



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월10일

(11) 등록번호 10-1507718

(24) 등록일자 2015년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/36 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7001530

(22) 출원일자(국제) 2009년06월24일

심사청구일자 2014년06월24일

(85) 번역문제출일자 2011년01월20일

(65) 공개번호 10-2011-0044978

(43) 공개일자 2011년05월03일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/004549

(87) 국제공개번호 WO 2009/156137

국제공개일자 2009년12월30일

(30) 우선권주장

08011429.1 2008년06월24일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2003530839 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

체에스엘 베링 게엠베하

독일 35041 마르부르크 에밀-폰-베링 슈트라쎄 76

(72) 발명자

바이머 토마스

독일 35075 글라덴바흐 리하르트-바그너-슈트라쎄

8

슐테 슈테판

독일 35043 마르부르크 바우어바하 슈트라쎄 46

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 연장된 생체내 반감기를 갖는 인자 VIII, 폰 빌레브란트 인자 또는 이들의 복합체

(57) 요약

본 발명은 응고 인자 VIII(FVIII) 및 폰 빌레브란트 인자(VWF)뿐만 아니라 이들의 복합체 및 이들의 유도체를 암호화하는 변형 핵산 서열, 이 핵산 서열을 함유하는 재조합 발현 백터, 이 재조합 발현 백터에 의해 형질전환된 숙주 세포, 상기 핵산 서열에 의해 암호화되고 미변형 야생형 단백질과 비교했을 때 연장된 생체내 반감기 및/또는 향상된 생체내 회수율과 함께 생물학적 활성을 보유하는 재조합 폴리펩타이드 및 유도체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 발현 수율을 향상시키는 상용하는 FVIII 서열에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 재조합 단백질 및 이들의 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 사람 유전자요법에 사용하기 위한, 상기 변형 핵산 서열을 포함하는 전이 백터에 관한 것이다.

(72) 발명자

메츠너 후베르트

독일 35041 마르부르크 임 보덴 6

크론트할러 울리히

독일 82041 다이젠휴펜 슈테파닌슈트라쎄 5

린트 홀거

독일 35037 마르부르크 엘리자베트-폰-타덴-슈트라
쎄 8

랑 비간트

독일 35091 쾰베 아카친벡 2

명세서

청구범위

청구항 1

변형된 혼 빌레브란트 인자(VWF) 폴리펩타이드 (단량체, 이량체 또는 다량체), 또는 인자 VIII (FVIII) 폴리펩타이드 및 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체로서,

상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 이의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분에서 반감기 연장 폴리펩타이드 (HLEP)의 N-말단 부분에 융합된 VWF 폴리펩타이드를 포함하고,

여기서, 상기 HLEP는 일부민이며, 상기 HLEP의 VWF 폴리펩타이드로의 융합은 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드의 이량체화 또는 다량체화를 방해하지 않는,

변형된 혼 빌레브란트 인자(VWF) 폴리펩타이드, 또는 인자 VIII (FVIII) 폴리펩타이드 및 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 반감기에 비해 연장된 생물학적 활성의 반감기를 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 반감기에 비해 적어도 25% 증가된 생물학적 활성의 반감기를 보유하거나, 상기 복합체가 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 25% 증가된 생물학적 활성의 반감기를 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드는 개체에 투여후 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 보유하거나, 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체가 개체에 투여후 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF의 상응하는 복합체의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 항원 반감기에 비해 적어도 25% 증가된 항원 반감기를 보유하거나, 상기 복합체가 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 25% 증가된 항원 반감기를 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 개체 투여후 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 보유하거나, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체가 개체에 투여후 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF를 포함하는 상응하는 복합체의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 생체내 회수율에 비해 적어도 10% 증가된 생체내 회수율을 보유하거나, 상기 복합체가 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 10% 증가된 생체내 회수율을 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 VWF 폴리펩타이드가 이의 1차 해독 산물의 C-말단 아미노산에서 HLEP의 N-말단 부분에 융

합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 VWF 폴리펩타이드가 이의 1차 해독 산물의 C-말단 부분에서 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 상응하는 변형되지 않은 VWF 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 적어도 10%를 보유하거나, 상기 복합체가 변형되지 않은 FVIII과 변형되지 않은 VWF의 상응하는 복합체의 생물학적 활성의 적어도 10%를 보유하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

(a) 제1항에 따른 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 그룹을 포함하는 숙주 세포를, 상기 변형된 VWF가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

(b) 상기 숙주 세포 또는 배양 배지로부터, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체를 회수하는 단계

를 포함하여, 변형된 VWF 폴리펩타이드를 생산하는 방법.

청구항 14

제1항에 따른 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체를 포함하는, A형 혈우병 또는 폰 빌레브란트병 치료용 약제학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

반감기 연장 폴리펩타이드 (HLEP)로서 일부분의 N-말단 부분을 VWF 폴리펩타이드의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분에 융합하여, 상기 HLEP의 VWF 폴리펩타이드로의 융합이 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드의 이량체화 또는 다량체화를 방해하지 않도록 하는 단계를 포함하는, 제1항에 따른 변형된 VWF 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

제17항의 방법에 의해 제조된 변형된 VWF 폴리펩타이드, 또는 FVIII 폴리펩타이드와 제17항의 방법에 의해 제조된 변형된 VWF 폴리펩타이드를 혼합하는 단계를 포함하는 제1항에 따른 변형된 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 복합체를 제조하는 방법에 의해 제조된 복합체를 포함하는, A형 혈우병 또는 폰 빌레브란트병 치료용 약제학적 조

성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 HLEP의 N-말단 부분에 융합된 VWF 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 HLEP는 VWF 1차 해독 폴리펩타이드 중의 아미노산 총수를 기준으로, VWF 1차 해독 폴리펩타이드 총 길이의 1% 이하의 C-말단 아미노산 거리에 위치한 VWF의 아미노산에 융합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합된 VWF 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 HLEP는 VWF 1차 해독 폴리펩타이드 중의 아미노산 총수를 기준으로, VWF 1차 해독 폴리펩타이드 총 길이의 1% 이하의 C-말단 아미노산 거리에 위치한 VWF의 아미노산에 융합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 변형된 VWF 폴리펩타이드가 이의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 아미노산에서 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되는 VWF 폴리펩타이드를 포함하는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 VWF 1차 해독 폴리펩타이드의 천연 C-말단의 1 내지 5개의 아미노산이 결실되고, 이렇게 생성된 VWF 폴리펩타이드의 C-말단 아미노산이 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 VWF 1차 해독 폴리펩타이드의 천연 C-말단 아미노산이 결실되고, 이렇게 생성된 VWF 폴리펩타이드의 C-말단 아미노산이 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되는, 변형된 VWF 폴리펩타이드 또는 복합체.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 응고 인자 VIII(FVIII) 및 혼 빌레브란트 인자(VWF)를 암호화하는 변형 핵산 서열뿐만 아니라 이들의 복합체 및 이들의 유도체, 이러한 핵산 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터, 이 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포, 상기 핵산 서열에 의해 암호화되고 미변형 야생형 단백질에 비해 향상된 생체내 회수율 및/또는 연장된 생체내 반감기와 함께 생물학적 활성을 나타내는 재조합 폴리펩타이드 및 유도체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 향상된 발현 수율을 초래하는 상응하는 FVIII 서열에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 재조합 단백질 및 이의 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 사람 유전자 요법에 사용되고 상기

변형 핵산 서열을 함유하는 전이 벡터에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈액 응고 인자의 결핍을 원인으로 하는 출혈 장애에는 다양한 종류가 있다. 가장 일반적인 장애는 혈액 응고 인자 VIII 및 IX의 결핍으로부터 각각 초래되는 혈우병 A 및 B이다. 다른 공지된 출혈 장애는 폰 빌레브란트병이다.

[0003] 혈장에서 FVIII은 대부분 VWF와 비공유 복합체로 존재하고 이의 응고재 기능은 X 인자의 Xa 인자로의 IXa 인자 의존적 변환을 가속시킨다. FVIII와 VWF의 복합체 형성으로 인해 오랫동안 FVIII와 VWF 기능은 동일한 분자의 2 가지 기능인 것으로 추정되었다. 겨우 70년대에 FVIII와 VWF가 생리학적 조건 하에서 복합체를 형성하는 다른 분자인 것이 분명해졌다. 이후 80년대에는 약 0.2 nmol/L의 해리 상수가 측정되었고(Leyte et al., Biochem J 1989, 257: 679-683), 두 분자의 DNA 서열이 연구되었다.

[0004] 고전적 혈우병 또는 A형 혈우병은 유전성 출혈 질환이다. 이는 혈액 응고 인자 VIII의 염색체 X-연관 결함으로 인한 것이며, 10,000 명당 한 명 내지 두 명의 발생률로 거의 전적으로 남성에게 일어난다. X-염색체 결함은 그 자신은 혈우병 환자가 아닌 여성 보인자에 의해 유전된다. A형 혈우병의 임상소견은 출혈 경향의 증가이다. FVIII 농축물을 사용한 치료가 도입되기 전에, 중증 혈우병에 걸린 사람의 평균 수명은 20년 미만이었다. 혈장 유래의 FVIII 농축물의 사용은 평균 수명을 길게 연장시키고 이를 대부분에게 다소간의 정상 생활을 영위할 가능성을 주어, A형 혈우병 환자의 상황을 크게 개선시켰다. 그러나, 혈장 유래 농축물 및 이의 사용에는 특정 문제가 있는데, 가장 심각한 것은 바이러스가 전달된다는 것이다. 지금까지, B형 간염, 비-A형 비-B형 간염 및 AIDS를 일으키는 바이러스가 사람들에게 심각한 피해를 주었다. 이후, 상이한 바이러스 불활성화 방법 및 새로운 고도로 정제된 FVIII 농축물이 최근에 개발되어, 혈장 유래 FVIII에 대해 매우 높은 안전성 표준이 확립되었다.

[0005] FVIII에 대한 cDNA의 클로닝[참조: Wood, W.I., et al. (1984) Nature 312:330-336; Vehar, G.A., et al. (1984) Nature 312:337-342]을 이용하여 FVIII을 재조합적으로 발현할 수 있었으며, 이로써 여러 재조합 FVIII 생성물의 개발이 유도되었고, 1992년 내지 2003년 사이에 규제 당국에 의해 승인되었다. 아미노산 Arg-740과 Glu-1649 사이에 존재하는 FVIII 폴리펩티드 쇄의 중앙 B 도메인이 완전한 생물학적 활성에 필요한 것으로 보이지 않는다는 사실은 B 도메인 결실된 FVIII의 개발을 이끌었다.

[0006] 성숙 FVIII 분자는 2332개의 아미노산으로 이루어지며, 이는 3개의 상동성 A 도메인, 2개의 상동성 C 도메인 및 하나의 B 도메인으로 구분될 수 있고 A1-A2-B-A3-C1-C2의 순서로 배열된다. 성숙 사람 FVIII의 완전한 아미노산 서열은 서열번호 15에 제시된다. 혈장으로의 이의 분비 동안에, 단일쇄 FVIII은 B-A3 경계에서 및 B 도메인 내의 상이한 부위에서 절단되어서, FVIII은 일련의 금속 이온 결합된 이종이량체로 세포내에서 프로세싱된다. 이러한 프로세싱은 A1, A2 및 B-도메인의 다양한 부분으로 이루어지고 분자량이 90 kDa 내지 200 kDa 범위인 불균질 중쇄 분자를 생성시킨다. 중쇄는 금속 이온을 통해, A3, C1 및 C2 도메인으로 이루어진 경쇄에 결합된다(Saenko et al. 2002. Vox Sang. 83:89-96). 혈장에서, 이러한 이종이량체 FVIII은 높은 친화성으로 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand Factor)에 결합하여, 이를 조숙 이화작용으로부터 보호한다. VWF에 결합된 비-활성화된 FVIII의 반감기는 혈장에서 약 12시간이다.

[0007] 응고 FVIII은 중쇄 내의 아미노산 Arg372 및 Arg740에서 및 경쇄 내의 아미노산 Arg1689에서 FXa 및 트롬빈에 의한 단백질분해 절단을 통해 활성화되어, 폰 빌레브란트 인자가 방출되고 활성화된 인자 VIII 이종삼량체가 생성되고, 이는 Ca^{2+} 가 존재하는 경우에 FIXa 및 FX와 함께 인지질 표면 상에서 테나제(tenase) 복합체를 형성할 것이다. 당해 이종삼량체는 A1 도메인, 50 kDa 단편, A2 도메인, 43 kDa 단편 및 경쇄 (A3-C1-C2), 73 kDa 단편으로 이루어진다. 따라서, FVIII의 활성형(FVIIIa)은 트롬빈-절단된 A3-C1-C2 경쇄에 2가 금속 이온을 통해 연결된 A1-서브유닛, 및 A1 및 A3 도메인과 비교적 느슨하게 연결된 유리 A2 서브유닛으로 이루어진다.

[0008] 과도한 응고를 피하기 위하여, FVIIIa는 활성화 후 곧바로 불활성화되어야 한다. Arg336 및 Arg562에서의 절단에 의해 활성화된 단백질 C(APC)를 통한 FVIIIa의 불활성화는 주요 율속 단계인 것으로 여겨지지 않는다. 오히려, 이종삼량체로부터 비-공유결합된 A2 서브유닛의 해리가 트롬빈 활성화 후 FVIIIa 불활성화에서의 율속 단계인 것으로 생각된다 [참조: Fay et al. 1991. J. Biol. Chem. 266 8957, Fay & Smudzin 1992. J. Biol. Chem. 267: 13246-50]. 이는 신속한 과정으로서, 단지 2.1분에 불과한 혈장 내에서의 FVIIIa의 짧은 반감기를 설명해 준다 [참조: Saenko et al., 2002. Vox Sang. 83: 89-96].

- [0009] 예방적 치료를 받고 있는 중증 A형 혈우병 환자의 경우에, FVIII은 혈장에서의 약 12 내지 14시간의 FVIII의 짧은 반감기로 인해 주당 약 3회씩 정맥내로 투여되어야 한다. 매번 정맥내 투여하는 것은 번거로우며, 통증을 수반하고, 환자 자신 또는 A형 혈우병으로 진단된 아이들의 부모에 의해 가정 요법으로 대부분 행해지기 때문에 특히 감염 위험이 있다.
- [0010] 따라서, 덜 자주 투여되는, FVIII을 함유하는 약제학적 조성물의 제조를 가능하게 하는 작용성 반감기가 증가된 FVIII을 제조하는 것이 매우 바람직할 것이다.
- [0011] 세포 수용체와의 상호작용을 감소시키거나(WO 03/093313A2, WO 02/060951 A2), 종합체를 FVIII에 공유결합시키거나(WO 94/15625, WO 97/11957 및 US 4970300), FVIII의 캡슐화(WO 99/55306)에 의해, 신규 금속 결합 부위의 도입에 의해(WO 97/03193), 웨პ타이드 결합(WO 97/40145 및 WO 03/087355)에 의해 또는 이황화 결합(WO 02/103024A2)에 의해 A2 도메인을 A3 도메인에 공유 부착하여, 또는 A1 도메인을 A2 도메인에 공유 부착하여(WO 2006/108590) 비-활성화된 인자 VIII의 반감기를 연장시키려는 여러 시도가 이루어졌다.
- [0012] FVIII 또는 VWF의 기능성 반감기를 연장하기 위한 다른 시도는 FVIII의 폐길화(WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) 또는 VWF의 폐길화(WO 2006/071801)로, 반감기가 증가된 폐길화된 VWF는 혈장에 존재하는 FVIII의 반감기도 간접적으로 증가시킬 것이다.
- [0013] 하지만 전술한 시도들은 아직도 승인된 FVIII 약제를 생산하지 못했고, FVIII 야생형 서열에 돌연변이를 도입할 때 또는 화학적 변형을 도입할 때, 적어도 이론적으로 면역원성 FVIII 변이체를 형성할 위험을 수반하기 때문에, 여전히 반감기 연장을 나타내는 변형 응고 인자 VIII 분자의 개발은 필요한 실정이다.
- [0014] 잠재적 혈전성 위험을 고려할 때, FVIIIa보다 FVIII의 비활성화 형태의 반감기를 연장시키는 것이 더욱 바람직하다.
- [0015] VWF는 결실된 경우, 기능적 결함이거나 또는 폰 빌레브란트 질환(VWD)의 여러 형태에서 감소된 양으로만 이용가능한 경우, 다수의 생리학적 기능을 보유하는 포유동물의 혈장에 존재하는 점착성 다량체 당단백질이다. 초기 지혈 동안 VWF는 혈소판 표면 상의 특정 수용체와 콜라겐 같은 세포의 기질의 성분 사이에 매개체로서 작용한다. 더욱이, VWF는 응고원 FVIII의 운반 및 안정화 단백질로서 작용한다. VWF는 내피 세포 및 거대핵세포에서 2813개 아미노산 전구체 분자로서 합성된다. 야생형 VWF의 아미노산 서열 및 cDNA 서열은 문헌[Collins et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4393-4397]에 개시되어 있다. 전구체 폴리펩타이드, 프리-프로-VWF는 성숙 혈장 VWF에서 발견되는 22개 잔기 시그널 웨პ타이드, 741개 잔기의 프로펩타이드 및 2050개 잔기의 폴리펩타이드로 이루어진다(Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). 시그널 웨პ타이드는 소포체에서 절단된 후, VWF의 두 단량체 사이에서 C-말단 이황화 가교가 형성한다. 분비 경로를 통해 추가 수송 동안, 12개 N-결합 및 10개 O-결합된 탄수화물 측쇄가 침가된다. 더욱 중요한 것은, VWF 이량체가 N-말단 이황화 가교를 통해 다량체화되고, 후기 골지체에서 효소 PACE/푸린에 의해 741개 아미노산 길이의 프로펩타이드가 절단된다. 이 프로펩타이드 뿐만 아니라 고분자량의 VWF 다량체(VWF-HMWM)는 내피 세포의 바이벨-펠라드 소체(Weibel-Palade body) 또는 혈소판의 α -과립에 저장된다.
- [0016] ADAMTS13은 혈장으로 분비된 후, VWF의 A1 도메인 내에서 VWF를 절단한다. 따라서, 혈장 VWF는 500kDa의 단일 이량체에서부터 최고 20개 이상의 이량체로 이루어진 분자량이 10,000 kDa을 넘는 다량체에까지 이르는 총 범위의 다량체로 이루어진다. 이에 따라 VWF-HMWM은 가장 강한 지혈 활성을 나타내며, 이는 리스트세틴 보조인자 활성(VWF:RCO)에 의해 측정될 수 있다. VWF:RCO/VWF 항원의 비가 높을수록 고분자량 다량체의 상대적 함량도 높다.
- [0017] VWF의 결함은 폰 빌레브란트 질환(VWD)의 원인이고, 이 질환의 특징은 다소 현저한 출혈 표현형이다. VWD 타입 3은 VWF가 완전히 결실된 가장 심각한 형태이고, VWD 타입 1은 VWF의 정량적 손실과 관련이 있고 그 표현형은 매우 경미할 수 있다. VWD 타입 2는 VWF의 정성적 결함과 관련이 있고 VWD 타입 3만큼 심각할 수 있다. VWD 타입 2는 많은 아형이 있고, 이 중 일부는 고분자량 다량체의 손실 또는 감소와 관련이 있다. 폰 VWD 타입 2a는 중간 다량체 및 큰 다량체의 손실 모두를 특징으로 한다. VWD 타입 2B는 최고 분자량 다량체의 손실을 특징으로 한다. VWD는 사람의 가장 흔한 유전 출혈 장애로, 혈장 기원 또는 재조합 기원의 VWF를 함유하는 농축물을 이용한 대체 요법으로 치료할 수 있다. VWF는 EP 05503991에 기술된 예처럼 사람 혈장으로 제조할 수 있다. EP 0784632는 재조합 VWF를 분리하는 방법을 기술한다.
- [0018] 혈장에서 FVIII은 폰 VWF에 높은 친화성으로 결합하고 폰 VWF가 조기 분해대사되지 않도록 보호하여, 초기 지혈 역할 외에, FVIII의 혈장 수준을 조절하는 중요한 역할을 하고, 결과적으로 2차 지혈을 제어하는 중심

인자이다. VWF에 결합된 비활성화된 FVIII의 반감기는 혈장에서 약 12 내지 14시간이다. VWF가 거의 또는 전혀 존재하지 않는 폰 빌레브란트 질환 타입 3에서 FVIII의 반감기는 약 6시간뿐이어서, 상기 환자들에 FVIII의 농도 감소로 인한 경미하거나 중간 정도의 혈우병 A 증상을 야기한다. FVIII에 미치는 VWF의 안정화 효과는 또한 CHO 세포에서 FVIII의 재조합 발현을 보조하는데 사용되었다(Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol).

[0019] 오늘날까지 혈우병 A 및 VWD의 표준 치료는 사람 공여체의 혈장에서 수득한 FVIII와 VWF의 복합체를 함유하는 농축물 또는 FVIII와 VWF 농축물의 제조물을 빈번하게 정맥내 주입하는 것을 수반하거나, 또는 FVIII의 경우에 재조합 FVIII를 기반으로 하는 약제학적 제조물의 빈번한 정맥내 주입을 수반한다. 이러한 대체 치료법은 일반적으로 효과적이지만, 예컨대 예방 치료를 받는 중증 혈우병 A 환자에게 FVIII은 약 12시간인 FVIII의 짧은 혈장 반감기로 인하여 주당 약 3회로 정맥내(i.v.) 투여되어야 한다. FVIII 활성의 수준은 이미 비-혈우병환자의 1% 이상이므로, 예컨대 FVIII 수준이 0.01 U/ml씩 상승하여 중증 A형 혈우병환자는 중간 A형 혈우병환자가 된다. 예방 치료법에서 용량투여 방식은 FVIII 활성의 저점 수준이 비-혈우병환자의 FVIII 활성의 2 내지 3% 수준 이하로 떨어지지 않도록 설계한다. 각 i.v. 투여는 성가시고 통증이 연계되고, 특히 이 투여가 환자 자신에 의해 또는 A형 혈우병 진단을 받은 소아의 부모에 의해 가정 치료로 대부분 이루어지기 때문에 감염 위험을 수반한다. 또한, 빈번한 i.v. 주사는 반드시 자국을 형성시키고, 이는 향후 주입을 방해한다. 중증 혈우병의 예방 치료는 생애 초에 시작되어, 종종 2살 미만의 소아에게 이루어지기 때문에, 이러한 작은 환자의 정맥에 주당 3회씩 FVIII을 주사하는 것은 더 더욱 어렵다. 제한된 기간 동안, 포트 시스템(port system)의 이식은 대안을 제공할 수 있다. 반복 감염이 일어날 수 있고 포트가 신체 활동 중에 불편을 유발할 수 있다는 사실에도 불구하고, 이 대안은 정맥내 주사에 비해 유리한 것으로 생각되는 것이 일반적이다.

[0020] 사람 혈행에서 사람 VWF의 생체내 반감기는 약 12 내지 20시간이다. VWD, 예컨대 타입 3의 예방 치료 시, VWF의 기능적 반감기를 연장하는 방법이 절실히 필요하다.

[0021] VWF의 기능적 반감기를 연장시키는 다른 시도는 폐길화(WO 2006/071801)로, 반감기가 증가된 폐길화된 VWF는 혈장에 존재하는 FVIII의 반감기도 간접적으로 증가시킬 것이다.

[0022] 하지만, 치료 단백질에 PEG 또는 다른 분자의 화학적 접합은, 다른 단백질과 중요한 상호작용 부위의 차폐로 인해 특이적 활성이 저하되는 위험을 항상 수반하고, 화학적 접합은 이 단백질 제조 시에 최종 수율을 감소시키고 제조 비용을 더욱 늘리는 추가 단계를 필요로 한다. 또한, 사람 건강에 미치는 장기적인 효과는 폰 빌레브란트 질환의 예방에 VWF가 투여되는 경우 또는 A형 혈우병에 FVIII이 투여되는 경우와 마찬가지로 현재 공지된 폐길화된 치료 단백질이 일생 동안 투여될 필요가 없기 때문에 알려진 바는 없다.

[0023] 따라서, 화학적으로 변형되지 않은 장수 VWF의 수득이 매우 절실히 실정이다.

[0024] 종래 기술에서, 반감기 연장 폴리펩타이드로서 알부민(WO 01/79271), 알파-태아단백질(WO 2005/024044) 및 면역 글로불린(WO 2004/101740)에 대한 응고 인자의 융합은 기술되어 있다. 이들은 각각의 치료 단백질 부분의 카르복시 말단, 또는 아미노 말단, 또는 양 말단에, 때로는 웹타이드 링커를 이용하여, 바람직하게는 글리신 및 세린으로 이루어진 링커를 이용하여 부착하는 것을 교시했다.

[0025] 밸런스(Ballance) 등(WO 01/79271)은 다수의 여러 치료 폴리펩타이드를 사람 혈청 알부민에 융합시킨 N- 또는 C-말단 융합 폴리펩타이드를 기술했다. 잠재적 융합 파트너의 긴 목록이 기술되고 있지만, 실제 각 알부민 융합 단백질이 생물학적 활성을 보유하고 개선된 성질을 보유하고 있는지에 대한 폴리펩타이드의 실험 데이터는 개시된 것이 전혀 없다. 상기 치료 폴리펩타이드의 목록 중에는 FVIII 및 VWF도 언급되어 있다.

[0026] C-말단 융합체는 당업자가 진지하게 생각하지 않았는데, 그 이유는 FVIII의 아미노산 2303번과 2332번 사이에 있는 바로 FVIII의 C-말단 부분에서 FVIII의 C2 도메인이 FVIII 기능에 필수적인 혈소판 막 결합 부위를 포함하기 때문이다. 이것은, 이 영역에서 알려진 많은 아미노산 돌연변이가 A형 혈우병을 초래하는 이유이다. 따라서, 알부민과 같이 비교적 큰 이종 폴리펩타이드가 혈소판 결합을 방해하여 FVIII 기능을 방해함이 없이 FVIII의 C-말단 부분에 융합될 수 있다는 사실은 놀라웠다. 또한, C2 도메인은 VWF의 결합 부위도 포함한다. 이 부위는 아미노산 서열 1649-1689와 함께 VWF에 대한 FVIII의 높은 친화성 결합에 책임이 있다. 따라서, 당업자는 C-말단에 알부민이 융합된 FVIII이 VWF에 대한 결합을 유지할 것이라고는 예상하지 못했다.

[0027] 밸런스(Ballance) 등의 예상과 대조적으로 FVIII의 N-말단에의 알부민 융합은 배양 배지로 분비되지 않는다는 것이 놀랍게도 밝혀졌다. 따라서, 전술한 이유로 인해, 현재 더 더욱 놀랍게도 C-말단 부분에서 알부민과 융합된 FVIII이 배양 배지로 분비되고 활성화된 혈소판의 막 및 VWF에 대한 결합을 비롯하여 자신의 생물학적 기능을 유지한다는 사실을 발견했다.

[0028] 또한, 본 발명의 변형 FVIII이 야생형 FVIII보다 생체내 회수율이 약 20% 증가한 것을 발견했다.

[0029] 또한, 당업자는 VWF의 N-말단 또는 C-말단에 대한 사람 알부민의 융합에 대해 고려한 적이 없었다. N-말단 융합시, 알부민 부분은 프로펩타이드 프로세싱 동안 절단될 것이다. 또는, 프로펩타이드가 생략된다면, 다량체화는 일어나지 않을 것이다. 위에서 설명한 바와 같이, VWF의 C-말단은 쇠네펜하임 등(Schneppenheim R. et al. 1996. Defective dimerization of VWF subunits due to a Cys to Arg mutation in VWD type IID. Proc Natl Acad Sci USA 93: 3581-3586; Schneppenheim R. et al. 2001. Expression and characterization of VWF dimerization defects in different types of VWD. Blood 97: 2059-2066.), 바론시아니 등(Baronciani L. et al. 2000. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with VWD type 3. Thromb. Haemost 84:536-540), 에나야트 등(Enayat MS et al. 2001. Aberrant dimerization of VWF as the result of mutations in the carboxy-terminal region: identification of 3 mutations in members of 3 different families with type 2A (phenotype IID) VWD. Blood 98:674-680) 및 제른베르그 등(Tjernberg et al. 2006. Homozygous C2362F VWF induces intracellular retention of mutant VWF resulting in autosomal recessive severe VWD. Br J Haematol. 133:409-418)에 의해 입증된 바와 같이 초기 이량체화 및 분비에 필수적이다. 따라서, 당업자는 VWF의 정상 이량체화 또는 다량체화가 손상될 것을 예상했기 때문에 VWF의 C-말단 또는 N-말단에 사람 알부민과 같은 큰 단백질을 융합시킬 생각을 하지 않았다. VWF의 더 큰 다량체가 초기 지혈에 가장 활성적이기 때문에, 당업자는 VWF의 기능적 반감기를 연장시키기 위해 다른 방법을 물색했다.

발명의 내용

[0030] 이제, 놀랍게도 VWF의 C-말단 부분에 알부민과 같은 이종 폴리펩타이드의 융합이 포유동물 세포로부터 VWF 카메라 단백질의 발현 및 분비를 허용할 뿐만 아니라 유의적인 VWF 활성을 유지하고 고분자량의 다량체를 형성하는 변형 VWF 분자를 생산한다는 것을 발견했다. 또한, 이와 같이 변형된 VWF 분자는 연장된 생체내 반감기 및/또는 향상된 생체내 회수율을 나타낸다.

발명에 대한 설명

[0032] 본 발명의 목적은 생체내 반감기가 증가된 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII과 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII과 변형 VWF의 복합체, 및 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체를 제공하는 것이다.

[0033] 본 발명의 의미에서, "변형 FVIII" 또는 "변형 VWF"란 용어는 FVIII 또는 VWF의 자연 대립유전자, 변이체, 결실체 및 삽입체를 비롯하여 반감기 연장 폴리펩타이드에 융합된 FVIII 또는 VWF 폴리펩타이드를 의미한다.

[0034] 본 발명의 다른 목적은 생체내 회수율이 향상된 변형 FVIII 또는 변형 VWF 뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체, 및 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체를 제공하는 것이다.

[0035] 본 발명의 또 다른 목적은 이러한 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 및 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체가 포유동물 세포에 의해 발현될 수 있고 각각 생물학적 활성을 유지한다는 것이다.

[0036] 이를 정리하면, 놀랍게도 본 발명의 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체, 및 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체는 생물학적 활성의 유지, 생체내 반감기 및 생체내 회수율의 증가를 나타냈다.

[0037] FVIII이 변형되고 A2 도메인이 활성화 후 A3 도메인에만 비-공유 부착된 상태를 유지하는 본 발명의 양태의 추가가 잠재적 이점은, FVIII의 비-활성화 형태의 반감기만을 증가시키고 FVIII의 활성화 형태의 반감기는 본질적으로 동일하게 유지하여, FVIII의 활성화 형태의 안정성을 초래하는 FVIII 변이체와 비교했을 때 혈전성 위험을 감소시킬 수 있다는 점이다.

[0038] 본 발명의 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 및 변형 FVIII와 변형 VWF 분자의 복합체는 FVIII의 C-말단 부분 또는 VWF의 C-말단 부분에 반감기 연장 단백질(HLEP)을 융합시켜 생산할 수 있다.

[0039] 본 발명의 의미에서 HLEP는 알부민, 아파민(afamin), 알파-태아단백질 및 비타민 D 결합 단백질을 포함하는 알부민 계열의 구성원, 뿐만 아니라 면역글로불린 불변 영역의 일부 및 생리학적 조건 하에 알부민 계열 구성원은 물론 면역글로불린 불변 영역의 일부에 결합할 수 있는 폴리펩타이드로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 가장 바람직한 HLEP는 사람 알부민이다.

[0040] 따라서, 본 발명은 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 및 변형 FVIII 및/또는 VWF의 C-말단 부분에 융합된 HLEP를 보유하는 변형 VWF와 변형 FVIII의 복합체에 관한 것으로, 상기 변형 FVIII 또는 변형 VWF뿐만 아니라 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체가 야생형 FVIII 또는 야생형 VWF 또는 야생형 VWF와 야생형 FVIII의 복합체의 기능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0041] 또한, 본 발명은 HLEP가 하나보다 많이 융합된 C-말단 융합체로, 여기서 여러 번 융합된 HLEP는 동일 HLEP이거나 또는 다른 HLEP의 배합물일 수 있는 C-말단 융합체에 관한 것이다.

[0042] 또한, 본 발명은 C-말단 부분에 HLEP에 대한 융합이 있는 변형 FVIII에 관한 것으로, 이 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체가 야생형 FVIII 또는 야생형 VWF 또는 야생형 VWF와 야생형 FVIII의 복합체에 비해 향상된 생체내 회수율을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0043] 본 발명의 다른 양태는 C-말단 부분에 HLEP에 대한 융합이 있는 변형 FVIII 폴리펩타이드로, 이 변형 FVIII은 야생형 FVIII만큼 높은 수율로 발효 배지로 분비되는 것을 특징으로 한다.

[0044] 본 발명의 다른 관점은 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 배합물이다.

[0045] 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 플라스미드 또는 벡터, 본 명세서에 기술된 플라스미드 또는 벡터를 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 다른 관점은 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체를 생산하는 방법으로,

[0047] (a) 본 발명의 숙주 세포를 변형 응고 인자가 발현되게 하는 조건 하에 배양하는 단계; 및

[0048] (b) 임의로, 숙주 세포로부터 또는 배양 배지로부터 변형 응고 인자를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0049] 또한, 본 발명은 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체, 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 명세서에 기술된 플라스미드 또는 벡터를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0050] 본 발명의 또 다른 관점은 혈액 응고 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에 사용되는, 본 발명에 따른 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 하나 이상의 플라스미드 또는 벡터 또는 숙주 세포의 용도에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 본 발명은 FVIII 및 VWF 또는 각 폴리펩타이드 성분의 하나를 함유하는 복합체에 관한 것이되, 이 복합체의 적어도 하나의 폴리펩타이드 성분이 그 1차 해독 산물의 C-말단 부분에서 반감기 연장 폴리펩타이드(HLEP)의 N-말단 부분에 융합된 복합체에 관한 것이다.

[0052] 또한, 본 발명은 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF를 함유하는 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체에 관한 것으로, 상기 변형 FVIII는 FVIII의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분에서 HLEP의 N-말단 부분에 융합되고, 또는 변형 VWF는 VWF의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분에서 HLEP의 N-말단 부분에 융합되어 있다.

[0053] 바람직한 양태에서, 본 발명은 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF를 함유하는 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체에 관한 것으로,

[0054] a. 변형 FVIII가 야생형 FVIII의 기능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타내거나, 또는

[0055] b. 변형 VWF가 야생형 VWF의 기능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타내거나, 또는

[0056] c. 변형 FVIII과 미변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII와 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 기

능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타내거나, 또는

[0057] d. 미변형 FVIII과 변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 기능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타내거나, 또는

[0058] e. 변형 VWF와 변형 FVIII의 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 기능적 반감기에 비해 연장된 기능적 반감기를 나타낸다.

[0059] 본 발명의 바람직한 양태는 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체, 또는 전술한 바와 같은 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체로서, 이 변형 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 기능적 반감기에 비해 25% 이상 증가된 기능적 반감기를 나타내거나, 또는 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII 및 야생형 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 25% 증가된 기능적 반감기를 나타낸다.

[0060] 본 발명의 다른 양태는 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF를 함유하는 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체로서,

[0061] a. 변형 FVIII가 야생형 FVIII의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 나타내거나, 또는

[0062] b. 변형 VWF가 야생형 VWF의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 나타내거나, 또는

[0063] c. 변형 FVIII과 미변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII와 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 나타내거나, 또는

[0064] d. 미변형 FVIII과 변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 나타내거나, 또는

[0065] e. 변형 VWF와 변형 FVIII의 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 항원 반감기에 비해 연장된 항원 반감기를 나타낸다.

[0066] 본 발명의 바람직한 양태는 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체, 또는 전술한 바와 같은 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체로서, 이 변형 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 항원 반감기에 비해 25% 이상 증가된 항원 반감기를 나타내거나, 또는 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 상기 변형 폴리펩타이드들을 함유하는 복합체가 야생형 FVIII 및 야생형 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 25% 증가된 항원 반감기를 나타낸다.

[0067] 본 발명의 또 다른 양태는 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF를 함유하는 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF를 함유하는 복합체로서,

[0068] a. 변형 FVIII가 야생형 FVIII의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 나타내거나, 또는

[0069] b. 변형 VWF가 야생형 VWF의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 나타내거나, 또는

[0070] c. 변형 FVIII과 미변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII와 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 나타내거나, 또는

[0071] d. 미변형 FVIII과 변형 VWF를 함유하는 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 나타내거나, 또는

[0072] e. 변형 VWF와 변형 FVIII의 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF를 함유하는 상응하는 복합체의 생체내 회수율에 비해 증가된 생체내 회수율을 나타낸다.

[0073] 본 발명의 다른 바람직한 양태는 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 전술한 바와 같은 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체로서, 이 변형 폴리펩타이드는 상응하는 야생형 폴리펩타이드의 생체내 회수율에 비해 10% 이상 증가된 생체내 회수율을 나타내거나, 또는 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 상기 변형 폴리펩타이드들을 함유하는 복합체가 야생형 FVIII 및 야생형 VWF의 상응하는 복합체에 비해 적어도 10% 증가된 생체내 회수율을 나타낸다.

[0074] 본 발명의 다른 바람직한 양태는

[0075] a) 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 전술한 바와 같은 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체이되, 이 복합체의 적어도 하나의 폴리펩타이드 성분이 이의 1차 해독 산물의 C-말단 아

미노산에서 HLEP의 N-말단 부분에 융합되어 있는 복합체, 또는

[0076] b) 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 전술한 바와 같은 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체이되, 이 복합체의 적어도 하나의 폴리펩타이드 성분이 이의 1차 해독 산물의 C-말단 부분에서 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되어 있는 복합체, 또는

[0077] c) 변형 폴리펩타이드 또는 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 전술한 바와 같은 상기 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체이되, 이 복합체의 적어도 하나의 폴리펩타이드 성분이 이의 1차 해독 산물의 C-말단 아미노산에서 HLEP의 N-말단 아미노산에 융합되어 있는 복합체이다.

[0078] 본 발명의 다른 바람직한 양태는 변형 폴리펩타이드, 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 전술한 바와 같은 이 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체이되, 이 변형 폴리펩타이드가 야생형 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 적어도 10%를 나타내거나, 또는 변형 폴리펩타이드를 함유하는 복합체 또는 상기 변형 폴리펩타이드들을 함유하는 복합체가 야생형 FVIII과 야생형 VWF의 상응하는 복합체의 생물학적 활성의 적어도 10%를 나타낸다.

[0079] 또한, 본 발명은 증가된 기능적 반감기를 보유하는 변형 FVIII 또는 변형 VWF를 제조하는 방법으로, FVIII의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분 또는 VWF의 1차 해독 폴리펩타이드의 C-말단 부분에 반감기-연장 폴리펩타이드의 N-말단 부분을 융합시키는 단계를 포함하는 방법, 및 이 방법에 의해 제조된 변형 FVIII과 야생형 VWF를 혼합하거나, 또는 야생형 FVIII을 전술한 방법에 의해 제조된 변형 VWF와 혼합하거나, 또는 전술한 방법에 의해 제조된 변형 VWF와 변형 FVIII을 혼합하여 변형 FVIII과 미변형 VWF를 함유하는 복합체, 미변형 FVIII과 변형 VWF를 함유하는 복합체, 또는 변형 FVIII과 변형 VWF를 함유하는 복합체를 제조하는 방법을 포함한다.

[0080] 또한, 본 발명은

[0081] a. 전술한 방법에 의해 제조된 변형 FVIII과 야생형 VWF,

[0082] b. 야생형 FVIII과 전술한 방법에 의해 제조된 변형 VWF, 또는

[0083] c. 전술한 방법에 의해 제조된 변형 FVIII과 전술한 방법에 의해 제조된 변형 VWF가 출혈 장애의 치료법, 바람직하게는 A형 혈우병 및/또는 폰 빌레브란트병의 치료법에 동시, 별도 또는 순차 사용하기 위한 약제학적 병용제제의 제조에 사용되는 용도도 포함한다.

[0084] 본 발명에 따른 "기능적 반감기"는 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체를 포유동물에게 투여한 후, 이 포유동물로부터 여러 시간 간격마다 채취한 혈액 시료에서 시험관내 측정할 수 있는 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체의 생물학적 활성의 반감기이다.

[0085] "융합" 또는 "융합된"이란 어구는 FVIII의 C-말단 부분 및/또는 VWF의 C-말단 부분에 대한 아미노산의 부가를 의미한다. 본 명세서에 "FVIII의 C-말단 아미노산에 융합" 또는 "VWF의 C-말단 아미노산에 융합"을 언급할 때, 이것은 성숙 야생형 FVIII cDNA 서열의 아미노산 2332번에서 FVIII의 C-말단 아미노산에 정확하게 융합하거나 또는 야생형 성숙 VWF의 아미노산 2050번에서 VWF의 C-말단 아미노산에 정확하게 융합한 것을 의미한다. 성숙 FVIII 또는 성숙 VWF는 프로펩타이드 절단 후의 각 폴리펩타이드를 의미한다. 하지만, 본 발명은 본 발명의 의미에서 "FVIII의 C-말단 부분에 융합" 또는 "VWF의 C-말단 부분에 융합"이 또한 FVIII 및/또는 VWF의 C-말단 아미노산으로부터 n개까지의 아미노산 중 하나 이상의 아미노산 위치가 결실된 각 FVIII 및/또는 VWF 분자에 대한 융합을 포함할 수 있다는 것을 포괄하기도 한다. 숫자 n은 FVIII 및/또는 VWF의 총 아미노산 수의 5%, 바람직하게는 1%를 초과하지 않아야 하는 정수이다. 보통, n은 20, 바람직하게는 15, 더욱 바람직하게는 10, 더 더욱 바람직하게는 5 또는 그 이하(예: 1,2,3,4 또는 5)이다.

[0086] 한 양태에서, 변형 FVIII은 다음과 같은 구조를 갖는 것이다:

[0087] [화학식 1]

[0088] N - FVIII - C - L1 - H

[0089] 상기 화학식 1에서,

[0090] N은 FVIII의 N-말단 부분이고,

- [0091] L1은 화학 결합 또는 링커 서열이고,
- [0092] H는 HLEP이며,
- [0093] C는 FVIII의 C-말단 부분이다.
- [0094] 다른 양태에서, 변형 VWF는 다음과 같은 구조를 갖는 것이다:
- [0095] [화학식 2]
- [0096] $N - VWF - C - L1 - H$
- [0097] 상기 화학식 2에서,
- [0098] N은 VWF의 N-말단 부분이고,
- [0099] L1은 화학 결합 또는 링커 서열이고,
- [0100] H는 HLEP이며,
- [0101] C는 VWF의 C-말단 부분이다.
- [0102] L1은 화학 결합이거나, 하나 이상의 아미노산, 예컨대 1 내지 20개, 1 내지 15개, 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 3개(예: 1, 2 또는 3개)의 아미노산으로 이루어지고 서로 동일하거나 상이할 수 있는 링커 서열일 수 있다. 보통, 링커 서열은 야생형 응고 인자의 상응하는 위치에는 존재하지 않는다. L1에 존재하는 적당한 아미노산의 예로는 Gly 및 Ser을 포함한다.
- [0103] 바람직한 HLEP 서열은 이하에 기술되어 있다. 이와 마찬가지로, 본 발명에는 각 HLEP의 정확한 "N-말단 아미노산"에 대한 융합, 또는 각 HLEP의 "N-말단 부분"에 대한 융합이 포함되며, HLEP는 N-말단에 하나 이상의 아미노산의 결실을 포함한다.
- [0104] 본 발명의 변형 FVIII, 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII과 변형 VWF의 복합체는 HLEP 서열을 하나보다 많이, 예컨대 2개 또는 3개의 HLEP 서열을 포함할 수 있다. 이러한 다중 HLEP 서열은 FVIII의 C-말단 부분 및/또는 VWF의 C-말단 부분에 직렬로, 예컨대 연속 반복체로서 융합될 수 있다.
- [0105] FVIII은 다양한 단계에서 단백분해적으로 프로세싱될 수 있다. 예를 들어, 상기 언급한 바와 같이, 혈장으로 분비되는 동안 단일쇄 FVIII은 B-A3 경계 및 B-도메인 내의 여러 부위에서 세포내 절단된다. 중쇄는 도메인 구조 A3-C1-C2인 경쇄에 금속 이온을 통해 결합한다. FVIII은 중쇄 내의 아미노산 Arg372 및 Arg740에서, 그리고 경쇄 내의 Arg1689에서 단백분해적 절단을 통해 활성화되어 A1 도메인, A2 도메인 및 경쇄(A3-C1-C2), 73kDa 단편으로 이루어진 활성화된 FVIII 이종삼량체를 생성한다. 따라서, FVIII의 활성 형태(FVIIIa)는 트롬빈-절단된 A3-C1-C2 경쇄에 이가 금속 이온 결합을 통해 결합된 A1 서브유닛 및 A1 및 A3 도메인과 비교적 느슨하게 결합한 유리 A2 서브유닛으로 이루어진다.
- [0106] 따라서, 본 발명은 단일쇄 폴리펩타이드로 존재하지 않고 비공유 결합을 통해 서로 결합된 여러 폴리펩타이드(예: 1개, 2개 또는 3개)로 이루어진 변형 FVIII을 포함한다.
- [0107] N - FVIII - C는 FVIII의 전체 길이의 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, FVIII의 생물학적 활성이 유지되는 한 FVIII의 N-말단, C-말단 또는 내부 결실도 포함한다. 결실을 보유한 FVIII이 야생형 FVIII의 생물학적 활성의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 가장 바람직하게는 적어도 75%를 유지한다면, 본 발명의 의미에서 생물학적 활성이 유지되는 것이다. FVIII의 생물학적 활성은 이하에 기술된 바와 같이 당업자라면 측정할 수 있다.
- [0108] FVIII의 생물학적 활성을 측정하는 적당한 검사는 예컨대 1단계 또는 2단계 응고 분석(Rizza et al. 1982. Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed. The Hemophilias. NY Churchill Livingston 1992) 또는 발색원성 기질 FVIII:C 분석(S. Rosen, 1984. Scand J Haematol 33: 139-145, suppl.)이다. 이 문헌들의 내용은 본 발명에 참고인용되었다.
- [0109] 사람 혈액 응고 FVIII의 성숙 야생형 형태의 cDNA 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 14 및 15에 제시했다. 특정 서열의 아미노산 위치에 대한 언급은 상기 FVIII 야생형 단백질의 아미노산 위치를 의미하는 것으로, 언급한 서열내 다른 위치들에서의 결실, 삽입 및/또는 치환과 같은 돌연변이의 존재를 배제하지 않는다.

예를 들어, 서열번호 15에 관한 "Glu2004"의 돌연변이는 변형 동족체에서 서열번호 15의 위치 1 내지 2332에 있는 하나 이상의 아미노산이 결실된 것을 배제하지 않는다.

[0110] "혈액 응고 인자 FVIII", "인자 VIII" 및 "FVIII"란 용어는 본 명세서에서 호환 사용된다. "혈액 응고 인자 VIII"은 야생형 혈액 응고 FVIII뿐만 아니라 야생형 혈액 응고 FVIII의 응혈원 활성을 보유하는 야생형 혈액 응고 FVIII의 유도체도 포함한다. 유도체는 야생형 FVIII의 아미노산 서열과 비교했을 때 결실, 삽입 및/또는 부가를 보유할 수 있다. FVIII이란 용어는 중쇄 및 경쇄를 함유하는 FVIII, 예컨대 활성화 전의 형태의 단백분해적 프로세싱된 형태를 포함한다.

[0111] "FVIII"이란 용어는 야생형 인자 VIII의 생물학적 활성의 적어도 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 가장 바람직하게는 적어도 75%를 보유하는 임의의 FVIII 변이체 또는 돌연변이체를 포함한다.

[0112] 비제한적 예로서, FVIII 분자는 APC 절단을 방지하거나 감소시킨 FVIII 돌연변이체(Amano 1998. Thromb. Haemost. 79:557-563), 추가로 A2 도메인을 안정시킨 FVIII 돌연변이체(WO 97/40145), 발현을 증가시킨 FVIII 돌연변이체(Swaroop et al. 1997. JBC 272:24121-24124), 면역원성을 감소시킨 FVIII 돌연변이체(Lollar 1999. Thromb. Haemost. 82:505-508), 각각 발현된 중쇄 및 경쇄로부터 재구성된 FVIII(Oh et al. 1999. Exp. Mol. Med. 31:95-100), HSPG(해파란 셀페이트 프로테오글리칸) 및/또는 LRP(저밀도 지단백 수용체 관련 단백질)와 같이 FVIII의 분해대사를 초래하는 수용체에 대한 결합을 감소시키는 FVIII 돌연변이체(Ananyeva et al. 2001. TCM, 11:251-257), 이황화 결합-안정화된 FVIII 변이체(Gale et al., 2006. J. Thromb. Hemost. 4:1315-1322), 향상된 분비성을 가진 FVIII 돌연변이체(Miao et al., 2004. Blood 103:3412-3419), 보조인자 특이적 활성을 증가시킨 FVIII 돌연변이체(Wakabayashi et al., 2005. Biochemistry 44:10298-304), 향상된 생합성 및 분비, 감소된 ER 샤파론(chaperone) 상호작용, 향상된 ER-골지 수송, 증가된 활성화 또는 불활성화에 대한 내성 및 향상된 반감기를 나타내는 FVIII 돌연변이체(Pipe 2004. Sem. Thromb. Hemost. 30:227-237에서 요약됨)를 포함한다. 이러한 FVIII 돌연변이체 및 변이체는 모두 본 발명에 참고인용된다.

[0113] VWF는 다양한 단계에서 단백분해적으로 프로세싱될 수 있다. 예컨대, 상기 언급된 바와 같이 프로테아제 ADAMTS13은 VWF의 A2 도메인 내에서 VWF를 절단한다. 따라서, 본 발명은 ADAMTS13 등에 의해 단백분해적으로 절단된 변형 VWF도 포함한다. 이러한 절단은 ADAMTS13에 의해 절단된 VWF의 적어도 하나 또는 최대 2개의 단량체를 각 말단에 함유하는 VWF의 다양체 쇄를 생산할 것이다.

[0114] N - VWF - C는 전체 길이의 VWF 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, VWF의 생물학적 활성이 유지되는 한, VWF의 N-말단, C-말단 또는 내부 결실도 포함한다. 생물학적 활성은 결실을 보유한 VWF가 야생형 VWF의 생물학적 활성의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 가장 바람직하게는 적어도 75%를 유지한다면, 본 발명의 의미에서 생물학적 활성이 유지되는 것이다. 야생형 VWF의 생물학적 활성은 리스토제틴 보조인자 활성(Federici AB et al. 2004. Haematologica 89:77-85), 혈소판 당단백질 복합체 Ib-V-IX의 GP Ib α 에 대한 VWF의 결합(Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12:305-310), 또는 콜라겐 결합 분석(Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80:466-471)에 대한 방법을 이용하여 당업자라면 측정할 수 있다.

[0115] 상기 정의에서 "FVIII" 및/또는 "VWF"는 한 개체부터 다른 개체까지 존재하고 일어날 수 있는 천연 대립유전자 변형을 포함할 수 있다. 상기 정의에서 "FVIII" 및/또는 "VWF"는 또한 FVIII 및/또는 VWF의 변이체도 포함한다. 이러한 변이체는 야생형 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 다르다. 이러한 차이의 예로는 보존적 아미노산 치환으로서, 즉 특성이 유사한 아미노산 그룹, 예컨대 (1) 작은 아미노산, (2) 산성 아미노산, (3) 극성 아미노산, (4) 염기성 아미노산, (5) 소수성 아미노산 및 (6) 방향족 아미노산 내에서의 치환을 포함할 수 있다. 이러한 보존적 치환의 예는 다음 표에 제시한다.

표 1

(1)	알라닌	글리신		
(2)	아스파르트산	글루탐산		
(3)	아스파라гин	글루타민	세린	트레오닌
(4)	아르기닌	히스티딘	리신	
(5)	이소류신	류신	메티오닌	발린
(6)	페닐알라닌	타이로신	트립토판	

[0116]

[0117] 하나 이상의 HLEP는 FVIII의 C-말단 부분에, 바람직하게는 FVIII의 예컨대 VWF, 혈소판 또는 FIX에 대한 결합능을 방해하지 않게 융합될 수 있다.

[0118]

[0118] 하나 이상의 HLEP는 VWF의 C-말단 부분에, 바람직하게는 VWF의 예컨대 FVIII, 혈소판, 혼파린 또는 콜라겐에 대한 결합능을 방해하지 않게 융합될 수 있다.

[0119]

[0119] FVIII이 생체내 응고 동안 내인적으로 활성화되면, 이는 이미 FVIIa로 야생형 활성화된 응고 인자의 경우에서처럼(Aledort 2004. J Thromb Haemost 2:1700-1708), 그리고 활성화된 인자가 증가된 기능적 반감기를 보유하는 경우 더욱 관련될 수 있는 혈전성 합병증을 초래할 수 있기 때문에 현재 활성화된 FVIII의 증가된 기능적 반감기를 유지하는 것이 더 이상 바람직하지 않을 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 생체내 내인적 활성화 후 또는 보조인자의 유용성 이후, 미변형 FVIII과 비슷한 기능성 반감기를 나타내는 장수 FVIII 분자를 제공하는 것이다. 이것은 예컨대 FVIII의 C-말단 부분과 HLEP 사이에 응고 인자 등에 대한 절단 부위를 도입시켜 달성을 할 수 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 FVIII-HLEP 결합 서열로 인해, 본 발명의 FVIII 키메라성 단백질의 활성화는 HLEP 부분으로부터 FVIIa의 완전한 분리를 동반하게 될 것이다. 따라서, 한 양태에 따라, 내인적 활성화된 변형 FVIII의 기능적 반감기는 활성화된 야생형 FVIII의 기능적 반감기와 실질적으로 동일하다(예컨대, ±15%, 바람직하게는 ±10%).

[0120]

[0120] 그러나, 본 발명의 또 다른 양태에서, 하나 이상의 단백분해적 절단 부위, 바람직하게는 Arg740 및/또는 Arg372의 트로빈 절단 부위는 절단 방지를 위해 돌연변이되거나 결실되어, 활성화된 분자조차도 연장된 기능적 반감기와 같은 향상된 성질을 나타내는 삽입 단백질을 생산한다.

[0121]

[0121] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명의 FVIII 단백질은 2개의 분리 쇄로 발현될 수 있다(이하 참조).

[0122]

[0122] 본 발명에 따른 변형 FVIII은 단일체 폴리펩타이드이거나, 또는 단백분해적 프로세싱으로 인해 비공유 결합을 통해 연결된 2개 또는 3개의 폴리펩타이드로 구성될 수 있다.

[0123]

[0123] 본 발명의 다른 양태에 따르면, PACE/푸린 절단 부위에 있거나 그 부근에 있는 아미노산(Arg1648)은 PACE/푸린에 의한 절단을 방지하기 위해 돌연변이되거나 결실된다. 이것은 향상된 반감기를 가진 단일체 FVIII/HLEP 융합분자를 생산할 것으로 생각된다.

[0124]

[0124] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명의 변형 FVIII은 통합 HLEP가 없는 상응하는 FVIII 형태 및/또는 야생형 FVIII과 비교했을 때 증가된 기능적 반감기를 나타낸다. 기능적 반감기는 예컨대 A형 혈우병의 동물 모델, 예를 들어 야생형 FVIII에 비해 더 긴 지속적 지혈 효과가 예상되는 FVIII 녹아웃 마우스에서 생체내 측정할 수 있다. 지혈 효과는 예컨대 꼬리 클립 이후 출혈 정지에 소요되는 시간을 측정하여 검사할 수 있다.

[0125]

[0125] 본 발명의 한 양태에서 기능적 반감기는 포유동물에게 투여된 후 시험관내에서 측정한 FVIII의 생물학적 활성의 반감기이다. 본 발명에 따른 변형 FVIII의 기능적 반감기는 동종에서 검사했을 때 변형이 없는 FVIII의 기능적 반감기보다 길다. 기능적 반감기는 야생형 FVIII과 비교했을 때 적어도 10%, 바람직하게는 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 100% 증가한 것이 바람직하다.

[0126]

[0126] HLEP 변형을 함유하는 변형 FVIII의 기능적 반감기는 각각의 변형 FVIII(및 비교용으로 야생형 FVIII)을 래트, 토끼 또는 다른 실험 동물 종에게 경맥내 또는 피하로 투여하고, 투여 후 적당한 간격을 두고 채혈한 혈액 시료에서 상기 변형 응고 인자 또는 각각의 미변형 응고 인자의 생물학적 활성의 제거를 추적하여 측정할 수 있다. 적당한 검사 방법은 본 명세서에 기술된 활성 검사이다.

- [0127] 본 발명의 다른 양태에 따른 기능적 반감기는 포유동물에게 투여한 후 시험관내에서 측정한 VWF의 생물학적 기능의 반감기이다. 본 발명에 따른 변형 VWF의 기능적 반감기는 동종에서 검사한 변형이 없는 VWF의 기능적 반감기보다 길다. 기능적 반감기는 야생형 VWF와 비교했을 때 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 100% 증가한 것이 바람직하다.
- [0128] HLEP 변형을 함유하는 변형 VWF의 기능적 반감기는 각각의 변형 VWF(및 비교용으로 미변형 VWF)을 래트, 토끼 또는 다른 실험 동물 종에게 정맥내 또는 피하로 투여하고, 투여 후 적당한 간격을 두고 채혈한 혈액 시료에서 상기 VWF 또는 각각의 미변형 VWF의 생물학적 활성의 제거를 추적하여 측정할 수 있다. 적당한 검사 방법은 본 명세서에 기술된 활성 검사이다.
- [0129] 생물학적 활성의 반감기의 대용 마커로서, 변형 또는 각각의 야생형 FVIII의 수준 또는 변형 VWF 또는 각각의 야생형 VWF의 항원 수준을 측정할 수 있다. 또한, 본 발명에는 FVIII 및/또는 VWF의 C-말단 부분에 HLEP에 대한 융합이 있는 변형 FVIII 및/또는 VWF가 포함되며, 이 변형 FVIII 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 복합체, 미변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체는 상기 삽입이 없는 FVIII 및/또는 VWF 항원의 반감기와 비교했을 때 FVIII 및/또는 VWF의 연장된 반감기를 나타내는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 "FVIII 항원의 반감기"는 포유동물에게 투여한 후 시험관내에서 측정한 FVIII의 항원의 반감기이다. 본 발명에 따른 "VWF 항원의 반감기"는 포유동물에게 투여한 후 시험관내에서 측정한 VWF의 항원의 반감기이다. 항원 검사법은 당업자에게 공지되고 시중에서 입수할 수 있는 효소 면역분석 방식(예: Dade Behring, Instrumentation Laboratory, Abbott Laboratories, Diagnostica Stago)에서 특정 항체를 기반으로 한 방법이다. 기능적 반감기 및 항원 반감기는 베타 제거 상의 시점(예: $t_{1/2} = \ln 2/k$ (k는 회귀선의 기울기이다)에 따라 계산할 수 있다.
- [0130] 다른 양태에서, 내인적 활성화된 변형 FVIII의 기능적 반감기는 활성화된 야생형 FVIII의 반감기에 비해 연장된다. 이 증가는 15% 이상, 예컨대 적어도 20% 또는 적어도 50%일 수 있다. 다시, 이러한 기능적 반감기 값은 상기 기능적 반감기에 대해 설명한 바와 같이 측정하고 계산할 수 있다. 내인적으로 활성화된 변형 FVIII 분자의 증가된 반감기는 FVIII의 극소량만이 이용가능하고, 이에 따라 혈전형성성이 아닌 상황에서 유익할 수 있다. 이러한 상황은, 예컨대 종종 낮은 발현율만이 달성될 수 있는, 유전자요법 치료 후에 나타날 수 있다. 따라서, 이와 같이 안정화된 FVIII 분자는 예컨대 고용량 또는 생리학적 용량의 단백질로 투여되면 상기 FVIII 분자와 연관된 혈전형성 위험에도 불구하고, 유전자요법에 유익할 수도 있다.
- [0131] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명의 변형 FVIII은 야생형 FVIII에 비해 향상된 생체내 회수율을 나타내고, 본 발명의 변형 VWF는 야생형 VWF에 비해 향상된 생체내 회수율을 나타낸다. 생체내 회수율은 예컨대 본 발명의 변형 FVIII 또는 VWF의 증가율이 상응하는 야생형 FVIII 또는 야생형 VWF에 비해 정맥내 투여 후 즉시(5 내지 10 분) 혈행 중의 항원 또는 활성 분석에 의해 발견될 것으로 예상한, 정상 동물이나 A형 혈우병의 동물 모델, 예컨대 FVIII 녹아웃 마우스에서, 또는 VWF 모델, 예컨대 VWF 녹아웃 마우스에서 생체내 측정할 수 있다.
- [0132] 생체내 회수율은 야생형 FVIII 또는 야생형 VWF에 비해 적어도 10%, 더욱 바람직하게는 적어도 20%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 40% 증가한 것이 바람직하다.
- [0133] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, HLEP로서 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 일부가 사용된다. 바람직하게는, IgG, 더욱 바람직하게는 IgG1의 힌지 영역과 CH2 및 CH3 도메인으로 이루어진 Fc 영역, 이의 단편 또는 변이체, 예컨대 신생 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 증가시키는 돌연변이를 포함하는 변이체가 사용되는 것이 좋다.
- [0134] 본 발명의 다른 목적은 생체내 단백분해적 프로세싱 후에 미변형 FVIII와 비슷한 기능적 반감기를 보유하는 장수 FVIII 분자를 제공하는 것이다. 이것은 변형 FVIII 내에 특정 절단 부위를 유지시켜, 예컨대 활성화된 응고 인자와 접촉했을 때, HLEP로부터 FVIII를 분리하는 단백분해적 절단을 초래함으로써 달성할 수 있다. 따라서, 한 양태에서, 단백분해적 프로세싱된 변형 FVIII의 기능적 반감기는 변형이 없는 미변형 VWF와 실질적으로 동일하고/하거나 야생형 VWF와 실질적으로 동일하다(예컨대, ±15%, 바람직하게는 ±10%).
- [0135] 본 발명의 또 다른 양태는 VWF에 감소된 결합을 보유하거나 VWF에 전혀 결합하지 않는 FVIII 분자의 C-말단 부분에서 일부만과 같은 HLEP에 융합되는 변형 FVIII 폴리펩타이드이다.
- [0136] 본 발명의 또 다른 목적은 생체내 단백분해적 프로세싱 후에 미변형 VWF와 비슷한 기능적 성질을 보유하는 장수 VWF 분자를 제공하는 것이다. 이것은 변형 VWF 내에 특정 절단 부위를 유지시키거나 삽입하여(하기 참조), 예컨대 활성화된 응고 인자와 접촉했을 때, HLEP로부터 VWF를 분리하는 단백분해적 절단을 초래함으로써 달성할 수

있다. 따라서, 한 양태에서, 단백분해적 프로세싱된 변형 VWF의 기능적 반감기는 변형이 없는 미변형 VWF와 실질적으로 동일하고/하거나 야생형 VWF와 실질적으로 동일하다(예컨대, $\pm 15\%$, 바람직하게는 $\pm 10\%$).

[0137] 본 발명의 다른 바람직한 양태는 야생형 VWF와 본 발명에 따른 변형 VWF의 공동발현으로, 미변형뿐만 아니라 변형 VWF 단량체를 함유하는 VWF 다량체를 생성한다.

링커 서열

[0139] 본 발명에 따르면, 치료 폴리펩타이드 부분은 웨타이드 링커에 의해 HLEP 부분에 커플링될 수 있다. 링커는 비면역원성이어야 하고 비절단성 또는 절단성 링커일 수 있다.

[0140] 비절단성 링커는 WO2007/090584에 예시된 바와 같이 교호적 글리신 및 세린 잔기로 구성될 수 있다.

[0141] 본 발명의 다른 양태에서, FVIII 및/또는 VWF 부분과 알부민 부분 사이에 웨타이드 링커는 사람 단백질에서 자연 도메인간 링커로 작용하는 웨타이드 서열로 구성된다. 이러한 웨타이드 서열은 자연 환경에서 단백질 표면 가까이에 위치하여, 이 서열에 대한 자연 내성을 추정할 수 있도록 면역계에 접근용이한 것이 바람직하다. 그 예는 WO2007/090584에 제시되어 있다.

[0142] 절단가능한 링커는 프로테아제에 의한 절단을 허용하기에 충분한 유연성이 있어야 한다. 바람직한 양태에서, 링커의 절단은 융합 단백질이 변형 FVIII이면 융합 단백질 내에서 FVIII의 활성화와 비슷하게 빠르게 진행된다.

[0143] 절단가능한 링커는 하기 폴리펩타이드 유래의 서열을 함유하는 것이 바람직하다:

[0144] a) 치료 폴리펩타이드의 활성화 동안 단백분해적으로 절단되는 단백분해적 절단 부위를 함유한다면 투여되어야 하는 치료 폴리펩타이드 자체,

[0145] b) 치료 폴리펩타이드의 연관에 의해 형성되거나 활성화되는 프로테아제에 의해 절단된 기질 폴리펩타이드,

[0146] c) 응고 또는 섬유소분해에 연관된 폴리펩타이드.

[0147] 더욱 바람직한 양태에서 링커 영역은 발현 융합 단백질의 신생항원성 위험을 감소시킬 수 있는 FVIII 및/또는 VWF의 서열을 포함한다. 또한, 치료 단백질이 단백분해적 활성화되어야 하는 FVIII인 경우, 웨타이드 링커 절단의 동역학은 사이모겐의 응고-관련 활성화 동력학을 더 면밀하게 반영할 것이다.

[0148] 바람직한 양태에서, 치료 폴리펩타이드는 FVIII 사이모겐이고 HLEP는 알부민이다. 이 경우에, 링커 서열은 FVIII의 활성화 영역의 서열, FX 또는 FVII와 같은 FIX의 임의의 기질의 절단 영역, 활성화에 FIXa가 관여하는 프로테아제에 의해 절단되는 임의의 기질 폴리펩타이드의 절단 영역에서 유래된다.

[0149] 매우 바람직한 양태에서, 링커 웨타이드는 FVIII 자체에서 유래되고 서열번호 15의 아미노산 위치 372, 740 및 1689 각각에서 트롬빈 절단 부위를 포함하는 서열을 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 링커 웨타이드는 FX, FIX, FVII 또는 FXI에서 유래된다.

[0150] 링커 웨타이드는 응고계의 프로테아제, 예컨대 FIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa 및 FVIIa에 의해 절단가능한 것이 바람직하다.

[0151] 상기 링커 서열은 또한 본 발명의 변형 VWF에도 사용될 수 있다.

[0152] 치료 폴리펩타이드, 절단가능한 링커 및 HLEP의 조합의 예는 WO2007/090584(예컨대, 표 2 및 도 4)와 WO2007/144173(예컨대, 표 3a 및 3b)에 열거된 작제물을 포함하지만, 이들에만 국한되는 것은 아니다.

반감기 연장 폴리펩타이드(HLEP)

[0154] 본 명세서에 사용된 "반감기 연장 폴리펩타이드"는 알부민, 알부민-계열의 구성원, 면역글로불린 G의 불변 영역 및 이의 단편 영역 및 생리학적 조건 하에서 알부민, 알부민 계열의 구성원뿐만 아니라 면역글로불린 불변 영역의 일부에 결합할 수 있는 폴리펩타이드로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 본 명세서에 기술된 전체 길이의 반감기-연장 단백질(예: 알부민, 알부민-계열의 구성원 또는 면역글로불린 G의 불변 영역) 또는 이의 하나 이상의 단편은 응고 인자의 치료 활성 또는 생물학적 활성을 안정화 또는 연장시킬 수 있다. 이러한 단편은 아미노산 길이가 10개 이상이거나, 또는 HLEP 서열 유래의 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 적어도 약 25개, 적어도 약 30개, 적어도 약 50개, 적어도 약 100개 또는 그 이상의 인접 아미노산을 포함하거나, 또는 각 HLEP의 특정 도메인 중 일부 또는 전체를 포함할 수 있되, 이 HLEP 단편은 야생형 FVIII 또는 야생형 VWF와 비교했을 때 적어도 25%의 기능적 반감기 연장을 제공해야 한다.

[0155] 본 발명의 제안된 응고 인자 삽입 작제물의 HLEP 부는 정상 HLEP의 변이체일 수 있다. "변이체"란 용어는 삽입, 결실 및 치환(보존적 또는 비보존적)을 포함하고, 이러한 변화는 변형 FVIII 또는 변형 VWF의 생물학적 활성을 부여하는 활성 부위 또는 활성 도메인을 실질적으로 변경하지 않는 것이다.

[0156] 특히, 제안된 본 발명의 FVIII HLEP 또는 VWF HLEP 응합 작제물은 HLEP의 자연 발생의 다형태 변이체 및 HLEP의 단편을 포함할 수 있다. HLEP는 임의의 척추동물, 특히 임의의 포유동물, 예컨대 사람, 원숭이, 소, 양 또는 돼지에서 유래될 수 있다. 비-포유동물 HLEP는 암탉 및 연어를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

HLEP로서의 알부민

[0158] "사람 혈청 알부민"(HSA) 및 "사람 알부민"(HA) 및 "알부민"(ALB)이란 용어는 본 출원에서 호환해서 사용된다. "알부민" 및 "혈청 알부민"이란 용어가 더 광범위하고, 사람 혈청 알부민(및 이의 단편 및 변이체)뿐만 아니라 다른 종의 알부민(및 이의 단편 및 변이체)도 포함한다.

[0159] 본 명세서에 사용된 "알부민"은 알부민의 하나 이상의 기능적 활성(예: 생물학적 활성)을 보유하는 알부민 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열, 또는 알부민 단편 또는 변이체를 종합해서 의미한다. 특히, "알부민"은 사람 알부민 또는 이의 단편, 특히 서열번호 16에 제시한 사람 알부민의 성숙 형태 또는 다른 척추동물의 알부민 또는 이의 단편, 또는 이러한 분자들의 유사체 또는 변이체, 또는 이의 단편을 의미한다.

[0160] 구체적으로, 본 발명의 제안된 FVIII 응합 및/또는 VWF 응합 작제물은 사람 알부민의 자연 발생의 다형태 변이체 및 사람 알부민의 단편을 포함할 수 있다. 일반적으로 말하면, 알부민 단편 또는 변이체는 아미노산 길이가 적어도 10개, 바람직하게는 적어도 40개, 가장 바람직하게는 70개 이상일 것이다. 알부민 변이체는 알부민의 적어도 하나의 전체 도메인 또는 이 도메인의 단편, 예컨대 도메인 1(서열번호 16의 아미노산 1-194), 2(서열번호 16의 아미노산 195-387), 3(서열번호 16의 아미노산 388-585), 1+2(서열번호 16의 1-387), 2+3(서열번호 16의 195-585) 또는 1+3(서열번호 16의 아미노산 1-194 + 서열번호 16의 아미노산 388-585)를 포함하거나, 또는 이를로 구성되는 것이 바람직할 수 있다. 각 도메인은 자체가 2개의 동종 서브도메인, 즉 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 및 512-585와 잔기 Lys106 내지 Glu119, Glu292 내지 Val315 및 Glu492 내지 Ala511을 포함하는 유연성이 있는 서브도메인간 링커 영역으로 구성된다.

[0161] 본 발명의 제안된 FVIII 응합 및/또는 VWF 응합 작제물의 알부민 부는 HA의 적어도 하나의 서브도메인 또는 도메인 또는 이의 보존적 변형을 포함할 수 있다.

HLEP로서의 아파민, 알파-태아단백질 및 비타민 D 결합 단백질

[0163] 알부민 외에, 알파-태아단백질, 알부민 계열의 다른 구성원은 생체내 부착된 치료 폴리펩타이드의 반감기를 연장하는 것으로 주장되고 있다(WO 2005/024044). 진화상 관련된 혈청 수송 단백질인 알부민 계열의 단백질은 알부민, 알파-태아단백질(AFP; Beattie & Dugaiczyk 1982. Gene 20:415-422), 아파민(AFM: Lichenstein et al. 1994. J. Biol. Chem. 269: 18149-18154) 및 비타민 D 결합 단백질(DBP; Cooke & David 1985. J. Clin. Invest. 76: 2420-2424)로 구성된다. 이들의 유전자는 사람, 마우스 및 래트에서 동일한 염색체 영역에 지도화되는 구조적 및 기능적 유사성이 있는 다중유전자 클리스터를 나타낸다. 알부민 계열 구성원들의 구조적 유사성은 HLEP로서의 유용성을 시사한다. 따라서, 본 발명의 다른 목적은 HLEP로서 이러한 알부민 계열 구성원, 이의 단편 및 변이체를 사용하는 것이다. "변이체"란 용어는 원하는 기능이 유지되는 한, 삽입, 결실 및 치환(보존적 또는 비보존적)을 포함한다.

[0164] 알부민 계열 구성원은 각 단백질 AFP, AFM 및 DBP의 전체 길이를 포함하거나, 또는 치료 활성을 안정화 또는 연장시킬 수 있는 하나 이상의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 단편은 아미노산 길이가 10개 이상이거나, 또는 각 단백질 서열 중 약 15개, 20개, 25개, 30개, 50개 또는 그 이상의 인접 아미노산을 포함하거나, 또는 각 단백질의 특정 도메인 중 일부 또는 전체를 포함할 수 있되, 단 HLEP 단편이 적어도 25%의 반감기 연장을 제공해야 한다. 본 발명의 삽입 단백질의 알부민 계열 구성원은 AFP, AFM 및 DBP의 자연 발생의 다형태 변이체를 포함할 수 있다.

HLEP로서의 면역글로불린

[0166] 면역글로불린 G(IgG) 불변 영역(Fc)은 치료 단백질의 반감기를 증가시키는 것으로 당업계에 알려져 있다(Dumont JA et al. 2006. BioDrugs 20: 151-160). 중쇄의 IgG 불변 영역은 3개의 도메인(CH1-CH3) 및 헌지 영역으로 이루어진다. 면역글로불린 서열은 각각 임의의 포유동물로부터, 또는 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터 유래될 수 있다. 또한, 항원 결합 도메인이 없는 IgG 및 IgG 단편도 HLEP로 사용될 수 있다. 치료 폴리펩타

이드 부는, 바람직하게는 항체의 힌지 영역 또는 웨타이드 링커(심지어 절단될 수도 있다)를 통해, IgG 또는 IgG 단편에 연결된다. 몇몇 특허와 특허출원에는 치료 단백질의 생체내 반감기를 연장하기 위한 면역글로불린 불변 영역과 치료 단백질의 융합에 대해 기술하고 있다. US 2004/0087778 및 WO 2005/001025는 생체내에서 빠르게 제거될 웨타이드의 반감기를 증가시키는, 생물학적 활성 웨타이드와 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부 또는 Fc 도메인의 융합 단백질에 대해 기술하고 있다. Fc-IFN- β 융합 단백질은 향상된 생물학적 활성, 연장된 혈행 반감기 및 더 큰 용해성을 가진 단백질로 기술되어 있다(WO 2006/000448). 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효능을 가진 Fc-EPO 단백질도 개시되어 있고(WO 2005/063808), 또한 G-CSF(WO 2003/076567), 글루카곤-유사 단백질-1(WO 2005/000892), 응혈 인자(WO 2004/101740) 및 인터루킨-10(US 6,403,077)과 Fc 융합체도 모두 반감기 연장 성질을 보유하는 것으로 개시되어 있다.

[0167] 폴리뉴클레오타이드

본 발명은 또한 본 출원에 기술된 바와 같은 변형 응고 인자, 바람직하게는 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. "폴리뉴클레오타이드(들)"란 용어는 일반적으로 미변형 RNA 또는 DNA 또는 변형 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 일본쇄 또는 이본쇄 DNA, 일본쇄 또는 이본쇄 RNA일 수 있다. 본 명세서에 사용된 "폴리뉴클레오타이드(들)"란 용어는 하나 이상의 변형 염기 및/또는 비정상 염기, 예컨대 이노신을 포함하는 DNA 또는 RNA를 포함하기도 한다. DNA 및 RNA에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 이는 당업자에게 공지된 많은 유용한 목적을 제공한다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명에 이용된 바와 같은 "폴리뉴클레오타이드(들)"란 용어는 폴리뉴클레오타이드의 화학적, 효소적 또는 대사적 변형 형태뿐만 아니라, 바이러스 및 세포, 예컨대 단세포 및 복합 세포에 특정적인 DNA 및 RNA의 화학적 형태도 포함한다.

[0169] 당업자는 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 주어진 폴리웨타이드가 여러 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 "변이체"는 본 발명에 포함된다.

[0170] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 분리된 폴리뉴클레오타이드인 것이 바람직하다. "분리된" 폴리뉴클레오타이드란 용어는 다른 핵산 서열, 예컨대 다른 염색체 및 염색체의 DNA 및 RNA(이에 국한되지 않는다)가 실질적으로 없는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 분리된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포로부터 정제될 수 있다. 당업자에게 공지된 통상적인 핵산 정제 방법은 분리된 폴리뉴클레오타이드를 수득하는데 사용할 수 있다. 또한, 이 용어는 재조합 폴리뉴클레오타이드 및 화학 합성된 폴리뉴클레오타이드도 포함한다.

[0171] 또한, 본 발명은 함께 본 발명의 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 그룹에 관한 것이다. 이 그룹 중의 제1 폴리뉴클레오타이드는 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF의 N-말단 부분을 암호화할 수 있고, 제2 폴리뉴클레오타이드는 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF의 C-말단 부분을 암호화할 수 있다.

[0172] 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 플라스미드 또는 벡터이다. 이 플라스미드 또는 벡터는 발현 벡터인 것이 바람직하다. 특별한 양태에서, 벡터는 사람 유전자요법에 사용되는 전이 벡터이다.

[0173] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드 그룹을 함유하는 플라스미드 또는 벡터 그룹에 관한 것이다. 제1 플라스미드 또는 벡터는 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, 제2 플라스미드 또는 벡터는 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 예를 들어, 응고 인자 VIII에 관련해서, 시그널 웨타이드의 암호화 서열, A1 및 A2 도메인, B 도메인 서열 나머지 및 HLEP는 제1 발현 벡터에 클로닝될 수 있고, 적당한 시그널 웨타이드 서열과 함께 A3, C1 및 C2의 암호화 서열은 제2 발현 벡터에 클로닝될 수 있다. 상기 발현 벡터는 둘 모두 적당한 숙주 세포에 공동형질감염되어, 이는 본 발명의 FVIII 분자의 경쇄 및 중쇄의 발현과 기능적 단백질의 형성을 초래할 것이다.

[0174] 대안적으로, FVIII 시그널 웨타이드의 암호화 서열, A1 및 A2 도메인은 제1 발현 벡터에 클로닝되고 HLEP, FVIII A3, C1 및 C2는 적당한 시그널 웨타이드 서열과 함께 제2 발현 벡터에 클로닝된다. 이 두 발현 벡터는 적당한 숙주 세포에 공동형질감염되어, 본 발명의 FVIII 분자의 경쇄 및 중쇄의 발현 및 기능적 단백질의 형성을 초래할 것이다.

[0175] 대안적으로, 두 암호화 서열은 2개의 다른 프로모터 서열을 이용하거나, 하나의 프로모터와 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 인자를 이용하여 두 FVIII 쇄의 발현을 유도하게 함으로써 하나의 발현 벡터에 클로닝된다.

[0176] 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드 또는 벡터, 또는 전술한 바와 같은 폴리

뉴클레오타이드 그룹, 또는 플라스미드 또는 벡터 그룹을 함유하는 숙주 세포이다.

[0177] 본 발명의 숙주 세포는 본 발명의 일부인 변형 응고 인자, 바람직하게는 변형 FVIII 분자를 생산하는 방법에 이용될 수 있다. 이 방법은

(a) 원하는 삽입 단백질이 발현되게 하는 조건 하에서 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 임의로, 숙주 세포로부터 또는 배양 배지로부터 원하는 삽입 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0179] 본 발명의 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF는 $\geq 80\%$ 순도, 더욱 바람직하게는 $\geq 95\%$ 순도로 정제하는 것이 바람직하고, 특히 바람직하게는 불순 거대분자, 특히 다른 단백질 및 혼란에 대해 99.9% 이상 순수한 약제학적 순수 상태이고 감염성 및 발열원 인자가 없는 것이 바람직하다. 본 발명의 분리 또는 정제된 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF는 다른 비관련 폴리펩타이드가 실질적으로 없는 것이 바람직하다.

[0180] 본 발명의 다양한 산물은 약제로서 유용하다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 본 발명의 플라스미드 또는 벡터를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0181] 또한, 본 발명은 A형 또는 B형 혈우병과 같은 혈액 응고 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 본 명세서에 기술된 FVIII 및/또는 변형 VWF 또는 변형 VWF 또는 변형 FVIII과 미변형 VWF의 복합체, 또는 미변형 FVIII과 변형 VWF의 복합체 또는 변형 FVIII와 변형 VWF의 복합체의 유효량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 본 발명의 플라스미드 또는 벡터의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 본 방법은 본 명세서에 기술된 본 발명의 숙주 세포의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

제안된 돌연변이체의 발현

[0182] 적당한 숙주 세포에서 재조합 돌연변이 단백질을 고농도로 생산하는 것은 당업자에게 공지된 방법에 따라 다양한 발현 시스템에서 전파될 수 있는 재조합 발현 벡터 내에 적당한 조절 인자와 함께 효과적인 전사 유닛으로 전술한 변형 cDNA를 조립하는 것을 필요로 한다. 효과적인 전사 조절 인자는 천연 숙주가 동물 세포인 바이러스에서 유래되거나 또는 동물 세포의 염색체 DNA에서 유래될 수 있다. 바람직하게는, 시미안 바이러스 40, 아데노바이러스, BK 폴리오마 바이러스, 사람 사이토메갈로바이러스 유래의 프로모터-인핸서 조합, 라우스 육종 바이러스의 장말단 반복체 또는 베타-액틴 또는 GRP78과 같이 동물 세포에서 강하게 구성적으로 전사되는 유전자를 포함하는 프로모터-인핸서 조합을 사용할 수 있다. cDNA로부터 전사된 안정한 고농도의 mRNA를 달성하기 위해, 전사 단위는 3' 근접 부분에 전사 종결-폴리아데닐화 서열을 암호화하는 DNA 영역을 함유해야 한다. 이 서열은 시미안 바이러스 40 조기 전사 영역, 토끼 베타-글로빈 유전자 또는 사람 조직 플라스미노겐 활성인자 유전자에서 유래되는 것이 바람직하다.

[0183] cDNA는 그 다음 변형 FVIII 및/또는 VWF 단백질의 발현을 위해 적당한 숙주 세포주의 계놈 내로 통합시킨다. 이 세포주는 정확한 폴딩, 이황화 결합 형성, 아스파라긴-결합된 글리코실화 및 다른 해독후 변형뿐만 아니라 배양 배지로의 분비를 보장하기 위해 척추동물 기원의 동물 세포주인 것이 바람직하다. 다른 해독후 변형의 예는 초기 폴리펩타이드 쇄의 티로신 O-황산화 및 단백분해적 프로세싱이다. 사용될 수 있는 세포주의 예는 원숭이 COS-세포, 마우스 L-세포, 마우스 C127-세포, 햄스터 BHK-21 세포, 사람 배아 신장 293 세포 및 햄스터 CHO 세포이다.

[0184] 상응하는 cDNA를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 여러 다른 방식으로 동물 세포주에 도입될 수 있다. 예를 들어, 재조합 발현 벡터는 여러 동물 바이러스를 기반으로 한 벡터로부터 생성될 수 있다. 이의 예는 배콜로바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 바람직하게는 소 유두종 바이러스를 기반으로 한 벡터이다.

[0185] 상응하는 DNA를 암호화하는 전사 단위는 또한 재조합 DNA가 계놈 내에 통합된 특정 세포 클론의 분리를 용이하기 위해, 동물 세포에서 우성의 선택성 마커로서 작용할 수 있는 다른 재조합 유전자와 함께 동물 세포 내로 도입시킬 수 있다. 이러한 종류의 우성의 선택성 마커 유전자의 예는 제네티신(G418)에 대한 내성을 부여하는 Tn5 아미노 글리코사이드 포스포트랜스퍼라제, 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 및 퓨로마이신에 대한 내성을 부여하는 퓨로마이신 아세틸 트랜스퍼라제이다. 이러한 선택성 마커를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 원하는 단백질의 cDNA를 암호화하는 것과 같은 벡터 상에 존재하거나, 또는 숙주 세포의 계놈에 동시에 도입 및 통합되는 별도의 벡터 상에서 암호화되어, 흔히 여러 전사 단위 사이에 치밀한 물리적 결합을 초래할 수 있다.

[0188] 원하는 단백질의 cDNA와 함께 사용될 수 있는 선택성 마커 유전자의 다른 종류는 디하이드로풀레이트 리덕타제 (dhfr)를 암호화하는 다양한 전사 단위를 기반으로 한다. 이러한 종류의 유전자를 내인성 dhfr-활성이 없는 세포, 바람직하게는 CHO 세포(DUKX-B11, DG-44)에 도입하면, 세포는 뉴클레오사이드가 없는 배지에서 증식할 수 있을 것이다. 이러한 배지의 한 예는 하이포산틴, 티미딘 및 글리신이 없는 햄(Ham's) F12이다. 상기 dhfr-유전자는 동일 벡터 또는 다른 벡터에 결합시켜, 상기 유형의 CHO-세포에 FVIII cDNA 전사 단위와 함께 도입시키면, 재조합 단백질을 생산하는 dhfr-양성 세포주가 생성된다.

[0189] 상기 세포주가 세포독성 dhfr-저해제 메토트렉세이트의 존재 하에 증식한다면, 메토트렉세이트 내성인 신규 세포주가 나타날 것이다. 이 세포주는 결합된 dhfr의 증폭된 수와 원하는 단백질의 전사 단위로 인해 증가된 속도로 재조합 단백질을 생산할 수 있다. 이러한 세포주를 메토트렉세이트의 증가 농도(1-10000 nM)에서 전파시키면, 원하는 단백질을 매우 높은 속도로 생산하는 신규 세포주가 수득될 수 있다.

[0190] 원하는 단백질을 생산하는 상기 세포주는 혼탁 배양하거나 다양한 고체 지지체 상에서 대규모로 증식시킬 수 있다. 이러한 지지체의 예는 텍스트란 또는 콜라겐 바탕질을 기반으로 한 마이크로 운반체, 또는 중공 섬유 또는 다양한 세라믹 재료 형태의 고체 지지체이다. 세포 혼탁 배양 또는 마이크로 운반체 상에서 증식시킬 때, 상기 세포주의 배양은 회분 배양 또는 연장된 기간 동안 조정 배지의 연속 생산 하에 관류 배양으로 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면 상기 세포주는 원하는 재조합 돌연변이 단백질을 생산하는 산업적 방법의 개발에 매우 적합하다.

정제 및 제형화

[0191] 상기 유형의 분비형 세포의 배지에 축적하는 재조합 변형 FVIII 및/또는 재조합 변형 VWF 단백질은 다양한 생화학적 방법 및 크로마토그래피 방법, 예컨대 원하는 단백질과 세포 배양 배지 중의 다른 물질 간에 크기, 하전, 소수성, 용해성, 특이적 친화성 등의 차이를 이용하는 방법으로 농축 및 정제할 수 있다.

[0192] 이러한 정제의 한 예는 예컨대 HLEP, 바람직하게는 사람 알부민에 지향성인, 또는 고체 지지체 상에 고정화된 각각의 응고 인자에 지향성인 모노클로날 항체에 대한 재조합 돌연변이 단백질의 흡착이다. 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF를 지지체에 흡착시키고, 세척 및 탈착 후, 단백질은 상기 성질들을 기반으로 한 다양한 크로마토그래피 기술로 추가 정제할 수 있다. 정제 단계의 순서는 예컨대 단계들의 역량 및 선택성, 지지체의 안정성 또는 다른 관점에 따라 선택한다. 바람직한 정제 단계는 예컨대 이온 교환 크로마토그래피 단계, 면역 친화성 크로마토그래피 단계, 친화성 크로마토그래피 단계, 소수성 상호작용 크로마토그래피 단계, 염료 크로마토그래피 단계, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 단계, 다중상 크로마토그래피 단계, 및 크기 배제 크로마토그래피 단계를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0193] [0194] 바이러스 오염의 이론적 위험을 최소화하기 위해, 바이러스의 효과적인 불활성화 또는 제거를 가능하게 하는 추가 단계가 상기 방법에 포함될 수 있다. 이러한 단계로는, 예컨대 액상 또는 고상에서 열처리, 용매 및/또는 계면활성제 처리, 가시광선, UV 스펙트럼, 감마선 조사 또는 나노여과가 있다.

[0195] 본 발명의 변형 폴리뉴클레오타이드(예: DNA)는 또한 사람 유전자 요법에 사용되는 전이 벡터에 통합될 수 있다.

[0196] 본 명세서에 기술된 다양한 양태들은 서로 조합될 수 있다. 본 발명은 이하 실시예에서 더 상세하게 설명될 것이다. 이러한 본 발명의 구체적 양태들의 설명은 첨부 도면과 함께 이루어질 것이다.

[0197] 본 발명에 기술된 변형 FVIII 및/또는 변형 VWF는 치료학적 용도의 약제학적 제제로 제형화될 수 있다. 정제된 단백질은 약제학적 제제를 제공하기 위해 임의로 약제학적 부형제가 첨가될 수 있는 통상적인 생리학적 용화성 수성 원층액에 용해될 수 있다.

[0198] 이러한 약제학적 담체 및 부형제뿐만 아니라 적당한 약제학적 제형은 당업계에 공지되어 있다(예컨대, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) 또는 "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). 특히, 본 발명의 폴리펩타이드 변이체를 함유하는 약제학적 조성물은 동결건조 형태 또는 안정한 액체 형태로 제형화될 수 있다. 폴리펩타이드 변이체는 당업계에 공지된 다양한 절차로 동결건조할 수 있다. 동결건조된 제형은 주사용 멸균수 또는 멸균 생리식염수 용액과 같은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제를 첨가하여 사용하기 전에 복원시킨다.

[0199] 조성물의 제형은 임의의 약제학적으로 적합한 투여 수단에 의해 개체에게 전달된다. 다양한 전달 시스템이 공지

되어 있고 임의의 편리한 경로를 통해 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 전신 투여되는 것이 바람직하다. 전신용인 경우, 본 발명의 삽입 단백질은 비경구(예컨대, 정맥내, 피하, 근육내, 복강내, 뇌내, 폐내, 비내 또는 경피) 또는 장(예: 구강, 질 또는 직장) 전달용으로 종래 방법에 따라 제형화한다. 가장 바람직한 투여 경로는 정맥내 및 피하 투여이다. 이 제형들은 주입 또는 일시 주사에 의해 연속 투여할 수 있다. 일부 제형은 서방출 시스템을 포함한다.

[0200] 본 발명의 삽입 단백질은 치료학적 유효 용량, 즉 원하는 효과를 나타내기에 충분한 용량으로 환자에게 투여하여, 허용할 수 없는 부작용을 일으키는 용량에 도달하지 않고 치료할 상태 또는 증상의 중증도 또는 확산을 방지하거나 경감시킨다. 정확한 용량은 많은 요인, 예컨대 증상, 제형, 투여 방식에 따라 다르고, 각각 각자의 증상마다 임상전 실험 및 임상 실험으로 측정해야 한다.

[0201] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 또는 다른 치료 제제와 함께 투여할 수 있다. 이러한 제제는 동일한 약제의 일부로 혼입될 수 있다. 이러한 제제의 한 예는 변형 FVIII와 미변형 VWF의 조합, 또는 미변형 FVIII과 변형 VWF의 조합, 또는 변형 FVIII과 변형 VWF의 조합이다.

도면

[0203] 도 1: 야생형 FVIII 및 FVIII-C-말단 알부민 융합 폴리펩타이드의 항원 및 활성 수준

[0204] 도 2: 100 U(FVIII:Ag)/kg의 FVIII 야생형 및 FVIII-FP 1656 VWF의 정맥내 주사 후, VWF ko 마우스에서 사람 FVIII:Ag 약동학 비교(평균; n=4/시점)

[0205] 도 3: wt rVWF(1570/1212), C-말단 결합된 알부민 함유 rVWF-FP(1572/1212), 또는 5:1의 비율로 혼합된 rVWF(1570/1212)와 rVWF-FP(1572/1212)의 혼합물을 함유하는 혼합 발현 세포 배양물을 함유하는 세포 배양 상청액의 VWF:RCO/VWF:Ag 비. 단위 정의에 따라 NHP의 이론적인 비인 1에 가까운 약 0.8의 값이 모든 경우에 수득되었다.

[0206] 도 4: HEK 세포에서 발현된 야생형 rVWF(1570/1212)(B) 및 HEK 세포에서 발현된 rVWF-FP(1572/1212)(A)의 SDS-아가로스 겔 전기영동. 밴드는 VWF 또는 알부민(HSA)에 대한 항체를 이용하여 검출했다.

[0207] 도 5: 래트에 100 IU VWF:Ag를 정맥내 주사 후 rVWF-FP 약동학 및 사람 rVWF 야생형의 비교(평균, n=2-3/시점).

실시예

실시예 1: C-말단 알부민 융합이 있는 FVIII 분자의 발현 벡터의 생성

[0210] 먼저 다중 클로닝 부위(pF8-FL) 내에 전체 길이의 FVIII cDNA 서열을 함유하는 pIRESpuro3(BD Biosciences)을 기반으로 한 발현 플라스미드를 이용하여 B 도메인 결실된 FVIII를 생성했다. 이를 위해, B 도메인을 결실시키기 위한 주형으로 pF8-FL을 이용하여 부위 지시된 돌연변이유발 실험에 올리고뉴클레오파이어 F8-1 및 F8-2(서열번호 1 및 2)를 표준 프로토콜(QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 따라 사용했다. 제2 단계로, a3 도메인의 R1648과 A2 도메인의 R740을 연결하기 위해 아미노산 서열 RRGR을 암호화하는 서열을 도입시켰다. 이것은 프라이머 F8-3 및 F8-4(서열번호 3 및 4)를 이용하는 다른 부위 지시된 돌연변이유발 단계로 수행했다. 수득되는 플라스미드는 pF8-457이라 명명했다. FVIII 알부민 융합 작제물은 단계적으로 제조했다. 먼저, PinAI 절단 부위를 FVIII 3' 말단에 도입시켰다. 이를 위해, 주형으로 pF8-457을 이용하고 PCR 프라이머로 We2827 및 We2828(서열번호 5 및 6)을 이용하여 PCR 단편을 발생시키고, 이것을 이어서 겔 정제하고, 제한효소 BspE1 및 NotI로 절단한 뒤, 미리 BspE1 및 NotI로 분해한 pF8-457에 연결시켰다. 수득되는 플라스미드(pF8-1433)를 그 다음 효소 PinAI 및 NotI로 절단하고, 프라이머 We 2829 및 We 2830(서열번호 7 및 8)을 이용해 사람 알부민 cDNA 함유 플라스미드 상에서 PCR로 수득하고 이어서 효소 PinAI 및 NotI로 분해한 단편을 삽입했다. 수득되는 발현 플라스미드(pF8-1434)는 B 도메인 결실된 FVIII의 암호화 서열과 그 다음 링커 삽입을 위한 PinAI 부위(아미노산 서열 ThrGly을 암호화함) 및 사람 알부민의 암호화 서열을 함유했다. pF8-1434에 의해 암호화된 아미노산 서열은 서열번호 9에 제시했다.

[0211] FVIII과 알부민 부분을 분리하는 링커 서열은 그 다음 전술한 새로 만든 PinAI 부위에 쉽게 삽입될 수 있다. 두 링커 서열의 삽입은 다음에 설명된다. 또한, pF8-1434를 기반으로 하여, TG 링커는 완전히 결실시킬 수 있고,

심지어 FVIII의 C-말단 또는 일부민의 N-말단 내의 결실도 부위 지시된 돌연변이유발을 이용해 수행할 수 있다.

[0212] FVIII 트롬빈 절단 부위 유래의 절단가능한 링커의 삽입: 먼저 위치 372에서 트롬빈 절단 부위를 암호화하는 서열을 함유하는 PCR 단편은 프라이머 We2979 및 We2980(서열번호 10 및 11)과 pF8-457을 주형으로 이용하여 PCR로 발생시켰다. 이 단편을 정제하고, PinAI로 분해하고 PinAI 분해된 pF8-1434에 연결시켰다. 서열분석으로 단편의 정확한 배향 삽입을 확인하고, 수득되는 플라스미드는 pF8-1563이라 명명했다.

[0213] 유연성 글리신/세린 링커의 삽입: 31개 아미노산 글리신/세린 링커의 암호화 서열을 함유하는 PCR 단편은 프라이머 We2991 및 We2992(서열번호 12 및 13)를 이용하여 WO2007/090584에 기술된 pFVII-937로부터 PCR로 증폭시켰다. 이 단편은 그 다음 정제하고, 제한효소 PinAI로 분해한 뒤, PinAI 분해된 pF8-1434에 연결시켰다. 서열분석으로 단편의 정확한 배향 삽입을 확인하고, 수득되는 플라스미드는 pF8-1568이라 명명했다.

[0214] 전술한 프로토콜 및 플라스미드를 이용하고 당업자에게 공지된 분자생물학 기술을 적용하여(예컨대, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>에 기술되어 있음), 당업자는 일부민을 다른 HLEP로 대체하거나 또는 기술된 PinAI 부위에 임의의 다른 링커를 삽입하여 다른 작제물을 제조할 수 있다. pIRESneo3(Invitrogen) 및 pEE12.4(Lonza)와 같은 적당한 벡터에 FVIII/알부민 cDNA의 전이는 발현을 허용하고 CHO 세포에서 각 FVIII 일부민 융합 단백질을 발현하는 클론의 선택을 가능하게 했다.

실시예 2: FVIII 및 VWF 단백질의 형질감염 및 발현

[0215] 발현 플라스미드는 이.콜라이 TOP10(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 증폭시키고 표준 프로토콜(Qiagen, Hilden, Germany)에 따라 정제했다. HEK-293(Invitrogen) 세포는 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen)으로 형질감염시키고, 무혈청 배지(Invitrogen 293 Express)에서 4 μ g/ml 퓨로마이신 및 임의로 0.5 IU/ml VWF의 존재 하에 증식시켰다. CHO 세포(CHO-S, Invitrogen; CHOK1SV, Lonza)는 리포펙타민 2000 시약(Invitrogen)을 이용해 형질감염시키고 무혈청 배지(CHO-S의 경우 Invitrogen CD CHO, 6mM 글루타민; CHOK1SV의 경우 CD-CHO)에서 500 내지 1000 μ g/ml 제네티신(CHO-S에만)의 존재 하에 증식시켰다. FVIII 발현을 위해, 임의로 0.5 IU/ml VWF 를 첨가했다. VWF 발현을 위해, WO 2007/144173에 기술된 바와 같이 PACE/푸린을 암호화하는 발현 벡터(pFu-797)를 공동형질감염시켰다. 다른 실험으로, VWF 야생형 및 C-말단에 일부민이 융합된 VWF를 암호화하는 2개의 플라스미드로 pFu-797을 공동형질감염시켜, 야생형 VWF 단량체 및 일부민-융합된 VWF 단량체를 보유한 VWF 단량체를 수득했다(도 3 참조). 형질감염된 세포 집단은 T-플라스틱을 통해 회전기 병 또는 소형 발효조로 분배하고, 정제를 위해 이 상청액을 수거했다.

[0216] 표 2는 실시예 1에 기술된 작제물의 HEK-293 발현 데이터이다.

표 2

작제물	활성 [IU/mL]
pF8-457	1.54
pF8-457 + 0.5 U/ml VWF	1.66
pF8-1434	1.59
pF8-1434 + 0.5 U/ml VWF	1.82
pF8-1563 + 0.5 U/ml VWF	2.04
pF8-1568 + 0.5 U/ml VWF	1.21

[0217]

실시예 3: FVIII 일부민 융합 단백질의 증가된 발현율

[0218] 도 1은 무혈청 세포 배양물에서 FVIII 일부민 융합 단백질의 발현 연구 결과를 요약한 것이다. HEK-293 세포는 3반복으로 각각 pF8-1434(FVIII C-말단 일부민 융합체) 및 pF8-457(FVIII 야생형)로 형질감염시키고, 동일한 세포수로 T80 플라스틱에 접종하고, 안정화 VWF의 부재 하에 증식시켰다. 그 다음, 96시간, 120시간 및 144시간 후에 세포 상청액을 수거하고 FVIII 활성을 대해 검사했다.

[0219] 그 결과, 세포 배양물에 FVIII 분자가 일체 부분으로 존재할 때 일부민 부분의 발현 증강 효과를 입증했다. 결과적으로, 생산성은 야생형 FVIII에 비해 융합 단백질이 분명하게 향상되어 있었다(도 1).

[0222] **실시예 4: FVIII 단백질의 정제**

FVIII 분자를 함유하는 발현 상청액에, FVIII 활성을 거의 전부 결합시키기 위해 충분한 양의 면역친화성 수지를 첨가했다. 면역친화성 수지는 지지체로 사용된 세파크릴 S1000 수지에 적당한 항-FVIII mAb를 공유 결합시켜 제조했다. 수지를 세척한 후, 크로마토그래피 컬럼에 충전하고 다시 세척했다. 용출은 250mM CaCl₂ 및 50% 에틸렌 글리콜을 함유하는 완충액을 이용하여 수행했다.

[0224] FVIII:C 활성을 함유하는 면역친화성 크로마토그래피(IAC) 분획을 모아서, 제형 완충액(부형제: 염화나트륨, 수크로오스, 히스티딘, 염화칼슘 및 Tween 80)에 대해 투석하고 농축했다. 시료는 동결보관하거나, 적당한 동결-건조 사이클을 이용하여 동결건조했다.

[0225] 대안적으로, FVIII 함유 세포 배양 상청액은 1차 이온교환 크로마토그래피 후 면역친화성 크로마토그래피(IAC)를 이용한 추가 정제로 농축/정제했다. 이 경우에, 이온교환 크로마토그래피의 용출액은 전술한 수지를 이용하는 IAC 컬럼에 부하했다.

[0226] **실시예 5: FVIII 활성 및 항원의 분석**

[0227] 시험관내에서 FVIII:C의 활성을 측정하기 위해, 응혈 분석(예: Pathromtin SL 시약 및 FVIII 결손 혈장, Dade Behring, Germany) 또는 발색형성 분석(예: Coamatic FVIII:C 분석, Haemochrom)을 사용했다. 이 분석은 제조업체의 지시에 따라 수행했다.

[0228] FVIII 항원(FVIII:Ag)은 당업자에게 성능이 알려진 ELISA로 측정했다. 간략히 설명하면, 마이크로플레이트를 웨일당 100 μ l 포획 항체(양 항-사람 FVIII IgG, Cedarlane CL20035K-C, 완충액 A[Sigma C3041]에 1:200으로 희석함)와 상온에서 2시간 동안 항온처리했다. 플레이트를 완충액 B(Sigma P3563)로 3회 세척한 후, 검사시료를 시료 희석 완충액(Cedarlane)으로 연속 희석한 희석물과 FVIII 제조물(CSL Behring: 200-2 mU/ml)을 시료 희석 완충액(웰당 용적: 100 μ l)으로 연속 희석한 희석물을 상온에서 2시간 동안 항온처리했다. 완충액 B로 3회 세척한 후, 검출 항체(양 항-사람 FVIII IgG, Cedarlane CL20035K-D, 페옥시다제 표지화됨)의 완충액 B에 1:2 희석한 희석물 100 μ l를 각 웰에 첨가하고, 상온에서 추가 시간 동안 항온처리했다. 완충액 B를 이용한 추가 세척 단계 후, 웨일당 기질 용액(1:10(v/v) TMB OUVF : TMB 완충액 OUVG, Dade Behring) 100 μ l를 첨가하고 상온의 암실에서 30분 동안 항온처리했다. 100 μ l 정지 용액(Dade Behring, OSFA)을 첨가하여 450nm 파장에서 적당한 마이크로플레이트 판독기로 판독하기 위한 시료를 준비했다. 검사시료의 농도는 그 다음 침조물로 FVIII 제조물을 이용한 표준 곡선을 이용하여 계산했다.

[0229] **실시예 6: 1회 i.v. 주사 후 VWF ko 마우스에서 FVIII-FP의 약동학 평가**

[0230] FVIII 야생형(DNA 457) 및 C-말단 FVIII-FP(DNA 1656)의 약동학을 비교하기 위해, 두 FVIII 변이체를 마우스에게 정맥내 투여했다. VWF ko 마우스 종(Denis C. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1998, Vol 95, 9524-9529)을 선택한 이유는, 다른 기능 중에서 VWF가 운반체로 FVIII의 안정화 단백질로 작용하여 FVIII를 조기 분해, 예컨대 프로테아제에 의한 분해로부터 보호하고 혈행으로부터 조기 제거를 방지하기 때문이다. 미변형 FVIII의 경우, VWF와 비-방해 상호작용은 VWF에 대한 결합 감소를 초래하는 C 말단 영역의 돌연변이에 의해 유발된 A형 혈우병 증례에서 예증된 것처럼 필요하다. 변형 FVIII의 경우, 이러한 결합은 향상된 약동학을 검사하거나 달성하기 위해 심지어 불필요할 수 있다. 따라서, 두 산물은 2 그룹의 마우스에게 일시주사로서 100 U(FVIII:Ag)/kg의 용량으로 i.v. 주사했다(표 3). 검사 물질을 적용한 후 5분째부터 24시간까지 적당한 간격으로 혈액을 후안와에서 채혈했다. 한 혈액 시료/마우스를 가지고 혈장 처리하고, 분석 시까지 -20°C에 동결보관했다. 사람 FVIII:Ag 농도는 사람 FVIII에 특이적인 ELISA 분석 또는 사람 알부민과 FVIII 각각에 특이적인 혼합 ELISA로 정량분석했다. 각 시점마다 모든 시료의 평균 혈장 농도는 약동학 파라미터의 계산에 사용했다. 반감기는 식 $t_{1/2} = \ln 2/k$ (k는 회귀선의 기울기)에 따라 베타 제거 상의 시점을 이용하여 계산했다. 결과는 도 2에 제시했다. 놀랍게도, FVIII-FP 1656($t_{1/2} = 3.06$ 시간, 5 내지 960분 사이)은 FVIII 야생형($t_{1/2} = 0.8$ 시간, 5 내지 240분 사이)에 비해 약 3 내지 4배 긴 최종 반감기를 나타냈다. 또한, FVIII-FP 1656의 회수율은 야생형 FVIII에 비해 약 20% 증가했다(표 4).

표 3

VWF ko 마우스에서 FVIII 약동학의 비교를 위한 처리 그룹

처리	용량 (FVIII:C) / 용적 / 스케줄 / 경로	N
FVIII 야생형	100 U (FVIII:Ag)/kg / 0.2 mL/20g b.w. / t=0 h /i.v..	24
FVIII-FP 1656	100 U(FVIII:Ag)/kg / 0.2 mL/20g b.w. / t=0 h /i.v..	24

[0231]

표 4

VWF ko 마우스에의 i.v. 주사 시,
FVIII 야생형 및 변형 FVIII, FVIII-FP 1656의 생체이용률 (%)

처리	생체이용률 (%)
FVIII 야생형	100
FVIII-FP 1656	120.4

[0232]

실시예 7: VWF 야생형 및 VWF 일부민 융합 단백질을 위한 밸현 벡터의 생성

먼저, 다중 클로닝 부위에 전체 길이의 VWF cDNA 서열을 함유하는 밸현 플라스미드를 제조했다. 이를 위해 VWF 암호화 서열은 당업자에게 공지된 표준 조건 하에(예컨대, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>에 기술된 바와 같이) VWF cDNA를 함유하는 플라스미드(시중에서 입수할 수 있음, 예컨대 pMT2-VWF, ATCC No. 67122)로부터 프라이머 세트 VWF+ 및 VWF- (서열번호 17 및 18)를 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)으로 증폭시켰다. 수득되는 PCR 단편은 제한효소 EcoRI로 분해하고, EcoRI에 의해 선형화된 밸현 벡터 pIRESpuro3(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)에 연결시켰다. CMV 프로모터의 하류에 VWF의 야생형 cDNA를 함유하는 수득되는 밸현 플라스미드는 pVWF-1570이라 명명했다.

31개 아미노산 글리신/세린 링커에 대한 암호화 서열과 사람 일부민 cDNA를 함유하는 PCR 단편은 W02007/090584에 기술된 pFVII-937로부터 프라이머 We2994 및 We1335(서열번호 19 및 20)를 이용하여 증폭시켰다. 이 PCR 단편은 그 다음 제한 엔도뉴클레아제 NotI로 분해하고 NotI 분해된 pVWF-1570에 연결시켰다. VWF wt, 링커 서열 및 사람 일부민의 암호화 서열을 함유하는 최종 플라스미드는 pVWF-1574라 명명했다.

융합 단백질의 밸현을 달성하기 위해, VWF와 링커 서열 사이에 여러 염기가 결실되어야 했다. 이것은 올리고뉴클레오파이드 We2995 및 We2996(서열번호 21 및 22)을 이용하여 표준 프로토콜(QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 따라 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 수행했다. pVWF-1572로 명명한 최종 밸현 플라스미드는 31개 아미노산 글리신/세린 링커와 사람 일부민의 암호화 서열과 프레임 내에 VWF의 암호화 서열을 함유했다. 밸현된 rVWF-FP의 아미노산 서열은 서열번호 25에 제시했다. 사람 VWF 프리프로단백질의 아미노산 서열은 서열번호 24에 제시했다.

전술한 프로토콜 및 플라스미드를 이용하고 당업자에게 공지된(그리고 상기 문헌 Current Protocols in Molecular Biology에 기술된) 분자생물학 기술을 적용하여 당업자라면 일부민 서열 대신 다른 HLEP 서열을 대체하거나, 링커 서열 대신 다른 링커 서열을 대체하여 다른 작제물을 제조할 수 있다.

실시예 8: VWF 및 VWF 일부민 융합 단백질의 경제

VWF 야생형(rVWF wt) 또는 VWF 일부민 융합 단백질(rVWF-FP)을 함유하는 세포 배양 상청액을 0.2 μ m 필터를 통해 멀균 여과하고, 평형 완충액(EB; 10mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂, pH 7.0)에 대해 투석했다. 이 물질을 그 다음 EB

[0238]

[0239]

로 평형화된 헤파린 프락토겔 컬럼에 적용했다. 이 컬럼을 EB로 세척하고 VWF 단백질은 EB 중의 500mM NaCl로 용출시켰다. 용출 피크는 농축하여 FB 완충액(3g/L 염화나트륨, 20 g/L 글리신, 5.5 g/L 삼나트륨 시트레이트 이수화물, pH 7.0)에 대해 투석했다. 마지막에, 물질을 멸균 여과하고 일정량씩 동결했다. 필요하면, 음이온 및 /또는 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 및 SEC를 포함하는 추가 정제 단계를 적용했다.

[0240] 실시예 9: VWF 활성 및 항원 분석

시료는 VWF:Ag(OPAB03, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany)의 면역탁도 측정 및 콜라겐 결합 (Technozym VWF:CBA ELISA, Ref. 5450301 및 캘리브레이터 세트 5450310 및 대조군 세트 5450312, Technoclone, Vienna, Austria)에 대해 제조자가 기술한 바대로 분석했다.

VWF:RCO 검사는 Siemens Healthcare Diagnostics(Marburg, Germany)의 BC VWF 시약을 제조자의 설명에 따라 사용하여 수행했다. 국제 농축물 표준은 매일 사용하는 가정내 표준 제조물을 조정하기 위한 기본 표준 제조물로 사용했다.

VWF:Rco 및 VWF:Ag 분석의 비는 검사된 여러 작제물을 비교하기 위해 계산했다. 도 3에 도시된 바와 같이 VWF:Rco/VWF:Ag 비는 wt rVWF 및 C-말단 rVWF-알부민 용합 단백질과 비슷했다.

약동학 분석을 위해 VWF 항원은 당업자에게 성능이 알려진 ELISA로 측정했다. 간략히 설명하면, 마이크로플레이트를 완충액 A[Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Germany]에 1:2000 비율로 희석한 포획 항체(토끼 항 사람 VWF-IgG, Dako A0082[Dako, Hamburg, Germany]) 100 μ l/웰과 상온에서 하룻밤 항온처리했다. 플레이트를 완충액 B(Sigma P3563)로 3회 세척한 후, 각 웰을 200 μ l 완충액 C(Sigma P3688)와 1.5시간 동안 상온에서 항온처리했다(차단용). 다시 완충액 B로 3회 세척한 후, 검사 시료를 완충액 B로 연속 희석한 희석물 및 표준 사람 혈장(ORKL21; 20-0.2mU/ml; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany)을 완충액 B로 연속 희석한 희석물(웰당 용적: 100 μ l)을 상온에서 1.5시간 동안 항온처리했다. 완충액 B로 3회 세척한 후, 검출 항체(토끼 항 사람 VWF-IgG, Dako P0226, 퍼옥시다제 표지화된 것)를 완충액 B에 1:16000 비율로 희석한 희석물 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 항온처리했다. 완충액 B로 3회 세척한 후, 기질 용액(OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) 100 μ l를 웰마다 첨가하고 상온의 암실에서 30분 동안 항온처리했다. 미희석 종결 희석 액(OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) 100 μ l를 첨가하여 적당한 마이크로플레이트 판독기에서 450nm 파장 하에 판독하기 위한 시료를 마련했다. 검사 시료의 농도는 그 다음 참조물질로 표준 사람 혈장을 이용한 표준 곡선을 통해 계산했다.

[0245] 실시예 10: VWF 및 VWF 알부민 용합 단백질의 다량체 분석

VWF 다량체 분석은 최근 기술된 SDS-아가로스 겔 전기영동(Tatewaki et al., Thromb.Res. 52: 23-32(1988), 및 Metzner et al., Haemophilia 4(Suppl.3): 25-32(1998))으로 약간의 변형을 주어 수행했다. 간략히 설명하면, 사용할 준비로 진행 완충액으로 평형화 후, 1% 아가로스 미니 겔(BioRad)을 이용하여 가능한 한 본 방법을 표준화했다. 비슷한 양의 VWF 항원을 SDS-아가로스 겔 전기영동으로 처리했다. 웨스턴 블로팅 후, VWF 단백질 밴드는 항-VWF(DAKO, 제품번호 0854) 또는 항-알부민 항체를 이용한 후 알칼리성 포스파타제 표지화된 항-IgG 항체 (SIGMA, 제품번호 1305)를 이용하여 검출하고, 발색 반응은 농도측정법으로 정량분석했다.

야생형 rVWF(1570/797) 및 rVWF-FP(1572/797)를 이용하면, rVWF-FP가 항-알부민 및 항-VWF 항체 모두에 의해 검출되는 보통 다량체 분포를 형성한다는 것을 웨스턴 블로팅 및 항-알부민 또는 항-VWF 항체에 의한 검출로 입증할 수 있다(도 4). 이것은 다량체 VWF의 서브유닛마다 알부민을 함유할지라도 보통 VWF 다량체 패턴이 형성된다는 것을 확인시켜준다. 알부민 부분은 VWF 분자의 N-말단 이량체화 또는 C-말단 다량체화를 저해하지 않는다는 것이 분명하다.

[0248] 실시예 11: 1회 i.v. 주사 후 래트 내의 VWF 및 VWF 알부민 용합 단백질의 약동학 평가

rVWF-FP 및 rVWF wt는 총 4마리 CD 래트 각각에게 정맥내 투여했다. 용량은 100 U(VWF:Ag)/kg(체중)이고, 주사 용량은 4ml/kg이다. 검사 물질을 적용한 후 5분부터 적당한 간격으로 후안와에서 혈액 시료를 채혈했고, 교호 시료채취 방식을 이용하여 시점(서브세트 1번에 대해 t=0, 5, 30, 90분, 4시간, 1일; 서브세트 2번에 대해 0, 15분, 1, 2, 8시간 및 2일)마다 2마리로부터 시료를 채취했다. 이 방식은 정량분석되는 혈장 농도에 혈액 시료 채취가 미치는 잠재적 효과를 최소화하도록 설계했다. 혈액은 혈장으로 가공하고 분석시까지 심온동결하여 보관했다. 이어서, 혈장 중의 VWF:Ag 수준은 실시예 9에 기술한 바와 같은 ELISA로 정량분석했다. 평균 혈장 농도는 약동학 파라미터를 계산하는데 사용했다. 반감기는 식 $t_{1/2} = \ln 2/k$ (k는 회귀선의 기울기)에 따라 베타 제거 상의

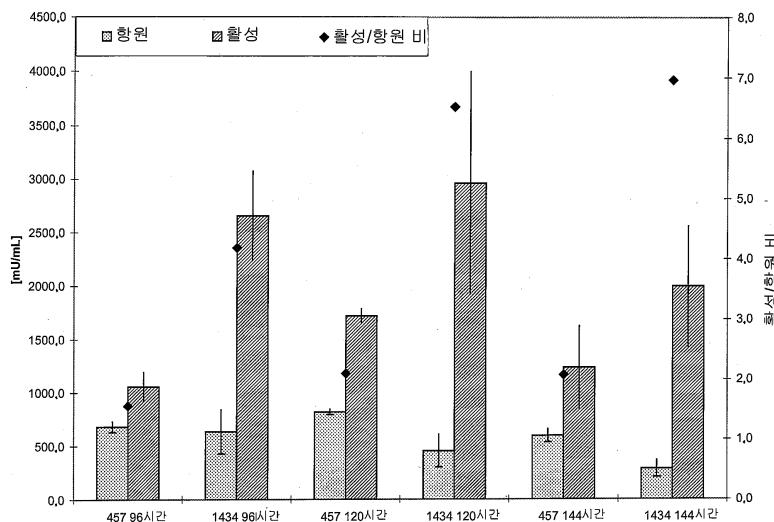
시점을 이용하여 계산했다.

[0250] 결과는 도 5에 도시했다($n=2$ /시점; 평균). 최종 반감기는 rVWF-FP에 대해서는 32.4분, rVWF wt에 대해서는 2.6분인 것으로 계산되었다. 또한, 회수율도 rVWF wt는 16.1%인데 비해 rVWF-FP는 42.1%로 향상되었다.

도면

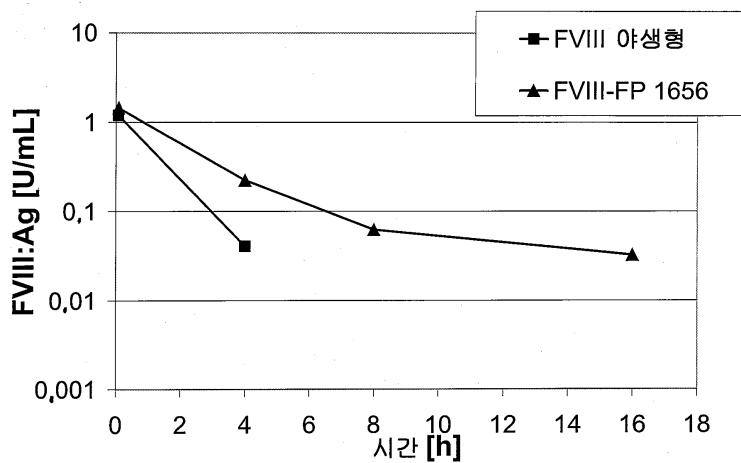
도면1

야생형 FVIII (457) 및 FVIII-C-말단 (1434) 일부민 응합 폴리펩타이드의 항원 및 활성 수준



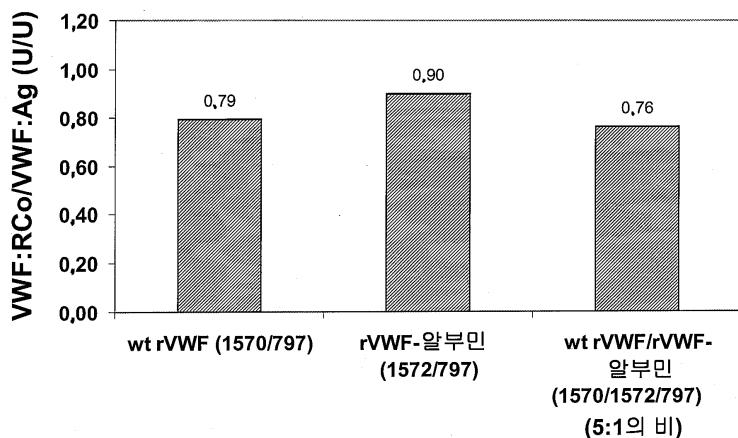
도면2

100U(FVIII:Ag)/kg FVIII 야생형 및 FVIII-FP 1656 VWF의 정맥내 주사 후 VWF ko
마우스에서의 사람 FVIII:Ag 약동학의 비교 (평균; $n=4$ /시점)



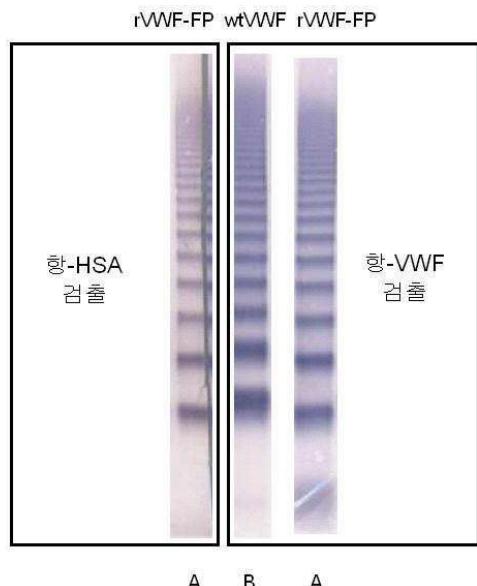
도면3

wt rVWF (1570/797), C-말단 결합된 일부민을 함유하는 rVWF-FP (1572/797), 또는 5:1의 비로 형질감염된 wt rVWF(1570/797)와 rVWF-FP(1572/797)의 혼합물을 함유하는 혼합된 발현 세포 배양물을 함유하는 세포 배양 상청액의 VWF:RCo/VWF:Ag 비. 모든 경우에서, 단위 정의에 따른 NHP의 이론적인 비인 1에 가까운 약 0.8의 값이 수득되었다.



도면4

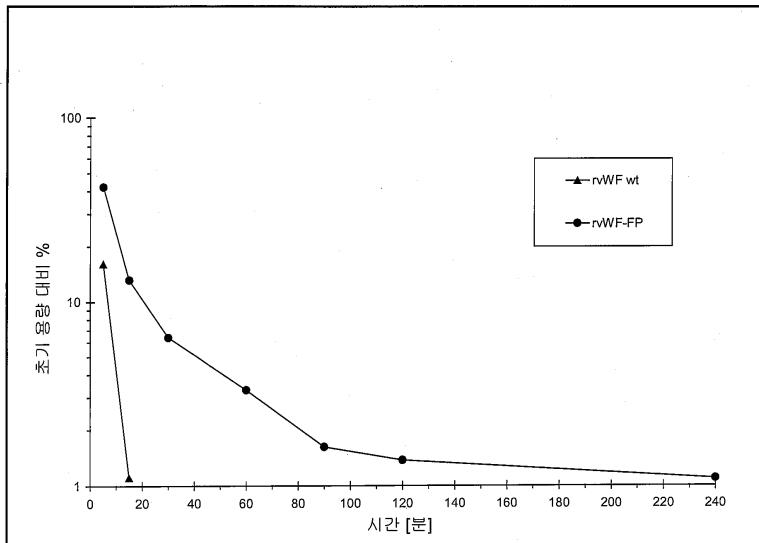
HEK 세포에서 발현된 야생형 rVWF(1570/797)(B) 및 rVWF-FP(1572/797)(A)의 SDS-아가로스 겔 전기영동. 밴드는 VWF 또는 알부민(HSA)에 대한 항체를 이용하여 검출했다.



A = rVWF-FP (푸린의 존재 하에 발현됨)
B = wt VWF (푸린의 존재 하에 발현됨)

도면5

VWF:Ag 측정을 기반으로 한 래트에서의 rVWF wt 및 rVWF-FP의 PK 분석



서 열 목 록

- <110> CSL Behring GmbH
 - <120> Factor VIII, von Willebrand factor or complexes thereof with prolonged in vivo half-life
 - <130> 2008_M004_A145
 - <150> EP 08011429.1
 - <151> 2008-06-24
 - <160> 25
 - <170> KopatentIn 1.71
 - <210> 1
 - <211> 36
 - <212> DNA
 - <213> Artificial
 - <220><223> Primer
 - <400> 1
- caatgccatt gaaccaagac gagaataac tcgtac 36
- <210> 2
 - <211> 36
 - <212> DNA
 - <213> Artificial
 - <220><223> Primer

<400> 2
 gtacgaggta tttctcgct tggttcaatg gcattg 36

<210> 3
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 3
 caatgccatt gaaccaagac gtcgtggtcg acgagaaata actcgta 48
 <210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 4
 gtacgaggta tttctcgctg accacgacgt cttggttcaa tggcattg 48
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 5
 cattattccg gatcaatcaa tgc 23
 <210> 6
 <211> 38
 <
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 6
 acgcggccgc ggtaccggtg tagaggtcct gtgcctcg 38
 <210> 7
 <211> 31
 <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 7

gtgaccggtg atgcacacaa gagtgagggtt g 31

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 8

cacgcggccg cctataagcc taaggcagct tg 32

<210> 9

<211> 2016

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

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

50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val

65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

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

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

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

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

370 375 380

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

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

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
 740 745 750

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 755 760 765

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 770 775 780

Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 785 790 795 800

Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
 805 810 815

Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
 820 825 830

Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 835 840 845

Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 850 855 860

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr

865	870	875	880
Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly			
885	890	895	
Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr			
900	905	910	
Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp			
915	920	925	
Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val			
930	935	940	
His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu			
945	950	955	960
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe			
965	970	975	
Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met			
980	985	990	
Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr			
995	1000	1005	
Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met			
1010	1015	1020	
Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg			
1025	1030	1035	
Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile			
1040	1045	1050	
His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr			
1055	1060	1065	
Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val			
1070	1075	1080	
Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu			
1085	1090	1095	
Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val			
1100	1105	1110	

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His
 1115 1120 1125
 Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp
 1130 1135 1140

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

Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly
 1205 1210 1215
 Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys
 1220 1225 1230
 His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
 1235 1240 1245
 His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu
 1250 1255 1260

Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu
 1265 1270 1275
 Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe
 1280 1285 1290
 Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His
 1295 1300 1305
 Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro
 1310 1315 1320

Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr
 1325 1330 1335
 Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr

1340	1345	1350
Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser	Ser Ser Gln Asp Gly	His Gln Trp
1355	1360	1365
Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly	Lys Val Lys Val Phe	Gln Gly Asn
1370	1375	1380
Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu		
1385	1390	1395
Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile	His Pro Gln Ser Trp	Val His Gln
1400	1405	1410
Ile Ala Leu Arg Met Glu Val	Leu Gly Cys Glu Ala	Gln Asp Leu
1415	1420	1425
Tyr Thr Gly Asp Ala His Lys	Ser Glu Val Ala His	Arg Phe Lys
1430	1435	1440
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe		
1445	1450	1455
Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys	Pro Phe Glu Asp His	Val Lys Leu
1460	1465	1470
Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val	Ala Asp Glu	
1475	1480	1485
Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys	Ser Leu His Thr Leu	Phe Gly Asp
1490	1495	1500
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met		
1505	1510	1515
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln	Glu Pro Glu Arg Asn	Glu Cys Phe
1520	1525	1530
Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	Pro Asn Leu Pro Arg	Leu Val Arg
1535	1540	1545
Pro Glu Val Asp Val Met Cys	Thr Ala Phe His Asp	Asn Glu Glu
1550	1555	1560
Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro		
1565	1570	1575

Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
 1580 1585 1590
 Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 1595 1600 1605
 Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 1610 1615 1620

 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
 1625 1630 1635
 Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 1640 1645 1650
 Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
 1655 1660 1665
 Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 1670 1675 1680

 Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 1685 1690 1695
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 1700 1705 1710
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
 1715 1720 1725
 Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 1730 1735 1740

 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 1745 1750 1755
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser
 1760 1765 1770
 Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 1775 1780 1785
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
 1790 1795 1800

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

1805	1810	1815
Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys		
1820	1825	1830
Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln		
1835	1840	1845
Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
1850	1855	1860
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro		
1865	1870	1875
Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val		
1880	1885	1890
Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys		
1895	1900	1905
Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu		
1910	1915	1920
Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe		
1925	1930	1935
Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln		
1940	1945	1950
Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro		
1955	1960	1965
Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
1970	1975	1980
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys		
1985	1990	1995
Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala		
2000	2005	2010
Leu Gly Leu		
2015		
<210> 10		
<211> 31		
<212> DNA		

<213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 10
 gcgaccggtg atgacaactc tccttcctt a 31
 <210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> Primer
 <400> 11
 gcgaccggtc caagtttag gatgcttctt g 31
 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 12
 gcgaccgggtt cgagcggggg atctggc 27
 <210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Primer
 <400> 13
 gcgaccggtg gatcccgacc ctccagag 28
 <210> 14
 <211> 7020
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 14
 atgcaaata agctctccac ctgcttctt ctgtgcctt tgcgattctg cttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgtatctc 120
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagattcct cctagagtgc caaaatctt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgtt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gctcccatc ctgtcagtc tcatgctgtt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt ctccctgtt ggaagccata catatgtctg gcaggccctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctt cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgttagagaa	600
gggagtcgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact tttgctgtt	660
tttgcattttt gaaaaagtgg gcaactcagaa acaaagaact ccttgcatttgc ggttggat	720
gtgcattttt ctggggctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggct	780
ctgcccaggc tgattggatg ccacaggaaa tcagtcattt ggcattgtt gttttttttt	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca cattttttt gaggaccat	900
cgccaggcgt cttggaaat ctgcacata actttcctt ctgtcaaac acttttttttgc	960
gacccatggac agtttctact gttttgtcat atctttccca accaacatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagttagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaaag actatgttgc tgatctact gattctgaa tggatgttgc caggtttgc	1140
gtatgttgc actatgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1200
tgggtacattt acattgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgtttttttt tttttttttt tttttttttt	1320
aagtacaaaaa aagtccgatt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1380
attcagcatg aatcggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1440
ttgattatattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1500
gtatgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1560
ccaaattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1620
actaaatcattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1680
gatcttagttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaaggagg aatgtcatcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1800
aaccgaagctt ggtttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1860
cagcttggagg atccagatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1920
tttgcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1980
atggggccatc agactgactt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	2040

atggctatg aagacacact caccatttc ccatttcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagacttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttcttagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttagatg atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagact aggcaaaagc aatthaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggttgcac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaaatg ttcctctag tgattttgtg atgcttgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga cttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagccctg tctgaaatga cacacttcg gccacagctc	2580
catcacagtgggacatggatttaccctt gaggcaggcc tccattaag attaaatgag	2640
aaactgggcaactgcgc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttcttagtaca	2700
tcaataatac tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtac tgataataca	2760
agttccttag gaccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattttaga taccactcta	2820
tttggcaaaa agtcatctcc cttacttagt cttggggac ctctgagctt gaggtaagaa	2880
aataatgatt caaagttgtt agaatcaggt ttaatgaata gccaagaaag ttcatgggaa	2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagggttagg ttatataag ggaaaagagc tcatggacct	3000
gctttgtatgatcaaagataa tgccttattc aaagttagca tctttgtt aaagacaaac	3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta	3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gttaaaaaa	3180
tgacacacctt tgattcatga cagaatgtt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta	3240
aatcatatgt caaataaaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa	3300
gagggccccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttttaa gatgttattc	3360
ttgcccagaat cagcaagggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctt gaactctgg	3420
caaggccccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggctcg	3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta	3540
ggactcaaag agatggttt tccaaggcgc agaaacctat ttcttactaa ctggataat	3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaatcc aggaagaaat agaaaagaag	3660
gaaacattaa tccaagagaa tggatgtttt cctcagatac atacagtgc tggcactaag	3720
aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac	3780

ggggcatatg ctccagtaact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840

aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttggaa aggcttggaa 3900
 aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tcctaataca 3960
 agccagcaga attttgcac gcaacgtatg aagagagct taaaacaatt cagactccca 4020
 ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acaccaac ccagtggtcc 4080
 aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag 4140
 aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200
 caagcaaata gatctccatt acccatgca aaggtatcat cattccatc tattagacct 4260

atatatctga ccagggcctt attccaagac aactttctc atttccagc agcatttat 4320
 agaaagaaag attctgggtt ccaagaaagc agtcatatct tacaaggagc caaaaaaaat 4380
 aaccttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc 4440
 ctggggacaa gtgccacaaa ttcaagtaca tacaagaaag ttgagaacac ttttctccg 4500
 aaaccagact tgcccaaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaagt tcacattat 4560
 cagaaggacc tattccctac gaaaaacttagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcg 4620
 gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggaa gcgatatagt ggaatgaagc aaacagac 4680

ggaaaagttc ctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740
 ttggatcttc ttgcttggaa taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800
 tcccaagaga agtaccacca aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat tttgtccctg 4860
 aacgcttggaa aagcaatca tgcaatagca gcaataatg agggacaaaa taagccgaa 4920
 atagaagtca cctggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tggctctca aaacccacca 4980
 gtcttggaaac gccatcaacg gggaaataact cgtactactc ttcaagtca tcaagaggaa 5040
 attgactatg atgataccat atcaatgaa atgaaagg aagatggatc cattatgat 5100

gaggatgaaa atcagagccc ccgcagctt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct 5160
 gcagttggaga ggctctggaa ttatggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg 5220
 gctcagatgtt gcagttggccc tcagttcaag aaagtgttt tccaggaatt tactgatggc 5280
 tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaatgaac atttggact cctggggcca 5340
 tatataagag cagaagttga agataatatc atggtaactt tcagaaatca ggcctctcg 5400
 cccttattctt tctattcttgc ctttattctt tatggatggatg atcaggagca aggaggc 5460
 ccttagaaaaa actttgtcaa gcctaattaa accaaaactt actttggaa agtgcacat 5520

catatggcac ccactaaaga ttagtttgac tgcaaaggct gggcttattt ctctgatgtt 5580
 gacctggaaa aagatgtgca ctcagggctg attggacccc ttctggctg ccacactaac 5640
 acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aattgctct gttttcacc 5700
 atcttgatg agaccaaaag ctggacttc actgaaaata tgaaaagaaa ctgcagggct 5760
 ccctgcaata tccagatgg agatccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880
 tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940

gtgttcactg tacaaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000
 gttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa ttggcggtt ggaatgcctt 6060
 attggcgagc atctacatgc tggatgagc acacttttc tgggtacag caataagtgt 6120
 cagactcccc tggaatggc ttctggacac attagagatt tttagattt acgttcagga 6180
 caatatggac agtggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
 tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aagggtggatc tggtggacc aatgatttt 6300
 cacggcatca agacccaggg tgcccgatc aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360

atcatcatgt atagtcttga tggaaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgg 6420
 accttaatgg tcttccttgg caatgtggat tcacatggta taaaacacaa tatttttaac 6480
 cctccaatta ttgctcgata catccgttg caccaactc attatagcat tcgcagcact 6540
 cttcgcatttgg agttgtatggg ctgtgatTTT aatagttgca gcatgccatt gggaaatggag 6600
 agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcatctt actttacaa tatgtttgcc 6660
 acctggcttc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
 caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtccaa 6780

ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttccctc 6840
 atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctttt ttcaaatgg caaagtaaag 6900
 gttttcagg gaaatcaaga ctccttcaca cctgtggatc actctctaga cccaccgtta 6960
 ctgactcgct accttcgaat tcacccctcag agttggatgc accagattgc cctggaggatg 7020

<210> 15

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

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

50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val

65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser

145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu

165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu

180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp

195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser

210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg

225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His

245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu

260	265	270	
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile			
275	280	285	
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly			
290	295	300	
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met			
305	310	315	320
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg			
325	330	335	
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Leu Thr Asp			
340	345	350	
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe			
355	360	365	
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His			
370	375	380	
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu			
385	390	395	400
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro			
405	410	415	
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr			
420	425	430	
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile			
435	440	445	
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile			
450	455	460	
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile			
465	470	475	480
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys			
485	490	495	
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys			
500	505	510	

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys

515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala

530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp

545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe

565 570 575

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

580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe

595 600 605

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

610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu

625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr

645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro

660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala

725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg

740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys

755	760	765	
Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn			
770	775	780	
Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro			
785	790	795	800
His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe			
805	810	815	
Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser			
820	825	830	
Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val			
835	840	845	
Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly			
850	855	860	
Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser			
865	870	875	880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala			
885	890	895	
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His			
900	905	910	
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Ser Ser Pro			
915	920	925	
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp			
930	935	940	
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp			
945	950	955	960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys			
965	970	975	
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys			
980	985	990	
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala			
995	1000	1005	

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp

 1040 1045 1050
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095
 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His

 1100 1105 1110
 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125
 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140
 Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155
 Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn

 1160 1165 1170
 Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 1175 1180 1185
 Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
 1190 1195 1200
 Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
 1205 1210 1215
 Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg

 1220 1225 1230
 Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu

1235	1240	1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn	Asp Ser Thr Asn Arg	Thr Lys Lys
1250	1255	1260
His Thr Ala His Phe Ser Lys	Lys Gly Glu Glu	Asn Leu Glu
1265	1270	1275
Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys	Gln Ile Val Glu Lys	Tyr Ala Cys
1280	1285	1290
Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305
Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320
Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335
Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395
Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr	Arg Val Leu Phe Gln	Asp Asn Ser
1400	1405	1410
Ser His Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425
Gln Glu Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu
1430	1435	1440
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu	Glu Met Thr Gly Asp	Gln Arg Glu
1445	1450	1455
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser	Ala Thr Asn Ser Val	Thr Tyr Lys
1460	1465	1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485
 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
 1490 1495 1500
 Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
 1505 1510 1515
 Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile

 1520 1525 1530
 Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
 1535 1540 1545
 Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
 1550 1555 1560
 Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
 1565 1570 1575
 Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys

 1580 1585 1590
 Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
 1595 1600 1605
 Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
 1610 1615 1620
 Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
 1625 1630 1635
 Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr

 1640 1645 1650
 Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
 1655 1660 1665
 Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
 1670 1675 1680
 Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
 1685 1690 1695
 Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser

1700	1705	1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro		
1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe		
1730	1735	1740
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu		
1745	1750	1755
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val		
1760	1765	1770
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser		
1775	1780	1785
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg		
1790	1795	1800
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys		
1805	1810	1815
Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys		
1820	1825	1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His		
1835	1840	1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu		
1850	1855	1860
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu		
1865	1870	1875
Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu		
1880	1885	1890
Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu		
1895	1900	1905
Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly		
1910	1915	1920
Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln		
1925	1930	1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
 1940 1945 1950
 His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
 1955 1960 1965
 Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
 1970 1975 1980
 Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
 1985 1990 1995
 Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
 2000 2005 2010
 Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
 2015 2020 2025
 Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
 2030 2035 2040
 Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
 2045 2050 2055
 Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
 2060 2065 2070
 Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
 2075 2080 2085
 Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
 2090 2095 2100
 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
 2105 2110 2115
 Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
 2120 2125 2130
 Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
 2135 2140 2145
 Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
 2150 2155 2160
 Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu

2165	2170	2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser		
2180	2185	2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala		
2195	2200	2205
Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val		
2210	2215	2220
Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met		
2225	2230	2235
Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr		
2240	2245	2250
Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly		
2255	2260	2265
His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe		
2270	2275	2280
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp		
2285	2290	2295
Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp		
2300	2305	2310
Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala		
2315	2320	2325
Gln Asp Leu Tyr		
2330		
<210> 16		
<211> 585		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 16		
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu		
1	5	10
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
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365

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

370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
580	585	
<210> 17		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> Primer		
<400> 17		
ttcgaattcc cgcagccctc atttgagg		30
<210> 18		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> Primer		
<400> 18		
tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c		31
<210> 19		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> Primer		
<400> 19		
gcggcggccg cgagccccat ttccc		25
<210> 20		
<211> 18		
<212> DNA		

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 20

gagagggagt actcaccc 18

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 21

ggaagtgcag caagtcgagc gggggat 27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer

<400> 22

atcccccgcg cgacttgctg cacttcc 27

<210> 23

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585
 <210> 24
 <211> 2813
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 24

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile

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

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

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

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser

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

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

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
 690 695 700
 Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp

 705 710 715 720
 Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
 725 730 735
 His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
 740 745 750
 Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
 755 760 765
 Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu

 770 775 780
 Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
 785 790 795 800
 Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
 805 810 815
 His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
 820 825 830
 Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr

 835 840 845
 Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
 850 855 860
 Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
 865 870 875 880
 Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
 885 890 895
 Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys

 900 905 910
 Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
 915 920 925
 Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys

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

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

 1205 1210 1215
 Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
 1220 1225 1230
 Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
 1235 1240 1245
 Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
 1250 1255 1260
 Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu

 1265 1270 1275
 Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
 1280 1285 1290
 Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
 1295 1300 1305
 Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 1310 1315 1320
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser

 1325 1330 1335
 Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
 1340 1345 1350
 Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
 1355 1360 1365
 Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu
 1370 1375 1380
 Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val

 1385 1390 1395
 Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro

1400	1405	1410
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile		
1415	1420	1425
Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val		
1430	1435	1440
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys		
1445	1450	1455
Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met		
1460	1465	1470
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu		
1475	1480	1485
Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu		
1490	1495	1500
Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys		
1505	1510	1515
Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp		
1520	1525	1530
Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val		
1535	1540	1545
Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln		
1550	1555	1560
Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr		
1565	1570	1575
Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser		
1580	1585	1590
Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr		
1595	1600	1605
Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile		
1610	1615	1620
Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu		
1625	1630	1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1640 1645 1650
 Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 1655 1660 1665
 Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala
 1670 1675 1680
 Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
 1685 1690 1695
 Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
 1700 1705 1710
 Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
 1715 1720 1725
 Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
 1730 1735 1740
 Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
 1745 1750 1755
 Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
 1760 1765 1770
 Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala
 1775 1780 1785
 Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
 1790 1795 1800
 Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn
 1805 1810 1815
 Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala
 1820 1825 1830
 Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val
 1835 1840 1845
 Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu
 1850 1855 1860
 Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile

1865	1870	1875
Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp		
1880	1885	1890
Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly		
1895	1900	1905
Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu		
1910	1915	1920
Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu		
1925	1930	1935
Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser		
1940	1945	1950
Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu		
1955	1960	1965
Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp		
1970	1975	1980
Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg		
1985	1990	1995
Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser		
2000	2005	2010
Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu		
2015	2020	2025
Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr		
2030	2035	2040
Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile		
2045	2050	2055
Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser		
2060	2065	2070
Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys		
2075	2080	2085
Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val		
2090	2095	2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg

2105 2110 2115

Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val

2120 2125 2130

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala

2135 2140 2145

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys

2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala

2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp

2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val

2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn

2210 2215 2220

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

2225 2230 2235

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

2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu

2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys

2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr

2285 2290 2295

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

2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp

2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly

2330	2335	2340
Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe		
2345	2350	2355
Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro		
2360	2365	2370
Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys		
2375	2380	2385
Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val		
2390	2395	2400
Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys		
2405	2410	2415
Gly Cys Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His		
2420	2425	2430
Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys		
2435	2440	2445
Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu		
2450	2455	2460
Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg		
2465	2470	2475
Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg		
2480	2485	2490
Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly		
2495	2500	2505
Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser		
2510	2515	2520
Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu		
2525	2530	2535
Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu		
2540	2545	2550
Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser		
2555	2560	2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
 2570 2575 2580
 Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp

 2585 2590 2595
 Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
 2600 2605 2610
 Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
 2615 2620 2625
 Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2630 2635 2640
 Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile

 2645 2650 2655
 Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr
 2660 2665 2670
 His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
 2675 2680 2685
 Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
 2690 2695 2700
 Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr

 2705 2710 2715
 Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
 2720 2725 2730
 Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
 2735 2740 2745
 Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
 2750 2755 2760
 Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg

 2765 2770 2775
 Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2780 2785 2790
 Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro

2795	2800	2805
Arg Lys Cys Ser Lys		
2810		
<210> 25		
<211> 3429		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Amino acid sequence of human VWF albumin fusion preproprotein		
<400>		
> 25		
Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Ile		
1	5	10
Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr		
20	25	30
Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly		
35	40	45
Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly		
50	55	60
Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys		
65	70	75
Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu		
85	90	95
Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro		
100	105	110
Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys		
115	120	125
Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly		
130	135	140
Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly		
145	150	155
Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln		
165	170	175
Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala		

180 185 190

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

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
 260 265 270
 Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
 275 280 285
 Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
 290 295 300
 Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
 305 310 315 320

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

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

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn

515 520 525

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

530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met

565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe

580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys

595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly

610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val

625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln

645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu

660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

675	680	685
Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys		
690	695	700
Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp		
705	710	715
Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met		
725	730	735
His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val		
740	745	750
Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg		
755	760	765
Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu		
770	775	780
Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met		
785	790	795
Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg		
805	810	815
His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln		
820	825	830
Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr		
835	840	845
Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp		
850	855	860
Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly		
865	870	875
Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp		
885	890	895
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys		
900	905	910
Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu		
915	920	925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940
 Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960

 Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975
 His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
 980 985 990
 Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005
 Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020

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

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

 Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
 1145 1150 1155
 His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys

1160	1165	1170
His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu	Leu Leu Gln	
1175	1180	1185
Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu	Val Ala Gly	
1190	1195	1200
Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp		
1205	1210	1215
Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr		
1220	1225	1230
Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr		
1235	1240	1245
Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser		
1250	1255	1260
Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu		
1265	1270	1275
Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe		
1280	1285	1290
Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg		
1295	1300	1305
Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp		
1310	1315	1320
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser		
1325	1330	1335
Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln		
1340	1345	1350
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile		
1355	1360	1365
Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu		
1370	1375	1380
Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val		
1385	1390	1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro

1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile

1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val

1430 1435 1440

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

1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met

1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu

1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu

1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys

1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp

1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val

1535 1540 1545

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

1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr

1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser

1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr

1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile

1610 1615 1620

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

1625	1630	1635
Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp		
1640	1645	1650
Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg		
1655	1660	1665
Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala		
1670	1675	1680
Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly		
1685	1690	1695
Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe		
1700	1705	1710
Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr		
1715	1720	1725
Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val		
1730	1735	1740
Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val		
1745	1750	1755
Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala		
1760	1765	1770
Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala		
1775	1780	1785
Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val		
1790	1795	1800
Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn		
1805	1810	1815
Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala		
1820	1825	1830
Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val		
1835	1840	1845
Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu		
1850	1855	1860

Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile
 1865 1870 1875
 Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp
 1880 1885 1890
 Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly
 1895 1900 1905
 Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu
 1910 1915 1920

 Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu
 1925 1930 1935
 Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser
 1940 1945 1950
 Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu
 1955 1960 1965
 Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp
 1970 1975 1980

 Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg
 1985 1990 1995
 Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser
 2000 2005 2010
 Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu
 2015 2020 2025
 Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr
 2030 2035 2040

 Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile
 2045 2050 2055
 Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser
 2060 2065 2070
 Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys
 2075 2080 2085
 Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val

2090 2095 2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg
 2105 2110 2115
 Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val
 2120 2125 2130
 Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala
 2135 2140 2145
 Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys
 2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala
 2165 2170 2175
 Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp
 2180 2185 2190
 Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
 2195 2200 2205
 Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
 2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
 2225 2230 2235
 Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
 2240 2245 2250
 Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
 2255 2260 2265
 Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
 2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
 2285 2290 2295
 Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
 2300 2305 2310
 Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
 2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly

2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe

2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro

2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys

2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val

2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys

2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His

2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys

2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu

2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg

2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg

2480 2485 2490

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

2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser

2510 2515 2520

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

2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu

2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser

2555	2560	2565
Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu	Ala Cys Met	
2570	2575	2580
2585	2590	2595
Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser		
2600	2605	2610
Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro		
2615	2620	2625
Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg		
2630	2635	2640
2645	2650	2655
Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr		
2660	2665	2670
His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys		
2675	2680	2685
Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala		
2690	2695	2700
2705	2710	2715
Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr		
Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr		
2720	2725	2730
Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His		
2735	2740	2745
Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp		
2750	2755	2760
2765	2770	2775
Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg		
Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val		
2780	2785	2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2795 2800 2805
 Arg Lys Cys Ser Lys Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 2810 2815 2820

 Ser Gly Gly
 2825 2830 2835
 Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
 2840 2845 2850
 Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 2855 2860 2865
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
 2870 2875 2880

 Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val
 2885 2890 2895
 Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
 2900 2905 2910
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
 2915 2920 2925
 Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
 2930 2935 2940

 Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
 2945 2950 2955
 Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 2960 2965 2970
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 2975 2980 2985
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
 2990 2995 3000

 Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 3005 3010 3015
 Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly

3020	3025	3030
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln		
3035	3040	3045
Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu		
3050	3055	3060
Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu		
3065	3070	3075
Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp		
3080	3085	3090
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile		
3095	3100	3105
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys		
3110	3115	3120
Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu		
3125	3130	3135
Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe		
3140	3145	3150
Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp		
3155	3160	3165
Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro		
3170	3175	3180
Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu		
3185	3190	3195
Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys		
3200	3205	3210
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
3215	3220	3225
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly		
3230	3235	3240
Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys		
3245	3250	3255

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
 3260 3265 3270
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 3275 3280 3285
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 3290 3295 3300

 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 3305 3310 3315
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 3320 3325 3330
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 3335 3340 3345
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys
 3350 3355 3360

 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys
 3365 3370 3375
 His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
 3380 3385 3390
 Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
 3395 3400 3405
 Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
 3410 3415 3420

 Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 3425