



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월10일

(11) 등록번호 10-2498901

(24) 등록일자 2023년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C07K 14/705** (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)

(52) CPC특허분류  
**C07K 14/70503** (2013.01)  
**A61K 38/00** (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7035514  
(22) 출원일자(국제) 2017년05월10일  
심사청구일자 2020년04월27일

(85) 번역문제출일자 2018년12월07일  
(65) 공개번호 10-2019-0003761  
(43) 공개일자 2019년01월09일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2017/051303  
(87) 국제공개번호 WO 2017/194941  
국제공개일자 2017년11월16일

(30) 우선권주장  
1608197.8 2016년05월10일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌  
WO2001066689 A1  
JP2001522867 A  
JP2004513660 A

(73) 특허권자  
**두센티스 바이오테라퓨틱스 리미티드**  
영국 오엑스29 8에이더블유 위트니 옥스퍼드셔 프  
리랜드 블렌하임 레인 9

(72) 발명자  
**혁슬리, 필립**  
영국 오엑스29 8에이더블유 위트니 옥스퍼드셔 프  
리랜드 블렌하임 레인 9 두센티스 바이오테라퓨틱  
스 리미티드 씨/오

**쉐리단, 조셉**  
영국 오엑스29 8에이더블유 위트니 옥스퍼드셔 프  
리랜드 블렌하임 레인 9 두센티스 바이오테라퓨틱  
스 리미티드 씨/오

**힐, 조나단**  
영국 오엑스29 8에이더블유 위트니 옥스퍼드셔 프  
리랜드 블렌하임 레인 9 두센티스 바이오테라퓨틱  
스 리미티드 씨/오

(74) 대리인  
**양영준, 이윤기**

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 고일영

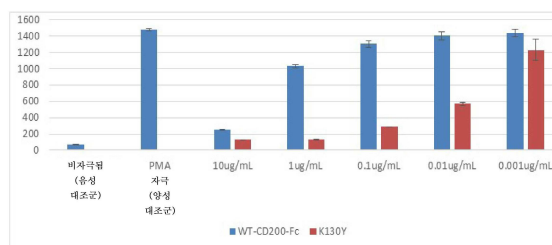
(54) 발명의 명칭 CD200 돌연변이체 및 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 일반적으로, 야생형 CD200보다 더 큰 친화도로 CD200 수용체에 결합하는 돌연변이체 CD200 단백질에 관한 것이고, 특히 본 발명은 아미노산 잔기 위치 130 및/또는 131에서의 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 CD200 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 융합 단백질을, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 제약 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다.

**대표도**

야생형 CD200-Fc 및 K130Y에 의한 단리된 인간 호중구에서의 PMA  
자극된 산화성 과원의 억제율 비교하는 용량 반응 결과



(52) CPC특허분류

**A61P 37/02** (2018.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열식별번호: 1에 상응하는 아미노산 잔기 위치 130 및/또는 131에서의 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 CD200 단백질이며, 여기서 상기 돌연변이는 K130Y 및/또는 I131Y로부터 선택된 치환 돌연변이인 단백질.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 1개 이상의 부가적 돌연변이를 포함하는 단백질.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 1개 이상의 부가적 돌연변이가 G129I, F128R, 및 N81K로부터 선택된 것인 단백질.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 단백질.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질의 세포외 도메인 (ECD)을 포함하는 단백질.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열식별번호: 3 또는 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 단백질.

#### 청구항 7

비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된, 제1항의 단백질을 포함하는 융합 단백질.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단백질이 비-CD200 단백질 코딩 부분에 링커 부분을 통하여 융합된 융합 단백질.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 링커 부분이 1 내지 15개의 아미노산을 포함하는 펩티드인 단백질.

#### 청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-CD200 단백질 코딩 부분이 항체 또는 항체의 항원 결합 단편인 단백질.

#### 청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-CD200 단백질 코딩 부분이 Fc 단편인 단백질.

#### 청구항 12

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 단백질.

#### 청구항 13

제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, CD200 수용체의 조절제인 단백질.

#### 청구항 14

제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, CD200 수용체의 효능제인 단백질.

## 청구항 15

제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

## 청구항 16

제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 일반적으로, 야생형 CD200보다 더 큰 친화도로 CD200 수용체에 결합하는 돌연변이체 CD200 단백질에 관한 것이고, 특히 본 발명은 아미노산 잔기 위치 130 및/또는 131에서의 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 CD200 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 융합 단백질, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 제약 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0002] 자가면역 질환은 전 세계에서 만성 질병의 두 번째 주요 원인이며 미국에서 여성의 이환율의 주요 원인이다. 2008년 국제 조사에 따르면, 미국에서의 만성적인 질병 환자는 다른 나라의 환자와 비교해서 비용 부담 때문에 적절한 치료를 받지 않을 가능성이 더 높다 (Schoen, C. et al., (2008) *Health Affairs Web Exclusive*, w1-w16). 부가적으로, 이들 환자는 가장 높은 의료 오류율, 치료 협력 조정 문제, 및 높은 자기 부담금 건강 관리 비용을 경험할 가능성이 더 크다.
- [0003] 현재, 미국 자가면역 관련 질환 협회 (AARDA)는 5천만명의 미국인이 자가면역 질환을 앓고 있다고 추정한다. 역학적 데이터는 자가면역 질환으로 인한 전반적인 건강 관리 시스템에 대한 전체 직접 및 비용을 결정하는데 부족하다. 그러나, 2001년에 국립 알레르기 및 감염성 질환 연구소 (NIAID) 소장인 안토니 포시(Anthony Fauci) 박사는 연간 자가면역 질환 치료 비용이 \$1000억을 넘는 것으로 추정하였다. \$1000억이 엄청난 숫자이긴 하지만, 자가면역 질환의 실제 비용에 대한 상당히 절제된 표현인 것으로 예상되며, 이는 100종 이상의 공지된 자가면역 질환 중 단지 7종의 질환, 즉 크론병, 궤양성 결장염, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 다발성 경화증 (MS), 류마티스성 관절염 (RA), 건선, 및 피부 경화증의 연간 비용이 역학 조사를 통해 매년 총 \$518억-\$706억인 것으로 추정되기 때문이다. 더욱이, 이러한 추정치는 이식 동안 면역억제 요법의 비용을 간과한 것이다.
- [0004] 자가면역 질환은 치유될 수 없는 만성적 병태이며, 이는 면역 체계가 건강한 세포를 외래인 것으로 판단하여 이를 공격할 때 발생한다. 유형에 따라, 자가면역 질환은 하나 또는 여러 상이한 유형의 신체 조직에 영향을 줄 수 있으며 비정상적인 기관 성장과 기관 기능 상의 변화를 유발할 수 있다. 면역 체계의 정상적인 조절은 주로, 면역 반응에 수반되는 세포에 의해 발현되는 단백질을 포함하는 수용체/리간드 쌍에 기인한다. 그러나, 이들 수용체/리간드 쌍은 종종, 자가면역 질환의 치료에 대한 장애물을 제공하는 시그널링 캐스케이드에 포함된다. 현재의 자가면역 질환의 관리는 이러한 질환의 프로세스를 제어하고, 특히 플레어-업 동안 그 증상을 줄이기 위한 시도를 수반한다.
- [0005] CD200 (분화 클러스터 200)으로 명명되기도 하는 OX-2 막 당단백질은 각종 세포 유형에서 발현되는 CD200 유전자에 의해 코딩된 인간 단백질이고 (문헌 [Barclay, A. N. (1981) *Immunology* 44, 727]), 면역글로불린 유전자 계열의 분자와의 고도의 상동성을 갖는다. 이러한 유전자에 의해 코딩된 단백질이 2개의 면역글로불린 도메인을 함유하고 CD200 수용체 (CD200R)에 결합하는 유형-1 막 당단백질이다.
- [0006] CD200R은 골수성 세포 (단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 호산구) 및 T 세포 상에서 발현된다 (Wright, et al., (2000), *Immunity* 12, 233-242; Wright, et al., (2003), *J. Immunol.*, 171, 3034-3046).
- [0007] CD200의 CD200R과의 결합은 억제 시그널을 골수성 및 T-세포에 전달하므로, 면역 체계의 선천적인 부분과 적응 부분 둘 다에 대한 면역억제 효과가 발휘된다 (Rahim S. A., (2005) *AIDS*, 19, 1907-1925; Shiratori, I., (2005) *J. Immunol.*, 175, 4441-4449; Misstear, K., et al., (2012), *Journal of Virology*, 86(11), 6246-6257).

- [0008] CD200R 효능제가 광범위한 질환 모델, 예를 들어 관절염 (문헌 [Gorczynski, et al., (2001) *Clin. Immunol.* 101, 328-34; Gorczynski, et al., (2002) *Clin. Immunol.* 104, 256-264]), 이식편 거부반응 (문헌 [Gorczynski, et al., (2002) *Transplantation* 73, 1948-1953]), 임신 실패 (문헌 [Gorczynski, et al., (2002) *Am. J. Reprod. Immunol.*, 48, 18-26]), 접촉 과민증 (문헌 [Rosenblum, et al., (2004) *Blood* 103, 2691-8]), 인플루엔자 유도된 폐 염증 (문헌 [Snelgrove, et al., (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1074-1083]) 및 HSV-유도된 염증성 병변 (문헌 [Sarangi, et al., (2009) *Clin. Immunol.* 131, 31-40])에서의 병리상태를 저하시키는 것으로 제시된 바 있다.
- [0009] 부가적으로, 인플루엔자 바이러스에 시험감염된 *CD200*<sup>-/-</sup> 마우스에서는, 야생형 대조군과 비교해서 증가된 폐 침윤 및 폐 내피 손상과 연관된 보다 중증의 질환이 발생하였다 (Rygiel. T. P., et al. (2009) *J. Immunol.* 183(3), 1990-1996). *CD200*<sup>-/-</sup> 마우스에서는 바이러스 로드를 제어할 수 있었던 면역 반응이 발생하였으며, 이는 악화된 면역 반응으로 인해 상기와 같은 중증의 질환이 유발되었다는 것을 시사한다. 결과적으로 바이러스 로드와 현저하게 증가하였음에도 불구하고, 바이러스 시험감염 전에 T-세포가 고갈됨으로써 질환을 방지할 수 있었다. 리지엘. 티. 피.(Rygiel. T. P.) (2009) 등은 T 세포가 인플루엔자 감염 동안 질환 증상의 발현에 필수적이며, 바이러스 로드와 아닌 CD200-CD200R 시그널링의 하향-조정의 기여가 면역 병리상태를 증가시킨다는 결론을 내렸다.
- [0010] 프로파일링 연구는 hCD200 발현이 다양한 환자 집단, 예컨대 다발성 경화증 (문헌 [Koning, et al., (2007) *Ann. Neurol.* 62, 504-514]), 천식 악화 (문헌 [Aoki, et al., (2009) *Clin. Exp. Allergy* 39, 213-221]), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) (문헌 [Walker, et al., (2009) *Exp. Neurol.* 215, 5-19]), 원발성 비대성 골관절병증 (문헌 [Ren, et al., (2013) *Rheumatol. Int.* 33(10), 2509-2512]), 임신 실패 (문헌 [Clark (2009) *Am. J. Reprod. Immunol.* 61, 75-84]) 및 모공성 편평 태선 (탈모) (문헌 [Harries, et al., (2013) *J. Pathol.* 231(2), 236-247])을 동반한 환자에서 하향 조절되는 것으로 제시한 바 있다.
- [0011] 효능제 CD200 단백질은, 예를 들어, WO 2000/061171 및 WO 2008/089022에 개시된다. 이러한 문헌에는 면역 세포 기능을 조정하기 위한 야생형 CD200 분자의 용도가 기재되어 있다. 본 발명은 야생형 CD200보다 더 큰 친화도로 CD200 수용체에 결합하는 돌연변이체 CD200 단백질에 관한 것이다.
- [0012] 따라서, 현재 이용가능한 자가면역 질환 치료와 연관된 문제점을 극복해줄 수 있는, 보다 낮은 용량으로 개선된 임상 효능을 제공할 필요가 있다.

### 발명의 내용

- [0013] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 아미노산 잔기 위치 130 및/또는 131에서의 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 CD200 단백질이 제공된다.
- [0014] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 융합 단백질이 제공된다.
- [0015] 본 발명의 제3 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0016] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0017] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 단백질 또는 본원에 정의된 바와 같은 조성물이 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1: WT-CD200-Fc, K130Y 및 I131Y의 SDS 겔.
- 도 2: A: K130Y의 크기 배제 크로마토그래프.  
B: I131Y의 크기 배제 크로마토그래프.
- 도 3: 센서 칩 표면 상에서의 항-인간 Fc 항체의 고정화.
- 도 4: 헤르셉틴 포획 및 hCD200R 회합/해리.
- 도 5: A: 포획된 야생형 CD200에 결합하는 CD200R의 회합 및 해리 상을 제시하는 센서그램.

B: 포획된 K130Y에 결합하는 CD200R의 회합 및 해리 상을 제시하는 센서그램.

**도 6:** 야생형 CD200-Fc 및 K130Y에 의한 단리된 인간 호중구에서의 PMA 자극된 산화성 파열의 억제를 비교하는 용량 반응 결과.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 아미노산 잔기 위치 130 및/또는 131에서의 돌연변이를 포함하는 돌연변이된 CD200 단백질이 제공된다. 본 발명자들은 이들 특별한 아미노산 잔기에서의 CD200의 세포외 도메인 내의 돌연변이가, CD200 수용체 (CD200R)에 대한 증가된 결합 친화도를 수반한 돌연변이체 CD200을 생성시킨다는 것을 밝혀내었다. 부가적으로, 본원에 기재된 바와 같이 돌연변이된 CD200 단백질은, 특히 더 큰 임상 효능을 수반하고 더 낮은 용량 하에서의 치료를 제공하는 것과 관련해서 상당한 혜택을 갖는다.
- [0020] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CD200 단백질"은 야생형 CD200 단백질을 지칭한다.
- [0021] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "야생형"은 자연에 존재하는 단백질, 펩티드, 아미노산 및 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "야생형 CD200 단백질"은 CD200 수용체에 결합하는 CD200의 임의의 전장 이소형 (UNIPROT P41217 OX2G\_인간; 서열식별번호(SEQ ID NO): 1) 또는 그의 임의의 부분을 지칭한다. CD200 단백질은 또한, OX-2 막 당단백질로서 공지된다.
- [0022] 야생형 CD200은 N-말단 세포외 도메인, 및 짧은 막횡단 및 세포질 도메인을 갖는 세포 표면 단백질이다. 세포외 도메인은 표적 수용체, 예컨대 CD200 수용체에 결합한다. 한 실시양태에서, CD200 단백질은 CD200 수용체에 결합하는 CD200의 세포외 도메인, 또는 그의 임의의 부분이다. 추가 실시양태에서, CD200 단백질은 야생형 CD200의 세포외 도메인 (서열식별번호: 2)이며, 시그널 서열을 포함한 전장 단백질에서는 위치 +31에서의 글루타민으로 시작하고 위치 +231에서의 리신에서 종결된다 (서열식별번호: 1).
- [0023] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "위치"는 아미노산 서열 내의 잔기 번호를 지칭하며, 여기서 1은 처음 번역된 아미노산이다.
- [0024] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "돌연변이된" 또는 "돌연변이"는 야생형 등가물에서 돌연변이체로의 형태 상의 변화가 진행된 단백질, 펩티드, 아미노산 및 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 예를 들어, 돌연변이된 또는 돌연변이체 단백질은 상응하는 야생형 서열과 비교한 경우에, 아미노산 및/또는 뉴클레오티드 서열 상의 변화가 진행될 수 있고, 이러한 변화는 또한, 돌연변이로서 지칭될 수 있다.
- [0025] 통상의 돌연변이는 치환, 결실, 부가, 말단절단, 전위 및 역위를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서 돌연변이는 치환, 전위 또는 역위이다. 추가 실시양태에서, 돌연변이는 치환 돌연변이이다. 추가 실시양태에서, 상기 치환 돌연변이는 K130Y 및/또는 I131Y이다.
- [0026] 아미노산 서열을 변경시키지 않는 뉴클레오티드 서열 내의 돌연변이가 여전히 돌연변이된 것으로 간주되어야 한다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다. 결과적으로, 단백질을 변경시키지 않는 뉴클레오티드 서열 내의 돌연변이도 여전히 돌연변이된 것으로 간주되어야 할 것이다.
- [0027] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "돌연변이된 CD200 단백질"은 아미노산 서열 내의 특징의 돌연변이된 아미노산 잔기 또는 다수의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하므로 야생형 CD200 단백질과 유사하긴 하지만 더 이상 동일하지 않은, CD200 수용체에 결합하는 전장 CD200 단백질 또는 그의 임의의 부분을 지칭한다.
- [0028] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 합성적으로 또는 재조합적으로 만들어질 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 합성적으로 만들어질 수 있다. 대체 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 재조합적으로 만들어질 수 있다.
- [0029] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 야생형 CD200보다 더 큰 친화도로 CD200 수용체에 결합한다.
- [0030] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 그 안에 있거나 또는 그에 부착된 생물학적으로 또는 화학적으로 활성인 비-CD200 성분을 포함할 수 있다.
- [0031] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 가용성 (즉, 순환성)이거나 또는 표면에 결합될 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 가용성이다. 대체 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 표면에 결합된다.
- [0032] 한 실시양태에서, 상기 돌연변이된 CD200 단백질은 CD200의 전체 세포외 도메인 또는 그의 일부분을 포함할 수



있다.

- [0033] 단백질, 펩티드 및 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "부분"은 기능적인, 즉 그들의 표적에 결합하는 단편 및 유도체를 지칭한다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단편"은 그의 표적, 예컨대 수용체를 인식하고 그에 결합하는 단백질, 펩티드, 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 일부를 지칭한다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유도체" 및 "돌연변이체"는 야생형 등가물과의 적어도 70% (예컨대 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%) 서열 유사성을 공유하고 야생형 등가물과 같이 기능하는 단백질, 펩티드, 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 따라서, 돌연변이체는 야생형 등가물의 유도체일 수 있다. 추가 실시양태에서, 돌연변이된 CD200 단백질은 위치 +31에서의 글루타민으로 시작하고 위치 +231에서의 리신에서 종결되는 야생형 CD200의 세포외 도메인의 일부분이다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아미노산 잔기"는 중합체성 체 내의 단량체성 단위, 즉 단백질 내의 단일 아미노산을 지칭한다.
- [0037] 한 실시양태에서, 상기 단백질은 아미노산 서열에 존재하는 1개 이상의 돌연변이, 예를 들어 1-15개의 돌연변이를 부가적으로 포함한다.
- [0038] 추가 실시양태에서, 상기 돌연변이된 단백질은 1개 이상의 부가적 돌연변이, 예컨대 G129I, F128R 및/또는 N81K로부터 선택된 돌연변이를 포함한다.
- [0039] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 단백질은 상기 단백질의 세포외 도메인 (ECD)을 포함한다. 추가 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 단백질은 서열식별번호: 3 또는 서열식별번호: 4의 서열을 포함한다.
- [0040] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 단백질은 전장 CD200 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 단백질은 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 13의 서열을 포함한다.
- [0041] 도 5 및 표 2에 제시된 바와 같이, 본원에 개시된 돌연변이된 CD200 단백질은 야생형 CD200 단백질보다 CD200 수용체와 더 단단하게 결합하고 이러한 수용체 상에서의 체류 시간이 더 길다.
- [0042] **융합 단백질**
- [0043] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 융합 단백질이 제공된다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "융합 단백질"은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,434,131 및 5,637,481에 기재된 바와 같이, 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 함께 연결된 하나 이상의 아미노산 서열, 펩티드 및/또는 단백질을 지칭한다. 이로써 연결된 아미노산 서열, 펩티드 또는 단백질이 하나의 융합 단백질을 형성한다.
- [0045] 한 실시양태에서, 본원에서의 단백질은 N- 또는 C-말단에서, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된다. 추가 실시양태에서, 본원에서의 단백질은 N-말단에서, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된다. 대체 실시양태에서, 본원에서의 단백질은 C-말단에서, 임의적 링커 부분을 통하여 비-CD200 단백질 코딩 부분에 융합된다.
- [0046] 한 실시양태에서, 상기 링커 부분은 1 내지 15개의 아미노산을 포함하는 펩티드이다. 추가 실시양태에서, 링커는 글리신으로 시작하고 세린에서 종결되는 10개의 아미노산 링커이다. 또한 추가 실시양태에서, 링커는 GGGSGGGGS의 서열 (서열식별번호: 11)을 포함하는 펩티드이다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비-CD200 단백질 코딩 부분"은 CD200 수용체에 결합하지 않고 CD200이 그의 표적에 결합하는 것을 방해하지 않는 임의의 펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 예는 면역글로불린 (Ig) 불변 영역 또는 그의 일부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0048] 추가 실시양태에서, 상기 비-CD200 단백질 코딩 부분은 항체 또는 그의 단편이다. 추가 실시양태에서, 상기 비-CD200 단백질 코딩 부분은 Fc 단편이다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 돌연변이된 CD200 융합 단백질은 또한, 돌연변이체 CD200-Fc로 지칭될 수 있다. 추가 실시양태에서, Fc 단편은 포유류 유래되며, 예컨대 인간 또는 원숭이, 예컨대 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 인간 C(감마)1로부터 유래된다. 상기 Fc 단편은 본 발명의 돌연변이된 CD200 단백질의 반감기 (즉, 수용체 점유율)를 증가시키는 이점을 제공하는 것으로 여겨진다.

Fc 영역이 그의 이펙터 기능을 저하시키도록 돌연변이될 수 있다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다 (예를 들어, US 5,637,481 및 US 6,132,992 참조).

[0049] 돌연변이된 CD200 단백질은 본원의 도 5 및 표 2에 제시된 바와 같이, 야생형 또는 비-돌연변이된 CD200 단백질과 비교해서 CD200 수용체에 대한 더 높은 친화도를 갖고 있기 때문에, 임의의 융합된 비-CD200 단백질 코딩 부분이 또한, 이러한 특징으로부터 혜택을 누릴 것이다. 이는 본원에 기재된 바와 같이, 제약 조성물 및 요법에 대한 상당한 혜택을 제공한다.

[0050] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 융합 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7의 서열을 포함한다.

[0051] 본 발명의 단백질은 바람직하게, 돌연변이된 CD200 단백질 또는 그의 임의의 부분을 코딩하는 핵산 서열을 재조합 발현 벡터 내로 삽입하고, 이러한 핵산 서열을, 발현을 증진시키는 조건 하에 재조합 발현 시스템에서 발현 시킴으로써 재조합 DNA 방법에 의해 생성된다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 부가적으로, 벡터, 예컨대 pcDNA 3.4를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 융합 단백질은 하나 이상의 제한 효소 부위, 예컨대 Hind III 및/또는 Xho I에 의해 플랭킹된다. 추가 실시양태에서, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 Hind III 및 Xho I 제한 부위에 의해 플랭킹된다.

[0052] 한 실시양태에서, 상기 융합 단백질은 하나 이상의 제한 효소 부위, 예컨대 Bam HI를 포함한다.

[0053] 본 발명의 제3 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본 발명에 의해 제공된 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 cDNA 단편 및 짧은 올리고뉴클레오티드 링커로부터 어셈블리되거나, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드로부터 어셈블리되어, 재조합 발현 벡터 내에 삽입될 수 있고 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공할 수 있다.

[0054] 재조합 발현 벡터는 포유류, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소와 작동적으로 연결된 돌연변이된 CD200을 코딩하는 합성 또는 cDNA-유래 핵산 단편을 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사 프로모터, 전사를 제어하는 임의적 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함한다. 통상적으로 복제 기점에 의해 부여된, 숙주 내에서 복제할 수 있는 능력, 및 형질전환체의 인식을 촉진시켜 주는 선별 유전자가 부가적으로 혼입될 수 있다.

#### [0055] 치료적 용도

[0056] 본 발명은 CD200 단백질과 CD200 수용체 간의 상호 작용이 결국에는 CD200 수용체에 대한 CD200의 친화도를 감소시키는 신속한 "온" 속도와 신속한 해리 ("오프") 속도를 특징으로 하기 때문에, 요법에 있어서 특별한 적용을 갖는다. 따라서, 본원에 제시된 바와 같이 CD200 수용체에 대한 돌연변이체 CD200 단백질의 친화도를 증가시키는 것은 더 강력한 특성을 수반한 제약 조성물의 제작에 사용될 수 있다.

[0057] 더욱이, 재조합 단백질에 대한 제작 비용은 많이 들고, 더 높은 친화도를 갖는 돌연변이체 CD200 단백질은 야생형 또는 비-돌연변이된 CD200 단백질보다 상당히 더 낮은 용량으로 제약 조성물에 사용되어 치료 효과를 달성할 수 있다. 따라서 돌연변이체 CD200 단백질을 사용하는 것이 임상적으로 더 유효하다는 것 외에도 비용 면에서 더 효과적일 수 있다.

[0058] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

[0059] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 돌연변이된 CD200 단백질은 CD200 수용체의 조절제이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "조절제"는 동역학적 변화를 초래하는 물질을 지칭하며, 예를 들어 특정 단백질의 조절제는 이러한 단백질의 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 본 발명의 돌연변이된 CD200 단백질의 특성에 비추어 볼 때, 이들은 CD200 수용체의 효능제인 것으로 여겨지고, 따라서 자가면역 질환의 치료에서의 유용성을 갖는다. 따라서, 추가 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 돌연변이된 CD200 단백질은 CD200 수용체의 효능제이다.

[0060] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 단백질 또는 본원에 정의된 바와 같은 조성물이 제공된다.

[0061] 본원에 정의된 돌연변이체 CD200 단백질을 포함하는 융합 단백질은 야생형 또는 비-돌연변이된 CD200 단백질을 포함하는 융합 단백질보다 더 높은 효율로 활성화된 면역 세포를 탈활성화시킬 수 있다.

[0062] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 신경근계, 혈관계, 눈, 소화관, 폐, 신장, 간, 말초 또는 중추 신경계, 골,



연골 또는 관절에서 발병되는 자가면역 질환으로부터 선택된다.

- [0063] 추가 실시양태에서, 자가면역 질환은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 자가면역 질환이다: 급성 파종성 뇌척수염 (ADEM); 급성 피사성 출혈성 백질뇌염; 애디슨병; 무감마글로불린혈증; 원형 탈모증; 아밀로이드증; 강직성 척추염; 항-GBM/항-TBM 신염; 항인지질 증후군 (APS); 자가면역 혈관부종; 자가면역 재생불량성 빈혈; 자가면역 자율신경실조증; 자가면역 간염; 자가면역 고지혈증; 자가면역 면역결핍; 자가면역 내이 질환 (AIED); 자가면역 심근염; 자가면역 난소염; 자가면역 췌장염; 자가면역 망막병증; 자가면역 혈소판감소성 자반증 (ATP); 자가면역 갑상선 질환; 자가면역 두드러기; 축삭 & 뉴런 신경병증; 발로병; 베체트병; 수포성 유사천포창; 심근병증; 캐슬만병; 셀리악병; 샤가스병; 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIDP); 만성 재발성 다초점성 골수염 (CRMO); 처그-스트라우스 증후군; 반흔성 유천포창/양성 점막 유천포창; 크론병; 코간 증후군; 저온 응집소 질환; 선천성 심장 차단; 콕사키 심근염; CREST 질환; 본태성 혼합 한랭글로불린혈증; 탈수초성 신경병증; 포진성 피부염; 피부근염; 데비병 (시신경척수염); 원관상 루푸스; 드레슬러 증후군; 자궁내막증; 호산구성 식도염; 호산구성 근막염; 결절성 홍반; 실험적 알레르기성 뇌척수염; 에반스 증후군; 섬유화 폐포염; 거대 세포 동맥염 (측두 동맥염); 거대 세포 심근염; 사구체신염; 굿패스처 증후군; 다발혈관염을 동반한 육아종증 (GPA) (이전에는 베게너 육아종증으로 지칭됨); 그레이브스병; 길랑-바레 증후군; 하시모토 뇌염; 하시모토 갑상선염; 용혈성 빈혈; 헤노흐-셴라인 자반증; 임신성 포진; 저감마글로불린혈증; 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP); IgA 신병증; IgG4-관련 경화성 질환; 면역조절 지단백질; 봉입체 근염; 간질성 방광염; 소아 관절염; 소아 당뇨병 (유형 1 당뇨병); 소아 근염; 가와사키 증후군; 램버트-이튼 증후군; 백혈구과괴성 혈관염; 편평 태선; 경화성 태선; 목질 결막염; 선상 IgA 질환 (LAD); 루푸스 (SLE); 만성 라임병; 메니에르병; 현미경적 다발혈관염; 혼합 결합 조직 질환 (MCTD); 무렌 궤양; 뮌샤-하버만병; 다발성 경화증; 중증 근무력증; 근염; 기면증; 시신경척수염 (데비); 호중구감소증; 안구 반흔성 유천포창; 시신경염; 회귀성 류마티즘; PANDAS (스트렙토코쿠스 (Streptococcus)와 연관된 소아 자가면역 신경정신 장애); 부신생물성 소뇌 변성; 발작성 야간 혈색소뇨 (PNH); 패리 롬버그 증후군; 파소니지-터너 증후군; 주변부 포도막염 (말초 포도막염); 천포창; 말초 신경병증; 정맥주위 뇌척수염; 악성 빈혈; POEMS 증후군; 결절성 다발동맥염; 유형 I, II, & III 자가면역 다선성 증후군; 류마티스성 다발근육통; 다발근염; 심근경색후 증후군; 심막절개술후 증후군; 프로게스테론 피부염; 원발성 담즙성 간경변증; 원발성 경화성 담관염; 건선; 건선성 관절염; 특발성 폐 섬유증; 괴저성 농피증; 순수 적혈구 빈혈; 레이노 현상; 반응성 관절염; 반사 교감신경 이영양증; 라이트 증후군; 재발성 다발연골염; 하지 불안 증후군; 복막후 섬유증; 류마티스성 열; 류마티스성 관절염; 사르코이드증; 슈미트 증후군; 공막염; 피부 경화증; 쇼그렌 증후군; 정자 & 고환 자가면역; 근육강직 증후군; 아급성 박테리아성 심내막염 (SBE); 수삭 증후군; 교감신경성 안염; 다카야스 동맥염; 측두 동맥염/거대 세포 동맥염; 혈소판감소성 자반증 (TTP); 톨로사-헌트 증후군; 횡단성 척수염; 제1형 당뇨병; 궤양성 결장염; 미분화 결합 조직 질환 (UCTD); 포도막염; 혈관염; 소포수포성 피부병; 백반증; 및 베게너 육아종증 (현재에는 다발혈관염을 동반한 육아종증 (GPA)으로 명명됨).
- [0064] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본 발명의 단백질을 적어도 하나의 자가면역 질환을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에게서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0065] 본 발명의 단백질이 단독 치료제로서 투여될 수 있거나 또는 자가면역 질환의 치료를 위한 하나 이상의 다른 화합물 (또는 요법)과의 조합 요법으로 투여될 수 있는 것으로 인지될 것이다.
- [0066] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 정의된 바와 같은 단백질을 하나 이상의 부가적 치료제와 조합하여 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0067] 자가면역 질환의 치료를 위해, 본 발명의 단백질은 하나 이상의 다른 약제와 조합하여, 보다 특히, 면역억제 요법에서 하나 이상의 면역억제제 또는 아주반트와 조합하여 유리하게 이용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 화합물과 함께 투여될 수 있는 (공동으로 투여되든지 아니면 상이한 시간 간격으로 투여되든지 간에) 다른 치료제 또는 치료의 예는 아자티오프린; 메토타렉세이트; 시클로스포린; 모노클로날 항체 (바실릭시맙, 다클리주맙, 및 무로모넵); 및 코르티코스테로이드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0069] 본 발명의 조합물에 존재하는 각각의 치료제는 개별적으로 다양한 용량 스케줄로 상이한 경로를 통하여 제공될 수 있다. 부가적으로, 2종 이상의 작용제 각각의 약량은 상이할 수 있는데: 각각은 동시에 또는 상이한 시간에 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 자신의 통상적인 일반 지식을 통하여 사용되는 투여 방식과 조합 요법을 알고 있을 것이다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 그들의 기존의 조합 방식에 따라 투여되는 하나 이상의 다른 작용제와 조합하여 사용될 수 있다.

- [0070] 일반적으로, 본원에 개시된 단백질은 약리학상 적절한 부형제 또는 담체와 함께 정제된 형태로 활용될 것이다. 전형적으로, 이들 부형제 또는 담체는 수성 또는 알콜성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액 (식염수 및/또는 완충 매질 포함)을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨 및 젖산을 가한 링거액을 포함한다. 현탁액 중에서 폴리펩티드 복합체를 유지하는 것이 필요한 경우에 적합한 생리학상 허용되는 아주반트는 증점제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴 및 알기네이트로부터 선택될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따르는 제약 조성물의 투여 경로는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 공지된 것 중 임의의 것일 수 있다. 면역요법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 요법의 경우에는, 본 발명의 단백질이 표준 기술에 따라서 어떠한 환자에게도 투여될 수 있다. 투여는 비경구적으로, 정맥내로, 근육내로, 복강내로, 경피적으로, 폐 경로를 통하여, 또는 또한, 적절하게는 카테터를 이용한 직접적인 주입을 포함한 임의의 적절한 방식에 의해서 이루어질 수 있다. 투여 용량 및 투여 빈도는 환자의 연령, 성별 및 상태, 다른 약물의 공동 투여, 금기 사항 및 임상가의 고려해야 할 다른 파라미터에 좌우될 것이다.
- [0072] 본 발명의 단백질은 저장을 위해 동결건조시키고 사용하기에 앞서 적합한 담체에서 재구성될 수 있다. 이러한 기술은 효과적인 것으로 밝혀졌고, 관련 기술분야에 공지된 동결건조 및 재구성 기술이 이용될 수 있다. 동결건조 및 재구성이 다양한 정도의 활성 손실을 초래할 수 있고, 보상하기 위해 수준을 상향 조정해야 할 수도 있다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 인지할 것이다.
- [0073] 하기 연구 및 프로토콜은 본원에 기재된 방법의 실시양태를 예시한다.
- [0074] 실시예 1: 돌연변이체 및 야생형 CD200-Fc 분자의 제작
- [0075] *유전자 합성*
- [0076] N-말단 시그널 서열을 포함하는 유니프روت(Uniprot) P412178 (OX2G\_인간)의 돌연변이체 또는 야생형 인간 CD200 잔기 1-231을 코딩하는 DNA 서열을 C-말단에서, 2개의 단백질 도메인 사이에 GGGSGGGGS의 링커 서열 (서열식별 번호: 11)을 수반한 P01857 (IHG1\_인간)의 IgG1 Fc, 잔기 99-330과 융합시켰다. 야생형 및 돌연변이체 구축물에 대한 유전자 합성을 진아트(GeneArt)에서 수행하였다.
- [0077] 5' Hind III 및 3'XhoI를 수반한 포유류 발현 벡터 pcDNA3.4를 사용하여 발현 구축물을 만들었다. 내부 Bam HI를 도입하여 Fc 도메인 스와핑을 촉진시켰다.
- [0078] *미디 프랩*
- [0079] 수령시, CD200-Fc 표적 단백질 (야생형 및 돌연변이체 CD200-Fc 단백질 둘 다)의 동결건조된 DNA 구축물을 50  $\mu$ l의 MQ에 현탁시키고 DH 5 $\alpha$  세포를 형질전환시켰다. 각각의 표적 단백질의 단일 콜로니를 선택하고, 이를 앰피실린을 함유하는 5.0 ml의 LB 내로 접종하였다. 그 다음, 확증을 위해 2.0 ml의 배양물로부터의 DNA를 단리하였고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분해하였다. 상기 DNA를 Hind III 및 XhoI로 소화시킴으로써 구축물을 확증하였다. 각각의 돌연변이체 또는 야생형 구축물을 중간 규모 DNA 제제용으로 100 ml의 LB 내로 배양하였다. 퓨어링크 하이퓨어 플라스미드 미디프랩 키트를 사용하여 상기 DNA를 단리하였다.
- [0080] *단백질 발현*
- [0081] 25 ml 배양물 부피에 대하여 제조업체의 지시에 따라서 씨모 피셔 김코(Thermo Fisher Gibco™) ExpiCHO™ 발현 시스템을 사용하여 CD200-Fc 표적 단백질을 제작하였다. 발현된 CD200-Fc를 함유하는 배지 상등액을 수집하고, 사용할 때까지 -80°C 하에 저장하였다.
- [0082] *단백질 정제*
- [0083] 친화 칼럼 정제를 위하여 배지를 컨디셔닝하기 위해 53 ml의 세파텍스G25가 채워진 하이프랩 탈염 칼럼 (XK26/10)을 사용하여 완충제 교환을 수행하였다. 상기 탈염 칼럼을 AKTA 익스플로러 플랫폼 상에서 완충제 A (20 mM 인산나트륨 pH 7.4를 함유하는 150 mM NaCl)로 평형화시켰다. 30 ml의 정화된 배양 배지를 1 ml/min의 속도로 일련으로 연결된 2개의 탈염 칼럼 상으로 로딩하였다. 단백질을 2 ml/min의 속도로 용출시키고 여러 분획으로 수집하였다. 최대 흡광도와 pH 7.4-7.2를 제시하는 분획을 풀링하였다. 더 낮은 pH를 나타내는 분획은 거부하였다. 탈염 후, 대략 45 ml의 야생형 또는 돌연변이체 CD200-Fc 상등액을 구성하도록 상기 샘플을 희석시켰다. 모든 정제 절차를 4°C 하의 얼음 위에서 수행하였다.
- [0084] 상기 칼럼을 10 칼럼 부피의 완충제 A (10 ml의 20 mM 인산나트륨 pH 7.4, 150 mM NaCl)로 세척하였다.

CD200-Fc 단백질을, 20 mM 인산나트륨 pH 7.4, 150 mM NaCl 및 100 mM 시트레이트 완충제 pH 3.5를 선형 구배로 사용하여 10-칼럼 부피에 걸쳐 pH 7.4-3.5 구배로 용출시켰다. SDS PAGE 데이터에 근거하여, 140 kDa 이량체 형태의 상기 단백질을 포함하는 CD200-Fc 분획을 단리하였다. 10 kDa 컷-오프를 수반한 아미콘 울트라 센트리콘(Amicon ultra centricon)을 사용하여 단백질 완충제를 교환시켰고, 상기 단백질을 대략 1 mg/ml가 되도록 농축시켰다.

[0085] 도 1은 야생형 CD200-Fc, K130Y 및 I131Y의 SGS 겔을 제시한다. 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여, 상기와 같이 제조된 CD200-Fc 단백질이 결합 분석을 수행하기 이전에 용액 중에서 응집체를 형성하지 않았다는 것을 입증하였다 (도 2).

[0086] 실시예 2: 야생형 및 돌연변이체 CD200-Fc 분자의 결합 분석

[0087] 신진 인터내셔널 리미티드(Syngene International Ltd.; 인도 방갈로르 - 560099 봄마산트라-지가니 링크 로드 봄마산트라 인더스트리얼 에리어 플롯 넘버 2&3 바이오콘 파크)에 의해 비아코어(Biacore) 실험을 수행하였다.

[0088] 검정 원리

[0089] 비아코어 계측은 상호 작용하는 두 분자 (본 경우에는 CD200 수용체 (CD200R)에 결합하는 야생형 CD200-Fc 또는 CD200-Fc 돌연변이체)의 결합 특징을 측정하기 위해 광학적 방법인 표면 플라스몬 공명 (SPR)을 사용한다. 이러한 기술은 두 번째 분자가 포획된 파트너 상으로 용액 중에서 유동될 때 칩 (센서) 상에 포획된 상호 작용하는 두 분자 중 하나의 굴절률 상의 변화를 측정한다. 이러한 실험에서는, CD200-Fc를 칩 (센서) 표면 상에 고정화시켰고, 연속 유동 조건 하에 포획된 CD200-Fc 상으로 수성 완충제 중에서 CD200R을 주입하였다. CD200R 결합 후의 CD200-Fc 굴절률 상의 변화를 실시간으로 측정하였고, 결과는 센서그램을 생성하기 위해 반응 단위 (RU) 대 시간으로서 플롯팅되었다 (도 5A 및 5B).

[0090] 계측 및 시약

[0091] 본 실험을 지이 헬스케어(GE Healthcare) 비아코어 T200 상에서 수행하였다. 표 1에는 본 검정을 개발 및 수행하는데 사용된 시약이 상세히 열거된다.

[0092] 표 1: 비아코어 실험 과정에 사용된 시약

Sl. No.	제품 설명	판매업체	카탈로그 No.
1	인간 항체 포획 키트	지이 헬스케어	BR1008-39
2	제조합 인간 CD200R, His 태그부착됨	크리에이티브 바이오파트	CD200R1-320H
3	제조합 인간 CD200, Fc-태그부착됨	크리에이티브 바이오파트	CD200-165H
4	제조합 마우스 CD200 단백질, Fc 키메라	크리에이티브 바이오파트	CD200-982M
5	트라스투주맵	로슈	N/A

[0093]

[0094] CD200-Fc 고정화

[0095] 제조업체의 지시에 따라서 지이 헬스케어 키트를 사용하여 아민 커플링함으로써 항-인간 Fc를 비아코어 CM5 센서 칩 상에 공유적으로 고정화시켰다. 최대 고정화 표적을 10000-15000 RU로 설정하였다. 도 3은 상기 칩 표면 상에서의 항-인간 Fc 항체의 포획을 제시한다. 유동 세포 1을 참조 (고정화된 리간드를 수반하지 않음)로서 사용하여, 칩 표면에 대한 비특이적 결합을 추정할 수 있었다. Fc-리간드를 비아코어 실험 완충제 (HBS-EP+: 2 mM EDTA 및 0.05% 계면활성제 P-20을 함유하는 10 mM HEPES 완충 식염수) 중에서 0.5 µg/mL이 되도록 희석시켰다. 최종 고정화 단계에서는, 야생형 CD200-Fc, 돌연변이체 CD200-Fc 및 비-관련 대조군 단백질 (헤르셉틴/트라스투주맵)을 최소 250 반응 단위 (RU)를 유발시키는 농도 하에 120초 동안 상기 칩 상으로 통과시킨 다음 (각각 유동 세포 2, 3 및 4를 사용한다), 실험 완충제 중에서 120초 동안 상기 표면을 안정화시켰다. 모든

CD200R 농도에 대하여 CD200-Fc 포획 절차를 반복하였다. 도 4는 예상된 바와 같이 CD200 수용체가 칩 표면 상에 고정화된 헤르셉틴에 결합하지 않는다는 것을 제시한다.

[0096] CD200-Fc-결합된 칩 표면 상으로의 CD200R의 통과

[0097] Fc-태그부착된 단백질의 포획 후, CD200R (상이한 농도 하)을 상기 포획된 CD200-Fc 및 대조군 단백질 상으로 120초 동안 유동시킨 다음 (회합을 관찰하기 위함), 실행 완충제 상으로 120초 동안 유동시켰다 (해리를 관찰하기 위함). 이어서, 30초 동안 10 mM 글리신-HCl (pH 2)을 사용하여 칩 표면을 재생시킨 다음 (30  $\mu$ L/min 유량), 이어서 주기 이전에 비아코어 실행 완충제를 이용하여 60초 동안 상기 표면을 안정화시켰다. 모든 CD200R 농축물을 하기 농도 하에 이중으로 실행하였다: 1  $\mu$ M, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.25 nM, 15.6 및 0 nM.

[0098] 데이터 분석

[0099] 결과는 반응 또는 공명 단위 (RU) 대 시간으로서 플롯팅된 센서그램에 나타나있다. 실험적 센서그램을 비아이밸류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어 버전 1.0 (지이 헬스케어)으로 분석하였다. 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 모델을 사용하여 곡선 피팅을 수행하였다. 반복적인 곡선 피팅을 위해 표준 파라미터 (예를 들어, 리간드 농도, 시간)를 사용한 속도 방정식을 사용하였다. 적합도의 근접성은 비아이밸류에이션 소프트웨어 버전 1.0에서 제조업체에 의해 제공된 알고리즘에 의해 결정되었다.

[0100] 결과

[0101] 도 4는 예상된 바와 같이 CD200 수용체가 칩 표면 상에 고정화된 헤르셉틴에 결합하지 않는다는 것을 제시한다. 도 5는 야생형 CD200-Fc (도 5A) 및 K130Y 돌연변이체 CD200-Fc (도 5B)에 결합하는 CD200 수용체에 대한 센서그램을 제시한다. K130Y가 야생형 CD200-Fc보다 더 큰 친화도 및 더 느린 이탈 속도로 CD200 수용체에 결합한다는 것이 도 5에서의 센서그램의 비교로부터 명백하다. 표 2에는 야생형 및 돌연변이체 CD200-Fc 분자, 즉 WT, K130Y, I131Y, G129I, F128R, N81K에 대한 온 속도 ( $M^{-1}s^{-1}$ ), 오프 속도 ( $s^{-1}$ ) 및 결합 친화도 값 (nM)이 기록된다. 관계식  $t_{1/2} (s) = 0.693/k_{off}(s^{-1})$ 을 사용하여 반감기를 계산하였다.

[0102] 표 2: 돌연변이체 CD200-Fc 분자에 대한 온 속도 ( $M^{-1}s^{-1}$ ), 오프 속도 ( $s^{-1}$ ) 및 결합 친화도 값 (nM)

SEQ ID NO:	돌연변이	온-속도 ( $M^{-1}s^{-1}$ )	오프-속도 ( $s^{-1}$ )	친화도 (nM)	t 1/2 (s)
SEQ ID NO: 5	WT	2.4E+05	2.7E-02	111.00	25.6
SEQ ID NO: 6	K130Y	4.0E+05	3.2E-03	8.07	216.6
SEQ ID NO: 7	I131Y	1.8E+05	9.1E-03	49.00	76.6
SEQ ID NO: 8	G129I	1.58 E 5	1.7E-02	108.00	40.8
SEQ ID NO: 9	F128R	1.63E 5	1.8E-02	109	39.2
SEQ ID NO: 10	N81K	2.07 E 5	2.1E-02	101	32.7

[0103]

[0104] 실시예 3: 기능적 세포성 모델을 사용한 분석

[0105] 산화성 과열 검정은 GVK 바이오사이언시스 프라이빗 리미티드(GVK Biosciences Private Limited; 인도 하이데라바드 - 500076 IDA 말라푸어 서베이 넘버 125 & 126 캠퍼스 MLR 1)에 의해 수행되었다.

[0106] 산화성 과열은 제조업체의 지시에 따라서 상업용 유동 세포 계수 기반 키트 (CAY601130, 케이만 케미칼스 (Cayman Chemicals; 미국 미시간주 48108))를 사용하여 단리된 인간 호중구에서 측정하였다. 본 검정은 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA)를 사용하여 산화성 과열을 개시한 후 유동 세포계수법에 의해 산화성 과열을 정량화한다. 산화 활성은 PMA 자극 후 산화 활성에 의해 형광 화합물 로다민 123으로 전환되는 세포 투과성의 비-형광 염료인 디히드로로다민 123을 사용하여 측정하였다. PMA 자극을 수반하고 CD200-Fc 인큐베이션을 수반하지 않은 샘플이 양성 대조군으로서 제공되었다. PMA 자극을 수반하지 않은 샘플이 음성 배경 대조군으로



서 제공되었다.

[0107] **검정 프로토콜**

[0108] 피콜-파크 분리 및 텍스트란 침강에 의해 말초혈로부터 인간 호중구를 단리하였다. 상기 세포를  $1 \times 10^6$  개의 세포/mL의 농도로 검정 완충제 (500 mL RPMI 기저 배지, 5 g BS 및 500  $\mu$ L의 1 M 염화칼슘)에 현탁시켰다. 상기 세포를 참조 분자 (야생형 CD200-Fc) 또는 CD200-Fc 돌연변이체를 수반한 수욕 중에서 37°C 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 10  $\mu$ L 부피의 디히드로로다민 123의 10X 작동 스톱을 상기 세포에 부가하고, 이를 상기 수욕 중에서 37°C 하에 15분 동안 인큐베이션하였다. 상기 세포를 200 nM의 PMA (1 mM 스톱)로 자극하고, 상기 수욕 중에서 37°C 하에 45분 더 인큐베이션하였다. 최종 인큐베이션 단계 후, 세포를 실온 하에 10분 동안 원심분리시켰다 (500 xg). 상등액을 버리고, 펠릿을 0.5 mL의 검정 완충제에 재현탁시켰다. 세포를 유동 세포계수법 (BD FACSVerse, BD 바이오사이언시스(BD Biosciences; 미국 뉴저지주))에 의해 분석하였다. 데이터는 PMA 단독으로 처리된 세포의 평균 형광 강도 값을 사용하여 플롯팅하였고, 이를 PMA 및 시험 화합물 (야생형 CD200-Fc 또는 돌연변이체 CD200-Fc)로 처리된 세포와 비교하였다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 6.0을 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 적절한 세포 집단 데이터가 수집되었다는 것을 보장하기 위해 전방 및 측방 산란 (FSC 대 SSC)을 사용하여 분석 프로그램에서 호중구 클러스터를 게이팅하였다. 최종적으로, 형광 히스토그램을 분석하여 산화성 과열에 대한 야생형 및 돌연변이체 CD200-Fc 단백질의 효과를 정량화하였다.

[0109] **데이터 분석**

[0110] 산화성 과열의 CD200-Fc 매개된 억제제는 하기 식을 사용하여 측정하였다:

[0111] 퍼센트 억제 =  $100 - (100 \times (\text{평균 시험 화합물 계수치} - \text{평균 음성 대조군 계수치}) / (\text{평균 양성 대조군 계수치} - \text{평균 음성 대조군 계수치}))$ .

[0112] 상기 식에서의 계수치는 게이팅된 세포 집단으로부터의 평균 형광 강도 값으로부터 유래된다. 모든 칼럼을 비교하는 본페로니 사후 시험을 사용하여 일원 ANOVA에 의해 상기 데이터를 대상으로 통계적 유의성을 분석하였다.

[0113] **결과**

[0114] 표 3에는 야생형 CD200-Fc, K130Y 및 양성 및 음성 대조군에 대한 상기 게이팅된 세포 집단으로부터의 평균 형광 강도 값이 상세히 열거된다. 도 6은 산화성 과열 검정에서 야생형 CD200-Fc의 효과와 K130Y의 효과를 비교한다.

[0115] K130Y 돌연변이체 CD200-Fc가 산화성 과열 검정에서 야생형 CD200-Fc보다 더 강력하고 더 낮은 용량 하에서 PMA 자극된 산화성 과열을 억제한다는 것이 표 6으로부터 용이하게 관찰될 수 있다. 더욱이, 이러한 기능적 활성상의 증가는 K130Y 돌연변이에 기인될 수 있으며, 이는 두 단백질이 K130Y 돌연변이를 제외하고는 동일하기 때문이다. 호중구는 염증이 생긴 조직 (예를 들어, 류마티스 관절 및 활액)에서 다수 발견되며, 더욱이 프로테아제 및 독성 산소 대사 물질의 분비를 통해 조직, 골 및 연골에 대한 손상을 직접적으로 입힐 수 있는 큰 잠재력을 갖는 것으로 인식될 뿐만 아니라 항원 제시 및 시토카인, 케모카인, 프로스타글란딘 및 류코트리엔의 분비를 통해 염증을 구동시키는 것으로 인식된다 (Wright, H. L., et al., (2010) *Rheumatology* 49, 1618-1631). 따라서, 호중구 활성화를 억제하는 작용제는 그의 병리상태가 이상 호중구 활성화에 의해 전적으로 또는 부분적으로 매개되는 염증성 및 자가면역 질환에 대한 유용한 치료제로서 기능할 것으로 예상될 수 있다.

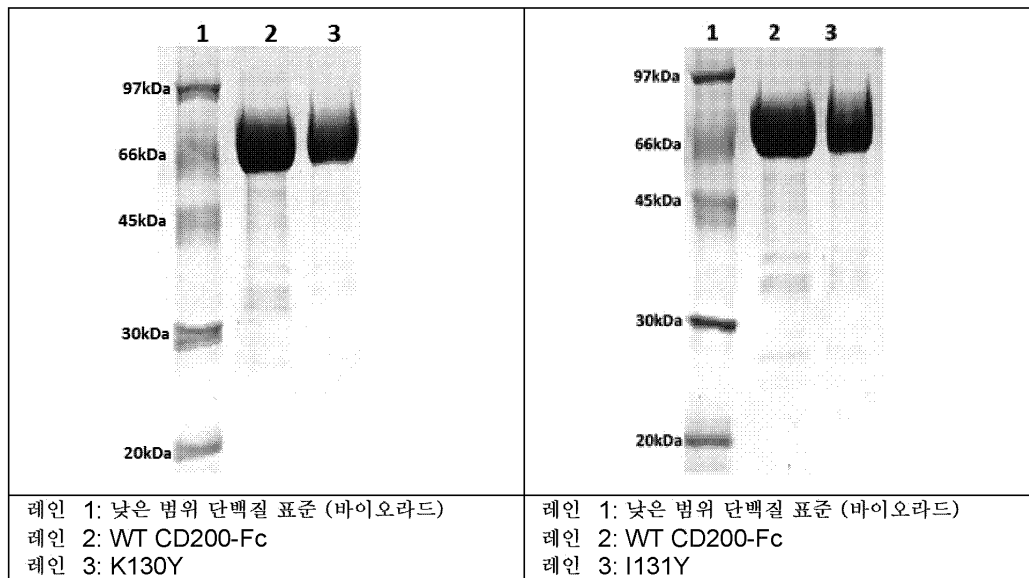
[0116] **표 3:** 야생형 CD200-Fc, K130Y 및 양성 및 음성 대조군에 대한 상기 게이팅된 세포 집단으로부터의 평균 형광 강도 값. 이중 실험으로부터의 SD 값이 괄호안에 있다.

	WT-CD200-Fc	K130Y
10ug/ML	248.5 (126)	126 (2.8)
1ug/ML	1033.5 (19.1)	133.5 (4.9)
0.1ug/mL	1304.5 (38.9)	287.5 (2.1)
0.01ug/ML	1407 (50.9)	568.5 (17.7)
0.001ug/ML	1437 (48.1)	1229.5 (129.4)
비자극됨 (음성 대조군)	68.5 (6.4)	
PMA 자극 (양성 대조군)	1480.5 (16.3)	

[0117]

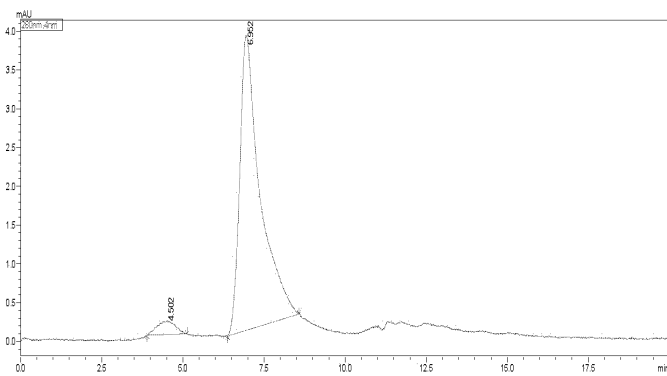
## 도면

### 도면1

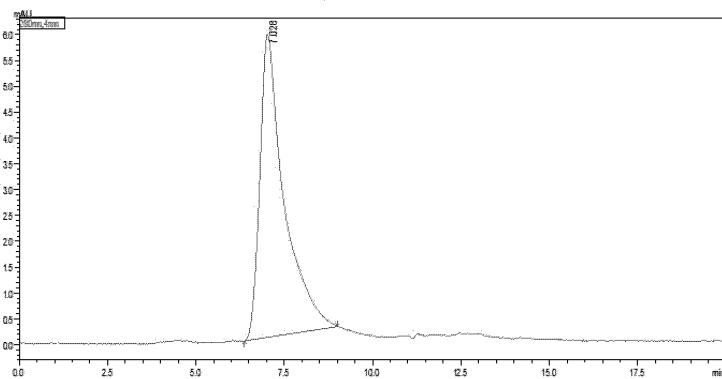


### 도면2

**A:** K130Y의 크기 배제 크로마토그래프



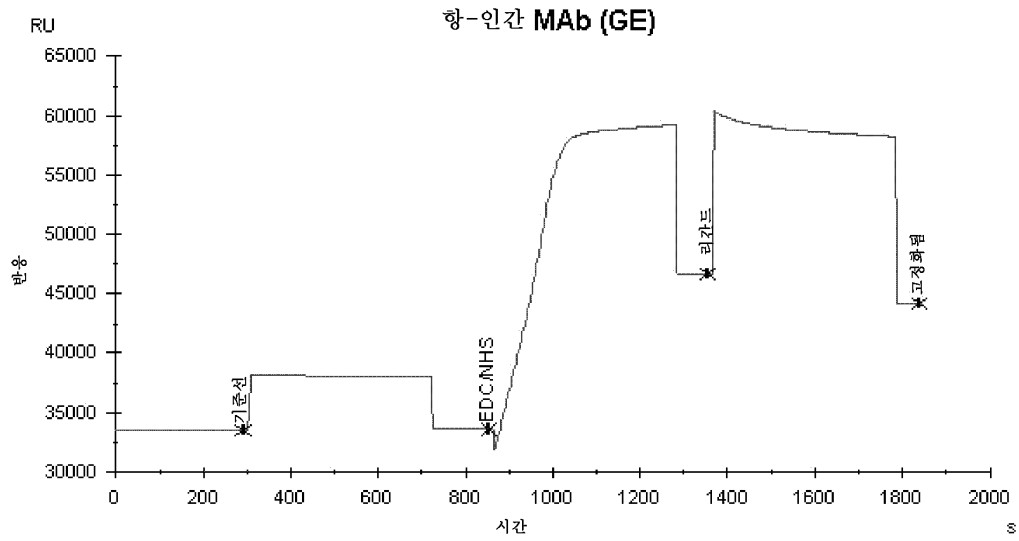
**B:** I131Y의 크기 배제 크로마토그래프





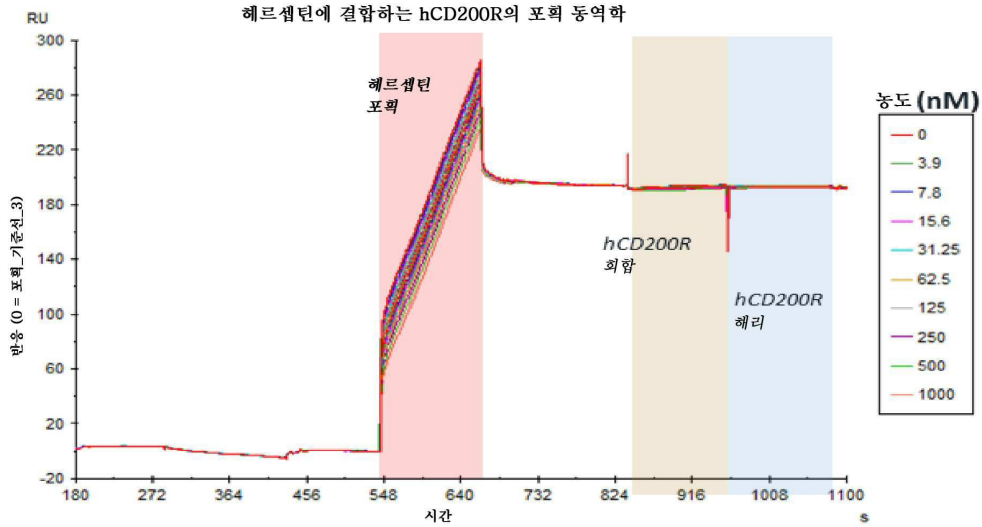
도면3

센서 칩 표면 상에서의 항-인간 Fc 항체의 고정화



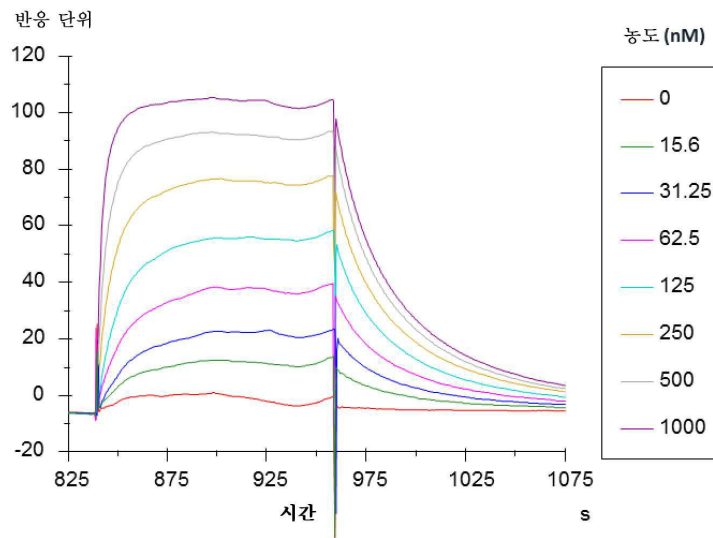
도면4

헤르셉틴에 결합하는 hCD200R의 포획 동역학

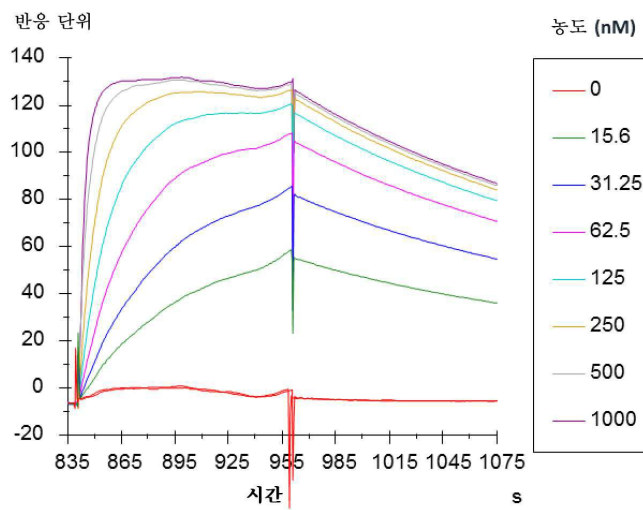


도면5

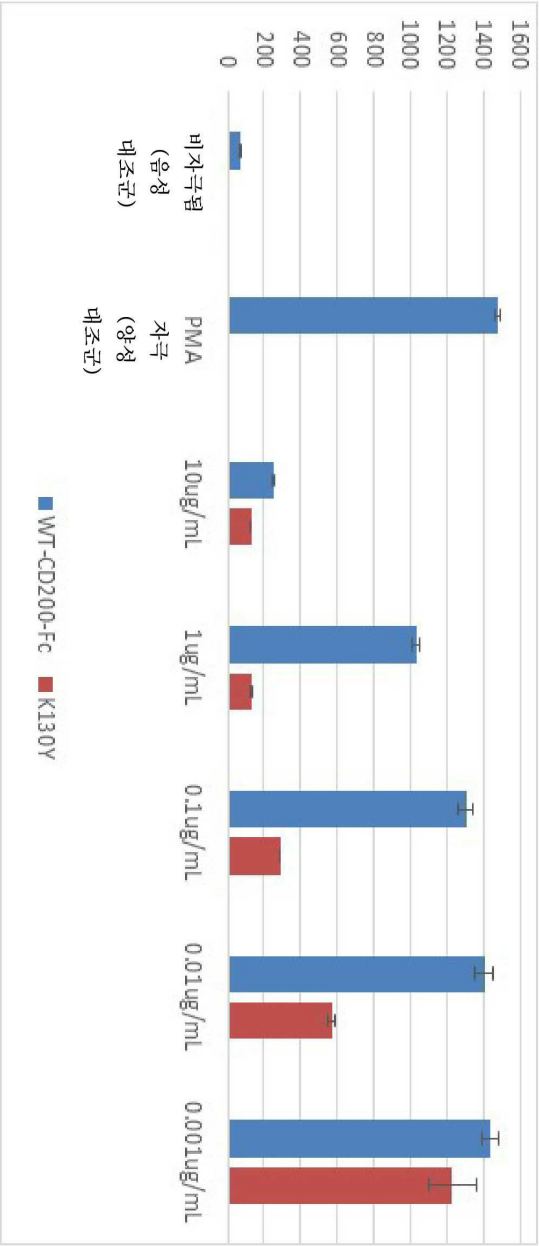
**A:** 포획된 WT CD200에 결합하는 CD200R의 회합 및 해리 상을 제시하는 센서그램



**B:** 포획된 K130Y와 결합하는 CD200R의 회합 및 해리 상을 제시하는 센서그램



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Ducentis Biotherapeutics Ltd.
- <120> NOVEL PROTEINS
- <130> DUC-C-P2019PCT
- <160> 13
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 278

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50 55 60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65 70 75 80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Ile Leu Leu Val Leu Ile Ser Ile Leu

245 250 255

Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu Ser Gln

260 265 270

Gly Val Gln Lys Met Thr

275

<210> 2

<211> 201

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 2

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro

1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val

20 25 30

Thr Trp Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe

35 40 45

Ser Glu Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile

50 55 60

Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn

65 70 75 80

Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe

85 90 95

Gly Phe Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln

100 105 110

Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile

115 120 125

Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val

130 135 140

Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn  
                          165                      170                      175  
 Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val  
                          180                      185                      190  
 Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys  
                          195                      200

<210> 3

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 3

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro  
 1                      5                      10                      15  
 Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val  
                          20                      25                      30  
 Thr Trp Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe  
                          35                      40                      45  
 Ser Glu Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile  
  
                          50                      55                      60  
 Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe  
                          85                      90                      95  
 Gly Phe Gly Tyr Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln  
                          100                      105                      110  
 Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile  
  
                          115                      120                      125  
 Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val  
                          130                      135                      140



Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn  
145                      150                      155                      160  
Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn  
                         165                      170                      175  
Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val  
  
                         180                      185                      190  
Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys  
                         195                      200  
<210> 4  
<211> 201  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> Artificial  
<400> 4  
Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro  
1                      5                      10                      15  
Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val  
                         20                      25                      30  
Thr Trp Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe  
  
                         35                      40                      45  
Ser Glu Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile  
                         50                      55                      60  
Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn  
65                      70                      75                      80  
Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe  
                         85                      90                      95  
Gly Phe Gly Lys Tyr Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln  
  
                         100                      105                      110  
Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile  
                         115                      120                      125  
Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val  
                         130                      135                      140

Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn

                    165                      170                      175  
 Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val  
                     180                      185                      190  
 Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys  
                     195                      200

<210> 5

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 5

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

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

                    85                      90                      95  
 Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr  
                     100                      105                      110  
 Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe  
                     115                      120                      125  
 Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile  
                     130                      135                      140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

370 375 380

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

385                      390                      395                      400  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

                    405                      410                      415  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

                    420                      425                      430  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

                    435                      440                      445  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

                    450                      455                      460  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465                      470

<210> 6

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 6

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1                      5                      10                      15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20                      25                      30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35                      40                      45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50                      55                      60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65                      70                      75                      80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85                      90                      95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100                      105                      110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

Gly Tyr Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

370 375 380  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
385 390 395 400  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
405 410 415  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
420 425 430  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
450 455 460  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 7

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 7

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr  
1 5 10 15  
Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30  
Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser  
35 40 45  
Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp  
50 55 60  
Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu  
65 70 75 80



Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

Gly Lys Tyr Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

325 330 335  
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350  
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

370 375 380  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

385 390 395 400  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

405 410 415  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

420 425 430  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 8

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 8

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50

55

60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65

70

75

80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85

90

95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100

105

110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115

120

125

Ile Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130

135

140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145

150

155

160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165

170

175

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

180

185

190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195

200

205

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

210

215

220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225

230

235

240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245

250

255

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

260

265

270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275

280

285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300  
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320  
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

325 330 335  
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350  
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

370 375 380  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

385 390 395 400  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

405 410 415  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

420 425 430  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 9

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 9

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50 55 60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65 70 75 80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Arg

115 120 125

Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245 250 255

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

260 265 270  
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285  
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300  
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350  
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
385 390 395 400  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

405 410 415  
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

420 425 430  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 10

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial



<220><223> Artificial

<400> 10

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50 55 60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65 70 75 80

Lys His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145 150 155 160

Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val

195 200 205

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

210 215 220

Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

405 410 415

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

420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 12

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Artificial

<400> 12

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val

20 25 30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser

35 40 45

Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp

50 55 60

Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65 70 75 80

Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile

85 90 95

Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr

100 105 110

Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe

115 120 125

Gly Tyr Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile

130 135 140

Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys

145                      150                      155                      160  
 Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg  
                                  165                      170                      175  
 Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn Gly Thr  
                                  180                      185                      190

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

Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu Ser Gln  
                                  260                      265                      270  
 Gly Val Gln Lys Met Thr  
                                  275

<210> 13  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Artificial  
 <400> 13

Met Glu Arg Leu Val Ile Arg Met Pro Phe Ser His Leu Ser Thr Tyr  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Val Trp Val Met Ala Ala Val Val Leu Cys Thr Ala Gln Val  
                                  20                      25                      30

Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro Ala Ser  
                                  35                      40                      45  
 Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val Thr Trp  
                                  50                      55                      60  
 Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe Ser Glu

65	70	75	80
Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile Asn Ile			
	85	90	95
Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn Ile Thr			
	100	105	110
Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe Gly Phe			
	115	120	125
Gly Lys Tyr Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln Pro Ile			
	130	135	140
Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile Thr Cys			
145	150	155	160
Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val Pro Arg			
	165	170	175
Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn Gly Thr			
	180	185	190
Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn Gln Val			
	195	200	205
Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val Thr Asp			
	210	215	220
Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly Tyr Trp Phe Ser Val Pro Leu Leu			
225	230	235	240
Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Ile Leu Leu Val Leu Ile Ser Ile Leu			
	245	250	255
Leu Tyr Trp Lys Arg His Arg Asn Gln Asp Arg Gly Glu Leu Ser Gln			
	260	265	270
Gly Val Gln Lys Met Thr			
275			