	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0034150 (43) 공개일자 2014년03월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)		(71) 출원인 에이치아이비엠 리서치 그룹, 인코포레이티드 미국 캘리포니아 91311 체스트워스 #106 테번서 스트리트 21053
(21) 출원번호 10-2013-7023105	(22) 출원일자(국제) 2012년02월01일 심사청구일자 없음	(72) 발명자 다비쉬, 대니얼 미국 캘리포니아 91403 셔먼 오크스 #104 노블 애비뉴 4430
(85) 번역문제출일자 2013년08월30일	(86) 국제출원번호 PCT/US2012/023536	볼즈-아유브, 야디라 미국 캘리포니아 91360 우드랜드 힐스 #104 빅토리 블러버드 22330
(87) 국제공개번호 WO 2012/106465 국제공개일자 2012년08월09일	(30) 우선권주장 61/438,585 2011년02월01일 미국(US)	(74) 대리인 특허법인아주양현

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **시알산 생성을 증가시키고 시알릭 관련 질환 병증을 치료하기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요약

피험체의 세포에서 UDP-GlcNAc 2-에피머라제/ManNAc 키나제 효소(GNE) 펩타이드를 발현하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 발현 작제물을 상기 피험체의 세포에게 전달하는 단계를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖고, 상기 피험체의 세포에게 전달 시, 상기 핵산 발현 작제물은 상기 GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편의 발현을 개시하는 것인 방법이 본원에 개시되어 있다. 또한, 세포에서 GNE 펩타이드를 제조하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 작제물로 상기 세포를 감염시키는 단계를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 방법이 개시되어 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

피험체의 세포에서 UDP-GlcNAc 2-에피머라제/ManNAc 키나제 효소(UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase enzyme: GNE) 펩타이드를 발현하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 발현 작제물(construct)을 상기 피험체의 세포에게 전달하는 단계를 포함하되, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖고, 상기 피험체의 세포에게 전달 시, 상기 핵산 발현 작제물은 상기 GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편의 발현을 개시하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단리된 핵산 발현 작제물은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 기재된 서열을 갖는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 피험체의 세포는 피험체의 사지에 있는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 전달 단계는 일시적인 혈관 폐쇄와 공조하는 혈관 전달 방법을 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 전달 단계는

- a) 유체를 혈관내 접근을 통해 상기 피험체의 사지에 점적하는 단계로서, 상기 점적된 유체는 핵산 발현 작제물을 포함하고, 상기 점적된 유체는 사지 골격근 또는 표적 조직을 통해 관류하는 것인 단계; 및
- b) 상기 점적된 유체의 용적을 증가시킴으로써 증가된 혈관내 및 조직내 압력을 가하는 단계를 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 핵산 발현 작제물은 단일 용량으로 전달되는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단일 용량은 점적되는 전체 용적과 무관하게 특정 농도의 생성물을 포함하거나, 점적되는 전체 용적과 무관하게 특정 물량의 생성물을 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 단리된 핵산 발현 작제물은 형질감염 촉진 프로모터/인핸서(enhancer)를 추가로 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질감염 촉진 폴리펩타이드는 시알산을 생성할 수 있는 효소적으로 활성인 폴리펩타이드를 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단리된 핵산 발현 작제물에 의해 발현되는 상기 형질감염 촉진 폴리펩타이드 또는 재조합 폴리펩타이드는 GNE의 고차유전자 형태(hypermorphic form)를 손상시켜 예상량보다 더 많은 시알산 N-아세틸뉴라미네이트를 생성하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 피험체의 세포는 이배체 세포를 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 피험체의 세포는 근육 세포를 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 피험체는 인간, 방주 동물, 식용 동물 또는 노역용 동물을 포함하는 것인 GNE 펩타이드의 발현방법.

청구항 14

서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 기재된 서열을 갖는 단리된 핵산 분자.

청구항 15

코딩된 GNE 효소를 전달하는 방법으로서,

- a) 피험체의 사지의 무릎 또는 팔꿈치 아래 지점에서의 정맥내 접근을 생성하는 단계;
- b) 정맥내 접근점보다 피험체의 신체의 나머지에 가까운 지점에 지혈대를 적용하는 단계; 및
- c) 정맥내 접근을 통해 상기 사지에 단리된 핵산 발현 작제물의 단일 용량을 도입하는 단계를 포함하되,

상기 단일 용량은 폴리뉴클레오타이드의 유출(extravasation)에 대한 혈관내 압력을 증가시키기에 충분한 용적이며,

상기 단리된 핵산 작제물은 GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 코딩된 GNE 효소의 전달방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 단리된 핵산 작제물은 형질감염 촉진 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 GNE 효소의 전달방법.

청구항 17

세포에서 GNE 펩타이드를 제조하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 작제물로 상기 세포를 감염시키는 단계를 포함하되, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 GNE 효소의 전달방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포 또는 박테리아 세포인 것인 GNE 효소의 전달방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 단리된 핵산 발현 작제물은 서열 번호 1 또는 서열 번호 2에 기재된 서열을 갖는 것인 GNE 효소의 전달방법.

명세서

기술분야

관련 출원

본 출원은 2012년 2월 1일에 다르비쉬(Darvish) 등의 미국 가출원 제61/438,585호에 대한 우선권을 주장하고, 도면을 비롯하여 이의 전체 개시내용은 본원에 참조문헌으로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 시알산 생합성의 중요한 효소(UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라제/N-아세틸만노사민 키나제, GNE)의 DNA 코딩 구역을 전달함으로써 생물학적 시스템에서의 시알산의 생성을 증가시키기 위한 유전자 치료 방법 및 조성물의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 유전적 내세포 근육병(Hereditary Inclusion Body Myopathy: HIBM)은 심각한 신체 무력화를 야기하는 청소년 발병 진행성 골격근 소모성 장애이다. 현재 HIBM에 효과적인 치료학적 치료법이 없다. HIBM은 GNE 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기되는 상염색체 열성 장애이다. 상기 GNE 유전자는 2작용성 효소 UDP-GlcNAc 2-에피머라제/ManNAc 키나제(GNE/MNK)를 코딩한다. 이는 세포 시알산 생성의 처음 2개의 반응을 촉매하는 중요한 속도 결정 효소이다. 시알산 생성 감소는 결과적으로 α -디스트로글라이칸(α -DG), 신경 세포 접착 분자(neural cell adhesion molecule: NCAM) 또는 네프틸리신과 같은 중요한 근육 단백질을 비롯한 다양한 당단백질의 시알릴화를 감소시키거나, 강글리오사이드(GM3) 신타아제와 같은 다른 유전자의 발현을 변형시킨다. 이는 결국 근 변성을 야기한다. HIBM은 또한 공포(Rimmed Vacuole)를 수반하는 원위 근육병(Distal Myopathy), 노나카 근육병(Nonaka Myopathy), 사두근을 조금만 쓰는 공포성 근육병(Vacuolar Myopathy) 또는 GNE 관련 근육병으로 공지되어 있다.

발명의 내용

[0006] 피험체의 세포에서 UDP-GlcNAc 2-에피머라제/ManNAc 키나제 효소(GNE) 펩타이드를 발현하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 발현 작제물(construct)을 상기 피험체의 세포에게 전달하는 단계를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖고, 상기 피험체의 세포에게 전달 시, 상기 핵산 발현 작제물은 상기 GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편의 발현을 개시하는 것인 방법이 본원에 개시되어 있다.

[0007] 코딩된 GNE 효소를 전달하는 방법으로서, a) 피험체의 사지의 무릎 또는 팔꿈치 아래 지점에서의 정맥내 접근을 생성하는 단계; b) 정맥내 접근점보다 피험체의 신체의 나머지에 가까운 지점에 지혈대를 적용하는 단계; c) 정맥내 접근을 통해 상기 사지에 단리된 핵산 발현 작제물의 단일 용량을 도입하는 단계로서, 상기 단일 용량은 폴리뉴클레오타이드의 유출(extravasation)에 대한 혈관내 압력을 증가시키기에 충분한 용적인 것인 단계를 포함하고; 상기 단리된 핵산 작제물은 GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 방법이 또한 개시되어 있다.

[0008] 추가로, 세포에서 GNE 펩타이드를 제조하는 방법으로서, GNE 펩타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 작제물로 상기 세포를 감염시키는 단계를 포함하고, 상기 GNE 펩타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 방법이 개시되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본원에 기재된 NTC8685-GNE 발현 벡터의 다이어그램;

도 2는 NTC8685-GNE 벡터의 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 1)을 도시한 도면;

도 3은 UMVC3-GNE 벡터의 다이어그램;

도 4는 UMVC3-GNE 벡터의 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 2)을 도시한 도면;

도 5는 GNE 단백질 효소의 아미노산 서열(서열 번호 3)을 도시한 도면;

도 6은 GNE 동형단백질 및 알로스테릭 도메인의 아미노산 서열을 도시한 도면. 더 많은 시알산 생산을 허용하는 공통 알로스테릭 도메인 돌연변이가 예시되어 있다(R263Q/W/L 및 R266Q/W);

도 7은 GNE 무(null) CHO 세포에서의 시알산 생성의 막대 그래프이다. 비처리 세포("배지", "빈 벡터")와 비교 시, 시알산 생성이 GNE 플라스미드로 형질감염된 세포에서 상당히 많았다;

도 8은 UMVC3 및 NTC8685 벡터와 비교한 시알산 GNE 무 CHO 세포의 막대 그래프;

도 9는 UMCV3 및 NTC8685 벡터와 비교한 GNE 무 CHO 세포의 시알산 함량 세포 분석의 막대 그래프;

도 10은 ManNAc에 대한 GNE 벡터의 상대 실험실내 용량 비교를 나타낸 막대 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 시알산 생합성의 중요한 효소(UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라제/N-아세틸만노사민 키나제, GNE)의 DNA 코딩 구역을 전달함으로써 생물학적 시스템에서 시알산 생성을 증가시키기 위한 유전자 치료 방법 및 조성물이 본원에 개시되어 있다. 세포 시알릭 생성 증가 또는 GNE 기능 증대로부터 이익을 얻을 수 있는 질환 병증으로는 유전적 내세포 근육병(HIBM) 또는 공포를 수반하는 원위 근육병(DMRV)을 들 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 방법 및 조성물은 또한 인간 세포 또는 조직으로부터 비인간 시알산(예를 들면, N-글라이코실뉴라미네이트, Neu5Gc)을 감소시키거나 제거하는 것에 관한 것이다. 비인간 시알산은 다양한 인간 질환의 원인이 될 수 있고, 비인간 시알산의 세포 수준의 장기간 감소는 이러한 질환 과정을 예방하고 치료하는 데 유리한 것으로 밝혀질 수 있다(WO/2010/030666)(Varki 2009). 아세틸뉴라미네이트(Neu5Ac)의 세포 생성 증가는 비인간 시알산의 세포 함량을 감소시킬 수 있다.
- [0011] 본 발명자들은, 개인적으로 HIBM에 의해 이환되면서, 지난 7년에 걸친 실험실내 연구를 통해 유전자 치료 벡터(플라스미드, 네이키드 폴리핵산)를 개발하고 검증하였다. 수년간의 의학 문헌 조사 및 다양한 실험실내 전달 방법 및 벡터에 관한 데이터의 평가를 통해, "비어 블록(Bier Block)"으로 공지된 절차의 변형을 이용하는 세련되고 손쉬운 전달 방법을 선택하였다. 비어 블록은 100년 넘도록 의료 행위에서 안전하게 사용되어 왔다(dos Reis 2008).
- [0012] 하기 기재된 바대로, 특정한 질환 과정, 플라스미드 및 전달 방법의 조합은 현재까지 기술된 어떤 다른 것보다 여러 이점을 갖는다. 이러한 이점은 인간 및 동물 모델에서의 실제 사용에 손쉬운 변형을 허용한다.
- [0013] 약리학적 생성물의 성분 및 동물 또는 인간 환자(예를 들면, HIBM으로 이환된 환자)의 골격근 또는 다른 장기(예를 들면, 간)에 약리학적 생성물을 전달하는 방법이 본원에 개시되어 있다. 약리학적 생성물은 GNE 단백질, 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열의 비변형된 또는 변형된 형태를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 GNE 뉴클레오타이드의 비변형된 또는 변형된 형태에 의해 코딩되는 재조합 단백질, 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 전달 방법은 (1) 표적 장기 시스템, 장기/조직 군 또는 신체 부위의 혈관 분리를 성취하기 위한 주요 혈관(동맥, 정맥 및/또는 림프계)의 외부 또는 내부 폐쇄 및 (2) 혈관(예를 들면, 정맥 내) 접근을 이용하는 치료학적 생성물의 투여를 포함한다. 몇몇 실시양태에서는, 분리된 신체 장기/조직/부위(표적 장기)가 전달하고자 하는 화합물에 노출되는 반면, 다른 실시양태에서는, 신체 장기/조직/부위가 이러한 노출로부터 보호된다.
- [0014] 치료학적 유전자(GNE)의 설명 및 개선
- [0015] 몇몇 실시양태에서, 본원에 개시된 치료학적 생성물은 폴리뉴클레오타이드(DNA) 분자이고, 다른 실시양태에서, 이는 폴리펩타이드(단백질, 단백질 단편, 아미노산 서열) 분자이다. 몇몇 실시양태에서, 선형 또는 원형 중 어느 하나인 폴리뉴클레오타이드 분자는 또한 GNE 단백질 또는 생물학적 시스템 내에 생물학적으로 활성이거나 활성이 되는 GNE 단백질의 변형된 형태를 코딩하는 코딩 서열 이외의 다양한 구성요소를 포함할 수 있다. GNE 단백질은 서열을 갖는다(도 3).
- [0016] 몇몇 실시양태에서, 본원에 개시된 치료학적 방법은 보통 "유전자 치료"로서 공지되어 있고, 상기 폴리뉴클레오타이드 분자의 투여를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 치료학적 방법은 보통 "효소 대체 치료(Enzyme Replacement Therapy: ERT)"로 공지되어 있고, GNE 단백질 또는 생물학적 시스템 내에 생물학적으로 활성이거나 활성이 되는 GNE 단백질의 변형된 형태의 투여를 포함한다.
- [0017] GNE는 시알산 생성의 중요한 효소(UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라제/N-아세틸만노사민 키나제)를 코딩한다. 몇몇 질환 병증은 GNE의 발현 증가로부터 이익을 얻을 수 있다. GNE 관련 근육병으로 공지된 심각하게 쇠약하게 하는 진행성 근육 소모성 장애, 유전적 내세포 근육병(HIBM) 및 IBM2로 공지된 이와 구별되는 형태 중 하나, 또는 공포를 수반하는 원위 근육병(DMRV)이 가장 주목할 만하다.
- [0018] GNE 유전자의 원하는 기능을 증대시키고 원치않는 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 GNE 효소 성분 또는 도메인(예를 들면, 일련의 10개 이상의 서열 아미노산)을 재조합할 수 있다. 예를 들면, 원핵생물 또는 진핵생물과 같은 생물학적 유기체에서 많은 양의 시알산(NeuAc) 생성이 바람직한 경우, 알로스테릭 억제 도메인 기능을 제거하거나 감소시키기 위해 GNE 유전자의 에피머라제 도메인을 최적화할 수 있다. ManNAc의 인산화를 효과적으로

수행할 수 있는 다른 효소와 같은 과잉 ManNAc 키나제 활성을 갖는 유기체 및 동물에서, 또한 GNE 키나제 도메인을 감소시키거나 제거하여 생물학적 시스템에서 크기, 최소 유효량을 감소시키고/시키거나 최대 내성 용량을 최대화할 수 있다.

[0019] GNE 효소 또는 이의 다양한 성분 또는 도메인이 또한 시알산 생성 이외의 세포 기능을 갖는 것으로 공지되어 있다(라도(Hinderlich, Salama et al. 2004; Broccolini, Gliubizzi et al. 2005; Krause, Hinderlich et al. 2005; Salama, Hinderlich et al. 2005; Penner, Mantey et al. 2006; Wang, Sun et al. 2006; Amsili, Shlomai et al. 2007; Amsili, Zer et al. 2008; Kontou, Weidemann et al. 2008; Kontou, Weidemann et al. 2009; Paccalet, Coulombe et al. 2010), 중요한 세포 분자의 저시알틸화(hyposialylation)는 인간 질환 과정에서 중요한 역할을 한다(Huizing, Rakocevic et al. 2004; Noguchi, Keira et al. 2004; Saito, Tomimitsu et al. 2004; Tajima, Uyama et al. 2005; Ricci, Broccolini et al. 2006; Galeano, Klootwijk et al. 2007; Sparks, Rakocevic et al. 2007; Nemunaitis, Maples et al. 2010).

[0020] 생물학적 시스템에서 시알산 및 NeuAc/NeuGc 비율을 증가시키는 것이 인간 피험체에서 몇몇 공지된 이유로 바람직하다. 포유동물은 (1) N-아세틸뉴라민산(NANA 또는 Neu5Ac) 및 (2) N-글라이코실뉴라민산(Neu5Gc)의 2종의 상이한 시알릭 분자를 생성한다. CMP-NANA는 CMP-NANA 하이드록실라제(CMAH)에 의해 CMP-Neu5Gc로 전환된다. 다른 영장류 및 포유동물(소 포함)과 달리, 인간은 CMAH의 Alu 매개 불활성화 돌연변이로 인해 Neu5Gc가 유전적으로 결핍된다(Chou, Hayakawa et al. 2002). 따라서, Neu5Ac는 인간에 의해 생성되는 유일한 시알산이고, 많은 인간은 Neu5Gc에 대한 항체를 생성한다(Tangvoranuntakul, Gagneux et al. 2003). 인간 조직 및 세포에서 발견되는 NeuGc는 식품 또는 세포 배양 배지로부터 유래하는 것으로 생각된다. 인간은 만성 염증 및 만성 염증이 중요한 인자인 것으로 생각되는 다양한 혼란 장애(예를 들면, 암, 죽상동맥경화증, 자가면역 장애)의 잠재적 원인인 NeuGc에 대한 항체를 생성한다(Hedlund, Padler-Karavani et al. 2008; Varki 2009). NeuGc는 또한 용혈성 요독 증후군(hemolytic-uremic syndrome: HUS)과 같은 인간 질환을 촉진할 수 있다. HUS의 주원인은 시가 독소발생 에스체리치아 콜라이(STEC: Shiga toxinogenic Escherichia coli) 감염이다. 고독성 시가 독소 서브틸라제 세포독소(SubAB)는 글라이칸에 대한 결합을 선호하여 NeuGc가 된다(Lofling, Paton et al. 2009). 이러한 정보는 NeuGc가 또한 몇몇 감염 물질에 대한 인간 감수성을 증가시킬 수 있다는 본 발명자들의 염려를 증가시킨다.

[0021] 따라서, 식품에서 NeuAc(인간 시알산)의 함량을 증가시키고, 식육제품 및 유가공품에서 발견되는 NeuGc의 비율을 감소시키는 것이 바람직하다. 이를 성취하기 위한 가능한 효과적인 방법은 GNE 발현을 증가시키고, 인간 또는 동물 식품(예를 들면, 유가공품, 식육제품, 유제품 및 다른 동물성 제품) 중 어느 하나에서 사용되는 생물학적 시스템 또는 유기체에서의 CMAH 발현을 감소시키거나 제거하는 것이다. CMAH 넷아웃(knock-out) 또는 넷다운(knock-down) 동물을 생성하기 위한 동물의 유전 변형, (억제 RNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 표현되는) 폴리뉴클레오타이드 기술에 의한 CMAH 효소 발현의 억제 또는 대사성 기질 유사체에 의한 CMAH 효소의 억제(이들로 제한되지는 않음)를 비롯한 유전공학 또는 대사공학 중 어느 하나에 의해 CMAH를 감소시킬 수 있다. NeuGc를 NeuAc로 전환하는 효소의 과발현에 의해 NeuGc는 생물학적 시스템에서 또한 감소될 수 있다.

[0022] 몇몇 예외로, 식물은 통상적으로 시알산을 생성하지 않는다. GNE 및 다른 시알산 경로 효소를 식물, 채소 및 유실 작물에서 사용하여 식품에서의 시알산을 증가시킬 수 있다.

[0023] 약물학적 산업, 식품 산업 및 화장품 산업(이들로 제한되지는 않음)을 비롯한 생명공학의 다양한 분야에서 바람직할 수 있는 다양한 조직/장기 또는 발육 단계에서의 발현을 증대시키기 위해 폴리뉴클레오타이드 구성요소(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 반복 구성요소)의 변형, 삽입 및/또는 제거를 이용할 수 있다.

[0024] 골격근이 용이하게 접근 가능하고 고도로 혈관화되는 중요한 조직이므로, 치료학적 가치를 갖는 단백질을 생성하기 위한 공장으로서 사용될 수 있다(문헌(Lu, Bou-Gharios et al. 2003; Ratanamart and Shaw 2006)에서 확인됨). 사실, 기능성 치료학적 단백질이 골격근에 의해 합성될 수 있고 혈우병, 품피병, 파브리병, 빈혈, 폐기종 및 가족성 고콜레스테롤혈증과 같은 장애와 관련된 병인론을 경감시키기에 충분한 양으로 혈류로 분비될 수 있다는 것이 입증되었다. 골격근에서 재조합 단백질을 발현하는 능력은 또한 뒤시엔느(Duchenne) 및 지대형 근이영양증과 같은 신경증 장애의 치료에 중요한 쟁점이다. 이러한 장애는 필수 근육 단백질을 생성하는 유전자의 돌연변이에 의해 야기된다. 이러한 장애의 하나의 가능한 치료는 유전자 도입으로, 이의 목적은 돌연변이된 유전자의 정상 및 기능성 카피를 근육에 도입하는 것이다.

[0025] 따라서, 일 양태에서, 시알산을 과생성하고 분비하는 단백질 공장으로서 근육을 사용하는 방법이 본원에 개시되어 있다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 혈장에서의 Neu5Ac 생합성을 증가시키고, 세포로부터 Neu5Gc 농도를 감소시킨다.

[0026] 치료학적 생성물의 설명 및 개선

- [0027] 몇몇 실시양태에서는, 치료학적 생성물이 폴리뉴클레오타이드인 반면, 다른 실시양태에서는, 치료학적 생성물이 폴리펩타이드이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 단백질에 대한 전장 코딩 구역, 단백질의 도메인에 대한 코딩 구역 또는 단백질의 인지되고 동정된 도메인보다 짧은 단백질 단편에 대한 코딩 구역을 포함할 수 있는 DNA 분자이다. 따라서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 적어도 15개의 염기쌍의 길이의 올리고머로부터 단백질에 대한 전장 코딩 구역을 포함하는 DNA 분자까지의 범위일 수 있다.
- [0028] 몇몇 실시양태에서는, 상기 폴리펩타이드가 전장 단백질, 예를 들면 효소 또는 수용체인 반면, 다른 실시양태에서는, 상기 폴리펩타이드가 단백질 단편이다. 몇몇 실시양태에서는, 상기 단백질 단편이 전장 단백질의 인지되고 동정된 도메인에 상응하는 반면, 다른 실시양태에서는, 상기 폴리펩타이드가 단백질의 인지되고 동정된 도메인보다 짧다. 따라서, 본원에 개시된 폴리펩타이드는 적어도 5개의 아미노산의 길이의 올리고머로부터 전장 단백질까지의 범위일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 단백질 단편은 치료학적 활성 단백질 단편이다. "치료학적 활성 단백질 단편"이란, 생리학적 조건 하에 단백질 단편이 야생형 GNE 단백질과 (예를 들면, 동일한 반응을 촉매하는) 동일한 생화학적 활성을 갖지만, 상이한 속도로 기능을 수행할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0029] 몇몇 실시양태에서는, 상기 폴리뉴클레오타이드가 선형 DNA 분자인 반면, 다른 실시양태에서는, 상기 폴리뉴클레오타이드가 원형 DNA 분자이다.
- [0030] 몇몇 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 원하는 생물학적 시스템에서 GNE 유전자를 발현할 수 있는 원형 DNA(플라스미드, 미니플라스미드 또는 미니서클)이다. 본 출원에 기재된 NTC8685 벡터는 크기 감소, 박테리아서열 함량 감소 및 항생제 비함유 선별과 같은 몇몇 이점을 갖는다. 당업자에게 공지된 다른 벡터를 또한 본원에 기재된 방법에 사용할 수 있다.
- [0031] 몇몇 실시양태에서, 선형이든 또는 원형이든 폴리뉴클레오타이드 치료학적 생성물을 다양한 양이온 또는 음이온 입자를 생성하는 다른 분자와 조합하여 네이키드 DNA(naked DNA)로서 투여하거나, 다른 약물학적 물질(예를 들면, 부형제, 혈관확장제, 진통제 등)과 병용 투여하여 치료 효율을 최대화하고 환자 불편함을 최소화한다. 폴리뉴클레오타이드 대신에, 기술된 전달 방법을 이용하여 다른 약물학적 생성물을 투여할 수 있다.
- [0032] 순 양의 제타 전위가 폴리뉴클레오타이드의 더 효과적인 세포 진입인 실험실내 연구와 달리, 골격근의 생체내 형질도입은 순 음전하를 갖는 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 더 효과적인 것으로 보인다(PCT WO/2004/062368).
- [0033] 일 실시양태에서, 이식유전자(transgene)에 대한 숙주 면역 반응의 기회를 감소시키고 이식유전자의 근육내 발현의 기간을 증대시키기 위해 근육 특이적 프로모터를 사용할 수 있다. 골격 플라스미드 구성요소를 변경하여 근육 특이적 발현을 허용할 수 있다. 골격근에서의 유전자 도입 후 고수준 및 장기간 재조합 단백질 발현을 성취하는 능력은 많은 질환 병증에서 바람직하다. 근육에 특이적인 프로모터 및 인핸서를 사용하여 이를 성취할 수 있다.
- [0034] 몇몇 상이한 근육 특이적 프로모터가 현재까지 기술되었다. 근육 크레아티닌 키나제(muscle creatine kinase: MCK) 프로모터 및 절두형이 사용되는 가장 흔한 근육 특이적 프로모터이다(Hauser, Robinson et al. 2000; Yuasa, Sakamoto et al. 2002; Sun, Zhang et al. 2005; Sebestyen, Hegge et al. 2007; Wang, Li et al. 2008). 합성 C5-12 프로모터 및 유사한 프로모터는 이식유전자의 고발현을 구동하면서 근육 특이적이 될 가능성을 나타낸다(Li, Eastman et al. 1999). 이 C5-12 프로모터는 AAV 벡터에서 유비쿼터스 CMV 프로모터와 유사한 발현 수준을 구동한다(Gonin, Arandel et al. 2005). MCK 인핸서(E-Syn 프로모터)를 첨가함으로써 C5-12가 추가로 개선될 수 있다(Wang, Li et al. 2008). 근육에서의 고발현에 하이브리드 α -미오신 중쇄 인핸서 프로모터/MCK 인핸서 프로모터(MHCK7) 프로모터를 또한 사용할 수 있다(Salva, Himeda et al. 2007). 또한 최근에 근육 세포에서 고수준 발현을 구동하거나 고수준으로 발현할 수 있는 근육 특이적 프로모터로서 데스민 프로모터가 기재되어 있다(Pacak, Sakai et al. 2008; Talbot, Waddington et al. 2010). 트로포닌 유전자와 같은 유전자의 업스트림 인핸서 구성요소(USE, USEx3/ Δ USEx3)가 또한 근육 특이적 프로모터를 개발하기 위한 유망한 후보 물질이다(WO 2008124934 20081023; Blain, Zeng et al. 2010).
- [0035] 본원에 개시된 바대로, GNE 코딩 서열 및/또는 이와 사용되는 관련 전달 비히클은 근육 세포, 근육 조직 등과 같은 특이적 세포 유형에 대해 표적될 수 있다. 예를 들면, 특이적 조직 또는 발육 단계에서만 GNE를 발현하도록 GNE 코딩 서열과 관련된 프로모터를 제조할 수 있다. 대안적으로, 발현 카세트를 다른 분자, 화합물 또는 생물학적 모이어티(예를 들면, 단백질/탄수화물/지질 함유 분자, 부분 또는 전체 항체 분자, 부분 또는 전체 사이토카인 분자, 바이러스 캡시드)와 캡핑하여 특이적 세포 유형에 결합하고 이에 진입하도록 설계된 생물학적

혼합물 또는 특이적 생물학적 입자를 생성할 수 있다. 이러한 결합 또는 친화도는 세포로의 DNA의 유입을 수월하게 할 수 있다. 근육으로의 전달을 위해, 특히 음이온 비리포솜 DNA 함유 입자가 매우 적합하다. 그러나, 양이온(리포솜) 및 다른 DNA 함유 생물학적 혼합물 또는 입자가 또한 손상된 세포벽을 갖는 근장애성 근육으로의 유입에 적합하다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 함유 분자 표적화 모어어터로는 미생물, 식물, 미생물 또는 합성 화합물(예를 들면, 항체, 사이토카인, 렉틴, 다른 대분자 또는 소분자)을 들 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0036] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드 생성물은 1) 선별 및 성장 과정의 목적을 위한 박테리아에서 활성인 박테리아 제어 구성요소, 2) 치료학적 유전자 생성물 또는 재조합 단백질의 발현의 목적을 위한 진핵생물 또는 포유동물 세포에서 활성인 진핵생물 제어 구성요소 및 3) 치료학적 유전자 생성물 또는 재조합 유전자인 GNE 코딩 구역의 구성요소를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 원핵생물/박테리아 선별 마커는 항생제 내성에 기초하거나(예를 들면, UMVC3 벡터에 제시된 것과 같은 카나마이신 내성, 도 3), RNA에 기초한다(예를 들면, NTC8685 벡터에 제시된 것과 같은 RNA-아웃, 도 1). 다른 실시양태에서, 효과적인 플라스미드 생성에 다른 구성요소를 사용한다(예를 들면, 도 3의 UMVC3 및 도 1의 NTC8684 둘 다에 도시된 pUC 원점). NTC8685-GNE 벡터의 뉴클레오타이드 서열이 도 2 및 서열 번호 1에 도시되어 있고, UMVC3-GNE 벡터의 뉴클레오타이드 서열이 도 4에 도시되어 있다. 추가의 실시양태에서, GNE 유전자에 의해 코딩되는 치료학적 단백질의 효과적인 전사 및 번역에 진핵생물 프로모터, 인핸서, 인트론 또는 다른 구성요소를 사용한다.

[0037] 항생제 내성의 가능한 확산을 최소화하기 위해, 세계보건기구(WHO), 미국 식품의약청(FDA) 또는 유럽 의약품 기구(European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: EMEA)와 같은 규제 기관에 의해 항생제 내성에 기초하지 않는 원핵생물 선별 마커가 바람직하다(Williams, Carnes et al. 2009).

[0038] 플라스미드 DNA를 사용하는 이유: 치료학적 유전자를 발현하기 위한 네이키드 또는 플라스미드 DNA(pDNA)의 임상적 사용은 IBM2에 의해 야기되는 근육 질환을 치료하기 위한 유망한 접근법이다. 유전자 치료 비히클로서의 네이키드 DNA는 훌륭한 안전성 기록을 갖고, 동일한 피험체에서의 반복 투여는 더 높은 발현 수준을 성취할 수 있다.(Hagstrom, Hegge et al. 2004; Wolff, Lewis et al. 2005; Wolff, Budker et al. 2005; Herweijer and Wolff 2007; Braun 2008; Duan 2008; Zhang, Wooddell et al. 2009). 전달 방법에 따라, 설치류 또는 영장류의 골격근에 전달된 pDNA는 근섬유에 보유되고 여러 달 동안 코딩된 유전자 생성물을 발현한다(Danko, Fritz et al. 1993; Danko, Williams et al. 1997; Sebestyen, Hegge et al. 2007). 세포 또는 체액성 면역을 유도할 수 있는 아데노 연관 바이러스(Adeno-Associated Virus; AAV) 및 다른 바이러스 벡터와 달리(Yuasa, Yoshimura et al. 2007; Mingozzi, Meulenberg et al. 2009), pDNA는 벡터에 대한 면역 반응을 통상적으로 발생시키지 않아서(Hagstrom, Hegge et al. 2004; Romero, Braun et al. 2004; Glover, Lipps et al. 2005; Wolff, Budker et al. 2005), 동일한 피험체에서의 반복 투여를 가능하게 한다. 추가로, 바이러스 또는 벡터 기반과 비교하여, pDNA는 대량으로 생산하기 비교적 저렴하고 여러 달 동안 안전하게 남아 있다(Walther, Stein et al. 2003; Urthaler, Ascher et al. 2007; Voss 2007).

[0039] 전달 방법, 전달 방법의 설명 및 개선

[0040] 유체역학적 점적의 일 실시양태에서, 외부 지혈대를 인간 또는 동물의 사지에 위치시키고, 특정 시간 또는 특정 유속(통상적으로 1 내지 3ml/초)으로 비체적(지혈대 밑의 사지 체적의 통상적으로 30 내지 50%)을 이용하여 말초 정맥내 접근을 이용하여 치료학적 생성물을 투여한다. 이는 약물학적 화합물의 노출 및 용량을 감소시키기 위해 1세기를 넘어 안전하게 효과적으로 사용되던 "비어 블록"으로 공지된 흔히 사용되는 의학 절차와 매우 유사하다. 비어 블록은 팔 또는 손 수술시 (일반 마취에 대한 필요성을 제거하는) 정맥내 국소 마취를 유도하기 위해 사용되어 왔다(dos Reis 2008; Vlassakov and Bhavani 2010). 특정 사지에 대한 화학치료학적 화합물의 투여를 위해 "분리 사지 점적(isolated limb infusion)"의 이름으로 종양학에서 유사한 방법이 사용되어, 내부 장기에 대한 용량 및 노출을 감소시킨다(Kroon and Thompson 2009). 사지에 지혈대를 위치시키는 것이 또한 중증 외상 후 출혈을 감소시키거나, 노출(예를 들면, 독 있는 뱀 및 다른 동물 물림) 후 독소에 대한 내부 장기의 노출을 감소시키기 위해 수술기 동안 효과적으로 사용되어 왔다.

[0041] 동일한 또는 매우 유사한 전달을 이용하여 유전자 치료 또는 생물물질을 투여할 때, 전달 방법이 "수력", "경정맥", "경정맥성", "경혈관", "혈관", "역행(retrograde)", "사지 정맥", "말초 정맥", "정맥내", "혈관내", "역행성", "유출", "고압", "가압", "분리 사지", "혈관 분리", "혈관 폐쇄", "혈류 폐쇄" 또는 임의의 이들의 조합을 비롯한 여러 이름으로 의학 문헌에 기재되어 있다(Su, Gopal et al. 2005; Sebestyen, Hegge et al. 2007; Vigen, Hegge et al. 2007; Zhang, Wooddell et al. 2009; Haurigot, Mingozzi et al. 2010; Hegge,

Wooddell et al. 2010; Powers, Fan et al. 2010). 특정한 관심에도 불구하고, 개과(개) 연구 후 혈관 폐쇄 시술 수행 후 정맥혈전 후 증후군(post-phlebotic syndrome) 또는 시술후 혈관병증에 주목하지 않았다(Haurigot, Mingozi et al. 2010).

- [0042] 몇몇 실시양태에서, 본원에 개시된 바대로, 전달 방법이 개선되었다. 동일 체적의 인간 및 동물 사지는 다양한 비의 근육 조직 및 비근육 조직(예를 들면, 지방 또는 반흔 조직)으로 이루어질 수 있다. 근육은 종종 혈관이 더 많고 이 지질 또는 반흔 조직에 더 높은 혈류를 요한다. 따라서, 비체적을 이용하여 치료학적 생성물을 투여하는 것은 개인의 사지에서 치료학적 생성물의 최적 분포를 부여할 수 없다. 더 많은 근육/비근육 조직을 갖는 사지는 동일한 치료학적 이익을 성취하기 위해 더 높은 점적 체적을 요할 수 있다. 혈관내(또는 점적 라인) 압력 및 점적 기간에 기초하여 점적을 조절하는 것은 표적 사지의 치료학적 생성물의 개선된 분포를 전달할 수 있다. 기재된 방법의 하기 변경은 따라서 이 전달 방법을 개선한다:
- [0043] 1) 수축기압의 거의 2 내지 4배(예를 들면, 인간 환자의 경우 320mmHg)의 특정 압력의 지혈대를 위치시킴.
- [0044] 2) 통상적으로 지혈대 압력 미만(예를 들면, 지혈대 압력이 320mmHg에서 유지되는 경우, 점적 라인 압력이 280 내지 300mmHg에서 유지됨)의 특정 혈관내(또는 점적 라인) 압력을 성취하기 위한 신속한 유동 증가.
- [0045] 3) 점적 유속을 조절함으로써 점적 라인 압력을 유지시킴.
- [0046] 4) 특정 시간 기간(15분) 동안 점적 라인 압력을 유지시킴.
- [0047] 5) 상기 1 및 2에 기재된 매개변수를 안전하게 성취하기 위해 특별히 설계된 장치를 사용. 이러한 장치는 설정 지혈대 압력에 기초하여 점적 라인의 압력 및 유속을 자동으로 제어할 수 있다. 안전성을 위해, 이러한 장치는 점적 라인 압력, 점적 라인 내의 공기 버블 또는 점적하고자 하는 유체를 보유하는 용기 내의 유체 수위의 급하강과 같은 매개변수의 검출시 점적을 자동으로 정지할 것이다(0ml/초의 유속).
- [0048] 혈관 폐쇄의 자리의 근위 또는 원위의 혈관 투여를 선택함으로써, 표적 장기, 조직 또는 신체 부위를 노출시키거나 보호할 수 있다.
- [0049] HLV 전달 방법을 사용하는 이유: DNA 예방접종 시행에 흔히 사용되지만, 근육내(IM) 접근법에 의해 전달되는 pDNA는 전체 사지 또는 전신에 대한 치료학적 생성물의 전달을 요하는 근육 질환에 비효과적이다(Jiao, Williams et al. 1992). 정맥내(IV) 플라스미드는 간에 의해 신속히 청소된다(Liu, Shollenberger et al. 2007). 그러나, 유체역학적 사지 정맥(HLV) 전달과 조합되어, pDNA 투여된 IV는 비인간 영장류를 비롯한 소동물 및 대동물에서의 전체 사지의 골격근을 효과적으로 균일하게 형질감염시켜(Hagstrom, Hegge et al. 2004), 비가역적인 미소혈관계 손상을 야기할 수 있다(Toumi, Hegge et al. 2006; Vigen, Hegge et al. 2007). 단일 용량은 장기간 유전자 발현을 발생시킬 수 있고, 반복 투여 용이성은 HLV를 IBM2 환자의 사지로 GNE 이식유전자를 전달하기에 적합하게 만든다. 지혈대를 사용하여, 팔 또는 다리에서의 혈류는 일시적으로 폐색되고, 플라스미드 DNA 용액은 정맥내로 신속히 주입된다. 이는 폐색 구역 내의 압력을 증가시켜, 인접 근섬유로 유전자 비히클을 현저히 효과적으로 이동시킨다. 혈류는 비가역적인 또는 영구적인 부작용 없이 10 내지 20분 내에 정상으로 복구된다. 다양한 장기로의 DNA 및 가능하게는 다른 잠재적 치료학적 분자의 전달에 유사한 고압 정맥내 접근법이 채택되고 조정된다.(Al-Dosari, Knapp et al. 2005; Arruda, Stedman et al. 2005; Wolff, Lewis et al. 2005; Herweijer and Wolff 2007; Toromanoff, Cherel et al. 2008).
- [0050] IBM2/DMRV는 하기 이유로 HLV를 사용하는 pDNA 유전자 전달에 의해 치료되는 이상적인 희귀 장애(orphan disorder)이다:
- [0051] 낮은 GNE 발현이 치료학적일 수 있다: 골격근에서 낮은 수준으로 발현되는 단백질 효소로서 작용하는 GNE 유전자는 비교적 작다(cDNA 크기 2,169bp, 722개의 아미노산에 대해 코딩). GNE의 낮은 양의 야생형 또는 매우 낮은 양의 시알루리아(sialuria) 형태의 발현은 현저히 효과적이거나 심지어 치유적인 것으로 밝혀질 수 있다. 추가로, GNE 유전자의 매우 낮은 발현이 중요한 치료학적 이점으로 전환되도록 GNE 유전자의 고차유전자(시알루리아) 형태를 사용할 수 있다. 이는 비교적 다량의 디스트로핀(또는 절두형 미니-디스트로핀)이 치료학적 이점을 실현하기 위해 필요할 수 있는 뒤시엔스 또는 베커(Becker) 근이영양증과 같은 다른 근육 질환과 매우 대조적이다.
- [0052] 사지만을 치료하는 것이 충분한 치료일 수 있다: IBM2는 팔 및 다리의 근육에 특히 영향을 미친다. 체간 근육은 질환 과정 중 나중에 임상적으로 이환된다. 심장 및 폐를 비롯한 필수 장기가 매우 많은 환자에 의해 임상적으로 이환되지 않는다. 팔 및 다리 기능을 손상하지 않기 위해, 본 발명자들은 삶의 질을 상당히 개선하고 독립성

손실은 지연시킬 수 있다.

[0053] 이식유전자에 대한 숙주 면역 반응이 일어나지 않을 것이다: 알려진 환자 중 99% 초과와 환자는 야생형과 1개의 아미노산이 다른 GNE 단백질을 발현한다(미스센스 돌연변이). 추가로, GNE는 아미노산 수준에서 마우스와 인간 사이에 98% 상동성으로 진화론적으로 보존된다. 따라서, 숙주 면역 반응 또는 GNE 이식유전자에 대한 중화 항체의 생성의 가능성은 최소이다. GNE와 근육 특이적 프로모터, 예컨대 크레아티닌 키나제(CK)의 커플링은 숙주 항체 반응의 기회를 추가로 감소시킨다(Fabre, Bigey et al. 2006).

[0054] 유리한 방관자 또는 거리 효과에 대한 가능성: 근섬유 내의 디스트로핀(큰 구조의 단백질)의 발현이 주사 자리에서만 유리한 것으로 보이는 디스트로핀 병증(distrophinopathy)와 달리, IBM2에서 Neu5Ac(소분자, 9탄당)는 근섬유의 제한 구역 내에 보유되지 않을 것이다. 1개의 근섬유에 의해 생성된 Neu5Ac는 주변 근섬유에 이익을 줄 수 있고, 혈청 내 ManNAc 또는 Neu5Ac는 이 혈청에 노출된 근섬유에 이익을 줄 수 있다. 하기 데이터는 이러한 가설을 추가로 지지한다: (a) Sia 결핍 마우스 모델은 혈청 중에 존재하는 Neu5Ac를 사용할 수 있다 (Malicdan, Noguchi et al. 2009), (b) 저시알릴화 세포는 이의 성장 배지가 ManNAc로 보충된 후 재시알릴화된다(Schwarzkopf, Knobloch et al. 2002) 및 (c) 배지에 GlcNAc가 아니라 5mM ManNAc 또는 Neu5Ac를 첨가하는 것은 60 내지 75%의 대조군으로부터의 1차 DMRV 섬유아세포 또는 근관의 시알산 함량을 정상 수준으로 복원한다 (Noguchi, Keira et al. 2004). 방관자 효과 및 거리 효과의 가능성은 최근의 단일 환자 시험에서 관찰되었다 (Nemunaitis, Maples et al. 2010). 환자의 팔뚝에 GNE-리포플렉스를 근육내 주사하였다(Extensor Carpi Radialis Longus, ECRL). 일시적인 강도 증가, 재조합 GNE(rGNE) 발현 및 세포 표면 시알산의 증가가 주사 자리 및 인접 구획 근육에서 관찰되었다. 원위 근육군(승모근 및 사두근)이 왼쪽 ECRL rGNE 이식유전자 발현과 관련하여 일시적으로 개선되고 시알릴화를 증가시킨다는 놀라운 관찰 이후 거리 효과의 가능성이 또한 제시되었다 (Nemunaitis, Maples et al. 2010).

[0055] 안전성/독성학

[0056] 이용 가능한 정보에 기초하여, GNE 플라스미드는 IBM2 환자에서 사용하기에 매우 안전한 벡터인 것으로 예상된다. 일반적으로, 유전자 치료 비히클로서의 네이키드 DNA는 훌륭한 안전성 기록을 갖고 동일한 피험체에서의 반복 투여는 더 높은 발현 수준을 성취할 수 있다. (Hagstrom, Hegge et al. 2004; Wolff, Lewis et al. 2005; Wolff, Budker et al. 2005; Herweijer and Wolff 2007; Braun 2008; Duan 2008; Zhang, Wooddell et al. 2009).

[0057] GNE 플라스미드의 안전성: GNE-플라스미드를 사용하는 설치류 독성학 연구가 현재 진행 중이다. 예비 데이터는 네이키드 플라스미드가 인간 환자에게 이미 투여된 GNE-리포플렉스보다 더 안전하다는 것을 입증한다고 제시하였다(Phadke, Jay et al. 2009; Nemunaitis, Maples et al. 2010). 본 발명자들은 12마리의 마우스(균주 B6;FBV 혼합 근교계, 4 내지 10월령의 6마리의 수컷 및 6마리의 암컷)에서 14일 기간의 최근의 pre-GLP 독성학 연구를 수행하였다. 수컷 마우스 및 암컷 마우스를 실험군 및 대조군으로 똑같이 무작위로 나눴다. 실험군은 IV 꼬리를 통해 투여되는 고용량 GNE 플라스미드(0.1ml 일반 식염수 중에 현탁된 0.6 mg)를 받았고, 대조군은 오직 0.1ml 일반 식염수를 받았다. 군을 하기 대로 각각 2마리의 마우스(1마리의 암컷, 1마리의 수컷)의 3개의 용량 빈도 군으로 추가로 나눴다: 1) 14일 동안의 매일 투여, 2) 격일 투여 및 3) 매주 투여. 모든 동물은 실험에 생존하였다. 체중, 온도, 식품 및 물 섭취, (1일째의 예비 투약 및 15일째의 검시시에 수행된) CBC 혈액 시험을 포함하는 모든 측정된 매개변수와 관련하여 실험군과 대조군 사이에 유의차가 없었다. 뇌, 폐, 심장, 간, 신장, 비장, 위, 장, 방광, 생식기, 림프절 및 근육을 포함하는 12개의 장기와 관련하여 육안 병리학에서 실험군과 대조군 사이에 유의차가 없었다. 일일 인간 등가 용량(human equivalent dose: HED)은 120mg이고, 최대 14일 전체 HED는 1440mg이었다.

[0058] GNE-리포플렉스의 안전성: 네이키드 플라스미드 GNE와 비교시, GNE-리포플렉스 형태는 더 독성이다. 리포플렉스를 생성하기 위해, 플라스미드 벡터를 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP) 및 콜레스테롤로 이루어지는 양이온 리포솜(GNE-리포플렉스)에 캡슐화하였다. 벡터를 BALB/c 마우스에 주입하고, GNE-리포플렉스의 단일 정맥내(IV) 점적은 100μg(0.1mg) 용량에서 33%의 동물에서 치사이고, 40μg 코호트(cohort)에서의 적은 비율의 동물이 일시적인 독성을 나타냈다(Phadke, Jay et al. 2009). 2010 ASGCT 컨퍼런스에서 제시된 포스터에 기초하면(Phadke, Jay et al. 2010), Balb/c 마우스에서의 GNE-리포플렉스의 수회 주사의 투여에 대한 최대 허용 용량은 (1) 주사당 20μg(인간 등가 용량(HED) = 5.2mg) 또는 (2) 80μg(HED = 20.8mg)의 축적 용량이다. 진행 중인 용량 증가 시험에서, 환자는 1 내지 3달 간격의 여러 점적(0.4, 0.4, 1.0mg)을 받았고, 각각의 점적의 12시간 내에 일시적인 1, 2 등급의 빈맥 및 열이 관찰되었다. 환자의 간 기능 시험은 또한 일시적으로 상승되는

것으로 보고되었지만, 요약서에서 정확한 수가 보고되지 않았다(Nemunaitis, Jay et al. 2010).

[0059] 유체역학적 사지 정맥(HLV) 전달 방법의 안전성: 유체역학적 전달 방법의 가능한 부작용을 현재의 연구에 제시된 지혈대 압력의 2배에서 비인간 영장류에서 연구하였다. 상기 절차는 어떠한 비가역적인 또는 오래 지속되는 부작용 없이 안전한 것으로 결정되었다(Vigen, Hegge et al. 2007; Hegge, Wooddell et al. 2010). 이의 절차는 국소 마취에 사용된 비어 블록 및 일세기 넘게 안전하게 효과적으로 사용되던 수술 항상성과 유사하다. 주요한 차이는 채혈이 불필요하고 절차 기간이 HLV에서 통상적으로 15분이라는 것이다(Hegge, Wooddell et al. 2010). 비인간 영장류에서의 조직학적 연구는 HLV 절차가 일시적인 근육 부종을 야기하지만 상당한 근육 손상이 없다는 것을 나타낸다(Hagstrom, Hegge et al. 2004; Toumi, Hegge et al. 2006). 비인간 영장류에서의 T2 강조 MRI 이미지는 또한 이 절차가 일시적인 근육 부종을 야기하지만 구획 증후군(compartment syndrome)과 같은 영구적인 근육 교란이 없다는 것을 나타낸다(Vigen, Hegge et al. 2007). 비인간 영장류에서의 자기 공명 혈관 조영은 우려되는 장기간 이상이 아니라 모세관 투과성에 대한 일시적인 효과와 일치하는 혈관 효과를 나타냈다(Vigen et al., 2007). 본 발명자들이 제안한 것(310mmHg)보다 훨씬 더 높은 지혈대 압력(700mmHg)을 이용하여 이러한 초기 연구를 수행하였다. 또한, 45 내지 50%의 사지 체적의 주사 용적을 이 연구에서 사용하였고, 본 발명자들은 주사/35%의 사지 체적을 제안하였다. 본 발명자들은 플라스틱이 근육 세포벽의 통합성 감소로 인해 정상 근육보다 더 효과적으로 근질관 섬유에 진입하여, 압력 및 주사 용적 감소를 정당화한다고 믿는다. 이러한 유사한 압력을 이용하여, 근이영양증을 앓고 있는 성인 환자에서의 용적 증가 연구는 노스캐롤라이나 대학교(University of North Carolina, 채플 힐)에서 연구 중이다(Powers, Fan et al. 2010).

[0060] 요약하면, pDNA를 사용하는 HLV 전달 방법은 비인간 영장류에서 효과적이고 안전한 것으로 입증되고, 임상적 치료학적 시험에서 시험될 준비가 된 성숙한 기술로 고려된다(Wells 2004; Al-Dosari, Knapp et al. 2005; Herweijer and Wolff 2007). 이러한 접근법의 주요 단점은 주요 내부 혈관을 일시적으로 클램핑하는 침습 방법(예를 들면, 수술, 복강경 또는 경피성 벌룬 폐쇄) 없이 횡격막, 심장 및 체간/목 근육을 용이하게 형질감염시킬 수 없다는 것이다. 이러한 단점이 많은 근이영양증에서는 의미있지만, 거의 IBM2로 이환된 환자에서만 중요하지는 않다. 많은 IBM2 환자는 장년까지 살고, 이의 심장 및 폐는 임상적으로 이환되는 것으로 보고되지 않았고, 체간/근 근육은 질환 진행시 늦게까지 강하게 남아 있는 것으로 보이고, 방관자 또는 거리 효과에 대한 상당한 가능성이 존재한다. 따라서, GNE 이식유전자를 사지 골격근에 전달하기 위한 pDNA의 HLV 전달은 물리적 의존성의 소실을 지연시킬 수 있는 IBM2에 대한 매력적인 치료학적 옵션이고, 많은 IBM2 환자에 대한 상당한 희망을 제공한다.

[0061] GNE 코딩 서열 및 관련 조성물은 임의의 종래의 비독성인 약학적으로 허용되는 담체, 아주반트 또는 비히클을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 제제화된 조성물 또는 이의 전달 형태의 안전성을 증대시키기 위해 상기 제제의 pH를 약학적으로 허용되는 산, 염기 또는 완충제로 조정할 수 있다. 예를 들면, 무균 주사용 수성 또는 지방질 현탁액을 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제제화할 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 비독성인 비경구로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 무균 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀션일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에 물, 링거액, U. S. P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 무균 고정유가 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노글라이세라이드 또는 다이글라이세라이드를 비롯한 임의의 완하성 고정유를 사용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산을 주사용 제제에서 사용할 수 있다.

[0062] 특정한 실시양태에 따르면, 특히 비경구 주사에 GNE 코딩 서열을 전달하도록 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte)(등록상표) 담체를 이용하거나 사용할 수 있다. (박스터 레보라토리즈, 인크.(Baxter Laboratories, Inc.), 일리노이주 모턴 그로브). 플라즈마-라이트(등록상표)는 정맥내 투여에 사용될 수 있는 무균 비발열성 등장성 용액이다. 각각의 100ml 용적은 526mg 염화나트륨, USP(NaCl); 502mg 글루콘산나트륨(C6H11NaO7); 368mg 아세트산나트륨 삼수화물, USP(C2H3NaO2·H2O); 37mg 염화칼륨, USP(KCl); 및 30mg 염화마그네슘, USP(MgCl2·6H2O)를 포함한다. 이는 항미생물제를 포함하지 않는다. 바람직하게는 수산화나트륨으로 pH를 약 7.4(6.5 내지 8.0)로 조정한다.

[0063] 예를 들면, 박테리아 보유 필터를 통한 여과에 의해 또는 무균 고체 조성물 형태의 무균제를 도입함으로써 GNE 코딩 서열을 전달하기 위해 사용되는 주사용 제제를 무균화할 수 있고, 이 무균제는 사용 전에 무균수, 플라즈마-라이트(등록상표) 또는 다른 무균 주사용 배지 중에 용해되거나 분산될 수 있다.

[0064] 시스템 내의 GNE 코딩 서열의 발현을 연장시키기 위해(또는 이의 효과를 연장시키기 위해), 피하 또는 근육내 주사로부터 상기 조성물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직할 수 있다. 빈약한 수용성을 갖는 결정질 또는 비결

정질 재료의 액체 현탁액을 사용하여 이를 성취할 수 있다. 이후, 상기 조성물의 흡수 속도는 이의 분해 속도에 따라 달라질 수 있고, 분해 속도는 결국 결정 크기 및 결정질 형태에 따라 달라질 수 있다.

[0065] 대안적으로, 상기 조성물을 오일 비히클 중에 용해시키거나 현탁시킴으로써 비경구로 투여되는 GNE 코딩 서열의 흡수 지연을 성취할 수 있다. 생분해성 중합체, 예컨대 폴리락타이드-폴리글라이콜라이드 내에 GNE 코딩 서열의 마이크로캡슐 기질을 형성함으로써 주사용 데포 형태를 제조할 수 있다. GNE 코딩 서열 재료 내 중합체의 비 및 사용되는 특정한 중합체의 성질에 따라, GNE 코딩 서열 방출 속도를 제어할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예로는 폴리(오쏘에스터) 및 폴리(엔하이드라이드)를 들 수 있다. 상기 기재된 바대로, 근조직과 같은 표적 신체 조직에 적합한 리포솜(또는 심지어 마이크로에멀션) 중에 GNE 코딩 서열을 포획함으로써 데포 주사용 체제를 또한 제조할 수 있다.

[0066] 시스템에서 시알산 생성을 조절하는 방법 이외에, 본 발명은 추가로 시스템에서 야생형 GNE를 생성하는 방법을 포함한다. 이러한 실시양태에 따라, 상기 시스템(예를 들면, 인간 환자의 근육 세포)은 돌연변이된 내인성 GNE 코딩 서열(예를 들면, GNE-M712T 서열)을 포함할 수 있다. 즉, 본 발명은 예를 들면 돌연변이된(결손) GNE 코딩 서열을 기능성 야생형 GNE 코딩 서열로 숨기는 세포 또는 근조직을 제공하는 것을 포함한다. 야생형 GNE 코딩 서열은 비경구 주사를 통해 예를 들면 본원에 기재된 리포솜 또는 지질 나노입자를 사용하여 이러한 시스템에 전달될 수 있다.

[0067] 본 발명의 추가의 관련 실시양태에 따르면, 유전적 내세포 근육병(HIBM2)을 치료하고, 예방하고/하거나, 이의 영향을 경감시키기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 일반적으로 환자에게 치료학적 유효량의 야생형 GNE 코딩 핵산 서열을 제공하는 것을 포함한다. 특정한 실험양태에서, 야생형 GNE 코딩 핵산 서열은 바람직하게는 비경구 주사를 통해 지질 나노입자 및 플라즈마-라이트(등록상표)와 유사한 담체와 함께 환자에게 전달될 수 있다.

[0068] 야생형 GNE 코딩 핵산 서열의 "치료학적 유효량"이란 구문은 표적 세포에서의 시알산 생성을 증가시키고/시키거나 그렇지 않으면 환자에서의 HIBM2를 치료하고, 예방하고/하거나, 이의 영향을 경감시키기 위한, 합당한 이득 대 위험 비로, 충분한 수준의 야생형 GNE를 발현하는 서열의 충분한 양을 의미한다. 그러나, 주치의가 합당한 의학적 판단 범위 내에 야생형 GNE 코딩 핵산 서열 및 본 발명의 관련 조성물의 전체 일일 용량을 결정할 수 있는 것으로 이해된다.

[0069] 본원에 기재된 방법의 이점 중 하나는, 폴리뉴클레오타이드가 전신 투여와 반대로 이환된 사지에 직접 투여되므로, 투여되는 치료학적 유효량이 이전에 기재된 방법에서보다 적다는 점이다. 따라서, 본 방법은 이전에 기재된 방법과 관련되는 많은 부작용을 감소시키거나 제거한다.

[0070] 임의의 특정한 환자에 대한 특정한 치료학적 유효량 수준은 환자의 HIBM2 장애의 중증도; 이용되는 특정한 GNE 코딩 서열의 활성; 이용되는 전달 비히클; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 이용되는 특정한 GNE 코딩 서열의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 속도; 치료 기간; 이용되는 특정한 GNE 코딩 서열과 조합되어 또는 동시에 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자; 및 의학 분야에 널리 공지된 유사한 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0071] 환자의 상태 개선 시, GNE 코딩 서열의 유지 용량을 필요한 대로 투여할 수 있다. 이후, 증상이 원하는 수준으로 경감될 때 병증 개선이 보유되는 수준으로 투여 용량 또는 투여 빈도 또는 둘 다를, 증상의 함수로서, 감소시킬 수 있다.

[0072] 본 발명의 추가의 다른 실시양태에 따르면, 시스템에서 야생형 GNE를 발현하는 신규한 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 바람직하게는 야생형 GNE 코딩 핵산 서열을 포함한다. 본원에 기재된 바대로, GNE 코딩 핵산 서열은 프로모터, 종결 서열 및 기타와 같은 다양한 전사 제어 구성요소를 포함할 수 있다. 본 발명에 포함되는 조성물의 비제한적인 예는 도 3에 도시된 본원에 기재된 pUMVC3-GNE 발현 벡터를 포함한다. 본 발명의 다른 실시양태에 대해 기재된 바대로, GNE 코딩 핵산 서열은 리포솜 또는 지질 나노입자와 같은 시스템으로의 전달에 적절한 비히클 내에 배치되거나 이에 연결될 수 있다. 훨씬 추가로, 이러한 실시양태에 따르면, 전달 비히클은 근육 세포 또는 근육 조직과 같은 표적 세포 또는 조직을 인식하고 이에 결합할 수 있는 물질로 임의로 데코레이팅될 수 있다.

[0073] 실시예

[0074] 실시예 1 - CHO-Lec3 세포에서의 외인성 GNE의 발현.

- [0075] 하기 실시예에서, 인간 cDNA 유래의 7개의 GNE 발현 벡터를 생성하였다. 야생형, M712T 및 R266Q의 3종의 상이한 GNE 형태를 GNE 결핍 세포(Lec3 세포)에서 강하게 발현시켰다. 명확한 효소 활성이 없더라도, 모든 효소는 유사한 단백질 발현 수준을 나타냈다. 하기 보이는 것처럼, 형질감염된 GNE 발현 세포주는 비형질감염된 세포보다 상당히 더 많은 시알산을 생성하였다.
- [0076] 방법론.
- [0077] 제1 절차:
- [0078] GNE 클로닝. GNE cDNA를 포함하는 양친 벡터는 다니엘 다르비쉬(Daniel Darvish)(에이치아이비엠 리서치 그룹(HIBM Research Group), 캘리포니아주 엔시노)에 의해 제공되고, pGNE-NB8(야생형), pGNE-MB18(M712T 돌연변이체) 및 pGNE-R266Q(R266Q 돌연변이체)를 포함하였다. 테스트네이션 벡터(destination vector)인 pUMVC3을 알데브론(Aldevron)(노스다코타주 파고)으로부터 구입하였다. 모 벡터로부터 테스트네이션 벡터로 R266Q 돌연변이체가 왕복하도록 서브클로닝 벡터인 pDrive(퀴아젠(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아)을 사용하였다.
- [0079] 환자 전혈로부터 분리된 RNA를 역전사하여 GNE cDNA 삽입유전자(insert)(야생형 및 M712T)를 생성하였다. 특이적으로 설계된 프라이머를 사용하여 표준 돌연변이유발 PCR 기술을 이용하여 R266Q 동형단백질을 생성하였다. 이후, cDNA를 EcoR1 및 BamH1 인식 5' 테일을 갖는 특이적으로 설계된 프라이머를 사용하여 증폭하고, 이후 T4 절찰(인비트로젠)에 의해 pUMVC3 발현 벡터(알데브론)로 서브클로닝하였다. 이후, 반응능 이. 콜라이 세포(인비트로젠)를 pUMVC3 발현 벡터에 의해 형질전환하였다.
- [0080] 양성 pUMVC3-GNE 클론을 175 ml LB 브로스 + 50µg/ml Kan 중에 밤새 성장시키고, 150 ml 배양물을 제조업자 프로토콜에 따라 퀴아젠(캘리포니아주 발렌시아) 하이스피드 플라스미드 막시 키트(HiSpeed Plasmid Maxi kit)에 사용하였다.
- [0081] DNA-지질 복합체. 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 시험 DNA(pUMVC3-GNE)와 실온에서 혼합함으로써 이 실시예에서 사용되는 DNA:지질 복합체를 생성하였다. DOTAP는 아반티 폴라 리피즈, 인크.(Avanti Polar Lipids, Inc.)(알라바마주 알라바스터)가 공급하는 상업적으로 구입 가능한 지질 입자이다. 1µl의 최종 용적 중에 0.5µg DNA:4mM DOTAP의 최종 비를 나타내는 원하는 전체 용적을 성취하는 방식으로 DOTAP를 pUMVC3-GNE DNA와 혼합하였다.
- [0082] 세포 배양. GNE 결핍 CHO-Lec3 세포는 알버트 아인슈타인 의과대학(Albert Einstein College of Medicine)에 의해 제공된다. 상기 세포를 4mM L-글루타민 및 10% 열 불활성화된 소 태아 혈청으로 보충된 α-MEM 배지 중에 5% CO₂에서 37°C에서 성장시켰다. 일시적인 형질감염을 위한 세포를 6웰 플레이트 내의 웰마다 1×10⁶개의 세포로 평판배양하고 밤새 성장시켰다. FBS를 계대배양마다 2.5% 감소시킴으로써 Lec3 세포를 혈청 감소 조건으로 성장시켰다.
- [0083] 일시적인 형질감염. Lec3 세포를 OptiMEM(인비트로젠, 캘리포니아주 칼스바드) 중에 웰마다 DNA:지질 복합체에 의해 6시간 동안 형질감염하고, 이후 배지를 일반 α-MEM 성장 배지로 바꾸고 상기 세포를 밤새 배양하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 4µg DNA + 10µl 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(인비트로젠)을 혼합함으로써 DNA:지질 복합체를 형성하였다. 형질감염 24시간 후, 세포를 트립신 분해에 의해 수확하고 PBS로 1회 세척한 후, 후속하여 웨스턴 블롯 또는 효소/당 검정을 수행하였다.
- [0084] 시알산 정량화. 대략 4×10⁶개의 세포를 티오바르비투르산 방법에 의한 막 결합 시알산의 정량화에 사용하였다. 세포를 물 중에 재현탁하고 25개이지 주사바늘을 통한 20회 계대배양에 의해 용균하고 원심분리하였다. 상청액을 브래드퍼드(Bradford) 단백질 추정에 사용하고 남은 펠렛을 100µl 2M 아세트산 중에 재현탁하고 800°C에서 1시간 동안 항온처리하여 당결합체 결합 시알산을 방출시켰다. 137µl 과요오드산 용액(57mM H₂SO₄ 중의 2.5mg/ml)을 첨가하고 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 다음에, 50µl 아비산나트륨 용액(0.5M HCl 중의 25mg/ml)을 첨가하고 관을 격렬하게 흔들어 황갈색의 완전 제거를 보장하였다. 이 단계 후, 100µl 2-티오바르비투르산 용액(NaOH에 의해 pH 9.0으로 조정된 71mg/ml)을 첨가하고 샘플을 7.5분 동안 100°C로 가열하였다. 상기 용액을 1ml 부탄올/5% 12M HCl로 추출하고 상을 원심분리에 의해 분리하였다. 유기상의 흡광도를 549nm에서 측정하였다. 시알산의 양을 시알산(nmol)/단백질(mg)로 측정하였다.
- [0085] 제2 절차:

- [0086] 하기 절차는 상기 기재된 절차에 대한 대안 절차이다.
- [0087] 세포 배양 및 생물학적 검정 시험: 파멜라 스탠리 박사(Dr. Pamela Stanley)(알버트 아인슈타인 의과대학)로부터 얻은 Lec3 CHO 세포(Hong 2003)를 초기에 10% 소 태아 혈청(FBS)(인비트로젠)을 포함하는 α -MEM 배지 중에 성장시키고, 0% FBS까지 2.5% 감분으로 α -MEM FBS 배지를 후속 계대배양하고, 트립신 처리한 후 형질감염시켰다. 2.0×10^6 개의 CHO 세포, 2.5ml 프리스타일 배지(Freestyle Media)(인비트로젠), 500 μ l Opti-MEM(인비트로젠), 10 μ l 리포팩타민(인비트로젠) 및 4 μ g DNA(벡터 무 세트에 제외)를 사용하여 4 세트의 형질감염을 3회 준비하고 5% CO₂ 중에 37°C에서 항온처리하였다. 준비된 세트는 GNE 야생형 pUMVC3 벡터, GNE M712T pUMVC3 벡터, GNE R266Q pUMVC3 벡터, 빈 벡터 및 벡터 무 배지를 포함하였다. 세포를 형질감염 48시간 후 수집하고, PBS로 세척하고, 용해 완충액 중에 재현탁하였다. 시알산 함량을 변형 버전의 레오나르드 바렌 방법(Leonard Warren method)(Warren 1959)을 이용하여 검출하고 UBV-Vis 모듈을 사용하여 549nm에서 나노드롭(NanoDrop)-1000 분광광도계(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))로 측정하였다. 표준 곡선을 알고 있는 시알산 농도로 생성하고 이는 흡광도와 시알산 농도 사이의 명확한 선형 관계를 나타낸다.
- [0088] 결과
- [0089] GNE 클론. 시험된 GNE cDNA 클론은 1개의 인간 야생형 cDNA 및 2개의 인간 돌연변이체 cDNA를 포함하였다. 돌연변이체는 M712T GNE 결핍 클론 및 R266Q 시알루리아 클론을 포함하였다. 시알루리아는 GNE의 CMP-시알산 결합 자리에서의 점 돌연변이에 의해 야기되는 인간 질환으로, 피드백 억제 및 시알산의 대량 생산을 소실시킨다. GNE cDNA를 제한효소 분해 클로닝에 의해 이의 원래 벡터로부터 발현 벡터인 pUMVC3으로 서브클로닝하였다. 클론을 방향성 제한효소 분해에 의해 스크리닝하여 GNE 삽입유전자가 정확한 배향에 있다는 것을 확인하였다. 양성 클론을 배향 둘 다에서 서열분석하여 클로닝 과정 동안 돌연변이가 발생하지 않는다는 것을 확인하였다. 생성된 크로마토그램을 젠뱅크(GenBank)로부터의 GNE 서열(수탁번호 NM_005467호)과 비교하였고 야생형은 어떠한 돌연변이도 나타내지 않았지만, M712T 및 R266Q 클론은 예상된 점 돌연변이만을 포함하였다. 양성 pUMVC3-GNE 클론을 maxi prep 플라스미드 정제 절차를 이용하여 확장하고 다시 서열분석하여 돌연변이가 발생하지 않았다는 것을 확인하였다. 이 DNA 스톡을 모든 후속 실험에 사용하였다.
- [0090] Wt-GNE mRNA 정량화. CHO-Lec3 세포를 10% 혈청 중에 성장시키고 24시간 동안 pUMVC3-GNE-wt DNA에 의해 일시적으로 형질감염시켜 발현된 재조합 GNE RNA의 양을 정량화하였다. 전체 RNA를 추출하고 RT-qPCR을 수행하여 GNE 전사체로부터 230bp 단편을 증폭하였다. pUMVC3-GNE-wt의 단계 희석을 이용하여 형질감염된 Lec3 세포에서 발현된 GNE-wt의 농도가 4.1pg/ μ l라는 것을 결정하였다. qPCR의 동적 범위는 5ng 내지 5fg이고, GNE mRNA 생성물은 대조군(비형질감염된) CHO-Lec3 세포에서 검출되지 않았다(비형질감염된 세포에 대한 cT 값은 42회 사이클보다 크고, 이는 5fg보다 적음). 따라서, 재조합 GNE mRNA 발현은 형질감염된 Lec3 세포에서 검출되었지만, 비형질감염된 세포는 검출 불가능한 양의 GNE mRNA를 가졌다.
- [0091] 시알산 검정. 형질감염된 Lec3 세포를 또한 세포 표면 시알산 발현에 대해 시험하였다. 양이 1.5배 더 많은 R266Q GNE1에 의해 형질감염된 Lec3 세포의 발현을 제외하고, 모든 Lec3 샘플은 대략 6.0nmol/mg의 막 결합 시알산을 가졌다(도 7). R266Q GNE는 GNE의 피드백 억제가 부족하고 세포내 시알산의 과생성을 야기하는 것으로 알려져 있다. Lec3 세포는 저시알화되는 것으로 보이고, 이는 야생형 CHO 세포와 비교하여 야생형 GNE의 약 100배 과발현에 의해서가 아니라 시알루리아 돌연변이체의 발현에 의해서만 극복될 수 있다. 야생형(wt)과 M712T GNE 사이에 유의차가 관찰되지 않았다.
- [0092] UMVC3 및 NTC8685 GNE 플라스미드의 비교: 벡터 둘 다의 시알산 생성을 비교하는 형질감염 연구는 서로 매우 상관관계가 있었다(도 8 및 도 9). 약간 더 많은 시알산 생성이 NTC8685 벡터에 의해 보고되었다. 다른 세포 유형을 사용한 추가의 실험실내 연구 및 생체내 연구를 수행하였다.
- [0093] ManNAc의 제공에 의한 시알산 생성. 세포 배양 배지에 N-아세틸만노사민(ManNAc)을 보충함으로써 시알산 생성 수준을 측정하였다. ManNAc의 제공 이외에, 모든 다른 세포 배양 변수는 형질감염 연구와 동일하였다(도 10).
- [0094] 예비 고용량 플라스미드 독성. 본 발명자들은 12마리의 마우스(균주 B6;FBV 혼합 근교계, 4 내지 10월령의 6마리의 수컷 및 6마리의 암컷)에서 14일 기간의 최근의 pre-GLP 독성학 연구를 수행하였다. 수컷 마우스 및 암컷 마우스를 실험군 및 대조군으로 똑같이 무작위로 나눴다(표 1). 마우스 모델에서의 최대 투여가능 용량(maximum feasible dose: MFD)은 주사당 600 μ g이었다. 제한은 플라스미드의 수용성(6 μ g/ μ l) 및 주사당 전체 용적(100 μ l)에 기초하였다. 30g의 마우스 체중 및 70kg의 인간 체중을 고려하면, 600 μ g의 마우스 용량에 대한 인간 등가 용

량(HED)은 113.82mg이었다.

표 1

	점적 빈도	마우스	체중(g) 1일	독성 24시간	독성 48시간	독성 7일	체중 7일	독성 14일	체중 14일	전체 플라스미드 용량
대조군 (100 일반 식염수)	매일	1M	29.54	무	무	무	28.8	무	28.96	0
		1F	29.99	무	무	무	26.6	무	26.74	0
	격일	1M	32.69	무	무	무	32.9	무	31.95	0
		1F	21.88	무	무	무	20.6	무	20.23	0
	주 1회 (1일 및 7일)	1M	27.76	무	무	무	27.5	무	26.91	0
		1F	22.24	무	무	무	22.5	무	23.55	0
실험군 (10μl 일반 식염수 중 600μg 플라스미드)	매일	1M	27.59	무	무	무	26.8	무	27.68	8.4 mg
		1F	27.28	무	무	무	24.7	무	21.78	8.4 mg
	격일	1M	31.54	무	무	무	29.6	무	29.39	4.2 mg
		1F	23.35	무	무	무	21.9	무	23.71	4.2 mg
	주 1회 (1일 및 7일)	1M	30.37	무	무	무	28	무	29.8	1.2 mg
		1F	24.55	무	무	무	23	무	23.38	1.2 mg

[0095]

[0096]

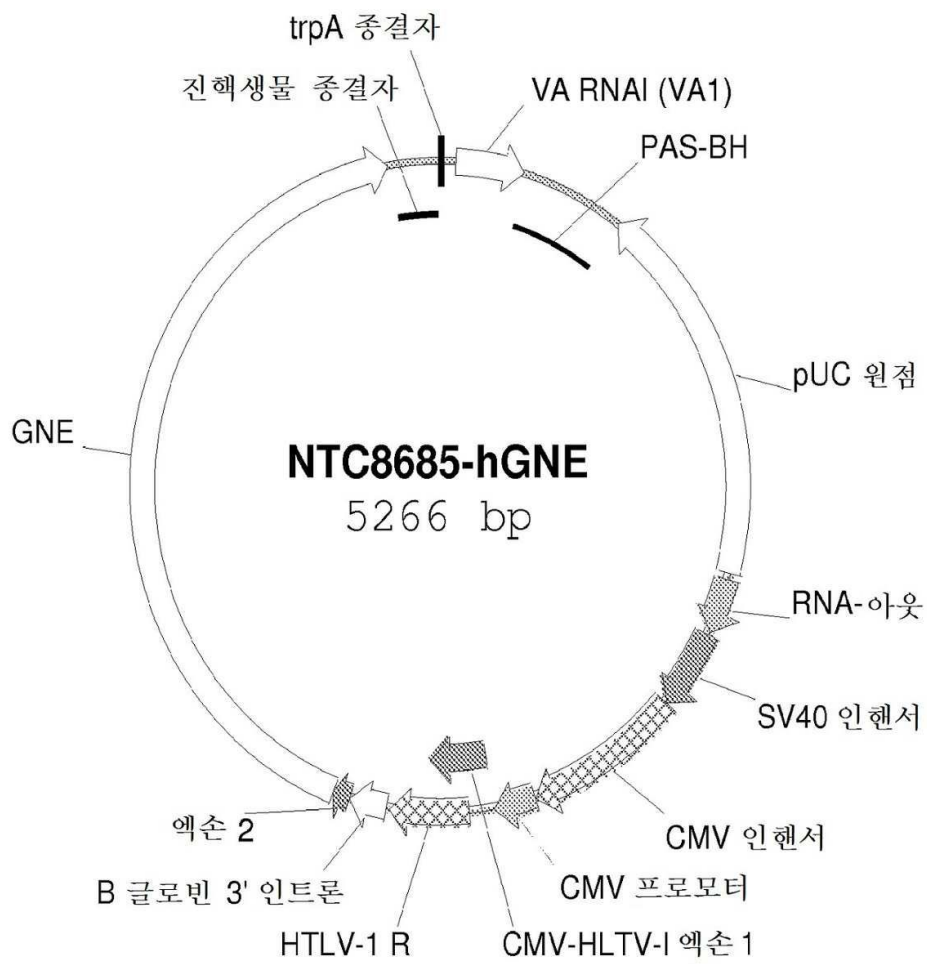
실험군은 꼬리 정맥으로 IV를 통해 투여되는 고용량 GNE 플라스미드(0.1ml 일반 식염수 중에 현탁된 0.6mg)를 받았고, 대조군은 0.1ml 일반 식염수를 받았다. 군을 하기 대로 각각 2마리의 마우스(1마리의 암컷, 1마리의 수컷)의 3개의 용량 빈도 군으로 추가로 나눴다: 1) 14일 동안의 매일 투여, 2) 격일 투여 및 3) 매주 투여. 모든 동물은 실험에 생존하였다. 체중, 온도, 식품 및 물 섭취, (1일 및 15일에 수행된) CBC 혈액 시험을 포함하는 모든 측정된 매개변수와 관련하여 실험군과 대조군 사이에 유의차가 없었다. 15일 검시 후, 뇌, 폐, 심장, 간, 신장, 비장, 위, 장, 방광, 생식기, 림프절 및 근육을 포함하는 12개의 장기와 관련하여 육안 병리학에서 실험군과 대조군 사이에 유의차가 없었다.

[0097]

본 발명의 예시적인 실시양태가 본원에 기재되어 있지만, 본 발명이 기재된 것에 제한되지 않고, 본 발명의 범위 또는 정신을 벗어나는 일 없이 당업자가 다양한 다른 변경 또는 변형을 만들 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

도면

도면1



도면2a

```

1  ccgcctaattg agcggggttt tttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt
51  aagcggggcac tcttcctgtg tctggtggat aaattcgcaa ggggtatcatg
101 gcggaacgacc ggggttcgag ccccgatatcc ggccgtccgc cgtgatccat
151 gcggtttaccg ccccggtgtc gaaccaggt gtgcgacgtc agacaacggg
201 ggagtgtctcc ttttggcttc cttccctac cggctctgct cgcgcgtttc
251 ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac
301 agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccg caggggcgcgt
351 cagcgggtgt tggcgggtgt cgggggcgcag ccatgacca gtcacgtagc
401 gatagcggag tgtatactgg ctttaactatg cggcatcaga gcagattgtg
451 ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag
501 aaaataccgc atcaggcgcct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgcctgc
551 gctcgggtcgt tcgggtgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta
601 atacgggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc
651 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt
701 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca
751 agtcagaggt ggcaaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc
801 ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg
851 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtc ttctcatagc
901 tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtg gtctgtcgtc ccaagctggg
951 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccg cgcgtgcgcc ttatccggtg
1001 actatcgtct tgagtcacaac ccggtaaagc acgacttatc gccactggca
1051 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcgggtgtac
1101 agagttcttg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga agaacagtat
1151 ttggtatctg cgtctcgtgc aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt
1201 agctcttgat ccggcaaaac aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgtg
1251 ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt
1301 tgatcttttc tacggggtct gaogctcagt ggaacgaaaa ctacggttaa
1351 gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt
1401 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt
1451 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgac
1501 tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctctgcaaaa ccacgttgtg
1551 gtagaattgg taaagagagt cgtgtaaaat atcgagttcg cacatcttgt
1601 tgtctgatta ttgatttttg gcgaaacat ttgatcatat gacaagatgt
1651 gtatctacct taacttaatg attttgataa aaatcattag gtaccctga
1701 tcaactgtga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc
1751 agcaggcaga agtatgcaaa gcattgcact caattagtca gcaaccaggt
1801 gtggaaaagt cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat
1851 ctcaattagt cagcaacccat agtcccgccc ctaactccgc ccatcccgcc
1901 cctaactccg ccaggttacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag
1951 ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgctgggtc gaccgcccac
2001 cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc
2051 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaaact
2101 gcccaacttg cagtacatca agtgtatcat atgccaaagta cgcctccctat
2151 tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgctcg gcattatgcc cagtacatga
2201 ccttatggga ctttcctact tggcagtaga tctacgtatt agtcatcgct
2251 attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtag atcaatgggc gtggatagcg
2301 gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
2351 gtttgatttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac
2401 tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta
2451 tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca gatcgctgg agacgccatc
2501 cacgtgtttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc
2551 ggcctgcacg tctccttcac gcgcccgcgc ccctacctga ggcgcacatc
2601 cagcccggtt gagtgcggtt ctgcccgcct cgcctgtgg tgcctcctga

```

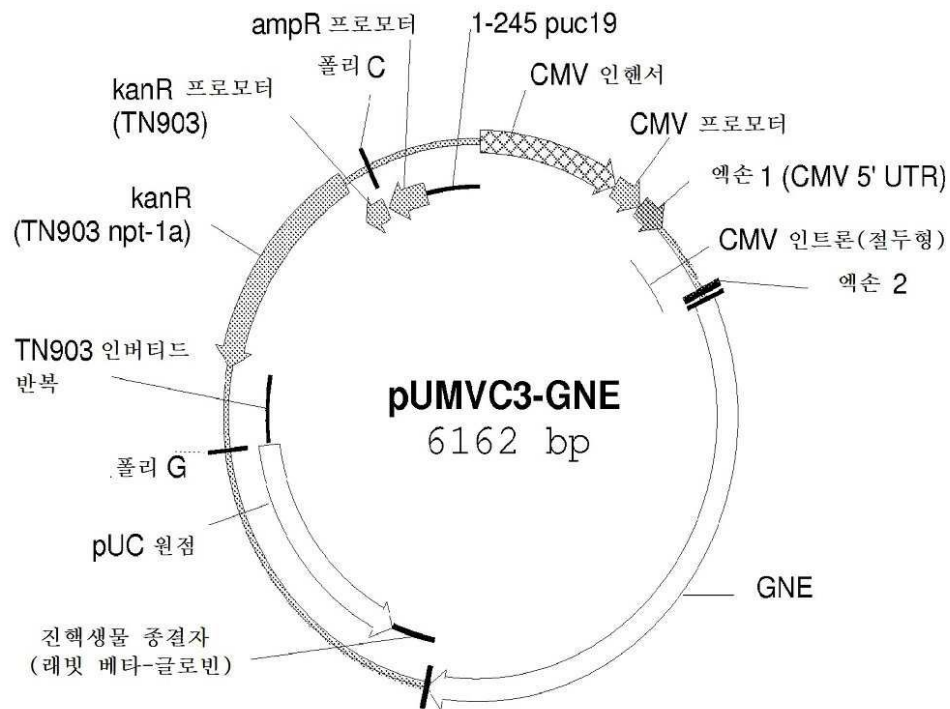

도면2b

```

2651 actgcgtccg ccgtctaggt aagtttaaaag ctcaggtcga gaccgggcct
2701 ttgtccggcg ctcccttgga gcctacctag actcagccgg ctctccacgc
2751 ttgtccctgac cctgcttgct caactctagt tctctcgta acttaatgag
2801 acagatagaa actgggtcttg tagaaacaga gtagtgcgct gcttttctgc
2851 caggtgctga ctctctccc ctgggctttt ttcttttct caggttgaaa
2901 agaagaagac gaagaagacg aagaagacaa accgtcgtcg acatggagaa
2951 gaatggaaat aaccgaaagc tgcgggtttg tgttgctact tghtaacgtg
3001 cagattattc taaacttgcc ccgatcatgt ttggcattaa aaccgaacct
3051 gagttctttg aacttgatgt tgtggtaactt ggctctcacc tgatagatga
3101 ctatggaaat acatatcgaa tgattgaaca agatgacttt gacattaaca
3151 ccaggctaca cacaattgtg agggggagaag atgaggcagc catggtggag
3201 tcagtaggcc tggccctagt gaagctgcca gatgtcctta atcgctgaa
3251 gcctgatata atgattgttc atggagacag gtttgatgcc ctggctctgg
3301 ccacatctgc tgccttgatg aacatccgaa tcttcacat tgaaggtggg
3351 gaagtcagtg ggaccattga tgactctatc agacatgcca taacaaaact
3401 ggctcattat catgtgtgct gcacccgcag tgcagagcag cacctgatat
3451 ccattgttga ggaccatgat cgcactcctt ttggcaggctg cccttccctat
3501 gacaaaactt tctcagccaa gaacaaagac tacatgagca tcattcgcct
3551 gtggctaggt gatcatgtaa aatctaaaga ttacattgtt gcaactacagc
3601 accctgtgac cactgacatt aagcattcca taaaaatgtt tgaattaaaa
3651 ttggatgcac ttatctcatt taacaagcgg accctagtcc tgtttccaaa
3701 tattgacgca gggagcaaaag agatggttcg agtgatgcgg aagaagggca
3751 ttgagcatca tcccaacttt cgtgcagtta aacacgtccc atttgaccag
3801 tttatacagt tgggtgcccc tgctggctgt atgattggga acagcagctg
3851 tggggttcga gaagttggag cttttggaac acctgtgatc aacctgggaa
3901 cacgtcagat tgaagagaa acaggggaga atgttcttca tgtccgggat
3951 gctgacaccc aagacaaaat attgcaagca ctgcaccttc agtttggtaa
4001 acagtacctt tgttcaaaga tatatgggga tggaaatgct gttccaagga
4051 ttttgaagtt tctcaaatct atcgatcttc aagagccact gcaaaaagaaa
4101 ttctgcttcc ctccgtgtaa ggagaatata tctcaagata ttgaccatat
4151 tcttgaact ctaagtgcct tggccgttga tcttggcggg acgaacctcc
4201 gaggttgcaat agtcagcatg aagggtgaaa tagttaagaa gtatactcag
4251 ttcaatccta aaacctatga agagaggatt aatttaatcc tacagatgtg
4301 tgtggaagct gcagcagaag ctgtaaaact gaactgcaga attttgggag
4351 taggcatttc cacaggtggc cgtgtaaatc ctcggaagg aattgtgctg
4401 cattcaacca aactgatcca agagtggaa cctgtggacc ttaggacccc
4451 cctttctgac actttgcata tccctgtgtg ggtagacaat gatggcaact
4501 gtgctgccct ggcgaaagg aaatttggcc aaggaaaggg actggaaaac
4551 tttgttacac ttatcacagg cacaggaatc ggtggtgga ttatccatca
4601 gcatgaattg atccacggaa gctccttctg tgctgcagaa ctgggccacc
4651 ttgttggtgc tctggatggg cctgattgtt cctgtggaag ccatgggtgc
4701 attgaagcat acgctctggg aatggccttg cagagggagg caaaaaagct
4751 ccatgatgag gacctgctct tgggtggaag gatgtcagtg ccaaaagatg
4801 aggtgtggg tgcgctccat ctcatccaag ctgcgaaact tggcaatgcg
4851 aaggcccaga gcatcctaag aacagctgga acagctttgg gtcttgggg
4901 tgtgaacatc ctccatacca tgaatccctc ccttgtgatc ctctcggag
4951 tcttggccag tcaactatata cacattgtca aagacgtcat tcgccagcag
5001 gccttgctct ccgtgcagga cgtggatgtg gtggtttcgg atttggttga
5051 ccccgccctg ctgggtgctg ccagcatggt tctggactac acaacacgca
5101 ggatctacta gtaagatctt ttccctctg ccaaaaatta tggggacatc
5151 atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatatt
5201 cattgcaata gtgtgttggg attttttgtg tctctcactc ggaaggacat
5251 aagggcggcc gctagc

```


도면3



도면4a

```

1  tggccattgc atacggttga tccatatcat aatatgtaca tttatatattg
51  ctcatgtcca acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagtattt
101 aatagtaaat aattacgggg tcattagtgc atagcccata tatggagtgc
151 cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga
201 cccccgcccc ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa
251 tagggacttt ccattgacgt caatgggttg agtatttacg gtaaaactgcc
301 cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga
351 cgtcaatgac ggtaaatggc ccgctgggca ttatgccagc tacatgacct
401 tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt
451 accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt
501 tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt
551 tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc
601 gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat
651 aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgctgggaga cgccatccac
701 gctgttttga cctccataga agacaccggg accgatccag cctccgcggc
751 cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaga gtgacgtaa
801 taccgcctat agactctata ggcacacccc tttggctctt atgcatgcta
851 tactgttttt ggcttggggc ctatacaccc ccgcttcctt atgctatagg
901 tgatggtata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca
951 ctccaacggt ggagggcagt gtagcttgag cagtactcgt tgcgtccgcg
1001 cgcgccacca gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat
1051 gggctctttt tgcagtcacc gtcgtcgacg gtatcgataa gcttgatata
1101 gaattcatgg agaagaatgg aaataaccga aagctcgggg tttgtgttgc
1151 tacttgtaac cgtgcagatt attctaaact tgccccgacg atgtttggca
1201 ttaaaaccga acctgagttc tttgaacttg atgttgtgtt acttggctct
1251 cacctgatag atgactatgg aaatacatat cgaatgattg aacaagatga
1301 ctttgacatt aacaccaggc tacacacaat tgtgagggga gaagatgagg
1351 cagccatggt ggagtcagta ggcctggccc tagtgaagct gccagatgct
1401 cttaatcgcc tgaagcctga tatcatgatt gttcatggag acaggtttga
1451 tgccctggct ctggccacat ctgctgcctt gatgaacatc cgaatccttc
1501 acattgaagg tggggaagtc agtgggacca ttgatgactc tatcagacat
1551 gccataacaa aactggctca ttatcatgtg tgctgcaccc gcagtgcaga
1601 gcagcacctg atatccatgt gtgaggacca tgatcgcatc cttttggcag
1651 gctgccttcc ctatgacaaa cttctctcag ccaagaacaa agactacatg
1701 agcatcattc gcatgtggct aggtgatgat gtaaaatcta aagattacat
1751 tgttgactca cagcaccttg tgaccactga cattaagcat tccataaaaa
1801 tgtttgaatt aacattggat gcaacttatc catttaacaa gcggacccta
1851 gtccctgttc caaatattga cgcagggagc aaagagatgg ttcgagtgat
1901 gcggaagaag ggcattgagc atcatcccaa ctttcgtgca gttaaacacg
1951 tcccatttga ccagtttata cagttgggtg cccatgctgg ctgtatgatt
2001 gggaacagca gctgtggggg tcgagaagtt ggagcttttg gaacacctgt
2051 gatcaacctg ggaacacgct agattggaag agaaacaggg gagaatgttc
2101 ttcatgtccg ggatgctgac acccaagaca aaatattgca agcactgcac
2151 cttcagtttg gtaaacagta cccttggtca aagatatatg gggatggaaa
2201 tgctgttcca aggattttga agtttctcaa atctatcgat cttcaagagc
2251 cactgcaaaa gaaattctgc tttctctctg tgaaggagaa tatctctcaa
2301 gatattgacc atattcttga aactctaagt gccttgcccg ttgatcttgg
2351 cgggacgaac ctccgagttg caatagtcag catgaagggt gaaatagtta
2401 agaagtatac tcagttcaat cctaaaacct atgaagagag gattaattta
2451 atcctacaga tgtgtgtgga agctgcagca gaagctgtaa aactgaactg
2501 cagaattttg ggagtaggca ttccacacag tggccgtgta aatcctcggg
2551 aaggaaattg gctgcattca accaaactga tccaagagtg gaactctgtg
2601 gaccttagga ccccccttcc tgacactttg catctccctg tgtgggtaga

```

도면4b

```

2651 caatgatggc aactgtgctg ccctggcgga aaggaaattt ggccaaggaa
2701 agggactgga aaactttgtt acacttatca caggcacagg aatcggtggt
2751 ggaattatcc atcagcatga attgatccac ggaagctcct tctgtgctgc
2801 agaactgggc caccttgttg tgtctctgga tgggcctgat tgttctctgtg
2851 gaagccatgg gtgcattgaa gcatacgcc ctggaatggc cttgcagagg
2901 gaggcacaaa agctccatga tgaggacctg ctcttggtgg aagggatgtc
2951 agtgccaaaa gatgaggtcg tgggtgctgt ccattctcat caagctgcga
3001 aacttggcaa tgcgaaggcc cagagcatcc taagaacagc tggaaacagct
3051 ttgggtcttg ggttgtgaa catectccat accatgaatc cctcccttgt
3101 gatcctctcc ggagtcctgg ccagtcacta tatccacatt gtcaaaagacg
3151 tcattcgcca gcaggccttg tcctccgtgc aggacgtgga tgtggtggtt
3201 tccgatttgg ttgaccccg cctgctgggt gctgccagca tggttctgga
3251 ctacacaaca cgcaggatct actaggatcc agatcttttt ccctctgcca
3301 aaaattatgg ggacatcatg aagccctctg agcatctgac ttctggctaa
3351 taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct
3401 ctactcggga aggacatatg ggaggcgaat tcatttaaaa catcagaatg
3451 agtatttggg ttagagtttg gcaacatatg cccattcttc cgcttcctcg
3501 ctactgactc cgtcgctgc ggtcgctcgt ctgcccagag cggtatcagc
3551 tcaactcaaa gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataaacgag
3601 gaaagaacat gtgagcaaaa ggcagcaaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
3651 gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca
3701 caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa
3751 gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgctgc tctgttccg
3801 accctgcgcg ttaccggata cctgtccgce tttctccctt cgggaagcgt
3851 ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctc
3901 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc
3951 tgcgcttatc ccggttaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga
4001 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt
4051 atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac
4101 actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt
4151 cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta
4201 gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaggga
4251 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtggaa
4301 cgaaaactca cgttaaggga ttttggctat gagattatca aaaaggatct
4351 tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt
4401 atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtagggc
4451 acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcg
4501 gggggggggg gcgctgaggt ctgctcgtg aagaaggtgt tgetgactca
4551 taccaggcct gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccag
4601 gttgatgaga gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt
4651 gctttgccac ggaaacggtct gcgttgctcg gaagatgcgt gatctgatcc
4701 ttcaactcag caaaagtctg atttattcaa caaagccgcc gtcccgtaa
4751 gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca attctgatta
4801 gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttatc atatcaggat
4851 tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaaac
4901 tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat
4951 tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa
5001 taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga atccggtgag
5051 aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc
5101 attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaacg ttattcattc
5151 gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa
5201 ttacaacacg gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc
5251 aacaatatct tcacctgaat caggatatct ttctaatacc tggaatgctg

```


도면4c

```

5301 ttttcccggtg gatcgagtg gtgagtaacc atgcatcatc aggagtagcg
5351 ataaaatgct tgatggtegg aagaggcata aattccgtca gccagtttag
5401 tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatggt
5451 tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc
5501 gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc cttttatacc catataaatc
5551 agcatccatg ttggaattta atcgcgccct cgagcaagac gtttcccggt
5601 gaatatggct cataacaccc cttgtattac tgtttatgta agcagacagt
5651 tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt aacatcagag
5701 attttgagac acaacgtggc tttccccccc ccccattat tgaagcattt
5751 atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgatg tatttagaaa
5801 aataaaca aa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga
5851 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta
5901 tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc
5951 tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc
6001 cgggagcaga caagcccgtc agggcgctgc agcgggtgtt ggccgggtgc
6051 ggggctggct taactatgag gcatcagagc agattgtact gagagtgcac
6101 catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat
6151 cagattggct at

```

도면5

```

1 MEKNGNNRKL RVCVATCNRA DYSKLAPIMF GIKTEPEFFE LDVVVLGSHL IDDYGNITYRM
61 IEQDDFDINT RLHTIVRGED EAAMVESVGL ALVKLPDVLN RLKPDIMIVH GDRFDALALA
121 TSAALMNIRI LHIEGGEVSG TIDDSIRHAI TKLAHYHVCC TRSAEQHLIS MCEDHDRILL
181 AGCPSYDKLL SAKNKDYMSI IRMWLGDDVK SKDYIVALQH PVTTDIKHSI KMFELTLDAL
241 ISFNKRTLVL FPNIDAGSKE MVRVMRKKGI EHPNFRAVK HVPFDQFIQL VAHAGCMIGN
301 SSCGVREVGA FGTPVINLGT RQIGRETGEN VLHVRDADTQ DKILQALHLQ FGKQYPCSKI
361 YGDGNAV PRI LKFLKSIDLQ EPLQKKFCFP PVKENISQDI DHILETSLAL AVDLGGTNLR
421 VAIIVSMKGEI VKKYTQFNPK TYEERINLIL QMCVEAAAEA VKLNCRILGV GISTGGRVNP
481 REGIVLHSTK LIQEWNSVDL RTPLSDTLHL PVWVDNDGNC AALAERKFGQ GKLENFVTL
541 ITGTGIGGGI IHQHELIHGS SFCAAEGLHL VVSLDGPDGS CGSHGCIEAY ASGMALQREA
601 KKLHDEDLLL VEGMSVPKDE AVGALHLIQA AKLGNKAQS ILRTAGTALG LGVVNLTHTM
661 NPSLVILSGV LASHYIHIVK DVIRQQALSS VQDVDVVVSD LVDPALLGAA SMVLDYTTTR
721 IY*

```

도면6a

```

NP_001121699b 1
METYGYLQRESCFQGPHELYFKNLSKRKQIMEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 80
NP_005467 1 -----
MEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 49
NP_001177317 1 -----MFIGDCSVAAKP-----RKQLLC-----
SLFQTTLGYRARASGWKPMVICRGSH 44
NP_001177312 1 -----
MEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 49
NP_001177313 -----
---
```

```

NP_001121699 81
LIDDYGNTRYMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVLNRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 160
NP_005467 50
LIDDYGNTRYMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVLNRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 129
NP_001177317 45
AFKDLINTRYMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVLNRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 124
NP_001177312 50
LIDDYGNTRYMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVLNRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 129
NP_001177313 1 -----
MIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVLNRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 70
```

```

NP_001121699 161
ILHIEGGEVSGTIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCEHDHRIILAGCPSYDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 240
NP_005467 130
ILHIEGGEVSGTIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCEHDHRIILAGCPSYDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 209
NP_001177317 125
ILHIEGGEVSGTIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCEHDHRIILAGCPSYDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 204
NP_001177312 130
ILHIEGGEVSGTIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCEHDHRIILAGCPSYDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 209
NP_001177313 71
ILHIEGGEVSGTIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCEHDHRIILAGCPSYDKLLSAKNKDYMSIIRMWLG--- 147
```

```

NP_001121699 241
KSKDYIVALQHPVTIDIKHSIKMFELTDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRVAVKHVPFDQFIQ 320
NP_005467 210
KSKDYIVALQHPVTIDIKHSIKMFELTDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRVAVKHVPFDQFIQ 289
NP_001177317 205
KSKDYIVALQHPVTIDIKHSIKMFELTDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRVAVKHVPFDQFIQ 284
NP_001177312 210
KSKDYIVALQHPVTIDIKHSIKMFELTDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRVAVKHVPFDQFIQ 289
NP_001177313 148 -----
SKEMVRVMRKKGIEHHPNFRVAVKHVPFDQFIQ 179
```

[** GNE 알로스테릭 도메인 **]

TLVLPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFR

GNE pR263Q	Q
GNE pR263W	W
GNE pR263L	L
GNE pR266Q	Q
GNE pR266W	W

```

NP_001121699 321
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 400
NP_005467b 290
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 369
NP_001177317 285
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 364
```


도면6b

```

NP_001177312 290
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTQIGRETGENVLHVRDADTQDKILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 369
NP_001177313 180
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTQIGRETGENVLHVRDADTQDKILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 259

NP_001121699 401
ILKFLKSIDLQEPLQKKFCFPPVKENISQDIDHILETSLALAVDLGGTNLRVAIVSMKGEIVKKYTQFNPKTYEERINLI 480
NP_005467b 370
ILKFLKSIDLQEPLQKKFCFPPVKENISQDIDHILETSLALAVDLGGTNLRVAIVSMKGEIVKKYTQFNPKTYEERINLI 449
NP_001177317 365
ILKFLKSIDLQEPLQKKFCFPPVKENISQDIDHILETSLALAVDLGGTNLRVAIVSMKGEIVKKYTQFNPKTYEERINLI 444
NP_001177312 370
ILKFLKSIDLQEPLQKKFCFPPVKENISQDIDHILETSLALAVDLGGTNLRVAIVSMKGEIVKKYTQFNPKTYEERINLI 449
NP_001177313 260
ILKFLKSIDLQEPLQKKFCFPPVKENISQDIDHILETSLALAVDLGGTNLRVAIVSMKGEIVKKYTQFNPKTYEERINLI 339

NP_001121699 481
LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNSVDLRTPLSDTLHLPVWVDNDGNCAALAERKFG 560
NP_005467b 450
LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNSVDLRTPLSDTLHLPVWVDNDGNCAALAERKFG 529
NP_001177317 445
LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNSVDLRTPLSDTLHLPVWVDNDGNCAALAERKFG 524
NP_001177312 450 LQMCVEAAAEAVKLNCRILGV-----
---- 470
NP_001177313 340
LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNSVDLRTPLSDTLHLPVWVDNDGNCAALAERKFG 419

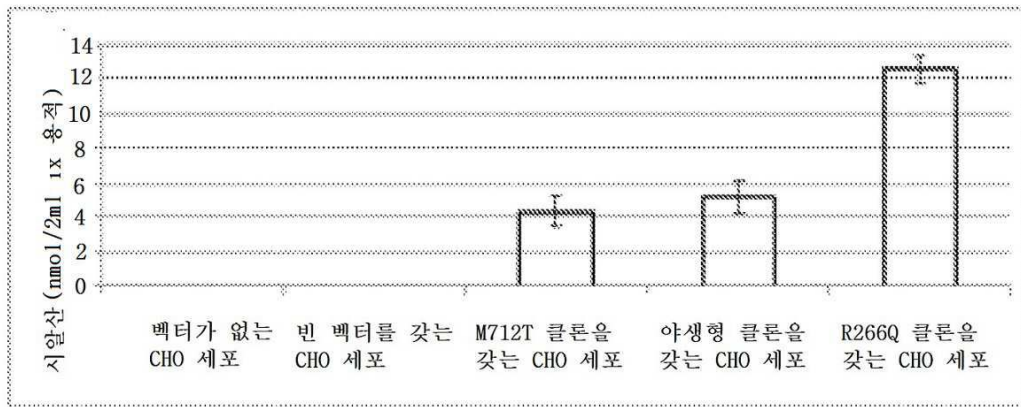
NP_001121699 561
QKGLENFVILITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAELGHLVVS LDGPDSCSGSHGCI EAYASGMALQREAKKLHDEDLI 640
NP_005467b 530
QKGLENFVILITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAELGHLVVS LDGPDSCSGSHGCI EAYASGMALQREAKKLHDEDLI 609
NP_001177317 525
QKGLENFVILITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAELGHLVVS LDGPDSCSGSHGCI EAYASGMALQREAKKLHDEDLI 604
NP_001177312 471 -----
GIGGGIIHQHELIHGSSFCAELGHLVVS LDGPDSCSGSHGCI EAYASGMALQREAKKLHDEDLI 535
NP_001177313 420
QKGLENFVILITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAELGHLVVS LDGPDSCSGSHGCI EAYASGMALQREAKKLHDEDLI 499

NP_001121699 641
LVEGMSVVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKQSILRTAGTALGLGVVNILHTMNP SLVILSGVLASHYIHIVKDVIRQQALS 720
NP_005467b 610
LVEGMSVVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKQSILRTAGTALGLGVVNILHTMNP SLVILSGVLASHYIHIVKDVIRQQALS 689
NP_001177317 605
LVEGMSVVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKQSILRTAGTALGLGVVNILHTMNP SLVILSGVLASHYIHIVKDVIRQQALS 684
NP_001177312 536
LVEGMSVVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKQSILRTAGTALGLGVVNILHTMNP SLVILSGVLASHYIHIVKDVIRQQALS 615
NP_001177313 500
LVEGMSVVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKQSILRTAGTALGLGVVNILHTMNP SLVILSGVLASHYIHIVKDVIRQQALS 579

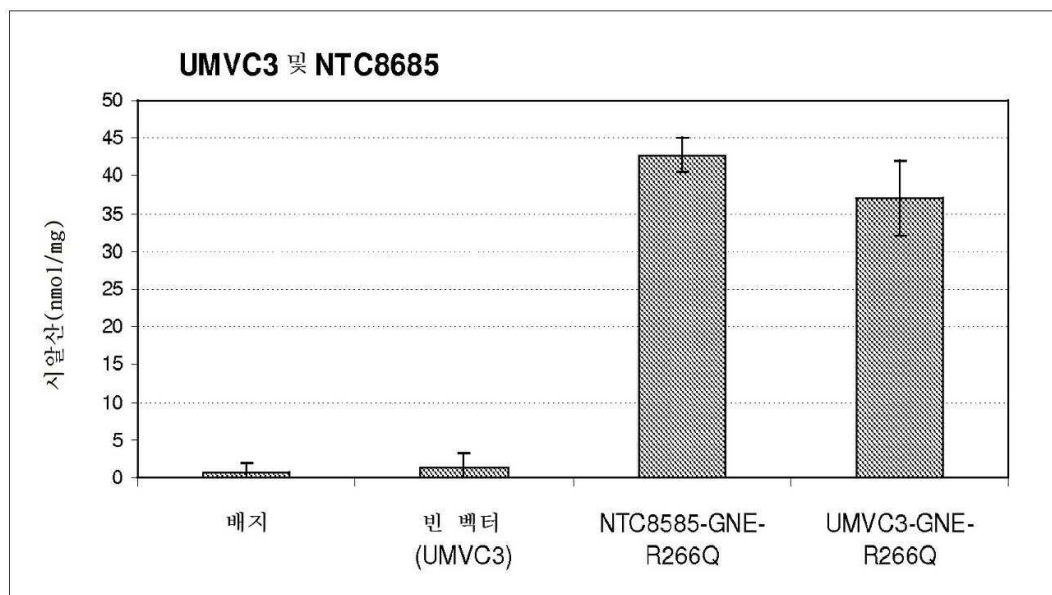
NP_001121699 721 SVQDQDVVVSDLVDPALLGAASMLDYTTTTRIY 753
NP_005467b 690 SVQDQDVVVSDLVDPALLGAASMLDYTTTTRIY 722
NP_001177317 685 SVQDQDVVVSDLVDPALLGAASMLDYTTTTRIY 717
NP_001177312 616 SVQDQDVVVSDLVDPALLGAASMLDYTTTTRIY 648
NP_001177313 580 SVQDQDVVVSDLVDPALLGAASMLDYTTTTRIY 612

```

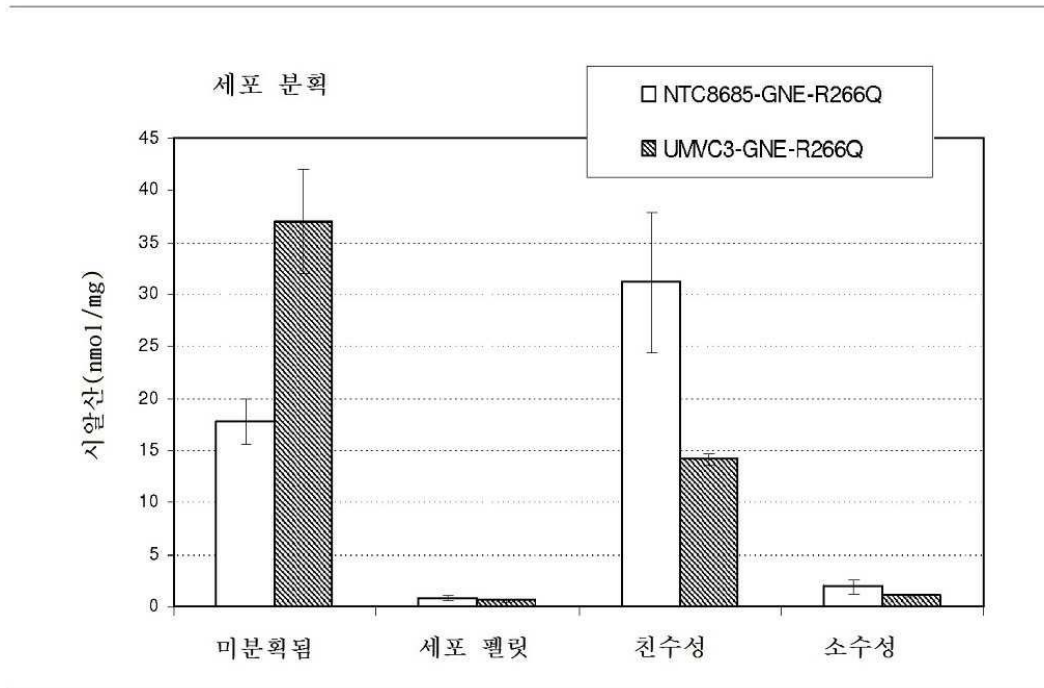
도면7



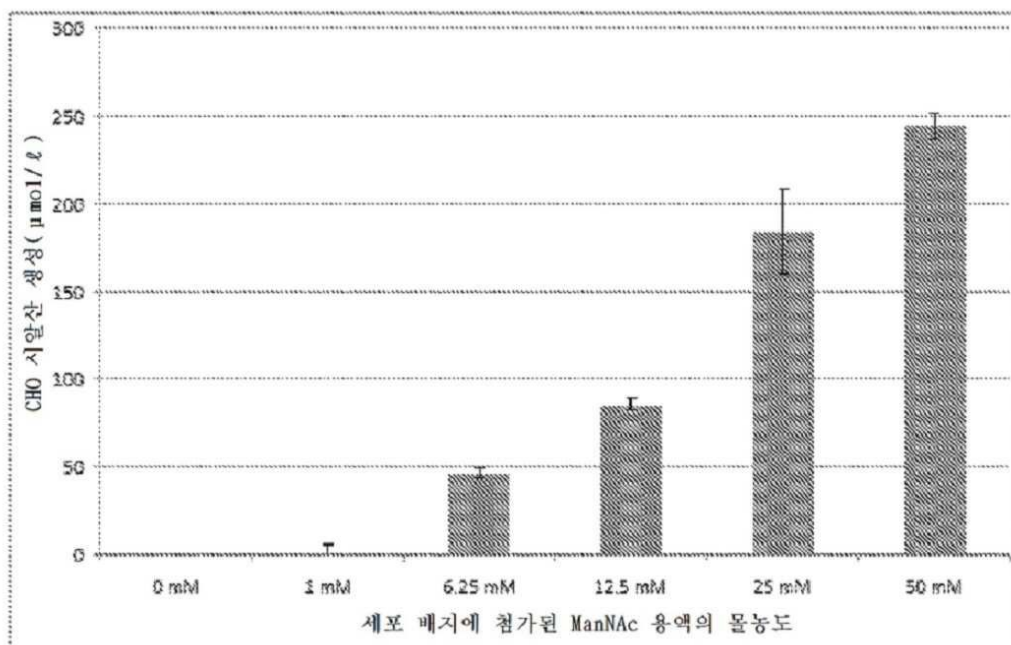
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> HIBM Research Group, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR INCREASING SIALIC ACID PRODUCTION
AND TREATING SIALIC RELATED DISEASE CONDITIONS

<130> WO2012/106465

<140> PCT/US2012/023536

<141> 2012-02-01

<150> US 61/438,585

<151> 2011-02-01

<160> 14

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 5266

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccgcctaattg agcgggcttt ttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcgggcac 60

tcttcctggg tctgggtgat aaattcgcaa gggtatcatg gcggacgacc ggggttcgag 120

ccccgtatcc ggccgtccgc cgtgatccat gcggttaccg cccgcgtgtc gaaccaggt 180

gtgcgacgtc agacaacggg ggagtgtctc ttttggttc cttccctac cgtctgcct 240

cgcgctttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 300

agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt caggcgcggt cagcgggtgt 360

tggcgggtgt cggggcgag ccatgacca gtacagtagc gatagcggag tgtatactgg 420

cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 480

ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgttc ctgctcact 540

gactcgctgc gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta 600

atagcgttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 660

caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc 720

cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta 780

taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt tccgacctg 840

ccgcttaccg gatacctgtc cgcttttct ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 900

tcacgtgtga ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 960

gaaccccccg ttcagccgca ccgtgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac 1020

ccggtaaagac acgacttacc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 1080

aggatatgtg gcggtgctac agagtcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga 1140

agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaag aagagttggt 1200

agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag	1260
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct	1320
gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg	1380
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtitta aatcaatcta aagtatatat	1440
gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgatc	1500
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccctgcaa ccacgtttgt gtagaattgg	1560
taaagagagt cgtgtaaaat atcgagtctg cacatcttgt tgtctgatta ttgatttttg	1620
gcgaaacat ttgatcatat gacaagatgt gtatctacct taacttaatg attttgataa	1680
aaatcattag gtacccctga tcactgtgga atgtgtgtca gttaggggtg ggaaagtccc	1740
caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct caattagtca gcaaccagg	1800
gtggaaagtc cccaggtccc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt	1860
cagcaacat agtcccgccc ctaactccgc ccatcccgcc cctaactccg cccagttacg	1920
gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc	1980
ccgcctggct gaccgcccga cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc	2040
atagtaacgc caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact	2100
gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat	2160
gacggtaaat ggcccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact	2220
tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac	2280
atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac	2340
gtcaatggga gtttgtttt gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac	2400
tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta tataagcaga	2460
gctcgtttag tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgtgtttt tgacctccat	2520
agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc ggctcgcatc tctccttcac gcgcccgcg	2580
ccctacctga ggccgccatc cagcccggtt gagtcgcgtt ctgccgcctc ccgcctgtgg	2640
tgcctcctga actgcgtccg ccgtctaggt aagtttaaag ctacaggtcga gaccgggcct	2700
ttgtccggcg ctcccttggg gcctacctag actcagccgg ctctccacgc tttgcctgac	2760
cctgcttgct caactctagt tctctcgta acttaatgag acagatagaa actgggtctg	2820
tagaaacaga gtagtcgctt gcttttctgc cagggtgctga cttctctccc ctgggctttt	2880
ttctttttct caggttgaaa agaagaagac gaagaagacg aagaagacaa accgtcgtcg	2940

acatggagaa gaatggaaat aaccgaaagc tgcgggtttg tgttgctact tgtaaccgtg	3000
cagattattc taaacttgcc cccatcatgt ttggcattaa aaccgaacct gagttctttg	3060
aacttgatgt tgtggtactt ggctctcacc tgatagatga ctatggaaat acatatcgaa	3120
tgattgaaca agatgacttt gacattaaca ccaggctaca cacaattgtg aggggagaag	3180
atgaggcagc catggtggag tcagtaggcc tggccctagt gaagctgcca gatgtcctta	3240
atgcctgaa gctgatatc atgattgttc atggagacag gtttgatgcc ctggctctgg	3300
ccacatctgc tgccttgatg aacatccgaa tccttcacat tgaaggtggg gaagtcagtg	3360
ggaccattga tgactctatc agacatgcca taacaaaact ggctcattat catgtgtgct	3420
gcacccgcag tgcagagcag cacctgatat ccatgtgtga ggacatgat cgcaccttt	3480
tggcaggctg ccttcctat gacaaacttc tctcagccaa gaacaaagac tacatgagca	3540
tcattcgcat gtggctaggt gatgatgtaa aatctaaaga ttacattgtt gcactacagc	3600
accctgtgac cactgacatt aagcattcca taaaaatgtt tgaattaaca ttggatgcac	3660
ttatctcatt taacaagcgg accctagtcc tgtttccaaa tattgacgca gggagcaaag	3720
agatggttcg agtgatgcgg aagaagggca ttgagcatca tccaacttt cgtgcagtta	3780
aacacgtccc atttgaccag tttatacagt tggttgcca tgctggctgt atgattggga	3840
acagcagctg tggggttcga gaagtggag cttttggaac acctgtgac aacctgggaa	3900
cacgtcagat tggaagagaa acaggggaga atgttcttca tgtccgggat gctgacaccc	3960
aagacaaaat attgcaagca ctgcaccttc agtttggtta acagtacct tgttcaaaga	4020
tatatgggga tggaatgct gttccaagga tttgaagtt tctcaaatct atcgatcttc	4080
aagagccact gcaaaagaaa ttctgctttc ctctgtgaa ggagaatatc tctcaagata	4140
ttgaccatat tcttgaaact ctaagtgcct tggccgttga tcttggcggg acgaacctcc	4200
gagttgcaat agtcagcatg aagggtgaaa tagttaagaa gtatactcag ttcaatccta	4260
aaacctatga agagaggatt aatttaatcc tacagatgtg tgtggaagct gcagcagaag	4320
ctgtaaaact gaactgcaga attttgggag taggcatttc cacaggtggc cgtgtaaate	4380
ctcggaagg aattgtgtg cattcaacca aactgatcca agagtggaac tctgtggacc	4440
ttaggacccc ctttctgac actttgcac tcctgtgtg ggtagacaat gatggcaact	4500
gtgtgcctt ggcggaagg aaatttggcc aaggaaaggg actggaaaac ttgtttacac	4560
ttatcacagg cacaggaatc ggtgtgtgaa ttatccatca gcatgaattg atccacggaa	4620
gtccttctg tctgcagaa ctgggccacc ttgttgttc tctggatggg cctgattgtt	4680

cctgtggaag ccatgggtgc attgaagcat acgcctctgg aatggccttg cagaggagg 4740
caaaaaagct ccatgatgag gacctgctct tgggtggaagg gatgtcagt ccaaaagatg 4800
aggctgtggg tgcgtccat ctcatccaag ctgcgaaact tggcaatgcg aaggcccaga 4860
gcatcctaag aacagctgga acagctttgg gtcttgggggt tgtgaacatc ctccatacca 4920
tgaatccctc ccttgtgac ctctccggag tcctggccag tcaactatc cacattgtca 4980
aagacgtcat tcgccagcag gccttgctct ccgtgcagga cgtggatgtg gtggtttcgg 5040
atttggttga ccccgccctg ctgggtgctg ccagcatggt tctggactac acaacacgca 5100

ggatctacta gtaagatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc 5160
ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatatt cattgcaata gtgtgttgga 5220
atTTTTgtg tctctcactc ggaaggacat aagggcggcc gctagc 5266

<210> 2

<211> 6162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tggccattgc atacgttgta tccatatcat aatatgtaca tttatattgg ctcatgtcca 60
acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaac aattacgggg 120
tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacct aacttacggt aaatggcccg 180

cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata 240
gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatattac gtaaactgcc 300
cattggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac 360
ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg 420
cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc 480
aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc 540
aatgggagtt tgTTTTggca ccaaaatcaa cgggacttcc caaaatgtcg taacaactcc 600

gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat aagcagagct 660
cgTTTTtagta accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga 720
agacaccggg accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc 780
cgtgccaaga gtgacgtaag taccgcctat agactctata ggacaccccc ttTggctctt 840
atgatgcta tactgttttt ggcttggggc ctatacacc cgccttctt atgtatagg 900
tgatgttata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctccaacggt 960

ggagggcagt gtagtctgag cagtactcgt tgctgccg cgcgccacca gacataatag 1020

ctgacagact aacagactgt tcctttccat gggctctttc tgcagtcacc gtcgtcgacg 1080

gtatcgataa gcttgatata gaattcatgg agaagaatgg aaataaccga aagctgcggg 1140

tttgtgttg tacttgtaac cgtgcagatt attctaaact tgccccgac atgtttggca 1200

ttaaaaccga acctgagttc ttggaacttg atgttggtt acttggtct cacctgatag 1260

atgactatgg aaatacatat cgaatgattg aacaagatga ctttgacatt aacaccaggc 1320

tacacacaat tgtgagggga gaagatgagg cagccatggt ggagtcagta ggcctggccc 1380

tagtgaagct gccagatgct cttaatcgcc tgaagcctga tatcatgatt gttcatggag 1440

acaggtttga tgccctggct ctggccacat ctgctgcctt gatgaacatc cgaatccttc 1500

acattgaagg tggggaagtc agtgggacca ttgatgactc tatcagacat gccataacaa 1560

aactggctca ttatcatgtg tgctgcaccc gcagtcagta gcagcacctg atatccatgt 1620

gtgaggacca tgatcgcatc cttttggcag gctgccttc ctatgacaaa cttctctcag 1680

ccaagaacaa agactacatg agcatcattc gcatgtggct aggtgatgat gtaaaatcta 1740

aagattacat tgttgacta cagcacctg tgaccactga cattaagcat tccataaaaa 1800

tgtttgaatt aacattggat gcacttatct catttaacaa gcggacccta gtctgtttc 1860

caaatattga cgaggggagc aaagagatgg ttcgagtgt gcggaagaag ggcatgtgac 1920

atcatcccaa ctttcgtgca gttaaacacg tccatttga ccagtttata cagttggttg 1980

cccatgctgg ctgtatgatt gggaacagca gctgtggggt tcgagaagtt ggagcttttg 2040

gaacacctgt gatcaacctg ggaacacgtc agattggaag agaaacaggg gagaatgttc 2100

ttcatgtccg ggatgctgac acccaagaca aaatattgca agcactgcac cttcagtttg 2160

gtaaacagta ccctgttca aagatatatg gggatggaaa tgctgttcca aggattttga 2220

agttttctca atctatcgat cttcaagagc cactgcaaaa gaaattctgc ttctctctg 2280

tgaaggagaa tatctctcaa gatattgacc atattcttga aactctaagt gccttgccg 2340

ttgatcttgg cgggacgaac ctccgagttg caatagtcag catgaagggt gaaatagtta 2400

agaagtatac tcagttcaat cctaaaacct atgaagagag gattaattta atctacaga 2460

tgtgtgtgga agctgcagca gaagctgtaa aactgaactg cagaattttg ggagtaggca 2520

tttcacagg tggcctgtga aatctcggg aaggaattgt gctgcattca accaaactga 2580

tccaagagtg gaactctgtg gaccttagga ccccccttc tgacactttg catctccctg 2640

tgtgggtaga caatgatggc aactgtgctg ccctggcgga aaggaaattt ggccaaggaa 2700

agggactgga aaactttgtt acacttatca caggcacagg aatcgggtgtt ggaattatcc 2760
atcagcatga attgatccac ggaagctcct tctgtgctgc agaactgggc caccttgttg 2820
tgtctctgga tgggcctgat tgttcctgtg gaagccatgg gtgcattgaa gcatacgct 2880
ctggaatggc ctigcagagg gaggcaaaaa agctccatga tgaggacctg ctcttgggtg 2940
aagggatgtc agtgccaaaa gatgaggctg tgggtgcgct ccatctcatc caagctcgca 3000
aacttggcaa tgcgaaggcc cagagcatcc taagaacagc tggacagct ttgggtcttg 3060
gggttgtgaa catcctccat accatgaatc cctcccttgt gatcctctcc ggagtcctgg 3120

ccagtcacta tatccacatt gtcaaagacg tcattcgcca gcaggccttg tctccgtgc 3180
aggacgtgga tgttggtgtt tcggatttgg ttgacccgc cctgctgggt gctgccagca 3240
tggttctgga ctacacaaca cgcaggatct actaggatcc agatcttttt ccctctgcca 3300
aaaattatgg ggacatcatg aagccccctg agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat 3360
ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctactcgga aggacatatg 3420
ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttgg ttagagtttg gcaacatatg 3480
cccattcttc cgcttctcg ctactgact cgtgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag 3540

cggtatcagc tactcaaaag gcgtaatac ggttatccac agaatcagg gataacgcag 3600
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 3660
tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 3720
agagggtggc aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 3780
tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 3840
cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 3900
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca gcccgaccgc tgcgccttat 3960

ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 4020
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 4080
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 4140
cagttacctt cggaataaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta 4200
gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag 4260
atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga 4320
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 4380

gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa 4440
tcagttaggc acctatctca gcgactgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcg 4500
gggggggggg gcgctgaggt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgactca taccaggcct 4560

gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga gctttgttgt 4620
 aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct gcgttgtcgg 4680
 gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagtctg atttattcaa caaagccgcc 4740
 gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgccca gtgttacaac caattaacca attctgatta 4800

 gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc 4860
 atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag 4920
 gatggcaaga tcttggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat 4980
 taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatt aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga 5040
 atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc 5100
 attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaacg ttattcattc gtgattgcgc 5160
 ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg 5220

 caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt tcacctgaat caggatattc 5280
 ttctaatacc tggaatgctg ttttcccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcatc 5340
 aggagtagcg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag 5400
 tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgtacct ttgccatgtt tcagaaacaa 5460
 ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gcccacatt 5520
 atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcgccct 5580
 cgagcaagac gtttcccgtt gaatatggct cataacaccc cttgtattac tgtttatgta 5640

 agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt aacatcagag 5700
 attttgagac acaacgtggc tttccccccc ccccatatt tgaagcattt atcagggtta 5760
 ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 5820
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 5880
 aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 5940
 tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca gcttctctgt aagcggatgc 6000
 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcggtgtc ggggctggct 6060

 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc 6120
 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat cagattggct at 6162

 <210> 3
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

Ile Ser Phe Asn Lys Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala
245 250 255

Gly Ser Lys Glu Met Val Arg Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His
260 265 270

His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln Phe Ile
275 280 285

Gln Leu Val Ala His Ala Gly Cys Met Ile Gly Asn Ser Ser Cys Gly
290 295 300

Val Arg Glu Val Gly Ala Phe Gly Thr Pro Val Ile Asn Leu Gly Thr
305 310 315 320

Arg Gln Ile Gly Arg Glu Thr Gly Glu Asn Val Leu His Val Arg Asp
325 330 335

Ala Asp Thr Gln Asp Lys Ile Leu Gln Ala Leu His Leu Gln Phe Gly
340 345 350

Lys Gln Tyr Pro Cys Ser Lys Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Ala Val Pro
355 360 365

Arg Ile Leu Lys Phe Leu Lys Ser Ile Asp Leu Gln Glu Pro Leu Gln
370 375 380

Lys Lys Phe Cys Phe Pro Pro Val Lys Glu Asn Ile Ser Gln Asp Ile
385 390 395 400

Asp His Ile Leu Glu Thr Leu Ser Ala Leu Ala Val Asp Leu Gly Gly
405 410 415

Thr Asn Leu Arg Val Ala Ile Val Ser Met Lys Gly Glu Ile Val Lys
420 425 430

Lys Tyr Thr Gln Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Glu Glu Arg Ile Asn Leu
435 440 445

Ile Leu Gln Met Cys Val Glu Ala Ala Ala Glu Ala Val Lys Leu Asn
450 455 460

Cys Arg Ile Leu Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Gly Arg Val Asn Pro
465 470 475 480

Arg Glu Gly Ile Val Leu His Ser Thr Lys Leu Ile Gln Glu Trp Asn

485 490 495
 Ser Val Asp Leu Arg Thr Pro Leu Ser Asp Thr Leu His Leu Pro Val
 500 505 510
 Trp Val Asp Asn Asp Gly Asn Cys Ala Ala Leu Ala Glu Arg Lys Phe
 515 520 525
 Gly Gln Gly Lys Gly Leu Glu Asn Phe Val Thr Leu Ile Thr Gly Thr
 530 535 540
 Gly Ile Gly Gly Gly Ile Ile His Gln His Glu Leu Ile His Gly Ser

 545 550 555 560
 Ser Phe Cys Ala Ala Glu Leu Gly His Leu Val Val Ser Leu Asp Gly
 565 570 575
 Pro Asp Cys Ser Cys Gly Ser His Gly Cys Ile Glu Ala Tyr Ala Ser
 580 585 590
 Gly Met Ala Leu Gln Arg Glu Ala Lys Lys Leu His Asp Glu Asp Leu
 595 600 605
 Leu Leu Val Glu Gly Met Ser Val Pro Lys Asp Glu Ala Val Gly Ala

 610 615 620
 Leu His Leu Ile Gln Ala Ala Lys Leu Gly Asn Ala Lys Ala Gln Ser
 625 630 635 640
 Ile Leu Arg Thr Ala Gly Thr Ala Leu Gly Leu Gly Val Val Asn Ile
 645 650 655
 Leu His Thr Met Asn Pro Ser Leu Val Ile Leu Ser Gly Val Leu Ala
 660 665 670
 Ser His Tyr Ile His Ile Val Lys Asp Val Ile Arg Gln Gln Ala Leu

 675 680 685
 Ser Ser Val Gln Asp Val Asp Val Val Val Ser Asp Leu Val Asp Pro
 690 695 700
 Ala Leu Leu Gly Ala Ala Ser Met Val Leu Asp Tyr Thr Thr Arg Arg
 705 710 715 720
 Ile Tyr

<210> 4

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Thr Tyr Gly Tyr Leu Gln Arg Glu Ser Cys Phe Gln Gly Pro

1 5 10 15

His Glu Leu Tyr Phe Lys Asn Leu Ser Lys Arg Asn Lys Gln Ile Met

20 25 30

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

35 40 45

Asn Arg Ala Asp Tyr Ser Lys Leu Ala Pro Ile Met Phe Gly Ile Lys

50 55 60

Thr Glu Pro Glu Phe Phe Glu Leu Asp Val Val Val Leu Gly Ser His

65 70 75 80

Leu Ile Asp Asp Tyr Gly Asn Thr Tyr Arg Met Ile Glu Gln Asp Asp

85 90 95

Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile Val Arg Gly Glu Asp Glu

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Asn Arg Leu Lys Pro Asp Ile Met Ile Val His Gly Asp Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Leu His Ile Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile Asp Asp Ser

165 170 175

Ile Arg His Ala Ile Thr Lys Leu Ala His Tyr His Val Cys Cys Thr

180 185 190

Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp His Asp Arg

195 200 205

Ile Leu Leu Ala Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ser Ala Lys

210 215 220
 Asn Lys Asp Tyr Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly Asp Asp Val
 225 230 235 240
 Lys Ser Lys Asp Tyr Ile Val Ala Leu Gln His Pro Val Thr Thr Asp
 245 250 255
 Ile Lys His Ser Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr Leu Asp Ala Leu Ile
 260 265 270

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

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

<210> 5

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Lys Thr Glu Pro Glu Phe Phe Glu Leu Asp Val Val Val Leu Gly Ser
 35 40 45
 His Leu Ile Asp Asp Tyr Gly Asn Thr Tyr Arg Met Ile Glu Gln Asp
 50 55 60
 Asp Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile Val Arg Gly Glu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ala Ala Met Val Glu Ser Val Gly Leu Ala Leu Val Lys Leu Pro
 85 90 95
 Asp Val Leu Asn Arg Leu Lys Pro Asp Ile Met Ile Val His Gly Asp
 100 105 110
 Arg Phe Asp Ala Leu Ala Leu Ala Thr Ser Ala Ala Leu Met Asn Ile
 115 120 125
 Arg Ile Leu His Ile Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile Asp Asp
 130 135 140
 Ser Ile Arg His Ala Ile Thr Lys Leu Ala His Tyr His Val Cys Cys
 145 150 155 160
 Thr Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp His Asp
 165 170 175
 Arg Ile Leu Leu Ala Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ser Ala
 180 185 190
 Lys Asn Lys Asp Tyr Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly Asp Asp
 195 200 205
 Val Lys Ser Lys Asp Tyr Ile Val Ala Leu Gln His Pro Val Thr Thr
 210 215 220
 Asp Ile Lys His Ser Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr Leu Asp Ala Leu
 225 230 235 240
 Ile Ser Phe Asn Lys Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala
 245 250 255
 Gly Ser Lys Glu Met Val Arg Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His
 260 265 270
 His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln Phe Ile

275 280 285
Gln Leu Val Ala His Ala Gly Cys Met Ile Gly Asn Ser Ser Cys Gly
290 295 300
Val Arg Glu Val Gly Ala Phe Gly Thr Pro Val Ile Asn Leu Gly Thr

305 310 315 320
Arg Gln Ile Gly Arg Glu Thr Gly Glu Asn Val Leu His Val Arg Asp
325 330 335
Ala Asp Thr Gln Asp Lys Ile Leu Gln Ala Leu His Leu Gln Phe Gly
340 345 350
Lys Gln Tyr Pro Cys Ser Lys Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Ala Val Pro
355 360 365
Arg

<210> 6

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Ala Leu Ala Thr Ser Ala Ala Leu Met Asn Ile Arg Ile Leu His Ile
115 120 125

Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile Asp Asp Ser Ile Arg His Ala
130 135 140

Ile Thr Lys Leu Ala His Tyr His Val Cys Cys Thr Arg Ser Ala Glu
145 150 155 160

Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp His Asp Arg Ile Leu Leu Ala
165 170 175

Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ser Ala Lys Asn Lys Asp Tyr
180 185 190

Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly Asp Asp Val Lys Ser Lys Asp
195 200 205

Tyr Ile Val Ala Leu Gln His Pro Val Thr Thr Asp Ile Lys His Ser
210 215 220

Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ser Phe Asn Lys
225 230 235 240

Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met
245 250 255

Val Arg Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg
260 265 270

Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln Phe Ile Gln Leu Val Ala His
275 280 285

Ala Gly Cys Met Ile Gly Asn Ser Ser Cys Gly Val Arg Glu Val Gly
290 295 300

Ala Phe Gly Thr Pro Val Ile Asn Leu Gly Thr Arg Gln Ile Gly Arg
305 310 315 320

Glu Thr Gly Glu Asn Val Leu His Val Arg Asp Ala Asp Thr Gln Asp
325 330 335

Lys Ile Leu Gln Ala Leu His Leu Gln Phe Gly Lys Gln Tyr Pro Cys
340 345 350

Ser Lys Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Ala Val Pro Arg

355 360

<210> 7

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Lys Asn Gly Asn Asn Arg Lys Leu Arg Val Cys Val Ala Thr

1 5 10 15

Cys Asn Arg Ala Asp Tyr Ser Lys Leu Ala Pro Ile Met Phe Gly Ile

20 25 30

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

35 40 45

His Leu Ile Asp Asp Tyr Gly Asn Thr Tyr Arg Met Ile Glu Gln Asp

50 55 60

Asp Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile Val Arg Gly Glu Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Val Leu Asn Arg Leu Lys Pro Asp Ile Met Ile Val His Gly Asp

100 105 110

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

115 120 125

Arg Asn Pro Ile Leu His Ile Glu Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Ile

130 135 140

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

145 150 155 160

Cys Cys Thr Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met Cys Glu Asp

165 170 175

His Asp Arg Ile Leu Leu Ala Gly Cys Pro Ser Tyr Asp Lys Leu Leu

180 185 190

Ser Ala Lys Asn Lys Asp Tyr Met Ser Ile Ile Arg Met Trp Leu Gly

195 200 205
 Asp Asp Val Asn Pro Lys Ser Lys Asp Tyr Ile Val Ala Leu Gln His
 210 215 220
 Pro Val Thr Thr Asp Ile Lys His Ser Ile Lys Met Phe Glu Leu Thr
 225 230 235 240
 Leu Asp Ala Leu Ile Ser Phe Asn Lys Arg Thr Leu Val Leu Phe Pro
 245 250 255
 Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met Val Arg Val Met Arg Lys Lys
 260 265 270

 Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe
 275 280 285
 Asp Gln Phe Ile Gln
 290
 <210> 8
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Ile Glu Gln Asp Asp Phe Asp Ile Asn Thr Arg Leu His Thr Ile
 1 5 10 15
 Val Arg Gly Glu Asp Glu Ala Ala Met Val Glu Ser Val Gly Leu Ala
 20 25 30

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

 Tyr His Val Cys Cys Thr Arg Ser Ala Glu Gln His Leu Ile Ser Met

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

Glu His His Pro Asn Phe Arg Ala Val Lys His Val Pro Phe Asp Gln
 165 170 175
 Phe Ile Gln

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met Val

1 5 10 15

Trp Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg

20 25 30

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met Val

1 5 10 15

Leu Val Met Arg Lys Lys Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg

20 25 30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met Val

1 5 10 15

Arg Val Met Gln Lys Lys Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg

20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Leu Val Leu Phe Pro Asn Ile Asp Ala Gly Ser Lys Glu Met Val

1 5 10 15

Arg Val Met Trp Lys Lys Gly Ile Glu His His Pro Asn Phe Arg

20 25 30