



(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)
 (21) 출원번호 10-2013-7023105
 (22) 출원일자(국제) 2012년02월01일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년08월30일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/023536
 (87) 국제공개번호 WO 2012/106465
 국제공개일자 2012년08월09일
 (30) 우선권주장
 61/438,585 2011년02월01일 미국(US)

(71) 출원인
 에이치아이비엠 리서치 그룹, 인코포레이티드
 미국 캘리포니아 91311 체스트워스 #106 데번셔
 스트리트 21053
 (72) 발명자
 다비쉬, 대니얼
 미국 캘리포니아 91403 셔먼 오크스 #104 노블 애
 비뉴 4430
 볼즈-아유브, 앤디라
 미국 캘리포니아 91360 우드랜드 힐스 #104 빅토
 리 블러버드 22330
 (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) 요 약

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

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 6

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

청구항 7

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

청구항 8

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

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질감염 촉진 폴리웨პ타이드는 시알산을 생성할 수 있는 효소적으로 활성인 폴리웨პ타이드를 포함하는 것인 GNE 웨პ타이드의 발현방법.

청구항 10

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

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 피험체의 세포는 아래체 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, 방추 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**

[0001] 관련 출원

[0002] 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 전달함으로서 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 네프릴리신과 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) 웨타이드를 발현하는 방법으로서, GNE 웨타이드 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 웨타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖고, 상기 피험체의 세포에게 전달 시, 상기 핵산 발현 작제물은 상기 GNE 웨타이드 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 웨타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하고, 상기 GNE 웨타이드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 방법이 또한 개시되어 있다.

[0008] 추가로, 세포에서 GNE 웨타이드를 제조하는 방법으로서, GNE 웨타이드 또는 이의 치료학적 활성 단편을 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 단리된 핵산 작제물로 상기 세포를 감염시키는 단계를 포함하고, 상기 GNE 웨타이드는 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 상당이 많았다;

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

도 9는 UMVC3 및 NTC8685 벡터와 비교한 GNE 무 CHO 세포의 시알산 함량 세포 분획의 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-글라이콜릴뉴라미네이트, 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 있더라도(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 저시알릴화(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 비를 증가시키는 것이 인간 피험체에서 몇몇 공지된 이유로 바람직하다. 포유동물은 (1) N-아세틸뉴라민산(NANA 또는 Neu5Ac) 및 (2) N-글라이코릴뉴라민산(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 혼한 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 toxicogenic 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 비를 감소시키는 것이 바람직하다. 이를 성취하기 위한 가능한 효과적인 방법은 GNE 발현을 증가시키고, 인간 또는 동물 식품(예를 들면, 유가공품, 식육제품, 유제품 및 다른 동물성 제물) 중 어느 하나에서 사용되는 생물학적 시스템 또는 유기체에서의 CMAH 발현을 감소시키거나 제거하는 것이다. CMAH 넛아웃(knock-out) 또는 넛다운(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(문현(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 카페를 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

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 문자이다. 따라서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 적어도 15개의 염기쌍의 길이의 올리고머로부터 단백질에 대한 전장 코딩 구역을 포함하는 DNA 문자까지의 범위일 수 있다.

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.

몇몇 실시양태에서는, 상기 폴리뉴클레오타이드가 선형 DNA 문자인 반면, 다른 실시양태에서는, 상기 폴리뉴클레오타이드가 원형 DNA 문자이다.

몇몇 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 원하는 생물학적 시스템에서 GNE 유전자를 발현할 수 있는 원형 DNA(플라스미드, 미니플라스미드 또는 미니서클)이다. 본 출원에 기재된 NTC8685 백터는 크기 감소, 박테리아 세포 함량 감소 및 항생제 비함유 선별과 같은 몇몇 이점을 갖는다. 당업자에게 공지된 다른 백터를 또한 본원에 기재된 방법에 사용할 수 있다.

몇몇 실시양태에서, 선형이든 또는 원형이든 폴리뉴클레오타이드 치료학적 생성물을 다양한 양이온 또는 음이온 입자를 생성하는 다른 문자와 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 가능성 을 나타낸다(Li, Eastman et al. 1999). 이 C5-12 프로모터는 AAV 백터에서 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 문자, 화합물 또는 생물학적 모이어티(예를 들면, 단백질/탄수화물/지질 함유 문자, 부분 또는 전체 항체 문자, 부분 또는 전체 사이토카인 문자, 바이러스 캡시드)와 팩키징하여 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 모어어티로는 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 백터에 제시된 것과 같은 카나마이신 내성, 도 3), RNA에 기초한다(예를 들면, NTC8685 백터에 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 백터의 뉴클레오타이드 서열이 도 2 및 서열 번호 1에 도시되어 있고, UMVC3-GNE 백터의 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 코팅된 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 백터와 달리(Yuasa, Yoshimura et al. 2007; Mingozzi, Meulenberg et al. 2009), pDNA는 백터에 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 백터 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).

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; Vlassak 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 수세기 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-phlebitic syndrome) 또는 시술후 혈관병증에 주목하지 않았다(Haurigot, Mingozzi 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 사지에서의 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 사지로의 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 베블 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 미소혈관세 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 뒤시엔느 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% 초과의 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, Knobeloch 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).

안전성/독성학

[0055] 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).

[0056] GNE 플라스미드의 안전성: GNE-플라스미드를 사용하는 설치류 독성학 연구가 현재 진행중이다. 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 근교제, 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 혼탁된 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.

[0057] 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) 접적은 100 μ g(0.1mg) 용량에서 33%의 동물에서 치사이고, 40 μ g 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 20 μ g(인간 등가 용량(HED) = 5.2mg) 또는 (2) 80 μ g(HED = 20.8mg)의 축적 용량이다. 진행중인 용량 증가 시험에서, 환자는 1 내지 3달 간격의 여러 접적(0.4, 0.4, 1.0mg)을 받았고, 각각의 접적의 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 플라스미드가 근육 세포벽의 통합성 감소로 인해 정상 근육보다 더 효과적으로 근질환 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 별룬 폐쇄) 없이 횡격막, 심장 및 체간/목 근육을 용이하게 형질감염시킬 수 없다는 것이다. 이러한 단점이 많은 근이영양증에서는 의미있지만, 거의 IBM2로 이환된 환자에서만큼 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, 아쥬반트 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 혼탁액을 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제제화할 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 비독성인 비경구로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 무균 주사용 용액, 혼탁액 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 혼탁 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 래보라토리즈, 인크.(Baxter Laboratories, Inc.), 일리노이주 모던 그로브). 플라즈마-라이트(등록상표)는 정맥내 투여에 사용될 수 있는 무균 비밸밸성 등장성 용액이다. 각각의 100ml 용적은 526mg 염화나트륨, USP(NaCl); 502mg 글루콘산나트륨(C6H11NaO7); 368mg 아세트산나트륨 삼수화물, USP(C2H3NaO2⁺H2O); 37mg 염화칼륨, USP(KC1); 및 30mg 염화마그네슘, USP(MgCl2²⁺H2O)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 혼탁액을 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 혼탁시킴으로써 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 대 중합체의 비 및 사용되는 특정한 중합체의 성질에 따라, GNE 코딩 서열 방출 속도를 제어할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예로는 폴리(오쏘에스터) 및 폴리(언하이드라이드)를 들 수 있다. 상기 기재된 바대로, 근조직과 같은 표적 신체 조직에 적합한 리포솜(또는 심지어 마이크로에멀션) 중에 GNE 코딩 서열을 포획함으로써 데포 주사용 제제를 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 실데포양태에서, 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 의약 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, 감소 시킬 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 데코레이트될 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. 데스티네이션 벡터(destination vector)인 pUMVC3을 알데브론(Aldevron)(노스다코타주 파고)으로부터 구입하였다. 모 벡터로부터 데스티네이션 벡터로 R266Q 돌연변이체가 왕복하도록 서브클로닝 벡터인 pDrive(퀴아젠(Qiagen), 캘리포니아주 밸렌시아)1을 사용하였다.

[0079] 환자 전혈로부터 단리된 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 결찰(인비트로겐)에 의해 pUMVC3 발현 벡터(알데브론)로 서브클로닝하였다. 이후, 반응능 이. 콜라이 세포(인비트로겐)를 pUMVC3 발현 벡터에 의해 형질전환하였다.

[0080] 양성 pUMVC3-GNE 클론을 175 mis LB 브로스 + 50 μ g/ml Kan 중에 밤새 성장시키고, 150 mis 배양물을 제조업자 프로토콜에 따라 퀴아젠(캘리포니아주 밸렌시아) 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.(Avant i Polar Lipids, Inc.)(알라바마주 알라바스터)가 공급하는 상업적으로 구입 가능한 지질 입자이다. 1 μ l의 최종 용적 중에 0.5 μ g DNA:4mM DOTAP1의 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% 옥 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(인비트로겐, 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 4 μ g DNA + 10 μ l 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(인비트로겐)을 혼합함으로써 DNA:지질 복합체를 형성하였다. 형질감염 24시간 후, 세포를 트립신 분해에 의해 수확하고 PBS로 1회 세척한 후, 후속하여 웨스턴 블로트 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 100 μ l 2M 아세트산 중에 재현탁하고 800°C에서 1시간 동안 항온처리하여 당결합체 결합 시알산을 방출시켰다. 137 μ l 과요오드산 용액(57mM H₂SO₄ 중의 2.5mg/ml)을 첨가하고 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 다음에, 50 μ l 아비산나트륨 용액(0.5M HCl 중의 25mg/ml)을 첨가하고 관을 격렬하게 흔들어 황갈색의 완전 제거를 보장하였다. 이 단계 후, 100 μ l 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: 패멜라 스탠리 박사(Dr. Pamela Stanley)(알버트 아인슈타인 의과대학)로부터 얻은 Lec3 CHO 세포(Hong 2003)를 초기에 10% 소 태아 혈청(FBS)(인비트로겐)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)(인비트로겐), 500μl Opti-MEM(인비트로겐), 10μl 리포펙타민(인비트로겐) 및 4μg DNA(벡터 무 세트에 제외)를 사용하여 4 세트의 형질감염을 3회 준비하고 5% CO₂ 중에 37°C에서 향온처리하였다. 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 UV-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 정체 절차를 이용하여 확장하고 다시 서열분석하여 돌연변이가 발생하지 않았다는 것을 확인하였다. 이 DNA 스트립을 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 회석을 이용하여 형질감염된 Lec3 세포에서 발현된 GNE-wt의 농도가 4.1pg/μl라는 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 600μg이었다. 제한은 플라스미드의 수용성(6μg/μl) 및 주사당 전체 용적(100μl)에 기초하였다. 30g의 마우스 체중 및 70kg의 인간 체중을 고려하면, 600μg의 마우스 용량에 대한 인간 등가 용

량(HED)은 113.82mg이었다.

표 1

| 첨적 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 | 28.8 | 무 | 28.96 | 0 |
| | | 1F | 29.99 | 무 | 무 | 26.6 | 무 | 26.74 | 0 |
| | 격일 | 1M | 32.69 | 무 | 무 | 32.9 | 무 | 31.95 | 0 |
| | | 1F | 21.88 | 무 | 무 | 20.6 | 무 | 20.23 | 0 |
| | 주 1회 (1일 및 7일) | 1M | 27.76 | 무 | 무 | 27.5 | 무 | 26.91 | 0 |
| | | 1F | 22.24 | 무 | 무 | 22.5 | 무 | 23.55 | 0 |
| | 실험군 (10 μ g 600 μ g 일반 식염수 (미 포함)) | 매일 | 1M | 27.59 | 무 | 무 | 26.8 | 무 | 27.68 8.4 mg |
| | | | 1F | 27.28 | 무 | 무 | 24.7 | 무 | 21.78 8.4 mg |
| | | 격일 | 1M | 31.54 | 무 | 무 | 29.6 | 무 | 29.39 4.2 mg |
| | | | 1F | 23.35 | 무 | 무 | 21.9 | 무 | 23.71 4.2 mg |
| | | 주 1회 (1일 및 7일) | 1M | 30.37 | 무 | 무 | 28 | 무 | 29.8 1.2 mg |
| | | | 1F | 24.55 | 무 | 무 | 23 | 무 | 23.38 1.2 mg |

[0095]

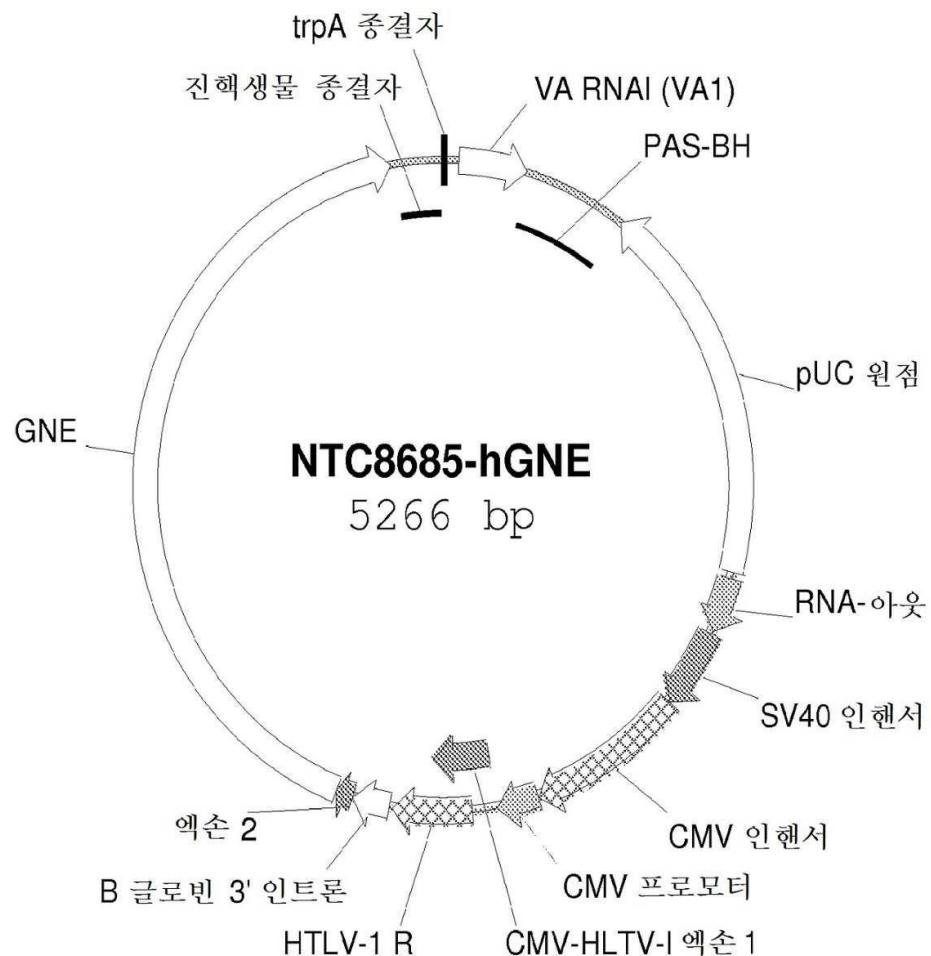
[0096] 실험군은 꼬리 정맥으로 IV를 통해 투여되는 고용량 GNE 플라스미드(0.1ml 일반 식염수 중에 혼탁된 0.6mg)를 받았고, 대조군은 0.1ml 일반 식염수를 받았다. 군을 하기 대로 각각 2마리의 마우스(1마리의 암컷, 1마리의 수컷)의 3개의 용량 빈도 군으로 추가로 나눴다: 1) 14일 동안의 매일 투여, 2) 격일 투여 및 3) 매주 투여. 모든 동물은 실험에 생존하였다. 체중, 온도, 식품 및 물 섭취, (1일 및 15일에 수행된) CBC 혈액 시험을 포함하는 모든 측정된 매개변수와 관련하여 실험군과 대조군 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

```

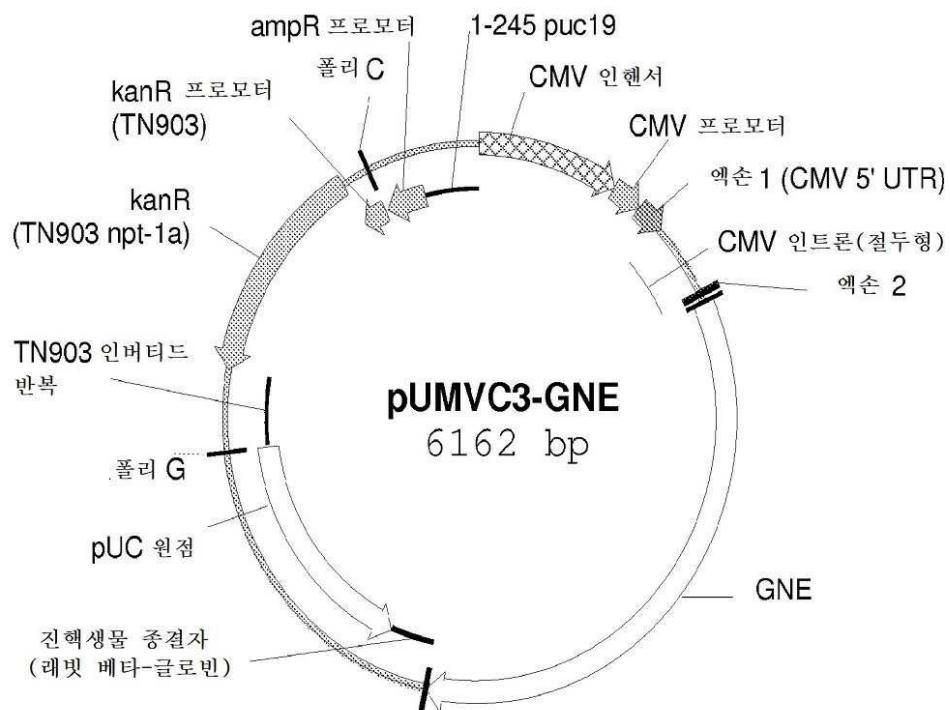
1 ccgcctaatg agcgggcctt ttttcttag ggtgaaaag gagagcctgt
51 aaggccac tcttcgtgg tctggat aaattcgaa gggatcatg
101 gcccacacc gggatcgag cccgtatcc ggcgtccgc cgtgatccat
151 gccgttaccg cccgcgtgc gaaccagggt gtgcacgtc agacaacggg
201 ggagtgcctc tttggctc ctccccctac cggtctgcct cgccgttcc
251 ggtatgcacg gtaaaaact ctgacacatg cagctcccg agacggtcac
301 agcttgctg taagcggatg cgggagcag acaagccgt cagggcgcgt
351 cagcgggtgt tgccgggtc cggggcgeag ccatgaccca gtcacgtage
401 gatacgaggat tgatatactgg ctaactatg cggcatcaga gcagattgt
451 ctgagagtgc accatatgcg gtgtaaata cggcacagat gcgtaaaggag
501 aaaataccgc atcaggcgt ctccgcctt ctcgctact gactcgctgc
551 gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta
601 atacggttat ccacagaatc agggataac gcaggaaaga acatgtgagc
651 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgtggcgt
701 tttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca
751 agtcagagggt ggcggaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgttcc
801 ccctggaaagc tccctcgatc getctctgt tccgacccctg ccgttaccg
851 gatacctgtc cgccttc cttccggaa gctgtggcgt ttctcatagc
901 tcacgcgtta ggtatctcg ttcgggttag gtcgttgcgt ccaagctggg
951 ctgtgtgcac gaacccccc ttcagcccg cccgtcgcc ttatccgta
1001 actatcgatc ttagtccaa cccgttaagac acgacttatac gccactggca
1051 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgttag gctggctac
1101 agagttcttg aagtggggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat
1151 ttggtatctg cgctctgtc aagccagtt cttcggaaa aagagtgg
1201 agctctgtat cccgcaaaaca aaccaccgcg ggtagcggtg gttttttgt
1251 ttgcaagcag cagattacgc cccggaaaaa aggatctcaa gaagatcctt
1301 tgatctttc tacgggtct gacgctcgt ggaacggaaa ctacgttaa
1351 gggattttgg tcatgagattt atcaaaaagg attcacccctt agatectttt
1401 aaattaaaaa tgaagttta aatcaatcta aagtatatat gatggaaactt
1451 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcgtt aggcacctat ctcagcgatc
1501 tgtctatcc tttcatccat agttgcctgt ctcctgcggg ccacgttgc
1551 gtagaattgg taaagaggt cgtgtaaaat atcgagttcg cacatctgt
1601 tgtctgatta ttgattttg gcgaaaccat ttgatcatat gacaagatgt
1651 gtatctacat taacttaatg atttgtataa aaatcattag gtacccctga
1701 tcactgttga atgtgttca gttagggtgt ggaaagttcc caggtcccc
1751 agcaggcaga agtacgaaa gcatgcacatc caattagtca gcaaccagg
1801 gtggaaagtc cccaggctcc ccaggcggca gaagtatgca aagcatgc
1851 ctcaattatgt cagcaaccat agtccccccc ctaactccgc ccatccccc
1901 ccttaactccg cccagttacg gggtcattatg ttcatagccc atatggag
1951 ttccgcgtta cataacttac ggttaatggc ccgcctggc gacccccc
2001 cgacccccc ccattgacgt caataatgac gtatgtccc atagtaacgc
2051 caataggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acgtaaact
2101 gcccacttgg cagtagatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat
2151 tgacgtcaat gacggtaat gccccccctg gcattatgcc cagtagatga
2201 ccttatgggaa ctttcctact tggcagttaca tctacgtatt agtcatcgct
2251 attaccatgg tgatgcgtt ttggcagttac atcaatggc gtggatagcg
2301 gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccatggac gtcataatggg
2351 gtttggatggc gacccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtacaaac
2401 tccgccttgcataat gggcggttagg cgtgtacggt gggaggtcta
2451 tataaggcaga gctcgatgg tgaaccgtca gatcgctgg agacggccatc
2501 cacgtgttt tgacccatc agaagacacc gggaccgatc cagccctccgc
2551 ggctcgatc tctccatc ggcggccgc ccctactga ggccgcacatc
2601 cacggcggtt gactcgatc ctggccctc ccgcctgtgg tgctcctga

```

도면2b

2651 actgcgtccg ccgtcttagt aagtttaaag ctcaggcga gaccggcct
 2701 ttgtccggcg ctcccggaa gcctacctag actcagccgg ctctccacgc
 2751 tttgcctgac cctgcttgct caactcttagt tctctcgta acttaatgag
 2801 acagatagaat actggcttgc tagaaacaga gtagtcgcct gctttctgc
 2851 caggtgtca cttctctccc ctgggcttt ttctttct caggttggaaa
 2901 agaagaagac gaagaagacg aagaagacaa accgtcgctg acatggagaa
 2951 gaatggaaat aaccgaaagc tgccgggtttg tggctact tggtaaccgtg
 3001 cagatttttccaaacttgc ccgtatcatgt ttggcattaa aaccgaacct
 3051 gagtttttccaaacttgc aactgtatgt tgggttactt ggctctcacc tgatagatga
 3101 ctatggaaat acatcgaa tgattgaaca agatgactt gacattaaca
 3151 ccaggttaca cacaattgtg aggggagaag atggggcagc catggggag
 3201 tcagtaggccc tggcccttagt gaagctgcca gatgtccta atgcctgaa
 3251 gcctgatatac atgattgttc atggagacag gtttgatgcc ctggctctgg
 3301 ccacatctgc tgccttgatg aacatccgaa tccttcacat tgaagggtgg
 3351 gaagtcaatggggcatttgc tgactctatc agacatgcca taacaaaact
 3401 ggctcattat catgtgtgct gcacccgcag tgcagagcag cactgtat
 3451 ccatgtgtga ggaccatgtatgc cgcattttt tggcaggctg cccttcctat
 3501 gacaaacttgc tctcagccaa gacaaaagac tacatgagca tcatttgc
 3551 gtggcttagt gatgtatgtt aatctaaaga ttacattttt gcaactacage
 3601 accctgtgac cactgacatttca aacgttccaa taaaatgtt tgaatttaca
 3651 ttggatgacat ttatctcatt taacaagcgg accctagttc tggggatcc
 3701 tattgacgca gggagcaaaag agatgggtcg agtgatgcgg aagaaggc
 3751 ttgagcatca tccccactt cgtgcagttt aacacgtccc atttgaccag
 3801 ttatatactgt tgggtggccaa tgggttgcgtt atgattggga acagcagctg
 3851 tggggttcga gaagggtggag ctttggaaac acctgtgatc aacctgggaa
 3901 cacgtcagat tggaaagagaa acagggggaga atgttcttca tggccggat
 3951 gctgacacccaa aagacaaaat atgcacggaa ctgcacccctc agtttggtaa
 4001 acatgttgc ttttccaaaga tatatggggaa tggaaatgtt gttccaaagg
 4051 ttttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aagagccact gcaaaaagaaa
 4101 ttctgttccatc tccctgtgaa ggagaatatac tctcaagata ttgaccat
 4151 tcttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aagagccact gcaaaaagaaa
 4201 gagttgcataatc aactgtatccaa aggggtggaaa tagtttgcgtt
 4251 ttcaatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca aagagccact
 4301 ttttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aagagccact gcaaaaagaaa
 4351 taggcatttc cacaggtggc cgtgttgc ttttccaaatct atcgatcttca
 4401 cattcaacca aactgtatccaa aggggtggaaa tagtttgcgtt
 4451 ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca
 4501 ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca
 4551 ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca
 4601 gcatgaatttgc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 4651 ttgttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 4701 attgaagcat acgcctctgg aatggcccttgc ttttccaaatct atcgatcttca
 4751 ccatgtatgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 4801 aggctgtggc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 4851 aaggcccaaaatc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 4901 ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca
 4951 ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct atcgatcttca
 5001 gccttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 5051 ccccgccctg ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 5101 ggttgcgttgc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 5151 atgaaggcccaaaatc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 5201 cattgcataatc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct
 5251 aaggcccaaaatc ttttccaaatct atcgatcttca aacatcgat ttttccaaatct

도면3



도면4a

도면4b

2651 caatgtatggc aactgtgtgc ccctggcgga aaggaaattt ggccaaggaa
2701 agggactgga aaacattgtt acacttatca caggecacagg aatcggttgt
2751 ggaattatcc atcagcatga attgatccac ggaagctct tctgtgtcgtc
2801 agaactgggc caccitgtt tgctctgga tgggcctgat tttccctgtg
2851 gaagccatgg gtgcattgaa gcatacgct ctggaatggc ttgcagagg
2901 gaggcaaaaa agctccatga tgaggacctg ctcttgggtt aaggatgtc
2951 agtgccaaaa gatggggct tgggtgcgtt ccatctatc caactgcgc
3001 aacctggcc tgcgaaggcc cagagatcc taagaacacgc tggaaacagct
3051 ttgggttggt ggggtgttggaa catctccat accatgaaatc ctccttgg
3101 gatcccttcc gtagtccctgg ccagtacta tatccacatt gtcaaagacg
3151 tcattcgcca gcaggcttgc ttccctgtc aggacgtgga tttgtgttgg
3201 tcggatttgg ttgaccggc cctgctgggt gctgccagca tggttctgg
3251 ctacacaaca cgcaggatct actaggatcc agatctttt ccctctggca
3301 aaaattatgg ggacatcatg aagccccctg agcatctgac ttctggctaa
3351 taaaggaat ttatttcat tgcaatagtg ttttggatt ttttgggtct
3401 ctaactcgga aggacatatg ggaggcggaaa tcatttaaaa catcagaatg
3451 agtattttgtt ttaggtttt gcaacatatg cccattctt cgcttccctcg
3501 ctaactact cgctgcgtt ggttgcgtt cttggggcgag cggatcage
3551 tcactcaaag gggtaatacc ggttacceac agaatcaggg gataacgc
3601 gaaagaacat gtgagaaaaa ggccagcaaa agggccagaa cctgaaaagg
3651 gcccgttgc tggcggtttt ccataggctc cggccccctg acgagcatca
3701 caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggc aaacccgaca ggactataaa
3751 gataccagge gtttcccccct ggaagetccc tctgtgcgtc tctgttccg
3801 accctgcgc ttacggata cctgtccgc ttctccctt cggaaagcgt
3851 ggcgtttct catagctcac gctgttaggt tctcagttcg tttgtgtcgt
3901 ttgcgtccaa gctgggtctg gtgcacgaac ccccggttca gcccaccgc
3951 tgcgccttat cccgttaacta tctgttgcg tccaaacccgg taagacacga
4001 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggatttgc agagcggagg
4051 attagggggg tgcgtacagat ttcttgcgtt ggtggctaa ctacggctac
4101 actagaagaa cgtattttgg tatctgcgtt ctgcgtaaac cgttacattt
4151 cggaaaaaaa gttggtagt cttgtatccgg caaacaaacc accgttgtt
4201 gcggtggttt ttttggttgc aaggcagcaga ttacccgcag aaaaaaaagg
4251 tctcaagaag atcccttgat cttttctacg gggtgcgtc ctcagtgaa
4301 cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct
4351 tcaccttagat cttttaaaat taaaatgaa gttttaaatc aatctaagt
4401 atatatgat aaacitggtc tgacagttaa caatgttca tcaatggggc
4451 acctatctca gggatctgtc tatttgcgtc atccatagtt gctgtactcg
4501 ggggggggggg ggcgttaggtt ctgcgtgtg aagaagggtg tgcgtactca
4551 taccaggccca gaatcgcccc atcatccgc cagaaggatgtt gggaccac
4601 gttgtatgaga gttttgttgc aggtggacca gttgtgttgcattt
4651 gcttgcac ggaacggctt gctgtgtcc gaaagatgtt gatgtatcc
4701 ttcaactcgtc caaaagttcg atttatttcaaa caaaggccgc gtcggctca
4751 gtcagcgtaa tgctctggca gtgttacaac caattaacca attctgatta
4801 gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattt atatcaggat
4851 tataaatacc atattttgc aaaaaggctt tctgtatgtt aggagaaaaac
4901 tcaccgagggc agttccatag gatggcaaga tcctggatc ggtctgcgt
4951 tccgactcgtt ccaacatcaa tacaacccat taatttcccc tgcgtaaaa
5001 taaggttac aagttagaaaaa tcaccatgtt tgacgactgtt atccgggt
5051 aatggcaaaa gttatgtcat ttcttcccg acttgttcaaa cggccggcc
5101 attacgcgtt tcataaaat cactgcata aaccaaaacc ttatttcc
5151 gtgattgcgc ctgagcggaga cggaaatccgc gatgcgtt aaaaaggac
5201 ttacaaacacg gaatcgaaatg caacccggcgc agggaaactgtt
5251 aacaatattt tcacctgtat caggatattt ttctaatacc tggaaatgtt

도면4c

5301 ttttccggg gatecgagtgtgagtaacc atgcatacaggatcacgg
 5351 ataaaatgtctatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag
 5401 tctgaccatc tcatactgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt
 5451 tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc
 5501 gcacctgatt gcccgcatt atcgcgcagec catttataacc catataaatac
 5551 agcatccatgttgaattta atcgcggcct cgagaagac gttccccgtt
 5601 gaatatggct cataacaccc ctgttattac tggttatgtt agcagacagt
 5651 tttattgttc atgatgatat atttttatct tggcaatgtt aacatcagag
 5701 attttgagac acaacgttgc tttccccccc cccccattat tgaagcattt
 5751 atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatgtttagaaaa
 5801 aataaacaacaa taggggttcc ggcacattt ccccaaaaag tgccacctga
 5851 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgtt
 5901 tcacagggttgc ctgcgttgc ggcgttgc tgatgacgg taaaaacctc
 5951 tgacacatgc agtcccgga gacggtcaca gttgtctgt aageggatgc
 6001 cgggagcaga caagccgtc aggccgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc
 6051 ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac
 6101 catatgcgggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat
 6151 cagattggct at

도면5

1 MEKNGNNRKL RVCVATCNRA DYSKLAPIMF GIKTEPEFFE LDVVVLGSHL IDDGNTYRM
 61 IEQDDFDINT RLHTIVRGED EAAMVESVGL ALVKLPDVNL RLKPDIMIVH GDRFDALALA
 121 TSAALMNIRI LHIEGGEVSG TIDDSIRHAI TKLAHYHVCC TRSAEQHLIS MCEDHDRILL
 181 AGCPSYDKLL SAKNKDYMSI IRMWLGDDVK SKDYIVALQH PVTTDIKHSI KMFELTLDAL
 241 ISFNKRTLVL FPNIADGSKE MVRVMRKKGII EHHPNFRAVK HVPPFDQFIQL VAHAGCMIGN
 301 SSCGVREVGA FGTPVINLGT RQIGRETGEN VLHVRDADTQ DKILQALHLQ FGKQYPCSKI
 361 YGDGNAPVRI LKFLKSIDLQ EPLQKKFCFP PVKENISQDI DHILETLSAL AVDLGGTNLR
 421 VAIVSMKGEI VKKYIQFNPK TYEERINLIL QMCVEAAAEE VKLNCRILGV GISTGGRVNP
 481 REGIVLHSTK LIQEWNVDL RTPLSDTLHL PVWVDNDGNC AALAERKFGQ GKGLENFVTL
 541 ITGTGIGGGI IHQHELIHGS SFCAAELGHL VVSLDGPDCS CGSHGCIEAY ASGMALQREA
 601 KKLHDEDLLL VEGMSVPKDE AVGALHLIQA AKLGNAKAQS ILRTAGTAG LGVVNILHTM
 661 NPSLVILSGV LASHYIHIVK DVIRQQALSS VQDVVVVSD LVDPALLGAA SMVLDYTRR
 721 IY*

도면6a

```

NP_001121699b 1
METYGYLQRESCFQGPHELYFKNLSKRNKQIMEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 80
NP_005467 1 -----
MEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 49
NP_001177317 1 -----MPIGDCSVAAKP-----RKQLLC-----
SLFTTLYGRARASGWKPMVICRGSH 44
NP_001177312 1 -----
MEKNGNNRKLRCVATCNRADYSKLAPIMFGIKTEPEFFELDVVVLGSH 49
NP_001177313 -----
---


NP_001121699 81
LIDDYGNTYRMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVNLRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 160
NP_005467 50
LIDDYGNTYRMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVNLRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 129
NP_001177317 45
AFKDLINTYRMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVNLRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 124
NP_001177312 50
LIDDYGNTYRMIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVNLRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 129
NP_001177313 1 -----
MIEQDDFDINTRLHTIVRGEDEAAMVESVGLALVKLPDVNLRLKPDIMIVHGDRFDALALATSAAALMNIR 70


NP_001121699 161
ILHIEGGEVSGTIIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCDHDRILLAGCPsyDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 240
NP_005467 130
ILHIEGGEVSGTIIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCDHDRILLAGCPsyDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 209
NP_001177317 125
ILHIEGGEVSGTIIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCDHDRILLAGCPsyDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 204
NP_001177312 130
ILHIEGGEVSGTIIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCDHDRILLAGCPsyDKLLSAKNKDYMSIIRMWLGDDV 209
NP_001177313 71
ILHIEGGEVSGTIIDDSIRHAITKLAHYHVCCTRSAEQHLISMCDHDRILLAGCPsyDKLLSAKNKDYMSIIRMWLG--- 147


NP_001121699 241
KSVDYIVALQHPVTTDIKHSIKMFELTLDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRANKHVPFDQFIQ 320
NP_005467 210
KSVDYIVALQHPVTTDIKHSIKMFELTLDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRANKHVPFDQFIQ 289
NP_001177317 205
KSVDYIVALQHPVTTDIKHSIKMFELTLDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRANKHVPFDQFIQ 284
NP_001177312 210
KSVDYIVALQHPVTTDIKHSIKMFELTLDALISFNKRTLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFRANKHVPFDQFIQ 289
NP_001177313 148 -----
SKEMVRVMRKKGIEHHPNFRANKHVPFDQFIQ 179

```

[** GNE 알로스테릭 도메인 **]
TLVLFPNIDAGSKEMVRVMRKKGIEHHPNFR

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

```

NP_001121699 321
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTRQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 400
NP_005467b 290
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTRQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 369
NP_001177317 285
LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTRQIGRETGENVLHVRDADTQDXILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 364

```

도면6b

NP_001177312 290
 LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTRQIGRETGENVLHVRDADTQDKILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 369
 NP_001177313 180
 LVAHAGCMIGNSSCGVREVGAFGTPVINLGTRQIGRETGENVLHVRDADTQDKILQALHLQFGKQYPCSKIYGDGNAVPR 259

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

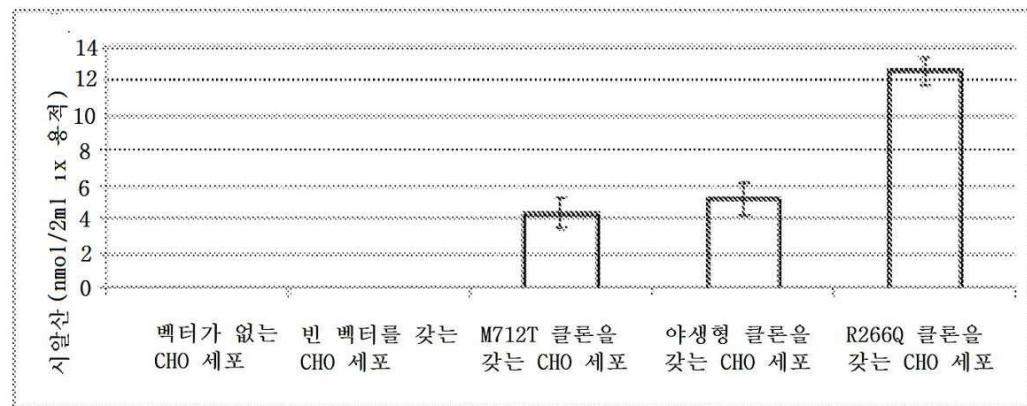
NP_001121699 481
 LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNVDLRTPLSDTLHLPVVVDNDGNCAALAERKFG 560
 NP_005467b 450
 LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNVDLRTPLSDTLHLPVVVDNDGNCAALAERKFG 529
 NP_001177317 445
 LQMCVEAAAEAVKLNCRILGVGISTGGRVNPREGIVLHSTKLIQEWNVDLRTPLSDTLHLPVVVDNDGNCAALAERKFG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

NP_001121699 561
 QGKGLENFTLITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAAELGHLVVSLDGPDCSCGSHGCIEAYASGMALQREAKKLHDEDLL 640
 NP_005467b 530
 QGKGLENFTLITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAAELGHLVVSLDGPDCSCGSHGCIEAYASGMALQREAKKLHDEDLL 609
 NP_001177317 525
 QGKGLENFTLITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAAELGHLVVSLDGPDCSCGSHGCIEAYASGMALQREAKKLHDEDLL 604
 NP_001177312 471 -----
 GIGGGIIHQHELIHGSSFCAAELGHLVVSLDGPDCSCGSHGCIEAYASGMALQREAKKLHDEDLL 535
 NP_001177313 420
 QGKGLENFTLITGTGIGGGIIHQHELIHGSSFCAAELGHLVVSLDGPDCSCGSHGCIEAYASGMALQREAKKLHDEDLL 499

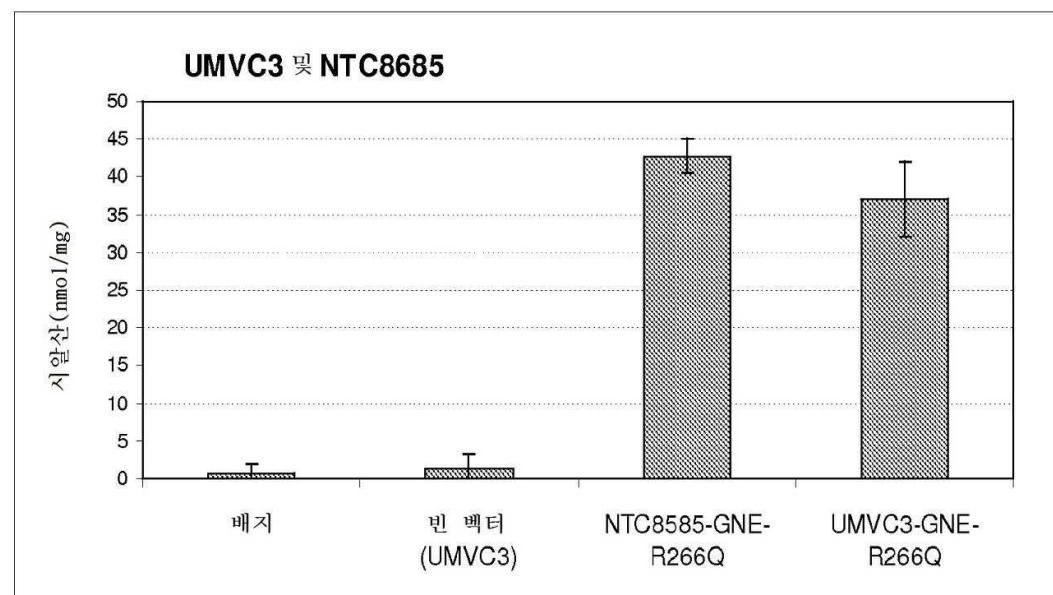
NP_001121699 641
 LVEGMSVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKAQSIIRTAGTAGLGLGVVNILHTMNPSLVLSGVLASHYIKIVKDVIQQALS 720
 NP_005467b 610
 LVEGMSVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKAQSIIRTAGTAGLGLGVVNILHTMNPSLVLSGVLASHYIKIVKDVIQQALS 689
 NP_001177317 605
 LVEGMSVPKDEAVGALHLIQAAKLGNAKAQSIIRTAGTAGLGLGVVNILHTMNPSLVLSGVLASHYIKIVKDVIQQALS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

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

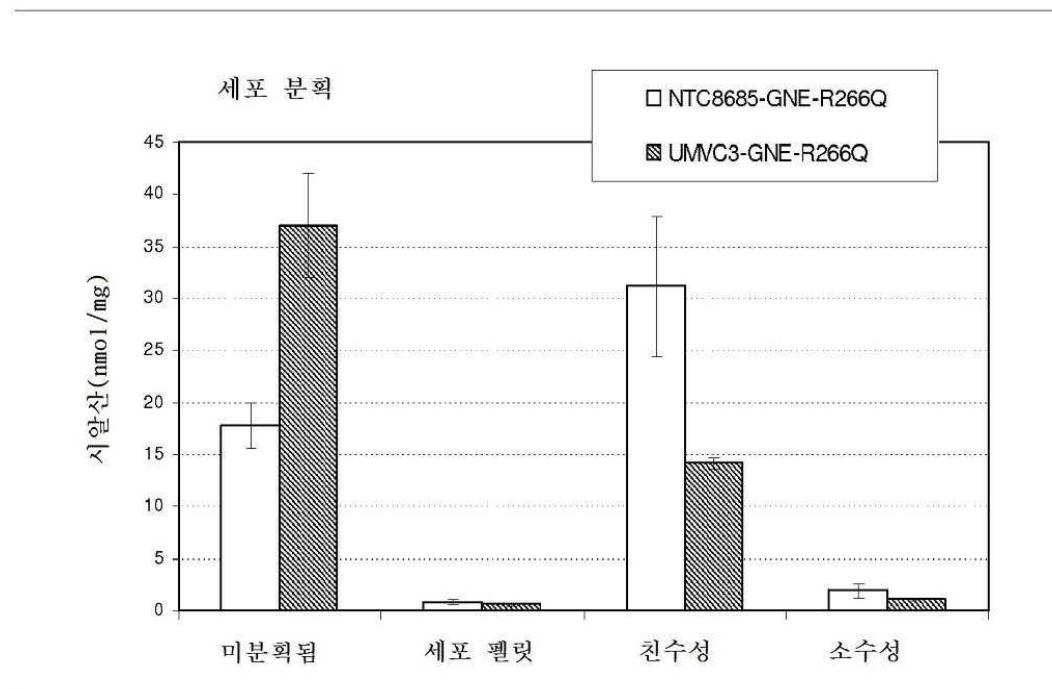
도면7



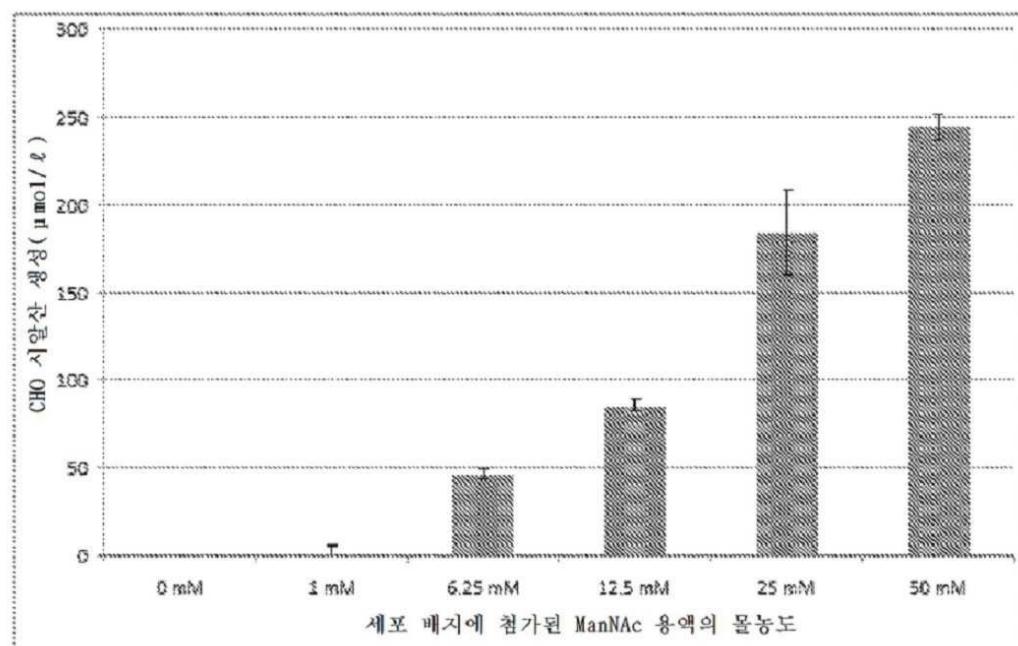
도면8



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

| | |
|--|------|
| ccgcctaatg agcggcttt ttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcggcac | 60 |
| tcttcgtgg tctggtgat aaattcgcaa gggtatcatg gcggacgacc ggggttcgag | 120 |
| ccccgtatcc ggccgtccgc cgtgatccat gcggtaaccg cccgcgtgtc gaaccagg | 180 |
| gtgcgacgtc agacaacggg ggagtgcctc tttggcttc ctcccctac cggtctgcct | 240 |
| cgcgcgttcc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctccgg agacggcac | 300 |
| agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagccgt cagggcgcgt cagcgggtgt | 360 |
| tggcgggtgt cggggcgcag ccatgaccca gtcacgtac gatagcggag tgtatactgg | 420 |
| cttaactatg cggcatcaga gcagattgt a ctgagagtgc accatatgac gtgtgaaata | 480 |
| ccgcacagat gcgttaaggag aaaataccgc atcaggcgct ctccgttcc ctgcgtcact | 540 |
| gactcgctgc gctcggtcg tccgtgcgg cgagcggtat cagtcactc aaaggcgta | 600 |
| atacggttat ccacagaatc aggggataac gcagggaaaga acatgtgagc aaaaggccag | 660 |
| caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgc | 720 |
| cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta | 780 |
| taaagatacc aggcgttcc ccctggaagc tccctcggtc gctctcctgt tccgaccctg | 840 |
| ccgcttaccg gatacgtgc cgccttctc cttcgaa ggcgtggcgt ttctcatagc | 900 |
| tcacgctgtt ggtatctcag ttgggtgtt gtcgttcgtt ccaagctggg ctgtgtgcac | 960 |
| gaaccccccgttccggcga ccgtcgcc ttatccgtt actatcgat tgagtccaa | 1020 |
| ccggtaagac acgacttatac gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg | 1080 |
| aggtatgtt gcggtgttcc agagttctt g aagtgggttgc ctaactacgg ctacactaga | 1140 |
| agaacagttatgttccggcga ccgtcgcc ttatccgtt actatcgat tgagtccaa | 1200 |

| | |
|--|------|
| agcttggat ccggcaaaca aaccaccgt ggttagcggtg gttttttgt ttgcaaggag | 1260 |
| cagattacgc gcagaaaaaa agatatcaa gaagatcctt tcatctttc tacgggtct | 1320 |
| | |
| gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg | 1380 |
| atcttcacct agatccttt aaattaaaaa tgaagttta aatcaatcta aagtatata | 1440 |
| gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcgtg aggcacctat ctcagcgatc | 1500 |
| tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccgtcaaa ccacgttgtg gtagaattgg | 1560 |
| taaagagagt cgtgtaaaat atcgagttcg cacatctgt tgtctgatta ttgattttg | 1620 |
| gcgaaaccat ttgatcatat gacaagatgt gtatctacct taacttaatg atttgataa | 1680 |
| aaatcattag gtacccctga tcactgtgga atgtgtca gtttaggtgt ggaaagtccc | 1740 |
| | |
| caggctcccc agcaggcaga agtatgc当地 gcatgc当地 caattagtca gcaaccagg | 1800 |
| gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt | 1860 |
| cagcaaccat agtccc当地 ctaactccgc cc当地ccccc cctaactccg cccagttac | 1920 |
| gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgttataacttac ggtaaatggc | 1980 |
| ccgc当地ggct gaccgccc当地 cgacccccc当地 ccattgacgt caataatgac gtatgtccc | 2040 |
| atagtaacgc caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact | 2100 |
| gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cggccctat tgacgtcaat | 2160 |
| | |
| gacggtaaat gccccccctg gcattatgcc cagtacatga cttatggga ctttctact | 2220 |
| tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgat attaccatgg tcatgc当地 ttggcagtgac | 2280 |
| atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cgggatttc caagtctcca cccattgac | 2340 |
| gtcaatggga gtttggggatccat caacgggact ttccaaaatg tcgtaaacaac | 2400 |
| tccgccccat tgacgcaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggctta tataaggaga | 2460 |
| gctcgtagt tgaaccgtca gatgc当地gg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat | 2520 |
| agaagacacc gggaccgatc cagccccc当地 ggctcgatc tctccttac cggccccc当地 | 2580 |
| | |
| ccctacgtga gccc当地ccatc cagccgggtt gagtc当地gg ctggccctc cggc当地gtgg | 2640 |
| tgc当地ctgtga actgc当地cccg cctgttaggt aagttaaag ctcaggctga gaccggccct | 2700 |
| ttgtccggcg ctcccttgga gc当地tacctag actcagccgg ctctccacgc tttgc当地tac | 2760 |
| cctgcttgct caactctagt tctctgtta acttaatgag acagatagaa actggcttg | 2820 |
| tagaaacaga gtatgc当地ct gctttctgc cagggtctga ct当地tcccttcc ctgggctttt | 2880 |
| ttcttttct cagggtgaaa agaagaagac gaagaagacg aagaagacaa accgtcgatc | 2940 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------|
| acatggagaa | aatggaaat | aaccgaaagc | tgccgggttgc | tgttgctact | tgttaaccgtg | 3000 |
| cagattattc | taaacttgcc | ccgatcatgt | ttggcattaa | aaccgaacct | gagttcttgc | 3060 |
| aacttgcgt | tgtggactt | ggctctcacc | tgatagatga | ctatggaaat | acatatcgaa | 3120 |
| tgattgaaca | agatgacttt | gacattaaca | ccaggctaca | cacaattgtg | agggggagaag | 3180 |
| atgaggcagc | catggtgag | tca tagtggcc | tggccctagt | gaagctgcc | gatgtcctta | 3240 |
| atcgccctgaa | gcctgatatac | atgattgttc | atggagacag | gtttatgtcc | ctggctctgg | 3300 |
| ccacatctgc | tgccttgatg | aacatccgaa | tccttcacat | tgaagggtgg | gaagtcagtg | 3360 |
| ggaccattga | tgactctatc | agacatgcc | taacaaaact | ggctcattat | catgtgtgct | 3420 |
| | | | | | | |
| gcacccgcag | tgcagagcag | cacctgatata | ccatgtgtga | ggaccatgat | cgcatttc | 3480 |
| tggcaggctg | cccttcctat | gacaaacttc | tctcagccaa | gaacaaagac | tacatgagca | 3540 |
| tcattcgcatt | gtggcttaggt | gatgtatgtaa | aatctaaaga | ttacattgtt | gcactacagc | 3600 |
| accctgtgac | cactgacatt | aagcattcca | taaaaatgtt | tgaattaaca | ttggatgcac | 3660 |
| ttatctcatt | taacaagcgg | accctagtcc | tgtttccaaa | tattgacgca | gggagcaaag | 3720 |
| agatggttcg | agtgtatgcgg | aagaaggca | ttgagcatca | tcccaacttt | cgtgcagtt | 3780 |
| aacacgtccc | atttgaccag | tttatacagt | tgggtggcc | tgctggctgt | atgattggga | 3840 |
| | | | | | | |
| acagcagctg | tgggttcga | gaagttggag | cttttggaaac | acctgtgatc | aacctggaa | 3900 |
| cacgtcagat | tggaagagaa | acaggggaga | atgttctca | tgtccggat | gctgacaccc | 3960 |
| aagacaaaat | attgcaagca | ctgcaccc | agtttggtaa | acagtaccct | tgttcaaaga | 4020 |
| tatatgggaa | tggaaatgt | gttccaagga | tttgaagtt | tctcaaatct | atcgatcttc | 4080 |
| aagagccact | gcaaaagaaa | ttctgcttc | ctcctgtgaa | ggagaatatc | tctcaagata | 4140 |
| ttgaccatat | tcttgaaact | ctaagtgcct | tggccgttga | tcttggcggg | acgaaccc | 4200 |
| gagttgcaat | agtcagcatg | aagggtgaaa | tagttaagaa | gtataactcag | ttcaatccta | 4260 |
| | | | | | | |
| aaccttatga | agagaggatt | aatttatcc | tacagatgt | tgtggaaagct | gcagcagaag | 4320 |
| ctgtaaaact | gaactgcaga | attttggag | taggcatttc | cacaggtggc | cgtgtaaatc | 4380 |
| ctcggttggaa | aatttgtgt | cattcaacca | aactgtatca | agagtggaaac | tctgtggacc | 4440 |
| tttaggacccc | cctttctgac | actttgcattc | tccctgtgt | ggttagacaat | gatggcaact | 4500 |
| gtgtgtccct | ggcgaaagg | aaatttggcc | aaggaaaggg | actggaaaac | tttggcacac | 4560 |
| ttatcacagg | cacaggaatc | ggtgggtggaa | ttatccatca | gcatgaattt | atccacggaa | 4620 |
| gctccttcgt | tgcgtcgaa | ctggccacc | tttttgggtc | tctggatggg | cctgtatgtt | 4680 |

| | |
|---|------|
| cctgtggaa ccatgggtgc attgaagcat acgcctctgg aatggccttg cagagggagg | 4740 |
| caaaaaagct ccatgatgag gacctgctct tggtggagg gatgtcagtg cccaaagatg | 4800 |
| aggctgtggg tgcgctccat ctcatccaag ctgcgaaact tggcaatgcg aaggcccaga | 4860 |
| gcaccttaag aacagctggaa acagcttgg gtcttgggt tggaaacatc ctccatacca | 4920 |
| tgaatccctc ccttgtgatc ctctccggag tcctggccag tcactatatc cacattgtca | 4980 |
| aagacgtcat tcgccagcag gccttgtcct ccgtgcagga cgtggatgtg gtggttcgg | 5040 |
| attingttga cccgcctg ctgggtgctg ccagcatggt tctggactac acaacacgca | 5100 |
| | |
| ggatctacta gtaagatctt ttccctctg cccaaaatata tggggacatc atgaagcccc | 5160 |
| tttagcatct gacttctggc taataaagga aatttatttt cattgcaata gtgtgttgaa | 5220 |
| atttttgtg tctctcactc ggaaggacat aaggcgccg gctagc | 5266 |
| <210> 2 | |
| <211> 6162 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 2 | |
| tggccattgc atacgttgta tccatatcat aatatgtaca ttatattgg ctcatgtcca | 60 |
| acattaccgc catgttgaca ttgattattt actagttattt aatagtaatc aattacgggg | 120 |
| tcattagttc atagccata tatggagttc cgcgatcat aacttacggt aaatggcccg | 180 |
| | |
| cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgcccata | 240 |
| gttaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtattttacg gtaaactgcc | 300 |
| cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac | 360 |
| ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatggactt tcctacttgg | 420 |
| cagtacatct acgtatttagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtagatc | 480 |
| aatggcggtg gatacggtt tgactcacgg ggattccaa gtctccaccc cattgacgtc | 540 |
| aatggagtt tggggca cccaaatcaa cgggacttcc caaaatgtcg taacaactcc | 600 |
| | |
| gccccattga cgccaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatata aagcagagct | 660 |
| cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgtttga cctccataga | 720 |
| agacaccggg accgatccag cctccgcggc cgggaacggc gcattgaaac gcggattccc | 780 |
| cgtgccaaga gtgacgtaa taccgcctat agactctata ggcacacccc tttggcttt | 840 |
| atgcatgcta tactgtttt ggcttggggc ctatacaccc cgcgttcctt atgcataagg | 900 |
| tgtatgtata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctccaaacgggt | 960 |

| | |
|---|------|
| agggactgga aaaccttgtt acacttatca caggcacagg aatcggttgt ggaattatcc | 2760 |
| atcagcatga attgatccac ggaagctcct tctgtgtgc agaactggc caccttgttgc | 2820 |
| tgtctctgga tggcctgtat tgccctgtg gaagccatgg gtgcattgaa gcatacgct | 2880 |
| ctggaatggc ctigcagagg gaggcaaaaa agctccatga tgaggaccig ctcttggtgg | 2940 |
| aaggatgtc agtgcacaaa gatgaggctg tgggtgcgt ccatctcatc caagctgcga | 3000 |
| aacttggcaa tgcaaggcc cagagcatcc taagaacagc tggaacagct ttgggtcttg | 3060 |
| gggttgtgaa catcctccat accatgaatc cctcccttgt gatcctctcc ggagtccctgg | 3120 |
| | |
| ccagtcacta tatccacatt gtcaaagacg tcattgcac gcaggccttgc tcctccgtgc | 3180 |
| aggacgtgga tgggtggtt tcggatggg ttgaccgcgc cctgctgggt gctgccagca | 3240 |
| tgggtctgga ctacacaaca cgcaggatct actaggatcc agatctttt ccctctgcac | 3300 |
| aaaattatgg ggacatcatg aagccccctt agcatctgac ttctggctaa taaaggaat | 3360 |
| ttatttcat tcaaatatgt tgggtggatt ttttgtgtct ctcaactcgga aggacatatg | 3420 |
| ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttgtt ttagagttt gcaacatatg | 3480 |
| cccatcttc cgccctctcg ctcaactgact cgctgcgtc ggctgtcgg ctgcggcag | 3540 |
| | |
| cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag | 3600 |
| gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc | 3660 |
| tggcgccccccctt ccataggctc cgcggccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc | 3720 |
| agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggg gttccccctt ggaagctccc | 3780 |
| tcgtgcgtc tccgtttccg accctgccgc ttaccggata ccgtccgccc tttccctt | 3840 |
| cgggaaagcgt ggcgtttct catagctcac gctgttaggta tctcagttcg gtgttaggtcg | 3900 |
| ttcgctccaa gctgggttgtt gtgcacgaac ccccggttca gcccggccgc tgcccttat | 3960 |
| | |
| ccggtaacta tcgttttagt tccaacccgg taagacacga ctatgcac ctggcagcag | 4020 |
| ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt | 4080 |
| gggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagttttgg tatctgcgtc ctgcgtgaagc | 4140 |
| cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta | 4200 |
| gccccgggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag | 4260 |
| atcccttgcat ctttctacg gggctgtacg ctcaatggaa cggaaactca cgttaaggga | 4320 |
| ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcaccttagat cttttaaat taaaaatgaa | 4380 |
| | |
| gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgttac | 4440 |
| tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcg | 4500 |
| gggggggggg gcgctgaggt ctgcctcgat aagaagggtt tgctgactca taccaggcct | 4560 |

| | |
|---|------|
| gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga gcttgggtt | 4620 |
| aggtggacca gttgggtatt ttgaacttt gctttgccac ggaacggct gcgttgtcg | 4680 |
| gaagatgcgt gatctgatcc ttcaacttag caaaaagttcg atttattcaa caaagccccc | 4740 |
| gtcccgtaa gtcaacgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca attctgatta | 4800 |
| | |
| gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaataacc | 4860 |
| atattttga aaaagccgtt tctgtatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag | 4920 |
| gatggcaaga tcctggatc ggtctgcgt tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat | 4980 |
| taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttac aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga | 5040 |
| atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttcttccag acttgtcaa cagggcagcc | 5100 |
| attacgctcg tcatcaaaaat cactcgcatc aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc | 5160 |
| ctgagcgaga cgaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg | 5220 |
| | |
| caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt tcacctgaat caggatattc | 5280 |
| ttctaataacc tgaaatgctg tttccggg gatcgcatg gtgagtaacc atgcatcatc | 5340 |
| aggagtaacgg ataaaatgtc ttagtggcg aagaggata aattccgtca gccagttag | 5400 |
| tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctaccc ttgccatgtt tcagaaacaa | 5460 |
| ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gccgcacatt | 5520 |
| atcgcgagcc catttataacc catataaattc agcatccatg ttgaaattta atcgcggcct | 5580 |
| c gagcaagac gtttccgtt gaatatggct cataacaccc ctgttattac tgtttatgt | 5640 |
| | |
| agcagacagt ttatttggtc atgatgatattt attttatct tgtgcaatgt aacatcagag | 5700 |
| attttgagac acaacgtggc tttccccccc cccccattat tgaagcattt atcagggtta | 5760 |
| ttgtctcatg agcgatatac tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc | 5820 |
| gcccacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt | 5880 |
| aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc ggcgtttcg gtgtgacgg | 5940 |
| tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgaa gacggtcaca gcttgtctgt aagggatgc | 6000 |
| cgggaggcaga caagcccgtc agggcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct | 6060 |
| | |
| taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcgt 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 Ile Ile His Gln His Glu Leu Ile His Gly Ser | | |
| | | |
| 545 | 550 | 555 |
| 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 |
| 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 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 |
| Ile Tyr | | |

<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 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 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 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 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