 형광성). 백그라운드 위의 증가된 형과 시그널은 본 발명의 융합 단백질 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 유도된 분자에 의한 포스포릴화를 나타낸다.

<1380> 실시예 33: 포스포릴화 검정

<1381> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 포스포릴화 활성을 검정하기 위해, 미국 특허 5,958,405 (본원에 참조로서 포함됨)에 기술된 바와 같은 포스포릴화 검정법을 이용하였다. 간단하게는, 감마-라벨링된 ³²P-ATP를 사용한 단백질 기질의 포스포릴화 및 감마 방사성 동위원소 카운터를 이용한 혼입된 방사능의 정량화에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질을 단백질 기질, ³²P-ATP, 및 키나아제 완충액과 인큐베이션하였다. 그 후, 기질로 혼입된 ³²P를 전기영동에 의해 유리 ³²P-ATP로부터 분리하고, 혼입된 ³²P를 계수하고, 네거티브 대조군과 비교하였다. 네거티브 대조군을 초과하는 방사능 계수는 융합 단백질의 포스포릴화 활성을 나타낸다.

<1382> 실시예 34: 폴리펩티드 리간드의 존재하에 본 발명의 알부민 융합 단백질의 포스포릴화 활성 (활성화)의 검출

<1383> 당해분야에 공지된 방법 또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 본 발명의 알부민 융합 단백질의 포스포릴화 활성을 측정할 수 있다. 포스포릴화 활성을 측정하는 바람직한 방법은 미국 특허 5,817,471(본원에 참조로서 포함됨)에 기술된 바와 같은 티로신 포스포릴화 검정법을 이용하는 것이다.

<1384> 실시예 35: 골수 CD34+ 세포 증식을 자극하기 위한 검정법

<1385> 본 검정법은 조혈 성장 인자의 존재하에 인간 CD34+의 증식력에 기초하며, CD34+세포의 증식을 자극하는 본 발명의 융합 단백질의 능력을 평가한다.

<1386> 대부분의 성숙한 전구체가 단지 단일 시그널에만 반응할 것이라는 것은 이미 입증되었다. 더욱 미숙한 전구체가 2개 이상의 반응할 시그널이 요구된다. 따라서, 다양한 선구 세포의 조혈 활성화에 대한 본 발명의 융합 단백질의 효과를 시험하기 위해, 본 검정물은 조혈 성장 인자의 존재 또는 부재하에 본 발명의 제공된 융합 단백질을 함유한다. 분리된 세포를 시험 샘플과 함께 줄기세포 인자(SCF)의 존재하에 5일 동안 배양시켰다. SCF 단독은 단지 "생존" 인자로서 이러한 조건에서 작용하는 골수 (BM) 증식에 대한 매우 제한된 효과를 가진다. 그러나, 이들 세포 (예를 들어, IL-3)에 대한 자극 효과를 나타내는 인자와 혼합될 경우, SCF는 상승 효과를 유도할 것이다. 따라서, 시험된 융합 단백질이 조혈 선구체에 대한 자극 효과를 갖는다면, 이러한 활성화는 용이하게 달성될 수 있다. 정상 BM 세포가 낮은 수준의 사이클링 세포를 갖기 때문에, 제공된 융합 단백질의 억제 효과는 관찰되지 않을 수 있다. 따라서, 선구체에 대한 억제 효과의 검정은 바람직하게는, 먼저 세포를 SCF+IL+3로 실험관내 자극시킨 후, 이러한 유도된 증식의 억제에 대해 평가되는 화합물과 접촉시키므로써 시험된다.

<1387> 간단하게는, CD34+ 세포를 당업계에 공지된 방법을 분리하였다. 세포를 해동시키고, 배지(1% L-글루타민 (500ml)를 갖는 QBSF 60 혈청 비함유 배지, Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD Cat# 160-204-101)에 재현탁시켰다. 200 x g에서 수차례의 완만한 원심분리 단계 후, 세포를 한시간 동안 방치하였다. 세포 수를 2.5×10^5 세포/ml로 조절하였다. 이 시간 동안, 100μl의 멸균수를 96-웰 플레이트의 가장자리 웰에 첨가하였다. 본 검정에서 본 발명의 알부민 융합 단백질로 시험될 수 있는 사이토카인은 50ng/ml의 단독의 rhSCF(R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat# 255-SC)이며, 30ng/ml의 rhSCF와 rhIL-3(R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat# 203-ML)의 혼합물이다. 1시간 후, 10μl의 제조된 사이토카인, 다양한 농도의 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 20μl의 희석된 세포를 이미 웰에 존재하는 배지에 첨가하여 최종의 총 부피가 100μl가 되게 하였다. 그

후, 플레이트를 37℃/5% CO₂ 인큐베이터를 오일 동안 배치하였다.

<1388>

검정 18시간 전에 채취하고, 0.5 μCi/웰의 [3H] 티미딘을 10 μl 부피로 각 웰에 첨가하여 증식율을 측정하였다. 각 96-웰 플레이트로부터 세포를 톱텍 하베스터(Tomtec Harvester) 96을 사용하여 필터매트로 채취하여 종결시켰다. 채취 후, 필터매트를 건조시키고, 트리밍시키고, 하나의 옴니필터(OmniFilter) 플레이트 및 하나의 옴니필터 트레이(OmniFilter Tray)로 이루어진 옴니필터 어셈블리로 배치시켰다. 60 μl 마이크로신티를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 탑실-A 프레스-온 실링 필름(TopSeal-A press-on sealing film)으로 밀봉시켰다. 바 코드 15 스티커를 계수를 위해 제 1 플레이트에 부착했다. 그 후, 밀봉된 플레이트를 로딩시키고, 방사능 수준을 팩카드 탑 카운트(Packard Top Count)로 측정하고, 프린팅된 데이터를 검정을 위해 수집하였다. 방사능 수준은 세포 증식의 양을 반영한다.

<1389>

본 실시예에 기술된 연구는 골수 CD34+ 세포 증식을 자극하기 위해 제공된 융합 단백질의 활성을 시험한다. 당업자는 본 발명의 융합 단백질 및 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 유전자 치료) 및 이의 작용제 및 길항제의 활성을 시험하기 위한 예시적 연구를 용이하게 변형시킬 수 있다. 골수 CD34+ 세포의 증식을 자극하는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 능력은, 융합 단백질에 상응하는 알부민 융합 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드는 면역시스템 및 혈구생성에 영향을 끼치는 질환의 진단 및 치료에 유용하다. 대표적인 용도는 상기 섹션 "면역활성" 및 "감염성 질환"에 기술되어 있으며, 본원의 다른 부분에서 기술되어 있다.

<1390>

실시예 36: 세포의 매트릭스 증진된 세포 반응(EMECR)의 검정

<1391>

세포의 매트릭스 증진된 세포 반응 (EMECR)의 목적은 세포의 매트릭스 (ECM) 유도된 시그널 하에 조절 줄기 세포에 대한 본 발명의 융합 단백질의 능력을 평가하는 것이다.

<1392>

세포는 주위 미세환경으로부터 수용된 시그널에 있어서 조절 인자에 대한 반응한다. 예를 들어, 섬유아세포, 및 내피 및 상피 줄기 세포는 ECM으로부터의 시그널의 부재하에서는 복제를 실패한다. 조절 줄기 세포는 골수에서 자가-소생할 수 있으나, 실험관내 현탁 배양물에서는 그렇지 못하다. 실험관내에서 자가-소생할 수 있는 줄기 세포의 능력은 스트로마 세포 및 ECM 단백질 피브로넥틴(fn)과의 이들의 상호작용에 의존적이다. fn으로의 세포 부착은 α₅.β₁ 및 α₄.β₁ 인테그린 수용체에 의해 매개되며, 이는 인간 및 마우스 조절 줄기 세포에 의해 발현된다. ECM 환경으로 조정되며, 줄기 세포 자가-소생 자극에 반응하는 인자(들)은 확인되지 않았다. 이러한 인자의 발현은 유전자 치료 및 골수 이식 적용에 있어서 매우 유익할 것이다.

<1393>

간단하게는, 폴리스티렌의 비조직 배양 처리된 96-웰 플레이트를 0.2 μg/cm²의 코팅 농도로 fn 절편으로 코팅시켰다. 마우스 골수를 0.2ml의 혈청 비함유 배지에 플레이트링 시켰다(1,000세포/웰). IL-3(5ng/ml) + SCF(50ng/ml)의 존재하에 배양된 세포는 포지티브 대조군으로서 작용할 것이며, 이러한 조건하에 줄기 세포의 자가-소생은 거의 발생하지 않을 것이나, 줄기 세포의 현저한 분화가 예상된다. 본 발명의 알부민 융합 단백질을 SCF(5.0ng/ml)의 존재 및 부재하에 적합한 네거티브 대조군과 시험하였으며, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 함유하는 투여된 조성물의 용적은 총 검정물 용적중의 10%이다. 그 후, 플레이트링된 세포를 세포 DNA로의 티미딘 혼입을 측정함으로써 정량화하였다. 검정에서 포지티브 히트의 확인은 세포의 표현형 특징을 요구할 것이며, 이는 배양 시스템의 스케일을 크게하거나 세포 표면 항원 및 FACSscan에 대한 적합한 항체 시제를 사용함으로써 달성될 수 있다.

<1394>

본 발명의 특정 융합 단백질이 조절 선구체의 자극제인 것으로 밝혀진다면, 융합 단백질 및 융합 단백질에 상응하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 면역계 및 혈구생성에 영향을 끼치는 질환의 진단 및 치료에 유용할 수 있다. 대표적인 용도는 상기 "면역 활성" 및 "감염성 질환"에 기술되어 있으며, 본원의 기타 부분에 기술되어 있다. 또한, 융합 단백질은 다양한 혈통의 줄기 세포 및 해당 선구체의 팽창에 유용할 수 있으며, 다양한 세포 유형의 분화 및/또는 증식에 유용할 수 있다.

<1395>

또한, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 조절 세포의 증식 및 분화를 억제하는데 사용될 수 있으며, 따라서 화학치료 동안 화학치료제로부터의 골수 줄기 세포를 생성시키는데 사용될 수 있다. 이러한 항증식 효과는 더 높은 용량의 화학 치료제의 투여를 가능하게 할 수 있으며, 따라서 더욱 효과적인 화학치료 처리법이 된다.

<1396>

게다가, 본 발명의 융합 단백질 및 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 스트로마 세포가 조절 계통의 세포 생성에 중요하기 때문에, 조절 관련 질환 예컨대, 빈혈증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 혈소판감소증 또는 백혈병의 치료 및 진단에 유용할 수 있다. 이의 사용은 골수 세포 생체의 배양, 골수

이식, 골수 재구성, 신생물의 방사선치료 또는 화학치료를 포함한다.

<1397> 실시예 37: 인간 피부 섬유아세포 및 대동맥 연근세포 증식

<1398> 본 발명의 알부민 용합 단백질을 정상의 인간 피부 섬유아세포(NHDF) 및 인간 대동맥 연근세포(AoSMC)의 배양물에 첨가하고, 두개의 보조 검정을 각각의 샘플로 수행하였다. 첫번째 검정은 정상적인 인간 피부 섬유아세포(NHDF) 또는 대동맥 연근세포(AoSMC)의 증식에 대한 용합 단백질의 영향을 시험하는 것이다. 섬유아세포 또는 연근세포의 비정상적인 성장은 섬유증 및 레테노시스를 포함한 여러 병리학적 과정의 일부이다. 두번째 검정은 NHDF 및 SMC 둘 모두에 의한 IL6 생성을 시험하는 것이다. IL6 생성은 기능 활성화의 표시체이다. 활성화된 세포는 많은 사이토카인 및 기타 인자의 생성을 증가시킬 것이며, 이는 사전염증 또는 면역조절 과정을 초래할 수 있다. 검정은 보조자극 또는 억제 활성을 체크하기 위해 보조-TNF α 자극의 존재하에 및 부재하에 수행하였다.

<1399> 간단하게는, 1일째에 96-웰 블랙 플레이트를 100 μ l 배양 배지에서 1000 세포/웰(NHDF) 또는 2000 세포/웰(AoSMC)로 세팅하였다. NHDF 배양 배지는 하기를 함유한다: 클로네틱스(Clonetics) FB 기초 배지, 1mg/ml hFGF, 5mg/ml 인슐린, 50mg/ml 젠타마이신, 2% FBS를 함유한다. 반면, AoSMC 배양물 배지는 클로네틱스 SM 기초 배지, 0.5 μ g/ml hEGF, 5mg/ml 인슐린, 1 μ g/ml hFGF, 50mg/ml 젠타마이신, 50 μ g/ml 암포테리신 B, 5% FBS. 37 $^{\circ}$ C에서 4-5시간 이상 동안 인큐베이션시킨 후, 배양물 배지를 흡기시키고, 성장 억류 배지로 교체하였다. NHDF에 대한 성장 억류 배지는 섬유아세포 기초 배지, 50mg/ml 젠타마이신, 2% FBS를 함유하는 반면, AoSMA에 대한 성장 억류 배지는 SM 기초 배지, 50mg/ml 젠타마이신, 50 μ g/ml 암포테리신 B, 0.4% FBS를 함유한다. 2일 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다.

<1400> 2일 제에, 본 발명의 알부민 용합 단백질의 일련의 희석물 및 주형을 배지 조절제 및 공지된 단백질 조절제를 항상 포함하도록 설계하였다. 자극 및 억제 실험에 있어서, 단백질을 성장 억류 배지로 희석시켰다. 억제 실험에 있어서, TNF α 를 2ng/ml(NHDF) 또는 5ng/ml(AoSMC)의 최종 농축물에 첨가하였다. 대조군 또는 본 발명의 알부민 용합 단백질을 함유하는 1/3 vol 배지를 첨가하고, 5일 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 에서 인큐베이션하였다.

<1401> 각 웰로부터 60 μ l를 또 다른 라벨링된 96-웰 플레이트로 이동시키고, 플레이트-밀봉제로 커버링하고, 6일 동안 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다 (IL6 ELISA에 있어서). 세포 배양 플레이트중의 나머지 100 μ l에, 배양물 부피 (10 μ l)의 10%에 상응하는 양으로 알라마르 블루(Alamar Blue)를 무균 첨가하였다. 다시 플레이트를 3 내지 4시간 동안 인큐베이터에 위치시켰다. 그 후, 사이토플루오르(CytoFluor)를 사용하여 530nm의 여기 및 590nm의 방출을 갖는 형광물을 측정하였다. 이는 성장 자극/억제 데이터를 생성시킨다.

<1402> 5일째에, 96 웰 플레이트를 PBS pH7.4중에 희석된 50-100 μ l/웰의 항-인간 IL6 모노클로날 항체로 코팅시키고 IL6 ELISA를 수행하고, 실온에서 ON을 배양하였다.

<1403> 6일째에, 플레이트를 페이퍼 타올상에 싱크시키고 블롯팅하여 비웠다. 4% BSA를 갖는 PBS를 함유하는 검정 완충액을 제조하였다. PBS중의 200 μ l/웰의 피어스 슈퍼 블록 차단 완충액으로 플레이트를 차단한 후, 세척 완충액(PBS, 0.05% 트윈-20)으로 세척하였다. 플레이트를 페이퍼 타올로 블롯팅하였다. 그 후, 50 μ l/웰의 희석된 항-인간 IL-6 모노클로날, 바이오틴-라벨링된 항체 0.50mg/ml를 첨가하였다. 배지(30, 10, 3, 1, 0.3, 0ng/ml)중의 IL-6 스톱을 희석시켰다. 샘플을 이중으로 플레이트의 상층 열에 첨가하였다. 플레이트를 커버링하고, 2시간 동안 셰이커에서 인큐베이션하였다.

<1404> 플레이트를 세척 완충액으로 세척하고, 페이퍼 타올로 블롯팅하였다. 검정 완충액중에 EU-라벨링된 스트렙티비딘을 1:1000으로 희석하고, 100 μ l/웰을 첨가하였다. 플레이트를 커버링하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척 완충액으로 세척하고, 페이퍼 타올로 블롯팅하였다.

<1405> 100 μ l/웰의 증진 용액을 첨가하였다. 5분 동안 셰이킹하였다. 왈락 DELFIA 형광분석기상에서 플레이트를 읽었다. 각 검정에서 삼중 샘플로부터의 값을 표로 만들고 평균화시켰다.

<1406> 이러한 검정에서의 양성의 결과는 AoSMC 세포 증식을 시사하며, 알부민 용합 단백질이 피부 섬유아세포 증식 및/또는 연근 세포 증식에 관련있음을 시사한다. 양성의 결과는 또한, 본 용합 단백질 및 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 많은 잠재적 용도를 암시한다. 예를 들어, 본 명세서에 걸쳐 상세하게 설명된 바와 같은 염증 및 면역 반응, 환부 치료, 및 혈관신생. 특히, 용합 단백질은 환부 치료 및 피부 재생에 사용될 수 있으며, 또한 혈관 및 림프관의 혈관발생의 증진에 사용될 수 있다. 혈관 성장은 예를 들어, 심혈관 질환의 치료에 이용될 수 있다. 추가적으로, 본 검정에서 길항 활성을 나타내는 용합 단백질은 항-혈관계 (예를

들어, 항-혈관신생)로서 작용함으로써 혈관신생과 관련된 질환, 질병 및/또는 상태를 치료하는데 유용할 수 있다. 이러한 질환, 질병 및/또는 상태는 당해분야에 공지되어 있고/거나 본원에 기술되어 있으며, 예컨대, 종양, 고형종양, 양성 종양, 예를 들어, 혈관종, 청신경종, 신경섬유종, 트라코마스 및 화농성 육아종; 동맥경화 플라그; 안구혈관신생 질환 예를 들어, 당뇨병성 신경종, 미숙아 망막증, 황반부 변성, 각막이식거부, 관신생 녹내장, 후수정체 섬유증, 홍채조홍, 망막모세포종, 눈의 포도막염 및 프테리시아 (비정상 혈관 성장); 류마티스 관절염; 건선; 지연된 상처 치료; 자궁내막증; 혈관발생; 육아종화(granulation); 비대성 반흔 (켈로이드); 골절 불유합; 경피증; 트라코마; 혈관 유착; 심근 혈관신생; 관동맥측부; 대뇌측부; 동정맥기형; 허혈성 지체 혈관신생; 오슬러-웨버 신드롬; 플라그 신혈관형성; 텔란지엑타시아(telangiectasia); 혈우병성 접합; 혈관섬유종; 섬유근이형증; 환부 육아종화; 크론병 및 죽상동맥경화가 있다. 게다가, 본 검정에서 길항제로서 작용하는 알부민 융합 단백질은 당해분야에 공지되고/거나 본원에 기술된 항-고증식성 질환 및/또는 항-염증을 치료하는데 유용할 수 있다.

<1407> 실시예 38: 내피세포상에서 세포 유착 분자 (CAM) 발현

<1408> 염증 및 혈관신생 영역에 대한 림프구의 보충은 림프구상의 세포 표면 유착 분자 (CAM)와 혈관 내피세포간의 특이적 수용체-리간드 상호작용과 관련있다. 정상 및 병리학적 셋팅(setting)에서 유착 과정은 내피 세포(EC)상에서 세포간 유착 분자-1(ICAM-1), 혈관 세포 유착 분자-1(VCAM-1), 및 내피성 백혈구 유착 분자-1(E-셀렉틴) 발현을 포함하는 일련의 다단계 캐스케이드(cascade)를 따른다. 혈관 내피세포 상에서 이러한 분자 및 기타 분자의 발현은 백혈구가 국소 맥관에 부착하고, 염증 반응의 전개 동안 국소 조직으로 일출시킬 수 있는 유효성을 측정한다. 사이토카인 및 성장 인자의 국소적 농도는 이들 CAM의 발현 조절에 관계한다.

<1409> 간단하게는, 내피세포 (예를 들어, 사람 제대정맥 내피세포 (HUVEC))를 표준 96 웰 플레이트에 컨플루언시하게 성장시키고, 성장 배지를 세포로부터 제거하고, 100 μ l의 199 배지 (10% 우태아 혈청 (FBS))로 대체하였다. 시험용 샘플 (본 발명의 알부민 융합 단백질 함유) 및 포지티브 또는 네가티브 대조군을 플레이트에 삼중 (10 μ l 부피)으로 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 5시간 (셀렉틴 및 인테그린 발현) 또는 24시간 (인테그린만 발현) 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 흡기시켜 배지를 제거하고, 100 μ l의 0.1% 파라포름알데히드-PBS (Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺를 지님)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 고정시켰다. 웰로부터 고정물을 제거하고, 웰을 PBX(+Ca,Mg) + 0.5% BAS로 1X 세척하고, 탈수시켰다. 10 μ l의 희석된 일차 항체를 시험 및 대조군 웰에 첨가하였다. 항-ICAM-1-바이오틴, 항-VCAM-1-바이오틴 및 항-E-셀렉틴-바이오틴을 10 μ g/ml의 농도로 사용하였다 (0.1mg/ml 스톡 항체의 1:10 희석물). 세포를 습한 환경에서 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS(+Ca,Mg) + 0.5% BAS로 3회 세척하였다. 20 μ l의 희석된 엑스트라아비딘-알칼리성 포스파타아제 (1:5,000 희석물, 본원에서는 작업 희석물로서 언급)를 각 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS(+Ca,Mg) + 0.5% BAS로 3회 세척하였다. 5ml의 글리신 완충액 당 p-니트로페놀 포스페이트 pNPP 정제 1개를 용해시켰다 (pH 10.4). 글리신 완충액중의 100 μ l pNPP를 각 시험 웰에 첨가하였다. 글리신 완충액중의 엑스트라아비딘-알칼리성 포스파타아제의 작업 희석물로부터 표준 웰을 삼중으로 제조하였다: 1:5,000 (10^0)> $10^{-0.5}$ > 10^{-1} > $10^{-1.5}$. 5 μ l의 각 희석물을 각 표준 웰에 첨가하고, 각 웰 중에서의 얻어진 AP 내용물은 5.50 ng, 1.74 ng, 0.55 ng, 0.18 ng이었다. 100 μ l의 pNPP 시약을 이후 각 표준 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 50 μ l의 3M NaOH를 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트를 글리신 완충액으로만 충전된 블랭크 웰에 대한 백그라운드 서브트랙션 옵션(the background subtraction option)을 이용하여 405nm에서 플레이트 판독기로 판독하였다. 또한, 주형을 각 표준 웰에서 AP-컨쥬게이트의 농도를 나타내도록 준비시켰다 [5.50ng; 1.74ng; 0.55ng; 0.18ng]. 결과는 각 샘플에서 결합된 AP-컨쥬게이트의 양으로서 나타내었다.

<1410> 실시예 39: 알라마르 블루 내피세포 증식 검정

<1411> 본 검정법은 소 림프관 내피세포 (LEC), 소 대동맥 내피 세포 (BAEC) 또는 사람 미세혈관 자궁근 세포 (UTMEC)의 bFGF-유도된 증식의 단백질 매개된 억제를 정량적으로 측정하는데 이용될 수 있다. 이러한 검정법은 대사활성의 검출을 기초로하여 형광광도분석 성장 지시제를 도입한다. 표준 알라마르 블루 증식 검정은 내피세포 자극의 공급원으로서 첨가된 10ng/ml의 bFGF를 지닌 EGM-2MV 중에서 준비되었다. 이러한 검정은 성장 배지 및 세포 농도를 약간만 변형시키면서 다양한 내피세포로 이용될 수 있다. 시험할 단백질 배치의 희석물을 적절하게 희석시켰다. bFGF를 함유하지 않는 혈청-비함유 배지 (GIBCO SFM)를 비자극된 대조군으로서 사용하고, 안지오스타틴 또는 TSP-1은 공지된 억제 대조군으로서 포함된다.

<1412> 간단하게는, LEC, BAEC 또는 UTMEC를 96 웰 플레이트에서 5000 내지 2000 세포/웰의 밀도로 성장 배지중에 시딩

하고, 37℃에서 하룻밤 동안 배치시켰다. 세포를 하룻밤 동안 인큐베이션시킨 후, 성장 배지를 제거하고, GIBCO EC-SFM으로 대체하였다. 세포를 10ng/ml 농도로 추가의 bFGF를 지닌 삼중 웰에서 본 발명의 알부민 융합 단백질의 적절한 희석물 또는 대조군 단백질 샘플 (SFM중에 제조됨)로 처리하였다. 세포를 샘플로 처리한 직후에, 플레이트(들)를 다시 3일 동안 37℃ 인큐베이터에 위치시켰다. 3일 후, 10ml의 스톡 알라마르 블루 (Biosource Cat# DAL 1100)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트(들)를 37℃ 인큐베이터에서 4시간 동안 위치시켰다. 그 후, 플레이트를 사이토플루오르 형광 판독기(CytoFluor fluorescence reader)를 사용하여 530nm의 여기 및 590nm의 방출에서 살폈다. 직접적인 출력을 상대적 형광 유닛으로 기록하였다.

<1413> 알라마르 블루는 세포 성장으로부터 유래된 성장 배지의 화학적 환원에 반응하여 형광을 나타내고 색을 변화시키는 산화-환원 지시제이다. 세포가 배양물중에서 성장함에 따라, 내재적 대사 활성은 인접한 주위 환경의 화학적 환원을 초래한다. 성장과 관련된 환원은 지시제를 산화된 (비형광 블루) 형태로부터 환원된 (형광 레드) 형태로 변화시킨다 (즉, 자극된 증식은 더 강한 시그널을 생성시키고, 억제된 증식은 더욱 약한 시그널을 생성시키고, 전체 시그널은 세포의 전체 수 및 이들의 대사 활성에 비례한다.) 활성의 배경 수준은 절식 배지에서만 관찰된다. 이를 포지티브 대조군 샘플 (성장 배지중의 bFGF) 및 단백질 희석물로부터 관찰된 결과와 비교하였다.

<1414> 실시예 40: 혼합된 림프구 반응의 억제 검출

<1415> 본 검정은 본 발명의 융합 단백질에 의한 혼합된 림프구 반응 (MLR)의 억제를 검출하고 평가하는데 사용될 수 있다. MLR의 억제는 세포 증식 및 생존력에 대한 직접적 효과, 상호작용 세포에 대한 보조자극 분자의 조절, 림프구와 보조 세포간의 부착 조절, 또는 보조 세포에 의한 사이토카인 생성의 조절로 인한 것일 수 있다. 본 검정에 사용된 말초혈 단핵 단편이 T, B 및 천연 킬러 림프구 및 단핵구 및 수지상 세포를 포함하기 때문에 다중 세포는 MLR을 억제하는 알부민 융합 단백질에 의해 표적화될 수 있다.

<1416> MLR을 억제하는 것으로 밝혀진 본 발명의 알부민 융합 단백질은 림프구 및 모노사이트 활성화 또는 증식과 관련된 질환에 적용될 수 있다. 이들 질환으로는 천식, 관절염, 당뇨병, 염증 피부 질환, 건선, 습진, 전신성 홍반성 루프스, 다발성 경화증, 사구체신염, 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 동맥경화증, 간경병, 이식편대 숙주병, 숙주대 이식편병, 간염, 백혈병 및 림프종을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

<1417> 간단하게는, 사람 공여체로부터의 PBMC를 림프구 분리 배지 (LSM[®], 밀도 1.0770g/ml, Oragnon Teknika Corporation, West Chester, PA)를 사용한 밀도 구배 원심분리로 정제하였다. 두 공여체로부터의 PBMC를 10% FCS 및 2mM 글루타민이 보충된 RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY)중에 2×10^6 세포/ml로 조절하였다. 제 3 공여체로부터의 PBMC를 2×10^5 세포/ml로 조절하였다. 각 공여체로부터의 PBMC 50 마이크로리터를 96-웰 둥근 바닥 미세적정 플레이트의 웰에 첨가하였다. 융합 단백질 시험 물질 (50 μ l)의 희석물을 미세적정 웰에 삼중으로 첨가하였다. (대상 단백질의) 시험 샘플을 1:4의 최종 희석을 위해 첨가하고; rhuIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 카탈로그 넘버 202-IL)를 최종 농도 1 μ g/ml로 첨가하고; 항-CD4 mAb (R&D Systems, 클론 34930.11, 카탈로그 넘버 MAB379)를 최종 농도 10 μ g/ml로 첨가하였다. 세포를 5% CO₂ 중 에서 37℃에서 7-8일 동안 배양시키고, 1 μ C의 [³H] 티미딘을 마지막 16시간 배양 동안 웰에 첨가하였다. 세포를 채취하고, 패카드 탑카운트(Packard TopCount)를 사용하여 티미딘 혼입을 측정하였다. 데이터는 삼중 측정치의 평균 및 표준 편차로서 나타내었다.

<1418> 대상 융합 단백질의 샘플을 별도의 실험으로 스크리닝하고, 림프구의 증식을 억제하는 네가티브 대조군 처리군인 항-CD4 mAb, 및 림프구의 증식을 증진시키는 포지티브 대조군 처리군인 IL-2(재조합 물질 또는 상청액으로서)와 비교하였다.

<1419> 실시예 41: 프로테아제 활성의 검정

<1420> 하기 검정법은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 프로테아제 활성을 평가하는데 사용될 수 있다.

<1421> 젤라틴 및 카세인 자이모그래프를 실질적으로 문헌 [Heusen et al., *Anal. Biochem.*, 102:196-202 (1980); Wilson et al., *Journal of Urology*, 149:653-658 (1993)]에 기술된 바와 같이 수행하였다. 샘플을 1% 젤라틴 오르카세인을 함유하는 10% 폴리아크릴아미드/0.1% SDS 겔상에서 수행하고, 2.5% 트리톤중에 실온에서 1시간 동안 함침시키고, 0.1M 글리신 (pH 8.3)중에 37℃에서 5 내지 16시간 동안 함침시켰다. 아미도 블랙(amido black)으로 염색 후, 단백질 분해 영역이 다시 블루-블랙 배경에 대해 다시 투명한 영역으로서 나타났다. 트립

신(Sigma T8642)을 포지티브 대조군으로서 사용하였다.

<1422>

프로테아제 활성은 n-a-벤조일-L-아르기닌 에틸 에스테르 (BAEE)(Sigma B-4500)의 절단을 모니터링함으로써 측정하였다. 반응은 pH 7.5로 세팅하였다 (25mM NaPO₄, 1mM EDTA 및 1mM BAEE). 샘플을 첨가하고, 260nm 흡광도 변화를 벡만(Beckman) DU-6 스펙트로포토미터에서 시간 구동 모드로 모니터링하였다. 트립신을 포지티브 대조군으로서 사용하였다.

<1423>

280nm 흡광도로서 측정된 헤모글로빈 또는 카세인으로부터의 산-가용성 펩티드의 방출 또는 폴린 방법(Folin method)을 측색계적으로 이용한 것을 기초로하는 추가적임 검정을 문헌 [Bergmeyer, et al., *Methods of Enzymatic Analysis*, 5 (1984)]에 기술된 바와 같이 수행하였다. 기타 검정법은 색원체 기질(chromogenic substrate)의 가용화를 포함한다 (Ward, *Applied Science*, 251-317 (1983)).

<1424>

실시예 42: 세린 프로테아제 기질 특이성의 확인

<1425>

본원에 기술되거나 당해분야에 공지된 방법을 이용하여 세린 프로테아제 활성을 갖는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 기질 특이성을 측정한다. 한 구체예에서, 기질 특이성을 측정하는 방법은 GB 2 324 529 (본원에 참조로서 포함됨)에 기술된 바와 같이 위치 스캐닝 합성 조합 라이브러리(positional scanning synthetic combinatorial library)의 사용을 특징으로 한다.

<1426>

실시예 43: 리간드 결합 검정

<1427>

하기 검정법은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 리간드 결합 활성을 평가하는데 사용될 수 있다.

<1428>

리간드 결합 검정은 수용체 약리학을 확인하기 위한 직접적인 방법을 제공하고, 높은 처리량 포맷으로 개조될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대해 정제된 리간드는 결합 연구를 위한 고도의 특이적 활성 (50-2000 Ci/mmol)으로 방사선라벨링된다. 그 후, 방사선라벨링 과정이 융합 단백질에 대한 리간드의 활성을 감소시키지 않는 것으로 측정되었다. 완충액, 이온, pH 및 기타 조절제 예컨대, 누클레오타이드에 대한 검정 조건은 막과 전체 세포 폴리펩티드 공급원 둘 모두에 대한 작업가능한 시그널 대 잡음비를 성립하도록 최적화된다. 이들 검정에 있어서, 특이적 폴리펩티드 결합은 관련된 전체 방사능 빼기 과량의 라벨링되지 않은 경쟁 리간드의 존재하에 측정된 방사능으로서 정의된다. 가능한 경우, 하나 초과와 경쟁 리간드가 나머지 비특이적 결합을 정의하기 위해 사용된다.

<1429>

실시예 44: 개구리(*Xenopus*) 난모세포에서 기능 검정

<1430>

본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 선형화된 플라스미드 주형으로부터의 캡핑된 RNA 전사물을 실험관 내에서 표준 공정에 따라 RNA 중합효소로 합성하였다. 실험관내에서, 전사물을 물중에 0.2mg/ml의 최종 농도로 현탁시켰다. 성숙한 암컷 두꺼비로부터 난소엽을 제거하고, 스테이지 V 데폴리클레이팅된(Stage V defolliculated) 난모세포를 수득하고, RNA 전사물 (10ng/난모세포)을 미세주입 장치를 이용하여 50nl 거환으로 주입하였다. 두개의 전극 전압 클램프를 사용하여 반응 융합 단백질 및 폴리펩티드 작용제 노출시 개개의 개구리 난모세포로부터 전류를 측정하였다. 실온에서 Ca²⁺ 유리 배르스 배지(Barth's medium)에서 기록하였다. 개구리계는 리간드를 활성화시키는데 있어서 공지된 리간드 및 조직/세포 추출물을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

<1431>

실시예 45: 마이크로피지오메트릭(Microphysiometric) 검정

<1432>

매우 다양한 2차 메신저 시스템의 활성화는 세포로부터의 소량의 산 분출을 초래한다. 형성된 산은 거의 세포 내 시그널링 과정에 에너지를 공급하는데 요구되는 증가된 대사 활성의 결과이다. 세포를 둘러싸는 배지에서 pH 변화는 매우 작으나, CYTOSENSOR 마이크로피지오미터에 의해 검출가능하다 (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.). 따라서, CYTOSENSOR는 에너지 사용 세포내 시그널링 경로에 결합되는 이차 메신저를 활성화시키는 본 발명의 알부민 융합 단백질의 능력을 검출할 수 있다.

<1433>

실시예 46: 추출물/세포 상청액 스크리닝

<1434>

많은 수의 포유동물 수용체가 존재하며, 이들 수용체에 대한 비 동종 활성화 리간드 (작용제)가 여전히 남아있다. 따라서, 이들 수용체에 대한 활성 리간드는 오늘날까지 확인된 리간드뱅크내에 포함되지 않을 수 있다. 따라서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 본 발명의 알부민 융합 단백질의 알부민 단백질 부분 및/또는 치료학적 단백질 부분에 대한 천연 리간드를 확인하기 위해 조직 추출물에 대해 작용적으로 스크리닝할 수 있다 (칼슘, cAMP, 마이크로피지오미터, 난모세포 전기생리 등, 작용 스트린 이용). 포지티브 작용 반응을 유도하는

추출물은 활성화 리간드를 분리하고 확인할 때까지 순차적으로 하부분류될 수 있다.

실시예 47: ATP-결합 검정

하기 검정은 본 발명의 융합 단백질의 ATP-결합 활성을 평가하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 알부민 융합 단백질의 ATP-결합 활성은 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 5,858,719에 기술된 ATP-결합 검정을 이용하여 검출될 수 있다. 간단하게는, 본 발명의 알부민 융합 단백질에 대한 ATP-결합을 경쟁 검정법으로 8-아지도-ATP로의 광친화성 라벨링을 통해 측정하였다. 1mg/ml의 ABC 이송 단백질을 함유하는 반응 혼합물을 다양한 농도의 ATP, 또는 가수분해불가능한 ATP 유사체 아데닐-5'-이미도디포스페이트와 함께 4℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 8-아지도-ATP (Sigma Chem. Corp., St. Louis, MO.)와 8-아지도-ATP (³²P-ATP)의 혼합물 (5mCi/μmol, ICN, Irvine CA)을 100 μM의 최종 농도로 첨가하고, 0.5ml의 분취액을 얼음위의 자기 (porcelain) 스폿 플레이트의 웰에 위치시켰다. 플레이트를 플레이트로부터 2.5cm 간격을 두고 단파장 254nm UV 램프로 1분 간격을 두고 두 번 조사하고, 조사 간격 사이에 1분 동안 냉각시켰다. 최종 농도 2mM가 되도록 디티오트레이톨을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 배양물을 SDS-PAGE 전기영동시키고, 건조시키고, 방사능 사진 촬영하였다. 본 발명의 알부민 융합 단백질에 상응하는 단백질 밴드가 여기되며, 방사능을 정량화시켰다. ATP 또는 아데닐-5'-이미도디포스페이트를 증가시키면서 방사능을 감소시키면 융합 단백질에 대한 ATP 친화도의 측정치를 제공한다.

실시예 48: 본 발명의 알부민 융합 단백질과 상호작용하는 시그널 변환 단백질의 동정

본 발명의 알부민 융합 단백질은 시그널 변환 경로 단백질 또는 수용체 단백질의 동정, 특징화 및 정제에 대한 연구 도구로서 제공될 수 있다. 간단하게는, 본 발명의 라벨링된 융합 단백질은 상호작용하는 분자를 정제하기 위한 시약으로서 유용하다. 친화성 정제의 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 크로마토그래피 칼럼에 공유적으로 결합시켰다. 추상의 표적 세포 예컨대, 암종 조직으로부터 유래된 세포-유리 추출물을 칼럼을 통과시켜, 적합한 친화력을 갖는 분자는 알부민 융합 단백질에 결합시켰다. 단백질 착물을 칼럼으로부터 회수하고, 분해하고, 회수된 분자를 N-말단 단백질 시퀀싱하였다. 본 아미노산 서열을 사용하여 캡처된 분자를 동정하거나, 적합한 cDNA 라이브러리로부터 관련 유전자를 클로닝하기 위한 변질된 올리고뉴클레오타이드 프로브를 고안하는데 사용된다.

실시예 49: IL-6 생검정

본 발명의 알부민 융합 단백질의 증식 효과를 시험하는 다양한 검정법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 이러한 검정에는 마르츠 등(Marz et al.)에 의해 기술된 IL-6 생검정 [Marz et al. (Prot. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 95:3251-56 (1998); 이는 본원에 참조로서 포함됨]이 있다. 37℃에서 68시간 후, 테트라졸륨 염 티아졸릴 블루 (MTT)를 첨가하고, 추가로 4시간 동안 37℃에서 인큐베이션시킴으로써 생존한 세포의 수를 측정하였다. B9 세포를 SDS로 용해시키고, 광학 밀도를 570nm에서 측정하였다. IL-6을 함유하는 대조군은 포지티브 대조군이며, 사이토카인을 함유하지 않는 대조군은 네가티브 대조군이다. 간단하게는, IL-6 의존성 B9 뮤린 세포를 IL-6 유리 배지로 3회 세척하고, 50μl로 웰당 5,000 세포 농도로 플레이팅시키고, 50μl의 본 발명의 융합 단백질을 첨가하고, 사용하였다. 네가티브 대조군과 관계있는 시험 샘플(들) (본 발명의 알부민 융합 단백질을 함유)에서 증진된 증식은 융합 단백질에 의해 매개된 증식 효과를 지시한다.

실시예 50: 닭 배아 뉴런 생존에 대한 지지.

교감 뉴런 세포의 생존능이 본 발명의 알부민 융합 단백질에 의해 지지되는 지를 시험하기 위해, 세날디 등의 닭 배아 뉴런 생존 검정을 사용할 수 있다(Prot. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 96:11458-63 (1998), 본원에 참조로서 포함됨). 간략하게, 운동 및 교감 뉴런을 닭 배아로부터 분리하고, L15 배지(10% FCS, 글루코오스, 소듐 셀레니트, 프로게스테론, 콘알부민, 푸트레신, 및 인슐린 함유; 라이프 테크놀로지스, 로크빌, MD) 및 둘베코의 변형된 이글스 배지(10% FCS, 글루타민, 페니실린, 및 25mM 헤페스 완충액(pH 7.2) 함유; 라이프 테크놀로지스, 로크빌, MD)에 각각 재현탁시키고, 사이토카인이 결핍된 네가티브 대조군뿐만 아니라 여러 농도의 본 발명의 정제된 융합 단백질의 존재하에 5% CO₂로 37℃에서 인큐베이션하였다. 3일 후에, 뉴런 생존능을 세포 형태의 평가 및 모스만(참조: Mosmann, T., J. Immunol. Methods, 65:55-63 (1983))의 비색 검정을 사용하여 측정하였다. 사이토카인이 결핍된 대조군에 비하여 증강된 뉴런 세포 생존능은 알부민 융합 단백질이 뉴런 세포의 생존능을 증강시키는 능력을 나타낸다.

실시예 51: 포스포타아제 활성의 검정.

- <1445> 하기 검정은 본 발명의 알부민 융합 단백질의 세린/트레오닌 포스파타아제(PTP아제) 활성을 평가하기 위하여 사용될 수 있다.
- <1446> 세린/트레오닌 포스파타아제(PTP아제) 활성을 검정하기 위하여, 당업자에 널리 공지된 검정법들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 세린/트레오닌 포스파타아제(PTP아제) 활성은 뉴 잉글랜드 바이오랩, 인크.사의 PSP아제 검정 키트를 사용하여 측정될 수 있고, PSP아제의 기질인 마이엘린 염기성 단백질(Myelin basic protein, MyBP)은 [³²P]ATP의 존재하에 cAMP-의존성 단백질 키나아제로 세린 및 트레오닌 잔기상에서 인산화된다. 단백질 세린/트레오닌 포스파타아제 활성은 그 후에 ³²P-라벨링된 MyBP로부터 무기 인산염의 방출을 측정함으로써 결정된다.
- <1447> 실시예 52: 세린/트레오닌 포스파타아제의 다른 단백질과의 상호작용
- <1448> 세린/트레오닌 포스파타아제 활성을 가지는 본 발명의 융합 단백질(즉, 실시예 51에서 결정된 것)은 예를 들어 추가의 상호작용 단백질 또는 수용체 단백질 또는 다른 시그널 변환 경로 단백질의 확인, 특성 규명 및 정제를 위한 연구 수단으로서 유용하다. 간단하게, 본 발명의 라벨링된 융합 단백질은 이와 상호작용하는 분자의 정제를 위한 시약으로서 유용하다. 친화성 정제의 한 구체예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 크로마토그래피 칼럼에 공유 결합하였다. 추정되는 표적 세포, 예를 들어 뉴런 또는 간 세포로부터 유래된 세포-비함유 추출물을 칼럼을 통과시키고 적절한 친화도를 가지는 분자를 융합 단백질에 결합시킨다. 융합 단백질-복합체를 칼럼으로부터 회수하고, 분리(dissociation)하고, 회수된 분자를 N-말단 단백질 시퀀싱하였다. 이러한 아미노산 서열을, 그 후에 포획된 분자를 확인하거나 적절한 cDNA 라이브러리로부터 적합한 유전자를 클로닝하기 위한 축퇴성 올리고뉴클레오티드 프로브를 설계하기 위하여 사용하였다.
- <1449> 실시예 53: 헤파라나제 활성의 검정
- <1450> 본 발명의 알부민 융합 단백질의 헤파라나제 활성을 검정하기 위하여 사용될 수 있는 많은 검정법이 공지되어 있다. 일례에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 헤파라나제 활성은 블로다브스키 등의 의한 문헌(Vlodavsky et al., Nat. Med., 5:793-802 (1999))에 기재된 바와 같이 검정된다. 간단하게, 세포 용해물, 컨디셔닝된 배지, 온전한 세포(35mm 디쉬 당 1 x 10⁶ 세포), 세포 배양 상청액, 또는 정제된 융합 단백질을 ³⁵S-라벨링된 ECM 또는 가용성 ECM 유래 펩크 I 프로테오글리칸과 함께, pH 6.2-6.6, 37℃에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 배지를 원심분리하고 상청액을 세파로오스 CL-6B 칼럼(0.9×30cm) 상에서 겔 여과로 분석하였다. 분획을 PBS로 용출하고 이들의 방사선활성을 측정하였다. 헤파란 설페이트 측쇄의 분해(degradation) 단편을 세파로오스 6B로부터 0.5 < Kav < 0.8(펩크 II)에서 용출하였다. 각 실험을 적어도 3회 수행하였다. 블로다브스키 등에 의해 기술된 "펩크 II"에 해당하는 분해 단편은 헤파린 설페이트를 절단하는데 있어 본 발명의 알부민 융합 단백질의 활성을 나타낸다.
- <1451> 실시예 54: 생분자의 고정화
- <1452> 본 실시예는, 상기 기술된 다양한 작용 검정에서 본 발명의 융합 단백질의 연구를 위해 개조될 수 있는 비숙주 세포 지질 이중층 구조물에서 본 발명의 알부민 융합 단백질의 안정화 방법을 제공한다(참조: e.g., Bieri et al., Nature Biotech 17:1105-1108 (1999), 전체 내용이 본원에 참조로서 포함됨). 간략하게, 바이오티닐화에 대한 탄수화물-특이적 화학은 본 발명의 알부민 융합 단백질에 바이오틴 태그를 제한하기 위해 사용되며, 이에 따라 고정화시에 일정한 정위(orientation)를 가능하게 한다. 세척된 막 중의 본 발명의 알부민 융합 단백질 용액 50mM을 실온에서 한 시간 동안 20 mM NaIO₄ 및 1.5 mg/ml (4mM) BACH 또는 2 mg/ml (7.5mM) 바이오틴-하이드라지드와 함께 인큐베이션하였다(반응 부피, 150μl). 다음에, 샘플을 먼저 5 시간 동안 4℃에서 투석하고(피어스 슬라이드알리저 카세트(Pierce Slidealizer Cassett), 10kDa 컷오프; 피어스 케미칼 코.(Pierce Chemical Co.,) 락포드 IL), 1 시간 마다 완충액을 교환하고, 최종적으로 500ml 완충액 R에 대해 12시간 동안 투석하였다(15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM 인산 나트륨, pH7). 큐벳에 첨가하기 바로 직전에, 시료를 완충액 ROG50 (50 mM 옥틸글루코시드가 보강된 완충액 R) 중에 1:5로 희석한다.
- <1453> 실시예 55: 메탈로프로테이나제 활성에 대한 검정
- <1454> 메탈로프로테이나제는 촉매 매카니즘으로써 Zn²⁺와 같은 금속 이온을 사용하는 펩티드 가수분해효소이다. 본 발명의 알부민 융합 단백질의 메탈로프로타아제 활성은 당업계에 공지된 방법에 따라 검정될 수 있다. 하기 예시되는 방법이 제공된다:

<1455> 알파-2-마크로글로불린의 단백질분해

<1456> 프로테아제 활성을 확인하기 위하여, 본 발명의 정제된 융합 단백질을 1X 검정 완충액(50 mM HEPES, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 25 pM ZnCl₂ 및 0.05% Brij-35) 중에서 기질 알파-2-마크로글로불린(0.2유닛/ml; 뵤링거 맨하임, 독일)과 혼합하고, 1 내지 5일 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 트립신을 포지티브 대조군으로서 사용하였다. 네가티브 대조군은 검정 완충액 중에 알파-2-마크로글로불린만을 함유한다. 시료를 수집하고 5분 동안 5% 2-머캅토에탄올을 함유하는 SDS-PAGE 시료 완충액 중에서 가열하고, 8% SDS-폴리아크릴아미이드 겔 상에 로딩하였다. 전기영동 후에, 단백질을 은 염색에 의해 가시화하였다. 단백질 분해는 네가티브 대조군과 비교하여 낮은 분자량 밴드의 출현으로 분명히 나타내었다.

<1457> 메탈로프로테이나제의 억제제에 의한 알파-2-마크로글로불린의 억제

<1458> 공지된 메탈로프로테이나제 억제제(금속 킬레이트(EDTA, EGTA, 및 HgCl₂), 펩티드 메탈로프로테이나제 억제제(TIMP-1 및 TIMP-2), 및 상업용 소분자 MMP 억제제)가 또한 본 발명의 알부민 융합 단백질의 단백질분해 활성의 특징규명을 위하여 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 세개의 합성 MMP 억제제는 MMP 억제제 I[MMP-1 및 MMP-8에 대한 IC₅₀ = 1.0 pM; MMP-9에 대한 IC₅₀ = 30 μM; MMP-3에 대한 IC₅₀ = 150 μM]; MMP-3 (스트로멜리신-1) 억제제 I [MMP-3에 대한 IC₅₀ = 5 μM], 및 MMP-3 억제제 II [MMP-3에 대한 K_i = 130 nM]; 칼바이오펜을 통해 입수가 가능한 억제제, 각각 카탈로그 번호 444250, 444218, 및 444225이다. 간략하게, 상이한 농도의 소분자 MMP 억제제를 22.9μl의 1×HEPES 완충액(50mM HEPES, pH 7.5, 0.2M NaCl, 10mM CaCl₂, 25 μM ZnCl₂, 및 0.05% Brij-35) 중에서 본 발명의 정제된 융합 단백질(50μg/ml)과 혼합하고, 2 시간 동안 실온(24℃)에서 인큐베이션하고, 그 후에 7.1μl의 기질 알파-2-마크로글로불린(0.2유닛/ml)을 첨가하고 20 시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 반응을 4×시료 완충액을 첨가하여 중단시키고 즉시 5분 동안 끓였다. SDS-PAGE 후에, 단백질 밴드를 은 염색에 의해 가시화하였다.

<1459> 합성 형광발생 펩티드 기질 절단 검정

<1460> 메탈로프로테이나제 활성이 증명된 본 발명의 융합 단백질에 대한 기질 특이성을 합성 형광발생 펩티드 기질(BACHEM 바이오사이언스 인크.사로부터 구입)을 사용하는 것과 같이 당업계에서 공지된 기술을 사용하여 결정하였다. 시험 기질은 M-1985, M-2225, M-2105, M-2110, 및 M-2255을 포함한다. 처음 네개는 MMP 기질이고 마지막 것은 중앙 피사 인자-α (TNF-α) 전환 효소(TACE)의 기질이다. 이들 기질은 바람직하게는 1:1 디메틸 설폭시드(DMSO) 및 물 중에서 제조되었다. 저장 용액(stock solution)은 50-500 μM이었다. 형광발생 검정을 향한 수속이 장착된 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) LS 50B 발광 스펙트로미터를 사용하여 수행하였다. 조사 λ는 328nm이고 발산 λ는 393nm였다. 간략하게, 검정을 176μl×HEPES 완충액(0.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35 및 50 mM HEPES, pH 7.5)을 4μl의 기질 용액(50 μM)으로 15분 동안 25℃에서 인큐베이션하고, 그 후에 20μl의 본 발명이 정제된 융합 단백질을 검정 큐벳에 첨가함에 의해 수행하였다. 기질의 최종 농도는 1 μM이었다. 초기 가수분해율을 30분 동안 모니터링하였다.

<1461> 실시예 56: NOD 마우스에서의 당뇨병 발생

<1462> 암컷 NOD(비-비만성 당뇨) 마우스는, 질병이 수컷 NOD 마우스에서보다 암컷 NOD 마우스에서 더 두드러짐에도 불구하고, 인간에서 발견되는 것과 유사한 과정으로 IDDM을 나타낸다는 것을 특징으로 한다. 이후에는 달리 지시하지 않는 한, 용어 "NOD 마우스"는 암컷 NOD 마우스를 언급한다. NOD 마우스는 만성 자가면역 질환에 의해 유발되는 베타 세포의 점진적인 파괴를 가진다. 따라서, NOD 마우스는 유글리세미아(euglycemia) 또는 정상 혈당 수준으로 삶을 시작한다. 그러나, 약 15 내지 16주령까지 NOD 마우스는 이들의 췌장 베타 세포의 대부분의 파괴와 대응하여 췌장이 충분한 인슐린을 생성할 수 없다는 것을 나타내는 고혈당증이 되기 시작한다. 따라서, 질병의 원인과 진행이 인간 IDDM 환자와 유사하다.

<1463> 면역화 방법의 효능에 대한 생체내 검정은 암컷 NOD/LtJ 마우스(바 하버, 메인에 위치한 잭슨 래버러토리사로부터 구입가능함)에서 평가될 수 있다. 문헌에서, 80%의 암컷 마우스는 24주령까지 당뇨병이 발병되고, 인슐린염이 6 내지 8주령 사이에 시작되었다고 보고되었다. NOD 마우스는 동종번식하며 다양한 면역조절 전략에 큰 반응성을 보인다. 성체 NOD 마우스(6 내지 8주령)은 20 내지 25g의 평균 질량을 가진다.

<1464> 이러한 마우스들을 처리되지 않거나(대조군), 본 발명의 치료제(즉, 본 발명의 알부민 융합 단백질 및 이들의 단편 및 변이체) 단독으로 또는 상기 기술된 다른 치료 화합물과 조합하여 치료할 수 있다. 당뇨병의 진행에

대한 이러한 다양한 치료 효과는 하기와 같이 측정할 수 있다:

- <1465> 14주령에서, 암컷 NOD 마우스는 내당능에 따른 표현형을 가질 수 있다. 내당능은 복강내 내당능 시험(IPGTT)으로 측정될 수 있다. 간략하게, 혈액을 글루코오스의 복강내 주사(1g/kg 체중량) 후 0분 및 60분에 안와주변 망(paraorbital plexus)으로부터 채취한다. 정상적인 내성은 0분에 144mg% 미만의 혈장 글루코오스 또는 60분에 160mg% 미만의 혈장 글루코오스로서 정의된다. 혈중 글루코오스 수준을 글루코미터 엘리트(Glucometer Elite) 장치로 결정한다.
- <1466> 이러한 표현형 분석에 기초하여, 동물을 상이한 실험 군에 할당할 수 있다. 특히, 보다 상승된 혈중 글루코오스 수준을 가지는 동물을 내당능 손상 군에 할당될 수 있다. 마우스에게 임의로 사료를 공급하고 산성수(pH 2.3)를 공급할 수 있다.
- <1467> 당 내성 및 불내성 마우스는 대조군, 본 발명의 알부민 용합 단백질 및 알부민 용합 단백질/치료 화합물 조합 그룹으로 추가로 나누어질 수 있다. 대조군에서 마우스에게 주당 6회로 매일 비히클을 주사할 수 있다. 알부민 용합 그룹의 마우스에는 주당 6회로 매일 비히클 중의 본 발명의 치료제(즉, 본 발명의 알부민 용합 단백질 및 이의 단편 및 변이체)를 주사할 수 있다. 알부민 용합 단백질/치료 화합물 조합 그룹의 마우스는 알부민 용합 단백질 및 상기 기술한 바와 같은 치료 화합물의 조합 둘 모두를 투여받았다.
- <1468> NOD 마우스의 뇨중 글루코오스의 수준은 랩스틱스(Labstix)(바이에르 디아그노스틱스, 햄프셔, 잉글랜드)를 사용하여 격주로 결정할 수 있다. 중량 및 용액 섭취 또한 격주 기준으로 결정될 수 있다. 당뇨병의 발생은 2회의 연속적인 측정시 당뇨 발생 후에 명백해진다. 10주 치료 후에, 추가의 IPGTT를 수행할 수 있고 동물은 그 다음날 살생될 수 있다.
- <1469> 10주 동안의 치료 동안, 당 내성 그룹 및 당 불내성 그룹 둘 모두의 대조 동물은 각각 60% 및 86%의 비율로 당뇨병을 발병하였다(미국 특허 제5,866,546호, 그로스 등). 이와 같이, 높은 비율의 당뇨병이 간섭이 없었다면 처음에 당 내성인 NOD 마우스에서조차 발생할 수 있다.
- <1470> 그 결과는 치료 전 및 후에 NOD 마우스에서 혈중 글루코오스 수준의 측정으로 확인될 수 있다. 혈중 글루코오스 수준은 기재된 모든 그룹의 당 내성 및 불내성 마우스 둘 모두에서 상기 기술된 바와 같이 측정된다.
- <1471> 대안적인 구체예에서, 본 발명의 치료제(즉, 서열 번호: Y로서 개지된 특이적 용합체, 및 이의 단편 및 변이체)는 스펙트로미터 분석을 사용하여 정량될 수 있고, 적절한 단백질 양이 용량 당 50 .mu.l. 인산염 완충 염수(PBS)로 주사 전에 현탁될 수 있다. 일주일 간격으로 2회의 주사가 각 마우스의 등 피부 아래의 경피로 투여될 수 있다. 모니터링을 면역화 전에 별도 2회에 수행할 수 있고, 치료 동안 및 그 후 계속 매주 수행할 수 있다. 소변을 매주 당에 대해 시험하고(Keto-Diastix.RTM.; Miles Inc., Kankakee, Ill.) 당뇨 마우스를 혈청 당에 대해 체크할 수 있다(ExacTech.RTM., MediSense, Inc., Waltham, Mass.). 공복시 혈당증이 2.5g/L 보다 큰 경우에 당뇨병이 진단된다.
- <1472> 실시예 57: NOD 마우스의 조직학적 검사
- <1473> NOD 마우스로부터의 조직 시료의 조직학적 검사는 본 발명의 조성물 및/또는 본 발명의 조성물과 다른 당뇨병 치료제의 조합물의 채장에서 베타 세포의 상대 농도를 증가시키는 능력을 증명할 수 있다.
- <1474> 실시예 56으로부터의 마우스를 치료 기간이 끝난 후에 살생시킬 수 있고 조직 시료를 채장으로부터 취할 수 있다. 시료를 0.9% 염수 중의 10% 포르말린 중에 고정하고 왁스에 함침시킬 수 있다. 5개의 연속된 5 .mu.m 절편 두 세트를 150 .mu.m 의 절단 간격으로 면역표지를 위해 절단할 수 있다. 절편을 인슐린(기니아 피그 항-인슐린 항혈청 희석율 1:1000, ICN 테임즈(Thames) U.K.) 및 글루카곤 (토끼 항-채장 글루카곤 항혈청 희석율 1:2000)에 대해 면역라벨링하고 페록시다아제 컨주게이션된 항기니아 피그(다코, 하이위컴, U.K.) 또는 페록시다아제 컨주게이션된 항-토끼 항혈청(희석율 1:50, 다코)로 검출하였다.
- <1475> 본 발명의 조성물은 당 내성 및 당 불내성 동물에서 당뇨병의 임상적 발현에 대한 것처럼 베타 세포의 가시적 질량에 대한 강한 효과를 가지거나 가지지 않을 수 있다.
- <1476> 실시예 58: NIDDM의 생체내 마우스 모델
- <1477> 잭슨 래버러토리사(바 하버, ME)로부터의 수컷 C57BL/6J 마우스는 3주령에 얻을 수 있고 통상적인 음식 또는 지방(35.5% wt/wt; Bioserv.Frenchtown, NJ) 또는 프룩토오스 (60% wt/wt; Harlan Teklad, Madison, WI) 중에 농축된 식이를 먹일 수 있다. 정규 음식은 4.5% wt/wt 지방, 23% wt/wt 단백질, 31.9% wt/wt 전분, 3.7% wt/wt

프록토오즈, 및 5.3% wt/wt 화이버로 구성된다. 고지방(라드(lard)) 식이는 35.5% wt/wt 지방, 20% wt/wt 단백질, 36.4% wt/wt 전분, 0.0% wt/wt 프록토오즈, 및 0.1% wt/wt 화이버로 구성된다. 고 프록토오즈 식이는 5% wt/wt 지방, 20% wt/wt 단백질, 0.0% wt/wt 전분, 60% wt/wt 프록토오즈, 및 9.4% wt/wt 화이버로 구성된다. 마우스를 12시간 광(오전 6시에서 오후 6시)/암 사이클로 22° +/-3℃ 온도 및 50% +/-20% 습도 조절실에서 케이지 당 5마리 이하로 수용할 수 있다(Luo et al., 1998, Metabolism 47(6): 663-8, "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus"; Larsen et al., Diabetes 50(11): 2530-9 (2001), "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats"). 3주 동안 각 식이에 대해 노출한 후에, 마우스에 100 mg/kg 체중량의 스트렙토조토신, "STZ"(시그마, 세인트루이스, MO) 또는 비히클(0.05 mol/L 시트르산, pH 4.5)으로 복강내 주사하고 다음 4주 동안 동일한 식이를 먹였다. 비공복 상태 하에서, 혈액을 꼬리의 말단을 잘라내어 STZ 후 1주, 2주, 및 4주에 수득한다. 시료를 사용하여 비공복시 혈장 글루코오스 및 인슐린 농도를 측정하는게 사용된다. 체중량 및 음식 섭취를 매주 기록한다.

<1478>

글루코오스 제거를 자극하는 인슐린의 능력에 대한 고지방 식이의 효과를 직접 결정하기 위하여, 실험을 상기 기술된 7주 기간이 끝나고 STZ로 주사된 지방-식이된 마우스, 비히클이 주사된 지방-식이된 마우스, 및 지방 식이된 마우스의 세 그룹에서 시작할 수 있다. 마우스를 실험하기 4 시간 전에 단식시켰다. 제 1 시리즈의 실험에서, 마우스를 메톡시플루란(피트맨-무어(Pitman-Moor), Mundelein, IL) 흡입으로 마취시킨다. 정식 인슐린(시그마)을 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 마우스에 주사할 수 있고([IV] 0.1 U/kg 체중량), 혈액을 상이한 꼬리 정맥으로부터 주사 후 3분, 6분, 9분, 12분, 및 15분에 수집할 수 있다. 혈장 글루코오스 농도를 이러한 시료에 대해 결정할 수 있고, 혈장으로부터 글루코오스 소실의 반감기(t1/2)가 윈논린(WinNonlin)(사이언티픽 컨설팅, Apex, NC), 약동학/약력학 소프트웨어 프로그램을 사용하여 계산할 수 있다.

<1479>

제 2 시리즈의 실험에서, 마우스를 복강내 소듐 펜토바비탈(시그마)로 마취할 수 있다. 복강을 열고, 주요 복강 정맥을 노출시키고 24-게이지 IV 카테터(존슨-존슨 메디칼, 알링턴, TX)를 꽂는다. 카테터를 복강내 정맥에 인접한 근 조직에 고정하고 시린지 연결부의 바닥에서 절단하고, 미리 충전된 PE50 플라스틱 튜브에 흑으로 채우고, 이 튜브는 다시 주입 용액을 가진 시린지에 연결된다. 복강은 다음에 봉합 폐쇄된다. 이러한 방법으로, 몸체의 낮은 부분으로부터 혈액의 역류의 차단물이 없을 것이다 마우스를 10μl/min의 주입 부피로 글루코오스(24.1mg/kg/min) 및 인슐린(10mU/kg/min)를 연속적으로 주입할 수 있다. 안와후방의 혈액 시료(각각 70μl)를 혈장 글루코오스 및 인슐린 농도의 측정을 위해 주입 시작 후 90분, 105분, 120분 및 135분에 취할 수 있다. 이러한 4개의 시료의 평균을 각 동물에 대한 정류 상태(steady-state) 혈장 글루코오스(SSPG) 및 인슐린(SSPI) 농도를 산출하기 위해 사용한다.

<1480>

최종적으로, 단독의, 또는 진성 당뇨병의 치료를 위해 나열된 치료제 중 하나 이상과 조합된 본 출원의 치료적 조성물, 알부민 용합 단백질의 혈장 글루코오스를 감소시킬 수 있는 능력을 평가하기 위한 실험을 STZ-주입된 "NIDDM" 마우스 모델의 하기 두 그룹에서 수행할 수 있다: (1) 지방-식이된 C57BL/6J, 및 (2) 프록토오즈-식이된 C57BL/6J. 이러한 연구를 위하여 마우스의 혈장 글루코오스 농도는 255 내지 555 mg/dL의 범위일 수 있다. 마우스를 비히클, 본 발명의 알부민 용합 치료제 단독 또는 진성 당뇨병의 치료를 위해 나열된 치료제 중 하나 이상과 조합된 본 발명의 알부민 용합 치료제를 이용한 치료에 무작위로 할당한다. 총 3회 용량이 투여될 수 있다. 꼬리 정맥 혈액 시료는 제 1 투여 전 및 최종 투여 후 3시간째의 혈장 글루코오스 농도의 측정을 위해 채취할 수 있다.

<1481>

혈장 글루코오스 농도는 시그마사의 글루코오스 다이어그노시틱 키트(Sigma No. 315), 효소 발색 검정을 이용하여 결정할 수 있다. 혈장 인슐린 수준은 린코 리서치(#RI-13K; 세인트 찰스, MO)사의 래트 인슐린 RIA 키트를 사용하여 결정할 수 있다.

<1482>

실시예 59: 인슐린 작용에의 관련성을 확립하는 시험관내 H4Ile-SEAP 리포터 검정

<1483>

다양한 H4Ile 리포터

<1484>

H4Ile/rMEP-SEAP: 래트로부터 분리된 말산 효소 프로모터(rMEP)는 인슐린 경로에 있는 PPAR-감마 요소를 함유한다. 이 리포터 구성물은 안정되게 간 H4Ile 세포주로 트랜스펙션된다.

<1485>

H4Ile/SREBP-SEAP: 스테롤 조절성 요소 결합 단백질((SREBP-1c)은 많은 인슐린-반응성 유전자, 예를 들어 지방산 합성효소(FAS)에 작용하며 섬유아세포, 지방세포, 및 간세포에서 지방산 대사에서 키 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다. 지방세포 결정 및 분화 인자 1(ADD-1)로도 알려진 SREBP-1c은 지방 세포에서 유전자 발현

에 대한 인슐린 효과의 1차 매개체로서 간주된다. 이의 활성은 인슐린, 스테롤, 및 글루코오스의 수준에 의해 조절된다. 이 리포터 구조물은 안정되게 H4IIe 세포주로 트랜스펙션된다.

<1486> *H4IIe/FAS-SEAP*: 지방산 합성효소 리포터 구성물은 최소의 SREBP-반응성 FAS 프로모터를 함유한다. 이 리포터 구조물은 안정되게 간 H4IIe 세포주로 트랜스펙션된다.

<1487> *H4IIe/PEPCK-SEAP*: 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제(PEPCK) 프로모터는 PEPCK 유전자 전사 조절 PEPCK 활성의 호르몬 조절의 제 1 위치이다. PEPCK는 간 글루코오스신생합성(gluconeogenesis)에서 개입 및 속도-제한 단계를 촉매하고 따라서 혈당 수준을 정상 범위 내로 유지하기 위하여 조심스럽게 조절되어야 한다. 이 리포터 구성물은 안정되게 간 H4IIe 세포주로 트랜스펙션된다.

<1488> 이러한 리포터 구성물은 또한 3T3-L1 섬유아세포 및 L6 근아세포로 안정되게 트랜스펙션될 수 있다. 이러한 안정한 세포주는 다음에 앞서 실시예 13에서 기술된 바와 같은 3T3-L1 지방세포 및 L6 근관(myotube)으로 분화된다. 분화된 세포주는 다음에 하기 기술되는 SEAP 검정에서 사용될 수 있다.

<1489> 증식 및 검정 배지

<1490> 증식 배지는 10% 우태아 혈청(FBS), 10% 송아지 혈청, 1% NEAA, 1×페니실린/스트렙토마이신 및 0.75mg/ml G418(H4IIe/rFAS-SEAP 및 H4IIe/SREBP-SEAP의 경우) 또는 0.50 mg/ml G418 (H4IIe/rMEP-SEAP의 경우)을 포함한다. H4IIe/PEPCK-SEAP의 경우에, 증식 배지는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 15mM HEPES 완충 염수, 및 0.50 mg/ml G418로 구성된다.

<1491> 검정 배지는 H4IIe/rFAS-SEAP, H4IIe/SREBP-SEAP, H4IIe/rMEP-SEAP 리포터의 경우에 저함량 글루코오스 DMEM 배지(라이프 테크놀로지), 1% NEAA, 1×페니실린/스트렙토마이신으로 구성된다. H4IIe/PEPCK-SEAP 리포터에 대한 검정 배지는 0.1% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 및 15mM HEPES 완충 염수로 구성된다.

<1492> 방법

<1493> 96-웰 플레이트에 대수 성장 단계의 세포가 부착될 때까지 10 μ l/웰의 증식 배지에서 75,000 세포/웰로 시딩한다. 증식 배지를 검정 배지(200 μ l/웰)로 교환하여 세포를 48시간 동안 기아상태로 한다. (H4IIe/PEPCK-SEAP 세포의 경우, 0.5 μ M 텍사메타손을 함유하는 검정 배지를 100 μ l/웰로 첨가하고 약 20 시간 동안 인큐베이션한다). 검정 배지를 그 후에 신선한 검정 배지 100 μ l/웰로 교환하고, 본 발명의 치료제(즉, 본 발명의 알부민 용합 단백질 및 이들의 단편 및 변이체)를 발현하는 트랜스펙션된 세포주로부터 수득된 세포 상청액의 50 μ l 분취량을 웰에 첨가한다. 빈(empty) 벡터가 트랜스펙션된 세포주로부터의 상청액을 네가티브 대조군으로 사용한다. 웰에 10nM 및/또는 100nM가 첨가된 것을 포지티브 대조군으로 사용한다. 48시간 인큐베이션 후에, 컨디셔닝된 배지를 회수하고 SEAP 활성을 측정한다(포스파-라이트(Phospha-Light) 시스템 프로토콜, 트로픽스 #BP2500). 간략하게, 시료를 희석 완충액 중에 1:4로 희석하고 30분 동안 65°C에서 인큐베이션하여 SEAP의 내인성 비태반성 형태를 불활성화한다. 희석된 시료의 50 μ l 분취량을 비태반성 SEAP 동질효소(isoenzyme)에 대하여 활성인 억제제의 혼합물을 함유하는 50 μ l의 SEAP 검정 완충액과 혼합하고 추가 5분 동안 인큐베이션한다. 에머랄드 발광 증강제 중에 1:20으로 희석된 CSPD 화학발광 기질의 50 μ l 분취량을 혼합물에 첨가하고 15 내지 20분 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 다이넥스(Dynex) 플레이트 발광분석기에서 판독한다.

<1494> 실시예 60: 형질전환 동물

<1495> 본 발명의 알부민 용합 단백질은 또한 형질전환 동물에서 발현될 수 있다. 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 기니아 피그, 돼지, 마이크로-피그, 염소, 양, 젓소, 및 비인간 영장류, 즉, 개코원숭이, 원숭이 및 침팬지를 비제한적으로 포함하는 임의의 종의 동물이 형질전환 동물을 생성하는데 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본원에 기술된 기술 또는 당업계에 공지된 기술은 유전자 치료 프로토콜의 일부로서 인간에서 본 발명의 용합 단백질을 발현하는데 사용된다.

<1496> 당업계에 공지된 임의의 기술이 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 동물에 도입하여 형질전환 동물의 설립 주(founder line)를 생성한다. 이러한 기술은 전핵 미세주입(pronuclear microinjection)(Paterson et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-698 (1994); Carver et al., Biotechnology (NY) 11:1263-1270 (1993); Wright et al., Biotechnology (NY) 9:830-834 (1991); 및 Hoppe et al., 미국 특허 번호 제 4,873,191호 (1989)); 생식세포주, 배반포 또는 배아 세포주로의 레트로바이러스 매개 유전자 이전(Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152 (1985)); 배아 줄기 세포에서의 유전자 표적화(Thompson et al., Cell 56:313-321 (1989)); 세포 또는 배아의 일렉트로포레이션(Lo,

1983, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814 (1983)); 유전자 총을 사용하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 도입(참조: e.g., Ulmer et al., Science 259:1745 (1993)); 배아 조혈모세포로 핵산 구조물을 도입하고 이 세포를 다시 배반포로 전이시키는 방법; 및 정자-매개 유전자 전이법 (Lavitrano et al., Cell 57:717-723 (1989) 등을 비제한적으로 포함한다(이는 전체 내용이 본원에 참조로서 포함됨). 이러한 기술의 검토를 위해, 문헌[Gordon, "Transgenic Animals," Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989)]을 참조할 것이고, 이는 전체가 본원에 참조로서 포함된다.

<1497>

당업계에 공지된 임의의 기술은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 형질 전환 클론을 생성하는데 사용될 수 있고, 예를 들어 휴면 상태(quietness)로 유도된 배양된 배아, 태아 또는 성체 세포로부터 핵의 핵이 제거된 난모세포로의 핵 전이가 있다(Campell et al., Nature 380:64-66 (1996); Wilmut et al., Nature 385:810-813 (1997)).

<1498>

본 발명은 모든 세포에 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 가지는 형질전환 동물 뿐만 아니라 모든 또는 일부 세포에 이러한 폴리뉴클레오티드를 가진 동물, 즉 모자이크 동물 또는 키메라를 제공한다. 형질전환유전자(transgene)은 또한 하기, 예를 들어 라스코 등의 교시내용((Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236 (1992))에 의해 특정 세포 타입으로 선택적으로 도입되고 활성화될 수 있다. 이러한 세포 타입 특이적 활성화를 위해 필요한 조절 서열은 관심대상의 특정 세포 타입에 따라 다를 것이고, 당업자에게 명확할 것이다. 본 발명의 융합 단백질이 본 발명의 융합 단백질의 치료 단백질 부분 또는 알부민 부분에 대응하는 내인성 유전자의 염색체 영역으로 인테그레이션되는 것이 바람직한 경우에, 유전자 표적화가 바람직하다. 간략하게, 이러한 기술이 활용되는 경우에, 내인성 유전자에 상동적인 일부 뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터는 염색체 서열과의 상동성 재조합을 통해 인테그레이션되어 내인성 유전자의 뉴클레오티드 서열의 기능을 파괴할 목적으로 설계된다. 형질전환유전자는 또한 특정 세포 타입에 선택적을 도입되어, 내인성 유전자가 하기, 예를 들어 구 등의 교시 내용(Gu et al., Science 265:103-106 (1994))에 의해 그 세포 타입에서만 내인성 유전자를 불활성화시킬 수 있다. 이러한 세포 타입에 특이적인 불활성화에 필요한 조절 서열은 관심대상인 특정 세포 타입에 따라 다를 것이고, 당업자에게 명확할 것이다.

<1499>

일단 형질전환 동물이 생성되는 경우에, 재조합 유전자의 발현을 표준 기술을 사용하여 검정할 수 있다. 초기 스크리닝은 서던 블랏 분석 또는 PCR 기술에 의해 수행되어 동물 조직을 분석하고 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 인테그레이션이 일어났음을 증명할 수 있다. 형질전환 동물의 조직에서 본 발명의 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 mRNA 발현 수준은 또한 동물로부터 수득된 조직 시료의 노던 블랏 분석, 인 시튜 하이브리드화 분석, 및 역전사효소-PCR(rf-PCR)를 비제한적으로 포함하는 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 융합 단백질-발현 조직의 시료는 또한 융합 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 면역세포화학적으로 또는 면역조직화학적으로 평가될 수 있다.

<1500>

일단 수립 동물이 생성되면, 이들은 특정 동물의 콜로니를 생성하기 위하여 교배, 동종교배, 이종교배 또는 잡종교배될 수 있다. 이러한 교배 전략의 예로는 별도의 주(line)를 확립하기 위하여 하나 이상의 인테그레이션 위치를 가지는 수립 동물의 이종교배; 각 형질전환유전자의 추가 발현의 효과 때문에 보다 높은 수준으로 형질전환유전자를 발현하는 화합물 형질전환체를 생성하기 위한 별도의 주의 동종교배; DNA 분석에 의해 동물의 스크리닝을 위한 필요를 제거하고 발현을 감소시키기 위하여, 소정의 인테그레이션 위치에 대한 동질접합체 동물을 생성하는 이종접합체 형질전환동물의 교배; 및 관심대상 실험 모델에 적합한 뚜렷한 배경상에 형질전환유전자(즉, 본 발명의 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드)를 위치시키기 위한 교배를 비제한적으로 포함한다. 본 발명의 형질전환동물은 본 발명의 융합 단백질 및 치료 단백질 및/또는 본 발명의 융합 단백질의 알부민 성분의 생물학적 기능을 연구하고, 비정상 발현과 관련된 질환 및/또는 질병을 연구하고, 이러한 질환 및/또는 질병을 개선하는데 효과적인 화합물을 스크리닝하는데 유용한 동물 모델 시스템을 비제한적으로 포함하는 용도를 가진다.

<1501>

실시예 61: 유전자 치료법을 사용하는 치료 방법-생체의

<1502>

유전자 치료법의 한 방법은 본 발명의 알부민 융합 단백질을 발현하는 섬유아세포를 환자에 이식한다. 일반적으로, 섬유아세포는 피부 생검에 의해 피검체로부터 수득된다. 얻어진 조직은 조직-배양 배지에 놓여지고 작은 조각으로 분리된다. 작은 덩어리의 조직은 조직 배양 플라스크의 젖은 표면에 놓여지고, 대략 10개 조각이 각 플라스크에 놓여진다. 플라스크를 거꾸로 놓고, 꼭 닫고, 밤새 실온에 둔다. 실온에서 24시간 후에, 플라스크를 거꾸로 하고 조직 덩어리는 플라스크 바닥에 고정된 채로 있고 신선한 배지(10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신 함유 햄(Ham)의 F12 배지)를 첨가한다. 다음에, 플라스크를 약 1 주일 동안 37℃로 인큐베이션한다.

- <1503> 이번에는, 신선한 배지를 첨가하고 후속하여 수일마다 변경한다. 배양액에서 추가 2주 후에, 단일층의 섬유아 세포가 나타난다. 단일층은 트립신처리되고 보다 큰 플라스크로 규모가 조정된다.
- <1504> 몰로니(Moloney) 설치류 사르코마 바이러스의 긴 말단 반복부에 의해 플랭킹(flanking)된 pMV-7(Kirschmeier, P.T. et al., DNA, 7:219-25 (1988))를 EcoRI 및 HindIII로 소화하고 후속하여 송아지 장내 포스포타아제로 처리한다. 선형 백터를 아가로스 겔 상에 분별시키고 유리 비드를 사용하여 정제한다.
- <1505> 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 필요하다면 5' 및 3' 말단 서열에 대응하고 임의로 적절한 제한 위치 및 개시/정지 코돈을 가지는 PCR 프라이머를 사용하여 증폭된 당업계에 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 한 구체예에서, 5' 프라이머는 EcoRI 위치를 함유하고, 3' 프라이머는 HindIII 위치를 포함한다. 동일한 양의 콜로니 설치류 사르코마 바이러스 선형 백본(backbone) 및 증폭된 EcoRI 및 HindIII 단편을 T4 DNA 리가아제의 존재하에 함께 첨가한다. 생성된 혼합물을 두개의 단편의 라이게이션을 위해 적절한 조건하에서 유지한다. 다음에, 라이게이션(ligation) 혼합물을 박테리아 HB101를 형질전환하는데 사용되고, 그 후에 백터가 적절하게 삽입된 대상 유전자를 가지는 지를 확인하기 위하여 카나마이신을 함유하는 아가 상에 플레이트팅한다.
- <1506> 양친화성 pA317 또는 GP+am12 팩킹 세포를 조직 배양물 중에 증식시켜 10% 송아지 혈청(CS), 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유한 두벨코의 개질된 이글스 배지(DEME)에서 밀도가 컨플루언스(confluence)를 이루도록 한다. 유전자를 함유하는 MSV 백터는 다음에 배지에 첨가되고 팩킹 세포는 백터로 형질도입된다. 팩킹 세포는 이제 유전자를 함유하는 감염성 바이러스 입자를 생성한다(팩킹 세포는 이제 생성자 세포라 칭한다).
- <1507> 새로운 배지를 형질도입된 생성자 세포에 첨가하고, 후속하여 배지를 컨플루언스를 형성한 생성자 세포의 10cm 플레이트로부터 수집한다. 감염성 바이러스 입자를 함유한 사용된 배지를 밀리포어 필터를 통해 여과하여 떼어낸 생성자 세포를 제거하고 이 배지를 다음에 섬유아세포를 감염시키기 위해 사용한다. 배지를 섬유아세포의 서브-컨플루언스를 형성한 플레이트로부터 제거하고 신속히 생성자 세포로부터의 배지와 교환한다. 이 배지는 제거되고 새로운 배지로 교체된다. 바이러스 역가가 높은 경우에, 실질적으로 모든 섬유아세포는 감염될 것이고 선별이 필요하지 않다. 역가가 낮은 경우에, neo 또는 his와 같은 선별 마커를 가진 레트로바이러스 백터를 사용할 필요가 있다. 섬유아세포가 효율적으로 감염되면, 섬유아세포를 분석하여 알부민 용합 단백질이 생성되는지를 결정한다.
- <1508> 다음에 조작된 섬유아세포를 단독으로 또는 사이토텍스 3 마이크로케리어 비드상에서 컨플루언스를 이루도록 증식시킨 후에 숙주에 이식한다.
- <1509> 실시예 62: 유전자 치료법을 사용하는 치료 방법-생체내
- <1510> 본 발명의 또 다른 측면은 장애, 질병, 및 질환을 치료하기 위하여 생체내 유전자 치료 방법을 사용하는 것이다. 유전자 치료 방법은 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 네이키드(naked) 핵산(DNA, RNA, 및 안티센스 DNA 또는 RNA) 서열의 도입에 관한 것이다. 본 발명의 알부민 용합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 표적 조직에 의한 폴리펩티드 발현을 위하여 필요한 프로모터 또는 임의의 다른 유전 요소에 작동적으로 연결될 수 있다(즉, 결합될 수 있다). 이러한 유전자 치료 및 전달 기술 및 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[W090/11092, W098/11779; 미국 특허 번호 제 5693622호, 제 5705151호, 제 5580859호; Tabata et al., Cardiovasc. Res. 35(3):470-479 (1997); Chao et al., Pharmacol. Res. 35(6):517-522 (1997); Wolff, Neuromuscul. Disord. 7(5):314-318 (1997); Schwartz et al., Gene Ther. 3(5):405-411 (1996); Tsurumi et al., Circulation 94(12):3281-3290 (1996)](본원에 참조로서 포함됨)을 참조할 수 있다.
- <1511> 폴리뉴클레오티드 구조물은 조직(심장, 근육, 피부, 폐, 간, 장 등)의 세포간 공간으로의 주사와 같은 동물의 세포에 주사가능한 물질을 전달하는 임의의 방법에 의해 전달될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 구조물을 약제학적으로 허용되는 액체 또는 수성 담체로 전달될 수 있다.
- <1512> 용어 "네이키드(naked)" 폴리뉴클레오티드, DNA 또는 RNA는 바이러스 서열, 바이러스 입자, 리포솜 제형, 리포펙틴 또는 침전제 등을 포함하여 세포로 들어가는 것을 돕거나, 증강시키거나 용이하게 하는데 작용하는 임의의 전달 비히클로부터 자유로운 서열을 의미한다. 그러나, 본 발명의 알부민 용합 단백질의 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 리포솜 제형(예를 들어 문헌[Feigner P.L. et al. (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772:126-139 and Abdallah B. et al. (1995) Biol. Cell 85(1):1-7]에 교시된 바와 같은 것들)으로 전달되고 상기 리포솜 제형은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

- <1513> 유전자 치료 방법에 사용되는 폴리뉴클레오티드 벡터 구조물은 바람직하게는 숙주 계통에 인테그레이션되지 않고 복제를 허용하는 서열을 함유하지 않는 구조물이다. 당업계에 공지된 임의의 강한 프로모터는 DNA의 발현을 추진시키기 위하여 사용될 수 있다. 다른 유전자 치료 방법과 달리, 표적 세포에 네이키드 핵산 서열을 도입하는 하나의 주요한 이점은 세포에서 폴리뉴클레오티드 합성의 일시적인 특성이다. 연구에 따르면 비복제 DNA 서열은 세포에 도입되어 6개월 이하의 기간동안 요망되는 폴리펩티드의 생성을 제공할 수 있다.
- <1514> 폴리뉴클레오티드 구조물은 근육, 피부, 뇌, 폐, 간, 비장, 골수, 흉선, 심장, 림프, 혈액, 뼈, 연골, 췌장, 신장, 쓸개, 위, 장, 고환, 난소, 자궁, 직장, 신경계, 눈, 분비기관(gland), 및 연결 조직을 포함하는 동물 내의 조직의 세포간 공간으로 전달될 수 있다. 조직의 세포간 공간은 세포간 액체, 기간 조직의 망상 섬유 중의 뮤코다당류, 혈관 또는 소실 벽의 탄성 섬유, 섬유 조직의 콜라겐 섬유, 또는 연결조직 인쉬팅(ensheathing) 근육 세포 내 또는 뼈의 소와 중의 그러한 동일한 매트릭스를 포함한다. 근육 조직의 세포간 공간으로의 전달은 하기 논의되는 이유로 바람직하다. 이들은 이러한 세포를 포함하는 조직으로 주사에 의해 편리하게 전달될 수 있다. 이들은 바람직하게는, 전달 및 발현이 비분화되거나 완전히 분화되지 않은 세포, 예를 들어 혈액 또는 피부 섬유아세포의 줄기 세포에서 달성될 수 있을지라도, 분화되는 지속적이고 분열되지 않는 세포로 전달되고 발현된다. 생체내 근육 세포는 특히 폴리뉴클레오티드를 흡수하고 발현하는 능력을 가진다.
- <1515> 네이키드 폴리뉴클레오티드 주사를 위하여, DNA 또는 RNA의 효과적인 투여량은 약 0.05g/kg 체중량 내지 약 50mg/kg 체중량의 범위내일 것이다. 바람직하게는, 용량을 약 0.005mg/kg 내지 약 20mg/kg 일 것이고, 보다 바람직하게는 약 0.05mg/kg 내지 약 5mg/kg일 것이다. 물론, 당업자로서 유용한 용량이 조직 주사 위치에 따라 다양할 수 있을 것이라는 것을 인정할 것이다. 적절하고 효과적인 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 치료되는 질환 및 투여 경로에 따라 다를 수 있다. 바람직한 투여 경로는 조직의 세포간 공간으로 주사의 비경구 투여에 의한다. 그러나, 다른 비경구 경로는 또한 예를 들어 특히 폐 또는 기관지 조직, 목, 또는 코의 점막으로의 전달을 위한 에어로졸 제형의 흡입이 사용될 수 있다. 또한, 네이키드 폴리뉴클레오티드 구성물이 방법에 사용된 카테터에 의해 혈관형성술 동안 동맥에 전달될 수 있다.
- <1516> 생체내 근육에서 주사된 폴리뉴클레오티드의 용량 반응 효과는 다음과 같이 결정된다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 생성을 위한 적절한 주형 DNA는 표준 재조합 DNA 방법에 따라 제조된다. 환형이거나 선형일 수 있는 주형 DNA는 네이키드 DNA로서 또는 리포솜과 복합체를 이루어 사용된다. 다음에, 사두근(quadriceps muscle)에 다양한 양의 주형 DNA를 주사한다.
- <1517> 5 내지 6주령의 수컷 및 암컷 Balb/C 마우스를 0.3ml의 2.5% 애버틴(Avertin)으로 복강내 주사하여 마취한다. 전방 넓적 다리상에 1.5cm 절개하여 사두근이 직접 보이도록 한다. 주형 DNA를, 근육의 원위 삽입 영역으로부터 무릎으로 약 0.5cm 및 약 0.2cm 깊이로, 1분에 걸쳐 27 게이지 바늘을 통해 1cc 시린지로 0.1ml 담체중에서 주사한다. 이후 위치 측정을 위해 봉합실을 주사 부위에 놓고, 피부를 스테인리스 스틸 클립으로 닫는다.
- <1518> 적절한 인큐베이션 시간(예를 들어 7일) 후에, 근육 추출물을 전체 사두근을 절개함에 의해 제조한다. 개개 사두근의 15um 다섯번째 절단면 마다 단백질 발현을 위해 조직화학적으로 염색한다. 융합 단백질 발현을 위한 시간 과정을 상이한 마우스로부터 사두근이 상이한 시간에 수집되는 것을 제외하고 유사한 방법으로 수행한다. 주사 후 근육 내에 DNA의 지속을 주사된 마우스 및 대조 마우스로부터의 총 세포성 DNA 및 HIRT 상청액을 제조한 후에 서던 블랏 분석에 의해 결정할 수 있다. 마우스에서 상기 실험의 결과는 네이키드 DNA를 사용하여 인간 및 다른 동물에서 적절한 용량 및 다른 치료 파라미터를 추정하는데 사용할 수 있다.
- <1519> 실시예 63: 본 발명의 융합 단백질의 생물학적 효과
- <1520> 성상세포 및 신경세포 검정
- <1521> 본 발명의 알부민 융합 단백질을 생존능, 신경돌기 성장, 또는 피질 신경 세포의 표현형 분화를 증진시키기 위한 활성 및 신경아교원섬유산성단백질 면역양성 세포, 성상세포의 증식 유도에 대해 시험할 수 있다. 생검을 위한 피질 세포의 선택은 피질 구조의 FGF-1 및 FGF-2의 우세한 발현 및 이미 보고된 FGF-2 치료로부터 기인한 피질 신경 생존의 증강에 기초한다. 티미딘 혼입 검정은 이러한 세포상에 본 발명의 활성의 알부민 융합 단백질을 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- <1522> 더욱이, 시험관에서 피질 또는 해마 뉴런에 대한 FGF-2(염기성 FGF)의 생물학적 효과를 기술하는 종래 보고서는 뉴런 생존 및 신경돌기 성장 둘 모두를 증가시킨다는 것을 증명한다(Walick et al., "Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3012-3016. (1986), 본원에 전체 내용이 참조로서 포함됨). 그러나, PC-12 세포에

대해 행해진 실험 보고서는 이러한 두 반응이 반드시 같은 의미를 가지지 않고 FGF가 시험된 것뿐만 아니라 어느 수용체가 표적 세포에 발현되는지에 따라 다르다는 것을 제안한다. 1차 피질 신경세포 배양 파라다임을 사용하여, 본 발명의 알부민 융합 단백질의 신경돌기 성장을 유도하는 능력은 예를 들어 티미딘 혼입 검정을 사용하여 FGF-2로 달성된 반응과 비교될 수 있다.

1523> 섬유아세포 및 내피세포 검정

1524> 인간 폐 섬유아세포는 클로네틱스(Clonetics)(샌디에고, CA)로부터 취득되고 클로네틱스의 증식 배지중에 유지된다. 진피 미세혈관 내피 세포는 셀 어플리케이션(Cell Application)(샌디에고, CA)로부터 취득된다. 증식 검정을 위해서, 인간 폐 섬유아세포 및 진피 미세혈관 내피 세포가 증식 배지에서 1일 동안 96-웰 플레이트 중에 5,000 세포/웰로 배양될 수 있다. 다음에 세포를 0.1% BSA 기초 배지에서 1일 동안 인큐베이션한다. 배지를 신선한 0.1% BSA 배지로 교환한 후에, 세포를 3일 동안 본 발명의 시험 융합 단백질과 인큐베이션한다. 알라마 블루(Alamar Blue)(알라마 바이오사이언스, 새크라멘토, CA)를 10%의 최종 농도로 각 웰에 첨가한다. 세포를 4 시간 동안 인큐베이션한다. 세포 생존능을 CytoFluor 형광 판독기로 판독하여 측정한다. PGE₂ 검정의 경우에, 인간 폐 섬유아세포는 1일 동안 96-웰 플레이트 중에서 5,000 세포/웰로 배양한다. 배지를 0.1% BSA 기초 배지로 교환한 후에, 세포를 24 시간 동안 IL-1 α 와 함께 또는 이것 없이 본 발명의 융합 단백질 또는 FGF-2와 인큐베이션한다. 상청액을 수집하고 EIA 키트(케이맨(Cayman), 앤 하버, MI)에 의해 PGE₂에 대해 검정한다. IL-6 검정의 경우에, 인간 폐 섬유아세포는 1일 동안 96-웰 플레이트 중에서 5,000세포/웰로 배양한다. 배지를 0.1% BSA 기초 배지로 교환한 후에, 세포를 FGF-2와 함께, 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질 및/또는 IL-1 α 와 함께 또는 이들 없이 24 시간 동안 인큐베이션한다. 상청액을 수집하고 ELISA 키트에 의해 IL-6(엔도젠(Endogen), 캠브리지, MA)에 대해 검정한다.

1525> 인간 폐 섬유아세포를 섬유아세포의 증식에 대한 효과를 평가하기 위하여 알라마 블루를 첨가하기 전에 기초 배지에서 3일 동안 FGF-2 또는 본 발명의 알부민 융합 단백질과 배양한다. FGF-2는 본 발명의 융합 단백질과 자극을 비교하기 위해 사용될 수 있는 10-2500ng/ml의 자극을 보여야 한다.

1526> [3H]티미딘 혼입에 기초한 세포 증식

1527> 하기 [3H]티미딘 혼입 검정은 치료제 단백질, 예를 들어 성장 인자 단백질의 섬유아세포, 상피 세포 또는 미성숙 근육 세포와 같은 세포의 증식에 대한 효과를 측정하기 위하여 사용될 수 있다.

1528> 서브-컨플루언스를 이룬 배양물을 무혈청 배지에서 18시간 동안 배양함에 의해 G1 상에 정지시킨다. 다음에 치료제 단백질은 24시간 동안 첨가하고, 마지막 4시간 동안 배양물을 0.33 μ M의 최종 농도로 [3H]티미딘(25Ci/mmol, 앰머샴, 알링턴 하이즈, IL)으로 표지한다. 혼입된 [3H]티미딘을 24 시간 동안 빙냉된 10% 트리클로로아세트산으로 침전시킨다. 후속하여, 세포를 빙냉된 10% 트리클로로아세트산 및 다음에 빙냉된 물로 순차적으로 세정한다. 0.5M NaOH 중에서 용해한 후에, 용해물 및 PBS 세정액(500ml)을 휘발시키고 방사선험성의 양을 측정한다.

1529> 파킨슨 모델

1530> 파킨슨 병에서 운동 기능의 손실은 흑색선조의 도파민성 투사 뉴런의 변성으로 부터 기인한 선조체 도파민의 결핍으로 인한 것이다. 광범위하게 특성이 규명된 파킨슨 병의 동물 모델은 1-메틸-4-페닐 1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP)의 전신성 투여와 관련된다. CNS에서, MPTP는 아스트로사이트에 의해 흡수되며 모노아민 옥시다제 B에 의해 1-메틸-4-페닐 피리딘(MPP⁺)로 대사되고 방출된다. 후속하여, MPP⁺는 도파민에 대한 고친화성 재흡수 운반체에 의해 도파민작용성 뉴런에 활발히 축적된다. MPP⁺는 다음에 전기화학 구배에 의해 미토콘드리아에 농축되고 선택적으로 니코티다미드 아데닌 디포스페이트:유비퀴논 옥시도리덕서나아제(복합체 I)을 선택적으로 억제하여 전자 이송을 방해하여 결국에는 산소 라디칼을 생성한다.

1531> FGF-2(염기성 FGF)가 흑질 도파민작용성 뉴런에 대한 영양 활성을 가진다는 것을 조직 배양 파라다임에서 증명하였다(Ferrari et al., Dev. Biol. 1989). 최근에, 운식커(Unsicker) 박사 그룹은 선조체에서 겔 포움 임플란트에 FGF-2를 투여하는 것은 MPTP 노출과 관련된 독성으로부터 흑질 도파민작용성 뉴런을 거의 완벽하게 보호한다는 것을 증명하였다(Otto and Unsicker, J. Neuroscience, 1990).

1532> FGF-2를 이용한 데이터에 기초하여, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 이것이 시험관내에서 도파민작용성 뉴런 생존을 증강시키는데 있어 FGF-2의 작용과 유사한 작용을 가지는 지를 결정하기 위하여 평가될 수 있고, 또한

MPTP 치료와 관련된 손상으로부터 선조체에서 도파민작용성 뉴런의 보호를 위해 생체내 시험될 수 있다. 본 발명의 알부민 융합 단백질의 잠재적 효과는 먼저 도파민작용성 뉴런 세포 파라다임에서 시험관내 실험된다. 배양물을 임태일로부터 잉태 14일의 위스타 래트 배아로부터 중뇌 바닥판을 절개하여 제조한다. 조직을 트립신으로 분리하고 폴리오르티닌-라미닌 코팅된 유리 커버슬립상에 $200,000\text{세포}/\text{cm}^2$ 의 밀도로 시딩한다. 세포를 둘베코의 개질된 이글스 배지 및 호르몬선 첨가물(N1)을 함유하는 F12 배지에 유지한다. 배양물을 시험관내에서 8일 후에 파라포름알데하이드로 고정하고 티로신 하이드록실라아제, 도파민작용성 뉴런에 대한 특이적 마커, 면역조직화학 염색에 대해 처리한다. 분리된 세포 배양물을 배아 래트로부터 제조한다. 배양 배지는 3일마다 교환하고 인자는 또한 그때에 첨가된다.

<1533> 도파민작용성 뉴런이 잉태 14일에 동물로부터 분리되기 때문에, 도파민작용성 전구체 세포가 증식하는 단계를 지난 발생시에, 티로신 하이드록실라아제 면역양성 뉴런 개수의 증가는 시험관내에서 생존하는 도파민작용성 뉴런의 수의 증가를 나타낼 것이다. 따라서, 본 발명의 치료 단백질이 도파민작용성 뉴런의 생존을 연장시키는 역할을 한다면, 융합 단백질이 파킨슨 병에 관여될 것이라는 것을 제시할 것이다.

<1534> 실시예 64: 췌장 베타 세포 이식 조합 치료

<1535> 이식은 자가면역 질환, 특히 표적 자가 조직이 심하게 손상된 경우에 일반적인 치료 형태이다. 비제한적인 일례로서, 췌장 이식 및 아일릿(islet) 세포 이식은 IDDM에 대한 일반적인 치료 옵션이다(참조, e.g., Stewart et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 (3): 984-988 (2001); Brunicardi, Transplant. Proc. 28: 2138-40 (1996); Kendall & Robertson, Diabetes Metab. 22: 157-163 (1996); Hamano et al., Kobe J. Med. Sci. 42: 93-104 (1996); Larsen & Stratta, Diabetes Metab. 22: 139-146 (1996); and Kinkhabwala, et al., Am. J. Surg. 171: 516-520 (1996)). 이식 방법으로서, 자가면역 질환 환자를 위한 이식 치료법은 이식된 조직의 숙주 거부의 위험을 최소화하는 치료법을 포함한다. 그러나, 자가면역 질병은 본래 자기 조직에 손상을 입히는 미리 존재하는 숙주 자가면역 반응이 이식된 조직에 동일한 손상 효과를 보일 것이라는 추가의 독립적인 위험을 수반한다. 이와 같이, 본 발명은 자가면역 질병의 이식 치료법을 거친 개체에서 면역조절제/면역억제제와 조합하여 본 발명의 알부민 융합 단백질을 사용하여 자가면역 췌장 질병의 치료를 위한 방법 및 조성물을 포함한다.

<1536> 본 발명에 따르면, 상기 기술된 알부민 융합 기재 조성물 및 제형은 본래 자기 조직에 대하여 초기에 유발된 숙주 개체의 자가면역 반응으로부터 생성된 이식된 기관, 조직 또는 세포에 대한 손상을 예방하고 치료하기 위하여 투여된다. 투여는 매 일주일 간격으로 2 내지 4회 용량으로 이식 전 및 후에 수행될 수 있다.

<1537> AI-401, CDP-571(항-TNF 모노클론성 항체), CG-1088, 디아미드(Diamyd)(당뇨병 백신), ICM3(항-ICM-3 모노클론성 항체), 리노미드(로쿠니맥스), NBI-6024(변경된 펩티드 리간드), TM-27, VX-740(HMR-3480), 카스파아제 8 프로테아제 억제제, 탈리도미드, hOKT3gammal(Ala-ala)(항-CD3-모노클론성 항체), 경구 인터페론-알파, 경구 락토바실러스, 및 LymphoStat-BTM를 비제한적으로 포함하는 면역조절제/면역억제제가 아일릿 세포 또는 췌장 이식에서 본 발명의 알부민 융합 치료제와 함께 사용될 수 있다.

<1538> 실시예 65: VH 및 VL 도메인의 확인 및 클로닝

<1539> 특정 항체를 발현하는 세포주로부터 VH 및 VL 도메인을 확인하고 클로닝하는 한가지 방법은 항체 발현 세포주로부터 만들어진 cDNA 상에 VH 및 VL 특이적 프라이머로 PCR을 수행하는 것이다. 간략하게, RNA는 세포주로부터 분리되고 EBV 세포주에 의해 발현되는 항체의 VH 및 VL 도메인을 증폭시키기 위해 설계된 RT-PCR에 대한 주형으로서 사용된다. 세포를 TRIzol[®] 시약(라이프 테크놀로지, 락빌, MD)중에서 용해하고, 1/5 부피의 클로로포름으로 추출한다. 클로로포름의 첨가 후에, 용액이 10분 동안 실온에서 인큐베이션되도록 하고, 테이בל탑 원심분리기에서 4℃로 15분간 14,000rpm으로 원심분리한다. 상청액을 수집하고 RNA를 동일한 부피의 이소프로판올을 사용하여 침전시킨다. 침전된 RNA를 테이בל탑 원심분리기에서 4℃로 15분간 14,000rpm으로 원심분리하여 펠릿을 형성한다. 원심분리 후에, 상청액을 제거하고 75% 에탄올로 세척한다. 세척 후에, RNA를 4℃에서 5분간 800rpm으로 다시 원심분리한다. 상청액을 제거하고 펠릿을 공기 건조되도록 한다. RNA를 DEPC 물에 용해시키고 10분 동안 60℃로 가열한다. RNA의 양은 광학 밀도 측정을 사용하여 결정할 수 있다.

<1540> cDNA를 역전사효소 및 램덤 헥사머 프라이머를 사용하여 1.5-2.5 마이크로그램의 RNA로부터 당업계에 공지된 방법에 따라 합성될 수 있다. cDNA는 다음에 VH 및 VL 도메인의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용된다. VH 및 VL 유전자를 증폭하기 위하여 사용되는 프라이머는 표 7에 도시된다. 통상적으로 PCR 반응은 단일의 5' 프라이머 및 단일의 3' 프라이머를 사용한다. 때때로, 사용가능한 RNA 주형의 양이 제한적인 경우 또는 보다 큰 효율

을 위해 5' 및/또는 3' 프라이머의 그룹이 사용될 수 있다. 예를 들어, 때때로, 모든 5개의 VH-5' 프라이머 및 모든 JH3' 프라이머는 하나의 PCR 반응에서 사용된다. PCR 반응은 1X PCR 완충액, 2mM의 각 dNTP, 0.7 유닛의 고성능 태크 폴리머라아제(High Fidelity Taq polymerase), 5' 프라이머 혼합물, 3' 프라이머 혼합물 및 7.5 마이크로리터 cDNA를 함유하는 50 마이크로리터 부피로 수행된다. VH 및 VL 둘 모두의 5' 및 3' 프라이머 혼합물은 각각 개개 프라이머 각각의 22 pmole 및 28 pmole을 함께 풀링함에 의해 만들어진다. PCR 조건은 하기와 같다: 5분간 96℃; 다음 1분 동안 94℃, 1분 동안 50℃, 및 1분 동안 72℃의 사이클 25회; 다음 10분 동안 72℃의 연장 사이클. 반응이 완결된 후에 시료 튜브를 4℃에 저장한다.

표 6: VH 및 VL 도메인을 증폭시키기 위해 사용된 프라이머 서열

<u>프라이머 명칭</u> <u>VH 프라이머</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>프라이머 서열 (5'-3')</u>
Hu VH1-5'	62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	63	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	64	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	65	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
Hu VH5-5'	66	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	67	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
Hu JH1,2-5'	68	TGAGGAGACGGTGACCGGGTGCC
Hu JH3-5'	69	TGAAGAGACGGTGACCATTTGTCCC
Hu JH4,5-5'	70	TGAGGAGACGGTGACCGGGTTCC
Hu JH6-5'	71	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
<u>VL 프라이머</u>		
Hu Vkappa1-5'	72	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa2a-5'	73	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa2b-5'	74	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa3-5'	75	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Hu Vkappa4-5'	76	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa5-5'	77	GAAACGACACTCAGCAGTCTCC
Hu Vkappa6-5'	78	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Hu Vlambda1-5'	79	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Vlambda2-5'	80	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Vlambda3-5'	81	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Vlambda3b-5'	82	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Vlambda4-5'	83	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Vlambda5-5'	84	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Vlambda6-5'	85	AATTTTATGCTGACTCAGCCCA
Hu Jkappa1-3'	86	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa2-3'	87	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Hu Jkappa3-3'	88	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Hu Jkappa4-3'	89	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa5-3'	90	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Hu Jlambda1-3'	91	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Jlambda2-3'	92	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Jlambda3-3'	93	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Jlambda3b-3'	94	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Jlambda4-3'	95	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Jlambda5-3'	96	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Jlambda6-3'	97	AATTTTATGCTGACTCAGCCCA

PCR 시료는 다음에 1.3% 아가로오스 겔 상에서 전기영동된다. 예상 크기(VH 도메인의 경우 ~506 염기쌍의 DNA 밴드, 및 VL 도메인의 경우 344 염기쌍)을 겔로부터 잘라내어 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 정제할 수

있다. 정제된 PCR 생성물은 PCR 클로닝 벡터(인비트로젠사의 TA 벡터, Carlsbad, CA)로 라이게이션될 수 있다. 개개의 클로닝된 PCR 생성물을 E. Coli의 트랜스펙션 및 청색/백색 선별 후에 분리할 수 있다. 다음에, 클로닝된 PCR 생성물은 당업계에 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 시퀀싱할 수 있다.

<1545>

VH 도메인 및 VL 도메인을 함유하는 PCR 밴드는 또한 전장 Ig 발현 벡터를 생성하기 위해 사용될 수 있다. VH 및 VL 도메인은 중쇄(즉, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4) 또는 경쇄(인간 카파 또는 인간 람다) 불변 영역의 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 벡터로 클로닝되어 완전한 중쇄 또는 경쇄 분자는 적절한 숙주 세포로 트랜스펙션되는 경우에 이들 벡터들로부터 발현될 수 있다. 또한, 클로닝된 중쇄 및 경쇄 둘 모두가 하나의 세포주에서 (하나 또는 두개의 벡터로부터) 발현되는 경우에, 이들은 세포 배양 배지로 분비되는 완전한 작용성 항체 분자로 회합될 수 있다. VH 및 VL 항체 도메인을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 완전한 항체 분자를 엔코딩하는 발현 벡터를 생성하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.

<1546>

실시예 66: HA-사이토카인 또는 HA-성장 인자 융합 단백질(예를 들어 NGF, BDNF α , BDNF β 및 BDNF γ)의 제조

<1547>

NGF와 같은 관심 대상인 사이토카인 또는 성장 인자에 대한 cDNA는 모두 표준 방법을 사용하는 cDNA 라이브러리, RT-PCR, 및 중복 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 PCR을 포함하여 다양한 수단에 의해 분리될 수 있다. 이러한 단백질 모두에 대한 뉴클레오타이드 서열은 공지되어 있고 입수가 가능하다. cDNA는 5' 및 3' 말단에서 제한효소 위치를 생성하도록 재단하여 올리고뉴클레오타이드 링커가 HA에 대한 cDNA를 함유하는 벡터로 cDNA를 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. 이것은 스페이서 서열을 사용하거나 사용하지 않고 N 또는 C-말단에 있을 수 있다. NGF(또는 다른 사이토카인) cDNA를 pPP00005 (도 2), pScCHSA, pScNHSA, 또는 pC4:HSA와 같은 벡터로 클로닝되고, 이로부터 완전한 발현 카세트를 절단하고 플라스미드 pSAC35에 삽입하여 효모에서 알부민 융합 단백질의 발현을 가능하게 한다. 다음에 효모로부터 분비되는 알부민 융합 단백질을 수지하고 배지로부터 정제하고 이의 생물학적 활성에 대해 시험한다. 포유동물 세포주에서 발현을 위하여, 사용되는 발현 카세트가 포유동물 프로모터, 리더 서열 및 터미네이터를 사용하는 것을 제외하고 유사한 방법을 개조한다(실시예 1 참조). 다음에 이러한 발현 카세트를 절단하고 포유동물 세포주의 프랜스펙션에 적합한 플라스미드에 삽입한다.

<1548>

실시예 67: HA-IFN 융합 단백질(예를 들어, IFN α)의 제조

<1549>

IFN α 와 같은 관심대상인 인터페론에 대한 cDNA는 모두 표준 방법을 사용하는 cDNA 라이브러리, RT-PCR, 및 일련의 중복되는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 PCR을 비제한적으로 포함하는 다양한 수단에 의해 분리될 수 있다. IFN α 와 같은 인터페론의 뉴클레오타이드 서열은, 예를 들어 미국 특허 제5,326,859호 및 제4,588,585호, EP 제32134호 뿐만 아니라 유전자은행과 같은 공용 데이터베이스에 공지되어 있고 입수가 가능하다. cDNA를 제한효소 위치를 생성하도록 5' 및 3' 말단에서 재단하여 올리고뉴클레오타이드 링커가 HA에 대한 cDNA를 함유하는 벡터로 cDNA를 클로닝하는데 사용될 수 있다. 이것은 스페이서 서열을 사용하거나 사용하지 않고 HA 서열의 N 또는 C-말단에 있을 수 있다. IFN α (또는 다른 인터페론) cDNA는 pPP00005 (도 2), pScCHSA, pScNHSA, 또는 pC4:HSA와 같은 벡터로 클로닝하여 이로부터 완전한 발현 카세트를 절단하고 플라스미드 pSAC35에 삽입하여 효모에서 알부민 융합 단백질의 발현을 가능하게 한다. 효모로부터 분비되는 알부민 융합 단백질은 그 후에 수집되고 배지로부터 정제되어 이의 생물학적 활성에 대해 시험될 수 있다. 포유동물 세포주에서 발현의 경우에, 사용된 발현 카세트가 포유동물 프로모터, 리더 서열, 및 터미네이터를 사용하는 것을 제외하고 유사한 방법을 개조한다(실시예 1 참조). 이러한 발현 카세트는 다음에 절단되고 포유동물 세포주의 트랜스펙션에 적합한 플라스미드로 삽입된다.

<1550>

바이알로부터 최대 단백질 회수

<1551>

본 발명의 알부민 융합 단백질은 이들이 낮은 농도로 포장되는 경우에조차 높은 정도의 안정성을 가진다. 또한, 낮은 단백질 농도에도 불구하고, 우수한 융합-단백질 회수는 수용액이 바이알 벽에 결합되는 것을 최소화하기 위하여 첨가된 다른 단백질을 포함하지 않는 경우조차 관찰된다. 바이알-저장된 HA-IFN 용액의 회수를 저장 용액과 비교한다. 6 또는 30 μ g/ml HA-IFN 용액을 바이알에 넣고 4°C에서 저장한다. 48시간 또는 72시간 후에, 10ng의 시료에 원래 대응하는 부피를 제거하고 IFN 샌드위치 ELISA에서 측정한다. 추정 값을 높은 농도의 저장 용액의 값과 비교한다. 도시된 바와 같이 본질적으로 이러한 바이알에서 시료의 손실은 없고, 이는 알부민과 같은 외인성 물질이 바이알 벽에서의 시료 손실을 막을 필요가 없다는 것을 나타낸다.

<1552>

HA- α -IFN 융합체의 생체내 안정성 및 생체이용률

<1553>

HA- α -IFN 융합 분자의 생체내 안정성 및 생체이용률을 결정하기 위하여, (효모로부터의) 정제된 융합 분자를

원숭이에게 투여한다. HA- α -IFN 융합체로부터 제형화된 약제 조성물은 연장된 혈청 반감기 및 생체이용율을 설명할 수 있다. 이에 따라, 약제 조성물은 천연 알파-인터페론 분자와 비교하여 보다 낮은 용량의 알파-인터페론 활성을 함유하도록 제형화될 수 있다.

<1554> HA- α -IFN 융합체를 함유하는 약제 조성물은 α -IFN의 투여에 의해 조절될 수 있는 질병 또는 질병 상태를 가진 환자의 질병을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 질병은 모상 세포 백혈병, 카포시 육종, 성기 및 항문 사마귀, 만성 B형 간염, 만성 비-A형, 비-B형 간염, 특히, C형 간염, D형 간염, 만성 골수성 백혈병, 항문 세포 암종, 방광 암종, 난소 및 자궁경부 암종, 피부 암종, 재발성 호흡기 유두종증, 비호지킨 및 피부 T-세포 림프종, 흑색종, 다발성 골수종, AIDS, 다발성 경화증, 교모세포종 등을 비제한적으로 포함한다(문헌(Interferon Alpha, In: AHFS Drug Information, 1997) 참조).

<1555> 이에 따라, 본 발명은 HA- α -IFN 융합 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 함유하고 인간 투여를 위하여 적절한 용량으로 제형화된 약제 조성물을 포함한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 HA- α -IFN 융합 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 함유하는 약제 조성물을 투여하기 위한 단계를 적어도 포함하는 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 포함한다.

<1556> 이작용성 HA- α -IFN 융합체

<1557> HA- α -IFN 발현 벡터는 이작용성 HA- α -IFN 융합 단백질의 발현을 위한 삽입체를 포함하도록 개질될 수 있다. 예를 들어, 관심대상인 제 2 단백질에 대한 cDNA는 이중 정지 코돈이 제거되거나 코딩 서열의 다운스트림으로 쉬프트된 후에 "rHA-IFN"의 프레임 다운스트림에 삽입될 수 있다.

<1558> 이작용성 HA- α -IFN 융합 단백질의 일 양태에서, B-림프구 자극제 단백질(유전자은행 수탁 번호 제4455139호) 또는 폴리펩티드에 대한 항체 또는 단편은 융합 분자의 HA 분자의 한 말단에 융합될 수 있다. 이러한 이작용성 단백질은 융합체의 α -IFN 성분에 의해 생성된 면역 반응을 조절하기 위해 유용하다.

<1559> 실시예 68: HA-단일 사슬 항체 융합 단백질의 제조

<1560> 단일 사슬 항체는 파지 라이브러리로부터 선택하고, 항체의 cDNA를 클로닝하고 프라이머로서 측면 불변 영역을 이용하여 가변성 영역을 클로닝함으로써 또는 임의의 특이적 항체의 가변성 영역에 상응하는 올리고뉴클레오타이드를 합성함으로써 특이적 항체의 가변성 영역을 클로닝함을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 여러 방법에 의해 생산된다. cDNA는 제한효소 위치를 생성하도록 5' 및 3' 말단에서 차단되어, 올리고뉴클레오타이드 링커가 HA에 대해 cDNA를 함유하는 벡터로 cDNA를 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. 이것은 스페이서 서열을 사용하거나 사용하지 않고 N 또는 C-말단에 있을 수 있다. 호르몬 cDNA는 pPPC0005 (도 2), pScCHSA, pScNHSA, 또는 pC4:HSA와 같은 벡터로 클로닝되고 이로부터 완전한 발현 카세트가 절단되고 플라스미드 pSAC35에 삽입되어 효모에서 알부민 융합 단백질의 발현을 가능하게 한다.

<1561> 본 발명의 융합 분자에서, V_H 및 V_L 은 하기 수단들 중 하나 또는 이들의 조합에 의해 연결될 수 있다: V_H 의 C-말단과 V_L 의 N-말단 간의 펩티드 링커; 분비와는 별도로 두개로 분리되고 이후 자체적으로 결합하도록 V_H 와 V_L 간의 Kex2p 프로테아제 분리 부위; 및 V_H 및 V_L 이 이들을 함께 연결시키기 위하여 이들 사이에 디설피드 결합을 형성시킬 수 있도록 위치한 시스틴 잔부. 대안적인 선택은 HA 또는 HA 도메인 단편의 N-말단에 V_H 를 위치시키고, HA 또는 HA 도메인 단편의 C-말단에 V_L 을 위치시키는 것이다.

<1562> 다음에 효모로부터 분비된 알부민 융합 단백질이 수집되고 배지로부터 정제되고 이의 생물학적 활성에 대해 시험된다. 포유동물 세포주에서 발현을 위해, 사용되는 발현 카세트가 포유동물 프로모터, 리더 서열 및 터미네이터를 사용하는 것을 제외하고 유사한 방법을 개조한다(실시예 1 참조). 다음에 이러한 발현 카세트는 절단되고 포유동물 세포주의 트랜스팩션을 위해 적합한 플라스미드에 삽입된다. 이러한 방식으로 생산된 항체는 배지로부터 정제되고 이의 항원에 결합시키기 위하여 표준 면역화학적 방법을 이용하여 시험될 수 있다.

<1563> 실시예 69: HA 융합 단백질(예를 들어, HA-항바이러스성, HA-항생성, HA-효소 억제제 및 HA-항알레르기 단백질)로서 억제 인자 및 펩티드의 제조

<1564> 고려되는 펩티드, 예를 들어 항생성 펩티드에 대한 cDNA는 모두 표준방법을 사용하는 cDNA 라이브러리, RT-PCR, 및 일련의 증폭되는 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 PCR을 비제한적으로 포함하는 다양한 수단에 의해 분리될 수 있다. cDNA는 제한효소 위치를 생성하도록 5' 및 3' 말단에서 차단되어 올리고뉴클레오타이드 링커가 HA에 대한 cDNA를 함유하는 벡터로 cDNA를 클로닝하도록 사용될 수 있다. 이는 스페이서 서열을 사용하거나

나 사용하지 않고 N 또는 C-말단에 있을 수 있다. 펩티드 cDNA는 pPPC0005 (도 2), pScCHSA, pScNHSA, 또는 pC4:HSA와 같은 벡터로 클로닝되고 이로부터 완전한 발현 카세트가 절단되고 플라스미드 pSAC35에 삽입되어 효모에서 알부민 융합 단백질의 발현을 가능하게 한다. 다음에 효모로부터 분리된 알부민 융합 단백질이 수집되고 배지로부터 정제되고 이의 생물학적 활성에 대해 시험된다. 포유동물 세포주에서 발현을 위해, 사용되는 발현 카세트가 포유동물 프로모터, 리더 서열 및 터미네이터를 사용하는 것을 제외하고 유사한 방법을 개조한다(실시예 1 참조). 다음에 이러한 발현 카세트는 절단되고 포유동물 세포주의 트랜스펙션을 위해 적합한 플라스미드에 삽입된다.

실시예 70: 타겟화된 HA 융합 단백질의 제조

고려되는 단백질에 대한 cDNA는 cDNA 라이브러리로부터 분리되거나 표준 분자 생물학 방법을 이용한 수개의 중복되는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 합성적으로 제조될 수 있다. 적절한 뉴클레오타이드는 통상적인 제한 부위를 형성하기 위하여 cDNA에서 조각될 수 있고, 또한 단백질 cDNA를 알부민 cDNA를 부착할 수 있다. 또한 타겟화 단백질 또는 펩티드 cDNA, 예를 들어 단일 사슬 항체 또는 펩티드, 예를 들어 세포내에서 단백질을 지시할 수 있는 핵 위치 신호는 알부민의 다른 단부에 융합될 수 있다. 고려되는 단백질 및 타겟화 펩티드는 알부민 cDNA와 융합할 수 있는 pPPC0005 (도 2), pScCHSA, pScNHSA, 또는 pC4:HSA와 같은 벡터로 클로닝된다. 이러한 방식으로, 알부민의 N- 및 C-말단 둘 모두는 다른 단백질에 융합된다. 융합된 cDNA는 이후 pPPC0005로부터 절제되고, 플라스미드, 예를 들어 pSAC35로 삽입되어 효모에서 알부민 융합 단백질의 발현을 가능하게 한다. 상기 모든 과정은 분자 생물학에서의 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 효모로부터 분리된 알부민 융합 단백질은 수집되고 배지로부터 정제되고 적절한 생화학적 및 생물학적 시험을 이용하여 이의 생물학적 활성 및 이의 타겟화 활성에 대해 시험된다.

실시예 71: 구조물 ID 2249, IFNa2-HSA, 생성

구조물 ID 2249, pSAC35:IFNa2.HSA는 효모 *S. 세레비시아*(*S. cerevisiae*) 발현 벡터 pSAC35에서 HSA의 성숙 형태의 아미노 말단에 융합된, IFNa2 단백질의 성숙 형태, 즉 C1-E165가 후속하는 HSA 키메라 리더 서열을 가지는 IFNa2 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 DNA를 포함한다.

IFNa2 cDNA의 클로닝

IFNa2를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 하기 기술된 바와 같이 프라이머 IFNa2-1 및 IFNa2-2를 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR 증폭제는 Sal I/Cla I으로 절단하고, Xho I/Cla I 절단 pScCHSA로 결합시켰다. 구조물 ID #2249는 HSA의 키메라 리더 서열, IFNa2의 성숙 형태, 후속하는 성숙 HSA 단백질을 함유하는 알부민 융합 단백질을 엔코딩한다.

IFNa2, IFNa2-1, 및 IFNa2-2의 성숙 형태를 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 PCR 증폭을 위해 적합한 두개의 올리고뉴클레오타이드가 합성되었다:

IFNa2-1: 5'-CGCGCGCGTCGACAAAAGATGTGATCTGCCTCAAACCCACA-3' (SEQ ID NO:348)

IFNa2-2: 5'-GCGCGCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTTGTCATCTTCCTTACTTCTTAACTTTCT-3' (SEQ ID NO:349)

IFNa2-1 프라이머는 Sal I 클로닝 위치(밑줄로 표시), 키메라 HSA 리더 서열의 마지막 세개 아미노산 잔기를 엔코딩하는 뉴클레오타이드, 및 IFNa2의 성숙 형태의 처음 7개 아미노산 잔기를 엔코딩하는 22개 뉴클레오타이드(굵은 글씨체로 표시)를 도입한다. IFNa2-2에서, Cla I 위치(밑줄로 표시) 및 이를 후속하는 DNA는 성숙 HSA 단백질의 처음 10개 아미노산을 엔코딩하는 DNA의 반대 짝(reverse complement)이고, 마지막 22개 뉴클레오타이드(굵은 글씨체로 표시)는 IFNa2의 마지막 7개 아미노산 잔기를 엔코딩하는 DNA의 반대 짝이다(실시예 2 참조). IFNa2-HSA의 PCR 증폭체가 이러한 프라이머를 사용하여 생성되고, 정제되고, Sal I 및 Cla I 제한효소로 소화되고 pScCHSA 벡터의 Xho I 및 Cla I 위치로 클로닝된다. 서열을 확인한 후에, 이러한 IFNa2 알부민 융합 단백질을 엔코딩하는 발현 카세트는 Not I 소화된 pSAC35로 서브클로닝된다.

또한, 아미노산 시퀀싱에 의해 발현된 알부민 융합 단백질의 N-말단의 분석은 예상되는 IFNa2 서열의 존재를 확인할 수 있다(하기 참조).

상이한 리더 서열을 사용하는 다른 IFNa2 알부민 융합 단백질은 당업계에 공지된 방법에 의해 제작되었다(실시예 2 참조). 다양한 리더 서열의 예에는 인버타아제(invertase) "INV"(구조물 2343 및 2410) 및 메이팅 알파 인자 "MAF"(구조물 2366)을 비제한적으로 포함한다. 이러한 IFNa2 알부민 융합 단백질을 앞서 기술한 바와 같

이 pC4(구조물 2382) 및 pEE12.1과 같은 포유동물 발현 벡터로 서브클로닝될 수 있다(실시에 5 참조). HAS에 C-말단 융합된 치료제 부분을 가지는 IFNa2 알부민 융합 단백질이 제작될 수 있다(구조물 2381).

<1576> 본 발명의 IFNa2 알부민 융합 단백질은 바람직하게는 IFNa2의 N 또는 C 말단(즉, Cys-1 내지 Glu-165)에 융합된 HSA의 성숙 형태, 즉 Asp-25 내지 Leu-609를 포함한다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 IFNa2 알부민 융합 단백질은 추가로 발현을 위해 사용된 숙주의 분비 경로에서 초기의 융합 폴리펩티드를 유도하는 신호 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 신호 서열에 의해 엔코딩되는 신호 펩티드가 제거되고, 성숙한 IFNa2 알부민 융합 단백질이 배양 배지내로 직접 분비된다. 본 발명의 IFNa2 알부민 융합 단백질은 MAF, INV, Ig, 피불린(Fibulin) B, 클러스테린(Clusterin), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 4를 포함하지만 이들에 제한되지 않는 이중성 신호 서열, 키메라 HSA/MAF 리더 서열을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 변이체 HSA 리더 서열, 또는 당 분야에 공지되어 있는 기타 이중성 신호 서열을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 IFNa2 알부민 융합 단백질은 천연 IFNa2를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 IFNa2 알부민 융합 단백질은 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함한다. 단편 및/또는 변이체를 포함하는 이들 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다.

<1577> 구조물 ID 2249의 발현 및 정제

<1578> 효모 사카로마이세스 세레비시애(S. cerevisiae)에서의 발현

<1579> 구조물 2249를 효모 사카로마이세스 세레비시애 균주 BXP10 내로 형질전환시키는 것은 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행하였다 (실시에 3 참조). 세포는 72시간 성장한 후에 정지기에서 수집할 수 있다. 세포를 3000g에서 10분간 정화시킴으로써 상층액을 수집한다. 발현 수준은 항-HSA 혈청 (Kent Laboratories)을 사용하는 면역블롯 검출에 의해 또는 1차 항체로서 조사된다. 근사 분자량이 88.5 kDa인 IFNa2 알부민 융합 단백질이 수득될 수 있다.

<1580> 효모 사카로마이세스 세레비시애 세포 상층액으로부터의 정제

<1581> 효모 사카로마이세스 세레비시애 세포 중의 구조물 ID #2249로부터 발현된 IFNa2 융합 단백질을 함유하는 세포 상층액은 디엑스(Dyax) 펩티드 친화성 컬럼으로 소규모로 정제하거나 (실시에 4 참조), 투석여과, DEAE-세파로오스 패스트 플로우(DEAE-Sepharose Fast Flow) 컬럼을 사용하는 음이온 교환 크로마토그래피, 부틸 650S 컬럼을 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), SP-세파로오스 패스트 플로우 컬럼을 사용하는 양이온 교환 크로마토그래피 또는 블루-세파로오스(Blue-Sepharose) 크로마토그래피, 및 Q-세파로오스 고성능 컬럼 크로마토그래피를 사용하는 고성능 크로마토그래피의 5 단계에 의해 대규모로 정제할 수 있다 (실시에 4 참조). IFNa2 알부민 융합 단백질은 100 내지 250 mM NaCl을 사용하여 DEAE-세파로오스 패스트 플로우 컬럼으로부터 용리되고, 150 내지 250 mM NaCl을 사용하여 SP-세파로오스 패스트 플로우 컬럼으로부터 용리되고, Q-세파로오스 고성능 컬럼으로부터 5 내지 7.5 mS/cm으로 용리될 수 있다. N-말단 시퀀스는 IFNa2의 성숙한 형태에 상응하는 서열 CDLPQ (SEQ ID NO:98)를 산출할 수 있다.

<1582> IFNa2의 활성은 시험관내 ISRE-SEAP 검정을 이용하여 검정될 수 있다.

<1583> 방법

<1584> 구조물 ID # 2249에 의해 엔코딩되는 IFNa2 알부민 융합 단백질은 앞서 실시에 76에 기재된 바와 같이 ISRE-SEAP 검정에서 활성에 대해 시험할 수 있다. 요약하면, 컨디셔닝된 효모 상층액을 ISRE-SEAP/293F 리포터 세포 주상에서 ISRE 신호 변환을 지시할 수 있는 능력에 대해 1:1000의 희석율로 시험하였다. ISRE-SEAP/293F 리포터 세포를 처리 1일 전에 96-웰 폴리-D-라이신 코팅된 플레이트에서 3×10^4 개 세포/웰로 플레이팅하였다. 그 후, 리포터 세포를 SEAP 리포터 유전자 화학발광 검정 (Roche catalog # 1779842)에서 사용하기 위해 $40\mu\text{l}$ 를 분리하기 전에 18 또는 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 재조합 인간 인터페론 베타인 "rhIFNb" (Biogen)를 포지티브 대조군으로서 사용하였다.

<1585> 결과

<1586> IFNa2-HSA의 정제된 제제는 10^{-1} 내지 10^1 ng/ml의 농도 (도 4 참조) 또는 10^{-10} 내지 10^{-8} ng/ml의 농도 (도 5 참조)에 걸쳐 ISRE-SEAP 검정에서 비교적 선형 증가를 나타내었다.

<1587> 구조물 ID 2249에 의해 엔코딩되는 인터페론 알파 융합체에 의한 OAS의 생체내 유도

<1588> 방법

<1589> OAS 효소인 2'-5'-올리고아데닐레이트 신테타아제(OligoAdenylate Synthetase)는 항바이러스 감염에 반응하여 인터페론에 의해 전사 수준에서 활성화된다. 인터페론 구조물의 효과는 처리된 원숭이로부터 혈액 샘플을 수득하고, 이들 샘플을 p41 및 p69라는 두 개의 OAS mRNA의 전사 활성화에 대해 분석함으로써 측정될 수 있다. 0.5ml 부피의 전혈을 동물 당 0일째, 1일째, 2일째, 4일째, 8일째, 10일째 및 14일째의 7개의 상이한 시점에서 그룹 당 4마리의 동물로부터 수득하였다. 다양한 그룹은 비히클 대조군, 1일째의 30 $\mu\text{g/kg}$ 의 HSA-IFN의 정맥 주사, 1일째의 30 $\mu\text{g/kg}$ 의 HSA-IFN의 피하 주사, 1일째의 300 $\mu\text{g/kg}$ 의 HSA-IFN의 피하 주사, 및 1일, 3일 및 5일째의 포지티브 대조군으로서 40 $\mu\text{g/kg}$ 의 인터페론 알파 (Schering-Plough)의 피하 주사를 포함한다. p41 및 p69 mRNA 전사체의 수준은 p41-OAS 및 p69-OAS에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 실시간 정량 PCR (Taqman)에 의해 측정하였다. OAS mRNA 수준을 18S 리보솜 RNA 내인성 대조군과 비교하여 정량하였다. 구조물 2249에 의해 엔코딩되는 알부민 융합체는 유사한 실험을 받을 수 있다.

<1590> 결과

<1591> p41 및 p69 OAS 둘 모두에 대한 mRNA 전사체 수준의 현저한 증가가 IFN α 처리된 원숭이와 대조적으로 HSA-인터페론 처리된 원숭이에서 관찰되었다 (p41 데이터에 대해서는 도 6을 참조). 효과는 거의 10일간 지속되었다.

<1592> 실시예 72: IFN α 2 알부민 융합 단백질에 대한 적응증.

<1593> INF 알파 알부민 융합 단백질 (구조물 2249, 2343, 2410, 2366, 2382, 및 2381에 의해 엔코딩되는 것들을 포함하지만 이들에 제한되지 않음)은 다발성 경화증을 치료, 예방, 개선 및/또는 검출하는데 사용될 수 있다. 다른 적응증으로는 비제한적으로 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 및 다른 코로나바이러스 감염을 포함하는 바이러스 감염을 포함한다: 비제한적으로 에볼라(Ebola) 바이러스 및 마르부르그(Marburg) 바이러스를 포함하는 필로바이러스(filovirus); 비제한적으로 피첸데(Pichende) 바이러스, 라사(Lassa) 바이러스, 쥘린(Junin) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 구아나리토(Guanarito) 바이러스를 포함하는 아레나바이러스(Arenavirus); 및 림프구 맥락수막염 바이러스 (LCMV); 비제한적으로 폰타 토로(Punta toro) 바이러스, 크림민-콩고(Crimean-Congo) 출혈열 바이러스, 샌드플라이 열(sandfly fever) 바이러스, 리프트 밸리 열(Rift Valley fever) 바이러스, 라 크로세(La Crosse) 바이러스, 및 한타바이러스(hantavirus)를 포함하는 분야바이러스(Bunyavirus); 비제한적으로 황열, 반지(Banji) 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 땡기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 진드기 매개 뇌염, 옴스크(Omsk) 출혈열, 및 키아사누르 포레스트 디지즈(Kyasanur Forest Disease) 바이러스를 포함하는 플라비바이러스(Flavivirus); 비제한적으로 베네주엘란(Venezuelan), 이스턴(eastern), 및 웨스턴(western) 말 뇌염 바이러스, 로스 리버(Ross River) 바이러스, 및 루벨라(Rubella) 바이러스를 포함하는 토가바이러스(Togavirus); 비제한적으로 백신니아(Vaccinia), 카우폭스(Cowpox), 스몰폭스(Smallpox), 및 멍키폭스(Monkeypox)를 포함하는 오르토폭스(Orthopox) 바이러스; 포진 바이러스; FluA/B; 호흡기 합포성 바이러스(RSV); 파라플루(parafly); 홍역; 리노바이러스; 아데노바이러스; 샘리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스; 바이러스 출혈열; 라브도바이러스(Rhabdovirus); 비제한적으로 니파(Nipah) 바이러스 및 헨드라(Hendra) 바이러스를 포함하는 파라믹소바이러스; 및 우선순위가 높은 병원 물질로서 유.에스. 센터스 포 디지즈 컨트롤 앤드 프리벤션(U.S. Centers for Disease Control and Prevention)에 의해 확인된 다른 바이러스 물질 (즉, 카테고리 A, B, 및 C 물질; 참조: Moran, Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20(2):311-30 및 Darling et al., Emerg. Med. Clin. North Am. 2002;20(2):273-309)을 포함한다. 한 구체예에서, IFN α -알부민 융합 단백질 또는 IFN 하이브리드 융합 단백질은 치료를 받은 적이 없는 환자뿐만 아니라 치료 경험이 있는 성인 및 소아 환자에서 HIV-1 감염, HCV, 또는 HIV-1 및 HCV 동시감염을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해 CCR5 길항제와 함께 투여되며, 추가로 리바비린, IL-2, IL-12, 펜타푸시드 단독 또는 항-HIV 약물 요법, 예를 들어 HAART와의 병용 중 하나 이상과 함께 투여된다.

<1594> 실시예 73: 유전자형 1의 인터페론-나이프(naive) 만성 C형 간염(HCV) 환자에서의 리바비린과 조합된 HSA-IFN α 2b의 항바이러스 활성

<1595> 배경:

<1596> 유전자형 1의 인터페론-나이프(IFN-나이프) HCV 환자의 통상적인 치료는 48주 동안 리바비린(RBV)과 조합된 인터페론 α 를 이용한다. 그러나, 이러한 치료는 유의한 실용적 한계를 지닌다. 현재의 인터페론 요법의 널리 공지된 부작용으로 인해, 인터페론의 각각의 투여 후에 환자의 삶의 질은 현저하게 감소된다. 최소한 매주 투여를 요하는 현재의 프로토콜은 지속된 기간 동안 삶의 질을 감소시킨다. 매우 많은 수의 환자가 결과적으로

치료를 중단하며, 몇몇 연구에서 중단 비율이 50%를 초과하는 것을 보고하고 있다. 더욱이, 현재의 인터페론 요법은 또한 상당한 비율의 현저한 혈액학적 감소를 발생시키고, 이는 RBV 용량의 감소를 요할 수 있으며, 보다 유의하게는 혈액학적 수치가 정상화될때까지 인터페론 치료 요법을 일시적으로 중단하는 것을 요할 수 있다. 따라서, IFN-나이트 환자에서 유전자형 1 HCV의 개선된 치료 프로토콜이 명백히 필요하다.

설명:

성숙한 인터페론 α -2b의 N-말단에 성숙 알부민의 C-말단을 유전학적으로 융합시킴으로써 HSA-IFN α 2b를 생성시켰다. 유전자형 1의 IFN-나이프 HCV 인간 환자에서의 활성 조절 임상 연구로 RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b를 이용한 치료의 안전성 및 효능을 평가하였고, 활성 대조군으로서 RBV와 조합된 PEG-IFN α -2a(PEG-IFN)를 이용한 통상적인 치료와 비교하였다.

방법:

유전자형 1의 IFN-나이브인 인간 HCV 환자를 리바비린(RBV)와 조합된 HSA-IFN α 2b 또는 활성 대조군인 PEG-IFN으로 치료하였다. 더욱 특히, 458명의 인간 환자를 (a) 1주에 1회(Q1w) 180 μ g으로 투여된 PEG-IFN; (b) 2주에 1회(Q2w) 900 μ g으로 투여된 HSA-IFN α 2B; (c) Q2w로 1200 μ g으로 투여된 HSA-IFN α 2b; 또는 (d) 4주에 1회(Q4w) 1200 μ g으로 투여된 HSA-IFN α 2b의 4개의 피하(sc) 치료 군으로 무작위화시켰다.

각 치료군의 각각의 환자에 체중에 기초하여 1000-1200 mg/일의 RBV를 투여하였다. 층별화는 위한 기준은 신체 질량지수(BMI) ($<25 \text{ kg/m}^2$ 또는 $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) 및 HCV RNA 역가($<800,000 \text{ IU/ml}$ 또는 $\geq 800,000 \text{ IU/ml}$)을 포함하였다.

연구 치료 기간은 48주였고, 24주의 추적 기간을 두었다. 연구의 1차 효능 종점은 치료 완료 24주 후의 검출가능하지 않은 바이러스 로드(load)(HCV RNA <10 IU/ml)로 정의되는 지속적 바이러스 반응(SVR)이다.

43 IU 내지 69,000,000 IU/mL의 민감도 범위(정량 수준(LOQ)) 및 10 IU/mL의 검출 수준(LOD)를 지니는 실시간 PCR 분석인 Quantascore™ (Labcorp)을 이용하여 HCV RNA 역가를 측정하였다. 알려진 트랜스퍼라아제(ALT), 및 전체 호중구 수치(ANC), 헤모글로빈 및 혈소판 수치를 포함하는 혈액학적 효과를 당 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 측정하였다.

치료 의향(ITT) 환자를 상기 환자가 임의의 데이터 포인트를 상실하거나 연구에서 탈락하거나 그렇지 않은 간에 상관없이 각각의 치료군의 모두 무작위화되고 치료된 환자로 정의하였다. 변형된 치료 의향(MITT) 환자를 상기 환자의 연구 등록일에 기초하여 24주에 방문가능한 환자로 정의하였다.

결과 및 논의:

환자의 인구통계적 항바이러스 반응 및 혈액학적 감소를 표 7(1차 잠정 분석) 및 표 11(최종 잠정 분석)에 요약하였다. 종합적으로, 모든 4개의 치료 프로토콜은 충분히 용인되었고, 등급 3-4 lab 값 또는 부작용으로 인한 중단과 관련하여 치료군 사이에 현저한 차이가 없었다.

표 7. 인구통계적 항바이러스 반응 및 혈액학적 효과의 예비 잠정 분석

	<u>PEG-IFN</u> <u>180 μg Q1w (n=114)</u>	<u>HSA-IFN a 2b</u> <u>1200 μg Q2w</u> <u>(n=110)</u>	<u>HSA-IFN a 2b</u> <u>900 μg Q2w</u> <u>(n=118)</u>	<u>HSA-IFN a 2b</u> <u>1200 μg Q4w</u> <u>(n=116)</u>
<u>인구통계</u>				
<u>남성</u>	<u>58%</u>	<u>58%</u>	<u>55%</u>	<u>67%</u>
<u>평균 BMI (kg/m^2)</u>	<u>25.1</u>	<u>25.7</u>	<u>25.4</u>	<u>26.1</u>
<u>· BMI $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$</u>	<u>53%</u>	<u>49%</u>	<u>49%</u>	<u>51%</u>
<u>정중 HCV RNA ($\log$</u>	<u>6.0</u>	<u>6.0</u>	<u>6.1</u>	<u>6.1</u>
<u>IU/ml)</u>	<u>62%</u>	<u>55%</u>	<u>56%</u>	<u>62%</u>
<u>· RNA $\geq 800,000$</u>				
<u>IU/ml</u>				

12주에서의 효능 HCV RNA 음성 (<LOQ) · BMI <25 kg/m ² vs. ≥25 kg/m ² EVR12 (≥2 log 감소) 2 nd 단계 기울기 >0.6 log/wk AKT의 정상화	70/112 (62.5%) [¶] 71.1% vs. 54.2% 96/112 (85.7%) 49% 12/73 (16.4%)	77/104 (74.0%) [¶] 74.1% vs. 74.0% 91/104 (87.5%) 58% 17/80 (21.2%)	74/112 (66.1%) 70.7% vs. 61.1% 90/112 (80.4%) 52% 18.81 (22.2%)	57/109 (52.3%)* 55.6% vs. 49.1% 80/109 (73.4%) 42% 27/83 (32.5%) [#]
12주에서의 실험실 ANC<750/mm ³ ANC<500/mm ³ Hb<12 g/dL 혈소판<50,000/mm ³	17.5% 2.6% 64% 3.5%	20.0% 3.6% 70.0% 2.7%	22.0% 3.4% 69.5% 1.7%	4.3%** 0.9% 49.1%** 0.9%

* p-값<0.05 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w vs. Q4w; [¶]p-값 0.068 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w vs. PEG-IFN; [#]p-값 <0.05 HSA-IFN α B 1200 μg Q4w vs. PEG-IFN; ** p-값 <0.05 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w vs. 모든 기타 군

표 8. 인구통계적 항바이러스 반응 및 혈액학적 효과의 최종 잠정 분석

	<u>PEG-IFN</u> <u>180 μg Q1w</u> <u>(n=114)</u>	<u>HSA-IFN α 2b</u> <u>1200 μg Q2w</u> <u>(n=110)</u>	<u>HSA-IFN α 2b</u> <u>900 μg Q2w</u> <u>(n=118)</u>	<u>HSA-IFN α 2b</u> <u>1200 μg Q4w</u> <u>(n=116)</u>
인구통계				
남성	58%	58%	56%	67%
평균 BMI (kg/m ²)	25.1	25.7	25.6	26.0
· BMI ≥25 kg/m ²	50%	48%	51%	50%
정중 HCV RNA (log IU/ml)	6.1	6.0	6.1	6.1
· RNA ≥800,000 IU/ml	62%	55%	56%	62%
12주 ITT에서의 효능				
HCV RNA 음성 (<LOQ)	75/114 (65.8%) [¶]	82/110 (74.5%) [¶]	82/118 (69.5%)	62/116 (53.4%)*
· BMI <25 kg/m ² vs. ≥25 kg/m ²	71.9% vs. 59.6%	77.2% vs. 71.7%	74.1% vs. 65.0%	56.9% vs. 50.0%
EVR12 (≥2 log 감소)	49%	58%	99/118 (83.9%)	88/116 (75.9%)
2 nd 단계 기울기 >0.6 log/wk	11/73 (15.1%)	17/79 (21.5%)	52% 17/80 (21.3%)	42% 26/83 (31.3%) [#]
ALT의 정상화				
20주 ITT에서의 효능				
HCV RNA <LOD (검출가능하지 않음)	77/114 (67.5%)	82/110 (74.5%)	83/118 (70.3%)	70/116 (60.3%)
24주 MITT에서의 효능				
HCV RNA <LOD (검출가능하지 않음)	57/90 (63.3%)	64/91 (70.3%)	58/87 (66.7%)	58/83 (69.9%)
12주에서의 실험실				
ANC<750/mm ³	20.2%	21.8%	22.0%	6.0%**
ANC<500/mm ³	3.5%	3.6%	3.4%	1.7%
Hb<12 g/dL	65%	74%	70%	52%**
혈소판<50,000/mm ³	3.5%	2.7%	1.7%	0.9%

<1612> *p-값<0.05 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w vs. Q4w; [†]p-값 0.15 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w vs. PEG-IFN; [#]p-값 <0.05 HSA-IFNα2B 1200 μg Q4w vs. PEG-IFN; **p-값 <0.05 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w vs. 모든 기타 군

<1613> **SVR의 항바이러스 반응 예측인자(Predictor)**

<1614> SVR의 항바이러스 반응 예측인자를 0.6 log/wk을 초과하는 2단계 기율기(2nd 기율기)를 지나는 치료 12주에서의 음성 HCV RNA 역가(즉, LOQ 미만의 HCV RNA 역가를 지님)로 정의하였다. 항바이러스 반응 곡선의 기율기의 단계는 두개의 활성을 나타낸다. 첫번째 단계는 반응의 직접적인 항바이러스 활성을 나타낸다. 두번째 단계는 치료 화합물에 의한 HCV 감염된 세포의 파괴를 예측한다. 따라서, 0.6 log/wk를 초과하는 두번째 단계의 기율기의 값은 SVR의 우수한 예측인자이다(양성 예측치(PPV) > 90%).

<1615> 12주의 ITT에서의 SVR의 항바이러스 반응 예측인자는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료군에서 가장 높았고, 이는 PEG-IFN 대조 치료에서의 75/114 환자 또는 65.8% ((최종 잠정 분석)(70/112 또는 62.5% (예비 잠정 분석))) 및 49%에서에 비해, 82/110명 또는 74.5%의 환자((최종 잠정 분석)(77/104 또는 74.0% (예비 분석)))가 HCV RNA 음성 수준(즉, LOQ 미만의 수준(<43 IU/mL))을 지녔고, 58%가 0.6 log/wk를 초과하는 두번째 단계의 기율기를 나타내었다. 이러한 데이터는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료 프로토콜이 12주의 PEG-IFN을 이용한 통상적인 치료와 적어도 동등한 항바이러스 활성을 지니는 것을 나타낸다. HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료 프로토콜에서 12주에서의 RNA 음성(즉, LOQ 미만의 HCV RNA 역가 수준을 지니는 환자의 수)은 PEG-IFN 대조 치료에 비해 약 9%(최종 잠정 분석) 및 12%(예비 잠정 분석) 더 높고, 두번째 단계의 기율기가 약 9%(최종 및 예비 잠정 분석 둘 모두) 더 높으므로, HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료 프로토콜은 통상적인 PEG-IFN 치료에 비해 우수한 효능을 발생시킬 수 있다. HSA-IFN α 2b 900 μg Q2w 및 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w 치료군에서 HCV RNA 음성을 지니는 환자의 수는 PEG-IFN을 이용한 통상적인 치료와 유사하였다.

<1616> 20 및 24주에서의 SVR의 항바이러스 반응 예측인자는 검출 수준(LOD) 미만(즉, <10 IU/mL)의 HCV RNA 역가를 지니는 환자로 나타낸다. 20주에서의 SVR의 항바이러스 반응 예측인자는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료군에서 가장 높았고, 이는 PEG-IFN 대조 치료에서의 77/114 또는 67.5%(최종 잠정 분석)에 비해, 82/110의 환자 또는 74.5%(최종 잠정 분석)가 검출가능하지 않은 HCV RNA 수준(즉, <10 IU/mL)을 지녔다. 유사하게, 24주에서의 SVR의 항바이러스 반응 예측인자는 IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료군에서 가장 높았고, 여기서 64/91 또는 70.3%(최종 잠정 분석)가 검출되지 않는 HCV RNA 수준을 지닌 반면, PEG-IFN 대조 치료는 57/90 또는 63.3%가 검출되지 않는 HCV RNA 수준을 지녔다. 20주 및 24주 데이터 둘 모두는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료 프로토콜이 개선된 투여 스케줄과 함께, PEG-IFN을 이용한 통상적인 치료와 적어도 동등한 항바이러스 활성 및 안전성을 지니는 것을 나타낸다.

<1617> **ALT 수준의 정상화**

<1618> 환자에서의 간기능의 통상적인 척도는 알라닌 트랜스퍼라아제(ALT)의 수준이다. HCV 감염 환자의 특징 중 하나는 간손상을 나타내는 높은 혈청 ALT 수준이다. 따라서, ALT 수준의 정상화는 간기능의 개선에 해당하고, 치료에 대한 유리한 예후이다. 모든 치료 프로토콜이 ALT 수준을 정상화시키는 약간의 능력을 나타내었으나, 가장 극적인 효과는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w 치료 프로토콜에서 관찰되었으며, 이는 PEG-IFN를 이용한 통상적인 치료에 비해 2배를 초과하는 많은 환자(최종 및 예비 잠정 분석)가 정상화된 ALT 수준을 달성하였다. 따라서, 1200 μg Q4w로 투여된 HSA-IFN α 2b는 놀랍게도 유전자형 1의 IFN-나이프 HCV 환자에서 간기능을 정상화시키는 데 있어서 통상적인 PEG-IFN 치료보다 더욱 효과적이다.

<1619> **혈액학적 효과**

<1620> 조합 치료 프로토콜에서 IFN 및 RBV의 최대 용량에 대한 순응 및 노출을 보장하는 것은 SVR 비율을 최대화시키는데 중요하다.

<1621> IFN 및 RBV를 이용한 조합 치료 동안 혈액학적 감소는 통상적인 일이다. RBV-유도 용혈로 인한 헤모글로빈(Hb)의 감소는 RBV의 용량 감소를 필요로 한다. 특히, 12g/dL 미만의 Hb는 1000-1200 mg/일로부터 800 mg/일로 RBV를 감소시키는 것을 필요로 한다. RBV 용량은 HCV 재발을 예방하는데 중요하다. HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4W 치료 프로토콜은 놀랍게도 Hb <12g/dL에서 현저하게 적은 감소(PEG-IFN의 65%에 비해 52% (최종 잠정 분석); PEG-IFN의 64%에 비해 49.1% (예비 잠정 분석))를 지녔다. 이는 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4W 치료 프로토콜을 이용한 보다 적은 재발율로 해석될 수 있고, 이는 개선된 SVR을 가능케 한다.

<1622> ANC <750/mm³에서의 감소는 조합 치료의 IFN 성분의 용량 감소를 필요로 한다. 놀랍게도, HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w 치료 프로토콜은 PEG-IFN에 비해 현저하게 적은 ANC <750/mm³를 지녔다(각각 6% 대 20.2%(최종 잠정 분석); 4.3% 대 17.5%(예비 잠정 분석)). 이는 또한 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w 치료 프로토콜을 이용하는데 필요한 보다 낮은 용량 감소에서 높은 SVE 비율이 제공되는 것으로 해석될 수 있다.

<1623> 유사한 혈액학적 감소가 12주에서 HSA-IFN α 2b Q2w 및 PEG-IFN 처리군 사이에서 발생하였다. 그러나, 놀랍게도 12주에서 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4w 처리군에서 관찰된 혈액학적 감소는 PEG-IFN 처리군에서 관찰된 것보다 약 75% 적었다. 이러한 결과는 HSA-IFN α 2b Q4w가 PEG-IFN 치료에 비해 우수한 안전성 프로파일 및 개선된 재발율을 제공할 수 있음을 나타낸다.

<1624> 치료 완료 12주 후의 항바이러스 반응

<1625> ITT 분석에 의한 치료 완료 12주 후에서의 지속된 바이러스 반응(SVR 12) 비율은 PEG-IFN의 54.4%에 비해 900Q2w에서 59.3%, 1200Q2w에서 55.5%, 1200Q4w에서 52.6%였다. IFN 및 RBV 치료에 대해 ≥80%인 환자에서, SVR12 비율은 1200Q4w에서의 67.5% 및 PEG-IFN에서의 63.0%에 비해 900Q2w 및 1200Q2w에서 가장 높았다(각각 73.8% 및 72.0%). 특히, 보다 무거운 환자(≥75 kg)에서, alb-IFN에 대한 SVR12 비율은 유지된 반면, PEG-IFN에 대해서는 감소하였다. 또한, 요법에 대해 80% 이상 이행된 환자에서, 재발률은 PEG-IFN (29.7%)에 비해 모든 alb-IFN 암(arm), 특히 900Q2w (13.0%)에서 감소하였다(p=0.0261). 종합적으로, 요법에 처음 12w에 걸친 항바이러스 반응 프로파일은 SVR12의 전조가 되었고, 1200Q4w 암에 대한 반응 프로파일은 가장 높은 양성 예측 값을 지녔다. 부작용으로 인한 중단은 900Q2w 암의 9.3%, 1200Q4w 암의 12.1% 및 1200Q2w 암의 19.1%에 비해 PEG-IFN 암에서 6.1%였다. 혈액학적 감소는 alb-IFN 1200Q4w 암에서 가장 낮았고, 다른 암 사이에서는 동등하였다. SF-36에 의해 측정된 삶의 질은 900Q2w 암에서 가장 바람직하였다.

<1626> 치료 완료 24주 후의 항바이러스 반응

<1627> 표 9에 나타난 바와 같이, ITT 분석에 기초한 치료 24주 후에서 지속적인 바이러스 반응 (SVR) (HCV RNA<10 IU/ml)이 달성된 환자의 백분율은 PEG-IFN의 57.9%에 비해 900Q2w에서 58.5%, 1200Q2w에서 55.5%, 1200Q4w에 대해 50.9%였다. 종합적으로, 치료 24주 후에서 모든 치료 환자에서, SVR 비율은 PEG-IFN의 66.7%에 비해 900Q2w에서 72.3%, 1200Q2w에서 70.6%, 1200Q4w에서 62%였다. 놀랍게도, 체중이 75 kg 이상인 치료 환자에서, SVR 비율은 alb-IFN 암에 대해서는 유지되었고, PEG-IFN에 대해서는 감소하였다. 이러한 서브그룹에서, SVR 비율은 PEG-IFN의 53.3%에 비해 900Q2w에서 74.2%, 1200Q2w에서 67.9%, 1200Q4w에서 61.0%였다. 따라서, 체중이 75 kg 이상인 환자에서 900Q2w, 1200Q2w 및 1200Q4w의 HSA-IFN α 2b의 투여는 PEG-IFN의 통상적인 치료를 받은 환자가 투여 스케줄로 인해 평균 개월당 2 내지 3회의 추가 투여를 받았음에도 불구하고 통상적인 PEG-IFN 치료에 비해 높은 효능을 발생시켰다.

<1628> 표 9. 치료 분석의 완료 24주 후의 인구통계적 항바이러스 효능 및 혈액학적 효과

<1629>

	Alb-IFN 900μg Q2w (n=118)	Alb-IFN 1200μg Q2w (n=110)	Alb-IFN 1200μg Q4w (n=116)	Peg-IFN α-2a 180μg (n=114) Qw
인구통계				
남성	66 (55.9%)	64 (58.2%)	78 (67.2%)	66 (57.9%)
평균 BMI (kg/m ²)	25.4	25.6	26.1	25.1
체중 ≥ 75 kg	59 (50.0%)	59 (53.6%)	62 (53.4%)	46 (40.4%)
정중 HCV RNA (log IU/ml)	6.1	6.0	6.1	6.1
SVR 비율				
전체	69 (58.5%)	61 (55.5%)	59 (50.9%)	66 (57.9%)
≥80% 이행	47/65 (72.3%)	36/51 (70.6%)	49/79 (62.0%)	48/72 (66.7%)
체중 (<75 kg, ≥75 kg)	(70.6%, 74.2%)	(73.9%, 67.9%)	(63.2%, 61.0%)	(76.2%, 53.3%)
실험실				
ANC<750/mm ³	28 (23.7%)	25 (22.7%)	12 (10.3%)	23 (20.2%)
Hb<10 g/dL	25 (21.2%)	31 (28.2%)	14 (12.1%)	22 (19.3%)

<1630> 삶의 질 분석

<1631> SF-36 건강 조사에 기초하여, 알부페론 900 Q2w 치료군의 환자는 48주 치료군을 통해 모든 시점에서 신체적 구성요소 및 정신적 구성요소의 SF-36 개요 척도 둘 모두에 의해 측정시 PEG-IFN 치료군의 환자에 비해 건강 관련 삶의 질의 장애가 덜한 것으로 보고되었다. 또한, 알부페론 900 Q2w 치료군의 작업 환자의 3.0% 및 5.8%만이 12 및 24주에서 방문 한달전 동안 7일의 작업을 빠뜨린 것으로 보고되었고, 이에 비해 PEG-IFN에 대해서는 12 및 24주에서 각각 19.2% 및 22.4%였다. 치료 12 및 24주에서, 900Q2w 치료군은 PEG-IFN에 비해 모든 10개의 SF-36 도메인에서 보다 양호하게 수행되었다.

<1632> 결론

<1633> 12주에서, 유전자형 1의 IFN-나이트 HCV에서의 최대 항바이러스 활성이 HSA-IFN α2b 1200 μg Q2w 치료군에서 관찰되었다. 혈액학적 감소에 대한 유사한 효과가 HSA-IFN α2b 1200 μg Q2w 및 PEG-IFN 치료군에서 관찰되었다. 더욱이, 20 및 24주에서, 최대 항바이러스 활성이 또한 HSA-IFN α2b 1200 μg Q2w 치료군에서 관찰되었다. 동등한 항바이러스 활성이 HSA-IFN α2b 900 μg Q2w 치료군에서 20 및 24주에 지속적으로 관찰되었다. 치료 완료 24주 후, 유전자형 1의 IFN-나이트 HCV의 최대 효능이 HSA-IFN α2b 900 μg Q2w 치료군에서 관찰되었다. 따라서, HSA-IFN α2b 900 μg Q2w는 개선된 투여 스케줄과 함께, 현재의 표준 치료인 PEG-IFN과 적어도 동등한 효능 및 안전성 프로파일을 제공할 수 있으며, 이는 환자에게 매우 편리한 것으로 해석된다. 900 μg Q2w 투여 스케줄은 보다 유리한 삶의 질 영향 및 PEG-IFN과 동등한 SVR 비율과 함께, PEG-IFN 주사수의 반을 필요로 한다. 또한, 1200 μg Q2w는 동등한 효능 및 개선된 투여 스케줄과 함께, 현재의 표준 치료인 PEG-IFN과 적어도 동등한 안전성 프로파일을 제공할 수 있으며, 이는 환자에게 매우 편리한 것으로 해석된다.

<1634> HSA-IFN α2b 1200 μg Q4W 프로토콜을 이용한 치료는 놀랍게도 PEG-IFN 통상 치료를 받는 환자가 투여 스케줄로 인해 3회의 추가 투여를 받았음에도 불구하고 통상적인 PEG-IFN 치료에 비해 12주에서 동등한 효능을 나타내었다. HSA-IFN α2b 1200 μg Q4W의 동등한 효능을 20주 및 24주에 걸쳐 지속적으로 통상적인 PEG-IFN 치료와 비교하였다. 간기능을 안정화시키고 혈액학적 인자의 감소를 극적으로 감소시키는 개선된 능력을 또한 12주에 HSA-IFN α2b 1200 μg Q4W 치료군에서 관찰하였고, 이는 상기 환자에서의 간 손상의 개선, 및 용량-감소 또는 일시적 종료 및 치료 후에 가능한 재발의 발생의 감소를 나타낸다. 1200 μg Q4W의 HSA-IFN α2b를 이용한 치료 24주 후, 환자의 절반 이상이 지속적인 바이러스 반응을 달성하였다. 따라서, 이러한 결과는 HSA-IFN α2b 1200 μg Q4W를 이요한 치료가 개선된 투여 스케줄, 간기능을 정상화시키는 보다 높은 능력 및 보다 낮은 혈액학적 감소의 이점과 함께 PEG-IFN과의 조합 치료와 동등한 효능을 제공할 수 있어, 환자에서 보다 높은 순응 및 편의, 및 보다 바람직한 치료후 효과를 발생시킬 수 있음을 암시한다. 요약하면, HCV 치료 분야에서의 최근의 발전이 제공시, HSA-IFN α2b Q4W 치료 프로토콜은 이상적인 특성(예를 들어, 동등한 효능, 우수한 용인성, 보다 높은 순응을 발생시키는 우수한 편의성)을 지녀, 인터페론-항바이러스 조합 요법을 위한 인터페론-선택 골격(interferon-backbone-of-choice)이 될 것이다.

<1635> 유리하게는, 900Q2w 및 1200Q2w HSA-IFN α2b 치료군에서, 체중이 75 kg 이상인 치료에 대해 80% 이상 이행된 환자는 PEG-IFN과 비교시 치료 완료 24주 후에 우수한 SVR 비율을 달성하였다. 우수한 SVR 비율을 달성하는 능력 외에 무거운 환자에서의 치료에 걸쳐 효능을 유지시키는 능력은 환자의 다수의 백분율이 75 kg을 초과하는 체중인 특정 국가(예를 들어, 미국)에서 특히 중요하다.

<1636> 종합적으로, 이러한 결과는 HSA-IFN α2b 및 RBV를 이용한 유전자형 1의 IFN-나이트 HCV 환자의 조합치료가 개선된 투여 스케줄의 이점과 함께 적어도 통상적인 PEG-IFN 및 RBV 조합 치료만큼 효과적인 치료임을 암시한다. 특히, 이러한 결과는 RBV와 조합된 HSA-IFN α2b를 이용한 치료가 개선되고 고도로 유리한 투여 스케줄을 지니면서 RBV를 이용한 통상적인 PEG-IFN 조합 치료와 비교하여 유사한 안전성 프로파일, 우수한 안전성 프로파일을 지니는 유사한 효능, 또는 우수한 효능 및 안전성 둘 모두를 지닐 수 있음을 암시한다.

<1637> 실시예 74: 유전자형 1의 인터페론 나이트 만성 C형 간염(HCV) 환자에서의 2주의 1회 또는 4주의 1회의 리바비린과 조합된 HSA-IFN α2b의 투여는 12주 치료에서 동등한 항바이러스 반응을 입증한다

<1638> 배경

<1639> 상기 논의된 바와 같이, 만성 C형 간염(CHC)의 치료를 위한 현재의 인터페론 요법은 독감 유사 증상, 피로 및 우울증을 포함하나 이에 제한되지 않는 유의한 부작용과 관련된다. 따라서, 인터페론 요법 동안 환자의 삶의 질은 현저하게 감소된다. 현재의 표준 치료는 적어도 매주의 투여를 필요로 하므로, 삶의 질이 감소되는 기간이 많아진다. 더욱이, 매주의 투여의 필요조건은 환자에게 불편함을 주는 것으로 보여진다. 빈번한 투여 스케

줄과 환자의 삶의 질에 대한 유의한 감소의 조합은 유의한 수의 환자가 치료를 중단하게 만든다. 따라서, 환자의 편의 및 내성을 증가시키는 IFN-나이트 환자에게서 유전자형 1의 HCV의 치료를 위한 개선된 치료 프로토콜이 명백히 필요하다. 투여 요법의 주요 목적은 지속적인 바이러스 반응(SVR) 또는 치료를 달성하기 위해 인터페론 요법 기간 동안 정량적 수준 미만의 HCV RNA 수준을 달성하고 이를 유지시키기 위한 것이다. 그러나, 매주의 투여는 2주에 1회 투여에 비해 환자에게 투여되는 약의 양이 두배가 되고, 4주에 1회 투여되는 약물의 양에 4배가 되므로, 이러한 투여 스케줄이 상기 목적을 달성하는지의 우려가 존재한다.

<1640> 설명

<1641> 치료 4주에서의 신속한 바이러스 반응(RVR)은 폐결화된 인터페론(PEG-IFN)으로 치료된 HCV 환자에서의 지속적인 바이러스 반응(SVR)에 대한 강력한 양성 예측인자이다. 성숙한 인터페론 α2b의 N-말단에 성숙한 알부민의 C-말단을 유전학적으로 융합시킴으로써 HSA-IFN α2b를 제조하였다. 리바비린(RBV)과 조합된 HSA-IFN α2b를 이용한 치료의 안전성 및 효능을 유전자형 1의 IFN-나이트 HCV 인간 환자에서의 활성 조절 임상 연구로 평가하였고, 이를 활성 대조군으로서 RBV와 조합된 PEG-IFN α-2a (PEG-IFN)를 이용한 통상적인 치료와 비교하였다. 2주에 1회(Q2w) 또는 4주에 1회(Q4w) 투여되는 HSA-IFN α2b를 이용한 초기 항바이러스 반응을 보다 덜 빈번한 투여 스케줄로 RBV와 조합된 HSA-IFN α2b를 이용한 치료가 RNA 음성, 예를 들어 HCV RNA <LOQ를 유지할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해 PEG-IFN과 비교하였다.

<1642> 방법

<1643> 유전자형 1의 IFN-나이트인 인간 HCV 환자를 실시예 73에 기재된 바와 같이 치료하였다. RVR (치료 4주에서의 HCV RNA <LOQ)를 달성한 환자에서의 치료 12주에서의 초기 바이러스 반응의 분석(≥2 log HCV RNA 감소로 정의되는 EVR, 또는 HCV RNA <LOQ로 정의되는 RNA 음성)을 표 10에 제시하였다.

<1644> 표 10. RVR를 지닌 환자에서의 치료 12주에서의 초기 바이러스 반응

ITT 분석	<i>Peg-IFNα2a</i> <i>180μg Q1w</i> <i>(n=114)</i>	<i>HSA-IFN α 2b</i> <i>1200μg Q2w</i> <i>(n=110)</i>	<i>HSA-IFN α 2b</i> <i>900μg Q2w</i> <i>(n=118)</i>	<i>HSA-IFN α 2b</i> <i>1200μg Q4w</i> <i>(n=116)</i>
<i>RVR을 지닌 환자</i> <i>(w4에서의 HCV RNA <LOQ)</i>	26% (30/114)	34% (37/110)	25% (29/118)	18% (21/116)
<i>RVR 환자 중:</i>				
<i>Wk 12: EVR을 달성하지 않음</i>	0% (0/30)	0% (0/37)	3% (1/29)	0% (0/21)
<i>Wk 12: HCV RNA <LOQ</i>	97% (29/30)	100% (37/37)	97% (28/29)	100% (21/21)
<i>w2에서 2 log 감소를 지닌 환자</i>	32% (36/114)	47% (52/110)	36% (43/118)	41% (47/116)
<i>이 환자 중:</i>				
<i>Wk 12: EVR을 달성하지 않음</i>	6% (2/36)	6% (3/52)	2% (1/43)	2% (1/47)
<i>Wk 12: HCV RNA <LOQ</i>	92% (33/36)	92% (48/52)	95% (41/43)	91% (43/47)

<1646> 결과 및 논의

<1647> 2주의 연구 방문은 HSA-IFN α2b의 두번째 투여 또는 PEG-IFN의 세번째 투여 전에 발생한다. 2주에서 ≥2 log HCV RNA를 달성한 900 μg의 HSA-IFN α2b Q2w를 투여받은 환자의 비율은 PEG-IFN을 투여받은 환자의 비율과 유사하였다. 2주에서 ≥2 log HCV RNA의 감소가 달성된 환자의 비율은 상기 환자가 2주에 1회 또는 4주에 1회 투여되는지의 여부와 상관 없이 PEG-IFN보다 1200 μg 치료군 둘 모두에서 높았다(P=0.03). HCV RNA에서 ≥2 log 감소를 지닌 환자 대부분은 12주에서 RNA 음성을 달성하였다. 또한, 12주에서 RNA 음성이 달성된 상기 환자의 비율은 모든 치료군에서 유사하였다(92% PEG-IFN; 95% HSA-IFN α2b 900 Q2w; 92% HSA-IFN α2b 1200 Q2w; 및 91% HSA-IFN α2b 1200 Q4w). 따라서, 2주에서의 항바이러스 반응은 Q2w 및 Q4w HSA-IFN α2b 치료군 둘 모두에서 12주의 반응 결과를 확실히 예보한다. 4주 및 12주에서 RNA 음성인 환자는 90%를 초과하는 SVR을 달성할 기회를 지닌다. 또한, 이러한 데이터는 치료 2주까지(HSA-IFN α2b의 단일 용량의 투여 후), 1200 μg Q2w 또는

Q4w의 HSA-IFN α 2b를 이용한 치료가 최소한 효능이 있고, PEG-IFN 치료보다 더욱 효능이 있을 수 있음을 암시한다. 또한, 1200 μg 용량의 HSA-IFN α 2b는 치료가 어려운(hard-to-treat) 유전자형 1의 집단에서 900 μg 용량의 HSA-IFN α 2b 또는 PEG-IFN보다 높은 항바이러스 활성을 제공하므로, 용량을 증가(예를 들어, 1800 μg)시키는 것이 더욱 효과적일 수 있을 것이다.

<1648> 2주에서 ≥ 2 log HCV RNA 감소가 달성된 환자의 비율은 1200 μg Q4W 치료군 보다 높으나, RVR이 달성된 환자의 비율은 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료군 또는 PEG-IFN 치료군 보다 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4W 치료군에서 낮다. HSA-IFN α 2b 1200 μg Q2w 치료군에서 RVR이 달성된 환자의 비율은 PEG-IFN 치료군 보다 높았다. 또한, RVR은 12주에서의 EVR 및 RNA 음성과 확실히 관련이 있었다($P < 0.001$). 12주에서, RVR을 지닌 환자는 모든 치료 암에서 97-100%의 유사한 EVR 또는 HCV 음성을 지녔었다. 따라서, RVR을 달성하는 환자의 비율이 PEG-IFN 치료군보다 HSA-IFN α 2b 1200 μg Q4W 치료군에서 낮았으나, 상기 환자의 100%가 12주에서 RNA 음성을 유지하였고, 이는 상기 치료 프로토콜이 실용적인 치료 프로토콜임을 암시한다. 또한, PEG-IFN 치료군에 비해 HSA-IFN α 2b 1200 μg 치료군에서 RVR이 달성된 환자의 비율이 더 높았고, 이는 Q4w 치료군에서 2주에 두번째 투여의 추가가 RVR을 증가시켰을 수 있음을 암시한다.

<1649> 종합적으로, 상기 데이터는 RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b의 덜 빈번한 투여 스케줄이 유전자형 1의 치료-나이프 환자의 치료에 있어서 PEG-IFN만큼 또는 이보다 더 효능적일 수 있음을 암시한다. 또한, 축적된 데이터는 치료 프로토콜의 처음 4주 동안 2주에 1회, 이후 24-48주 동안 4주에 1회로 1200 μg 또는 이 이상(예를 들어, 1800 μg)의 전체 농도로 HSA-IFN α 2b를 투여하는 것을 포함하는 치료 요법이 현재 표준 치료만큼 또는 이보다 더 우수할 수 있음을 암시한다. 더욱이, 이러한 데이터는 상기 조합 치료 요법이 Q2w 요법과 동등하거나 이보다 나은 효능과 함께 Q4w 요법의 편의성 및 용인성을 환자에 제공함을 암시한다.

<1650> 실시예 75: 리바비린과 조합된 HSA-IFN α 2b에 대한 만성 C형 간염(HCV) 비-반응자 환자의 반응

<1651> 배경

<1652> 미국에서는 4백만명의 사람이 C형 간염 바이러스(HCV)에 감염되고, 이는 상기 바이러스가 미국에서 간질환의 가장 흔한 병인으로 만들었다. 항바이러스 분자인 리바비린(RBV)의 현재의 치료를 이용하거나 이용하지 않는 인터페론 알파(IFN α)는 통상적으로 환자에 대한 가장 효과적인 치료로 인지되어 왔다. 보다 최근에, 인터페론 알파의 폐결화된 형태가 RBV와 조합된 HCV의 치료에 대해 승인되었다. 이러한 폐결화된 인터페론은 표준 인터페론 또는 리바비린 요법과 조합된 인터페론 보다 HCV 치료에 있어서 보다 효과적인 것이 밝혀졌고, 이는 HCV에 대한 통상적인 치료가 될 것이다.

<1653> 그러나, 이러한 치료는 유의한 실용적 한계를 지닌다. 치료 동안 환자의 삶의 질의 현저한 감소 및 통상적인 요법과 관련된 현저한 혈액학적 감소의 현저한 비율의 널리 공지된 부작용 외에, 통상적인 요법은 HCV에 대한 현재의 치료를 받는 환자의 높은 비율에서 효과적이지 않다. 이전에 IFN α-RBV 요법을 받지 않은 HCV환자 치료의 임상 연구는 통상적인 치료를 개시한 환자의 약 45%가 명백한 HCV를 실패하고, 만성적으로 감염된 채로 유지(예를 들어, 비-반응자)되는 것으로 나타났다. 사회에서, 상기 요법에 반응하는 환자의 비율은 상당히 적다.

<1654> 임상 연구자들은 폐결화된 IFN α 및 RBV의 통상적인 요법을 이용하여 IFN α 또는 RBV와 조합된 IFN α를 이용한 이전의 치료에 반응하는데 실패한 HCV 환자의 비반응자 집단을 재치료함으로써 상기 환자의 요구에 부응하였다. 예를 들어, 문헌[Shiffman *et al.*, Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment, *Gastroenterology* 126(4):1015-23 (2004)]을 참조하라. 본 실험에 등록된 환자의 35%가 통상적인 요법을 이용한 재치료 20주 후에 HCV RNA의 증거가 없었으나, 이들 환자 중 다수는 치료 중단후 재발하였다. 따라서, 환자의 18% 만이 실제로 지속적인 바이러스 반응 (SVR)을 달성하였으며, HCV를 치료하였다. 유사하게는, 통상적인 폐결화된 IFN α 치료요법으로 이전의 치료에 실패한 비-반응자 환자가 다른 폐결화된 IFN α로 다시 치료되었을 때, 이러한 환자 중 ~5 내지 10% 만이 일화적 증거를 기초로 하여 SVR을 달성할 수 있었다. 따라서, 단지 하나의 인터페론 치료요법으로 실패하지 않고 모든 현존하는 인터페론 치료요법에 실패한 환자의 집단은 계속 상당히 성장하고 있다. 따라서, 일반적으로 HCV의 치료뿐만 아니라 이전에 인터페론 요법으로 치료되었고(예를 들어, IFN α 치료 경험이 있고) 비-반응자, 특히 치료하기 가장 어려운 비-반응자 환자(예를 들어, 이전 치료 또는 현존하는 통상적인 케어로 재치료에 실패한 환자) 환자의 치료를 위한 대체적인 치료법에 대한 개선된 치료 프로토콜이 필요하다.

<1655> 원리

<1656> HSA-IFN α 2b는 성숙한 알부민을 이의 C-말단에서 성숙한 인터페론 α-2b의 N-말단에 유전적으로 융합시킴으로써

형성된다. RBV와 조합한 HSA-IFN α 2b로의 치료 안정성, 내인성, 및 효능은 무작위화된 오픈 라벨 임상 연구에서 IFN 치료 경험이 있는 비-반응자 HCV 인간 환자에서 평가되었다. 이러한 연구의 목적을 위하여, 비-반응자는 HCV RNA 수준의 2-log 감소 획득의 실패로 인한 12주에 이전 치료법을 중단한 HCV 환자(예를 들어, 조기 바이러스 반응, 12주 또는 EVR12) 또는 치료 프로토콜의 완료 후 SVR 획득에 실패한 환자로서 정의된다. 치료 중 지 후 재발된 환자는 본 연구에서 배제되었다. 또한, 본 연구에서 환자 중 적어도 50%는 이전에 폐그화된 IFN α 치료 프로토콜에 대해 실패하였다.

방법

이전에 적어도 한번의 IFN α 치료 프로토콜에 대해 실패한 인간 IFN α 치료 경험이 있는 비-반응자 HCV 환자를 3개의 피하 (sc) HSA-IFN α 2b 치료군으로 무작위화하였다: (a) 2주마다 한번씩 900 μ g (Q2w); (b) 1200 μ g Q2w 및 (c) 4주마다 한번씩 1200 μ g (Q4w). 각 치료군에서의 각 피검체는 또한 1000-1200mg/일 RBV를 수용하였다. 이러한 초기 3명의 지원자로부터의 안전성 데이터를 평가한 후에, 1000-1200mg/일 RBV와 조합하여 1500 μ g Q2w 또는 1800 μ g Q2w로 HSA-IFN α 2b를 수용한 2명의 추가 지원자의 연속적인 추가와 함께 HSA-IFN α 2b를 단계적으로 많이 투약하였다.

본 연구에서 치료 기간은 24주 점검과 함께 48주였다. 본 연구의 1차 효능 종료점은 지속 바이러스 반응(SVR)이다.

HCV RNA 역가를 실시간 PCR 검정, 1천만 IU 내지 1억 IU/mL의 감도 범위를 갖는 Quantasure™(Labcorp)을 이용하여 측정하였다. 알라닌 트랜스퍼라제(ALT) 및 혈액학적 효과, 예를 들어 절대 호중구수(ANC), 헤모글로빈, 및 혈소판수를 당해 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 측정하였다.

결과 및 논의

인구 통계

치료에 대한 비-반응쪽으로 나타나는 환자의 독립적 척도로서 제공하는 여러 인구 통계 특징이 확인되었다. 비-반응성의 중요한 예비-치료 예측 인자는 (1) 유전자형 1, (2) 높은 베이스라인 중간 HCV RNA 수준, (3) PEG+RBV 치료법에 대한 이전 비 반응, (4) 아프리카계 미국인, (5) F3-F4의 발달된 섬유증 수준 (METAVIR® 분류 사용), 및 (6) 높은 BMI(예를 들어, = 25 mg/kg)를 포함한다. 아마도, 비-반응성에 대한 최고의 전체적인 척도는 다수의 실패된 이전 IFN 계열 요법의 배경에서 PEG-RBV 치료의 종래 실패사례이다.

피검체 인구 통계는 표 11에 요약하였다. 전체적으로, 모든 피검체 인구 통계는 모든 치료군에서 유사하였다. 대부분의 피검체는 하나를 초과하는 IFN를 함유한 요법에 노출되었으며, 이전에 PEG+RBV로의 치료에 실패하였다. 또한, 베이스라인 질환 특징이 5개의 치료군에 대해 유사하지만, 1800 μ g Q2w 치료군은 상당히 보다 높은 예비 치료 HCV RNA 및 가장 높은 비율이 종래 PEG+RBV 실패를 갖는다. 따라서, 1800 μ g Q2w 치료군에서의 피검체는 가장 양호한 치료-난치 환자 집단으로 나타내었다.

표 11. 인구 통계 및 베이스라인 특징

	900 μ g Q2w N=23	1200 μ g Q2w N=24	1200 μ g Q4w N=24	1500 μ g Q2w N=22	1800 μ g Q2w N=22	P 수치
평균 나이	53	50	49	51	47	0.0687
% 남성	60.9%	58.3%	62.5%	86.4%	59.1%	0.2095
유전자형 1	20 (87.0%)	24 (100%)	22 (91.7%)	21 (95.5%)	21 (95.5%)	0.4531
Med HCV RNA (log ₁₀ IU/mL)	7.1	6.6	6.2	7.0	7.6	< 0.0001
PEG+RBV	14 (60.9%)	16 (66.7%)	15 (62.5%)	16 (72.2%)	20 (90.9%)	0.1370
아프리카계 미국인	2 (8.7%)	3 (12.5%)	1 (4.2%)	7 (31.8%)	2 (9.1%)	0.0940
F3 - F4	7 (30.4%)	7 (29.2%)	4 (16.7%)	9 (40.9%)	7 (31.8%)	0.5012
BMI $\geq$ 25 kg/m ²	20 (87.0%)	21 (87.5%)	18 (75.0%)	18 (81.8%)	17 (77.3%)	0.7637
이전에 1회 이상 치료받은 피검체 %	47.8%	66.7%	66.6%	72.7%	54.5%	0.4087

<1667> 효능 및 생물학적 활성

<1668> 치료 기간 동안 예비-치료 수준으로부터의 HCV RNA 감소율은 유전자형 1, PEG+RBV 비-반응자, 가장 난치의 HCV 환자 집단에 대해 표 12에 나타내었다. 2 내지 12주에, HCV RNA 감소율의 정도는 900 내지 1500 μ g 치료군과 유사하였다. 그러나, 최대 바이러스 양 감소율은 1800 μ g 치료군에서 관찰되었다. 이는 놀랍게도 본 치료군에서 보다 높은 수준의 예비-치료 HCV RNA 및 가장 높은 비율의 PEG-RBV 실패율을 고려하게 한다. 최초 12주 치료 동안 항바이러스 반응의 정도는 바이러스 동력학의 제 2 상 기울기를 반영하고, 이는 SVR의 포지티브 예측 인자이다.

<1669> 도 7에 나타난 바와 같이, HCV RNA 감소율의 기울기는 유전자형 1, PEG+RBV 비-반응자에서 900 내지 1500 μ g 치료군에 대해 12주에서 비교가능하다. 놀랍게도, HCV RNA 감소율의 정도는 1800 μ g 치료군에 대해 가장 컸다. 1500 및 1800 μ g 치료군에 대한 HCV RNA 감소율은 본 환자의 서브군에서 24주에 비교가능하다.

<1670> 24주에서, HCV RNA 네거티브인 피검체의 비율은 900 내지 1500 μ g 치료군에 걸쳐 비교될 수 있다. 12주와 비슷하게, 유전자형 1에 대한 서브군 검증인, 24주에서 PEG+RBV 비-반응자는 1800 μ g 치료군(데이터는 보이지 않음)에서 가장 높은 반응 비율을 나타내었다.

<1671> 피검체는 연구자의 재량에서 효능의 결핍을 위해 24주에서 중단될 수 있고 EVR12 결핍의 고 네거티브 예측값 및 SVR에 대한 24주 RNA 음성율에 나타내는 인터페론-기반 처방계획으로부터 누적 데이터를 줄 수 있다.

<1672> 24주에서 RNA 네거티브인 대부분의 환자들은 48주에서 여전히 네거티브이다. 전체 치료의 종료점 반응(end-of-treatment response)(ETR, 48주에서 HCV 네거티브)은 900-1200 μ g 치료군(도 8A)에 대해 31%였다. 따라서, 12주(예를 들어, EVR12) 또는 24주에서 HCV RNA 네거티브되는 높은 비율의 피검체가 ETR을 얻었다. 유전자형 1 PEG+RBV 비-반응자 내에서, 1500 μ g 및 1800 μ g 치료군(도 8B)에서 가장 높은 비율의 ETR을 가지며 ETR 비율은 약 15% 내지 27%의 범위이다.

<1673> 또한, 상당한 수의 피검체는 12주에서 계속 HCV RNA 네거티브가 되며 이후 48주의 치료, 예를 들어, SVR을 얻는 치료가 이어진다. 900-1200 μ g 치료군에서 전체 SVR 비율은 21%이었다(도 8C). 유전자형 1 PEG+RBV 비-반응자 내에서, SVR 비율은 10% 내지 15.4%(도 8D)의 범위이다.

<1674> 요약하면, 이들 데이터는 RBV와 조합된 900-1200 μ g의 HSA-IFN α 2와 함께 높은 퍼센트의 PEG+RBV 결핍을 갖는 IFN α 치료-경험이 있는, 비-반응자 HCV 환자의 치료는 강한 결과로 나타나며 항바이러스 활성과 비교할 수 있다는 것을 나타낸다. 저 바이러스성 발견(breakthrough)(예를 들어, HCV RNA 검출될 수 없지만 둘 이상의 시점에서 순차적으로 포지티브) 및 재발 비율이 또한 이 난치성 비-반응자 개체군의 치료에서 관찰된다. 또한, 리바비린과 조합된 HSA-IFN α 2b로의 이 용량에서 치료되는 환자가 SVR 비율에서 상당한 증가를 가질 수 있는 것을 나타내는, 상당히 더 큰 환원이 또한 1차 12주의 요법에 걸쳐 1800 μ g 치료군에서 관찰되었다.

<1675> 표 12. *GT1 및 PEG+RBV 비-반응자에 대한 항바이러스 반응*

	900 μ g Q2w N=12	1200 μ g Q2w N=16	1200 μ g Q4w N=13	1500 μ g Q2w N=15	1800 μ g Q2w N=19
12 주					
EVR12^a	5 (41.7%)	4 (25%)	3 (23.1%)	5 (33.3)	12 (63.2%)
95% C.I.^b	(15.1%, 72.3%)	(7.3%, 52.4%)	(7.2%, 52.4%)	(11.8%,61.6 %)	(38.4%,83.7%)
24 주					
검출가능하지 않음 HCV RNA	2 (16.7%)	3 (18.8%)	2 (15.4%)	4 (26.7%)	6 (31.6%)
95% C.I.^b	(2.1%, 48.4%)	(4.0%, 45.6%)	(1.9%, 45.4%)	(7.8%, 55.1%)	(12.6%, 56.6%)
48 주					
ETR^a	3 (25%)	3 (18.8%)	2 (15.4%)		
95% C.I.^b	(5.5%, 57.2%)	(4.0%, 45.6%)	(1.9%, 45.4%)		

<1676>

<1677> ^aHCV RNA에서 검출될 수 없는 HCV RNA 또는 ≥ 2 -로그 감소로서 정의됨

- <1678> ^b정확한 95% 신뢰 인터벌.
- <1679> 혈액성 효과
- <1680> 치료 프로토콜과 조합된 많은 용량의 IFN 및 RBV로의 확실한 순응 및 노출은 SVR 비율을 최대로 하기 위해 중요하다.
- <1681> IFN 및 RBV로 조합 치료되는 동안 혈액성 감소는 일반적이다. RBV 용량은 HCV 재발을 막기 위해 중요하다. 그러나, RBV-유도된 용혈 현상에 기인하는 헤모글로빈(Hb) 및 혈소판(PLT) 수의 감소는 RBV에서 용량 감소를 필요로 한다. 절대 호중구수(ANC)<750/mm³에서의 감소는 조합 치료의 IFN이 감소된 용량을 필요로 한다.
- <1682> 비록 일부 ANC 및 PLT 감소가 관찰되었지만, 이들 감소는 모든 Q2w 치료군에 걸쳐 비교될 수 있으며 4 내지 8주 부근에서 정체에 도달하였다. 게다가, 기준선으로부터 Hb 감소는 12주 및 그 이상 동안 모든 Q2w 치료군(1800 μg 치료군을 포함)에 걸쳐 비교될 수 있다. 혈액성 값에서의 감소는 Q4w 치료군에서 보다 적다. 전체에 걸쳐, 유해 작용의 관리를 위해 용량이 감소된 12/115 피검체가 있었다. 치료 프로토콜에서 개설한 바와 같이 대부분 HSA-IFN α 2b의 용량의 감소는 ANC에서 감소라는 결과를 낳는다. Q2w 치료군 사이에 관찰된 용량 반응은 없다. 따라서, 높은 용량 치료군에서 관찰된 용량 감소를 위한 증가된 요구는 없다.
- <1683> 요약하면, 비록 RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b의 치료에서 관찰되는 혈액성 값에서 일부 감소가 있지만, 이들 감소는 치료군에 걸쳐 비교될 수 있으며, 900-1800 μg의 RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b로 치료되는 IFN α 치료-경험이 있는, 비-반응자 HCV 환자 사이에서 안정성의 차이는 별로 없음을 나타낸다.
- <1684> 결론
- <1685> 이들 결과를 하나로 합치면 PEG+RBV 치료 프로토콜로 이전에 실패한 환자들을 포함하는 IFN α 치료-경험이 있는, 비-반응자 HCV 환자의 상당한 비율에서 SVR을 얻고, 따라서 HCV를 박멸하는데 효율적이 될 수 있다는 점을 제안한다. 특히, 이들 결과는 RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b 900-1200 μg로의 치료가 연구에서 모든 환자의 21%가 SVR을 얻는 결과가 나타남을 보여준다. SVR은 심지어 이들 고 난치성 환자의 10% 내지 15.4%가 SVR을 얻은 PEG+RBV 처방으로 이전에 실패한 환자에서도 얻을 수 있다. 더욱이, 1800 μg 치료군은 대부분의 난치성 환자 개체군에서 최대 24주 HCV RNA 음성 비율이, 이 치료가 이들 환자에 대해 심지어 더 큰 SVR 비율이라는 결과를 낼 수 있음을 나타냄을 보여준다. 또한, 안전한 프로파일은 HSA-IFN α 2b의 모든 치료군에 걸쳐 비슷하다. 더욱이, 이들 결과는 HSA-IFN α 2b가 개선된 복용 스케줄의 제공과 함께 2 내지 4주마다 효능적으로 투여될 수 있음을 나타낸다. 따라서, 이들 결과는 인터페론-기반 요법, 특히 현재 당업계에 없는 일반적으로 폐길화된 인터페론-RBV 요법이 실패된 환자에 대해, RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b의 치료가 효능적이고 안전한 치료를 택일적으로 매우 유리하고 개선된 복용 스케줄에 제공함을 나타낸다.
- <1686> 실시예 76. 유전자형 2 또는 3, 인터페론-경험이 없는(naive) 만성 C형 간염(HCV) 환자에서 리바비린과 조합된 HSA-IFN α 2b의 항바이러스 활성
- <1687> 배경
- <1688> 전세계적으로 1억 7천만명 이상의 사람이 C형 간염 바이러스(HCV)로 감염되었는데, 이 바이러스는 상당한 공중 보건 관심사로서 나타났으며 전세계에 걸쳐 빠르게 간 질환의 가장 일반적인 원인이 되고 있다. 급성 HCV 감염은 일반적으로 증상이 없고, 이른 진단에 문제가 있다. 사실, HCV 감염은 약 70%의 급성 감염이 지속될 때 만성 상태로 되는 경향이 있다. 따라서, 비록 신규 감염의 발생은 감소하였지만, HCV 감염의 유행은 가까운 미래에 여전히 일정할 것으로 예측된다.
- <1689> 인터페론 알파(IFN α)와 항바이러스 분자, 리바비린(RBV)의 병용치료 또는 인터페론 알파(IFN α) 단독은 역사적으로 만성 C형 간염(CHC)인 환자를 위한 가장 효과적인 치료로서 인지되어왔다. 보다 최근에, 폐길화된 형태의 인터페론 알파가 RBV와 조합된 HCV의 치료에 대해 입증되었다. 이들 폐길화된 인터페론은 표준 인터페론 또는 리바비린 요법과 조합된 인터페론보다 HCV 치료에 보다 효과적으로 보이며 HCV에 대한 일반적인 치료가 될 수 있다.
- <1690> 현재 추천된 요법에 대한 전체적으로 지속된 항바이러스 반응(SVR)은 바이러스 및 숙주 특성, 특히 바이러스 유전자형에 의존하는 CHC 환자에서 크게 변한다. 예를 들어, SVR 비율은 좀더 일반적인 유전자형 1을 갖는 환자에서 약 42-46%의 범위이다. 반면에, 덜 일반적인 유전자형 2 또는 3을 갖는 환자는 76-80%에서 SVR 비율을 경험한다. 또한, 유전자형 1 환자보다 치료하기가 덜 어려운 것으로 간주되는 유전자형 2 또는 3인 환자는 더욱

낮은 용량의 리바비린을 갖는 더욱 짧은 지속시간의 요법으로 치료될 수 있다.

<1691> 24주 이후 24주의 점검 주기 동안 RBV와 조합된 유전자형 2 또는 3의 폐길화된 인터페론을 위한 현재 추천되는 요법이 SVR을 얻는 환자의 상당한 비율에서 결과를 나타내지만, 이 치료 프로토콜은 여전히 IFN-기반된 요법에 대해 상당히 실제적으로 공통적 한계가 남아있다. 특히, 현재 추천되는 요법은 각 투여 후 환자의 생명의 질을 실질적으로 감소시키는 부작용에 의한 피로움이 남아있다. 따라서, 효능적이고 유전자형 2 또는 3 HCV로 감염된 환자에 의해 좀더 허용되는 새로운 치료 처방에 대한 요구가 계속된다.

<1692> 원리

<1693> HSA-IFN α 2b는 성숙한 인터페론 α -2b의 C-말단에서 N-말단으로 유전적 용융 성숙한 알부민에 의해 생성된다. RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b로의 안전하고 효능적인 치료는 유전자형 2 또는 3, IFN-경험이 없는 CHC 인간 환자에서 무작위, 멀티-센터, 열린-라벨에서 평가된다.

<1694> 방법

<1695> 유전자형 2 또는 3, IFN-경험이 없는 43명의 인간 HCV 환자를 두 피하(sc) HSA-IFN α 2b 치료군으로 무작위 분류하였다: (a) 2주마다 1500 μ g 투여됨(Q2w) 또는 (2) 4주마다 1500 μ g 투여됨(Q4w). 각 치료군에서 각 피검체는 또한 800mg/day의 RBV에서 수용되었다. 계층화를 위한 기본적 원리는 유전자형(2 또는 3) 및 HCV RNA(<800,000 IU/mL 또는 $\geq$ 800,000 IU/mL)을 포함한다.

<1696> 연구의 치료 기간은 24주와 점검 24주이다. 기본적 효능 종말점은 지속적인 바이러스 반응(SVR)이다.

<1697> HCV RNA 역가는 6천 9백만 IU/mL으로 43IU의 감도 범위(양 평가의 한계(LOQ))를 갖는 실시간 PCR, Quantasure™ (Labcorp)을 사용하여 측정하였다. 인슐린 저항은 항상성 평가 모델(HOMA)을 사용하여 평가하였다.

<1698> 환자가 임의의 분실한 데이터 포인트를 갖거나 연구에서 이탈하거나 그렇지 않음에 개의치 않고, 치료 목적(ITT) 환자는 모두 무작위로 한정되며, 치료된 각 치료군의 피검체이다. 개조된 치료 목적(MITT) 환자는 연구에서 그들의 등록에 근거한 12주 방문을 생각할 수 있는 환자들로 한정된다.

<1699> 결과 및 논의

<1700> 4 및 12주에서 피검체 인구 통계 및 항바이러스 반응을 표 13에 요약하였다. 전체적으로, HSA-IFN α 2b가 모든 치료군에 잘 허용되었다.

<1701> 표 13. 인구 통계 및 항바이러스 반응.

	HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q2w (N=21)	HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q4w (N=22)
인구통계		
% 남성	71.4%	68.2%
% HCV RNA $\geq$ 800,000	71.4%	59.1%
평균 HOMA 예비치료	2.2	2.5
4 주(<LOQ) ITT	16/21 (76.2%)	15/22 (68.2%)
유전자형 2	8/10	6/10
유전자형 3	8/11	9/12
12 주(<LOQ) MITT	14/17 (82.4%)	16/18 (88.9%)
유전자형 2	7/9	9/9
유전자형 3	7/8	7/9

<1702> ITT= 치료 목적; MITT= 개조된 치료 목적(12주 동안 방문에 적합한 피검체)

<1704> HCV RNA 감소의 크기 및 HCV RNA< LOQ를 갖는 유전자형 2 또는 3 환자의 비율은 HSA-IFN α 2b Q2w 및 HSA-IFN α 2b Q4w 치료군 모두에 걸쳐 비교될 수 있다. 4주에서, HCV RNA< LOQ를 갖는 유전자형 2 또는 3 환자의 비율은 1500 μ g Q2w에서 76.2% 및 1500 μ g Q4w 치료군에서 68.2%였다. 12주에서, 두 치료군에서 높은 비율의 유전자형 2 또는 3 환자가 HCV RNA< LOQ를 가졌다(1500Q2w에서 82.4% 및 1500Q4w에서 88.9%).

<1705> 따라서, 이들 결과는 Q2w 또는 Q4w 주에서 1500 μ g HSA-IFN α 2b를 갖는 유전자형 2 또는 3 CHC 환자의 치료가 강

한 항바이러스 반응 비율을 나타내는 것을 나타낸다. 더욱이, HSA-IFN α 2b 1500μg Q4w 프로토콜을 갖는 치료는 유전자형 2 또는 3 환자에서 HSA-IFN α 2b 1500μg Q2w 프로토콜을 갖는 치료와 비교할 수 있는 효능을 보여준다. 따라서, 이들 결과는 Q2w 또는 Q4w에서 HSA-IFN α 2b 1500μg를 갖는 치료가 잠재적으로 환자에 대한 뛰어난 용인성 및 편리성을 나타내고, 대단히 크게 개선된 복용 스케줄의 장점을 갖는 HCV 유전자형 2 또는 3에 감염된 환자에 대해 현재 추천되는 요법으로서 적어도 효율적이라는 것을 제시한다.

실시예 77. HSA-IFN α 2b로 치료된 유전자형 1, 인터페론-경험이 없는 만성 C형 간염(HCV) 환자의 삶의 질(QOL)

배경

상술한 바와 같이, 48주 동안 리바비린(RBV)과 조합된 폐길화된 인터페론 α로 유전자형 1, 인터페론-경험이 없는(IFN-경험이 없는) HCV 환자를 위한 일반적 치료는 상당한 실제적인 한계를 갖는다. 현재 추천되는 인터페론 요법의 공지된 부작용에 기인하는, 환자의 삶의 질은 인터페론의 각 투여 후 실질적으로 감소된다. 현재 프로토콜은 치료에 기인하는 감소된 삶의 질 및 결석일들이 증가하는 기간이 연장되는 결과를 나타내기 위해 적어도 주 단위에서 복용을 필요로 한다. 많은 수의 환자가 50%를 넘는 중지 비율이 보고되는 일부 연구와 함께 결과적으로 많은 수의 환자가 치료를 중단한다. 따라서, 현재의 관리의 표준과 비교하여 삶의 질 상에 개선된 영향을 갖는, IFN-경험이 없는 환자에서 유전자형 1의 치료를 위한 개선된 치료적 프로토콜에 대한 명백한 요구가 있다.

원리

RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b로의 안전하고 효능의 치료는 유전자형 1, IFN-경험이 없는 HCV 인간 환자의 활성 조절된 임상 연구에서 평가되고, 실시예 73에서 기재된 활성 조절로서 RBV와 조합된 PEG-IFN α -2a(PEG-IFN)로의 일반적 치료와 비교된다. 1차 12주의 요법 동안, RBV와 조합된 HSA-IFN α 2b로 치료하는 QOL 및 결석일(예를 들어, 일로부터 빠진 날)에 관한 효과가 RBV와 조합된 PEG-IFN와 비교된다.

방법

458명의 인간, 유전자형 1 HCV 환자가 실시예 73에 기재한 바와 같이 무작위로 되고 치료된다. SF-36v2® 측정 모델(QualityMetric, Lincoln, RI)에 의해 측정된 QOL 및 무능력한 날은 치료전, 및 4주 및 12주의 치료에서 평가된다. 특히, 8개의 SF-36v2도메인이 평가되었다: 물리적 기능성(PF), 역할-육체(RP), 신체적 통증(BP), 일반적 건강(GH), 지속(VT), 사회적 기능성(SF), 역할-감정(RE), 및 정신 건강(MH). 1차 4개의 도메인(PF, RP, BP, 및 GH)이 육체 건강 성분(Physical Health Component)에 상응하며 남은 4개의 도메인(VT, SF, RE, 및 MH) QOL 모델의 정신 건강 성분(Mental Health Component)에 상응한다.

규준-기반 육체적 성분 요약(PCS) 스코어뿐 아니라 8개 SF-36v2 도메인의 변형된(미가공) 스코어 및 정신 성분 요약(MCS) 스코어가 12주의 치료를 통해 평가되었다.

결과 및 논의

표 14. 삶의 질 측정

	PEG-IFN 180μg Qw (n=114)	HSA-IFNα2b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2b 1200μg Q2w (n=110)	HSA-IFNα2b 1200μg Q4w (n=116)
SF-36 도메인(MCID)	SF-36 QOL 파라미터에서 기준선으로부터 12주까지의 평균 변화 (악화)			
PCS (2.6)	-8.0	-5.6*	-6.5	-6.0
신체 기능 (5)	-18	-14	-16	-13
신체 통증 (4)	-21	-11* [#]	-14 [#]	-15 [#]
MCS (2.7)	-6.3	-3.6* [#]	-4.9	-5.0
체력 (4.2)	-19	-13* [#]	-17	-16
정신 건강 (4)	-11	-4* [#]	-7 [#]	-4* [#]
사회적 기능 (6)	-20	-10* [#]	-15	-19
4주에서의 업무 결석	평가 시에 업무에 종사하는 환자에서의 1개월 전의 결석일 수			
평균 결석일	4	1*	3	3
≥ 3 일	21/63 (33%)	5/66 (8%)*	17/61 (28%)	15/62 (24%)
≥ 7 일	14/63 (22%)	3/66 (5%)*	8/61 (13%)	7/62 (11%)
12주에서의 업무 결석				
평균 결석일	4	1*	3	3
≥ 3 일	21/69 (30%)	7/70 (10%)*	13/59 (22%)	17/72 (24%)
≥ 7 일	12/69 (17%)	3/70 (4%)*	7/59 (12%)	8/72 (11%)

*p-값<0.05 대 Peg-IFN; [#] 최소의 임상 중요성 차이를 넘는다

12주에서, 900μg HSA-IFN α 2b Q2w를 받는 환자를 위한 QOL이 8 개인 도메인의 5는 물론 MCS 및 PCS에서 통계학적 중요성을 얻는 측정마다 PEG-IFN와 관련되어 개선된다. 1200 μg Q2w 및 1200 μg Q4w HSA-IFN α 2b 치료군에서, QOL의 악화는 사실상 측정마다 PEG-IFN과 관련되어 감소되며 육체적 고통 및 정신 건강 모두에서 임상적으로 상당한 차이를 갖는다.

전체적으로, 임의의 HSA-IFN α 2b 치료군에서 유전자형 1 HCV 환자는 PEG-IFN 치료군에서의 유전자형 1 HCV 환자보다 그들의 HCV 감염 및 이후의 요법에 기인한 근로일(MDW)을 더욱 적게 상실한다. 특히, PEG-IFN를 받는 환자보다 900 μg HSA-IFN α 2b Q2w를 받는 환자는 75% 더 적은 MDW를 가지며 1200 μg HSA-IFN α 2b Q2w 또는 1200 μg HSA-IFN α 2b Q4w를 받는 환자는 25% 더 적은 MDW를 갖는다.

실시예 73에서 보여진 HSA-IFN α 2b의 항바이러스 활성과 함께, 이들 결과는 HSA-IFN α 2b 및 RBV로의 유전자형 1, IFN-경험이 없는 HCV 환자의 조합 치료가 적어도 개선된 복용 스케줄 및 개선된 QOL의 장점을 갖는 일반적인 PEG-IFN 및 RBV 조합 치료만큼 효율적이라는 점을 제시한다. 특히, 이들 결과는 RBV와 조합한 HSA-IFN α 2b로의 치료가 RBV와 PEG-IFN 조합 치료로 얻을 수 있는 것보다 QOL 표시의 악화가 감소하고 더욱 적은 근로 상실일을 환자에 제공함에 의해 일반적인 RBV와 PEG-IFN 조합 치료보다 개선되고 매우 장점을 갖는 치료 프로토콜을 제공할 수 있다는 점을 제시한다.

실시예 78: 유전자형 1 인터페론-경험이 없는 만성 C형 간염(HCV) 환자에서 일용량(Daily Dose)의 리바비린과 조합되어, 2주에서 추가 투여와 함께 4주마다 투여되는 HSA-IFN α 2b의 열린-라벨, 무작위, 멀티센터 파일럿 연구

배경

α1b-IFN의 바이러스 동역학 모델은 HCV RNA에서 비선형 이중상(biphasic) 감소를 나타낸다. 초기 요법 후, 바이러스성 로드와 빠른 약물-의존성 감소("제1상")와 이어지는 상대적으로 느리지만 이어지는 몇주의 요법 동안 연속적으로 지수적으로 감퇴되는 "제2상"이 있다. 제1상 HCV RNA 감소는 약물-의존성을 보여준다. 유사하게, HCV RNA에서 약물-의존성 제2상 감소가 있다. 이들은 표준 및 PEG-IFN α 치료 모두에서 관찰되듯이 지속적인 바이러스 감소(SVR)의 강력한 예보자로 나타난다(Neumann et al., Hepatology 36(4 Pt 2):357a (2002); Perelson et al., Hepatology 42:749-754 (2005)).

<1724>

원리

<1725>

리바비린의 일용량과 조합되어, 4주마다 투여되고 2주에서 추가 용량을 갖는 HSA-IFN α 2b의 2-용량 처방의 안전성과 효능은 열린-라벨, 무작위, 멀티센터 파일럿 연구에서 평가된다. 2-용량 처방은 유전자형 1 만성 C형 간염을 갖는 IFN-경험이 없는 환자에서 4주마다 리바비린의 일용량과 조합된 HSA-IFN α 2b, 및 2주마다 리바비린의 일용량과 조합된 1/2 용량의 HSA-IFN α 2b의 투여와 비교된다.

<1726>

방법

<1727>

적격의 환자는 표 15에서 보여주는 바와 같이 1:1:1 비율에서 세 치료군의 하나로 무작위로 정해진다. 900Q2w 치료군은 이 연구에서 내부 표준물질로서 도움을 주는데 왜냐하면 그것이 PEG-IFN α -2a에 대해 허용할 수 있는 안전성 프로파일 및 유사한 HCV RNA 감소를 가짐을 보여주기 때문이다. 1800Q2/4 치료군은 4주에서 HCV RNA 감소의 크기를 증가시키도록 2주에서 alb-IFN 1800 μ g의 추가적인 용량을 받을 것이며, 그것에 의해 4주에서 빠른 바이러스 반응(RVR4) 비율 및 잠재적인 SVR 비율을 증가시킨다. 용량 감소는 또한 연구 계획에 포함된다. 900Q2w군에 대한, 600 μ g의 최저 용량 수준으로의 alb-IFN의 용량 감소는 IFN α -경험이 없는 유전자형 1 만성 C형 간염 환자에서 또 다른 상 2a 연구의 유사한 용량에서 관찰되는 상당한 항바이러스 활성을 근거로 선택된다. 1800Q4w 및 1800Q2/4w군에 대한, 4주마다 1200 μ g으로의 용량 감소는 2주마다 600 μ g alb-IFN 용량으로의 유사한 노출을 근거로 선택된다.

<1728>

약 225명의 환자가 무작위로 선별되었다(즉, 치료군마다 75명의 환자). 무작위화는 스크리닝에서 HCV RNA($\geq 400,000$ IU/mL 또는 $<400,000$ IU/mL) 및 종에 의해 층화되었다. 요법의 전체 기간은 48주이다. 48주간의 치료를 완료한 모든 환자는 52주 및 60주에 되돌아올 것이다. 60주에서 HCV RNA < 100 IU/mL를 갖는 환자들은 SVR 평가를 위해 72주에 되돌아올 것이다.

<1729>

12주에서 조기 바이러스 반응을 얻을 수 없는 환자(EVR12, ≥ 2 -log10 감소로서 정의되거나 HCV RNA $< LOQ$ [43IU/mL]), 또는 24주에서 HCV RNA ≥ 100 IU/mL를 가지거나 그 이상인 환자들은 연구 치료가 중단될 것이다. 이들 환자들은 SVR 실패로 간주될 것이며 추가적인 HDV RNA 평가 수행이 필요하지 않을 것이다.

<1730>

조기에 치료가 중단된 모든 환자들은 4- 및 12-주 치료후 안전성 점검 방문을 완료해야 한다. 또한, 12-주 치료후 안전성 점검 방문에서 HCV RNA < 100 IU/mL를 갖는 환자들은 SVR 평가를 위해 24주 치료 후 되돌아올 것이다.

<1731>

그들의 HCV RNA 반응에도 불구하고 포지티브 alb-IFN 또는 HSA 항체 반응을 갖는 환자들은 연구기간동안 24-주 치료후 안전성 점검 방문(4- 및 12-주 치료후 안전성 점검 방문에 더하여)을 완료해야 한다.

<1732>

HCV RNA는 43 IU/mL(LOQ) - 6천 9백만 IU/mL의 역학 범위, 및 15 IU/mL의 더욱 낮은 검출한계(LOD)를 갖는 입증된 실시간 폴리메라아제 연쇄 반응(PCR) 검정에 의해 평가될 것이다.

<1733>

표 15: 치료군

치료군	피하 투여되는 인터벌 Alb-IFN 투약 (투여된 도스의 전체수)	리바비린* 구강 투여
900Q2w	900 μ g alb-IFN 2주마다(24도스)	1000 또는 1200 mg/day
1800Q4w	1800 μ g alb-IFN 4주마다(12도스)	1000 또는 1200 mg/day
1800Q2/4w	1800 μ g alb-IFN 2주에서(13도스) 추가적인 도스와 함께 4주마다	1000 또는 1200 mg/day

<1734>

<1735>

* 리바비린 용량은 1일에 환자의 체중(kg)에 근거하여 정해질 것이며 전체 48주에 대하여 음식과 섭취해야 하는 2일로 나누어진 용량에서 투여된다:

<1736>

- 몸무게 < 75 kg인 환자에서 1000 mg/day(400 mg am 및 600 mg pm)

- <1737> · 몸무게 ≥ 75 kg인 환자에서 1200 mg/day(600 mg am 및 600 mg pm)
- <1738> 효능 평가
- <1739> HCV RNA 샘플은 다음의 방문에서 수집될 것이다: 24주 또는 그 이상에서 EVR12를 얻지 못하거나 HCV RNA ≥ 100 IU/mL를 갖는 환자를 제외하고, 1일, 4일, 1주, 2주, 4주, 32일, 및 6, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48, 52, 60, 및 72주.
- <1740> 안전성 평가
- <1741> 환자는 연구 기간에 걸쳐 부작용(AEs), 심각한 부작용(SAEs), 실험 이상 및 면역원 상태에 대해 모니터링 될 것이다. 부작용으로 인한 피로움은 개선된 미생물학 및 감염된 질병의 디비전(DMID) 독성 표에 따라 등급을 매길 것이다.
- <1742> 다른 평가
- <1743> 약물 동력학(PK) 샘플은 1일, 4일, 8일(1주), 15일(2주), 29일(4주), 32일, 57일(8주), 및 85일(12주)에서 수집될 것이다. 질문 사항, 급성 변형된 SF36 건강 조사 및 일 생산성 및 활성 장애 질문 사항(WPAI-SHP)의 결과가 보고된 환자는 48-주 치료 임상을 통해 2주마다 및 점검 임상동안 52, 60, 및 72주에서 수집될 것이다.
- <1744> 데이터 검토
- <1745> 치료 목적(ITT) 개체군은 적어도 한 용량의 연구 약물을 받는 모든 환자들로 무작위로 구성될 것이다. ITT 이론에 따라, 환자는 무작위로 배당되는 치료에 따라 분석될 것이다. 안정성 개체군은 적어도 한 용량의 연구 약물을 받는 모든 환자들로 구성되며, 받는 치료에 따라 분석될 것이다.
- <1746> alb-IFN의 안정성 및 허용성은 AEs/SAEs, 중지에 따른 AEs, 용량 감소 또는 생략에 따른 AEs, 및 실험 이상을 포함하는 각 치료군에 대한 전체적인 안정성 프로파일을 검사함에 의해 평가될 것이다. 사망, 다른 심각한 부작용, alb-IFN의 중지에 기인하는 부작용, 및 용량 감소 또는 생략에 따른 AEs는 치료군에 의해 나타내어질 것이다. 이들 작용에 대한 비율은 모든 세 치료군에서 95% 신뢰 간격(CIs)에 따라 평가될 것이다. 또한, 짝이되는 비교군은 예측되는 셀 수가 5 미만이면 피어슨 치-스퀘어 테스트 또는 피셔스 이그젝트 테스트(Fisher's exact test)를 사용하여 평가될 것이다.
- <1747> 분류별의 효능 종말점에 대한 반응 비율은 그들의 대응하는 95% CIs로 보고될 것이다. 유사하게, 짝이되는 비교군은 예측되는 셀 수가 5 미만이면 피어슨 치-스퀘어 테스트 또는 피셔스 이그젝트 테스트를 사용하여 평가될 것이다. 시간에 대한 HCV RNA 검출 이하는 각각의 짝이되는 비교군의 카플란-메이어 방법 및 로그랑크 시험을 사용하여 평가될 것이다.
- <1748> 본 출원에 인용된 각각의 문헌 (특허, 특허 출원, 특허 공개공보, 논문, 초록, 실험실 매뉴얼, 서적 또는 기타 발표물)의 전체 내용뿐만 아니라 본 출원에 언급된 젠뱅크(GenBank), 젠세크(GeneSeq) 또는 CAS 레지스트리(Registry)와 같은 데이터베이스에 특이적인 식별번호를 통해 이용가능한 정보는 그 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된다.
- <1749> 또한, 다음 각각의 국제 출원 및 미국 출원의 명세서 및 서열 목록의 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다: 2002년 12월 23일에 출원된 국제 출원 번호 PCT/US02/40891; 2004년 1월 20일에 출원된 국제 출원 번호 PCT/US2004/001369; 2005년 2월 9일에 출원된 국제 출원 번호 PCT/US2005/004041; 2006년 7월 31일에 출원된 국제 출원 번호 PCT/US06/29391; 2004년 2월 11일에 제출된 미국 출원 번호 10/775,204; 2005년 7월 7일에 제출된 미국 출원 번호 11/175,690; 2006년 5월 8일에 제출된 미국 출원 번호 11/429,373; 2006년 5월 8일에 제출된 미국 출원 번호 11/429,276; 2006년 5월 8일에 제출된 미국 출원 번호 11/429,374; 2006년 7월 31일에 제출된 미국 출원 번호 11/495,624; 및 2005년 8월 12일 제출된 미국 가출원 번호 60/707,521; 2005년 8월 31일 제출된 60/712,386; 2005년 11월 3일 제출된 60/732,724; 2006년 2월 28일 제출된 60/776,914; 2006년 3월 13일 제출된 60/781,361; 2006년 6월 2일 제출된 60/810,182, 2006년 6월 15일 제출된 60/813,682; 2006년 9월 14일 제출된 60/844,349; 2006년 11월 13일 제출된 60/858,410; 2007년 2월 20일 제출된 60/902,039; 및 2007년 6월 7일 제출된 60/942,647.
- <1750> 기탁된 생물학적 물질에 대한 표시
- <1751> (PCT Rule 13bis)

<1752> A. 하기 제공된 표시는 상세한 설명의 제 31면에 있는 표 3에 언급된 기탁된 생물학적 물질에 관한 것이다.

<1753> B. 기탁의 식별표시: 추가의 기탁은 또 다른 시트에서 확인
된다:

<1754> 기탁기관 명칭: **아메리칸 타입 컬처 콜렉션**

<1755> 기탁기관 주소: **미국 20110-2209 버지니아**

<1756> **마나사스 유니버시티 블러바드 10801**

	수탁 번호	기탁 일자
1	PTA-3763	2001년 10월 4일
2	PTA-3940	2001년 12월 19일
3	PTA-3942	2001년 12월 19일
4	PTA-3939	2001년 12월 19일
5	PTA-4670	2002년 9월 16일

<1758> **캐나다**

<1759> 본 출원인은 본 출원을 기초로 하여 캐나다 특허를 받거나, 본 출원이 거절되거나, 포기되어 더 이상 재생되지 않거나, 취하될 때까지 특허청장은 본 출원에 언급된 기탁된 생물학적 물질의 샘플을 특허청장이 정하는 독립 전문가에게 제공하는 것만을 허가할 것을 요청하는 바이며, 이에 따라 본 출원인은 국제 출원의 공개를 위한 기술적 준비의 완료 전에 국제 사무국에 서면으로 통지해야 합니다.

<1760> **노르웨이**

<1761> 본 출원인은 본 출원이 공중의 검사에 공개되거나 (노르웨이 특허청에 의해), 공개적 검사없이 노르웨이 특허청에 의해 최종 결정될 때까지 샘플의 제공이 당업자에게만 이루어질 것을 요청하는 바입니다. 이러한 요청은 본 출원이 노르웨이 특허법의 22절 및 33(3)절하에 공중에게 이용가능해지는 시점 이전에 본 출원인에 의해 노르웨이 특허청에 제출될 것입니다. 이러한 요청이 본 출원인에 의해 제출된 경우, 샘플의 제공을 위한 제 3자에 의해 이루어지는 임의의 요청은 사용하고자 하는 전문가를 나타낼 것입니다. 이러한 전문가는 노르웨이 특허청에 의해 작성된 인정된 전문가 목록에 등재된 임의의 사람 또는 개별적 경우에 본 출원인에 의해 승인된 임의의 사람일 수 있습니다.

<1762> **호주**

<1763> 본 출원인은 미생물의 샘플의 제공은 특허결정 전, 또는 본 출원의 소멸, 거절 또는 취하 전에 본 발명에 이해 관계가 없는 당업자에게만 이루어질 것을 통지하는 바입니다 (호주 특허 법규의 규칙 3.25(3)).

<1764> **핀란드**

<1765> 본 출원인은 본 출원이 공중의 검사에 공개되거나 (특허 및 법규의 국가 위원회에 의해), 공중의 검사에 공개됨이 없이 특허 및 등록의 국가 위원회에 의해 최종 결정될 때까지 샘플의 제공은 당업자에게만 이루어질 것을 요청하는 바입니다.

<1766> **영국**

<1767> 본 출원인은 미생물의 샘플의 제공이 전문가에게만 이용가능할 것을 요청하는 바입니다. 이러한 요청은 출원의 국제 공개를 위한 기술적 준비의 완료 전에 국제 사무국에 제출되어야 합니다.

<1768> **덴마크**

<1769> 본 출원인은 본 출원이 공중의 검사에 공개되거나 (덴마크 특허청에 의해), 공중의 검사에 공개됨이 없이 덴마크 특허청에 의해 최종 결정될 때까지 샘플의 제공이 당업자에게만 이루어져야 할 것을 요청하는 바입니다. 이러한 요청은 본 출원이 덴마크 특허법의 22절 및 33(3)절하에 공중에게 이용가능해지는 시점 이전에 본 출원인에 의해 덴마크 특허청에 제출될 것입니다. 이러한 요청이 본 출원인에 의해 제출된 경우, 샘플의 제공을 위한 제 3자에 의해 이루어지는 임의의 요청은 사용하고자 하는 전문가를 나타낼 것입니다. 이러한 전문가는 덴마크 특허청에 의해 작성된 인정된 전문가 목록에 등재된 임의의 사람 또는 개별적 경우에 본 출원인에 의해 승인된

임의의 사람일 수 있습니다.

<1770>

스웨덴

<1771>

본 출원인은 본 출원이 공중의 검사에 공개되거나 (스웨덴 특허청에 의해), 공중의 검사에 공개됨이 없이 스웨덴 특허청에 의해 최종 결정될 때까지 샘플의 제공이 당업자에게만 이루어질 것을 요청하는 바입니다. 이러한 요청은 우선일로부터 16개월이 경과하기 전에 본 출원인에 의해 국제 사무국에 제출될 것입니다 (바람직하게는 PCT 출원인 가이드의 I권 부록 Z에 복사되어 있는 PCT/RO/134 양식으로). 이러한 요청이 본 출원인에 의해 제출된 경우, 샘플의 제공을 위한 제 3자에 의해 이루어지는 임의의 요청은 사용하고자 하는 전문가를 나타낼 것입니다. 이러한 전문가는 스웨덴 특허청에 의해 작성된 인정된 전문가 목록에 등재된 임의의 사람 또는 개별적 경우에 본 출원인에 의해 승인된 임의의 사람일 수 있습니다.

<1772>

네덜란드

<1773>

본 출원인은 네덜란드 특허결정일 또는 출원의 거절, 취하 또는 소멸일까지 미생물은 특허 규칙의 31F(1)에 제공된 바와 같이 단지 전문가에 대한 샘플의 지급에 의해 이용가능할 것을 요청하는 바입니다. 이러한 요청은 본 출원이 네덜란드 왕국의 특허법의 22C절 또는 25절하에 공중에 이용가능해지는 일자 (두 가지 일자 중 빠른 때) 전에 본 출원인에 의해 네덜란드 특허청에 제출되어야 합니다.

도면

도면1A

```

1 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA 60
1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 20

61 GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120
21 A L V L I A F A Q Y L Q C P F E D H V 40

121 AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180
41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 60

181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240
61 N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L 80

241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300
81 R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E 100

301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360
101 C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V 120

361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420
121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 140

421 GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG 480
141 E I A R R H P Y F Y A P E L L F F A K R 160

```

481 TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA 540
161 Y K A A F T E C C Q A A A D K A A C L L P 180

541 AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 600
181 K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C 200

601 GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC 660
201 A S L Q K K F G E R A F K A W A V A R L S 220

661 CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA 720
221 Q R F P K A E F A E V S K L L V T D L T K 240

721 GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT 780
241 V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L 260

781 GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 840
261 A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C E 280

841 AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAT GAT CCT GCT 900
281 K P L L E K S H C I A E V E N D E M P A 300

901 GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT 960
301 D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A 320

도면1C

961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020
321 E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D 340

1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1080
341 Y S V V L L L L R L A K T Y E T L E K C 360

1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140
361 C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L 380

1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200
381 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E 400

1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260
401 Y K F Q N A L L L V R Y T K K V P Q V S T 420

1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320
421 P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H 440

1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380
441 P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460

1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440
461 C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S 480

도면1D

```

1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500
481 L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K 500

1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560
501 E F N A E T F T F T F H A D I C T L S E K E 520

1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620
521 R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T 540

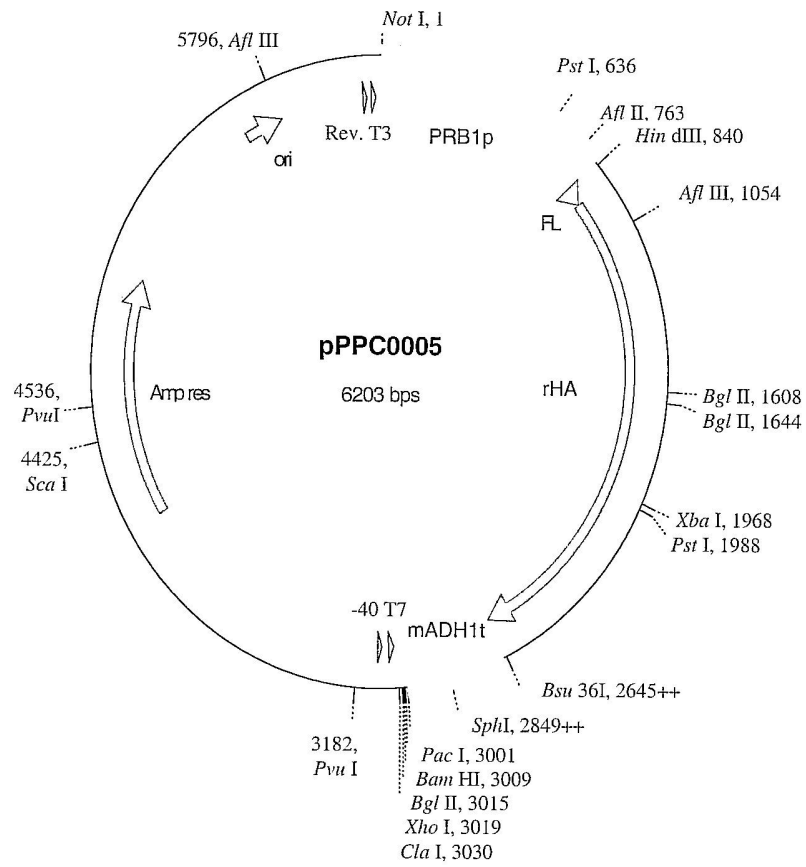
1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680
541 K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K 560

1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740
561 A D D K E T C F A E E G K K L V A A S Q 580

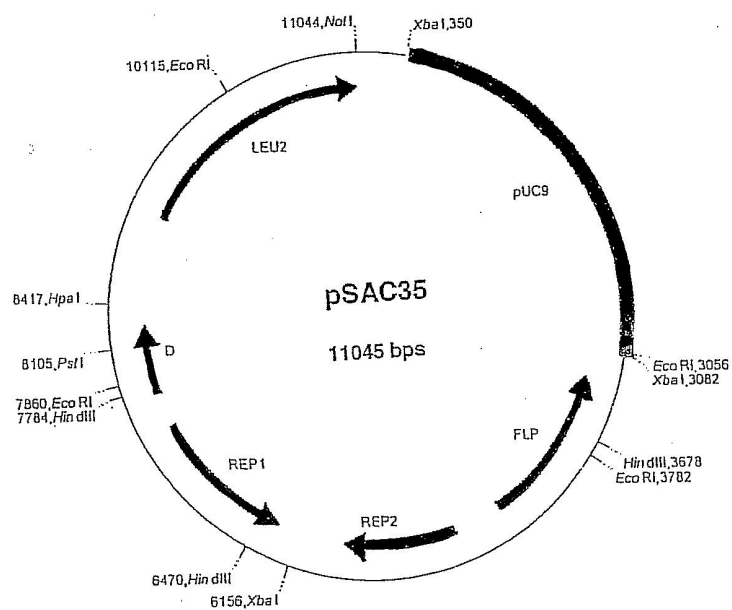
1741 GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782
581 A A L G L * 585

```

도면2

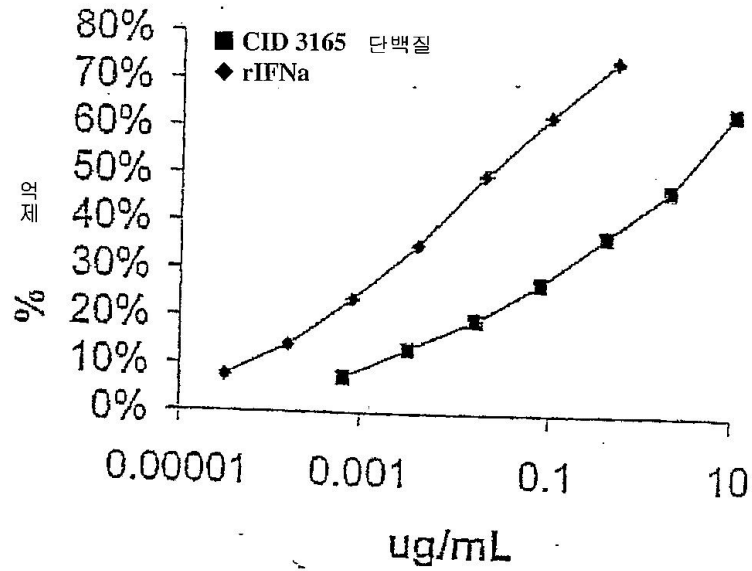


도면3



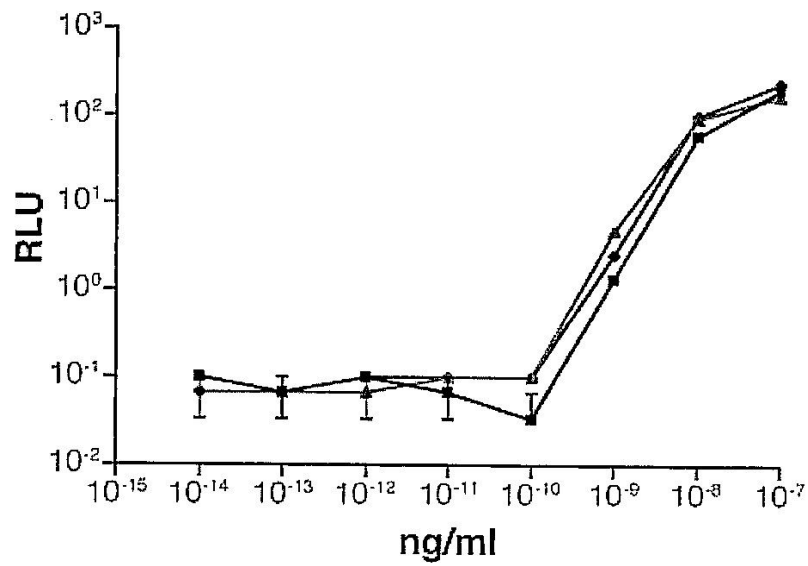
도면4

IFNa 알부민 융합 단백질에 의한 HS294T 멜라노마 세포의 증식의 억제

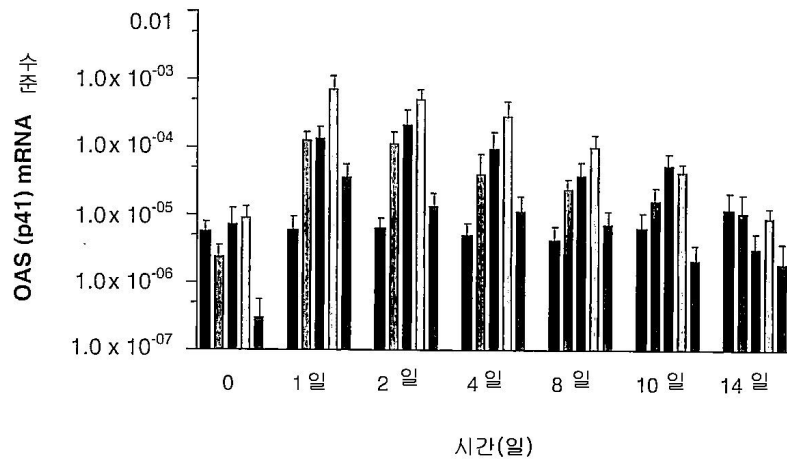


도면5

IFNa 알부민 융합 단백질의 SEAP 활성

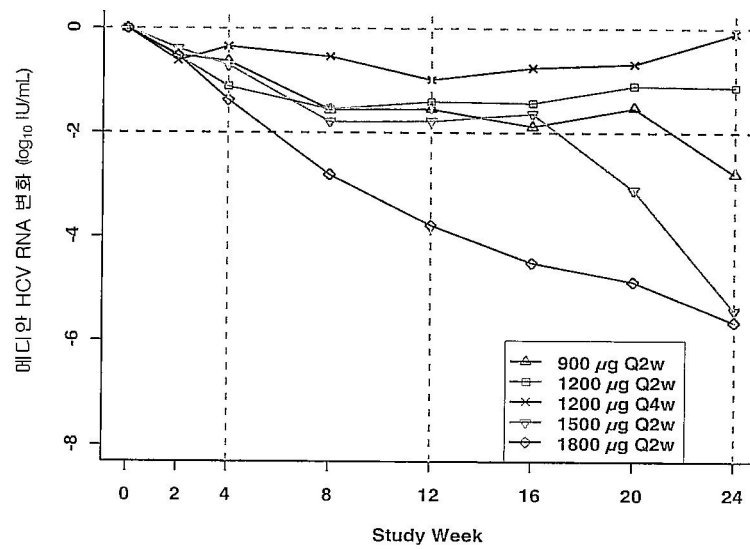


도면6

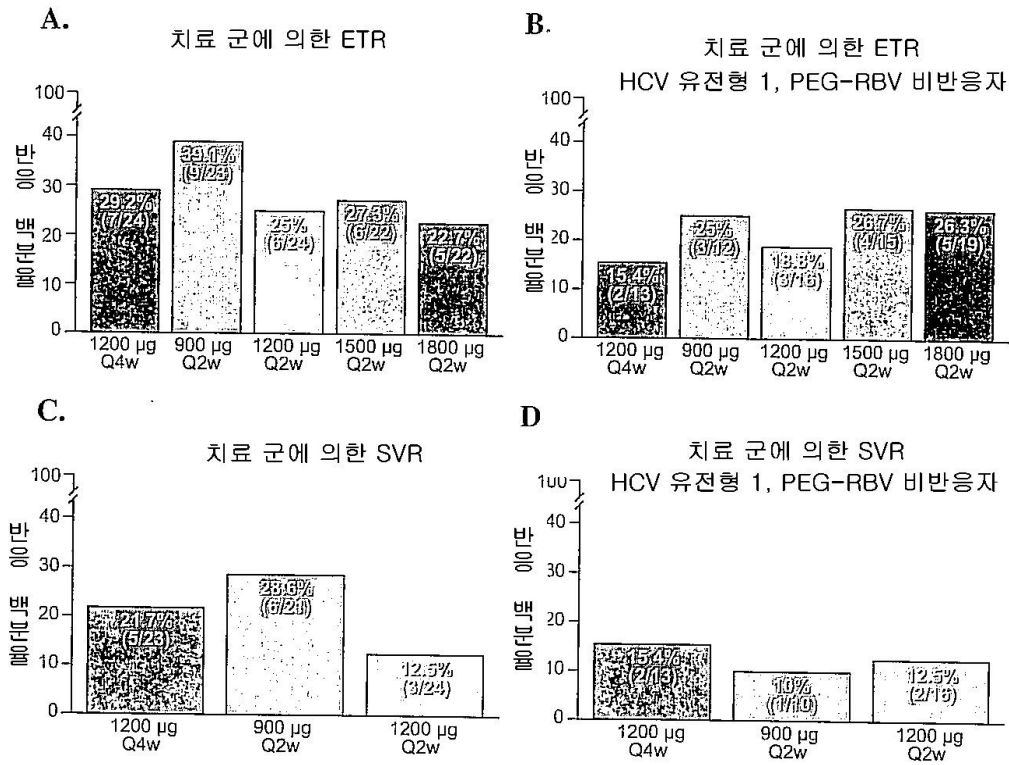


도면7

무전형 1, PEG-RBV 비반응자에서의 HCV RNA 환원에 대한 HSA-IFN α 2b의 효과(N=75)



도면8



서열 목록

<110> Subramanian et al.

<120> Albumin Fusion Proteins

<130> PF619PP5

<160> 189

<170> Patentin Ver. 2.0

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

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

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

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

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

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

[illegible]

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 2
<211> 1782
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
gatgcacaca agagtgaggt tgcctcatcg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
gccttggtgt tgattgcctt tgcctcagat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt 240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattgggtgag accagaggtt 360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaataa
atacttatat 420
gaaattgccg gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg 480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca 540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaaatgt 600
gccagctctc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtgag tcgcctgagc 660
cagagatttc ccaaagctga gtttcagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa 720
gtccacacgg aatgctgcca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
gccaagtata tctgtgaaaa tcaggattcg atctccagta
aactgaagga atgctgtgaa 840
aaacctctgt tgaaaaaat ccaatgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct 900

gacttgcctt cattagctgc tgattttggt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat 1020
tactctgtcg tgctgtgctt gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt 1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaaacaa aactgtgagc tttttgagca gcttggagag 1200
tacaaattcc agaatgcgct attagtctgt
tacaccaaga aagtacccca agtgtcaact 1260
ccaactcttg tagaggtctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca caaaatgctg cacagagtcc 1440
ttggtgaaca ggcgaccatg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaaa 1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
agacaaatca agaacaacac tgcacttggt gagcttgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
aaagagcaac tgaaagctgt
tatggatgat ttgcgagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttggtgc tgcaagtcaa 1740
gctgccttag gcttataaca tctacattta aaagcatctc ag 1782

<210> 3
<211> 609
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

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

115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
130	135	140
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
145	150	155
		160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
	165	170
		175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys		
	180	185
		190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu		
	195	200
		205
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys		
	210	215
		220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
225	230	235
		240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser		
	245	250
		255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly		
	260	265
		270
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile		
	275	280
		285
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu		
	290	295
		300
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp		
305	310	315
		320
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser		
	325	330
		335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 4
<211> 15
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> turn
<223> Linker peptide that may be used to join VH

and VL domains in an scFv.

<400> 4
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 394
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gcggccgccg gatgcaaggg ttcgaatccc ttagctctca ttatTTTTTg ctttttctct 60
tgaggtcaca tgatcgcaaa atggcaaatg gcacgtgaag ctgtcgatat tggggaactg 120
tggtggttgg caaatgacta attaatgtag tcaaggcgcc atcctcatga aaactgtgta 180
acataataac cgaagtgtcg aaaaggtggc acctgtcca attgaacacg ctcgatgaaa 240
aaaataagat atatataagg ttaagtaaag cgtctgttag aaaggaagt tttccttttt 300
cttgctctct tgtcttttca tctactatTT ccttcgtgta atacagggtc gtcagataca 360
tagatacaat tctattaccc ccattccatac aatg 394

<210> 6
<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Val Ser Val Ala Ala Leu Ser Cys Leu Met Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Gln Ala
20

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Stanniocalcin signal peptide

<400> 7

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Tyr Ser

<210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala

<210> 12
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)
 <223> Xaa equals any one of Glu or Asp

<400> 12
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala
 20 25 30

Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp
 35 40 45

Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu
 50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Leu Xaa Lys Arg
85

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Glu Lys Arg
20

<210> 14
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg
20

```
<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 15
Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15

Ser Leu Asp Lys Arg
20

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 17
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Met Glu Arg Ala Ala Pro Ser Arg Arg Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala
20 25

<210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Met Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Leu Thr Trp Glu
1 5 10 15

Ser Gly Gln Val Leu Gly
20

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Met Leu Pro Leu Cys Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Gly Pro
1 5 10 15

Gly Pro Ser Leu Gly
20

<210> 20
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (14) to (18)
<223> Variant of HSA native leader

<400> 21
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (14) to (18)
<223> Variant of HSA native leader

<400> 22
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Gly Val
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (14) to (18)

<223> Variant of HSA native leader

<400> 23

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

Leu Gly

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Ser Gly

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Ser Gly

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (14) to (18)

<223> Variant of HSA native leader

<400> 26

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

Ser Gly

<210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (14) to (18)
 <223> Variant of HSA native leader

<400> 27
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Gly Val
 1 5 10 15

Ser Gly

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (14) to (18)
 <223> Variant of HSA native leader

<400> 28
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val
 1 5 10 15

Ser Gly

<210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (14) to (23)
 <223> Variant of HSA native leader

<400> 29
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Gly Val

1 5 10 15

Leu Gly Asp Leu His Lys Ser
20

<210> 30
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic signal peptide

<400> 30
Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Ala Pro Ala Arg Gly
20

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala

<210> 32
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15

Leu Glu His Thr His Arg Arg Gly Ser Leu Asp Lys Arg
20 25

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Lys Leu Ala Tyr Ser Leu Leu Leu Pro Leu Ala Gly Val Ser Ala
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Tyr Lys Arg
20

<210> 34

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr
20 25 30

Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln
35 40 45

Thr Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Lys
50 55 60

Arg
65

<210> 35

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr
20 25 30

Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln
35 40 45

Thr Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Glu
50 55 60

Glu Gly Glu Pro Lys Arg
65 70

<210> 36
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer used to generate XhoI and ClaI

site in pPPC0006

<400> 36
gcctcgagaa aagagatgca cacaagagtg aggttgctca tcgatttaaa gatttggg 58

<210> 37
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer used in generation XhoI and ClaI

site in pPPC0006

<400> 37
aatcgatgag caacctcact cttgtgtgca tctcttttct cgaggctcct ggaataagc 59

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer used in generation XhoI and ClaI
site in pPPC0006

<400> 38
tacaaactta agagtccaat tagc 24

<210> 39
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer used in generation XhoI and ClaI

site in pPPC0006

<400> 39
 cacttctcta gagggtttc atatgtctt 29

<210> 40
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Misc_Structure
 <223> Synthetic oligonucleotide used to alter restriction

sites in pPPC0007

<400> 40
 aagctgcctt aggtttataa taaggcgcgc cggccggccg tttaaactaa gcttaattct 60

<210> 41
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Misc_Structure
 <223> Synthetic oligonucleotide used to alter restriction

sites in pPPC0007

<400> 41
 agaattaagc ttagtttaaa cggccggccg gcgcgcctta ttataagcct aaggcagctt 60

<210> 42
 <211> 32
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer useful for generation of albumin

fusion protein in which the albumin moiety is N-terminal of the Therapeutic Protein

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)

<223> n equals a,t,g, or c

<400> 42

aagctgcctt aggcttannn nnnnnnnnnn nn

32

<210> 43

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer useful for generation of albumin

fusion protein in which the albumin moiety is N-terminal of the Therapeutic Protein

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (41)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (44)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)

<223> n equals a,t,g, or c

<400> 43

gcgcgcgttt aaacggccgg ccggcgcgcc ttattannnn nnnnnnnnnn n

51

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Leu Asp Lys Arg

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Leu Glu Lys Arg

1

<210> 46

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer useful for generation of albumin fusion

protein in which the albumin moiety is c-terminal of the
Therapeutic Protein

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature
 <222> (25)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)
 <223> n equals a,t,g, or c

<400> 46
 aggagcgtcg acaaaagann nnnnnnnnnn nnn

<210> 47
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer useful for generation of albumin

fusion protein in which the albumin moiety is c-terminal of the Therapeutic Protein

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)
 <223> n equals a,t,g, or c

<400> 47
 ctttaaatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcacnnn nnnnnnnnnn nn

52

<210> 48
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
 1 5

<210> 49
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) to (11)
 <223> Kozak sequence

<400> 49
 ccgccaccat g 11

<210> 50
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer useful for inserting Therapeutic

 protein into pC4:HSA vector

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature

<222> (32)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (44)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)

<223> n equals a,t,g, or c

<400> 50

ccgccgtcgc aggggtgtgt ttcgtcgann nnnnnnnnnn nnnnnn

46

<210> 51

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer useful for inserting Therapeutic

protein into pC4:HSA vector

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)
<223> n equals a,t,g, or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (52)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (53)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)

<223> n equals a,t,g, or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (55)

<223> n equals a,t,g, or c

<400> 51

agtcccatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcacnnnn nnnnnnnnnn nnnnn

55

<210> 52

<211> 733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52
 gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60
 aattcgaggg tgcaccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga 120
 tctcccgga tctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180
 tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240
 aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcttg caccaggact 300
 ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg 360
 agaaaacat ctccaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
 accctgcccc 420
 catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480
 atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga 540
 ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg 600
 acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660
 acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720
 gactctagag gat 733

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)
 <223> Xaa equals any of the twenty naturally occurring L-amino acids

<400> 53
 Trp Ser Xaa Trp Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence with 4 tandem copies of the GAS binding site found in the IRF1 promoter (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)), 18 nucleotides complementary to the SV40 early promoter, and a Xho I restriction site.

<400> 54
 gcgcctcgag atttcccga aatctagatt tccccgaat gatttcccg aaatgatttc 60
 cccgaaatat ctgccatctc aattag 86

<210> 55
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence complementary to the SV40 promoter; includes a Hind III restriction site.

<400> 55

gcggcaagct tttgcaaag cctaggc

27

<210> 56

<211> 271

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Protein_Bind

<223> Synthetic promoter for use in biological assays; includes GAS binding sites found in the IRF1 promoter

<400> 56

ctcgagattt ccccgaaatc tagatttccc cgaaatgatt tccccgaaat gatttccccg

60

aaatatctgc catctcaatt agtcagcaac catagtcccg ccctaactc cgcccatccc

120

gcccctaact ccgccagtt ccgccattc tccgcccacat ggctgactaa tttttttat

180

ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt

240

ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct t

271

<210> 57

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer complementary to human genomic EGR-1 promoter sequence; includes a Xho I restriction site.

<400> 57

gcgctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg

32

<210> 58

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer complementary to human genomic EGR-1 promoter sequence; includes a Hind III restriction site.

<400> 58

gcgaagcttc gcgactcccc ggatccgcct c 31

<210> 59

<211> 12

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

ggggactttc cc 12

<210> 60

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer with 4 tandem copies of the NF-KB binding site (GGGGACTTCCC), 18 nucleotides complementary to the 5' end of the SV40 early promoter sequence, and a XhoI restriction site.

<400> 60

gcggcctcga ggggactttc ccggggactt tccggggact ttccgggact ttccatcctg 60
ccatctcaat tag 73

<210> 61

<211> 256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Protein_Bind

<223> Synthetic promoter for use in biological assays; includes NF-KB binding sites.

<400> 61

ctcgagggga ctttcccgga gactttccgg ggactttccg ggactttcca tctgccatct 60
caattagtc gcaaccatag tcccgcctt aactccgcc atcccgcctt taactccgcc 120
cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt ttattttatg cagaggccga 180
ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 240
cttttgcaaa aagctt

256

<210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate VH forward primer useful for
 amplifying human VH domains

<400> 62
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgg 23

<210> 63
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate VH forward primer useful for
 amplifying human VH domains

<400> 63
 caggtcaact taaggagtc tgg 23

<210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate VH forward primer useful for
 amplifying human VH domains

<400> 64
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgg 23

<210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate VH forward primer useful for
amplifying human VH domains

<400> 65
caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate VH forward primer useful for
amplifying human VH domains

<400> 66
gaggtgcagc tgttcagtc tgc 23

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate VH forward primer useful for
amplifying human VH domains

<400> 67
caggtacagc tgcagcagtc agg 23

<210> 68
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate JH reverse primer useful for
amplifying human VH domains

<400> 68
tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 24

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate JH reverse primer useful for

amplifying human VH domains

<400> 69

tgaagagacg gtgaccattg tccc

24

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate JH reverse primer useful for

amplifying human VH domains

<400> 70

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc

24

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate JH reverse primer useful for

amplifying human VH domains

<400> 71

tgaggagacg gtgaccgtgg tccc

24

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 72

gacatccaga tgacccagtc tcc

23

<210> 73

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 73

gatgttgtga tgactcagtc tcc

23

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 74

gatattgtga tgactcagtc tcc

23

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 75

gaaattgtgt tgacgcagtc tcc

23

<210> 76

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 76

gacatcgtga tgaccagtc tcc

23

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 77

gaaacgacac tcacgcagtc tcc

23

<210> 78

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vkappa forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 78

gaaattgtgc tgactcagtc tcc

23

<210> 79

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 79

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 80
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 80
cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 81
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 81
tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 82
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 82
tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 83
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 83

cacgttatac tgactcaacc gcc

23

<210> 84

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 84

caggctgtgc tcactcagcc gtc

23

<210> 85

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Vlambda forward primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 85

aattttatgc tgactcagcc cca

23

<210> 86

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Jkappa reverse primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 86

acgtttgatt tccaccttgg tccc

24

<210> 87
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Jkappa reverse primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 87
acgtttgatc tccagcttgg tccc 24

<210> 88
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Jkappa reverse primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 88
acgtttgata tccactttgg tccc 24

<210> 89
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate Jkappa reverse primer useful for
amplifying human VL domains

<400> 89
acgtttgatc tccaccttgg tccc 24

<210> 90
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate Jkappa reverse primer useful for
 amplifying human VL domains

<400> 90
 acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

<210> 91
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate Jlamba reverse primer useful for
 amplifying human VL domains

<400> 91
 cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 92
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate Jlamba reverse primer useful for
 amplifying human VL domains

<400> 92
 cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 93
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate Jlamba reverse primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 93

tcctatgtgc tgactcagcc acc

23

<210> 94

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Jlambda reverse primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 94

tcttctgagc tgactcagga ccc

23

<210> 95

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Jlambda reverse primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 95

cacgttatac tgactcaacc gcc

23

<210> 96

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Jlambda reverse primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 96

caggctgtgc tcactcagcc gtc

23

<210> 97
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate Jlambda reverse primer useful for

amplifying human VL domains

<400> 97

aattttatgc tgactcagcc cca

23

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Cys Asp Leu Pro Gln

1 5

<210> 99

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa equals Arg or Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (113)

<223> Xaa equals Ala or Val

<400> 99

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Xaa Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met Asn
 100 105 110
 Xaa Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Arg
 145 150 155 160
 Leu Arg Arg Lys Glu
 165

<210> 100
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)
 <223> Xaa equals Arg or Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)
 <223> Xaa equals Ala or Val

<400> 100
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Xaa Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met Asn
100 105 110

Xaa Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 101

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa equals Arg or Lys

<400> 101

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Xaa Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Met Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met Asn
 100 105 110
 Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu Arg
 145 150 155 160
 Leu Arg Arg Lys Glu
 165

<210> 102

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> Xaa equals Arg or Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97)

<223> Xaa equals Ser or Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (98)

<223> Xaa equals Cys or Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)

<223> Xaa equals Val or Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (100)

<223> Xaa equals Met or Asp

<400> 102

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Xaa Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Glu Val Gly Val Ile Glu Ser Pro Leu Met Tyr
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys Arg
145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
165

<210> 103
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (115)
<223> Xaa equals Ala or Val

<400> 103
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu
100 105 110

Met Asn Xaa Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 104

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Met Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Asp Asn Arg Arg Thr Leu
1 5 10 15

Met Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser Pro Ser Ser Cys Leu Met
20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln
50 55 60

Ile Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu

145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic signal peptide

<400> 105

Met Arg Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Ala Pro Ala Arg Gly
20

<210> 106

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer (deleted)

<400> 106

000

<210> 107

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer for full-length IFN β amplification, has BamHI cloning site

<400> 107

gcgcggatcc gaattccgcc gccatgacca acaagtgtct cctccaaatt gctctcctgt 60

tgtgtcttctc cactacagct ctttccatga gctacaactt gcttgg 106

<210> 108

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer for full-length IFNb amplification, has ClaI cloning site

<400> 108

gcgcgcatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcggt tcggaggtaa cctgt 55

<210> 109

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 109

cgcgcgctgc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41

<210> 110

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 110

gcgcgcatcg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatcttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala

20

<210> 112

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg
20

<210> 113

<211> 1497

<212> DNA

<213> Hypocrea jecorina

<400> 113

tctagagttg tgaagtcggt aatcccgtg tatagtaata cgagtcgcat ctaaatactc 60
cgaagctgct gcgaacccgg agaatcgaga tgtgctggaa agcttctagc gagcggctaa 120
attagcatga aaggctatga gaaattctgg agacggcttg ttgaatcatg gcgttccatt 180
cttcgacaag caaagcgttc cgtcgcagta gcaggcactc attcccgaaa aaactcggag 240
attcctaagt agcgatggaa ccggaataat ataataggca atacattgag ttgcctcgac 300
ggttgcaatg caggggtact gagcttggac ataactgttc cgtacccac ctcttctcaa 360
cctttggcgt ttccctgatt cagcgtaccc gtacaagtcg taatcactat taaccagac 420

tgaccggacg tgttttccc ttcatattgga gaaataatgt cattgcgatg tgtaatttgc 480
ctgcttgacc gactggggct gttcgaagcc cgaatgtagg attgttatcc gaactctgct 540
cgtagaggca tgttgtgaat ctgtgtcggg caggacacgc ctggaagggt cacggcaagg 600
gaaaccaccg atagcagtgat ctatgtagca cctgtaaagc cgcaatgcag catcactgga 660
aaatacaaac caatggctaa aagtacataa gttaatgcct aaagaagtca tataccagcg 720
gctaataatt gtacaatcaa gtggctaaac gtaccgtaat ttgccaacgg cttgtggggg 780
tgcagaagca acggcaaagc cccacttccc caggtttgtt tcttactca gtccaatctc 840
agctgggtgat

cccccaattg ggtcgtttgt ttgttccggt gaagtgaag aagacagagg 900
taagaatgtc tgactcggag cgttttgcat acaaccaagg gcagtgatgg aagacagtga 960
aatgttgaca ttcaaggagt atttagccag ggatgcttga gtgtatcgtg taaggaggtt 1020
tgtctgccga tacgacgaat actgtatagt cacttctggt gaagtgggtcc atattgaaat 1080
gtaagtcggc actgaacagg caaaagattg agttgaaact gcctaagatc tcgggcccctc 1140
gggccttcgg cctttgggtg tacatgtttg tgctccgggc aaatgcaaag tgtggttagga 1200
tcgaacacac tgctgccttt accaagcagc tgagggtatg tgataggcaa atgttcaggg 1260
gccactgcat ggtttcgaat

agaaagagaa gcttagccaa gaacaatagc cgataaagat 1320
agcctcatta aacggaatga gctagtaggc aaagtcagcg aatgtgtata tataaagggtt 1380
cgaggtccgt gcctccctca tgcctcccc atctactcat caactcagat cctccaggag 1440
acttgtacac catcttttga ggcacagaaa cccaatagtc aaccgaggac tggcatc 1497

<210> 114

<211> 366

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

<400> 114

agatctgggt cctgagtaca tctaccgatg cgctcgate cccctcttag ccgcatgaga 60
 ttcctacat ttatgtccta tcgttcaggg tcctatttgg accgctagaa atagactctg 120
 ctgatttgt ttccattatt cagcaatta cgatagtatt tggctctttt cgtttggccc 180
 aggtcaattc gggtlaagacg cgatcacgcc attgtggccg ccggcgttgt gctgctgcta 240
 tccccgcat ataaacaacc cctccaccag ttcgttgggc ttgcaaatg ctgtactcta 300
 tttcaagttg tcaaaagaga ggattcaaaa aattataccc cagatatcaa agatatcaaa 360
 gccatc 366

<210> 115

<211> 1646

<212> DNA

<213> *Hypocrea jecorina*

<400> 115

tctagagttg tgaagtcggt aatcccgtg tatagtaata cgagtcgcat ctaaatactc 60
 cgaagctgct gcgaaccgg agaatcgaga tgtgctggaa agcttctagc gagcggctaa 120
 attagcatga aaggctatga gaaattctgg agacggcttg ttgaatcatg gcgttccatt 180
 cttcgacaag caaagcgttc cgtcgagta gcaggcactc attcccga aaactcggag 240
 attcctaagt agcgatggaa ccggaataat ataataggca atacattgag ttgcctcgac 300
 ggttgcaatg caggggtact gagcttggac ataactgttc cgtacccac ctcttctcaa 360
 cctttggcgt ttcctgatt cagcgtaccc gtacaagtcg taatcactat taaccagac 420

tgaccggacg tgttttggc ttcatttga gaaataatgt cattcgatg tgtaatttgc 480
 ctgcttgacc gactggggt gtctgaagcc cgaatgtagg attgttatcc gaactctgct 540
 cgtagaggca tgttgtgaat ctgttcggg caggacacgc ctgaaggtt caccgcaagg 600
 gaaaccaccg atagcagtg ctagtacaa cctgtaaagc cgcaatgcag catcactgga 660
 aaatacaaac caatggctaa aagtacataa gttaatgcct aaagaagtca tataccagcg 720
 gctaataatt gtacaatcaa gtggctaaac gtaccgtaatt ttgccaacgg ctgtgggggt 780
 tgcagaagca acggcaaacg cccacttccc cagtttgtt tcttactca gtccaatctc 840
 agctggtgat

cccccaattg ggtcgttgt ttgttccggt gaagtgaag aagacagagg 900
 taagaatgtc tgactcggag cgttttgcac acaaccaagg gcagtgatgg aagacagtga 960
 aatgttgaca ttcaaggagt atttagccag ggatgcttga gtgtatcgtg taaggagggt 1020
 tgtctgccga tacgacgaat actgtatagt cacttctggt gaagtgttcc atattgaaat 1080
 gtaagtccgc actgaacagg caaaagattg agttgaaact gcctaagatc tcgggcctc 1140
 gggccttcgg cctttgggtg tacatgtttg tgctccgggc aaatgcaaag tgtggtagga 1200
 tcgaacacac tgctgccttt accaagcagc tgagggtatg tgataggcaa atgttcaggg 1260
 gccactgcat ggtttcgaat

agaaagagaa gcttagcctg cagcctctta tcgagaaaga 1320
 aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaaaaaac ccagacacgc 1380
 tcgacttctt gtcttctat tgattgcagc ttccaatttc gtcacacaac aaggtcctag 1440
 cttagccaag aacaatagcc gataaagata gcctcattaa acggaatgag ctagttagga 1500
 aagtcagcga atgtgtatat ataaagggtc gaggtccgtg cctccctcat gctctccca 1560
 tctactatc aactcagatc ctccaggaga cttgtacacc atcttttgag gcacagaaac 1620
 ccaatagtca accgcggact ggcatc 1646

<210> 116

<211> 516

<212> DNA

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 116

agatctggtt cctgagtaca tctaccgatg cgctcgate cccctcttag ccgcatgaga 60
 ttcctaccat ttatgtccta tcgttcaggg tctatattgg accgctagaa atagactctg 120
 ctcgatttgt ttccattatt cagcaatta cgatagtatt tggctctttt cgtttggccc 180
 aggtcaattc gggtlaagacg cgatcacgcc attgtggccg ccggcgctgc agcctcttat 240
 cgagaagaa attaccgtcg ctctgtattt gtttgcaaaa agaacaaaac tgaaaaaacc 300
 cagacacgct cgacttcttg tcttcttatt gattgcagct tccaatttcg tcacacaaca 360
 aggtcctacg ccggcgttgt gctgctgcta tccccgcat ataacaacc cctccaccag 420

 ttcgttgggc ttigcgaatg ctgtactcta tttcaagttg tcaaaagaga ggattcaaaa 480
 aattatacc cagatatcaa agatatcaa gccatc 516

<210> 117
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 117
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 cagggggtgg gggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

 gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaa 495

<210> 118
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 cagggggtgg gggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

 gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaa 495

<210> 119
 <211> 495
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 119

tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggtgtg ggggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

gaggttgtca gaggagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 120

<211> 498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 120

tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggtgtg ggggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gaggagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaataa 498

<210> 121

<211> 495

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 121

tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggtgtg ggggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
ttgtgcctgg 420
gaggttgtca gaggagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 122
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 122
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
 ttgtgcctgg 420
 gaggttgtca gacgagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaa 495

<210> 123
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
 ttgtgcctgg 420
 gaggttgtca gacgagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaa 495

<210> 124
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 124
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
 ttgtgcctgg 420

gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 125
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 125
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggggtgg ggggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
ttgtgcctgg 420
gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 126
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 126
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggggtgg ggggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 127
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 127
tgtgatctgc ctcaaaccce cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtttg gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300

cagggggtgg gggtagacaga gactcccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

gaggttgtca gacgagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 128

<211> 767

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
20 25 30

Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
35 40 45

Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
50 55 60

Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
65 70 75 80

Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
85 90 95

Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
100 105 110

Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
115 120 125

Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
130 135 140

His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
145 150 155 160

Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
165 170 175

Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
180 185 190

Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
195 200 205

Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
210 215 220

Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
225 230 235 240

Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
245 250 255

Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
260 265 270

Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
275 280 285

Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
290 295 300

His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
305 310 315 320

Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr
325 330 335

Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
340 345 350

Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
355 360 365

Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His
370 375 380

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
385 390 395 400

Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
405 410 415

Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
420 425 430

Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
435 440 445

Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
450 455 460

Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
465 470 475 480

His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
485 490 495

Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
500 505 510

Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
515 520 525

Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
530 535 540

Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
545 550 555 560

Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
565 570 575

Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
580 585 590

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr

595
 600
 605
 His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg
 610 615 620
 Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe
 625 630 635 640
 Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro
 645 650 655
 Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 660 665 670
 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr
 675 680 685
 Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly
 690 695 700
 Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala
 705 710 715 720
 Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys
 725 730 735
 Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser
 740 745 750
 Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 755 760 765
 <210> 129
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 129
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
20 25 30

Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
35 40 45

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
50 55 60

Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
65 70 75 80

Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
85 90 95

Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
100 105 110

Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
115 120 125

Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
130 135 140

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
145 150 155 160

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
165 170 175

Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
180 185 190

Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
195 200 205

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
210 215 220

Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
225 230 235 240

Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
245 250 255

Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
260 265 270

Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
275 280 285

Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
290 295 300

Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp
305 310 315 320

Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
325 330 335

Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
340 345 350

Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu
355 360 365

Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp
370 375 380

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val
385 390 395 400

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln
405 410 415

Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
420 425 430

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

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

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

Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
675 680 685

Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile
690 695 700

Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile
705 710 715 720

Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu
725 730 735

Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met
740 745 750

Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys
755 760 765

Glu

<210> 130

<211> 779

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly
1 5 10 15

Leu Glu His Thr His Arg Arg Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His
20 25 30

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
35 40 45

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
50 55 60

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
65 70 75 80

Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
85 90 95

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

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
115 120 125

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
130 135 140

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
145 150 155 160

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
165 170 175

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
180 185 190

Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu
195 200 205

Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys
210 215 220

Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe
225 230 235 240

Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu
245 250 255

Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr
260 265 270

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
275 280 285

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu
290 295 300

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala
305 310 315 320

Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala
325 330 335

Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys
340 345 350

Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro
355 360 365

Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr
370 375 380

Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala
385 390 395 400

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu
405 410 415

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
420 425 430

Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
435 440 445

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
450 455 460

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
465 470 475 480

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
485 490 495

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
500 505 510

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro

515	520	525
Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr		
530	535	540
Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu		
545	550	555 560
Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val		
	565	570 575
Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp		
	580	585 590
Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser		
	595	600 605
Gln Ala Ala Leu Gly Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly		
	610	615 620
Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu		
625	630	635 640
Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu		
	645	650 655
Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu		
	660	665 670
Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala		
	675	680 685
Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln		
	690	695 700
Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr		
705	710	715 720
Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr		
	725	730 735

Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys
740 745 750

Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
755 760 765

Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770 775

<210> 131
<211> 774
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser
20 25 30

Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile
35 40 45

Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln
50 55 60

Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
65 70 75 80

His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
85 90 95

Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu
100 105 110

Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly
115 120 125

Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg
130 135 140

Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser
145 150 155 160

Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
165 170 175

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His
180 185 190

Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe
195 200 205

Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro
210 215 220

Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys
225 230 235 240

Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His
245 250 255

Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr
260 265 270

Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
275 280 285

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu
290 295 300

Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu
305 310 315 320

Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro
325 330 335

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala
340 345 350

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

355	360	365
Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys		
370	375	380
Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe		
385	390	395 400
Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu		
405	410	415
Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr		
420	425	430
Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp		
435	440	445
Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu		
450	455	460
Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala		
465	470	475 480
Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala		
485	490	495
Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys		
500	505	510
Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro		
515	520	525
Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr		
530	535	540
Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala		
545	550	555 560
Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu		
565	570	575

Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe
580 585 590

Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser
595 600 605

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser
610 615 620

Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp
625 630 635 640

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr
645 650 655

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn
660 665 670

Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro
675 680 685

Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr
690 695 700

Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu
705 710 715 720

Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val
725 730 735

Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp
740 745 750

Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
755 760 765

Gln Ala Ala Leu Gly Leu
770

<210> 132

<211> 769

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ile Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg
20 25 30

Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
35 40 45

Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn
50 55 60

Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln
65 70 75 80

Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp
85 90 95

Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn
100 105 110

Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro
115 120 125

Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg
130 135 140

Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
145 150 155 160

Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu
165 170 175

Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
180 185 190

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

195	200	205
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val		
210	215	220
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp		
225	230	235 240
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
	245	250 255
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala		
	260	265 270
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
	275	280 285
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
	290	295 300
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
305	310	315 320
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
	325	330 335
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys		
	340	345 350
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu		
	355	360 365
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys		
	370	375 380
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
385	390	395 400
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser		
	405	410 415

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
420 425 430

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
435 440 445

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
450 455 460

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
465 470 475 480

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
485 490 495

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
500 505 510

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
515 520 525

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
530 535 540

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
545 550 555 560

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
565 570 575

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
580 585 590

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
595 600 605

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
610 615 620

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
625 630 635 640

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
645 650 655

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
660 665 670

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
675 680 685

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
690 695 700

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
705 710 715 720

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
725 730 735

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
740 745 750

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
755 760 765

Leu

<210> 133

<211> 835

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser
85 90 95

Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe
100 105 110

Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe
115 120 125

Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met
130 135 140

Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala
145 150 155 160

Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln
165 170 175

Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu
180 185 190

Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe
195 200 205

Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala
210 215 220

Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr
225 230 235 240

Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys Ser Glu
245 250 255

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

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

Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys
485 490 495

His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys
500 505 510

Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys
515 520 525

Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu
530 535 540

Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val
545 550 555 560

Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe
565 570 575

Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
580 585 590

Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu
595 600 605

Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe
610 615 620

Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln
625 630 635 640

Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala
645 650 655

Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
660 665 670

Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys
675 680 685

Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser
690 695 700

Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser
705 710 715 720

Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro
725 730 735

Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe
740 745 750

Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu
755 760 765

Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
770 775 780

His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp
785 790 795 800

Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
805 810 815

Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
820 825 830

Leu Gly Leu
835

<210> 134

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

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

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

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

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

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

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

690

695

700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 135

<211> 773

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys
180 185 190

Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys
195 200 205

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe
210 215 220

Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr
225 230 235 240

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr
245 250 255

Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
260 265 270

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
275 280 285

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
290 295 300

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
305 310 315 320

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
325 330 335

Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
340 345 350

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
355 360 365

Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
370 375 380

Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
385 390 395 400

Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
405 410 415

Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
420 425 430

Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
435 440 445

Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
450 455 460

Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
465 470 475 480

Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
485 490 495

Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
500 505 510

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
515 520 525

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr

530

535

540

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
545 550 555 560

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
565 570 575

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
580 585 590

Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
595 600 605

Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
610 615 620

Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr
625 630 635 640

Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
645 650 655

Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
660 665 670

Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
675 680 685

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu
690 695 700

Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu
705 710 715 720

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met
725 730 735

Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
740 745 750

Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln
755 760 765

Ala Ala Leu Gly Leu
770

<210> 136
<211> 769
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136
Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ile Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg
20 25 30

Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
35 40 45

Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn
50 55 60

Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln
65 70 75 80

Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp
85 90 95

Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn
100 105 110

Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro
115 120 125

Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg
130 135 140

Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu
145 150 155 160

Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu
165 170 175

Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
180 185 190

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
195 200 205

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
210 215 220

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
225 230 235 240

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
245 250 255

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
260 265 270

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
275 280 285

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
290 295 300

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
305 310 315 320

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
325 330 335

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
340 345 350

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
355 360 365

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

370

375

380

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
385 390 395 400

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
405 410 415

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
420 425 430

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
435 440 445

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
450 455 460

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
465 470 475 480

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
485 490 495

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
500 505 510

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
515 520 525

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
530 535 540

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
545 550 555 560

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
565 570 575

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
580 585 590

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
595 600 605

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
610 615 620

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
625 630 635 640

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
645 650 655

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
660 665 670

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
675 680 685

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
690 695 700

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
705 710 715 720

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
725 730 735

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
740 745 750

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
755 760 765

Leu

<210> 137

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

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

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

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

660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 138
<211> 774
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

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

500	505	510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
545	550	555
		560
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
565	570	575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
580	585	590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
595	600	605
Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu		
610	615	620
Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys		
625	630	635
		640
Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe		
645	650	655
Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile		
660	665	670
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr		
675	680	685
Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu		
690	695	700
Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met		
705	710	715
		720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 139

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 140

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser

145					150							155					160
Leu	Arg	Ser	Lys	Glu													
				165													
<210>	141																
<211>	165																
<212>	PRT																
<213>	Homo sapiens																
<400>	141																
Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Met		
1				5					10					15			
Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp		
			20					25					30				
Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn	Gln	Phe	Gln		
		35					40					45					
Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe		
	50					55					60						
Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu		
65					70					75					80		
Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu		
				85					90					95			
Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys		
			100					105					110				
Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu		
		115					120					125					
Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg		
	130					135					140						
Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser		
145				150						155					160		

165

<210> 142

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 143
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 143
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 144
 <211> 165
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 145

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 146

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 147

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

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

20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 148

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 <210> 149
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 149
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 150
catacaaaact taagagtcca 20

<210> 151
<211> 56
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 151
ctttaaatcg atgagcaacc tcaactcttgt gtgcatacgc gttagccaaa gaagca 56

<210> 152
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 152
 catacaaact taagagtcca 20

<210> 153
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 153
 ctttaaactg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatctgc cgatattttg gctgca 56

<210> 154
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 154
 catacaaact taagagtcca 20

<210> 155
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 155
 ctttaaactg atgagcaacc tcactcttgt gtgcatctct cttatccaaa gaacct 56

<210> 156
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 156
 cgcgcgctc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41

<210> 157

<211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 157
 gcgcgcacgc atgagcaacc tcactcttgc gtgcaccttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 158
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 158
 gttacgacag tagcaggcgt ttcggct 27

<210> 159
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 159
 gcgcgcacgc atgagcaacc tcactcttgc gtgcaccttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 160
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 160
 cgcgcgcgc gacaaaagat gtgatctgcc tcaaaccac a 41

<210> 161
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 161
 gcgcgcacgc atgagcaacc tcactcttgc gtgcaccttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 162
 <211> 38

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 162
caagctgcct taggcttatg tgatctgcct caaaccca 38

<210> 163
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 163
gaattcggcg cgccttatc cttacttctt aaactttct 39

<210> 164
<211> 107
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 164
gcgcgcggat ccgccaccat ggcttgacc ttgctttac tgggtggcct cctggtgctc 60
agctgcaagt caagctgctc tgtgggctgt gatctgctc aaaccca 107

<210> 165
<211> 59
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 165
gcgcgcatcg atgagcaacc tcactcttgi gtgcatcttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 166
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 166
gcatgtgac tgcctcaaac ccaca 25

<210> 167
<211> 59

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 167
gcgcgcacgc atgagcaacc tcactcttgc gtgcaccttc cttacttctt aaactttct 59

<210> 168
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 168
catacaaaact taagagtcca 20

<210> 169
<211> 67
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 169
ctttaaatgc atgagcaacc tcactcttgc gtgcaccttc cttatccaaa gaaccggaat 60
aagccga 67

<210> 170
<211> 495
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 170
tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc
ttgtgcctgg 420
gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaa 495

<210> 171
<211> 774
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

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

420	425	430
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val		
435	440	445
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His		
450	455	460
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val		
465	470	475
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg		
485	490	495
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe		
500	505	510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
545	550	555
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
565	570	575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
580	585	590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
595	600	605
Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu		
610	615	620
Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys		
625	630	635
		640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 172

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 173
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 173
agaagtgtg caaggctgac g 21

<210> 174
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 174
acctgacctg caggaaagag 20

<210> 175
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 175
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

 gaggttgtca gacgagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaataata a 501

<210> 176
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 176
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
 aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420

 gaggttgtca gacgagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
 ttaagaagta aggaataata a 501

<210> 177
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 177
 tgtgatctgc ctcaaaccca cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttccccag 120
 gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
 cagcagatct tcaatctctt cagcaciaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
 ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
 caggggggtgg gggtagacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360

aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaataata a 501

<210> 178
<211> 501
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 178
tgtgatctgc ctcaaaccac cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggttg ggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaataata a 501

<210> 179
<211> 501
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 179
tgtgatctgc ctcaaaccac cagcctgggt tctagaagga ccttgatgct cctggcacag 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgcttg aaggacagac atgactttgg atttcccag 120
gaggagtgtt gcaaccagtt ccaaaaggct gaaaccatcc ctgtcctcca tgagatgac 180
cagcagatct tcaatctctt cagcacaag gactcatctg ctgcttgga tgagaccctc 240
ctagacaaat tctacactga actctaccag cagctgaatg acctggaagc ctgtgtgata 300
cagggggttg ggtgacaga gactccctg atgaaggagg actccattct ggctgtgagg 360
aaatacttcc aaagaatcac tctctatctg aaagagaaga aatacagccc ttgtgcctgg 420
gaggttgta gagcagaaat catgagatct ttttctttgt caacaaactt gcaagaaagt 480
ttaagaagta aggaataata a 501

<210> 180
<211> 774
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180
Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

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

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

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

660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 181

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

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

500	505	510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
545	550	555
		560
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
565	570	575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
580	585	590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
595	600	605
Leu Ser Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu		
610	615	620
Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys		
625	630	635
		640
Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe		
645	650	655
Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile		
660	665	670
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr		
675	680	685
Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu		
690	695	700
Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met		
705	710	715
		720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 182

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

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

565

570

575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Ser Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 183

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

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

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

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Ser Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 184

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala

20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
610 615 620

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
625 630 635 640

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
645 650 655

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
660 665 670

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

675 680 685

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
690 695 700

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
705 710 715 720

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
725 730 735

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Ser Ala Trp Glu Val Val
740 745 750

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
755 760 765

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
770

<210> 185
<211> 165

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 185
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 186

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 187

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys

100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 <210> 188
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 188
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 189

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
 165