



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월02일

(11) 등록번호 10-1476844

(24) 등록일자 2014년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7028236

(22) 출원일자(국제) 2006년05월03일

심사청구일자 2011년05월03일

(85) 번역문제출일자 2007년12월03일

(65) 공개번호 10-2008-0011423

(43) 공개일자 2008년02월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/016983

(87) 국제공개번호 WO 2006/119363

국제공개일자 2006년11월09일

(30) 우선권주장

60/677,680 2005년05월04일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Biochemical and Biophysical Research

Communications 329 (2005), pp. 1234-1239.*

GenBank Acession No. AAP36147.1, Homo sapiens

2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa

[synthetic construct], 2003.05.13.*

Genes and Immunity 4 (2003), pp. 411-419.

PNAS 99 (2002), pp. 11311-11316.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

일루미젠 바이오사이언시스, 인코포레이티드

미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 헤이든 애비뉴 65

큐비스트 파마슈티컬즈 인코포레이티드 씨/오

(72) 발명자

이아도나토, 손, 피.

미국 98122 워싱턴주 시애틀 31번 애비뉴 421

매그네스, 찰스, 엘.

미국 98115 워싱턴주 시애틀 피.오. 박스 51182

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 OAS1 유전자에서의 돌연변이

(57) 요약

본 발명은 비-인간 영장류에서의 OAS1 단백질의 변형된 아미노산 서열, 및 이와 관련된 유전자에 관한 것이다.

대표도 - 도2

OAS1의 치료 형태에 유용한 아미노산 치환 목록

위치	아미노산 치환
1	M 또는 - (결실)
31	D 또는 N
115	L 또는 F
127	G 또는 R
162	S 또는 G
295	R 또는 T
315	G 또는 R

(72) 발명자

쉐러, 크리스티나, 에이.

미국 98119 워싱턴주 시애틀 12번 애비뉴 웨스트
1837

펠린, 피., 캠퍼온

미국 98126 워싱턴주 시애틀 38번 애비뉴 사우스웨
스트 2666

하겐, 토리

미국 98422 워싱턴주 타코마 라이트하우스 레인 엔
이 1938

울슨, 아미

미국 98103 워싱턴주 시애틀 썬사이드 아베 엔.
3717

특허청구의 범위

청구항 1

서열 1의 아미노산 서열에서 위치 1의 메티오닌이 결실되고 위치 162의 아미노산이 글리신인 아미노산 서열의 폴리펩티드로 구성된 돌연변이 올리고아데닐레이트 신테타제 1 단백질.

청구항 2

제1항의 돌연변이 올리고아데닐레이트 신테타제 1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제약상 허용되는 담체, 및 제1항의 돌연변이 올리고아데닐레이트 신테타제 1 단백질을 포함하는, 포유동물에서 바이러스에 의한 감염을 치료 또는 예방하기 위한 치료 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 바이러스가 C형 간염 바이러스인 치료 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 또는 비-인간 영장류 올리고아데닐레이트 신테타제 유전자에서의 돌연변이를 검출하는 방법, 및 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근까지, 감염에 대한 자연적인 저항성이 인간 개체군 내에 존재하는 다수의 질환들이 확인되어 왔다. 문헌 [Alter and Moyer, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.* 18 Suppl. 1:S6-10 (1998)]에서는 주사

용 약물 사용자와 같은 높은 위험군에서 90%나 되는 C형 간염 바이러스 감염 (HCV) 비율이 보고되었다. 그러나, 상기 문헌에서는 나머지 10%가 감염에 대해 분명하게 저항성을 나타내게 하는 메커니즘이 확인되지 않았다. HCV 감염에서 역할을 하는 단백질에는 2-프라임, 5-프라임 올리고아데닐레이트 신테타제가 있다. OAS는 아데노신의 2-프라임, 5-프라임 올리고머 (2-5A)의 합성을 촉매하는 능력을 특징으로 하는 인터페론-유래 단백질이다. 문헌 [Hovanessian et al., *EMBO* 6: 1273-1280 (1987)]에서는 인터페론-처리된 인간 세포가 40 (OAS1), 46 (OAS1), 69 및 100 kD의 단백질들에 상응하는 여러 OAS를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Marie et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:580-587 (1989)]에서는 69-kD OAS인 p69에 대해 고도로 특이적인 폴리클로날 항체를 생성시켰다. 문헌 [Marie and Hovanessian, *J. Biol. Chem.* 267: 9933-9939 (1992)]에서는 항-p69 항체로 인터페론-처리된 인간 세포 발현 라이브러리를 스크리닝함으로써 부분 OAS2 cDNA를 단리하였다. 이들은 부분 cDNA로 추가의 라이브러리를 스크리닝하여, 두 가지 OAS2 이소형을 코딩하는 cDNA를 회수하였다. 더 작은 이소형은 3-프라임 비번역 영역의 길이가 다른 두 mRNA에 의해 코딩된다.

[0003] 노던 블롯 분석에 의해, OAS2가 인간 세포에서 네 가지 인터페론-유도된 mRNA로서 발현되는 것으로 밝혀졌다. 예상된 OAS2 단백질은 공통의 683-아미노산 서열 및 상이한 3-프라임 말단을 갖는다. 시험관내 전사/번역 생성물의 SDS-PAGE에 따르면, 두 이소형은 69 및 71 kD의 분자 질량을 갖는다. 두 이소형은 시험관내에서 OAS 활성을 나타냈다. 서열 분석 결과, OAS2는 프롤린-풍부한 주위의 링커 영역에 의해 분리된 두 OAS1-상동성 도메인을 함유하는 것으로 나타났다. N- 및 C-말단 도메인은 OAS1과의 동일성이 각각 41% 및 53%이다.

[0004] 문헌 [Hovanian et al., *Genomics* 52: 267-277 (1998)]에서는, 형광 제자리 혼성화 및 맵핑된 클론 내의 혼입에 의해, OAS1, OAS2 및 OAS3 유전자가 12q24.2 상의 130-kb 영역과 클러스터링되는 것으로 결정되었다. 2-5A는 RNase I과 결합하여 이를 활성화함으로써 바이러스 및 세포 RNA를 분해하여, 세포 단백질 합성을 억제하고 바이러스 복제를 손상시킨다.

[0005] OASL로서 지칭되는 네 번째 인간 OAS 유전자는 OASL이 효소 활성이 결여되어 있다는 점에서 OAS1, OAS2 및 OAS3과 상이하다. OASL 유전자는 유비퀴틴의 직렬 반복부에 대해 상동성인 164 아미노산 C-말단 도메인에 융합된 OAS 단위로 구성된 2-도메인 단백질을 코딩한다 (문헌 [Eskildsen et al., *Nuc. Acids Res.* 31:3166-3173, 2003]; [Kakuta et al., *J. Interferon & Cytokine Res.* 22:981-993, 2002]).

[0006] 당업계에서는 바이러스 복제 및 바이러스 감염을 억제하는데 있어서의 역할로 인해, HCV 복제를 억제하는 억제제-기재의 요법의 상당한 요구를 비롯하여, OAS1 활성과 관련된 바이러스 복제를 억제하는 방법 및 조성물이 필요한 실정이다.

[0007] <발명의 요약>

[0008] 본 발명은 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자에서의 돌연변이를 특징으로 할 수 있는 C형 간염 저항성-관련 돌연변이를 검출하는 것에 관한 것이다.

[0009] 한 실시양태에서, 유전자 스크리닝 방법이 고려된다. 이 방법은, 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 (OAS1) 형태 (비제한적으로, 서열 1 포함)에 대하여 위치 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 및 335 중 하나 이상에서의 아미노산 변형을 야기하는 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자 돌연변이의 존재에 대하여 인간 또는 비-인간 영장류로부터 단리된 핵산 샘플을 분석하는 것을 포함한다.

[0010] 추가 실시양태에서, 유전자 스크리닝 방법이 고려된다. 이 방법은, 진뱅크(Genbank) 서열 등록 번호 NP_002525.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 3 포함)에 대하여 위치 363에서의 아미노산 변형을 야기하는 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자 돌연변이의 존재에 대하여 인간 또는 비-인간 영장류로부터 단리된 핵산 샘플을 분석하는 것을 포함한다.

[0011] 또다른 추가 실시양태에서, 유전자 스크리닝 방법이 고려된다. 이 방법은, 진뱅크 서열 등록 번호 NP_058132.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 2 포함)에 대하여 아미노산 위치 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 또는 394 중 하나 이상에서의 아미노산 변형을 야기하는 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자 돌연변이의 존재에 대하여 인간 또는 비-인간 영장류로부터 단리된 핵산 샘플을 분석하는 것을 포함한다.

[0012] 또다른 추가 실시양태에서, 유전자 스크리닝 방법이 고려된다. 이 방법은, 진뱅크 서열 등록 번호

NP_001027581.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 4 포함)에 대하여 아미노산 위치 347, 361, 364, 372, 384, 385 또는 399 중 하나 이상에서의 아미노산 변형을 야기하는 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자 돌연변이의 존재에 대하여 인간 또는 비-인간 영장류로부터 분리된 핵산 샘플을 분석하는 것을 포함한다.

[0013] 추가 실시양태에서, 본 발명은 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 (OAS1) 형태 (비제한적으로, 서열 1 포함)에 대하여 위치 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 및 335에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 단백질, 및 바이러스 감염, 바람직하게는 플라비바이러스 감염, 가장 바람직하게는 C형 간염 감염에 대한 저항성의 진단제를 제조하기 위한 상기 단백질의 용도를 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 진단제는 항체이다.

[0014] 추가 실시양태에서, 본 발명은 진뱅크 서열 등록 번호 NP_002525.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 3 포함)에 대하여 위치 363에서의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질, 및 바이러스 감염, 바람직하게는 플라비바이러스 감염, 가장 바람직하게는 C형 간염 감염에 대한 저항성의 진단제를 제조하기 위한 상기 단백질의 용도를 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 진단제는 항체이다.

[0015] 추가 실시양태에서, 본 발명은 진뱅크 서열 등록 번호 NP_058132.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 2 포함)에 대하여 위치 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 및 394에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질, 및 바이러스 감염, 바람직하게는 플라비바이러스 감염, 가장 바람직하게는 C형 간염 감염에 대한 저항성의 진단제를 제조하기 위한 상기 단백질의 용도를 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 진단제는 항체이다.

[0016] 또다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 진뱅크 서열 등록 번호 NP_001027581.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 모든 올리고아데닐레이트 신테타제 1 형태 (비제한적으로, 서열 4 포함)에 대하여 위치 347, 361, 364, 372, 384, 385 또는 399에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질, 및 바이러스 감염, 바람직하게는 플라비바이러스 감염, 가장 바람직하게는 C형 간염 감염에 대한 저항성의 진단제를 제조하기 위한 상기 단백질의 용도를 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 진단제는 항체이다.

[0017] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 단백질인, 바이러스, 바람직하게는 플라비바이러스, 가장 바람직하게는 C형 간염 바이러스에 의한 감염을 예방 또는 억제하기 위한 치료 화합물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 치료 화합물은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA이다.

[0018] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 개시된 아미노산 변형을 갖는 본 발명의 OAS1에 의해 코딩된 단백질인, 바이러스, 바람직하게는 플라비바이러스, 가장 바람직하게는 C형 간염 바이러스에 의한 감염을 예방 또는 억제하기 위한 치료 화합물을 제공한다.

[0019] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 돌연변이의 유리한 효과를 모방하는, 바이러스, 바람직하게는 플라비바이러스, 가장 바람직하게는 C형 간염 바이러스에 의한 감염을 예방 또는 억제하기 위한 치료 화합물을 제공한다. 치료 화합물은 소분자, 단백질, 펩티드, DNA 또는 RNA 분자, 또는 항체일 수 있다.

[0020] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 OAS1 유전자에 의해 코딩된 단백질인, 암, 바람직하게는 전립선암을 예방 또는 치료하기 위한 치료 화합물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 치료 화합물은 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA이다.

[0021] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질인, 암, 바람직하게는 전립선암을 예방 또는 치료하기 위한 치료 화합물을 제공한다.

[0022] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 돌연변이의 유리한 효과를 모방하는, 암, 바람직하게는 전립선암을 예방 또는 치료하기 위한 치료 화합물을 제공한다. 치료 화합물은 소분자, 단백질, 펩티드, DNA 또는 RNA 분자, 또는 항체일 수 있다.

[0023] 추가 실시양태에서, 치료 화합물은 OAS1 또는 하나 이상의 하위-영역의 활성 또는 전체 단백질의 하위-기능을 억제할 수 있으며, 이러한 화합물의 대표적인 것으로는 안티센스 분자, 리보자임 (ribozyme), 및 OAS1 폴리뉴클

레오티드에 특이적으로 결합할 수 있는 RNAi 분자, 및 OAS1 단백질 및 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이의 단편이 있다.

- [0024] 다른 실시양태에서, 본 발명은 OAS1 억제제를 제공한다. 본 발명의 억제제에는 안티센스 분자, 리보자임, RNAi, 항체 또는 항체 단편, 단백질 또는 폴리펩티드, 및 소분자가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 안티센스 분자는 본 발명의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 엄격한 조건하에 이와 혼성화되는 폴리뉴클레오티드 중 10, 15 또는 20개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0025] 또다른 실시양태에서, OAS1의 억제제는 본 발명의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 폴리펩티드로 정의된 단백질의 영역에 특이적으로 결합하는 것으로 한다. 본 발명의 억제제에는 항체, 항체 단편, 소분자, 단백질 또는 폴리펩티드가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 또다른 실시양태에서, OAS1의 억제제는 본 발명의 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는 OAS1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하거나 이와 혼성화되는 안티센스 또는 RNAi 분자를 포함하는 것으로 한다.
- [0027] 추가 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체 내에 1종 이상의 OAS1 억제제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0028] 추가 실시양태는 OAS1 유전자 발현 또는 생물학적 활성을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0029] 추가 실시양태는 본 발명에 개시된 하나 이상의 돌연변이를 갖는 OAS1 유전자의 특정 형태의 발현을 특이적으로 증가 또는 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0031] 본 발명은 포스포로티오에이트 연결을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 추가로 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 하나 이상의 변형된 당 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 추가로 제공한다.
- [0033] 본 발명은 또한 2'-O-메틸 당 잔기인 하나 이상의 변형된 당 잔기를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0034] 본 발명은 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 추가로 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 5-메틸시토신인 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 추가로 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 키메라 올리고뉴클레오티드인 안티센스 화합물을 제공한다.
- [0037] 본 발명은 생체내에서 인간 세포 또는 조직을, 인간 OAS1을 코딩하는 핵산 분자로 표적화된 뉴클레오티드 8개 내지 35개 길이의 리보자임 또는 안티센스 화합물과 접촉시켜 인간 OAS1의 발현을 억제하는 것을 포함하는, 인간 세포 또는 조직에서 인간 OAS1의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 생체내에서 안티센스 또는 RNAi 화합물 또는 리보자임을 사용하여 본 발명에 따른 위치에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것으로 정의되는 특정 형태의 OAS1의 발현을 감소 또는 증가시키는 방법을 추가로 제공한다.
- [0039] 본 발명은 생체내에서 암 세포를, 인간 OAS1을 코딩하는 핵산 분자로 표적화된 뉴클레오티드 8개 내지 35개 길이의 리보자임 또는 안티센스 화합물과 접촉시켜 인간 OAS1의 발현을 억제하는 것을 포함하는, 암 세포의 성장을 조절하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 OAS1 폴리뉴클레오티드의 표적 영역을 확인하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 제자리 혼성화에 의해 OAS1 폴리뉴클레오티드를 확인하기 위한 표지된 프로브를 제공한다.
- [0041] 본 발명은 HCV 감염을 예방 또는 억제하기 위한 의학의 제조에 있어서 본 발명에 따른 OAS1 억제제의 용도를 제공한다.
- [0042] 본 발명은 OAS1 억제제를 OAS1 단백질의 특정 영역 또는 상기 단백질의 특정 기능으로 지정하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오티드를 생리학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와의 혼합물로서 포함하는, OAS1의 발현을 억제하기 위한 제약 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 OAS1 RNA를 특이적으로 절단할 수 있는 리보자임, 및 상기 리보자임을 포함하는 제약 조성물을 추가

로 제공한다.

- [0045] 또한, 본 발명은 OAS1의 활성을 감소시킬 수 있거나 또는 OAS1 mRNA의 발현을 감소 또는 예방할 수 있는, OAS1의 소분자 억제제를 제공한다.
- [0046] 본 발명은 C형 간염 바이러스 NS5A 단백질과 같은 다른 단백질과의 상호작용을 비롯하여, 2'-5' 올리고아데닐레이트의 합성 이외의 특정 단백질 기능을 변경시키는 OAS1 억제제를 추가로 제공한다.
- [0047] 본 발명은 글리코실화 및 인산화를 포함하나, 이에 제한되지 않는 OAS1의 번역-후 변형을 변화시키는 화합물을 추가로 제공한다.
- [0048] 본 발명은 (a) 증폭 조건하에 본 발명에 따른 OAS1 유전자의 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 인간 게놈 DNA의 영역을 증폭시키기 위한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 프라이머 쌍으로 인간으로부터의 게놈 DNA 샘플을 처리하여, 상기 영역을 함유하는 증폭 생성물을 제조하는 단계; 및 (b) 단계 (a)의 증폭 생성물 중에서 본 발명의 뉴클레오타이드 위치에서의 뉴클레오타이드 돌연변이의 존재를 검출함으로써 상기 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, 올리고아데닐레이트 신테타제 유전자 돌연변이를 확인하기 위한 인간 유전자 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0049] 또한, 본 발명은 (a) PCR 완충액 중에서 인간으로부터의 게놈 DNA 샘플을 올리고아데닐레이트 신테타제 유전자-특이적 PCR 프라이머 쌍과 조합하여 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 혼합물을 형성하는 단계; (b) 상기 PCR 혼합물을 다수회의 PCR 열주기로 처리하여 올리고아데닐레이트 신테타제 유전자 증폭 생성물을 제조하는 단계; 및 (c) 혼성화 조건하에 단계 (b)에서 제조된 생성물을, 상기 돌연변이를 검출할 수 있는 프로브로 처리하는 단계를 포함하는, 올리고아데닐레이트 신테타제 유전자 (OAS1)의 유전자에 의해 코딩된 OAS1 단백질 내 본 발명의 아미노산 변형에 상응하는 뉴클레오타이드 위치에서 야생형 뉴클레오타이드를 비야생형 뉴클레오타이드로 치환하는 것을 포함하는 돌연변이를 함유하는 인간 C형 간염 감염 저항성 질환 대립유전자를 인간에서 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0050] 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 작은 억제성 RNA (RNAi), 단백질, 폴리펩티드, 항체 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 단리된 OAS1 억제제를 제공한다. 단리된 억제제는 본 발명의 아미노산 치환과 관련된 OAS1 유전자 돌연변이에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 15개 이상의 연속적인 핵산을 포함하는 안티센스 분자 또는 그의 상보체일 수 있다.
- [0051] 단리된 OAS1 억제제는 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, 제약상 허용되는 담체 중에 치료 유효량의 1종 이상의 OAS1 억제제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0052] 또한, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 단백질, RNAi, 폴리펩티드, 항체 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택된 OAS1 억제제를 포유동물 세포에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 세포에서 OAS1의 발현을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0053] 추가로, 본 발명은 OAS1 유전자 유래의 선택된 표적 핵산 서열의 전부 또는 일부와 특이적으로 혼성화하는데 효과적인 소정량의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제약상 효과적인 비히클 중에 넣어 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 OAS1 유전자의 발현을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 또한, 본 발명은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, RNAi, 단백질, 폴리펩티드, 항체 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되며 플라비바이러스에 의한 감염을 예방하는 OAS1 억제제를 감염에 민감한 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 대상체에서 플라비바이러스에 의한 감염을 예방하는 방법에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0060] 본 발명은 올리고아데닐레이트 신테타제 1 유전자에 있어서의 신규한 돌연변이, 바이러스 감염에 대한 감수성 또는 저항성의 진단을 위한 이들 돌연변이의 용도, 본 발명에 따른 돌연변이를 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 및 단백질, 항체 및 관련 핵산을 사용한 바이러스 감염의 예방 또는 억제에 관한 것이다. 이들 돌연변이는 플라비바이러스, 특히 C형 간염 바이러스로의 감염에 대한 보균자의 저항성과 관련되어 있다.
- [0061] 최근의 많은 의학 연구는 질환을 야기하거나 질환에 기여하는 돌연변이 및 결함을 확인하는데 집중되어 있다. 이러한 연구는 질환 상태를 목표로 한 치료 화합물 및 방법을 초래하도록 설계된다. 감염성 작용제 및 다른 위험 인자에 대한 노출에도 불구하고 사람들을 건강하게 유지하도록 하는 유전적 영향을 연구하는데는 주의가 덜 기울여져 왔다. 본 발명은 질환에 대한 저항성을 부여하는 유전적 변이 또는 돌연변이를 발견하기 위해 인간 대상체의 특정 개체군을 확인하고 분석한 본 발명자들에 의해 개발된 방법의 성공적인 적용을 제시한다. 특정

질환 또는 생물학적 상태에 대한 자연적 저항성을 갖는 하위-개체군 부분의 확인은 또한 제약상 중재, 진단적 평가, 또는 예방적 백신화와 같은 예방에 대한 적합한 표적인 유전자 및 단백질의 확인을 가능하게 한다.

[0062] 본원에서 확인된 하위-개체군 부분은 공개류종인 출원 일련번호 제10/972,135호에서 앞서 확인 및 개시되었으며, 여기에는 코호트(cohort)가 감염된 반면 (혈청반응 양성), C형 간염 바이러스 (HCV)에의 반복된 노출에도 불구하고 혈청반응 음성으로 남아있는 개체가 포함된다. 연구된 개체군은 반복된 수혈을 받는 혈우병 환자 및 공유된 주사기 바늘 및 다른 위험 인자를 통해 노출된 정맥 약물 사용자를 포함한다.

[0063] 본 개시물은 실시예 1에 기술된 비-인간 영장류의 OAS1 유전자에서 확인된 돌연변이를 제공한다.

[0064] 출원 일련번호 제10/972,135호에서는 HCV 감염; 정의; 발명의 수행 방식; 폴리뉴클레오타이드 분석; 폴리뉴클레오타이드 프라이머의 제조; 폴리머라제 연쇄 반응; 핵산 서열 분석; 막-고정 표적 서열의 검출; 염기 치환 검출용 스캐닝 기술; OAS1 기능 복구 및/또는 증진용 치료제; OAS1 기능 억제용 치료제; 리보자임; RNAi; 단백질 및 폴리펩티드; 소분자; OAS1 억제제 효능의 평가 방법; 및 제약 조성물과 관련된 개시물을 제공한다. 출원 일련번호 제10/972,135호는 이의 전문이 그 거명을 통해 본원에 포함되어 있다.

[0065] 본 발명의 폴리펩티드는 이의 천연 기능의 일부로서 세포막을 가로질러 전달되고 전달 벡터 또는 발현 비히클의 부재하에 이들의 항바이러스 효과를 중재할 수 있다. 염기성의 양(+)으로 하전된 단백질의 세포 전달 특징은 이전에 기술되었고, 당업자에게 널리 공지되어 있다 (문헌 [Ryser and Hancock, Science, 1965 Oct 22;150(695):501-3]).

[0066] 폴리펩티드가 액체 제제로서 제조되어 주사로 투여되는 경우, 바람직하게는 용액은 140 mM 염화나트륨 및 10 mM 칼슘을 함유하는 pH 7.4의 등장성 염 용액이다. 주사액은 투여 경로, 환자의 건강 등을 고려하여, 예를 들어 치료적 유효량으로, 바람직하게는 1일 약 1 µg/체중kg 내지 약 5 mg/체중kg의 투여량으로 투여될 수 있다.

[0067] 본 발명의 폴리펩티드(들)은 적합한 제약 담체와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 치료 유효량의 단백질, 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체에는 염수, 완충화된 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합물이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제제는 투여 방식에 적합해야 한다.

[0068] 또한, 본 발명의 폴리펩티드(들)은 폴리펩티드를 하나 이상의 잔기 또는 접합물과 화학적으로 결합시킴으로써 변형되어, 폴리펩티드(들)의 활성, 세포 분포, 또는 세포 흡수를 증진시킬 수 있다. 이러한 잔기 또는 접합물에는 지질 (예를 들어, 콜레스테롤, 콜산, 티오에테르, 지방족쇄, 인지질 및 이들의 유도체), 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 팔미틸 잔기 및, 예를 들어 미국 특허 제5,514,758호, 동 제5,565,552호, 동 제5,567,810호, 동 제5,574,142호, 동 제5,585,481호, 동 제5,587,371호, 동 제5,597,696호 및 동 제5,958,773호에 개시된 바와 같은 다른 것이 포함된다.

[0069] 또한, 본 발명의 폴리펩티드(들)은 변형되어 특정 질환 징후에 대해 특이적인 세포 유형을 표적화할 수 있다 (예를 들어, C형 간염 감염의 경우에는 간 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않음). 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 기재된 표적화 목표를 달성하는 적합한 방법이 기재되어 있으며, 여기에는 리포솜 표적화, 수용체-매개의 내포작용 (endocytosis) 및 항체-항원 결합이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 아시알로당단백질 수용체를 사용하여 폴리펩티드(들)에 갈락토스 부위를 부가함으로써 간 세포를 표적화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 대식세포 및 간 세포에서 발견되는 만노스 수용체를 표적화하기 위하여, 만노스 부위를 폴리펩티드(들)에 접합시킬 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 다중 전달 및 표적화 방법을 조합할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드(들)은 리포솜 내에 캡슐화됨으로써 간 세포로 표적화될 수 있고, 이러한 리포솜은 아시알로당단백질 수용체로의 표적화를 위해 갈락토스에 접합될 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물의 하나 이상의 성분으로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 제약 팩 또는 키트를 제공한다. 제약학적 또는 생물학적 제품의 제조, 용도 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지가 이러한 용기(들)과 연관되어 있고, 상기 통지는 인간 투여를 위한 제조, 용도 또는 판매에 대한 기관에 의한 승인을 반영한다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 다른 치료적 화합물과 함께 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 폴리펩티드(들)을 약제로서 사용하는 경우, 이들은 적합한 비히클 내에서 포유동물에게 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 상기 기재된 바와 같은 약제로서 사용하는 경우, 이들은 투여 경로, 환자의 건강 등을 고려하여, 예를 들어 1일 약 10 µg/체중kg 내지 약 10 mg/체중kg의 치료적 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 투여량은 바이러스, 바람직하게는 플라비바이러스, 가장 바람직하게는 RSV 및 HCV에 의한 감염의 예방 또

는 억제, 암, 염증, 당뇨병 또는 다른 질환의 예방 또는 치료를 달성하기에 적당한 것이 바람직하다.

[0072] 단백질, 그의 단편 또는 다른 유도체, 또는 그의 상동체, 또는 이들을 발현하는 세포는 이에 대한 항체를 생산하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 상기 항체는, 예를 들어 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 단일 쇄, Fab 단편, 또는 Fab 발현 라이브러리의 산물일 수 있다. 폴리클로날 항체의 생산에 대하여 당업계에 공지된 다양한 절차를 이용할 수 있다.

[0073] 본 발명의 폴리펩티드(들)에 대해 생성된 항체는 폴리펩티드를 동물에 직접 주사함으로써 또는 폴리펩티드를 동물, 바람직하게는 비인간에 투여함으로써 획득할 수 있다. 이어서, 이렇게 획득된 항체는 폴리펩티드 자체에 결합할 것이다. 이러한 방식으로, 폴리펩티드의 오직 한 단편만을 코딩하는 서열조차 전체 천연 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 더욱이, 다수의 폴리펩티드에 특이적인 이러한 항체의 패널이 사용될 수 있다.

[0074] 모노클로날 항체의 제조를 위해, 연속 세포주 배양에 의해 생산되는 항체를 제공하는 어떠한 기술도 사용할 수 있다. 이러한 예에는 하이브리도마 기술 (문헌 [Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-597]), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (문헌 [Kozbor, et al., 1983, *Immunology Today* 4:72]), 및 인간 모노클로날 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술 (문헌 [Coe, et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96])이 포함된다.

[0075] 단일 쇄 항체의 생산을 위해 기재된 기술 (미국 특허 제4,946,778호)을 개조하여 본 발명의 면역원성 폴리펩티드 산물에 대한 단일 쇄 항체를 생산할 수 있다.

[0076] 상기 항체는, 예를 들어 이들 단백질을 영상화하고, 적절한 생리학적 샘플에서의 수준을 측정하는 등의 목적을 위해, 본 발명의 단백질 서열의 국소화 및 활성화에 관한 방법에 사용될 수 있다.

[0077] 본 발명은 1 내지 34개의 아미노산에 의해 도 1-5의 폴리펩티드와 다른 폴리펩티드를 제공하며, 이러한 차이에는 치환, 삽입, 결실, 변형된 아미노산 또는 아미노산 유도체의 혼입, 및 상기 폴리펩티드의 C-말단 또는 N-말단으로부터의 아미노산의 부가 또는 결실이 포함된다. 본 발명은 바이러스 감염, 신생물, 암, 당뇨병의 치료, 및 세포 성장 및 분화 및 조직 재생 증진 등을 비롯한, 이들 폴리펩티드의 치료적 및 예방적 용도를 제공한다. 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 폴리펩티드 제조에서의 용도, 유전자 요법으로서의 용도, 진단 도구로서의 용도 등을 비롯한 상기 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공한다.

[0078] 제약 조성물

[0079] 본 발명은 치료적 적용을 위한 활성 성분으로서의 폴리펩티드의 제약 조성물을 제공한다. 이들 조성물은 또한 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 일반적으로, 포유동물 또는 대상체에서의 바이러스 감염, 암, 신생물, 염증 또는 다른 질환을 억제하기 위한 제약 조성물에는 상기 기술한 바와 같이 본 발명의 시행에 필요한 유효량의 하나 이상의 폴리펩티드, 또는 이와 동일한 효과를 가짐이 입증된 그의 단편, 및 제약적 및 생리적으로 허용되는 담체 또는 희석제가 포함된다. 본 발명에 따라, 제약 조성물은 도 1-5의 2종 이상의 폴리펩티드가 조합되어 구성될 수 있다. 상기 제약 조성물은 또한 인접한 분자 내에 도 1-5의 하나 이상의 변형을 함유하는 단일 폴리펩티드로 구성될 수 있다.

[0080] 상기 조성물은 경구, 피하, 또는 비경구, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 근육내, 복강내, 비내 및 경막내로 투여되거나, 필요에 따른 주입 기술에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 제약상 허용되는 담체, 희석제, 보조제 및 비히클, 및 이식용 담체는 본 발명의 활성 성분들과 반응하지 않는 불활성의 무독성 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 양이온성 지질도 상기 조성물에 포함되어 폴리펩티드 흡수를 촉진할 수 있다. 화합물의 이식물도 유용하다. 일반적으로, 상기 제약 조성물은 멸균 상태이다.

[0081] 본 발명은 형광물, 화학적 발광물 또는 방사선험성 분자와 같은 검출가능한 표지에 부착된 폴리펩티드의 조성물에 관한 것이다.

[0082] 다른 예는 공지된 물질을 사용하여 공지된 기술에 의해 제제화될 수 있는 제약 조성물이다 (이 거명을 통해 본원에 포함되어 있는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pp. 1435-1712] 참조). 일반적으로, 상기 제제는 투여, 안정성, 제조 관계 및 다른 인자와 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 도 1-5의 폴리펩티드는 주사 또는 흡입을 통한 폐 투여에 의해 투여될 수 있다. 또한, 장용성 투여 형태가 유용할 수 있으며, 따라서 경구 투여가 효과적일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 전달을 위해 리포솜 또는 다른 미세담체로 삽입될 수 있고, 지속 방출을 위해 겔 또는 다른 조

성물로 제제화될 수 있다. 바람직한 조성물은 상기 조성물이 사용되는 용도에 따라 달라지지만, 일반적으로 본 발명의 폴리펩티드의 경우에 바람직한 제약 조성물은 피하 주사 또는 흡입을 통한 폐 투여용으로 제조된 것들이다 (각 투여형에 대한 특정 제제는 구체적인 폴리펩티드의 성질에 따라 달라짐).

- [0083] 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 접합물의 치료 제제는 전형적으로 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물로 투여된다. 상기 제약 조성물은 당업자에게 공지된 방식으로 제조되어 저장하기에 충분히 안정하고, 인간 또는 포유동물에게 투여하기에 적합한 폴리펩티드 약제를 생성한다.
- [0084] 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 접합물은 "그 자체로" 및/또는 이의 염 형태로 사용될 수 있다. 적합한 염에는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 (예컨대, 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘)과의 염, 및 예를 들어 아연 염이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이들 염 또는 복합체는 결정질 및/또는 무정형 구조로서 존재할 수 있다.
- [0085] "제약상 허용되는"은 투여된 환자에서 사용되는 투여량 및 농도에서 임의의 부적당한 효과를 야기하지 않는 담체 또는 부형제를 의미한다. 상기 제약상 허용되는 담체 및 부형제는 당업계에 널리 공지되어 있다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990)]; [Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000)]; 및 [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조).
- [0086] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 리바비린 및 인터페론 α 를 조합하여 사용할 때 HCV 감염에 대해 효과적인 치료가 될 수 있는 것으로 나타났다. 조합시 이들의 효능은 약물 생성물을 단독으로 사용할 때의 효능을 초과하였다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 인터페론, 리바비린 및/또는 바이러스 표적 (바이러스 프로테아제, 바이러스 폴리머라제, 바이러스 복제 복합체의 어셈블리) 및 숙주 표적 (바이러스 가공에 필요한 숙주 프로테아제, NS5A와 같은 바이러스 표적의 인산화에 필요한 숙주 키나제, 및 바이러스 IRES를 효율적으로 사용하는데 필요한 숙주 인자의 억제제) 둘 다에 대해 개발된 다양한 소분자와 조합하여 투여될 수 있다. 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-12, IL-23, IL-27, 또는 IFN- γ 가 공투여될 수 있다. 이들 제제는 동일한 제약 조성물의 일부로서 포함될 수 있거나, 또는 본 발명의 폴리펩티드 또는 접합물과 별개로, 다른 치료 일정에 따라 투여되거나 동시에 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드, 폴리펩티드 접합물 또는 조성물은 다른 요법의 보조제로서 사용될 수 있다.
- [0087] 본 발명의 목적을 위해, "환자"에는 인간 및 다른 포유동물이 포함된다. 따라서, 상기 방법은 인간 요법 및 수의학적 적용에 사용된다.
- [0088] 본 발명의 폴리펩티드 또는 접합물을 포함하는 제약 조성물은 다양한 형태, 예를 들어 액체, 겔, 동결건조된 고체 또는 압축된 고체로서 제제화될 수 있다. 바람직한 형태는 치료될 특정 증상에 따라 달라질 것이고, 당업자에게는 명확할 것이다.
- [0089] 본 발명의 제제의 투여는 다양한 방식, 예를 들어 경구 피하, 정맥내, 뇌내, 비내, 경피, 복막내, 근육내, 폐내, 경막내, 질내, 직장내, 안구내 또는 임의의 다른 허용되는 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제제는 주입에 의해 연속적으로 투여될 수 있지만, 당업계에 널리 공지된 기술, 예컨대 펌프 (예를 들어, 피하 삼투압 펌프) 또는 이식을 사용하여 볼루스 주사가 허용된다. 일부 예에서, 상기 제제는 용액제 또는 분무제로서 직접 적용될 수 있다.
- [0090] 제약 조성물의 예에는 비경구 투여용으로 고안된 용액제가 있다. 많은 경우에서, 제약적 용액 제제는 즉시 사용하기에 적절한 액체 형태로 제공되지만, 이러한 비경구 제제는 또한 냉동 또는 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 전자의 경우에, 상기 조성물은 사용하기 전에 용해되어야 한다. 당업자가 인지하고 있는 바와 같이, 동결건조된 제제가 일반적으로 이들의 액체 상태보다 안정하고, 후자의 형태는 종종 보다 광범위한 저장 조건하에 상기 조성물 내에 함유되는 활성 화합물의 안정성을 증진시키는데 사용된다. 상기 동결건조된 제제는 사용하기 전에 1종 이상의 적합한 제약상 허용되는 희석제, 예컨대 주사용 멸균수 또는 멸균 생리학적 식염수를 첨가함으로써 재구성된다.
- [0091] 비경구 제제는 저장을 위해, 목적하는 순도를 갖는 폴리펩티드를 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 당업계에 전형적으로 사용되는 안정화제 (이들 모두 "부형제"라 명명함), 예를 들어 완충제, 안정화제, 보존제, 등장화제, 비-이온성 세제, 항산화제 및/또는 다른 기타 첨가제와 적절하게 혼합함으로써 동결건조된 제제 또는 수용액으로서 제조될 수 있다.

- [0092] 완충제는 생리학적 조건과 가까워지는 범위 내의 pH를 유지하도록 돕는다. 이들은 전형적으로 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 적합한 완충제에는 유기산 및 무기산, 및 이의 염, 예컨대 시트레이트 완충제 (예를 들어, 일시트르산나트륨-이시트르산나트륨 혼합물, 시트르산-삼시트르산나트륨 혼합물, 시트르산-일시트르산나트륨 혼합물 등), 숙시네이트 완충제 (예를 들어, 숙신산-일나트륨 숙시네이트 혼합물, 숙신산-수산화나트륨 혼합물, 숙신산-이나트륨 숙시네이트 혼합물 등), 타르트레이트 완충제 (예를 들어, 타르타르산-타르트산나트륨 혼합물, 타르타르산-칼륨 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 등), 푸마레이트 완충제 (예를 들어, 푸마르산-일나트륨 푸마레이트 혼합물, 푸마르산-이나트륨 푸마레이트 혼합물, 일나트륨 푸마레이트-이나트륨 푸마레이트 혼합물 등), 글루코네이트 완충제 (예를 들어, 글루콘산-글리콘산나트륨 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-글루콘산칼륨 혼합물 등), 옥살레이트 완충제 (예를 들어, 옥살산-옥살산나트륨 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-칼륨 옥살레이트 혼합물 등), 락테이트 완충제 (예를 들어, 락트산-락트산나트륨 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-칼륨 락테이트 혼합물 등) 및 아세테이트 완충제 (예를 들어, 아세트산-아세트산나트륨 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 등)가 포함된다. 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제 및 트리메틸아민염, 예컨대 트리스도 가능하다.
- [0093] 미생물 증식을 억제하기 위하여 보존제를 첨가하며, 전형적으로 약 0.2%-1% (w/v)의 양으로 첨가한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 보존제에는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레솔, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 벤즈알코늄 클로라이드, 브로마이드 또는 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤 (예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤), 카테콜, 레소르시놀, 시클로헥산을 및 3-펜탄올이 포함된다.
- [0094] 등장화제는 액체 조성물의 등장성을 위해 첨가하며, 여기에는 폴리히드릭 당 알코올, 바람직하게는 트리히드릭 또는 그 이상의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨이 포함된다. 폴리히드릭 알코올은 다른 성분의 상대적인 양을 고려하여 0.1 중량% 및 25 중량%, 전형적으로 1 중량% 내지 5 중량%의 양으로 존재할 수 있다.
- [0095] 안정화제는 기능적으로 치료제를 용해시키거나 변성 또는 용기 벽에의 부착을 예방하도록 돕는 벌크화제에서 첨가제 범위의 광범위한 부형제를 지칭한다. 전형적인 안정화제는 폴리히드릭 당 알코올 (상기 열거됨); 아미노산 (예컨대, 아르기닌, 리신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오미틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등), 유기 당 또는 당 알코올 (예컨대, 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 리비톨, 미오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등, 및 시클리톨 (예컨대, 이노시톨)); 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황-함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 나트륨 티오술페이트; 저분자량의 폴리펩티드 (즉, 10개 미만의 잔기); 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 당당류, 예컨대 크실로스, 만노스, 프럭토스 및 글루코스; 이당류, 예컨대 락토스, 말토스 및 수크로스; 삼당류, 예컨대 라피노스, 및 다당류, 예컨대 텍스트란일 수 있다. 안정화제는 전형적으로 활성 단백질 중량을 기초로 0.1 내지 10,000 중량부의 범위 내에 존재한다.
- [0096] 비-이온성 계면활성제 또는 세제 ("습윤제"로도 공지됨)는 치료제의 용해를 돕고 교반으로 인한 응집에 대해 치료 폴리펩티드를 보호하기 위해 존재할 수 있으며, 또한 폴리펩티드의 변성을 야기하지 않으면서 상기 제제가 전단 표면 스트레스에 노출되도록 한다. 적합한 비-이온성 계면활성제에는 폴리소르베이트 (20, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉(Pluronic)(등록상표) 폴리올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (트윈(Tween)(등록상표) 20, Tween(등록상표) 80 등)가 포함된다.
- [0097] 추가 기타 부형제에는 벌크화제 또는 충전제 (예를 들어, 전분), 킬레이트제 (예를 들어, EDTA), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E) 및 공용매가 포함된다.
- [0098] 활성 성분은 또한, 예를 들어 액적형성 (coascervation) 기술 또는 계면중합화에 의해 제조된 미세캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로오스, 젤라틴 또는 폴리-(메틸메타크릴레이트)미세캡슐, 콜로이드성 약물 전달체 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세소구, 미세에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 거대에멀전 내에 포착될 수 있다. 이러한 기술은 상기 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]에 개시되어 있다.
- [0099] 본 발명의 한 국면에서, 상기 조성물은 액체 조성물, 예컨대 수성 조성물이고, 솔포알킬 에테르 시클로텍스트린 유도체를 포함한다.

- [0100] 생체내 투여에 사용되는 비경구 제제는 멸균상태여야 한다. 이는, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0101] 지속-방출 제제의 적합한 예에는 폴리펩티드 또는 접합물을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스, 적합한 형태, 예컨대 필름 또는 미세캡슐을 갖는 매트릭스가 포함된다. 지속-방출 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드, L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 프로리스 (ProLease)(등록상표) 테크놀로지 또는 루프론 데포(Lupron Depot)(등록상표)(락트산-글리콜산 공중합체 및 루프로리드 아세테이트로 구성된 주사용 미세소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 분자를 장기간, 예컨대 100일 이상 동안 방출시킬 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 보다 짧은 기간 동안 방출시킨다. 캡슐화된 폴리펩티드가 장시간 동안 체내에 남아있을 경우, 이들은 37°C에서 수분에 노출된 결과로 변성되거나 응집되어 생물학적 활성이 감소되거나 면역원성에서의 변화가 일어날 수 있다. 관련된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 티오-디설피드 상호변화를 통해 분자내 S-S 결합이 형성되는 응집 메카니즘을 발견하면, 설피드틸 잔기를 변형시켜 산성 용액으로부터 동결건조하고, 수분 함량을 제어하고 구체적인 중합체 매트릭스 조성물을 발전시켜 안정화를 달성할 수 있다.
- [0102] 펩티드 및 펩티드 접합물의 경구 투여 수행은 본 발명에서 의도한 것이다. 경구 투여에 있어서, 상기 제약 조성물은 고체 또는 액체 형태, 예를 들어 캡슐제, 정제, 현탁액제, 에멀전제 또는 용액제일 수 있다. 제약 조성물은 바람직하게는 제시된 양의 활성 성분을 함유하는 투여 단위 형태로 제조된다. 인간 또는 다른 포유동물의 적합한 1일 투여량은 환자의 상태 및 다른 인자에 따라 광범위하게 다양해질 수 있으나, 당업자는 통상의 방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0103] 경구 투여용 고체 투여 형태에는 캡슐제, 정제, 좌제, 분말제 및 과립제가 포함될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 하나 이상의 불활성 희석제 (예컨대, 수크로스, 락토스), 또는 전분과 혼합될 수 있다. 상기 투여 형태에는 또한 통상의 방식으로 추가 물질 (예를 들어, 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제)이 포함될 수 있다. 캡슐제, 정제 및 알약의 경우에, 상기 투여 형태는 또한 완충제가 포함될 수 있다. 정제 및 알약은 추가로 장용성 코팅물로 제조될 수 있다.
- [0104] 폴리펩티드 또는 접합물은 보조제, 예컨대 락토스, 수크로스, 전분 분말, 알칸산의 셀룰로스 에스테르, 스테아르산, 활석, 스테아르산마그네슘, 산화마그네슘, 인산 및 황산의 나트륨 및 칼슘염, 아카시아, 젤라틴, 알긴산 나트륨, 폴리비닐-피롤리딘, 및/또는 폴리비닐 알코올과 혼합할 수 있고, 통상의 투여를 위해 정제 또는 캡슐화될 수 있다. 별법으로, 이들은 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올, 오일 (예컨대, 옥수수유, 낙화생유, 면실유 또는 참깨유), 트래거캔트 겔, 및/또는 각종 완충제 중에 용해될 수 있다. 다른 보조제 및 투여 방식은 제약업계에 널리 공지되어 있다. 담체 또는 희석제는 시간 지연 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 단독으로, 또는 왁스 또는 당업계에 널리 공지되어 있는 다른 물질과 함께 포함될 수 있다.
- [0105] 제약 조성물은 통상의 제약 작용, 예컨대 안정화에 적용될 수 있고/거나, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 통상의 보조제, 예컨대 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 완충제, 충전제 등을 함유할 수 있다.
- [0106] 경구 투여용 액체 투여 형태에는 제약상 허용되는 에멀전제, 용액제, 현탁액제, 시럽제 및 당업계에 통상적으로 사용된느 불활성 희석제 (예컨대, 물)을 함유하는 엘릭시르가 포함될 수 있다. 상기 조성물은 또한 보조제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제 및 향미제가 포함될 수 있다.
- [0107] 폐 투여에 적합한 제제를 본 발명의 일부로 한다. 제트 또는 초음파 네블라이저와 함께 사용하기에 적합한 제제는 전형적으로 물에 용해되는 폴리펩티드 또는 접합물을, 예를 들어 용액 1 mL 당 약 0.01 내지 25 mg의 접합물, 바람직하게는 약 0.1 내지 10 mg/mL의 농도로 포함할 것이다. 상기 제제는 또한 완충제 및 당당 (예를 들어, 단백질 안정화 및 삼투압 조절을 위해), 및/또는 0.1 내지 10 mg/ml 농도의 인간 혈청 알부민을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 완충제의 예에는 아세트산나트륨, 시트레이트 및 글리신이 있다. 바람직하게는, 완충제는 상기 용액의 pH를 3 내지 9로 조절하기에 적합한 물농도의 조성물을 가질 것이다. 일반적으로, 1 mM 내지 50 mM의 완충제 물농도는 이러한 목적에 적합하다. 사용될 수 있는 당의 예에는 통상적으로 제제의 1 중량% 내지 10 중량% 범위의 락토스, 말토스, 만니톨, 소르비톨, 트레할로스 및 크실로스가 있다.
- [0108] 네블라이저 제제는 또한 에어로졸을 형성하는데 있어서, 용액의 원자화에 의해 야기되는 단백질의 표면 유래

응집을 감소 또는 예방하기 위해 계면활성제를 함유할 수 있다. 각종 통상의 계면활성제, 예컨대 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르를 사용할 수 있다. 양은 일반적으로 상기 제제의 0.001 중량% 내지 4 중량%의 범위일 것이다. 이러한 목적을 위한 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트이다.

[0109] 본 발명의 액체 입자의 적합한 분산을 발생시키는 구체적인 제제 및 방법이 이 거명을 통해 본원에 포함된 WO 94/20069, 미국 특허 제5,915,378호, 동 제5,960,792호, 동 제5,957,124호, 동 제5,934,272호, 동 제5,915,378호, 동 제5,855,564호, 동 제5,826,570호 및 동 제5,522,385호에 기술되어 있다.

[0110] 계측 투여량 흡입 장치용 제제는 일반적으로 미분된 분말을 포함할 것이다. 이러한 분말은 동결건조에 이어 액체 접합물 제제를 분쇄함으로써 제조될 수 있고, 또한 안정화제, 예컨대 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유할 수 있다. 전형적으로, 0.5% (w/w) 초과 HSA를 첨가한다. 또한, 필요할 경우, 1종 이상의 당 또는 당 알코올을 제제에 첨가할 수 있다. 이러한 예에는 락토스, 말토스, 만니톨, 소르비톨, 소르비토스, 트레할로스, 크실리톨 및 크실로스가 포함된다. 제제에 첨가되는 양은 존재하는 접합물의 약 0.01 내지 200% (w/w), 바람직하게는 대략 1 내지 50% 범위일 수 있다. 이어서, 상기 제제를 동결건조하고 원하는 입자크기로 분쇄한다.

[0111] 이어서, 적절한 크기의 입자를 계면활성제의 도움으로 추진제 중에 현탁시킨다. 상기 추진제는 이러한 목적을 위해 사용되는 임의의 통상의 물질, 예컨대 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본, 히드로플루오로카본 또는 히드로카본, 및 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, 또는 그의 조합물일 수 있다. 적합한 계면활성제에는 소르비탄 트리올레에이트 및 대두 레시틴이 포함된다. 올레산은 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다. 이어서, 이러한 혼합물을 전달 장치에 로딩한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 시판되는 계측 투여량 흡입기의 예에는 벤톨린 (Ventolin) (미국, 노쓰캐롤라이나주, 리서치 트라이앵글 파크 소재 글락소 인크 제조) 계측 투여량 흡입기가 있다.

[0112] 분말 흡입용 제제는 미분된 건조 분말 함유 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 접합물을 포함할 것이고, 또한 벌크화제, 예컨대 락토스, 소르비톨, 수크로스, 또는 만니톨을 상기 장치로부터 분말의 분산을 용이하게 하는 양, 예를 들어 상기 제제의 50 중량% 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 상기 분말의 입자는 중간 직경이 10 μm 미만, 바람직하게는 0.5 내지 5 μm , 가장 바람직하게는 1.5 내지 3.5 μm 이고, 폐 내에서 밀도가 약 1 g/cm³인 입자에 상응하는 공기역학 특성을 가질 것이다. 본원의 교시에 따라 사용하기에 적합한 분말 흡입기의 예에는 스핀헤일러 (spinaler) 분말 흡입기 (미국, 매사추세츠주, 베드포드 소재, 피스콘 코포레이션 제조)가 있다. 이들 장치의 분말은 미국 특허 제5,997,848호, 동 제5,993,783호, 동 제5,985,248호, 동 제5,976,574호, 동 제5,922,354호, 동 제5,785,049호 및 동 제5,654,007호에 개시된 방법에 따라 생성되고/거나 전달될 수 있다.

[0113] 치료 생성물의 폐 전달을 위해 고안된 기계 장치에는 모두 당업자에게는 친숙한 네블라이저, 계측 투여량 흡입기 및 분말 흡입기가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실행에 적합한 시판되는 장치의 구체적인 예에는 울트라벤트 (Ultravent) 네블라이저 (미국, 미주리주, 세인트루이스 소재, 말린크로프트 제조); 아코른 (Acorn) II 네블라이저 (미국, 콜로라도주, 앤글우드 소재 마퀘스트 메디칼 프로덕츠 (Marquest Medical Products) 제조); 벤톨린 계측 투여량 흡입기 (미국, 노쓰캐롤라이나주, 리서치 트라이앵글 파크, 글락소 인크 (Glaxo Inc.) 제조); 스핀헤일러 분말 흡입기 (미국, 매사추세츠주, 베드포드소재 피스콘 코포레이션 제조); "스탠딩 클라우드" 장치 (미국, 캘리포니아주, 산 카를로스 소재, 넥타 테라퓨틱스, 인크 (Nektar Therapeutics, Inc.) 제조); AIR 흡입기 (미국, 매사추세츠주, 캠브리지 소재, 알커메스 (Alkermes) 제조); 및 AERx 폐 약물 전달 시스템 (미국, 캘리포니아주, 헤이워드 소재, 아라디움 코포레이션 (Aradigm Corporation))가 있다.

[0114] 본 발명은 또한 폴리펩티드를 포함하는 키트, 접합물, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 세포, 방법, 조성물 및 시스템, 및 본 발명의 장치를 제공한다. 본 발명의 키트는 임의로 (1) 장치, 시스템, 시스템 성분 또는 본원에 기술된 장치 성분; (2) 폴리펩티드 또는 접합물, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 키트 성분; 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 플라스미드 발현 벡터; 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 세포; 또는 임의의 상기 성분 중 하나 이상을 포함하는 조성물; (3) 치료 또는 예방법을 비롯한 본원에 기술된 임의의 방법을 실행하기 위한 지시서, (2) 또는 임의의 상기 성분의 조성물에서 확인된 임의의 성분을 사용하기 위한 지시서; 및/또는 본원에 기술된 임의의 장치, 시스템 또는 성분을 작동하기 위한 지시서; (4) 하나 이상의 상기 성분 또는 조성물을 고정시키기 위한 용기, 및 (5) 포장물 중 하나 이상을 포함한다.

[0115] 추가 국면에서, 본 발명은 상기 및 본원에 기술된 임의의 장치, 성분, 조성물 또는 키트의 용도, 본원에 기술된 임의의 방법 또는 분석의 수행 및/또는 본원에 기술된 임의의 분석 또는 방법을 수행하기 위한 임의의 장치, 성

분, 조성물 또는 키트의 용도를 제공한다.

[0116] 화학적 변형, 접합물 및 융합

[0117] 본 발명의 임의의 폴리펩티드는 더 큰 폴리펩티드 서열, 예를 들어 융합 단백질의 일부로서 존재할 수 있고, 예컨대 상기 폴리펩티드의 안정화, 검출 또는 정제를 위한 1종 이상의 도메인 또는 하위서열의 부가에 의해 생겨날 수 있다. 폴리펩티드 정제 하위서열에는, 예를 들어 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, GST 융합, 또는 임의의 다른 검출/정제 서열 또는 당업계에 공지된 "태그"가 포함될 수 있다. 이들 추가 도메인 또는 하위서열은 본 발명의 폴리펩티드 활성화에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 못하거나, 또는 예컨대 프로테아제 처리, 인테인 혼입 등에 의한 합성 후 가공 단계에 의해 제거될 수 있다.

[0118] 본 발명에는, 예를 들어 본원에 기술된 Ig 분자, 예를 들어 인간 IgG Fc ("단편 결정화가 가능한," 또는 단편 상보체 결합) 힌지, CH2 도메인 및 CH3 도메인에 융합된 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질, 및 상기 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 포함된다. Fc는 세포 상 항체 수용체 및 상보체의 C1q 성분에 결합하는 역할을 하는 항체의 일부이다. 이들 융합 단백질 및 이들의 코딩 핵산은 예방적 및/또는 치료적 약물로서, 또는 진단 도구로서 유용하다 (예를 들어, 문헌 [Challita-Eid, P. *et al.* (1998) J. Immunol 160:3419-3426]; 및 [Sturmhoefel, K. *et al.* (1999) Cancer Res 59:4964-4972]) 참조). 본 발명은 또한, 예를 들어 미국 특허 제5,876,969호에 기술된 바와 같은 알부민 분자, 예컨대 인간 혈청 알부민 (HSA)에 융합된 본 발명의 폴리펩티드, 및 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. Ig 및 알부민 융합 단백질은 폴리펩티드 혈청 반감기 및/또는 기능적 생체내 반감기 증가, 폴리펩티드 항원성 감소, 폴리펩티드 저장 안정성 증가, 또는 생체이용률 증가, 예를 들어 AUC_{sc} 증가를 나타낼 수 있고, 따라서 예방적 및/또는 치료적 약물로서 유용할 수 있다.

[0119] 모든 본 발명의 폴리펩티드는 세포막을 가로질러 전달하는 고유의 능력을 가지며, 세포 내 치료적 기능에 영향을 미친다. 그러므로, 본 발명은 세포 투과성 또는 임의의 다른 분자의 전달성을 증진시키기 위한 본 발명의 폴리펩티드의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 다른 분자의 전달성을 증진시키기 위한 본 발명의 폴리펩티드의 임의의 단편 또는 하위단편 (이는 아미노산 약 5개 길이, 아미노산 약 10개 길이, 예컨대 아미노산 약 15개 길이, 예를 들어 아미노산 약 20개 길이, 아미노산 약 25개 길이, 아미노산 약 30개 길이, 예컨대 아미노산 약 35개 길이, 아미노산 약 35 내지 50개 길이, 아미노산 약 50 내지 100개 길이, 예컨대 아미노산 약 100 내지 125개 길이임)의 용도를 제공한다.

[0120] 임의의 본 발명의 폴리펩티드는 또한 1종 이상의 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 변형된 아미노산은, 예를 들어 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 잔기에 접합된 아미노산 또는 유기 유도체화제에 접합된 아미노산일 수 있다. 변형된 아미노산의 존재는, 예를 들어 (a) 폴리펩티드 혈청 반감기 및/또는 기능적 생체내 반감기 증가, (b) 폴리펩티드 항원성 감소, (c) 폴리펩티드 저장 안정성 증가, 또는 (d) 생체이용률 증가, 예를 들어 AUC_{sc} 증가라는 점에서 유리할 수 있다. 아미노산(들)은, 예를 들어 번역시 또는 번역 후에 재조합 제조 (예를 들어, 포유동물 세포내 발현 동안 N-X-S/T 모티프에서의 N-연결된 글리코실화) 동안 변형되거나 합성 수단에 의해 변형된다.

[0121] 용어 "접합물" (또는, 호환적으로 "폴리펩티드 접합물" 또는 "접합된 폴리펩티드")은 1종 이상의 본 발명의 폴리펩티드가 1종 이상의 비-폴리펩티드 잔기에 공유적으로 부착되어 형성되는 불균질 (조성 측면에서) 분자를 나타내는 것으로 한다. 용어 "공유적 부착"은 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 잔기가 서로 공유적으로 직접 결합하거나, 또는 개재 잔기 또는 브리지, 스페이서 또는 연결 잔기와 같은 잔기를 통해 서로 공유적으로 간접 결합한 것을 의미한다. 바람직하게는, 접합된 폴리펩티드는 관련 농도 및 상태에서 가용성이며, 즉 생리적 유액, 예컨대 혈액에 가용성이다. 본 발명의 접합된 폴리펩티드의 예에는 글리코실화된 폴리펩티드 및/또는 PEG화된 폴리펩티드가 포함된다. 용어 "비-접합된 폴리펩티드"는 접합된 폴리펩티드의 폴리펩티드 부분을 지칭하는데 사용될 수 있다.

[0122] 용어 "비-폴리펩티드 잔기"는 폴리펩티드의 부착기에 접합할 수 있는 분자를 의미하는 것으로 한다. 비-폴리펩티드 잔기의 바람직한 예에는 중합체 분자, 당 잔기, 친지성 화합물, 또는 유기 유도체화제, 특히 중합체 분자 또는 당 잔기가 포함된다. 비-폴리펩티드 잔기는 폴리펩티드의 부착기를 통해 폴리펩티드에 연결됨을 이해할 것이다. 폴리펩티드에 부착된 비-폴리펩티드 잔기, 예컨대 중합체 분자(들)의 수를 특별히 나타낸 경우를 제외하고는, 폴리펩티드에 부착된 "비-폴리펩티드 잔기"에 대한 모든 언급 또는 본 발명에서 달리 사용된 경우에는 폴리펩티드에 부착된 1종 이상의 비-폴리펩티드 잔기를 언급하는 것이다.

- [0123] 용어 "중합체 분자"는 2개 이상의 단량체의 공유 연결에 의해 형성된 분자로 정의되며, 여기서 단량체 중 어떤 것도 아미노산 잔기는 아니다. 용어 "중합체"는 용어 "중합체 분자"와 호환적으로 사용될 수 있다.
- [0124] 용어 "당 잔기"는 생체내 또는 시험관내 글리코실화, 예컨대 N- 또는 O-글리코실화에 의해 부착된 탄수화물 분자를 나타내는 것으로 한다. "N-글리코실화 부위"는 서열 N-X-S/T/C를 가지며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고, N은 아스파라긴이며, S/T/C는 세린, 트레오닌 또는 시스테인, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌, 가장 바람직하게는 트레오닌이다. "O-글리코실화 부위"는 세린 또는 트레오닌 잔기의 OH기를 포함한다.
- [0125] 용어 "부착기"는 관련된 비-폴리펩티드 잔기, 예컨대 중합체 분자 또는 당 잔기와 커플링될 수 있는 아미노산 잔기를 나타내는 것으로 한다.
- [0126] 생체내 N-글리코실화에 대하여, 용어 "부착기"는 N-글리코실화 부위 (서열 N-X-S/T/C를 가지며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고, N은 아스파라긴이고, S/T/C는 세린, 트레오닌 또는 시스테인, 바람직하게는 세린 또는 트레오닌, 및 가장 바람직하게는 트레오닌임)를 구성하는 아미노산 잔기를 나타내는 비통상적인 방식으로 사용된다. N-글리코실화 부위의 아스파라긴 잔기가 글리코실화동안 당 잔기가 부착된 것이지만, 이러한 부착은 N-글리코실화 부위의 다른 아미노산 잔기가 존재하지 않는 한 달성될 수 없다. 따라서, 비-폴리펩티드 잔기가 당 잔기이고, 접합이 N-글리코실화에 의해 달성된 경우, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화와 관련되어 사용된 용어 "비-폴리펩티드 잔기에 대한 부착기를 포함하는 아미노산 잔기"는, 기능성 N-글리코실화 부위가 아미노산 서열에 도입되어 상기 서열로부터 제거되거나, 또는 기능성 N-글리코실화 부위가 아미노산 서열 내에 보유되는 방식으로 (예를 들어, N-글리코실화 부위의 일부를 이미 구성하는 세린 잔기를 트레오닌 잔기로 치환하거나 그 역으로 치환함으로써) N-글리코실화 부위를 구성하는 1개, 2개 또는 모든 아미노산 잔기가 변경되는 것으로 이해된다.
- [0127] 용어 "도입" (즉, "도입된" 아미노산 잔기, 아미노산 잔기의 "도입")은 주로 존재하는 다른 아미노산 잔기를 존재하는 아미노산 잔기로 치환하는 것으로 하나, 또한 추가 아미노산 잔기의 도입을 의미할 수 있다.
- [0128] 용어 "제거하는" (즉, "제거된" 아미노산 잔기, 아미노산 잔기의 "제거")은 주로 다른 아미노산 잔기를 제거된 아미노산 잔기로의 치환을 의미하는 것으로 하나, 또한 제거된 아미노산 잔기의 결실 (치환 없이)을 의미할 수 있다.
- [0129] 용어 "비-폴리펩티드 잔기에 대한 부착기를 포함하는 아미노산 잔기"는 비-폴리펩티드 잔기가 결합하거나 (도입된 아미노산 잔기의 경우), 결합될 아미노산 잔기 (제거된 아미노산 잔기의 경우)를 의미하는 것으로 한다.
- [0130] 용어 "기능적 생체내 반감기"는 통상의 의미, 즉 폴리펩티드의 생물학적 활성의 50%가 생체/표적 기관 내에 여전히 존재하는 시간, 또는 폴리펩티드의 활성이 초기값의 50%인 시간을 의미하는 것으로 사용된다. 기능적 생체내 반감기는 실험 동물, 예컨대 래트, 마우스, 토끼, 개 또는 원숭이에서 측정할 수 있다. 바람직하게는, 기능적 생체내 반감기는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이에서 측정한다. 또한, 기능적 생체내 반감기는 정맥내 또는 피하로 투여된 샘플에 대해 측정할 수 있다.
- [0131] 기능적 생체내 반감기를 측정하는 별법으로서, "혈청 반감기," 즉 폴리펩티드가 제거되기 전에 이의 50%가 혈장 또는 혈류 내에서 순환하는 시간으로 측정할 수 있다. 혈청 반감기의 측정은 종종 기능적 생체내 반감기를 측정하는 것보다 더 간단하고, 혈청 반감기 크기는 통상적으로 기능적 생체내 반감기 크기의 우수한 지표가 된다. 별법으로, 혈청 반감기에 대한 용어에는 "혈장 반감기", "순환 반감기", "혈청 제거율", "혈장 제거율" 및 "제거 반감기"가 포함된다.
- [0132] 폴리뉴클레오티드 및 돌연변이유발 방법
- [0133] 본 발명에는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 본 발명에는 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 제한 엔도뉴클레아제, RNase 또는 DNase (예를 들어, 명세서 내 다른 부분에서 특정 재조합 포맷에서 수행한 바와 같음)로 분해시켜 제조한 조성물; 및 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 기계적 방식 (예를 들어, 초음파 분해, 와동 등)으로 단편화 또는 전단화하여 제조한 조성물이 포함되며, 이는 본원에 기술된 방법에서 재조합에 대한 기질을 제공하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 임의의 폴리뉴클레오티드를 절단하여 제조된 조성물을 제공한다. 이러한 절단은 기계적, 화학적 또는 효소적 절단을 포함할 수 있고, 효소적 절단은 제한 엔도뉴클레아제, RNase 또는 DNase로의 절단을 포함할 수 있다.

- [0134] 본 발명에는 또한 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 핵산 폴리머라제의 존재하에 본 발명의 1종 이상의 단편화된 폴리뉴클레오타이드를 인큐베이션하는 것을 포함하는 방법으로 제조한 조성물이 포함된다. 이렇게 생성된 조성물은 상기 기술한 여러 재조합 포맷에 대한 재조합 혼합물을 형성한다. 핵산 폴리머라제는 RNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제, 또는 RNA-지시 DNA 폴리머라제 (예를 들어, "역전사효소")일 수 있으며, 상기 폴리머라제는, 예를 들어 열안정성 DNA 폴리머라제 (예를 들어, VENT, TAQ 등)일 수 있다.
- [0135] 유사하게, 본 발명의 하나 이상의 핵산에 상응하는 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는 조성물은 재조합 기질로서 유용하고, 이것이 본 발명의 특징이다. 편의상, 이들 단편화, 전단 또는 올리고뉴클레오타이드 합성화된 혼합물은 단편화된 핵산 세트로서 언급된다.
- [0136] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 돌연변이시키거나 재조합하여 제조한 폴리펩티드를 코딩하는, 단리되거나 재조합된 핵산을 제공한다.
- [0137] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및 핵산 단편은 공지된 합성 방법에 따라 표준 고체상 방법에 의해 제조될 수 있다. 전형적으로, 약 100개 이하의 염기 단편을 개별적으로 합성한 다음, 결합시켜 (예를 들어, 효소적 또는 화학적 결합 방법, 또는 폴리머라제 매개 재조합 방법에 의해) 임의의 목적하는 연속 서열을 형성시킨다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 전형적으로 자동화 합성 방법에서 수행된 바와 같이, 예를 들어 문헌 [Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-69] 또는 문헌 [Matthes et al. (1984) EMBO J 3:801-05]에 기술된 고전적인 포스포르아미디트 방법을 사용하여 화학적 합성으로 제조될 수 있다. 포스포르아미디트 방법에 따라, 예를 들어 자동화 DNA 합성기에서 올리고뉴클레오타이드를 합성하고, 정제하고, 어닐링하고, 결합시키고 적절한 벡터 내로 클로닝한다.
- [0138] 또한, 임의의 폴리뉴클레오타이드는 임의의 다양한 시판원, 예컨대 오페론 테크놀로지스 인크.(Operon Technologies Inc.) (캘리포니아주, 알라메다 소재) 및 여러 다른 곳에서 주문할 수 있다. 유사하게, 펩티드 및 항체는 임의의 다양한 공급원, 예를 들어 셀테크 펩티드 (Celtek Peptides) (테네시주, 나쉬빌 소재); 워싱턴 바이오테크놀로지, 인크. (Washington Biotechnology, Inc.) (메릴랜드주, 발티모어 소재); 글로벌 펩티드 서비스 (Global Peptide Services) (콜로라도주, 포트 콜린 소재) 및 여러 다른 곳에서 주문할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 특정 폴리뉴클레오타이드는 또한 OAS 폴리펩티드 및 이들 폴리펩티드의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 혼성화하거나 PCR-증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 (예를 들어, 전형적인 순환성 서열 재조합 방법에서와 같이 상동성 핵산을 재조합하여 생성시킨 라이브러리) 수득할 수 있다. cDNA 클론을 스크리닝하고 단리하는 절차는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 기술은, 예를 들어 문헌 [Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymol. Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, Calif. ("Berger")]; [J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, ("Sambrook")]; 및 [F.M. Ausubel et al. (1987-2005) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, New York, NY ("Ausubel")]에 기술되어 있다. 본 발명의 일부 폴리뉴클레오타이드는 자연적으로 발생한 서열을 변경시키므로써, 예를 들어 돌연변이유발, 순환성 서열 재조합 (예를 들어, 서플링) 또는 올리고뉴클레오타이드 재조합에 의해 수득할 수 있다. 다른 경우에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드는 인실리코 (in silico) 방식으로 또는 본원에 언급된 참고문헌에 기술된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드 재조합 방법을 통해 제조될 수 있다.
- [0140] 본원에 자세히 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에는 본 발명의 폴리펩티드, 이들 폴리뉴클레오타이드 서열에 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열 및 적어도 엄격한 조건하에 본원에 정의된 서열에 혼성화되는 폴리뉴클레오타이드가 포함된다. 코딩 서열은 특정 폴리펩티드 또는 도메인, 영역 또는 상기 폴리펩티드의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있고, 여기에는 mRNA, crRNA, 합성 RNA 및 DNA, 및 cDNA가 포함된다. 폴리뉴클레오타이드는 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 단일-가닥인 경우, 이는 코딩 가닥 또는 비-코딩 (안티-센스, 상보적) 가닥일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에는 (i) 단리된 상태, (ii) 예를 들어, 융합 단백질, 프리-단백질, 프리프로-단백질 등을 코딩하기 위해 1종 이상의 추가의 코딩 서열과 조합된 상태, (iii) 적합한 숙주에서 코딩 서열의 발현에 효과적인 비-코딩 서열, 예컨대 인트론, 제어 성분, 예컨대 프로모터 (예를 들어, 자연 발생 또는 재조합 또는 서플링된 프로모터), 종결자 성분, 또는 5' 및/또는 3' 비번역 영역과 조합된 상태, 및/또는 (iv) 코딩 서열이 이중 기원 유전자인 벡터, 세포, 또는 숙주 환경에 포함된 상태의 본 발명의 폴리펩티드의 코딩 서열이 포함된다.
- [0141] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 또한 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 담체, 완충제, 보조제, 부형제 등의

존제하에 핵산의 전형적인 조성 제제와 조합하여 발견될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 단편은 전형적으로 약 200 개 이상의 뉴클레오티드 염기, 예컨대 약 250, 300, 350, 400, 450, 460, 470개 이상의 염기를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 단편은 고도로 엄격한 조건하에 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드 서열에 혼성화되고/거나, 본원에 기술된 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 특성을 갖는 아미노산 서열을 코딩할 수 있다.

[0142] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 폴리펩티드 또는 이의 단편을 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드 발현 벡터의 발현을 통해 전형적으로 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 제조물 (즉, 발현물)로서; 치료제로서; 예방제로서; 진단제 도구로서; 면역원으로서; 보조제로서; 상보성 또는 부분 상보성 핵산의 존재에 대한 진단제 프로브로서; 추가 반응, 예를 들어 순환성 서열 재조합 반응 또는 돌연변이 반응에 대한 기질로서의 다양한 용도를 가져서 신규 및/또는 개선된 변이체 등을 제조한다.

[0143] 발현 벡터, 제조 방법, 유전자 요법

[0144] 본 발명의 폴리펩티드를 제조하고 분리하기 위한 재조합 방법이 본원에 기술되어 있다. 재조합 제조 이외에, 폴리펩티드는 고체상 기술을 사용하여 직접 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J. (1963) J Am Chem Soc 85:2149-2154] 참조). 펩티드 합성은 수동 기술 또는 자동화 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 자동화 합성은, 예를 들어 제조자가 제공한 지시서에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 431A 펩티드 신테사이저 (Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer) (캘리포니아주, 포스터시티 소재, 퍼킨 엘머)를 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들어, 화학적 방법을 사용하여 별개로 하위서열을 화학적으로 합성하고 합하여, 전장 폴리펩티드 또는 이의 단편을 제공할 수 있다. 별법으로, 상기 서열은 폴리펩티드의 제조를 전문으로 하는 임의의 회사에서 주문할 수 있다. 가장 통상적으로, 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어 하기에 기술된 바와 같이 코딩 핵산을 발현하고 폴리펩티드를 회수하여 제조할 수 있다.

[0145] 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법이 또한 포함된다. 이러한 방법 중 하나에는, 코딩된 폴리펩티드를 제조하는데 효과적인 조절 서열에 작동적으로 연결된 본 발명의 임의의 핵산을 세포의 개체군에 도입시키고, 배양 배지에서 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고, 상기 세포 또는 배양 배지로부터 폴리펩티드를 분리하는 것이 포함된다. 세포에 의한 흡수 (형질감염) 및/또는 폴리펩티드의 발현을 용이하게 하기에 충분한 핵산의 양을 사용한다. 상기 핵산을 당업계에 공지된 임의의 전달 방법, 예를 들어 주사, 유전자총, 수동 흡수 등으로 이들 세포에 도입시킨다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 핵산은 벡터, 예컨대 재조합 발현 벡터 (예를 들어, DNA 플라스미드 벡터) 또는 당업계에 공지된 임의의 벡터 중 일부일 수 있다. 본 발명의 핵산을 포함하는 핵산 또는 벡터를 제조할 수 있고, 표준 재조합 DNA 기술 및 당업계에 공지된 분리 방법으로 제제화할 수 있다. 이러한 핵산 또는 발현 벡터는 생체내에서 포유동물의 세포 개체군 내로 도입하거나, 또는 포유동물의 선택된 세포 (예를 들어, 종양 세포)를 포유동물로부터 분리하여, 코딩된 폴리펩티드의 흡수 및 발현이 일어나기에 충분한 양으로 상기 세포의 개체군 내로 생체외에서 도입할 수 있다. 또는, 본 발명의 핵산을 포함하는 핵산 또는 벡터는 시험관내에서 배양된 세포를 사용하여 제조한다. 한 국면에서, 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법에는 벡터의 흡수 및 코딩된 폴리펩티드의 발현이 일어나는 양과 방식으로, 세포의 개체군을 본원에 기술된 본 발명의 임의의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터내로 도입시키고, 상기 발현 벡터를 본원에 기술된 임의의 도입/전달 포맷에 의해 포유동물에게 투여하고; 상기 폴리펩티드를 포유동물 또는 포유동물의 생성물로부터 분리하는 것이 포함된다.

[0146] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 분리되거나 재조합된 핵산 (본원에서 폴리뉴클레오티드라고 지칭됨)을 제공하며, 이는 집합적으로 "본 발명의 핵산 (또는 폴리뉴클레오티드)"로 지칭된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 다양한 적용에 유용하다. 상기 기술한 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 본 명세서의 다른 곳에 기술된 유전자 요법, DNA 백신화 및 면역요법에 유용한 발현 벡터 내로 혼입시킬 수 있다.

[0147] 본 발명의 임의의 폴리뉴클레오티드 (상기 기술한 것들 포함)는 하나 이상의 추가의 아미노산 서열, 예를 들어 분비/국소화 서열, 폴리펩티드의 가용화 또는 고정화 (예를 들어, 세포 표면 제시용)에 유용한 서열, 폴리펩티드의 검출 및/또는 정제에 유용한 서열 (예를 들어, 폴리펩티드 정제 서열, 예컨대 에피토프 태그, 폴리히스티딘 서열 등)을 포함하는 융합 단백질을 코딩할 수 있다. 다른 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 이러한 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 하나 이상의 폴리펩티드를 발현할 수 있다.

- [0148] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지, 바이러스 또는 바이러스 단편을 포함할 수 있다. 이러한 벡터는 발현 벡터를 포함할 수 있고, 원할 경우, 핵산은 본원 및 하기에 기술된 것을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 또한, 다른 국면에서, 본 발명은 부형제 또는 담체, 및 본 발명의 하나 이상의 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 세포, 또는 상기 핵산을 포함하는 숙주를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 제약 조성물일 수 있고, 부형제 또는 담체는 제약상 허용되는 부형제 또는 담체일 수 있다.
- [0149] 본 발명은 또한 본 발명의 2종 이상의 핵산 또는 이의 단편 (예를 들어, 재조합을 위한 기질로서)을 포함하는 조성물을 포함한다. 상기 조성물은 재조합 핵산의 라이브러리를 포함할 수 있고, 상기 라이브러리는 상기 기술한 2개 이상, 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상 또는 100개 이상의 핵산을 함유한다. 상기 핵산은 임의로 발현 라이브러리를 제공하는 발현 벡터로 클로닝된다.
- [0150] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 이의 단편, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 적합한 담체, 예컨대 제약 담체와 조합하여 치료적 또는 예방적 용도에 적용될 수 있다. 상기 조성물은 치료적 및/또는 예방적 유효량의 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 상기 담체 또는 부형제는 염수, 완충화된 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 그의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제제는 투여 방식에 적합해야 한다. 핵산, 폴리펩티드 및 단백질의 투여 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0151] 본원에 사용된 분자생물학적 기술 및 벡터, 프로모터 및 여러 다른 관련된 소재를 기재하는 일반적인 문헌에는 상기 베르거 (Berger); 상기 샘브루크 (Sambrook (1989)) 및 상기 아우수벨 (Ausubel)이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 상동성 핵산의 제조를 위한, 시험관내 증폭 방법을 통해 당업자에게 지시하기에 충분한 기술, 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 결합 연쇄 반응 (LCR), Q β -복제효소 증폭 및 다른 RNA 폴리머라제 매개 기술 (예를 들어, NASBA)의 예는 상기 베르거, 샘브루크 및 아우수벨의 문헌, 및 문헌 [Mullis et al. (1987) U.S. Pat. No. 4,683,202]; [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds.) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990) ("Innis")]; [Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47]; [The Journal Of NIH Research (1991) 3:81-94]; [Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:1173-1177]; [Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874-1878]; [Lomeli et al. (1989) J Clin Chem 35:1826-1831]; [Landegren et al. (1988) Science 241:1077-1080]; [Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294]; [Wu and Wallace (1989) Gene 4:560-569]; [Barringer et al. (1990) Gene 89:117-122] 및 [Sooknanan and Malek (1995) Biotechnology 13:563-564]에서 찾을 수 있다. 시험관내 증폭된 핵산 클로닝의 개선된 방법은 문헌 [Wallace et al., U.S. Pat. No. 5,426,039]에 기술되어 있다. PCR에 의한 거대 핵산 증폭의 개선된 방법 (여기서, 40 kb 이하의 PCR 앰플리콘이 생성됨)은 이 거명을 통해 포함된 문헌 [Cheng et al. (1994) Nature 369:684-685]에 요약되어 있다. 당업자는 본질적으로 역전사효소 및 폴리머라제를 이용하여 제한 분해, PCR 증폭 및 서열분석에 적합한 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있음을 인지할 것이다. 상기 아우수벨, 샘브루크 및 베르거의 문헌을 참조한다.
- [0152] 포유동물 숙주 세포에서, 여러 발현 시스템, 예컨대 바이러스-기초 시스템을 사용할 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용된 경우에, 코딩 서열은 후방 프로모터 및 트리파르티트 리더 서열로 이루어진 임의로 아데노바이러스 전사/번역 복합체로 결합된다. 바이러스 게놈의 비필수 E1 또는 E3 영역 내 삽입은 감염된 숙주 세포 내의 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 생존가능한 바이러스를 생성시킨다 (문헌 [Logan and Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655-3659]). 또한, 전사 인핸서, 예컨대 라우스 육종 바이러스 (RSV) 인핸서는 포유동물 숙주 세포에서의 발현을 증가시키는데 사용된다. 숙주 세포, 배지, 발현 시스템 및 제조 방법은 각종 포유동물 단백질의 클로닝 및 발현에 대해 공지되어 있는 것들이다. 발현 효율은 사용 중인 세포 시스템에 적절한 인핸서를 혼입함으로써 증진될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Scharf D. et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62]; 및 [Bittner et al. (1987) Methods in Enzymol 153:516-544] 참조).
- [0153] 특정 개시 신호는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 코딩 서열 및/또는 이의 단편의 번역이 효율적이라도 도울 수 있다. 이들 신호에는, 예를 들어 ATG 개시 코돈 및 인접 서열이 포함될 수 있다. 코딩 서열, 이의 개시 코돈 및 상류 서열이 적절한 발현 벡터로 삽입되는 경우에, 추가의 번역 제어 신호는 필요하지 않을 수 있다. 그러나, 코딩 서열 (예를 들어, 성숙 단백질 코딩 서열) 또는 이의 일부만이 삽입된 경우, ATG 개시 코돈을 비롯한 외부 핵산 전사 제어 신호가 제공되어야 한다. 또한, 개시 코돈은 올바른 판독 프레임 내에 존재하여 전체 삽입의 전사를 확실히 해야 한다. 외부 전사 성분 및 개시 코돈은 천연 및 합성의 다양한 기점일 수 있다.
- [0154] 상기 구조물의 숙주 세포 내 도입은 생체내, 생체외 또는 시험관내 방법을 위한 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스

트란 매개 형질감염, 전기천공, 유전자 또는 백신 총, 주사 또는 다른 통상의 기술에 의해 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Davis, L., Dibner, M., and Battey, I. (1986) Basic Methods in Molecular Biology] 참조).

[0155]

인식하는 바와 같이, 박테리아, 식물, 동물 (특히, 포유동물) 및 원시세균 기원의 세포를 비롯한 여러 세포의 배양 및 제조에 여러 문헌을 이용할 수 있다. 예를 들어, 상기 샘브루크, 아우수벨 및 베르거의 문헌, 및 문헌 [Freshney (1994) Culture of Animal Cells, Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York] 및 여기에 언급된 참고문헌; [Doyle and Griffiths (1997) Mammalian Cell Culture: Essential Techniques John Wiley and Sons, New York]; [Humason (1979) Animal Tissue Techniques, fourth edition W.H. Freeman and Company]; 및 [Ricciardelli et al. (1989) In vitro Cell Dev Biol 25:1016-1024]을 참조한다. 식물 세포 배양 및 재생에 대하여는, 예를 들어 문헌 [Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue and Organ Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.]; [Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture] 및 [Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Plant Molecular Biology (1993) R. R. D. Croy (ed.) Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6]을 참조한다. 일반적으로 세포 배양 배지는 문헌 [Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla]에 기술되어 있다. 세포 배양에 대한 추가의 정보는 상업적으로 입수할 수 있는 문헌, 예를 들어 문헌 [Life Science Research Cell Culture Catalogue from Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) ("Sigma-LSRCCC")] 및, 예를 들어 문헌 [Plant Culture Catalogue and supplement also from Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) ("Sigma-PCCS")]에서 찾을 수 있다.

[0156]

본 발명의 폴리펩티드는 공지되어 있는 여러 방법, 예를 들어 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀로로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 (예를 들어, 본원에 제시된 임의의 태깅 시스템 사용), 히드록시아파티트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피로 회수하고 정제될 수 있다. 원할 경우, 성숙 단백질 또는 이의 단편의 배위를 완료하는데 단백질 재접힘을 사용할 수 있다. 마지막으로, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 최종 정제 단계에서 사용할 수 있다. 상기 언급한 것들 외에, 다양한 정제 방법이 당업계, 예를 들어 문헌 [Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.]; [Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2.sup.nd Edition Wiley-Liss, New York]; [Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, New Jersey]; [Harris and Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England]; [Harris and Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England]; [Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3.suprd Edition Springer Verlag, New York]; [Janson and Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, New York] 및 [Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, New Jersey]에 공지되어 있다.

[0157]

유기체 생체내 도입 및 발현에 적합한 다수의 바이러스 벡터가 공지되어 있다. 이러한 벡터에는 레트로바이러스 벡터 (예를 들어, 문헌 [Miller, Curr Top Microbiol Immunol (1992) 158:1-24]; [Salmons and Gunzburg (1993) Human Gene Therapy 4:129-141] 및 [Miller et al. (1994) Method in Enzymology 217:581-599]), 및 아데노-연관 벡터 (문헌 [Carter (1992) Curr Opin Biotech 3:533-539; Muzyczka (1992) Curr Top Microbiol Immunol. 158:97-129]에 검토됨)가 포함된다. 사용되는 다른 바이러스 벡터에는 일반적으로 예를 들어 문헌 [Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1:51-64]; [Latchman (1994) Molec Biotechnol 2:179-195] 및 [Johanning et al. (1995) Nucl Acids Res 23:1495-1501]에 기술된 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터 및 신드비스 (Sindbis) 바이러스 벡터가 포함된다.

[0158]

한 국면에서, 폭스 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 면역 반응 증진, 예를 들어 증가 또는 개선된 T 세포 증식을 원할 경우, 폭스 바이러스 벡터를 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 함께 형질감염시키며, 이것은 예방적, 치료적 및 진단적 적용에 유용하다. 예를 들어, 문헌 [Berencsi et al., J Infect Dis (2001)183(8):1171-9]; [Rosenwirth et al., Vaccine 2001 February 8;19(13-14):1661-70]; [Kittleson et al., J Immunol (2000) 164(8):4204-11]; [Brown et al. Gene Ther 2000 7(19):1680-9]; [Kanesa-athan et al., Vaccine (2000) 19(4-5):483-91] 및 [Sten (2000) Drug 60(2):249-71]에 논의된 바이러스 벡터를 참조한다. 이러한 벡터 및 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 또한 본 발명의 특징이다.

[0159]

유전자 요법 및 유전자 백신은 만성 감염성 질환 (예를 들어, HIV 감염, 바이러스 간염), 및 비-감염성 질환

(예를 들어, 암) 및 일부 형태의 선천성 결함, 예컨대 효소 결핍증에 대항하기 위한 방법을 제공하며, 이러한 방법은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포 포함)와 함께 적용될 수 있다. 생체내, 생체의 및 시험관내에서 핵산 및 벡터를 세포내로 도입하는 여러 방법이 사용되어 왔고, 이러한 방법이 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터와 함께 사용될 수 있다. 이들 방법에는 리포솜 기초 유전자 전달 (문헌 [Debs and Zhu (1993) WO 93/24640] 및 미국 특허 제 5,641,662호; [Mannino and Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7):682-691]; [Rose, U.S. Pat. No. 5,279,833]; [Brigham (1991) WO 91/06309]; [Felgner et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:7413-7414]; [Brigham et al. (1989) Am J Med Sci 298:278-281]; [Nabel et al. (1990) Science 249:1285-1288]; [Hazinski et al. (1991) Am J Resp Cell Molec Biol 4:206-209]; 및 [Wang and Huang (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:7851-7855]); 예를 들어, 암을 치료하기 위한 아데노바이러스 벡터 매개 유전자 전달 (예를 들어, 문헌 [Chen et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:3054-3057]; [Tong et al. (1996) Gynecol Oncol 61:175-179]; [Clayman et al. (1995) Cancer Res. 5:1-6]; [O'Malley et al. (1995) Cancer Res 55:1080-1085]; [Hwang et al. (1995) Am J Respir Cell Mol Biol 13:7-16]; [Haddada et al. (1995) Curr Top Microbiol Immunol. 1995 (Pt. 3):297-306]; [Addison et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:8522-8526]; [Colak et al. (1995) 뇌 Res 691:76-82]; [Crystal (1995) Science 270:404-410]; [Elshami et al. (1996) Human Gene Ther 7:141-148]; [Vincent et al. (1996) J Neurosurg 85:648-654]) 및 여러 다른 방법들이 포함된다. 레트로바이러스 계통의 일부로서 치료적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제-결합성 레트로바이러스 벡터, 특히 단순 MuLV 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Miller et al. (1990) Mol Cell Biol 10:4239 (1990)] 및 [Kolberg (1992) J NIH Res 4:43]; 및 [Cornetta et al. (1991) Hum Gene Ther 2:215)]을 참조한다. 리간드-특이적, 양이온-기재 수송 시스템과 커플링된 핵산 수송 (문헌 [Wu and Wu (1988) J Biol Chem, 263:14621-14624])이 또한 사용되어 왔다. 노출된 (naked) DNA 발현 벡터가 또한 문헌 [Nabel et al. (1990), supra] 및 [Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468])에 기술되어 있다. 일반적으로, 이들 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 적절한 벡터내로 삽입하는데 적합할 수 있다.

[0160] 본 발명의 핵산을 환자에게 도입시킴으로써 본 발명에 적용할 수 있는 유전자 요법 프로토콜을 기술하는 일반적인 문헌에는, 예를 들어 문헌 [Robbins (1996) Gene Therapy Protocols, Humana Press, New Jersey]; [Joyner (1993) Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England]가 포함된다.

[0161] 항바이러스 치료

[0162] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는데 치료적으로 또는 예방적으로 사용될 수 있다. 예시적인 바이러스에는, 플라비바이러스과 (Flaviviridae)의 바이러스, 예를 들어 C형 간염 바이러스, 황열 바이러스, 웨스트 나일 (West Nile) 바이러스, 재페니즈 뇌염 바이러스, 뎅기 (Dengue) 바이러스 및 소 바이러스성 설사 바이러스; 헤파드나바이러스과 (Hepadnaviridae)의 바이러스, 예를 들어 B형 간염 바이러스; 피코르나바이러스과 (Picornaviridae)의 바이러스, 예를 들어 뇌심근염바이러스, 인간 리노바이러스, A형 간염 바이러스; 레트로바이러스과 (Retroviridae)의 바이러스, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스, 인간 T-림프영양성 바이러스 및 로우스 (Rous) 육종 바이러스; 코로나바이러스과 (Coronaviridae)의 바이러스, 예를 들어 SARS 코로나바이러스; 라브도바이러스과 (Rhabdoviridae)의 바이러스, 예를 들어 광견병 바이러스 및 수포성 구내염 바이러스; 파라믹소바이러스과 (Paramixoviridae)의 바이러스, 예를 들어 호흡기 세포융합 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스, 유두종바이러스과 (Papillomaviridae)의 바이러스, 예를 들어 인간 유두종 바이러스, 및 헤르페스바이러스과 (Herpesviridae)의 바이러스, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0163] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 폴리펩티드에 연결된 1종 이상의 비-폴리펩티드 잔기를 포함하고, 항 바이러스성 특징을 보이며, 비-접합된 폴리펩티드에 비해 임의로 혈청 반감기 및/또는 기능적 생체내 반감기 증가, 및/또는 항원성 감소와 같은 다른 목적하는 특성을 나타내는 접합물을 제공하는 것이다. 일부 이러한 접합물은 참조 올리고아데닐레이트 신테타제에 비해 바이러스로 감염된 세포에서 바이러스를 제거하는데 증진된 효능을 나타낼 수 있다. 일부 이러한 접합물은 추가로 참조 올리고아데닐레이트 신테타제에 비해 감소된 독성을 가질 수 있다.

[0164] 본 발명의 다른 목적은 바이러스-감염 세포에게 상기 세포에서의 바이러스 복제를 억제하기에 유효한 양의 본 발명의 폴리펩티드 또는 접합물을 투여하는 것을 포함하는, 바이러스-감염 세포에서의 바이러스 복제 억제 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 바이러스-감염 세포에 상기 세포에서의 바이러스 복사본 수를 감소시키기에 유효한 양의 본 발명의 폴리펩티드 또는 접합물을 투여하는 것을 포함하는, 바이러스-감염 세포에서의 바이러스 복

사본 수를 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 세포는 배양되거나 또는 달리 포유동물로부터 단리되거나 (즉, 시험관내 또는 생체외), 또는 생체내에, 예를 들어 대상체, 포유동물, 영장류 또는 인간 내에 있을 수 있다.

[0165] 항암 및 염증 치료

[0166] 본 발명의 폴리펩티드는 특정 세포 유형 및 세포주가 아폽토시스 (apoptosis)를 겪거나 상기 세포주 또는 세포 유형의 성장 지연의 영향을 야기할 수 있음이 입증되었다. 예시적인 실시양태에서, 이러한 세포주 또는 세포 유형은 전립선 및 유방으로부터 유래된 것들이다.

[0167] 본 발명은 세포 개체군을 세포 개체군의 증식을 억제하기에 유효한 양의 본 발명의 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 세포 개체군의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 상기 세포 개체군은 배양되거나 또는 달리 포유동물로부터 단리되거나 (즉, 시험관내 또는 생체외), 또는 생체내에, 예를 들어 대상체, 포유동물, 영장류 또는 인간 내에 있을 수 있다.

[0168] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 사용하여 암 및 신생물 질환을 치료하는 것을 제공한다. 예시적인 암 및 신생물 질환에는, 부신피질 암종, AIDS 관련암, 예를 들어 카포시 육종, AIDS-관련 림프종, 항문암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담관암, 예를 들어 간의성암, 방광암, 골암, 예를 들어 골육종 및 악성 섬유성 조직구종, 뇌 줄기 신경아교종, 뇌종양, 예를 들어 신경아교종, 성상세포종, 악성 신경아교종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 및 신경모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경아교종, 유방암, 기관지 샘종, 버킷 림프종, 유암 종양, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 백혈병, 예를 들어 모발 세포 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병 및 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식성 장애, 결장직장암, 피부 T-세포 림프종, 자궁내막암, 식도암, 유잉 (Ewing) 계열의 종양, 두개 외 생식 세포 종양, 고환외 생식 세포 종양, 안암, 예를 들어 안구내 흑색종 및 망막모세포종, 담낭암, 위암, 임신성 영양막 종양, 두경부암, 간세포 암종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 원발성 CNS 림프종, 비인두암, 섬세포 암종, 신장(콩팥 세포)암, 후두암, 구순암, 간암, 폐암, 예를 들어 비-소세포 및 소세포 폐암, 발덴스트롬 (Waldenstrom) 고분자글로불린혈증, 메르켈 (Merkel) 세포 암종, 중피종, 전이성 편평 경부암, 복합 내분비샘 신생물, 다중 골수종, 플라즈마 세포 신생물, 균상식육종, 골수형성이상 증후군, 골수증식성 질환, 비강암 및 부비동암, 난소암, 예컨대 생식 세포 및 표피세포, 저-악성 잠재성 난소종양, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 갈색세포종, 뇌하수체 종양, 폐흉막 모세포종, 전립선암, 횡문근육종, 침샘암, 육종, 세자리 (Sezary) 증후군, 피부암, 예를 들어 흑색종 및 편평 세포 암종, 고환암, 가슴샘종, 흉선 암종, 갑상선암, 일시적 세포암, 영양막 종양, 요도암, 자궁암, 질암, 외음부암 및 윌름즈 (Wilms) 종양이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0169] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 사용하여 자가면역 질환 및 염증을 치료하는 것을 제공하며, 상기 자가면역 질환 및 염증에는 천식, 크론병, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 다발성 경화증, 중증근무력증, 시각 신경염, 건선, 류마티스성 관절염, 그레이브스병, 하시모토병 (갑상선염), Ord 갑상선염, 당뇨병, 당뇨병, 리이터 증후군, 자가면역 간염, 원발성 담관성 간경화증, 간 경화증, 간 섬유증, 항인지질 항체 증후군, 안간대성 근경련 증후군, 측두동맥염, 급성 범발성 뇌척수염, 굿패스처 (Goodpasture) 증후군, 베게너 (Wegener) 육아종증, 복강 질환, 천포창, 다발성관절염, 가운 자가면역 용혈성 빈혈, 타카야스 동맥염, 심장동맥염, 자궁내막증, 간질성 방광염, 신경근긴장증, 공피증, 백반증, 여성외음부통, 샤가스 (Chagas) 질환, 사코이드증, 만성 피로 증후군, 급성 호흡 곤란 증후군, 건염, 윤활낭염, 류마티스성 다발성 근육통, 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 알레르기성 비염, 심혈관 질환, 만성 담낭염, 기관지확장증, 진폐증, 예를 들어 규폐증, 골관절염, 아테롬성동맥경화증, 자율신경기능장애, 강직관절염, 급성 전방 포도막염, 전신성 홍반 루푸스, 인슐린-의존성 당뇨병, 심상 천포창, 실험 알레르기성 뇌척수염, 실험 자가면역 포도막염, 혼합형 연결 조직 질환, 쇼그렌 증후군, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소 자색반, 급성 류마티스 열, 혼합형 필수성 한랭글로불린혈증, 소아 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절 질환, 강직관절염, 건선 관절염, 신경통, 활막염, 사구체신염, 혈관염, 인플루엔자의 후유증으로 발생하는 염증, 통상의 감기 및 다른 바이러스 감염, 통풍, 접촉성 피부염, 요통 및 경통, 생리통, 두통, 치통, 염좌, 긴장, 근육염, 화상, 상해 및 동통, 및 대상체에서 수술 및 치료 후 발생하는 염증이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0170] 세포 성장 및 조직 재생 치료

[0171] 본 발명의 폴리펩티드는 특정 세포 유형 및 세포주, 예를 들어 Huh7 간암 세포 및 MRC5 태아 폐섬유모세포 세포에서 유사분열성 세포 성장-증진 프로그램을 자극하는 것으로 나타났다. 이러한 유사분열성 프로그램은 본 발명의 폴리펩티드로 처리된 세포 및 세포주의 발현 마이크로어레이 분석 및 세포 생존능 분석을 사용하여 확인한다. 본 발명은 대상체 또는 포유동물로부터 유래된 조직 및 세포를 이용하여 시험관내, 생체내 및 생체외에서

세포 성장 및 조직 재생을 자극하는 본 발명의 폴리펩티드의 용도를 제공한다.

[0172]

본 발명의 폴리펩티드의 유도체

[0173]

본 발명은 1 내지 34개의 아미노산에 의해 도 1-5의 폴리펩티드와 다른 폴리펩티드를 제공하며, 이러한 차이에는 치환, 삽입, 결실, 변형된 아미노산 또는 아미노산 유도체의 혼입, 및 상기 폴리펩티드의 C-말단 또는 N-말단으로부터의 아미노산의 부가 또는 결실이 포함된다. 1종 이상의 아미노산 치환은, 예를 들어 치환기(예컨대, 보존성 치환기), 예컨대 하기 기술된 것 중 하나에 따른 본 발명의 폴리펩티드에 대해 일어날 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 1종 이상의 아미노산 치환은 비-폴리펩티드 잔기에 대한 부착기를 포함하는 아미노산 잔기를 도입하거나 제거하는 폴리펩티드에서 일어날 수 있다. 이러한 예에는 1종 이상의 N-글리코실화 부위 도입, 1종 이상의 시스테인 잔기 또는 리신 잔기 도입, 1종 이상의 N-글리코실화 부위 제거, 및/또는 또는 1종 이상의 리신 또는 히스티딘 제거가 포함된다. 이러한 일부 폴리펩티드는 올리고아데닐레이트 신타타제 활성을 나타낸다. 보존성 치환기에는 1군: 알라닌 (A), 글리신 (G), 세린 (S), 트레오닌 (T); 2군: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3군: 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4군: 아르기닌 (R), 리신 (K), 히스티딘 (H); 5군: 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 및 6군: 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 트립토판 (W)이 포함된다. 아미노산의 다른 치환기를 사용할 수 있다. 예를 들어, 아미노산은 유사한 기능 또는 화학구조 또는 조성(예를 들어, 산성, 염기성, 지방족, 방향족, 황-함유)에 의해 분류될 수 있다. 예를 들어, 지방족 군에는 글리신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 이소류신 (I)이 포함될 수 있다. 서로에 대해 보존성 치환기인 것으로 고려되는 아미노산을 함유하는 다른 군에는 방향족: 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 황-함유: 메티오닌 (M), 시스테인 (C); 염기성: 아르기닌 (R), 리신 (K), 히스티딘 (H); 산성: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E), 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q)이 포함된다. 또한, 아미노산의 추가 분류에 대하여는 문헌 [Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company]을 참조한다. 본원의 폴리펩티드 서열 목록은 상기 치환기와 조합되어 모든 보존적으로 치환된 폴리펩티드 서열의 발현 목록을 제공한다.

[0174]

한 국면에서, 본 발명은 도 5의 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성 (예를 들어, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성)을 갖는 서열을 포함하는 각각의 단리된 또는 재조합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 예에서, 상기 폴리펩티드는 올리고아데닐레이트 신타타제 활성을 나타낸다.

[0175]

서열 (폴리펩티드 또는 핵산)이 다른 것과 비슷한 정도는 두 서열에 대한 구조적 특성 및 기능적 특성이 유사한 지표를 제공한다. 따라서, 본 발명의 문맥에서, 임의의 주어진 예시 서열과 유사한 서열을 갖는 서열이 본 발명의 특징이다. 특히, 하기 정의된 바와 같은 서열 동일성 백분율을 갖는 서열이 본 발명의 특징이다. 서열 관계를 결정하는 다양한 방법, 예를 들어 수동적인 정렬 및 컴퓨터 보조 서열 정렬 및 분석이 사용될 수 있다. 서열 정렬을 수행하는 다양한 컴퓨터 프로그램이 이용가능하거나, 또는 당업자에 의해 수동으로 정렬을 수행할 수 있다.

[0176]

상기 나타난 바와 같이, 본 발명에서 사용되는 폴리펩티드 및 핵산의 서열이 동일할 필요는 없으나, 실질적으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 핵산의 상응하는 서열과 동일할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 다양하게 변형시켜, 예컨대 1종 이상의 보존성 또는 비-보존성인 아미노산 삽입, 결실 및/또는 치환하여 적용될 수 있으며, 여기서 상기 변형은 이들의 용도, 예컨대 치료적 또는 예방적 용도 또는 투여 또는 진단적 적용에서 특정 이점을 제공할 수 있다. 본 발명의 핵산은 또한 각종 변형, 예컨대 동일하거나 상이한 아미노산을 코딩하는 1종 이상의 코돈 내 1종 이상의 핵산의 하나 이상의 치환에 적용되거나 (침묵 변이 (상기 정의한 바와 같이) 또는 비-침묵 변이를 야기함), 또는 상기 서열 내 1종 이상의 핵산 (또는 코돈)의 하나 이상의 결실에 적용될 수 있다. 상기 핵산은 또한 발현 시스템 (예를 들어, 박테리아 또는 포유동물) 내에 최적의 발현을 제공하는 1종 이상의 코돈을 포함하도록 변형될 수 있는 반면, 원할 경우 상기 1종 이상의 코돈은 여전히 동일한 아미노산(들)을 코딩한다. 상기 핵산의 변화는 이들의 치료적 또는 예방적 용도 또는 투여, 또는 진단적 적용에서 특정 이점을 제공할 수 있다. 핵산 및 폴리펩티드는 이들이 각각 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드 내 서열과 실질적으로 동일한 (하기 정의됨)서열을 포함하는 한, 여러 방식으로 변형될 수 있다.

[0177]

용어 "동일한" 또는 "동일성"은, 최대 유사도에 대해 비교하고 정렬할 경우, 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 시각 검열에 의해 결정한 바와 같이, 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서 동일하거나, 또는 구체화된 백분율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 갖는 2개 이상의 서열을 지칭한다.

[0178]

참조 (즉, 조회) 서열에 대한 대상체 서열의 "서열 동일성%" ("% 동일성")은 대상체 서열이 비교 길이에서 조회 서열에 대해 구체화된 백분율로 동일함 (즉, 폴리펩티드 서열에 대해 아미노산-아미노산 기준으로, 또는 폴

리뉴클레오티드 서열에 대해 뉴클레오티드-뉴클레오티드 기준으로)을 의미한다.

[0179] 본 발명의 폴리펩티드를 제조하기 위한 부위 지정 돌연변이유발

[0180] 본 발명의 폴리펩티드는 부위-지정 돌연변이유발의 임의의 표준 방법을 사용하여 조작될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 상응하는 핵산 서열은 특정 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 높은 정확도의 DNA 폴리머라제를 사용하여 합성된다. 상기 표적 서열은 메틸화-감수성 이. 콜라이 (*E. coli*) 균주로부터 단리된 이중 가닥 플라스미드 상에 함유된다. 목적하는 돌연변이를 함유하는 상보성 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 정제한다. 이중 가닥 플라스미드 주형 변성의 교대 주기를 위한 온도 (94℃에서 30초 동안)를 제어하고, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 어닐링 (55℃에서 1분 동안)하고, 프라이머를 높은 정확도의 폴리머라제로 연장 (68℃에서 1분 동안/플라스미드 길이 kb)하기 위해, 열 사이클러를 사용한다. 대략 15 주기 후에, 새롭게 합성되고 첨가된 DNA의 혼합물을 메틸화 장기에 특이적인 제한 효소 (Dpn I)로 처리하여 모 플라스미드를 분해한다. 목적하는 돌연변이를 함유하는 플라스미드를 스크리닝 및 단리하기 위해, 생성된 DNA를 화학적 또는 전기적으로 감수성인 박테리아 균주 내로 도입시킨다. 플라스미드 DNA를 형질전환주로부터 단리하고, 돌연변이체 서열을 확인하기 위해 형광 염료-종결자 서열 분석을 통해 스크리닝한다.

[0181] 거대 약물 생성물 발현, 발효 및 정제

[0182] λ DE3의 용해원 (lysogen)을 함유하고, 따라서 lacUV5 프로모터의 제어하에 T7 RNA 폴리머라제 유전자의 염색체 복사본을 보유하는 이. 콜라이 균주는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 1종 이상의 폴리펩티드에 상응하는 핵산 서열을 코딩하는 IPTG-유도성 프로모터를 함유하는 박테리아 발현 벡터로 형질전환된다. 배양물은 37℃에서 클로로암페니콜 34 μ g/mL 및 카나마이신 15 μ g/mL가 보충된 루리아 액체 배지에서 증식시킨다. OD600이 0.4를 초과할 때, 온도를 18℃로 낮추고 세포를 17시간 동안 0.5 mM IPTG로 발현을 유도한다. 이어서, 박테리아 세포를 50 mM NaH_2PO_4 (pH 8), 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, 10% 글리세롤, 0.1% NP40, 2 mM DTT 및 프로테아제 억제제 (VWR)를 함유하는 완충액 중에 현탁시키고, 가울린 (Gaulin) 균질화기 내에 용해시키고, 원심분리하여 단백질을 정제 전에 세포 파쇄물을 제거한다.

[0183] 한 실시양태에서, 아미노-말단에 있는 폴리히스티딘 태그를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드를 정제할 수 있다. 폴리히스티딘 태그의 친화도 정제에서, 예를 들어 이. 콜라이 4 L에 의해 발생된 용해질에 대해 사용하는 컬럼 5 mL와 함께 니켈 컬럼을 사용하였다. 상기 용해질을 상기 컬럼상에 로딩한 다음, 완충제 A (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 30% 글리세롤, 20 mM 이미다졸, 2 mM DTT (pH 7.5))로 세척하였다. 이어서, 3.2 컬럼 부피에 대해 7% 완충제 B (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 30% 글리세롤, 2 M 이미다졸, 2 mM DTT (pH 6.8))까지의 단계적 용리를 수행하였다. 이어서, 3 컬럼 부피에 대해 100% 완충제 B까지의 구배를 수행하였다. 이어서, 본 발명의 폴리펩티드를 완충제 C (50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 40% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (pH 6.8)) 내에 겔-여과하고, 추가 정제를 위해 양이온 교환 컬럼 상에 로딩하였다. 단백질을 로딩한 후에, 상기 컬럼을 완충제 C로 세척한 다음 75% 완충제 D (50 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, 40% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (pH 6.8))에 이어 5 컬럼 부피의 100% 완충제 D까지의 단계적 용리를 수행하였다. 이어서, 상기 단백질을 완충제 E (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 40% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (pH 6.8)) 내로 겔 여과하고, -20℃에서 저장하였다.

[0184] 본 발명의 폴리펩티드의 다른 실시양태, 예를 들어 비제한적으로 폴리히스티딘 태그가 결여된 것, 폴리아르기닌 태그를 포함하는 것, 시스테인 함량이 감소된 것, 열에 더 안정적인 약물 후보물을 제조하기 위해 고안된 아미노산 서열이 변형된 것, 약물 후보물의 특정 활성을 증진시키거나 감소시키기 위해 변형된 것은 별법의 정제 전략을 필요로 할 수 있다. 폴리히스티딘 태그가 결여된 폴리펩티드 약물 후보물의 실시양태는, 예를 들어 양이온 교환 컬럼에 직접 적용될 수 있다. 추가 단계, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토그래피는 완충제 F (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (pH 6.8)) 중에 단백질을 수득하고, 10 컬럼 부피에 대해 100% 완충제 E로의 구배를 시행하여 사용할 수 있다. 다른 친화도 컬럼 또는 사이징 컬럼을 사용하여 폴리펩티드 약물 후보물의 다른 실시양태를 정제할 수 있다.

[0185] 완충액 교환, 약물 후보물 농축 및 약물 후보물의 정제를 위해, 별도의 기술을 또한 사용할 수 있다. 여기에는, 환외여과, 접선 유동 여과 및 약물 후보물 농축 및 완충액 교환을 위한 여과작용이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 또는 일부 다른 화학 제제에 의한 약물 후보물의 침전과 같은 기술을 또한 사용할 수 있다. 우레아 또는 일부 다른 변성물에서의 약물 후보물의 변성 및 이의 재접힘을 또한 사용할 수 있다.

- [0186] 본 발명의 폴리펩티드는 염을 함유하는 부형제에 의해 안정화되는데; 300 mM NaCl에서 안정한 용액은 150 mM NaCl에서 침전을 시작할 수 있다. 이러한 이유 때문에, 부형제 혼합물은 이들 안정화 염 농도를 선호할 것이고, 여기에는 인산나트륨, 염화나트륨, 염화칼슘 및 염화마그네슘이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0187] 아미노산-기재 부형제, 예컨대 아르기닌의 첨가로 본 발명의 폴리펩티드가 안정화되는 것이 입증되었다. 10% 수크로스 용액은 본 발명의 폴리펩티드가 1 mg/mL에서 안정하도록 해주고, 2% w/v 아르기닌을 첨가하면 폴리펩티드의 일부 실시양태는 3 mg/mL에서 안정하도록 해준다. 이러한 이유 때문에, 다른 아미노산 기재 화합물 (히스티딘, 글루타민, 글리신 및 인간 알부민을 포함하나, 이에 제한되지 않음)이 부형제로서 사용될 수 있다.
- [0188] 부형제, 예컨대 글리세롤을 첨가하여 본 발명의 폴리펩티드를 안정화시킨다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 10% 글리세롤 (v/v) 1 mg/mL로 최대 농축되는 반면, 40% 글리세롤 첨가시, 상기 약물 후보물은 12 mg/mL 이하에서 안정하다. 유사한 화학적 특성을 갖는 화합물을 함유하는 부형제 혼합물에는 폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 만니톨, 크실리톨 및 소르비톨이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이당류, 예컨대 수크로스는 10% w/v에서 안정화되는 것으로 나타났고, 다른 이당류 (말토스 및 트레할로스를 포함하나, 이에 제한되지 않음)를 또한 사용할 수 있다. 단당류가 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 폴리소르베이트, 폴리에틸렌글리콜 및 유사한 화합물이 또한 본 발명을 시행하는데 사용될 수 있다.
- [0189] 당업자는 저장시에 폴리펩티드의 안정성을 증진시키기 위해 항산화제 및 보존제를 사용할 수 있음을 인지할 것이다. 항산화제 (비제한적으로, 시트르산나트륨 포함)은 본 발명의 폴리펩티드의 장기 저장을 위해 안정화시킬 수 있다. 보존제 (비제한적으로, 벤질 알코올 포함)가 또한 저장시 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있고, 최종 부형제 혼합물에 사용될 수 있다.
- [0190] 폴리펩티드의 올리고아데닐레이트 신테타제 활성 측정
- [0191] 본 발명의 폴리펩티드의 올리고아데닐레이트 신테타제 활성은 이전에 공개된 방법 (문헌 [Justesen, J., et al. Nuc Acids Res. 8:3073-3085, 1980])에 따라 측정할 수 있다. 요약하면, 단백질은 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 50 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 2.5 mM ATP, α[³²P]ATP, BSA 0.5 mg/ml 및 10% 글리세롤을 함유하는 완충제 중 폴리이노신산:폴리시티딜산 200 μg/ml로 활성화된다. 37°C에서 30분 내지 24시간 동안 반응을 진행시키고, 90°C에서 3분 동안 가열시켜 반응을 종결시킨다. 반응 혼합물 2-4 μl를 PEI-셀룰로스 박층 플레이트 상에 떨어뜨렸다. 건조시킨 후에, 상기 플레이트를 0.4 M 트리스-HCl, 30 mM MgCl₂ (pH 8.7)로 현상한다. 상기 플레이트를 건조시키고, 인 영상 분석으로 가시화한다. 별법으로, 반응 혼합물을 추가로 0.05 U/μl 송아지 소장 포스파타제와 함께 인큐베이션하여 말단 포스페이트를 제거할 수 있다. 0.76 M KH₂PO₄ (pH 3.6) 현상 완충제 시스템을 사용하여 박층 크로마토그래피 분리를 수행한다. 이어서, 상기 플레이트를 건조시키고, 인 영상 분석으로 가시화한다.
- [0192] 폴리펩티드의 항바이러스 활성 측정
- [0193] 세포독성 바이러스로부터 배양된 세포를 보호하는 본 발명의 폴리펩티드의 능력은 뮤린 뇌심근염 바이러스 (EMCV, ATCC 균주 VR-129B) 감염 모델을 사용하여 입증한다. 다른 시험관내 바이러스 감염 모델에는 플라비바이러스 (예컨대, 소 설사 바이러스, 웨스트 나일 바이러스 및 GBV-C 바이러스), 다른 RNA 바이러스 (예컨대, 호흡기 세포융합 바이러스) 및 HCV 복제단위 (replicon) 시스템이 포함되나, 이에 제한되지 않는다 (예를 들어, 문헌 [Blight, K.J., et al. 2002. J. Virology, 76:13001-13014]). 바이러스 복제에 감수성인 임의의 적절한 배양 세포를 항바이러스 분석에 사용할 수 있다.
- [0194] 인간 Huh7 간암 세포를 96 웰 배양 플레이트 내에 1 x 10⁴ 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 완전 배지 (10% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM) 내에서 밤새 인큐베이션한다. 다음날 오전에, 배지를 0-10 μM 단백질 또는 등량의 단백질 희석 완충제를 함유하는 완전 배지로 대체하였다. 목적하는 경우, α-인터페론을 100 IU/ml의 농도로 첨가하였다. 바이러스 감염 전에, 세포를 2-8시간 동안 예비처리하였다. 예비처리한 후에, 완전 배지 내 EMC 바이러스 희석물을 함유하는 등량 부피의 배지를 상기 웰에 첨가하였다. 본원에 기술된 실험에서, 50-500 범위의 플라크 형성 단위 (pfu)를 각 웰 마다 첨가한다.
- [0195] 바이러스 감염을 밤새 (대략 18시간) 진행시키고, 임의의 입수가 가능한 세포 생존능 또는 세포 독성 시약을 사용

하여 생존 세포의 비율을 계산한다. 생존 세포에서 테트라졸륨 화합물 [3-(4,5-디메틸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨, 내부염; MTS]이 착색화 포르마잔 화합물로 전환하는 것을 측정하는 세포 생존능 분석을 이용하여 본원에 기술된 결과를 수득한다. 492 nm의 흡광도에서 MTS에서 포르마잔으로의 전환을 96-웰 플레이트 판독기에서 검출한다. 생성된 흡광도를 플롯팅하여 세포 생존능을 직접 평가하거나, 또는 대조군-처리된 샘플로 표준화하여 처리후 생존 세포의 백분율을 계산한다.

[0196] 폴리펩티드 PEG화; 술포히드릴

[0197] 디오티오프레이톨 (DTT)-무함유 정제된 폴리펩티드를 활성화된 mPEG-MAL (Nektar Therapeutics)과 0.5-10:1의 몰 비율로 혼합하여 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)와 본 발명의 폴리펩티드의 접합을 달성하였다. 실온에서 5분 내지 2시간 동안 반응을 진행시키고, 2 mM DTT를 첨가하여 쉐킷하였다. 선형 20 kDa 및 분지형 40 kDa PEG를 사용하여 다중 시스테인 부위에서 접합시켰다 (도 6A 및 6B). 당업자에게 공지된 다양한 크로마토그래피 방법론을 사용하여 하나 이상의 PEG를 함유하는 비-PEG화된 형태를 서로 분리할 수 있다. 본 발명의 예시적인 실시양태에서, 상이한 PEG 형태를 분리하기 위하여, 이온 교환 칼럼, 소수성 상호작용 컬럼, 겔 여과 및 크기 배제 크로마토그래피를 각각 단독으로 또는 서로 조합하여 사용할 수 있다.

[0198] 폴리펩티드 PEG화; N-말단

[0199] 본 발명의 폴리펩티드는 N-말단 아민에서 PEG화될 수 있다. 20 mM 나트륨 시아노보로하이드라이드를 함유하고, 빙조에서 교반한 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 30% 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM DTT (pH 5) 중 폴리펩티드에, 5배 과량의 mPEG 부티르ALD-40K를 첨가한다. 10시간 이하 동안 반응을 진행시킨 다음, 50배 과량의 글리신을 첨가하여 쉐킷한다. SDS-PAGE로 반응 생성물을 분석한다.

[0200] 하기 실시예는 예시의 방식으로 제공되며, 제한하려는 것은 아니다.

실시예

[0201] 실시예 1

[0202] 비-인간 영장류 OAS1 단백질에서의 아미노산 변형

[0203] 비-인간 영장류로부터의 OAS1 유전자를 서열분석하고, 인간 OAS1 유전자에서 발견된 돌연변이와 비교하였다. 상기 돌연변이는 OAS1 유전자 및 단백질의 진화에 대한 추가 식견을 제공한다. 진화적으로 보존된 아미노산은 OAS1 기능 또는 효소 활성화에 대해 중요하거나 결정적인 부위를 시사한다. 역으로, 예를 들어 인간에서만 최근 돌연변이되거나 영장류에서 다수의 아미노산 치환을 나타내는 OAS1 아미노산 부위는 기능 또는 효소 활성화에 덜 중요한 부위이다. OAS1 단백질의 특정 모티프 내 돌연변이된 부위의 풍부성은 기능성 도메인의 변형에 대한 내성과 관련이 있다. 이러한 부위 및 모티프를 최적화하여 단백질 기능 또는 특이적 활성을 증진시켰다. 유사하게, OAS1과 같이 면역 또는 바이러스 방어 기능을 갖는 유전자 및 단백질에서의 돌연변이는 바이러스 감염에 의한 역사적 도전으로부터 유래한 것으로 가정한다. 영장류 OAS1 단백질에서의 돌연변이는 이러한 기반으로 항-바이러스 효능을 증진시키는 것으로 가정되고, 인간 치료적 OAS1 단백질의 최적화에 대한 기회이다.

[0204] 예시적인 실시양태에서, OAS1 내 특정 부위에 대한 선조 영장류 아미노산은 OAS1 단백질의 인간 치료 형태로 복구되어 단백질 특이 활성 또는 항-바이러스 효능을 최적화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 비-인간 영장류 OAS1에서 확인되지만 반드시 보존되지는 않는 대체 아미노산은 단백질 특이 활성 또는 항-바이러스 효능을 증진시키기 위해 OAS1의 인간 치료 형태로 치환된다. 천연 영장류 단백질 및 영장류-인간 하이브리드 형태 둘 다를 코딩하는 DNA 및 mRNA 서열은 신규하고 유용성을 갖는다. 이들의 유용성의 여러 예에는 이들 각각의 DNA 또는 mRNA 상대부를 검출하는 제제; 치료적 단백질의 제조에서 사용되는 발현 벡터; 및 각각의 mRNA에 결합하는 신규 화합물의 검출에서의 유용성이 있다.

[0205] 도 1은 OAS1의 치료 형태 (서열 1)를 제공한다. 추가의 치료 형태를 제공하기 위한 이러한 형태의 변형은 도 2에 제공된 하나 이상의 아미노산 변형을 사용하여 수행된다. 도 2에 기술된 바와 같이, 유용한 변형은 서열 1 및 OAS1의 다른 형태로부터 최초 메티오닌을 제거하는 것이다. 도 3에 나타난 바와 같이 추가로 변형시킨다. 도 2 및 3에 기술된 상기 변형은 또한 도 5에 제공된 다른 치료적 OAS1 이소형에도 적용된다. 도 3은 또한 진뱅크 서열 등록 번호 NP_002525.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1 단백질의 특정 변형 (예를 들어, 서열 3), 진뱅크 서열 등록 번호 NP_0058132.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1 단백질의 특정 변형 (예를 들어, 서열 2) 및 진뱅크 서열 등록 번호 NP_001027581.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1 단백질의 특정 변형 (예를 들어, 서열 4)을 제공한다. 도 4는 고릴라, 침팬지, 오랑우탄 및 짧은 꼬리 원숭이를 비롯한 비-인간 영

장류에서 확인된 예시적 돌연변이의 목록이다. 도 5는 본 발명의 진단적 및 치료적 목적에 유용한 추가의 인간 및 비-인간 영장류 OAS1 이소형, 및 본 발명에 기술된 특정 영장류 돌연변이의 목록이다.

[0206] 실시예 2

[0207] cDNA의 제조 및 서열분석

[0208] C형 간염 저항성 표현형을 갖는 환자로부터의 배양 림프모구 또는 섬유모세포로부터 전체 세포내 RNA를 정제하였다. 정제 절차는 문헌 [Chomczynski, et al., Anal. Biochem., 162:156-159 (1987)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 세포를 4.0 M 구아니딘 티오시아네이트, 0.1 M 트리스-HCl (pH 7.5) 및 0.1 M 베타-머캅토에탄올을 함유한 변성 용액 10 ml에 세포를 균질화시켜 세포 용해물을 형성하였다. 이어서, 나트륨 라우릴 사르코시네이트를 세포 용해물에 대해 최종 농도 0.5%로 혼합한 다음, 혼합물을 5000 X g로 실온에서 10분 동안 원심분리하였다. 전체 RNA를 함유하는 생성된 상층액을 5.7 M 염화세슘 및 0.01 M EDTA (pH 7.5)의 쿠션 상에 층을 이루게 올려놓고, 원심분리하여 펠렛화하였다. 0.1% 나트륨 도데실 술페이트 (SDS)를 함유한 10 mM 트리스-HCl (pH 7.6) 및 1 mM EDTA (TE)의 용액 중에 생성된 RNA 펠렛을 용해시켰다. 페놀클로로포름 추출 및 에탄올 침전 후에, 260 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정제된 전체 세포내 RNA 농도를 추정하였다.

[0209] 상기에서 제조된 전체 RNA를, 제1 가닥 합성용 역전사효소를 사용하고 cDNA를 5' 및 3' 단편으로 명명된 2개의 겹쳐진 단편으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 PCR하는 cDNA 합성에 대한 주형으로 사용하였다. 본 발명을 시행하는데 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 제작자의 지시서에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 381A DNA 신시사이저 상에서 합성하였다. 당업계에 공지된 방법을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 방법은 미국 특허 제4,683,192호, 동 제4,683,202호, 동 제4,800,159호 및 동 제4,965,188호, 및 문헌 [PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, New York (1989)]; 및 [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, et al., eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]를 비롯한 여러 문헌에 기술되어 있으며, 프라이머는 본원에 기술된 아미노산 변형 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 기초한다.

[0210] HCV 감염된 환자 및 HCV 감염되지 않은 환자의 PCR-증폭 DNA로부터 직접 결정된 서열을 분석하였다. 바이러스에 반복 노출되었음에도 불구하고, HCV에 대해 혈청반응 음성인 환자들에게서 OAS 유전자의 코딩 영역으로부터 상류에 돌연변이가 존재하는 것으로 검출할 수 있었다.

[0211] 특정 실시양태 및 실시예를 포함하는 상기 명세서는 본 발명을 예시하려는 것이지 제한하려는 의도가 아니다. 본 발명의 진정한 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서, 다수의 다른 변형 및 변형이 행해질 수 있다. 인용된 모든 특허, 특허 공보 및 비-특허 간행물이 그 거명을 통해 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 OAS1 단백질의 치료 형태의 아미노산 서열 (서열 1)이다.

[0056] 도 2는 OAS1의 모든 치료 형태에 유용한 아미노산 치환의 목록 표이다.

[0057] 도 3은 OAS1의 치료 형태에 유용한 영장류 OAS1 아미노산 변형의 목록 표이다. *로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_002525.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다. +로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_058132.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다. ^로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_001027581.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다.

[0058] 도 4는 영장류 OAS1 유전자의 돌연변이 위치 및 상응하는 아미노산 변형을 나타내는 표이다.

[0059] 도 5는 인간 및 비-인간 영장류 형태를 포함하는, 본 발명의 추가 OAS1 이소형의 목록이다. 또한, 영장류 이소형의 돌연변이가 제공된다. 이들 이소형은 단독으로 또는 본 발명에서 확인되는 임의의 돌연변이와 함께 진단제, 치료제 및 본원에 기술된 다른 목적에 유용하다.

도면

도면1

OAS1의 바람직한 치료 형태

서열 1

```

1   MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK 60
61   GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE 120
121  VQAPRWGNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGSYKPNFQIYVKLIEECTDL 180
181  QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGLPPQYALELLTVYAW 240
241  ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD 300
301  PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPFCFKNWDGSPVSSWILL 346
    
```

도면2

OAS1의 치료 형태에 유용한 아미노산 치환 목록

위치	아미노산 치환
1	M 또는 - (결실)
31	D 또는 N
115	L 또는 F
127	G 또는 R
162	S 또는 G
295	R 또는 T
315	G 또는 R

도면3A

OAS1의 치료 형태에 유용한 영양류 아미노산 변형 목록

위치	아미노산 치환
24	Lys 또는 Thr
25	His 또는 Cys
28	Thr 또는 Lys 또는 Met
36	Thr 또는 Ile
47	Gln 또는 Arg
53	Ala 또는 Val
54	Arg 또는 Cys
54	Arg 또는 His 또는 Cys
64	Phe 또는 Ser
69	Ala 또는 Thr
69	Ala 또는 Ser 또는 Thr
74	Ile 또는 Ser
104	Lys 또는 Arg
108	Val 또는 Ala
112	Glu 삽입
113	Ser 또는 Arg
114	Ile 또는 Ala
116	Arg 또는 Ser 또는 Ala
117	Glu 또는 Val
118	Val 또는 Lys
119	종결 또는 Phe
127	Asp 또는 Gly
130	Cys 또는 Arg
139	Phe 또는 Leu
142	Arg 또는 Gly
160	Ile 또는 Thr
161	Asp 또는 Gly
166	Asp 또는 Asn
175	Lys 또는 Glu
179	Tyr 또는 Asp
200	Glu 또는 Gln
226	Pro 삽입
242	Gln 또는 Arg
246	Glu 또는 Lys
248	Asp 또는 His
250	Ile 또는 Asn
254	Glu 또는 Gly
274	Val 또는 Lys
279	Glu 또는 Lys
282	Ser 또는 Ile
284	Lys 또는 Glu
288	Ser 또는 Arg
289	Arg 또는 Arg
292	Glu 또는 Thr

도면3B

292	Arg 또는 Thr
292	Ser 또는 Thr
314	Ile 또는 Lys
335	중결 또는 Trp
347+	Thr 또는 Ala
347^	Pro 또는 Thr
349+	Ser 또는 Ser
350+	Asp 또는 Asn
352+	Gly 또는 Glu 또는 Ala
353+	Arg 또는 Asp
354+	중결 또는 Asp
356+	Ser 또는 Thr
357+	Tyr 또는 Asp
361+	Met 또는 Arg
361^	Glu 또는 Gly
363*	Lys 또는 Glu
363+	Pro 또는 Gln
364+	Gln 또는 Lys
364^	Val 또는 Leu
365+	His 또는 Tyr
369+	Gln 또는 Arg 또는 Gly
371+	Tyr 또는 His
372^	Ala 또는 Ala
373+	Cys 또는 Tyr
374+	Ser 또는 Pro
375+	Tyr 또는 His
378+	Gln 또는 His
379+	Ser 또는 Arg
382+	Ile 또는 Thr
384^	His 또는 Gln
385 ^	Leu 또는 Phe
388+	Ala 또는 Thr
389+	Arg 또는 Pro
394+	Asn 또는 Asp
399^	Arg 또는 Ser

*: *로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_002525.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다 (예를 들어, 서열 3).

+: +로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_058132.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다 (예를 들어, 서열 2).

^: ^로 나타낸 위치는 진뱅크 서열 등록 번호 NP_001027581.1에 대해 카르복실-말단 상동성인 OAS1의 형태를 지칭한다 (예를 들어, 서열 4).

표시되지 않은 다른 모든 위치는 OAS1의 모든 형태를 지칭한다.

도면4A

[illegible]

OAS1 에서의 영양분 동연변이

[illegible]

아니도한 위치는 OASI의 모든 이소형 (예를 들어, 시열 1-4 및 진뱅크 시열 등록번호 NP 002525.1 및 NP 058132.1)에 대한 것이지만 예외적으로 *는 오직 NP 002525.1 상동성 형태에 대한 위치를 나타내며, *는 오직 NP 058132.1 상동성 형태에 대한 위치를 나타내며, *는 오직 NP 001027581.1 상동성 형태에 대한 위치를 나타낸다.

도면5A

본 발명의 추가 OAS1 이소형

서열 2 (뉴클레오타이드 종말점이 3914354,3926867인 NT_009775.15 염색체 12q24.1의 인간 OAS1 이소형 E18/p46)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLAESNSADDEDDPR
361 RYQKYGYIGTHEYPHFHSHRPSTLQAASTPQAEEDWTCTIL

```

서열 3 (뉴클레오타이드 종말점이 3914354,3925071인 NT_009775.15 염색체 12q24.1의 인간 OAS1 이소형 E16/p40)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHEA

```

서열 4 (뉴클레오타이드 종말점이 3914354,3927007인 NT_009775.15 염색체 12q24.1의 인간 OAS1 이소형 p48)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

```

도면5B

서열 5 (고릴라 OAS1 이소형 E18 상동체)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFTEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNATAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKFNWDGSPVSSWILLAESDSGR

```

서열 6 (고릴라 OAS1 이소형 E16 상동체)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFTEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNATAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKFNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHKA

```

서열 7 (고릴라 OAS1 이소형 p48 상동체)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFTEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNATAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLKKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPCKFNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLNASASWKGGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

```

서열 8 (보노보 OAS1 이소형 E18 상동체)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFTEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLIGGYKPDFQIYVKLIECTY

```


도면5C

181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYA
241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPFCFKNXDGSPVSSWILLAESDSADDETD
361 RRYQKYGYIGTHEYPHFHSHRPSTLQAASAPQAEEDWTCTIL

서열 9 (보노보 OAS1 이소형 E16 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
121 EVQAPRWDNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKPDQIYVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYA
241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPFCFKNXDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPA
361 PLHEA

서열 10 (보노보 OAS1 이소형 p48 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRKQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
121 EVQAPRWDNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKPDQIYVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYA
241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPFCFKNXDGSPVSSWILLTQHTPGSIRPTGR
361 RGLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

서열 11 (서부침팬지 OAS1 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCQSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQREERAFSVKF
121 EVQAPRWDNPRALSFVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTDGYKPDQIYVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLQRPPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKLGKLPQYALELLTVYA
241 WEQGSMETDFNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIEKYLRRLTKPRPVIL
301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAEAWLNYPFCFKN

도면5D

서열 12 (침팬지 OAS1 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFQGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRQLEACQREERAFXVKF
121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPFDALGQLTDGYKPDPIYVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA
241 WEQGSMETDFNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIEKYLRRQLTKPRPVIL
301 DEADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPFCFKN

서열 13 (수마트라 오랑우탄 OAS1 단 이소형)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPARVSKVVK
61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQRESIFREV

서열 14 (수마트라 오랑우탄 OAS1 이소형 E18 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
121 VQAPRWDNPRALS FVLSSFQLXEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPDPIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIKKYLRSRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPGWRLAQEAELNYPFCFKNWDGSPVSSWILLAESDSEDDETYDPR
361 MYXKYGYIRTHEYSHFSHPSTLQAASTPQAEENWTCTIL

서열 15 (수마트라 오랑우탄 OAS1 이소형 E16 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
121 VQAPRWDNPRALS FVLSSFQLXEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPDPIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIKKYLRSRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPGWRLAQEAELNYPFCFKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHEA

서열 16 (수마트라 오랑우탄 OAS1 이소형 p48 상동체)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK

도면5E

```

61  GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
121  VQAPRWDNPRALS FVLSSFQLXEGVEFDVLPAPFDALGQLTGGYKPDPIYVKLIEECTDL
181  QKEGEFSTCFTELQRDFLKRPTKLSLIRLVKHWYQNCCKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241  ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIKYLSRQLKKPRPVILD
301  PADPTGNLGGGDFIGWRQLAQEAELNYPCEKNWDGSPVSSWILLPQHTPGSIHPTGRR
361  ELDVHHPNLNASASWGKGLQCYLDHLLHFQVGLLIQRGQRSSVSWCIQDRTQVS

```

상기 서열에서, X는 하기 표에 기술된 변이 아미노산을 나타낸다.

서열	아미노산 위치	대체 아미노산
서열 8	336	W 또는 C
서열 9	336	W 또는 C
서열 10	336	W 또는 C
서열 12	117	S 또는 A
서열 14	113	S 또는 R
서열 15	113	S 또는 R
서열 16	113	S 또는 R
서열 14	114	I 또는 A
서열 15	114	I 또는 A
서열 16	114	I 또는 A
서열 14	116	R 또는 S
서열 15	116	R 또는 S
서열 16	116	R 또는 S
서열 14	117	E 또는 V
서열 15	117	E 또는 V
서열 16	117	E 또는 V
서열 14	118	V 또는 K
서열 15	118	V 또는 K
서열 16	118	V 또는 K
서열 14	119	종결 또는 F
서열 15	119	종결 또는 F
서열 16	119	종결 또는 F
서열 14	142	R 또는 G
서열 15	142	R 또는 G
서열 16	142	R 또는 G
서열 14	363	P 또는 Q

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Illumigen Biosciences Inc.

<120> MUTATIONS IN OAS1 GENES

<130> 55382-52

<140> PCT/US06/016983

<141> 2006-05-03

<150> 60/677,680

<151> 2005-05-04

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15

Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20 25 30

Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60

Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65 70 75 80

Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85 90 95

Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
100 105 110

Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
115 120 125

Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
130 135 140

Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
145 150 155 160

Gly Ser Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
165 170 175

Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
180 185 190

Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
195 200 205

Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210 215 220

Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225 230 235 240

Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245 250 255

Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260 265 270

Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275 280 285

Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro

290 295 300
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
 305 310 315 320

Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
 325 330 335
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu
 340 345

<210> 2
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
 260 265 270
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg

275 280 285
 Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
 290 295 300
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
 305 310 315 320

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

 Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile Leu
 385 390 395 400

<210> 3
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
 195 200 205
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly

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

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

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

<210> 4
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

180	185	190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu		
195	200	205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly		
210	215	220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp		
225	230	235
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg		
245	250	255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp		
260	265	270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg		
275	280	285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro		
290	295	300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala		
305	310	315
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp		
325	330	335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro Gly		
340	345	350
Ser Ile His Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro Leu		
355	360	365
Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp Gln		
370	375	380
Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser		
385	390	395
Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser		
405	410	

<210> 5
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Gorilla gorilla

<400> 5

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20 25 30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35 40 45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60
Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65 70 75 80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85 90 95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu

100 105 110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
115 120 125

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

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

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

Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325 330 335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser Gly
340 345 350
Arg

<210> 6
<211> 364
<212> PRT
<213> Gorilla gorilla

<400> 6
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20 25 30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35 40 45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60

Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Gorilla gorilla

<400> 7
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser
385 390 395 400
Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser
405 410

<210> 8
<211> 401

<212> PRT

<213> Pan paniscus

<220>

<221> VARIANT

<222> 336

<223> Xaa is Trp or Cys

<400> 8

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15

Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His
20 25 30

Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60

Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65 70 75 80

Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85 90 95

Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu
100 105 110

Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
115 120 125

Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
130 135 140

Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
165 170 175

Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr
180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
195 200 205

Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu
210 215 220

Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
225 230 235 240

Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe
245 250 255

Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
260 265 270

Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
275 280 285

Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
290 295 300

Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
305 310 315 320

Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa

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

 Gln Ala Ala Ser Ala Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 Leu

<210> 9
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Pan paniscus

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 336
 <223> Xaa is Trp or Cys

<400> 9
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
 195 200 205

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

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

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

<210> 10
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Pan paniscus

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 336
 <223> Xaa is Trp or Cys

<400> 10
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

 Gln Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser
 405 410 415

<210> 11

<211> 335

<212> PRT

<213> Pan troglodytes verus

<400> 11

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

50	55	60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val		
65	70	75
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly		
	85	90
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu		
	100	105
Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp		
	115	120
		125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu		
	130	135
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu		
145	150	155
Thr Asp Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu		
	165	170
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr		
	180	185
		190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser		
	195	200
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu		
210	215	220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala		
225	230	235
Trp Glu Gln Gly Ser Met Glu Thr Asp Phe Asn Thr Ala Gln Glu Phe		
	245	250
		255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr		
	260	265
Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu		
	275	280
Arg Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp		
290	295	300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu		
305	310	315
		320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn		
	325	330
		335

<210> 12

<211> 335

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<220>

<221> VARIANT

<222> 117

<223> Xaa is Ser or Ala

<400> 12

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile

1	5	10	15
Glu Asp Tyr	Leu Leu Pro	Asp Lys Cys Phe	Arg Lys Gln Ile Asn His
	20	25	30
Ala Ile Asp	Ile Ile Cys Gly	Phe Leu Lys Glu Arg	Cys Phe Gln Gly
	35	40	45
Ser Ser Tyr	Pro Val His Val	Ser Lys Val Val	Lys Gly Gly Ser Ser
	50	55	60
Gly Lys Gly	Thr Thr Leu Arg	Gly Arg Ser Asp	Ala Asp Leu Val Val
65	70	75	80
Phe Leu Ser	Pro Leu Thr Thr	Phe Gln Asp Gln	Leu Asn Arg Arg Gly
	85	90	95
Glu Phe Ile	Gln Glu Ile Arg Arg	Gln Leu Glu Ala	Cys Gln Arg Glu
	100	105	110
Glu Arg Ala	Phe Xaa Val Lys Phe	Glu Val Gln Ala	Pro Arg Trp Asp
	115	120	125
Asn Pro Arg	Ala Leu Ser Phe	Val Leu Ser Ser	Leu Gln Leu Gly Glu
130	135	140	
Gly Val Glu	Phe Asp Val Leu	Pro Ala Phe Asp	Ala Leu Gly Gln Leu
145	150	155	160
Thr Asp Gly	Tyr Lys Pro Asp	Pro Gln Ile Tyr	Val Lys Leu Ile Glu
	165	170	175
Glu Cys Thr	Tyr Leu Gln Lys	Glu Gly Glu Phe	Ser Thr Cys Phe Thr
	180	185	190
Glu Leu Gln	Arg Asp Phe Leu	Lys Gln Arg Pro	Thr Lys Leu Lys Ser
	195	200	205
Leu Ile Arg	Leu Val Lys His	Trp Tyr Gln Asn	Cys Lys Lys Lys Leu
	210	215	220
Gly Lys Leu	Pro Pro Gln Tyr	Ala Leu Glu Leu	Leu Thr Val Tyr Ala
225	230	235	240
Trp Glu Gln	Gly Ser Met Glu	Thr Asp Phe Asn	Thr Ala Gln Glu Phe
	245	250	255
Arg Thr Val	Leu Glu Leu Val	Ile Asn Tyr Gln	Gln Leu Cys Ile Tyr
	260	265	270
Trp Thr Lys	Tyr Tyr Asp Phe	Glu Asn Pro Ile	Ile Glu Lys Tyr Leu
	275	280	285
Arg Arg Gln	Leu Thr Lys Pro	Arg Pro Val Ile	Leu Asp Pro Ala Asp
	290	295	300
Pro Thr Gly	Asn Leu Gly Gly	Gly Asp Pro Lys	Gly Trp Arg Gln Leu
305	310	315	320
Ala Gln Glu	Ala Glu Ala Trp	Leu Asn Tyr Pro	Cys Phe Lys Asn
	325	330	335

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Pongo pygmaeus abelii

<400> 13

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile

1					5					10					15				
Glu	Asp	Tyr	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	His	Phe	Arg	Met	Gln	Ile	Asn	His				
				20					25					30					
Ala	Ile	Asp	Thr	Ile	Cys	Gly	Phe	Leu	Lys	Glu	Arg	Cys	Phe	Arg	Gly				
				35					40					45					
Ser	Ser	Tyr	Pro	Ala	Arg	Val	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser				
				50					55					60					
Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Leu	Arg	Gly	Arg	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Val	Val				
65					70					75					80				
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Phe	Gln	Asp	Gln	Leu	Asn	Arg	Arg	Gly				
				85					90					95					
Glu	Phe	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Lys	Gln	Leu	Glu	Ala	Cys	Gln	Arg	Glu				
				100					105					110					
Ser	Ile	Phe	Arg	Glu	Val														
				115															

<210> 14
<211> 400
<212> PRT
<213> Pongo pygmaeus abelii

<220>
<221> VARIANT
<222> 113
<223> Xaa is Ser or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> 114
<223> Xaa is Ile or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> 116
<223> Xaa is Arg or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 117
<223> Xaa is Glu or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa is Val or Lys

<220>
<221> VARIANT

<222> 119
<223> Xaa is Phe or term

<220>
<221> VARIANT
<222> 142
<223> Xaa is Arg or Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> 363
<223> Xaa is Pro or Gln

<400> 14
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20 25 30
Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35 40 45
Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60

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

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

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

Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260 265 270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Leu Ser
275 280 285

Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
 290 295 300
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Ile Gly Trp Arg Gln Leu Ala
 305 310 315 320

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

Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asn Trp Thr Cys Thr Ile Leu
 385 390 395 400

<210> 15
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Pongo pygmaeus abelii

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 113
 <223> Xaa is Ser or Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 114
 <223> Xaa is Ile or Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 116
 <223> Xaa is Arg or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 117
 <223> Xaa is Glu or Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 118
 <223> Xaa is Val or Lys

<220>

<221> VARIANT
 <222> 119
 <223> Xaa is Phe or term

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 142
 <223> Xaa is Arg or Gly

<400> 15
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60

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

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

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

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

Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325 330 335

Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser
340 345 350

Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala
355 360

<210> 16
<211> 414
<212> PRT
<213> Pongo pygmaeus abelii

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 113
<223> Xaa is Ser or Arg
```

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 114
<223> Xaa is Ile or Ala
```

<220>
<221> VARIANT
<222> 116
<223> Xaa is Arg or Ser

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 117
<223> Xaa is Glu or Val
```

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa is Val or Lys
```

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa is Phe or term
```

```
<220>
<221> VARIANT
<222> 142
<223> Xaa is Arg or Gly
```

<400> 16

```

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

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

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

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

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

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

```

Leu	Leu	His	Phe	Gln	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Gln	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser
385					390				395						400
Ser	Val	Ser	Trp	Cys	Ile	Ile	Gln	Asp	Arg	Thr	Gln	Val	Ser		
				405					410						