

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/395

(11) 공개번호 10-2005-0082389
(43) 공개일자 2005년08월23일

(21) 출원번호 10-2004-0010835
(22) 출원일자 2004년02월18일

(71) 출원인 메덱스젠 주식회사
서울특별시 성동구 행당1동 한양대학교 의과대학 A관 2층

(72) 발명자 정용훈
서울특별시송파구송파동삼익아파트212동1201호
조훈식
서울특별시도봉구창1동주공4단지410-604
박홍규
서울특별시양천구목2동522-7호16/4
홍성희
서울특별시중구장충동2가193-479골든빌303호
이기완
서울특별시송파구가락1동가락아파트56동501호

(74) 대리인 이세진
김성남

심사청구 : 없음

(54) 직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체를 포함하는 장기이식합병증 치료용 약제학적 조성물

요약

본 발명은 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로블린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 또는 부가적으로 당화된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 10

색인어

장기이식 합병증

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 직렬 연쇄 융합된 단량체 단백질 CD2-CD2/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCD22Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 CTLA4-CTLA4/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pCT44Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pLAG33Ig의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 TNFR2-TNFR1/Fc를 발현하는 재조합 발현 플라스미드 pTR21Ig-Top'의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 5a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질([CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질(1:[TNFR1/Fc]₂, 2:[TNFR2/Fc]₂) 및 연쇄 융합된 이량체 단백질(3:[TNFR2-TNFR1/Fc]₂, 4:[TNFR2-TNFR2/Fc]₂)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질([CD2/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂)을 투여함으로써 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물([CTLA4/Fc]₂ + [LAG3/Fc]₂, [CD2/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂)을 투여함으로써 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 비교한 그래프이다.

도 8a는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [CTLA4/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 투여한 경우 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 비교한 그래프이다.

도 8b는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 투여한 경우 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 비교한 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 단순 융합된 이량체 단백질 [TNFR2/Fc]₂ 또는 연쇄 융합된 이량체 단백질 ([TNFR2-TNFR1/Fc]₂ 또는 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂)을 투여한 경우 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 비교한 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질 ([CD2-CD2/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂) 또는 이들의 혼합물 ([CD2-CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂)을 투여함으로써 이식편대 숙주질환에 대한 생존율이 증가하는 정도를 비교한 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체를 포함하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 이량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

조직 또는 장기의 이식에는 (1) 자가이식(autotransplantation) - 한 개체의 일부를 동일한 개체의 다른 부분에 이식; (2) 동계이식(isotransplantation) - 동일한 균일계 동물간에 행해지는 이식으로, 예를 들면, 일란성 쌍생아간에 행해지는

이식; (3) 동종이식(allotransplantation) - 유전적 조성이 다른 두 개체간에 행해지는 이식으로, 예를 들면, 이란성 쌍생아 간의 이식 또는 혈연관계가 전혀 없는 개체간의 이식 및 (4) 이종이식(xenotransplantation) - 서로 다른 동물 종 개체간의 이식으로, 예를 들면, 침팬지 또는 돼지의 조직 또는 장기를 인간에게 이식하는 것 등이 있다.

조직 또는 장기 이식에 의한 질환 치료에 있어서, 가장 큰 문제점은 수령자(recipient)가 공여자(donor)로부터 조직 또는 장기를 이식받은 후에 심각한 장기이식 합병증을 보인다는 것이다. 장기이식 합병증이란, 이식편(이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기)의 공여자와 수령자간의 유전적 배경이 상이함에 따라(즉, 동종이식 또는 이종이식), 서로를 이물질로 인식하여 배제하려는 면역반응을 의미한다. 이러한 장기이식 합병증은 T 세포로 대표되는 면역담당 세포에 의한 세포성 면역과 항체에 의한 체액성 면역이 복잡하게 제후된 형태로 일어나지만, 주로 T 세포에 의한 세포성 면역이다.

따라서 장기이식 합병증을 치료하기 위하여 하나의 방법으로 T 세포의 활성을 억제하는 하기 화합물들이 사용되고 있다. 예를 들면, 사이클로스포린(cyclosporin; CsA), 타크롤리무스(tacrolimus; FK-506), 아자티오프린(azathioprine; AZ), 미코페놀산 모페틸(mycophenolate mofetil; MMF), 미조리빈(mizoribine; MZ), 레플루노마이드(leflunomide; LEF), 프레도니솔론(prednisolon) 또는 메틸프레도니솔론(methylprednisolon) 등의 부신피질 스테로이드, 시롤리무스(sirolimus), 데옥시퍼구알린(deoxypergualin; DGS) 및 FTY720(화학명칭 : 2-아미노-2-[2-(4-옥틸페닐)에틸]-1,3-프로판디올 히드로클로라이드) 등이다.

장기이식 합병증을 치료하기 위하여 다른 방법으로 T 세포의 활성을 억제하는 CTLA4의 가용성 영역과 면역글로불린의 Fc 조각이 결합된 융합 단백질(미국특허 제5,844,095호)이 임상 이용되고 있다. 일반적으로 T 세포의 활성화에는 항원 제공 세포(Antigen Presenting Cell, APC)에 의해 제공되는 두 가지 신호가 필요하다. 첫 번째는 APC의 MHC에 의해 항원이 제공되는 것으로, T 세포 수용체/CD3 복합체가 인식하는 신호이고, 이러한 신호에 의해 MHC/항원 복합체를 인식하는 특정한 T 세포의 활성화(activation)가 유도된다. 두 번째는 동시 자극 시그널(costimulation signal)이라고도 알려져 있으며, T 세포의 분화(proliferation)를 유도한다. 이 신호는 APC의 B7에 의해 매개되며 T 세포는 B7을 인식하는 두 가지의 리간드가 있다. 첫 번째는 CD28이라고 하며, 이는 T 세포막에 항상 발현된다. CD28이 B7과 결합하면 IL-2의 분비와 T 세포의 분화를 유도한다. 두 번째 리간드는 CTLA4라고 하며, 이는 CD28과 상동성(homology)을 가지고 있으며 T 세포가 활성화된 이후에 발현이 된다. CTLA4는 B7에 대한 결합력이 CD28의 20배 정도 강력하며 이는 T 세포의 활성을 중지시킨다. 따라서 CTLA4 단백질은 B7/CD28의 신호를 차단하는 효과적인 물질로 사용될 수 있다.

한편, 이와 같이 면역반응을 억제함에 있어서 유효작용부위인 CTLA4의 세포외역 부위를 다가화 혹은 다량체화하면 그 효능의 증가를 예상할 수 있는데, 이러한 목적으로 CTLA4의 세포외역 부위를 면역글로불린의 중쇄와 연결한 융합된 단량체 단백질(중쇄융합단백질)과 CTLA4의 세포외역 부위를 면역글로불린의 경쇄와 연결한 융합된 단량체 단백질(경쇄융합단백질)을 동시에 한 세포주내에서 발현시키면 중쇄와 경쇄간의 결합에 의하여 이량체 구조의 융합 단백질을 제조할 수 있다. 이때 이량체는 유효부위가 생체내에서와 동일하게 병렬 배열된 형태로 제조되고 그 효능은 중쇄의 단량체에 비하여 현저히 증가됨이 제시된 바 있다.

그러나 상기와 같은 면역글로불린 융합 단백질의 제조방법은 융합 단백질을 제조할 때에 중쇄와 경쇄 각각에 융합시킨 두 개의 유전자를 동시에 생산 세포주에 주입해야하고, 세포가 두 종류의 융합 단백질을 생산할 때 두 단백질의 생산수율이 현저히 떨어지며, 생산된 중쇄융합단백질과 경쇄융합단백질들이 100% 결합되지 않아 단량체인 중쇄융합단백질 또는 경쇄융합단백질로부터 중쇄융합단백질과 경쇄융합단백질의 융합된 이량체를 순수 분리하는 공정 등의 기술적 곤란으로 인하여 실용화되기 어려운 문제점이 있다. 이러한 이유 등으로 지금까지는 면역글로불린 융합 단백질 제제는 두 개의 융합단백질이 단순히 서로 병렬 배열된 이량체 형태로 제조 사용되고 있었다.

본 발명자들은 상기와 같은 병렬 형태의 면역접합체가 가진 문제점들을 해결한 직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체를 대한민국 특허출원 제10-2001-0045028호 및 제10-2002-0045921호에 개시하였다. 이에, 본 발명자들은 장기이식 합병증을 앓고 있는 개체에게 상기 특허문헌에 개시된 직렬 연쇄체(concatamer)를 갖는 면역접합체를 투여한 결과, 상기 개체의 생존율이 증가됨을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명은 한 관점으로서 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물을 제공하고자 한다.

다른 관점에서 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본원 명세서에 사용된 용어 "장기이식 합병증(Transplantation Rejection)"이란, 이식편(이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기)의 공여자와 수령자간의 유전적 배경이 상이하어 (1) 공여자의 이식편 유래 면역 세포가 수령자를 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편대 숙주질환) 및 (2) 수령자가 공여자의 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편 거부반응)을 의미한다. 본 발명에 따른 억제학적 조성물들은 이들을 모두 치료 대상으로 한다.

특히, 이종 이식 또는 인공 장기 이식의 경우, 수령자와 공여자 간의 유전적 배경이 매우 상이하기 때문에 장기이식 합병증이 두드러지게 나타난다. 일례로, 돼지의 이종 이식편을 인간에게 이식하는 경우에는 초급성 거부반응이 일어나 이식편은 수분 내로 괴사 탈락하게 된다. 본 발명에서는 상기 이종 이식 뿐만 아니라 인공 장기 이식에 의한 합병증들을 또한 치료 대상으로 한다.

"이식편대 숙주질환(Graft-Versus-Host-Disease; GVHD)"은 특히, 골수이식에 의해 발병하는데, 공여자의 이식편에서 유래된 T 세포가 수령자의 조직 또는 기관을 이물질로 인식하여 공격함으로써 나타나는 질환으로, 급성 또는 만성으로 나눌 수 있다. 급성 GVHD는 일반적으로 이식 후 7~100일에 발생하는데, 조직적합성 항원이 불일치하거나 환자의 나이가 많은 경우에 더욱 심각해진다. 이 때에는 이식편의 T 세포가 수령자의 피부(예: 발진, 통증, 가려움, 수포현상), 간(예: 황달, 간기능 이상), 위장관(예: 설사, 출혈) 등에 영향을 미친다. 만성 GVHD는 장기 생존자 중 17~42%에게서 발생하며, 증상이 자가면역질환과 유사하다. 상기 급성 GVHD와 마찬가지로 피부, 위장관, 간에 각종 합병증이 나타나고 폐와 눈에도 합병증이 유발되며, 심각한 경우에 결막건조증상, 면역기능 파괴로 인한 치명적 감염증이 유발되기도 한다.

"이식편 거부반응(Graft Rejection)"은 수령자가 이식편을 이물질로 인식함으로써 수령자의 면역계가 그 이식편을 공격함으로써 유발되는 질환으로, 시기별로 (1) 이식 직후에 일어나는 강한 거부반응인 초급성 거부반응, (2) 이식 후 수개월 이내에 보이는 급성 거부반응 및 (3) 이식 후 수개월 이후에 보이는 만성 거부반응으로 나눌 수 있다. 통상적으로 조직 또는 장기 이식받은 수령자는 발열, 백혈구 수 증대, 권태감 등의 전신증상 뿐만 아니라, 이식편 부근에서 종창 또는 압통을 보인다. 최종적으로 이식편은 괴사 탈락하게 된다.

앞서 주지된 바와 같이 이러한 장기이식 합병증(이식편 숙주질환 및 이식편 거부반응)들은 모두 면역세포의 활성화 및 밀접한 관계가 있기 때문에 본 발명자들에 의해 개발된 면역세포의 증식을 억제하는 직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체(대한민국 특허출원 제10-2001-0045028호 및 제10-2002-0045921호)를 이용하여 치료할 수 있다. 즉, 상기 직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체는 면역세포의 활성을 억제함으로써 면역반응 그 자체의 억제 뿐만 아니라 부수적으로 발생하는 각종 질환을 완화, 경감 또는 완치할 수 있다.

따라서 본 발명은 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

추가로, 본 발명자들은 본 발명에 따른 억제학적 조성물이 상이한 둘 이상의 이량체 단백질을 포함하는 경우, 장기이식 합병증의 치료 효과가 더욱 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 억제학적 조성물의 보다 바람직한 양태는 (1) 제 1 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (2) 제 2 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하되, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질과 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질이 상이한 것임을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물일 것이다.

한편, 당업계에 공지된 바와 같이 부가적으로 당화된 단백질은 물리적 성질은 물론 생체 내에서의 안정성 및 기능도 개선된다. 따라서 본 발명에 따른 억제학적 조성물이 당화된 면역접합체를 포함하게 되면 장기이식 합병증에 대한 치료 효과는 더욱 증가할 것이다.

이에, 본 발명은 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

아울러, 본 발명자들은 본 발명에 따른 억제학적 조성물이 상이한 둘 이상의 당화된 이량체 단백질을 포함하는 경우, 장기이식 합병증의 치료 효과가 더욱 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 억제학적 조성물의 보다 바람직한 양태는 (1) 제 1 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (2) 제 2 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하되, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질과 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질이 상이한 것임을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물일 것이다.

직렬 연쇄 융합된 면역접합체에 대한 용어 정의

본원 명세서에 사용된 용어 "면역반응에 관여하는 단백질"은 세포성 및 체액성 면역반응에서 세포간 신호 전달 과정을 담당하여 면역반응을 활성화 또는 억제시키는 단백질을 총칭한다. 면역이란 세균 또는 바이러스 등의 자신이 아닌 것으로부터 자신을 보호하는 과정이다. 면역반응은 세포성 및 체액성 면역반응으로 나눌 수 있으며, T 세포와 B 세포 등의 림프구가 가장 중요한 역할을 한다. T 세포는 주로 세포성 면역반응을 주관하며 바이러스에 감염된 세포 또는 암세포 등을 직접적으로 공격하여 죽이기도 하고 면역 또는 염증 반응을 활성화시키는 사이토카인이라는 물질을 분비하여 다른 면역세포의 작용을 돕기도 한다. B 세포는 세균과 바이러스 등의 자신이 아닌 외부의 물질(항원)이 체내에 들어올 경우 항체를 만들어 이를 몰아내도록 하여 이를 체액성 면역반응이라 한다. 세포성 면역과 체액성 면역 모두에서는 세포간의 신호 전달이 매우 필수적인 과정이며 이 과정에서 세포내 신호전달을 담당하는 세포표면 수용체 단백질과 이 수용체에 결합하는 신호물질인 리간드 단백질이 작용한다.

본 발명에 따른 면역반응에 관여하는 단백질의 대표적인 예로는 사이토카인, 사이토카인 수용체, 세포표면 수용체 및 세포표면 수용체를 인식하는 단백질 등이 포함된다. 이와 같은 단백질의 구체적인 예로는 이에 제한되는 것은 아니지만, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF, G-CSF, M-CSF, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-7R, IL-12R, IL-18R, G-CSFR, M-CSFR, Fas(Apo 1), CD4, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD54, CD70, CD80, CD86, CD95, CD100, CD119, CD130, CD137, CD154, CD166, ICOS, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PD-1, OX40, 4-1BB, B7H 등이 포함된다. 전술한 단백질 각각의 생체내 역할은 당업계에서 알려져 있으며, 모두 장기이식 합병증을 유발하는 면역반응을 억제하는데 이용될 수 있다.

본원 명세서에 사용된 용어 "세포외역 가용성 부위(soluble extracellular domain)"는 인지질로 구성된 세포막을 관통하는 단백질(integral protein)에서 소수성 아미노산으로 구성되어 있어 세포막을 통과하는 부분(transmembrane domain)을 기준으로 세포외부로 노출되어 있는 부분을 가리킨다. 이 부위는 대부분 친수성 아미노산이 단백질 표면으로 향하는 구조(folding)를 하고 있어서 수용액상에서 가용성(soluble)을 나타낸다. 대부분의 세포표면 수용체 단백질에서 리간드와 결합하는 기능을 담당하는 것은 세포외역 부위이며 세포내역 부위(intracellular domain)는 세포내 신호전달 기능을 담당하고 있다.

본원 명세서에 사용된 용어 "면역글로불린"은 다양한 종류의 항원을 특이적으로 인식하도록 B 세포에 의해 생성되고 B 세포의 항원 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 가리킨다. 이 분자는 Y 모양으로 두 개의 동일한 경쇄와 두 개의 동일한 중쇄로 구성된다. 경쇄와 중쇄 모두는 가변 및 고정 영역을 포함한다. 4개의 쇠는 힌지 영역이라고 하는 중쇄의 플렉서블 영역(flexible region)에 위치한 디설파이드 결합에 의해 함께 고정되어 있다. 중쇄와 경쇄 모두의 가변 영역은 결합하여 두 개의 동일한 항원-결합 부위를 형성한다. 중쇄 고정 영역에 의해 면역글로불린A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) 및 M(IgM)인 다섯개 부류로 나누어진다. 각각의 부류는 이소타입이라고 하며 독특한 구조적 특징과 상이한 생물학적 특성을 갖고 있다. 예를 들면, IgG는 Fc 구조에서 다른 이소타입과 약간 상이하다. 또한, IgG 및 IgA는 많은 아부류가 있다. 예를 들면, 인간 IgG 이소타입내에 4가지의 아부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4가 있으며 각각은 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ 및 $\gamma 4$ 중쇄를 갖는다. 보체 활성화, 식세포-Fc 수용체에의 결합, 항원-의존 세포독성과 같은 면역글로불린 분자의 기능은 중쇄의 Fc 영역에 존재하는 구조적 결정소에 의해 매개된다. 이러한 중쇄의 Fc 영역은 본 발명에 따른 이량체 단백질의 구성 요소로서 사용되며 상기 모든 부류 또는 아부류의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다.

본원 명세서에 사용된 용어 "면역글로불린 Fc 조각"은 면역글로불린분자는 기능적으로 구분되는 조각들로 나누어지는 데 이 가운데 항원 결합력은 없으나 쉽게 결정체를 형성하는 조각으로서 힌지 부위(hinge region), CH2와 CH3 도메인이 결합하여 이루어지고 항체에서 효과물질 및 세포들과의 결합에 관여하는 부분을 가리킨다. 따라서 본 발명과 관련하여 언급되는 Fc 조각은 일부 문헌에 기술된 바와는 다를 수 있으나 힌지 영역을 포함하며 이것은 단순히 본 발명을 설명하는데 있어 편리를 도모하기 위한 것으로 당업자는 본원 명세서 및 도면을 참고로 하여 충분히 이해할 것이다.

본원 명세서에 사용된 용어 "연쇄체 단백질"은 직렬 연쇄 융합된 단백질(즉, 두 개의 생물학적 활성 단백질의 가용성 부위가 연결되어 하나의 긴 폴리펩타이드를 형성하고 있는 형태)을 가리킨다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 조각의 힌지 부위에 결합된 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 C-말단(C-terminal)에 또 다른 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단(N-terminal)이 펩타이드 결합되어 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위 두 개가 하나의 긴 폴리펩타이드를 형성하고 있는 형태를 가리킨다.

본원 명세서에 사용된 용어 "단순 융합된 단량체 단백질"은 면역글로불린 Fc 조각의 힌지 부위에 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위가 결합하여 하나의 폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 융합 단백질을 가리킨다. 단순 융합된 단량체 단백질은 편의상 "단백질 명칭/Fc"로 표기할 수 있다. 예를 들면 면역반응에 관여하는 단백질인 LAG3의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 조각이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질은 LAG3/Fc로 표기된다. 또한, 면역글로불린 Fc 조각의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 조각이 IgG1으로부터 유래된 경우에는 LAG3/IgG1Fc로 표기된다.

본원 명세서에 사용된 용어 "단순 융합된 이량체 단백질"은 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 융합된 이량체 구조의 융합 단백질을 가리킨다. 단순 융합된 이량체 단백질은 편의상 "[단백질 명칭/Fc]₂"로 표기할 수 있다. 예를 들면 면역반응에 관여하는 단백질인 LAG3의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 조각이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 융합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3/Fc]₂로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 조각의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 조각이 IgG1으로부터 유래된 경우에는 [LAG3/IgG1Fc]₂로 표기된다.

본원 명세서에 사용된 용어 "연쇄 융합된 단량체 단백질"은 단순 융합된 단량체 단백질에서 힌지 부위에 결합된 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 N-말단에 또 다른 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 C-말단이 직렬의 연쇄체 형태로 결합하여 하나의 폴리펩타이드로 형성된 단량체 구조의 융합 단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 단량체 단백질은 편의상 "단백질 명칭-단백질 명칭/Fc"로 표기할 수 있다. 예를 들면 면역반응에 관여하는 단백질인 LAG3의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 조각이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질인 LAG3의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질은 LAG3-LAG3/Fc로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 조각의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 조각이 IgG1으로부터 유래된 경우에는 LAG3-LAG3/IgG1Fc로 표기된다.

본원 명세서에 사용된 용어 "연쇄 융합된 이량체 단백질"은 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 융합된 이량체 구조의 융합 단백질을 가리킨다. 연쇄 융합된 이량체 단백질은 편의상 "[단백질 명칭-단백질 명칭/Fc]₂"로 표기할 수 있다. 예를 들면 면역반응에 관여하는 단백질인 LAG3의 세포외역 가용성 부위와 면역글로불린 Fc 조각이 결합된 단순 융합된 단량체 단백질의 LAG3의 세포외역 가용성 부위에 또 다른 LAG3의 세포외역 가용성 부위가 결합된 연쇄 융합된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부위에서 디설파이드 결합에 의해 융합된 이량체 구조의 융합 단백질은 [LAG3-LAG3/Fc]₂로 표기된다. 마찬가지로, 면역글로불린 Fc 조각의 유래를 표기할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 조각이 IgG1으로부터 유래된 경우에는 [LAG3-LAG3/IgG1Fc]₂로 표기된다.

앞서 주지된 바와 같이 연쇄체 단백질, 연쇄 융합된 단량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 모두 면역글로불린 Fc의 힌지에 세포외역 가용성 부위 두 개가 직렬 연결되어 형성된 것이다. 본 발명에 있어, 상기 세포외역 가용성 부위 두 개는 그들이 특이적으로 결합하는 단백질(target)이 동일한 것을 특징으로 하므로, 상기 두 개의 세포외역 가용성 부위의 아미노산 서열은 동일할 수도 있고 다를 수도 있다. 동일한 예에는 CTLA4-CTLA4/Fc, CD2-CD2/Fc, LAG3-LAG3/Fc, TNFR2-TNFR2/Fc 등이 있다. 상이한 예로는 TNFR2-TNFR1/Fc가 해당되는데, TNFR2와 TNFR1은 모두 TNF 단백질과 특이적으로 결합하는 단백질이지만, 이들의 세포외역 가용성 부위의 아미노산 서열은 상이하다.

본원 명세서에 사용된 "벡터"라는 용어는 외래 유전자를 숙주 세포 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체로서의 DNA 분자를 말한다. 유용한 벡터가 되기 위해서는 복제될 수 있어야 하며, 숙주 세포 내로 유입할 수 있는 방안을 갖추어야 하고, 자신의 존재를 검출할 수 있는 수단을 구비해야 한다. 여기서, 외래 유전자로는 예를 들면 연쇄 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물이 그에 해당한다.

본원 명세서에 사용된 "재조합 발현 플라스미드"라는 용어는 일반적으로 외래 유전자가 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 벡터에 작동적으로 연결되어 형성된 환상의 DNA 분자를 말한다. 재조합 발현 플라스미드는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이중 DNA가 생성될 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주 세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동적으로 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

본원 명세서에 사용된 "조절 서열 (expression control sequence)"이라는 용어는 본 발명의 폴리펩타이드 발현에 필수적인 혹은 이로온 핵산 서열들을 말한다. 각각의 조절 서열은 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열에 천연적(native) 혹은 외래적(foreign)일 수 있다. 그러한 조절 서열에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로펩타이드(propeptide) 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer) 혹은 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그널 펩타이드 서열 및 전사 종결인자 등을 포함한다. 최소한 조절 서열은 프로모터를 포함한다.

본원 명세서에 사용된 "작동적으로 연결된(operably linked)"이라는 용어는 벡터의 각 구성 성분들이 고유한 작용을 할 수 있도록 형성된 성분들의 배열을 의미한다. 따라서, 코딩 서열에 작동적으로 연결된 조절 서열(control sequence)은 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 지시하도록 작용하는 한 조절 서열이 코딩 서열과 인접해 있을 필요는 없다. 예를 들면, 개재 서열(intervening sequence)이 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 존재할 수 있는데, 이 경우 프로모터 서열은 코딩 서열에 "작동적으로 연결"되었다고 할 수 있다.

본원 명세서에 사용되는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 또한, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO) 및 생쥐 세포같은 동물 세포, COS 1, COS 7, 사람 태아신장 293 세포(human embryonic kidney cells), BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포 및 조직배양된 인간 세포는 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다. 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 클로닝할 때에는 동물세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다. COS 세포를 이용하는 경우에는 COS 세포에서 SV40 라지 T 안티겐(large T antigen)이 발현하고 있으므로 SV40의 복제개시점을 갖는 플라스미드는 세포중에서 다수 카피(copy)의 에피솜(episome)으로 존재하도록 되고 통상보다 고 발현을 기대할 수 있다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종으로부터 얻을 수 있거나, 숙주 세포와 다른 종의 것일 수 있거나, 또는 그것은 어떠한 이중 또는 상동성 DNA를 포함하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.

본 발명에 따른 직렬 연쇄체 형태의 융합 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 이.콜라이에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λgt10과 λgt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현벡터는 2μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 이들 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절 서열에는 상술한 발현 벡터의 구조 유전자와 연관된 발현 조절 서열을 포함한다. 유용한 발현 조절서열의 예에는 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 Φ10은 이. 콜라이에서 폴리펩타이드를 발현시키는데 특히 유용하다.

본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는 여부와 관계없이 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

전술한 형질전환 및 형질감염은 Davis et al. Basic Methods in Molecular Biology(1986) 및 Sambrook et al. Basic Methods in Molecular Biology(1989)와 같은 기본적인 실험 지침서에 기술된 방법에 의해서 실시될 수 있다. 본 발명에 따른 DNA 작제물을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 도입하는데 바람직한 방법은 예를 들어서, 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium phosphate transfection), DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 이환(transvection), 미세주입(microinjection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 스크래프 로딩(scrape loading), 총알식 도입(ballistic introduction) 혹은 감염(infection) 등을 포함한다.

한편, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 주성분인 연쇄 융합된 이량체 단백질 또는 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 대한민국 특허출원 제10-2001-0045028호 "연쇄체화에 의한 면역글로블린 융합 단백질의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 TNFR/Fc 융합 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 벡터 및 상기 벡터에 의한 형질전환체"(메텍스젠) 및 제10-2002-0045921호 "직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체"(메텍스젠)에 기술된 제조방법을 이용하여 수득할 수 있다. 이하에서 상기 제조방법을 간략하게 설명하면 다음과 같다.

본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질은 일반적으로 (a) 면역글로블린 Fc 조각을 코딩하는 유전자와 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자로부터 단순 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하고, (b) 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물과 또 다른 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자에 동일한 제한효소 인식서열을 중합효소 연쇄반응으로 삽입하며, (c) 상기 제한효소 인식서열과 일치하는 제한효소를 사용하여, 상기 단순 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물과 상기 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 유전자의 제한효소 인식서열 부위를 절단하고, (d) 양쪽 DNA 서열의 절단된 부분을 라이게이즈로 연결하여 연쇄 융합된 단량체 단백질을 코딩하는 DNA 작제물을 제조하며, (e) 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물을 벡터에 작동적으로 연결하여 재조합 발현 플라스미드를 작제하고, (f) 작제된 재조합 발현 플라스미드로 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키며, (g) 형성된 형질전환체 또는 형질감염체를 연쇄 융합된 단량체 단백질 코딩 DNA 작제물이 발현되도록 하기에 적절한 조건하에서 배양하여 배양물로부터 목적하는 연쇄 융합된 이량체 단백질을 분리 정제함으로써 제조할 수 있다.

본 발명에 따른 연쇄 융합된 이량체 단백질의 제조방법에 있어서, [LAG3-LAG3/Fc]₂의 경우에는 플라스미드 pLAG33-Top'(기탁번호: KCCM10556), [TNFR2-TNFR2/Fc]₂의 경우에는 pTR22-Top10'(기탁번호: KCCM 10291), [CD2-CD2/Fc]₂의 경우에는 플라스미드 pCD22Ig(기탁번호: KCCM 10402), [CTLA4-CTLA4/Fc]₂의 경우에는 pCT44Ig(기탁번호: KCCM 10400) 및 [TNFR2-TNFR1/Fc]₂의 경우에는 플라스미드 pTR21-Top10'(기탁번호: KCCM 10290)를 각각 이용하여 제조하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질은 부가적인 당쇄 결합 부위를 갖도록 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열상에, 상기된 O-형 또는 N-형 당쇄수식이 발생하도록 하나 이상의 뉴클레오타이드를 변이시킨 다음 그 DNA를 진핵 숙주 세포를 통해 발현하면서 자연적으로 당쇄수식이 일어나도록 함으로써 제조할 수 있다. 한 가지 양태로서, 본 발명에 따른 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질은 N-형 당쇄수식이 일어날 수 있는 Asn-X-Ser/Thr 서열이 부가 및/또는 증가하도록 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 서열을 변이시킴으로써 달성된다.

약제학적 조성물

본 발명에 따른 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 연쇄 융합된 이량체 단백질 또는 부가적으로 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질을 약제학적으로 허용되는 담체에 혼입시킨 형태로 제공하는 것이 바람직할 것이다.

또한, 본 발명에 따른 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 연쇄 융합된 이량체 단백질들의 혼합물 또는 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질들의 혼합물을 약제학적으로 허용되는 담체에 혼입시킨 형태로 제공하는 것이 바람직할 것이다. 이와 같은 약제학적 조성물은 예를 들면, [CD2-CD2/Fc]₂와 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 동시에 함유하는 약제학적 조성물 또는 [LAG3-LAG3/Fc]₂와 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 동시에 함유하는 약제학적 조성물이다.

본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체”라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서 본 발명의 약제학적 조성물은 국부, 경구, 비경구, 안내, 경피, 직장, 장관 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 본원에 사용된 용어 “비경구”는 피하, 비내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 심장내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구적 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspension)으로 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수 양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.

본 발명의 바람직한 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사용 용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 비휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

앞서 제조된 액상 조성물은 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해 살균제 또는 방사를 혼입시켜 대개 살균된다. 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형 조성물을 수득하여 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

본 발명의 연쇄 융합된 이량체 단백질 또는 당화된 연쇄 융합된 이량체 단백질을 함유한 약제학적 조성물은 실온에서의 안정성을 증가시키고, 값비싼 저온 저장의 필요성을 줄이며, 저장 수명(shelf-life)을 연장하기 위해 동결건조시킬 수 있다. 동결건조 공정은 동결, 일차 건조 및 이차 건조의 연속 단계로 이루어질 수 있다. 조성물을 동결시킨 후의 이차 건조 공정은 압력을 강하하고 수증기의 승화를 위해 가열하는 것이다. 이차 건조 단계는 건조물로부터 흡수된 잔여 수분을 증발시키는 것이다.

한 양태로서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 동결건조 방법은 다음의 순서와 같다: (1) 동결건조 현미경 분석법을 사용하여 제제의 붕괴 온도(collapse temperature)를 결정한다(Pikal, M. J. et al. Int. J. Pharm., 1990,62,165-186); (2) 바이알을 실온하의 동결-건조기 선반에 놓고 이후에 -1°C에서 약 30분 동안 평형화시킨다; (3) 선반을 -55°C로 냉각시키고 이 온도를 2시간동안 유지한다; (4) 약 -32°C의 생성물 온도 또는 붕괴 온도보다 5°C 낮은 온도에서 이차 건조를 실시한다; (5) 35°C에서 이차 건조를 실시한다. 챔버 압력을 55 내지 120 mmHg로 조절한 후 건조를 완성한다; (6) 동결-건조기의 진공하에서 바이알을 마개로 막고 동결건조된 바이알을 크립프-밀봉하여 2°C 내지 8°C에 저장한다.

동결건조된 제제에는 부형제(excipients) 및 동결건조보호제(lyoprotectant)가 포함될 수 있다. 부형제로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 0.9% NaCl과 10 mM 인산나트륨(pH 7.0) 또는 10 mM 나트륨 시트레이트(pH 7.0)의 완충액이 포함된다. 동결건조보호제는 동결 및 건조 공정동안에 생물학적 분자를 보호하고 최종 산물에 기계성(mechanical support)을 부여하는 역할을 하며 이들의 예로는 PBS(pH 7.0), PBS/4%, 12% 또는 15% 트레할로즈 등을 들 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물과 관련하여 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 조성물이 적용되는 이식편대 숙주 질환에 대해 개선 또는 치료 효과를 나타내는 활성성분의 양을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서 치료학적 유효량은 환자의 연령, 성별, 적용부위, 투여회수, 투여시간, 제형, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있지만, 야생형보다 적은 양으로 투여하면 되는데 예를 들면 0.01~1000 μ g/kg/일, 보다 바람직하게는 0.1~500 μ g/kg/일, 가장 바람직하게는 1~100 μ g/kg/일로 투여한다.

본 발명은 하기 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명될 것이다. 그러나 이들 실시예는 단순히 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명할 것이다.

하기 실시예 1은 LAG3에 관한 것이며, LAG3/Fc 또는 LAG3-LAG3/Fc의 아미노산 서열 및 코딩 DNA 서열 그리고 이들의 제조에 이용된 프라이머 서열들을 하기 표 1에 요약하였다.

표 1.
LAG3-LAG3/Fc 서열 및 이의 제조에 이용된 프라이머 서열

유전자 명칭	서열 번호	설명
Oligo-LAG3-F- <i>EcoR</i> I	1	LAG3 세포외역부위 5'말단 <i>EcoR</i> I 포함
Oligo-LAG3-R-5P	2	LAG3 세포외역부위 3'말단 concatamer 제조시 사용
Oligo-LAG3-F-5P	3	LAG3 세포외역부위 5'말단 concatamer 제조시 사용
Oligo-LAG3-R- <i>Spe</i> I	4	LAG3 세포외역부위 3'말단 <i>Spe</i> I 포함
hIgG-F- <i>Spe</i> I	5	IgG 힌지 5'말단 <i>Spe</i> I 포함
hIgG-R- <i>Xba</i> I	6	IgG 3'말단 <i>Xba</i> I 포함
LAG3/Fc 코딩 DNA	7	-
LAG3/Fc 단백질	8	-
LAG3-LAG3/Fc 코딩 DNA	9	-
LAG3-LAG3/Fc 단백질	10	-

<실시예 1>

A. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조

a. LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편

LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소 *EcoR* I의 인식서열과 리더서열(서열번호 8의 펩타이드 1-22)의 코딩서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의 뉴클레오타이드)와, 제한효소 *Spe* I의 인식서열과 상기 세포외역 가용성 부위의 3'말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 4번의 뉴클레오타이드)를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 건강한 성인의 단핵구 세포(T림프구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

건강한 성인의 혈액을 채취하고 알피엠아이-1640[RPMI-1640(Gibco BRL, USA)] 배지와 1:1로 희석하여 이를 피콜-하이팩 [Ficoll-hypaque(Amersham, USA)]을 사용하여 밀도구배 원심분리(density-gradient centrifugation)하여 상부에 형성된 T 림프구 세포층을 얻었다. 그리고 알피엠아이-1640 배지로 3회 세척하고 여기에 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL, USA) 함유 알피엠아이-1640 배지를 가하여 T 림프구 세포가 5×10^5 개/ml로 하고, 파이토헤마글루티닌-엠 [Phytohemagglutinin-M (Calbiochem, Germany)]을 2 μ g/ml로 첨가하여 자극하였다.

mRNA는 트리리에이젠트 [Tri-Reagent(MRC, USA)] mRNA 분리 키트를 이용하여 순수 분리하였다. 우선 인간 T 림프구 2×10^7 개의 세포를 인산완충 생리식염수용액(phosphate buffered saline, PBS, pH7.2)으로 3회 세척한 후 1ml 트리리에이젠트로 수차례 섞어서 RNA를 용해시켰다. 이 튜브에 0.2ml 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 강하게 흔들어준 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 4°C에서 15,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 1.5ml 튜브로 옮기고 0.5ml 이소프로판올(isopropanol)을 첨가한 후, 4°C에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후, 침전물에, 75% 에탄올(Ethanol)-25% 디이피씨[DEPC(Sigma, USA)]를 처리한 3차 증류수를 1ml 첨가하여 2 내지 3회 섞은 후 4°C에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에서 건조시켜 잔여 에탄올을 제거한 후 RNA를 디이피씨를 처리한 3차 증류수 50 μ l로 녹였다.

cDNA 합성은 1.5ml 튜브에 정제된 2 μ g mRNA와 1 μ l 올리고 디티[oligo dT(dT30, Promega, USA)] 프라이머를 10 μ M의 농도로 혼합하고, 70°C에서 2분간 가열한 후, 얼음에 넣어 2분간 냉각시켰다. 이 혼합물에 200U 엠-엠엘브이(M-MLV) 역전사효소[reverse transcriptase(Promega, USA)], 10 μ l 5x 반응완충용액(reaction buffer) [250mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 8.3, 375mM 염화칼륨(KCl), 15mM 염화마그네슘(MgCl₂), 50mM 디티티(DTT)], 1 μ l 디엔티피[dNTP(각각 10mM의 농도, Takara, Japan)]를 넣고 디이피씨를 처리한 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후, 42°C에서 1시간 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.

b. 면역글로블린 G1의 Fc 부위를 코딩하는 DNA 단편

면역글로블린 G1의 Fc 부위를 코딩하는 DNA 단편은, 제한효소 *Spe I* 의 인식서열과 IgG1의 상쇄부위의 5'말단을 코딩하는 서열을 갖는 한 프라이머(서열번호 5의 뉴클레오타이드)와 *Xba I* 의 인식서열과 IgG1 Fc의 3'말단을 코딩하는 안티센스의 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6번의 뉴클레오타이드)를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 생성시켰다. 이 반응을 위한 주형 cDNA는 회복기에 있는 원인 불명의 열 환자의 말초 혈액세포(B 림프구)에서 추출한 mRNA를 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 제조하였다.

c. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물

상기 생성된 LAG3의 세포외역 가용성 부위를 코딩하는 DNA단편과 면역글로브린 G1의 Fc 부위를 코딩하는 DNA 단편을 제한효소 *Pst I* 으로 소화시키고 티포 디엔에이 라이게이즈(T₄ DNA ligase, USB, USA)를 이용하여 결합시킴으로써 단순 단량체 형태의 LAG3/Fc 유전자를 제작하였다. 제조된 유전자는 발현 후 단백질의 분비를 용이하게 하기 위한 리더서열을 포함시켰다.

d. 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 클로닝

상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 *EcoRI*과 *XbaI*으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터(Stratagene사 제품) 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+)]의 *EcoRI*/*XbaI* 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 7). 이때 생성된 융합 단백질은 단순 융합된 단량체 단백질로서 LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산 서열은 서열번호 8에 해당한다.

B. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 제조

LAG3의 세포외역 가용성 부위가 연쇄체(concatamer)의 형태를 갖는 융합된 유전자를 만들기 위해, 즉 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 만들기 위해, 제한효소 *EcoR I* 의 인식서열과 리더서열(서열번호 8의 펩타이드 1-22)의 코딩서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 1의 뉴클레오타이드)와 상기 세포외역 가용성 부위의 3' 말단 서열을 코딩하는 안티센스 서열(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 다른 프라이머(서열번호 2의 뉴클레오타이드)를 사용하여 하나의 LAG3 세포외역 가용성 부위의 단편을 증폭하였고, 또한 LAG3 세포외역 가용성부위의 리더 서열이 종료되는 부위(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 갖는 한 프라이머(서열번호 3의 뉴클레오타이드)와 제한효소 *Xba I* 의 인식서열과 IgG1 Fc의 3'말단을 코딩하는 안티센스의 서열을 갖는 다른 프라이머(서열번호 6의 뉴클레오타이드)를 사용하여 다른 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 단편을 증폭하였다. 이 반응은 상기 제조된 단순 융합된 단량체 단백질 LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물(서열번호 7의 뉴클레오타이드)을 주형으로 사용하였다.

중합효소 연쇄반응은 1 μ l 1차 cDNA, 2U 피에프유(Pfu) DNA 중합효소[polymerase (Stratagene, USA)], 10 μ l 10X 반응완충용액(reaction buffer) [200mM 트리스-HCl, pH8.75, 100mM 황산암모늄 [(NH₄)₂SO₄], 100mM 염화칼륨 (KCl), 20mM 염화마그네슘(MgCl₂)], 1% 트리톤(등록상표 Triton) X-100, 1mg/ml 우혈청알부민(BSA), 3 μ l 프라이머 1(10 μ M), 3 μ l 프라이머2(10 μ M), 2 μ l 디엔티피(dNTP, 각각 10mM)를 넣고 3차 증류수로 100 μ l가 되도록 첨가한 후 실시하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리한 다음 95 $^{\circ}$ C 1분, 58 $^{\circ}$ C 1분30초, 72 $^{\circ}$ C 1분30초씩 31회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C 15분간 더 반응시켜 중합효소 연쇄반응 산물이 완전한 평활 말단(blunt end)이 되도록 하였다.

중합효소 연쇄반응 산물들을 0.8% 아가로즈 젤(agarose gel)에 전기영동한 후, 큐엑스 투 젤 추출 키트[Qiaex II gel extraction kit(Qiagen, USA)]를 이용하여 순수 분리하였다. 순수분리된 중합효소 연쇄반응 산물들을 제한효소 BamHI으로 처리한 후 페놀/클로로포름 추출 방법으로 순수 분리하였다. 이어서, BamHI으로 처리된 두 종류의 DNA 단편을 라이게이즈로 결합시켰다.

C. 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물의 클로닝

상기 제조된 연쇄 융합된 단량체 단백질 LAG3-LAG3/Fc를 코딩하는 DNA 작제물을 제한효소 *EcoRI* 과 *XbaI* 으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터인 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+), startagene, USA]의 *EcoRI/XbaI* 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 전체 코딩 영역 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다(서열번호 9). 이때 생성된 융합 단백질은 연쇄 융합된 단량체 단백질로서 LAG3-LAG3/Fc라 명명하였고, 이들의 추정 아미노산 서열은 서열번호 10에 해당한다.

벡터로 사용할 10 μ l 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II (+), Stratagene, USA]를 15U *EcoRI*과 15U *XbaI*, 5 μ l 10X 반응완충용액(reaction buffer) [100mM 트리스-HCl, pH 7.5, 100mM 염화마그네슘(MgCl₂), 10mM 디티티 (DTT), 500nM 염화나트륨(NaCl)], 5 μ l 0.1% 우혈청알부민[BSA(Takara, Japan)]을 섞은 후, 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켜 DNA를 소화시켰다. 반응물을 0.8% 아가로즈 젤에 전기영동한 후, 큐엑스 투 젤 추출 키트 [Qiaex II gel extraction kit(Qiagen, USA)]로 순수 분리하였다.

*EcoRI*과 *XbaI*으로 소화된 피블루스크립트 케이에스투 플러스[pBluescript KS II(+), Stratagene, USA] 100ng과 제한효소로 소화시킨 20ng의 중합효소 연쇄반응 산물을 혼합하고 0.5U 티포(T4) DNA 라이게이즈[ligase(Amersham, USA)], 1 μ l 10X반응완충용액(reaction buffer) [300mM 트리스-에이치씨엘(Tris-HCl), pH 7.8, 100mM 염화마그네슘(MgCl₂), 100mM 디티티(DTT), 10mM 에이티피(ATP)]를 넣은 후 3차 증류수로 10 μ l가 되도록 첨가한 후 16 $^{\circ}$ C 수조(water bath)에서 16시간 동안 반응시켰다. 대장균[E. coil Top10(Novex, USA)]을 리비듐 클로라이드(RbCl, ribidium chloride, Sigma, USA)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 형질전환시켜 암피실린(ampicillin, Sigma, USA)을 50 μ g/ml 함유한 엘비(LB) 고체 배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니들을 암피실린이 50 μ g/ml 함유된 엘비(LB) 액체배지 4ml에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 진탕 배양하였다. 이 중 1.5ml을 샘브룩(Sambrook J) 등의 문헌(Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.25-1.31, p1.63-1.69, p7.26-7.29, 1989)에 기술된 알칼리 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드를 소량 추출한 후, *EcoRI*과 *XbaI*으로 소화시켜 클로닝의 유무를 확인하였다.

전체 코딩영역 서열은 다이데옥시 체인 터미네이션 [Dideoxy chain termination(생어(Sanger F) 등의 문헌, PNAS USA, 74:5483, 1977)]법을 이용한 다음과 같은 DNA 서열화 방법에 의해 확인하였다. 상기의 알칼리 분해법으로 추출한 플라스미드와 시퀀네이즈(등록상표 Sequenase ver. 2.0, Amersham, USA) 및 35S 디에이티피(dATP, Amersham, USA)를 사용하여 제품 사용법에 준하는 방법으로 DNA 서열화 반응을 진행시켰다. 6% 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)에 위의 시료를 로딩(loading)하고 전압을 1800 내지 2000V 사이로 유지하여 젤의 온도를 50 $^{\circ}$ C로 유지하면서 2시간 전기영동한 후, 건조시킨 다음 엑스레이 필름(Kodak, USA)에 2일 동안 노출시킨 후 DNA 염기 서열을 판독하였다.

<실시에 2>

다른 단백질인 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4의 단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질은 전술한 실시예 1과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있다. 보다 자세한 제조방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 대한민국 특허출원 제10-2001-0045028호 "연쇄체화에 의한 면역글로불린 융합 단백질의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조

된 TNFR/Fc 융합 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 벡터 및 상기 벡터에 의한 형질전환체 "(메릭스젠) 및 제10-2002-0045921호 "직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체"(메릭스젠)를 통하여 확인할 수 있다. 관련된 TNFR1, TNFR2, CD2 또는 CTLA4 서열들을 아래 표 2에 나타내었다.

표 2.
본 발명에 따른 단백질 및 이의 코딩 서열

유전자 명칭	서열목록
TNFR2/Fc 코딩 DNA	11
TNFR2/Fc 단백질	12
TNFR2-TNFR2/Fc 코딩 DNA	13
TNFR2-TNFR2/Fc 단백질	14
CD2/Fc코딩 DNA	15
CD2/Fc 단백질	16
CD2-CD2/Fc 코딩 DNA	17
CD2-CD2/Fc 단백질	18
CTLA4/Fc 코딩 DNA	19
CTLA4/FC 단백질	20
CTLA4-CTLA4/FC 코딩 DNA	21
CTLA4-CTLA4/FC 단백질	22
TNFR1/Fc 코딩 DNA	23
TNFR1/Fc 단백질	24
TNFR2-TNFR1/Fc 코딩 DNA	25
TNFR2-TNFR1/Fc 단백질	26

<실시예 3>

단순/연쇄 융합된 이량체 LAG3 융합 단백질의 발현 및 정제

차이니스 햄스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1, ATCC CCL-61, Ovary, Chinese hamster, Cricetulus griseus)에서 융합 단백질을 발현시키기 위하여, LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 블루스크립트 케이에스투 플러스 플라스미드를 형질 전환된 대장균에서 추출한 후, 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 소화시켜 얻은 LAG3-LAG3/Fc 단편을 동물세포 발현 벡터인 피씨알쓰리(pCR™3, Invitrogen, USA) 플라스미드의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하여, 재조합 발현 플라스미드를 pLAG33Ig를 제조하였다(도 3). 이 플라스미드를 pLAG33-Top10'이라 명명하였고, 2004년 1월 13일자로 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM, 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221 유림빌딩 소재)에 기탁번호 KCCM 10556로 기탁하였다.

형질 감염은 상기 LAG3-LAG3/Fc 융합 유전자를 포함한 플라스미드 pLAG33Ig DNA를 지브코 비알엘(Gibco BRL, USA)사의 리포펙타민(Lipofectamine™) 시약과 혼합함으로써 수행하였다. 1×10^5 세포/구의 농도의 차이니스 햄스터 난소 세포주 케이원(CHO-K1) 세포를 6구 조직 배양판 (six-well tissue culture plate, Nunc, USA)에 접종하고 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 디엠이엠(DMEM) 배지에서 세포가 50 내지 80%가 되도록 배양한 후, 혈청이 없는 디엠이엠(DMEM) 배지에서 플라스미드 pLAG33Ig DNA를 1 내지 2 μ g 취하고, 리포펙타민(Gibco BRL, USA)을 2 내지 25 μ l 취하여 상온에서 15 내지 45분간 반응시킨 DNA-리포솜 혼합체(Liposome complex)를 세포 배양판에 첨가시켰다. 5시간동안 배양한 후 혈청이 20%가 함유된 디엠이엠(DMEM) 배지를 첨가하여 18 내지 24시간 배양하였다. 최종 형질 감염 후에 세포를 1.5 mg/ml의 제네티신(Geneticin, G418, Gibco BRL, USA)이 첨가된 10% 우태아혈청 디엠이엠(DMEM) 배지에서 3주간 배양하고, 형성된 집락을 분리하여 증폭 배양하였다. 융합 유전자의 발현 여부는 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 사용한 효소 면역 검사법(ELISA)을 통해 검사하였다.

효소 면역 검사법(ELISA)은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 1mg/ml 염소 항인간 면역 글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 0.1M 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)에 1:2000으로 희석한 후, 96구 효소 면역 검사판(96-well flexible plate, Falcon, USA)에 100 μ l씩 분주하고 랩으로 봉한 후 4℃에서 16시간 이상 방치

하여 항체가 검사판 표면에 코팅되게 하였다. 이를 세척완충용액(washing buffer) [0.1% 트윈-20(Tween-20) 함유, 1X 인산완충 생리식염수(PBS, Phosphate buffered saline)]으로 3회 세척한 후 희석용액[(diluent buffer) 1X 인산완충 생리식염수 48.5ml, 우태아 혈청 1.5ml, 트윈-20 50 μ l]을 180 μ l씩 분주하였다. 첫 구(well)에 배양한 상층액 20 μ l를 넣은 후 마이크로 피펫 (micropipette)을 이용하여 연속적으로 희석하였고, 양성 대조군으로 0.01 μ g/ μ l 인간 면역글로블린 (human IgG, Sigma, USA)을, 음성 대조군으로 형질감염되지 않은 차이니스 햄스터의 난소 케이윈(CHO-K1) 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석하였다. 희석이 끝난 96구 효소 면역 검사판(Falcon, USA)을 호일로 싸서 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 반응시킨 후, 세척용액으로 3회 세척하였다. 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항-인간 면역글로블린(Peroxidase labeled goat anti-human IgG, KPL, USA)을 희석용액으로 1:5000 희석한 다음 이를 100 μ l씩 분주하고 호일로 싼 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척용액으로 3회 세척한 후 티엠비 퍼옥시데이즈 시스템(TMB microwell peroxidase substrate system, KPL, USA)을 이용하여 발색시키고, 흡광기(microplate reader, Bio-RAD, Model 550, Japan)로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

이렇게 제조된 형질전환체(transfectant)가 생산한 융합 단백질을 정제할 목적으로 무혈청배지(serum free media) 중 CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA)에 적응시키기 위하여 다음의 과정으로 진행하였다. 약 3×10^5 개의 세포를 6구판 (6-well plate)에 접종한 후 16시간동안 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하여 정착시킨 후 현미경 하에서 약 30 내지 50%의 면적에 세포가 부착된 것을 확인하고 10% 우태아 혈청 함유 DMEM와 CHO-S-SFM II의 비율을 8:2가 되도록 배지를 교체하여 배양하였다. 이 비율로 3회 계대 배양한 후, 각각 6:4의 비율로 3회, 4:6의 비율로 3회, 3:7의 비율로 3회, 2:8의 비율로 3회, 및 1:9의 비율로 3회 계대 배양한 후 최종적으로 100% CHO-S-SFM II 배지에서 계대 배양하여, 이의 발현량을 효소 면역 검사법을 이용하여 측정하였다.

이 세포들을 무혈청배지가 없는 CHO-S-SFM II(Gibco BRL, USA) 배지에서 대량 배양후 각각의 융합 단백질을 함유한 배양액을 200xg, 12분간 원심분리하여 세포 찌꺼기들을 완전히 제거하고 프로테인 에이 컬럼(HiTrap protein A column, Amersham, USA)을 이용한 다음의 방법으로 순수 분리하였다. 20mM 인산화 나트륨(Sodium phosphate, pH 7.0, sigma, USA)을 1ml/min의 속도로 2분간 통과시킨 후, 10ml 배양액을 동일한 속도로 컬럼을 통과시켜 프로테인 에이에 융합 단백질이 결합하도록 하였다. 20mM 인산화 나트륨(pH 7.0)을 2분간 동일 속도로 통과시켜 세척한 후, 0.1M 시트르산(C₆H₈O₇ · H₂O, citric acid, pH 3.0, sigma, USA)을 3분간 동일속도로 통과시키면서 500 μ l씩 1.5ml 튜브에 순차적으로 추출물을 분주하였다. 이를 1M 트리스(Tris, pH 11.0, USB, Sigma)를 이용하여 pH 7.0으로 적정하였으며 각 튜브의 융합 단백질의 존재 유무는 상기에 기술한 효소면역 검사법(ELISA)을 통하여 확인하였다. 순수 분리한 융합 단백질은 센트리콘 30(Centricon 30, Amicon, USA)을 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 2000xg, 30분간 원심분리하여 농축하였다.

<실시예 4>

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제

단순/연쇄 융합된 이량체 단백질 CD2, CTLA4, TNFR의 발현 및 정제는 전술한 실시예 1과 동일한 절차에 따라 제조할 수 있었다. 보다 자세한 방법은 본 발명의 발명자가 이미 출원한 바 있는 대한민국 특허출원 제10-2001-0045028호 "연쇄체화에 의한 면역글로블린 융합 단백질의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 TNFR/Fc 융합 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 벡터 및 상기 벡터에 의한 형질전환체"(메텍스젠) 및 제10-2002-0045921호 "직렬 연쇄체를 갖는 면역접합체"(메텍스젠)를 통하여 확인할 수 있다. 한편, 이로부터 수득한 재조합 발현 플라스미드는 각각 pCD22Ig(도 1), pCT44Ig(도 2), pTR2Ig-Top'(도 4)이라 명명하였다.

아울러, 실시예 3 및 실시예 4에 따라 순수 정제된 단백질들이 목적인 단순 융합된 이량체 단백질 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 및 연쇄 융합된 이량체 단백질 [CD2-CD2/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂가 맞는지 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였고 (도 5a), 마찬가지로 [TNFR1/Fc]₂, [TNFR2/Fc]₂, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂에 대해서도 SDS-PAGE를 실시하였다(도 5b).

<실시예 5>

이식편대 숙주질환 유발

본 발명에서 사용한 마우스는 몸무게 20~25g의 8~12주령 암컷 마우스 C57BL/6과 BDF1[(C57BL/6 x DBA/2)F₁]이며, 멸균된 (filter-top microisolator)에서 사육하였다. 수령 마우스에게는 공여 마우스의 비장 세포를 주입하기 하루 전에 박트림(bactrim)을 투여하였다. BDF1 (H-2Kb/d) 수령 마우스는 연세대학교의 미생물학 교실로부터 전신에 700cGy의 감마선을 조사(irradiation)받은 것을 이용하였다. 공여 마우스로부터 수득한 비장 세포는 10% 알피엠아이(RPMI)에 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 배지에 준비하였고, 세포는 400g에서 10분간 원심분리하여 수득하였다.

이식편대 숙주질환을 유발하기 위하여 앞서 감마선에 의해 조사된 BDF1 수령 마우스에게 동종 공여 마우스인 C57BL/6 마우스(H-2Kb)의 살아있는 비장 세포(25 x 10⁶개)를 역방향 주입 방법을 이용하여 이식하였다. 비장 세포의 주입 후, 조사 영향을 평가하기 위해서 매일 외관과 건강 상태를 관찰하였으며, 몸무게와 비장 지수를 측정하였다.

<실시예 6>

단순 융합된 이량체 단백질의 이식편대 숙주질환 치료효과

상기 이식편대 숙주질환에 걸린 마우스에게 단순 융합된 이량체 단백질인 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 각각을 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 여기서, 대조군 수령 마우스에게는 PBS를 투여하였으며, 상기 수령 마우스들의 생존율을 비교하기 위해서 격일로 몸무게를 측정하여 생존율을 계산하였다(도 6).

대조군 수령 마우스의 경우 이식편대 숙주질환으로 인하여 체중이 빠르게 감소하였고, 공여 마우스의 활성화된 T 세포의 증식으로 인하여 수령 마우스의 비장 세포 수가 감소하였다. 결국은 비장 세포를 수령 마우스로 공급한지 2주 정도 경과한 후에 본 발명에 사용된 모든 대조군 마우스가 심각한 체중 감소를 나타냈으며, 사망에 이르렀다. 한편, 단순 융합된 이량체 단백질인 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂를 각각 단독 투여받은 마우스의 경우에는 모두 이식편대 숙주질환에 의한 치사율이 대조군에 비하여 감소하였다. 상기와 같이 단순 융합된 이량체 단백질을 단독 투여한 경우에 [LAG3/Fc]₂가 약 4주의 생존 기간을 보여서 가장 좋은 면역억제 효과를 나타내었으며, [CTLA4/Fc]₂, [CD2/Fc]₂의 순서로 생존율이 증가하는 결과를 보여주었다.

<실시예 7>

단순 융합된 이량체 단백질의 단독 투여 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질 [CD2/Fc]₂, [LAG3/Fc]₂, [CTLA4/Fc]₂ 각각을 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질의 혼합물 [CD2/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂ 또는 [LAG3/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂를 각각 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 7).

각각의 단순 융합된 이량체 단백질을 단독으로 투여한 경우보다는 복합적으로 투여한 경우에 더 높은 생존율을 보여주었다. 그 중에서도 특히 [LAG3/Fc]₂ + [CTLA4/Fc]₂ 혼합물을 투여한 경우에 실험개체 전원이 약 40일 이상의 생존기간을 나타냄으로써 이식편대 숙주질환에 의한 치사율을 가장 많이 감소시킴을 보여주었다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였으며(표 3), 이 결과는 이식편대 숙주질환의 치료에는 단순 융합 이량체 단백질을 1종 단독으로 사용하는 것보다는 2종 이상 복합적으로 투여하는 것이 더 좋은 치료효과를 달성할 수 있음을 보여주는 것이다.

표 3.
단순 융합된 이량체 단백질의 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역억제제 (mg/kg/일)	공여 마우스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 ±SEM
--------------------	--------	--------	-----	------	----------------

PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±1.06
[CD2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	14~22	15.7±3.37
[LAG3/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	13~26	18±5.12
[CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~28	23.2±3.49
[CD2/Fc] ₂ + [CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	16~29	23.2±5.71
[LAG3/Fc] ₂ + [CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	21~40	28±7.71

<실시예 8>

단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

(1) CTLA-4의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [CTLA4/Fc]₂을 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 다른 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8a).

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [CTLA4/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 26일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 38일의 최대 생존 기간을 보였다. 이 결과를 각각 10마리의 마우스에서 평균생존기간을 계산하여 도표화하였다(표 4). 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

표 4.

단순 융합된 이량체 단백질 및 연쇄 융합된 이량체 단백질에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역 억제제 (mg/kg/일)	공여 마우스	수령 마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 ±SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7±1.06
[CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	14~26	18.4±4.70
[CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~38	28.2±8.12

(2) TNFR2의 경우

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 다른 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200µg/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 8b).

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

<실시예 9>

[TNFR2-TNFR2/Fc]₂와 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 또는 [TNFR2-TNFR1/Fc]₂에 의한 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 단순 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2/Fc]₂를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 다른 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂ 또는 [TNFR2-TNFR1/Fc]₂ 를 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 9).

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에게 [TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 20일의 최대 생존 기간을 보인 반면에, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂를 단독 투여한 경우에 약 30일의 최대 생존 기간을 보였으며, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂를 단독 투여한 경우에는 약 35일의 최대 생존 기간을 보였다. 이러한 결과들은 단순 융합된 이량체 단백질보다는 연쇄 융합된 이량체 단백질이 이식편대 숙주질환에 더 좋은 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다. 또한, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂와 [TNFR2-TNFR2/Fc]₂는 효과 면에서 거의 유사하였지만, [TNFR2-TNFR2/Fc]₂가 보다 우수한 면역억제효과를 보유하고 있음을 확인하였다.

<실시예 10>

연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과

이식편대 숙주질환에 걸린 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질인 [CD2-CD2/Fc]₂, [LAG3-LAG3/Fc]₂, [CTLA4-CTLA4/Fc]₂, [TNFR2-TNFR1/Fc]₂를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다. 마찬가지로, 이식편대 숙주질환에 걸린 또 다른 수령 마우스에 연쇄 융합된 이량체 단백질의 복합체인 [CD2-CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂ 및 [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂를 각각 인산완충용액(PBS)에 200 μ g/0.5ml의 농도로 용해하여 0, 2, 4, 6일째에 복강내 투여하였다(도 10).

대조군 마우스의 경우 상기 결과와 유사하게 약 2주 후에는 100% 치사율을 나타내었다(표 5). 실시예 7의 단순 융합된 이량체 단백질의 경우와 유사하게, 연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여보다는 복합 투여가 보다 좋은 생존율을 나타낼 수 있었다. 연쇄 융합된 이량체 단백질을 복합 투여한 [CD2-CD2/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂와 [LAG3-LAG3/Fc]₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc]₂의 경우에 비장세포 주입 후 약 10주까지도 각각 50%와 40%의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과들은 이식편대 숙주질환의 치료를 위하여 면역 억제제를 이용하는 경우에, 연쇄 융합된 단백질을 복합적으로 투여하는 것이 더욱 좋은 치료 효과를 달성할 수 있음을 시사하는 것이다.

표 5.

연쇄 융합된 이량체 단백질의 단독 투여 또는 복합 투여에 따른 이식편대 숙주질환 치료효과 비교

면역억제제 (mg/kg/day)	공여마우스	수령마우스	마리수	생존일수	평균생존일수 \pm SEM
PBS	C57BL/6	BDF1	10	11~15	13.7 \pm 4.3
[CD2-CD2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~28	21.4 \pm 5.6
[TNFR2-TNFR2/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	20~34	26.2 \pm 6.1
[TNFR2-TNFR1/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	18~31	23.6 \pm 5.4
[CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	19~38	28.2 \pm 8.2
[LAG3-LAG3/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	22~50	34.6 \pm 10.6
[CD2-CD2/Fc] ₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	44이상	100이상
[LAG3-LAG3/Fc] ₂ + [CTLA4-CTLA4/Fc] ₂	C57BL/6	BDF1	10	50이상	100이상

[CTLA4-CTLA4/Fc] ₂			
-------------------------------	--	--	--

발명의 효과

본 발명에 따른 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 또는 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 광범위한 장기이식 합병증을 치료하는데 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, (1) 제 1 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (2) 제 2 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하되, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질과 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질이 상이한 것임을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 면역글로불린이 IgG인 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 면역반응에 관여하는 단백질이 CTLA-4, LAG-3, CD2, TNFR1 및 TNFR2로 이루어진 그룹 중에서 1종 선택되는 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 단량체 단백질이 서열번호 10, 서열번호 14, 서열번호 18, 서열번호 22 및 서열번호 26의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 면역반응에 관여하는 단백질이 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF, G-CSF, M-CSF, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-7R, IL-12R, IL-18R, G-CSFR, M-CSFR, Fas(Apo

1), CD4, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD54, CD70, CD80, CD86, CD95, CD100, CD119, CD130, CD137, CD154, CD166, ICOS, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PD-1, OX40, 4-1BB 및 B7H로 이루어진 그룹 중에서 1종 선택되는 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 7.

제 2항에 있어서, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질은 CTLA-4 이고, 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질은 LAG-3인 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 8.

면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 9.

제 8항에 있어서, (1) 제 1 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질 및 (2) 제 2 면역반응에 관여하는 단백질의 세포외역 가용성 부위의 직렬 연쇄체가 면역글로불린 Fc 조각의 힌지에 결합되어 형성된 단량체 단백질 두 개가 힌지 부분에서 디설파이드 결합되고 당화된 직렬 연쇄 융합된 이량체 단백질을 포함하되, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질과 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질이 상이한 것임을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 10.

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 면역글로불린이 IgG인 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 11.

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 면역반응에 관여하는 단백질이 CTLA-4, LAG-3, CD2, TNFR1 및 TNFR2로 이루어진 그룹 중에서 1종 선택되는 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 12.

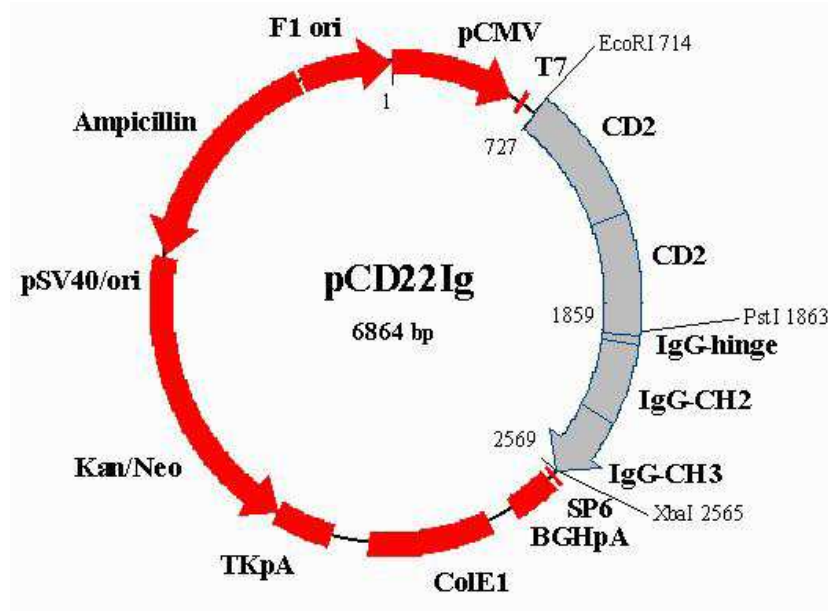
제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 면역반응에 관여하는 단백질이 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF, G-CSF, M-CSF, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-7R, IL-12R, IL-18R, G-CSFR, M-CSFR, Fas(Apo 1), CD4, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD54, CD70, CD80, CD86, CD95, CD100, CD119, CD130, CD137, CD154, CD166, ICOS, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PD-1, OX40, 4-1BB 및 B7H로 이루어진 그룹 중에서 1종 선택되는 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

청구항 13.

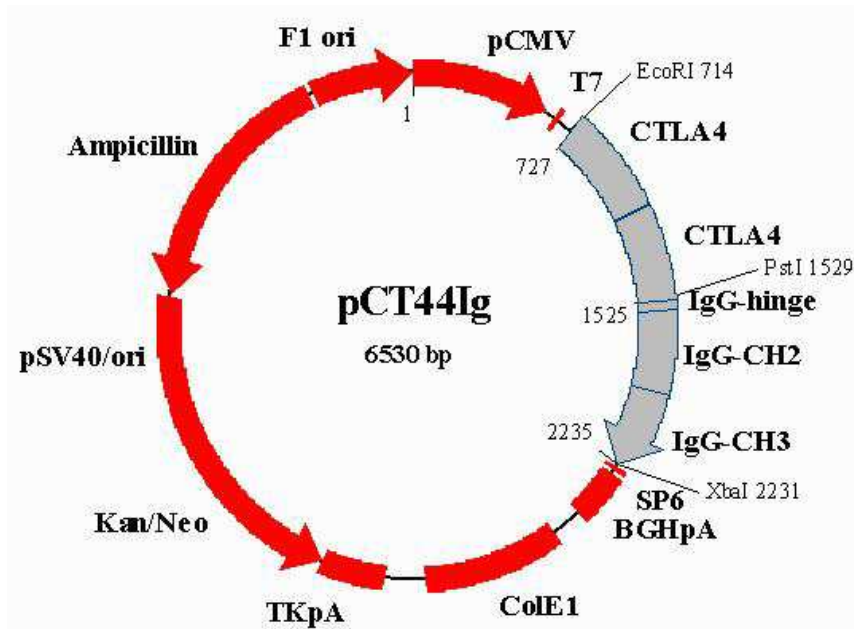
제 9항에 있어서, 상기 제 1 면역반응에 관여하는 단백질은 CTLA-4 이고, 상기 제 2 면역반응에 관여하는 단백질은 LAG-3인 것을 특징으로 하는 장기이식 합병증 치료용 억제학적 조성물.

도면

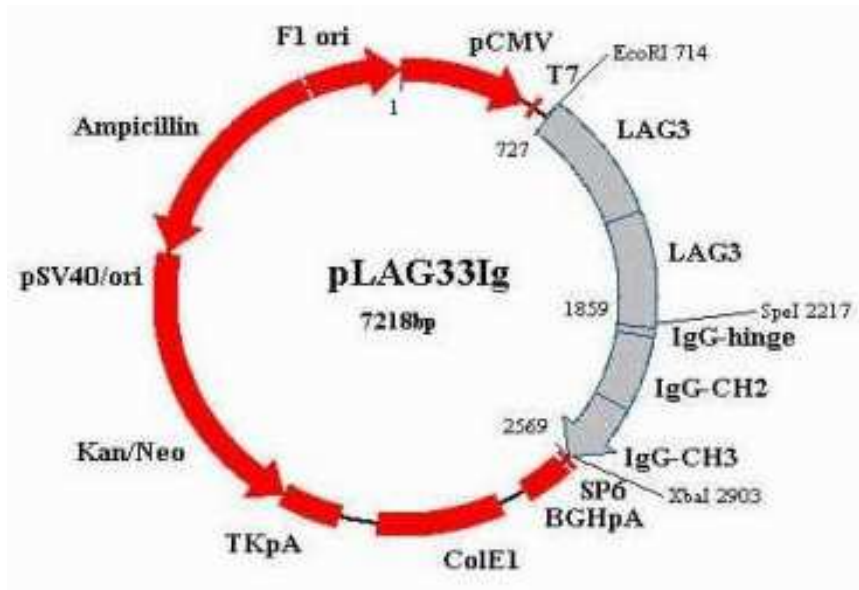
도면1



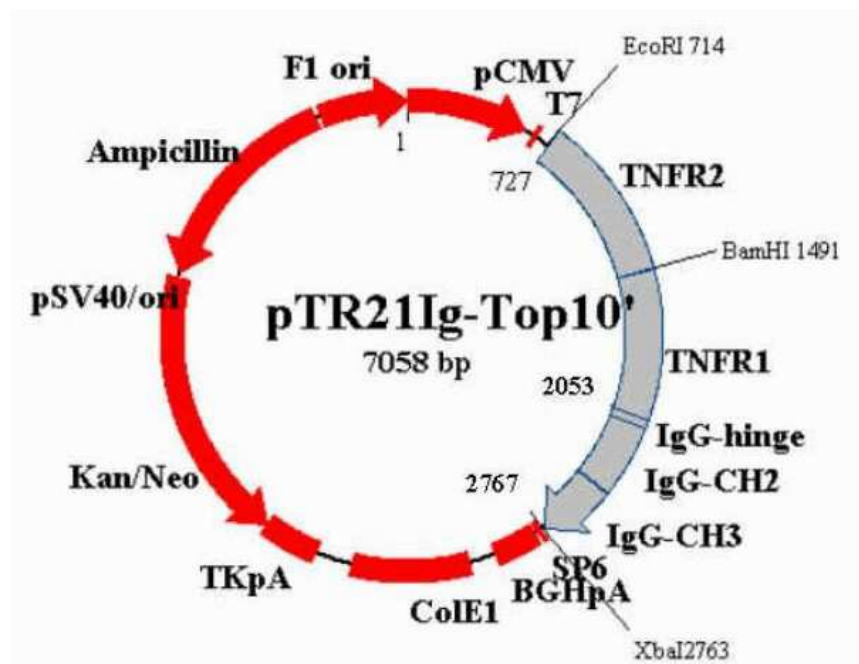
도면2



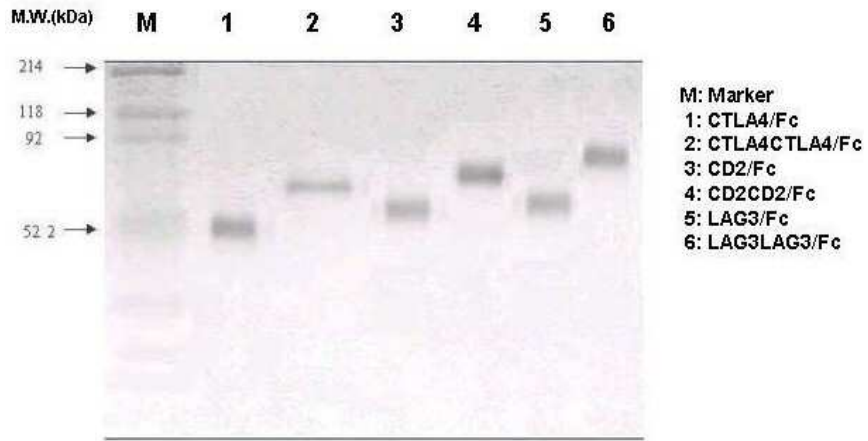
도면3



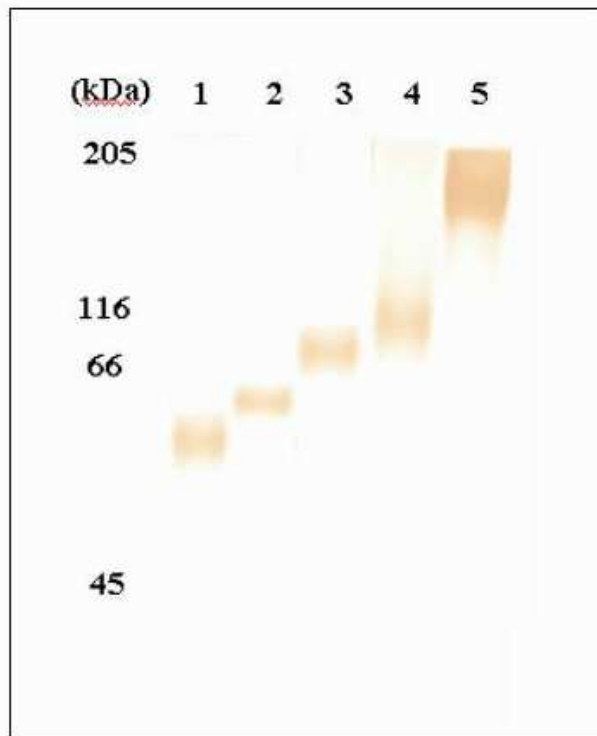
도면4



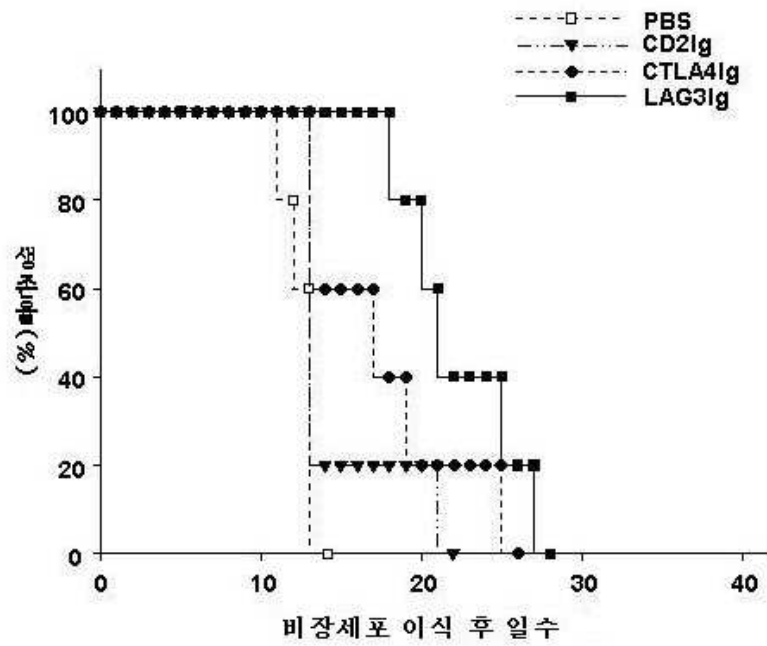
도면5a



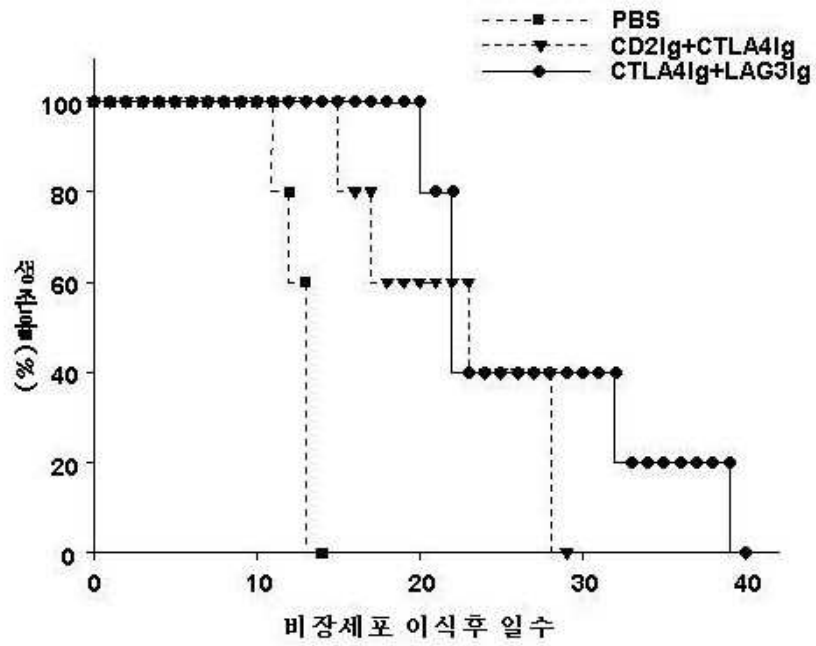
도면5b



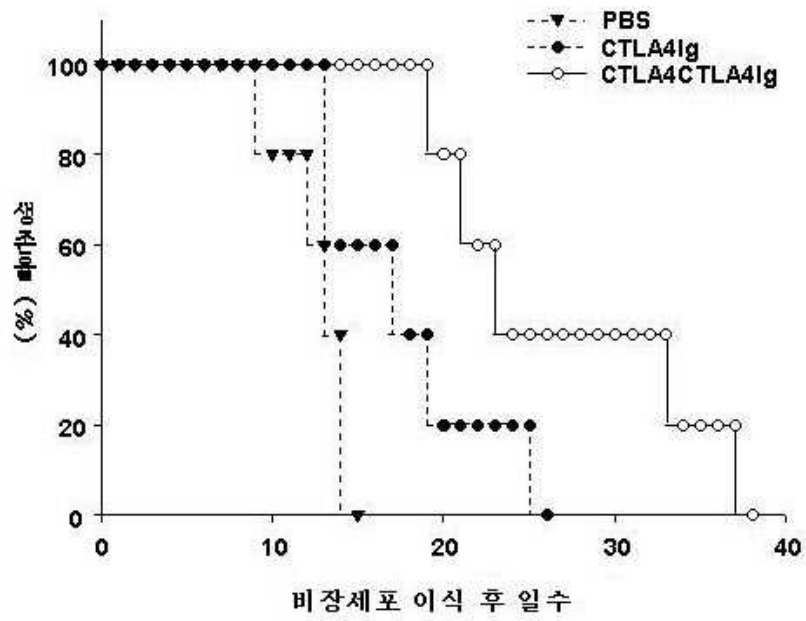
도면6



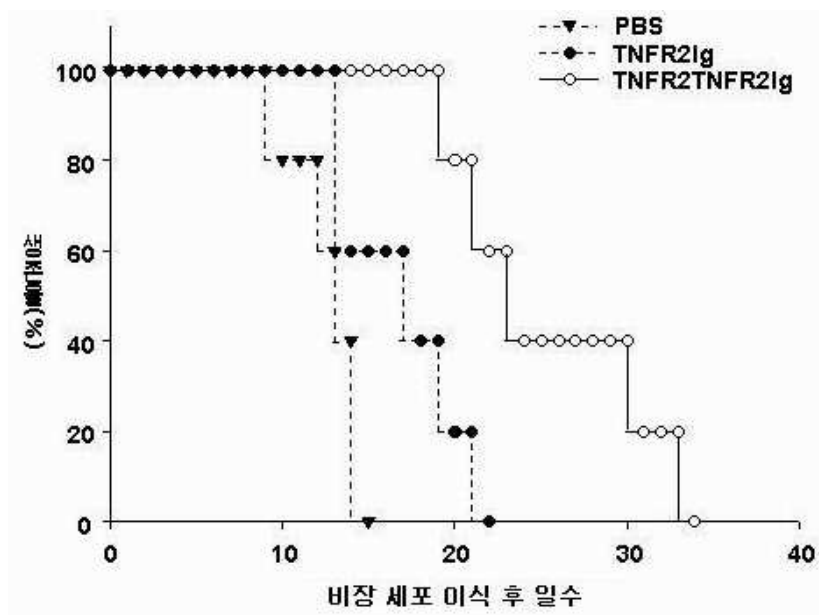
도면7



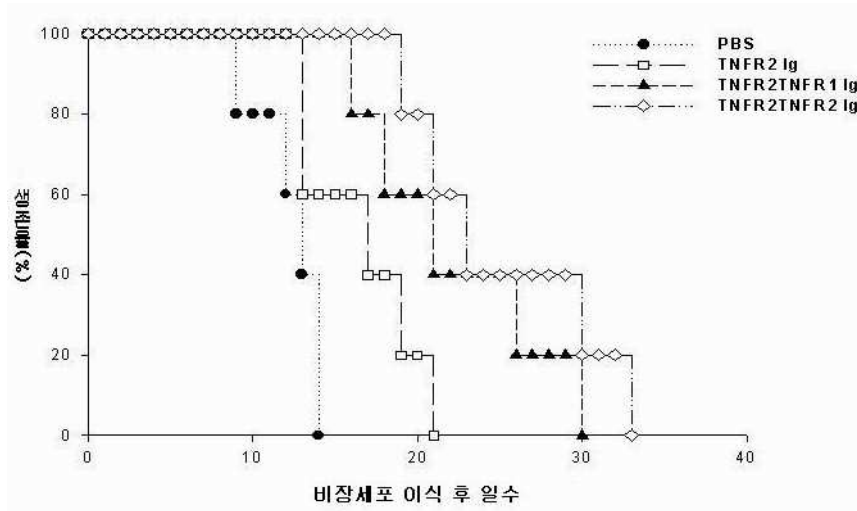
도면8a



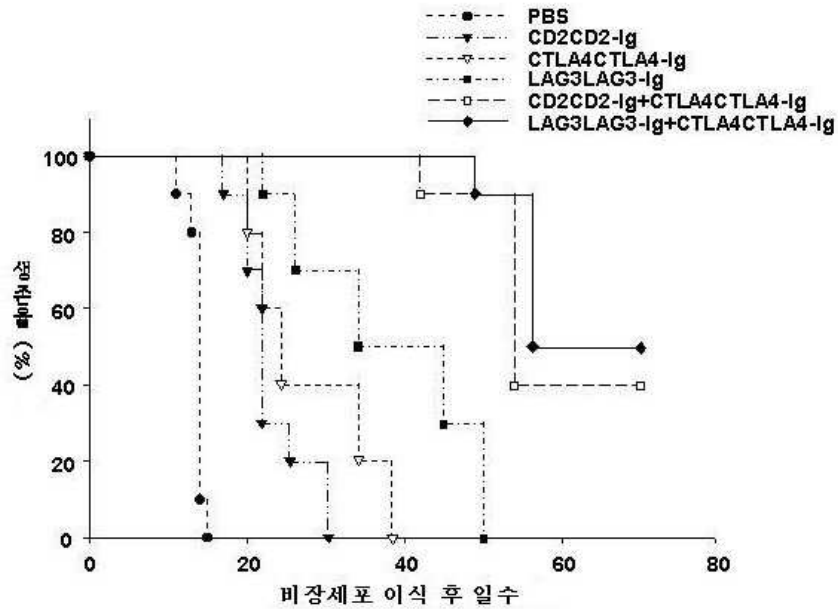
도면8b



도면9



도면10



<110> MEDEXGEN CO., LTD

<120> Pharmaceutical Composition for treatment of Transplantation Rejection comprising Concatameric Immunoadhesin

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer, oligo-LAG3-F-EcoRI

<400> 1
ggaattcatg tgggaggctc agttcctggg c 31

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, oligo-LAG3-R-5P

<400> 2
agtgaggtta tacatgatgg agacgttg 28

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, oligo-LAG3-F-5P

<400> 3
ctccagccag gggctgaggt c 21

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, oligo-LAG3-R-SpeI

<400> 4
gactagttgg gggctccaga cccagaacag 30

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, hIgG-F-SpeI

<400> 5
gagtagtgca gagcccaaat cttgtgac 28

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer, hIgG-R-XbaI

<400> 6
gctctagagc tcatttaccc ggagacaggg agag 34

<210> 7
<211> 1503
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(66)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1500)
<223> LAG3/Fc

<400> 7
atg tgg gag gct cag ttc ctg ggc ttg ctg ttt ctg cag ccg ctt tgg 48
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

gtg gct cca gtg aag cct ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg 96
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

tgg gcc cag gag ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc 144
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

ccc ctc cag gat ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag 192
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

cat cag cca gac agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg 240
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu

65	70	75	80	
gcc ccc ggc cct cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc				288
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro				
	85	90	95	
cgc cgc tac acg gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg				336
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly				
	100	105	110	
agg ctg ccc ctg cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag				384
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln				
	115	120	125	
cgc ggg gac ttc tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc				432
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala				
	130	135	140	
ggc gag tac cgc gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc				480
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys				
	145	150	155	160
cgc ctc cgt ctg cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca				528
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro				
	165	170	175	
gga tct ctc aga gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc				576
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser				
	180	185	190	
cgc cct gac cgc cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag				624
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln				
	195	200	205	
ggc cga gtc cct gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc				672
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser				
	210	215	220	
ttc ctc ttc ctg ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc				720
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly				
	225	230	235	240
tgc atc ctc acc tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac				768
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn				
	245	250	255	
ctc act gtt ctg ggt ctg gag ccc cca act agt gca gag ccc aaa tct				816
Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser				
	260	265	270	
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg				864
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu				

275	280	285	
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc			912
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
290	295	300	
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc			960
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
305	310	315	320
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag			1008
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
325	330	335	
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg			1056
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
340	345	350	
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat			1104
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
355	360	365	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc			1152
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
370	375	380	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag			1200
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
385	390	395	400
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc			1248
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
405	410	415	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg			1296
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
420	425	430	
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct			1344
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
435	440	445	
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc			1392
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
450	455	460	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg			1440
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
465	470	475	480
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg			1488
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			

485

490

495

tcc ccg ggt aaa tga
 Ser Pro Gly Lys
 500

1503

<210> 8
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser

210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser
 260 265 270

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 9
<211> 2211
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(66)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2208)
<223> LAG3-LAG3/Fc

<400> 9
atg tgg gag gct cag ttc ctg ggc ttg ctg ttt ctg cag ccg ctt tgg 48
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

gtg gct cca gtg aag cct ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg 96
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

tgg gcc cag gag ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc 144
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

ccc ctc cag gat ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag 192
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

cat cag cca gac agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg 240
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80

gcc ccc ggc cct cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc 288
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

cgc cgc tac acg gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg 336
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

agg ctg ccc ctg cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag 384
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

cgc ggg gac ttc tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc 432
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140

ggc gag tac cgc gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc 480
 Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160

cgc ctc cgt ctg cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca 528
 Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175

gga tct ctc aga gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc 576
 Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190

cgc cct gac cgc cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag 624
 Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205

ggc cga gtc cct gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc 672
 Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220

ttc ctc ttc ctg ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc 720
 Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240

tgc atc ctc acc tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac 768
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

ctc act ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg tgg gcc cag gag 816
 Leu Thr Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu
 260 265 270

ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc ccc ctc cag gat 864
 Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp
 275 280 285

ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag cat cag cca gac 912
 Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp
 290 295 300

agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg gcc ccc ggc cct 960
 Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro
 305 310 315 320

cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc cgc cgc tac acg 1008
 His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr
 325 330 335

gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg agg ctg ccc ctg 1056
 Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu
 340 345 350

cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag cgc ggg gac ttc 1104
 Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe
 355 360 365

tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc ggc gag tac cgc 1152
 Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg
 370 375 380

gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc cgc ctc cgt ctg 1200
 Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu
 385 390 395 400

cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca gga tct ctc aga 1248
 Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg
 405 410 415

gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc cgc cct gac cgc 1296
 Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
 420 425 430

cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag ggc cga gtc cct 1344
 Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro
 435 440 445

gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc ttc ctc ttc ctg 1392
 Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu
 450 455 460

ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc tgc atc ctc acc 1440
 Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr
 465 470 475 480

tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac ctc act gtt ctg 1488
 Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu
 485 490 495

ggt ctg gag ccc cca act agt gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act 1536
 Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 500 505 510

cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca 1584
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 515 520 525

gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg 1632
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 530 535 540

acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct 1680
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 545 550 555 560

gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc 1728
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 565 570 575

aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc 1776
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 580 585 590

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac 1824
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 595 600 605

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc 1872
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 610 615 620

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg 1920
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 625 630 635 640

ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc 1968
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 645 650 655

ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc 2016
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 660 665 670

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac 2064
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 675 680 685

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc 2112
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 690 695 700

agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 2160
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 705 710 715 720

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa 2208
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 725 730 735

tg a 2211

<210> 10
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
 85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
 100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
 130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn

	245		250		255
Leu Thr Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu	260		265		270
Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp	275		280		285
Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp	290		295		300
Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro	305		310		320
His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr	325		330		335
Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu	340		345		350
Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe	355		360		365
Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg	370		375		380
Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu	385		390		400
Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg	405		410		415
Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg	420		425		430
Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro	435		440		445
Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu	450		455		460
Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr	465		470		475
Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu	485		490		495
Gly Leu Glu Pro Pro Thr Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	500		505		510
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	515		520		525

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 530 535 540

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 545 550 555 560

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 565 570 575

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 580 585 590

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 595 600 605

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 610 615 620

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 625 630 635 640

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 645 650 655

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 660 665 670

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 675 680 685

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 690 695 700

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 705 710 715 720

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 725 730 735

<210> 11
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1470)
 <223> TNFR2/Fc

<400>	11	
atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc		48
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu		
1 5 10 15		
tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac		96
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr		
20 25 30		
gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag		144
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln		
35 40 45		
aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa		192
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys		
50 55 60		
gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac		240
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp		
65 70 75 80		
agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt		288
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys		
85 90 95		
ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg		336
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg		
100 105 110		
gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc gcc tgg tac tgc gcg ctg		384
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu		
115 120 125		
agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc		432
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg		
130 135 140		
ccg gcc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg		480
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val		
145 150 155 160		
tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg		528
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr		
165 170 175		
gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg		576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly		
180 185 190		
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt		624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser		

195	200	205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc			672
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser			
210	215	220	
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc			720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser			
225	230	235	240
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc act ggc			768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly			
245	250	255	
gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc			816
Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
260	265	270	
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca			864
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
275	280	285	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc			912
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
290	295	300	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg			960
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
305	310	315	320
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag			1008
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
325	330	335	
gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg			1056
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
340	345	350	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac			1104
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
355	360	365	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg			1152
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
370	375	380	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag			1200
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
385	390	395	400
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat			1248
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			

405	410	415	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac			1296
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
420	425	430	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc			1344
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe			
435	440	445	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac			1392
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
450	455	460	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg			1440
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
465	470	475	480
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga			1473
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
485	490		
<210> 12			
<211> 490			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 12			
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu			
1	5	10	15
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr			
20	25	30	
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln			
35	40	45	
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys			
50	55	60	
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp			
65	70	75	80
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys			
85	90	95	
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg			
100	105	110	
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu			
115	120	125	

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 260 265 270

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 275 280 285

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 290 295 300

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 305 310 315 320

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 325 330 335

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 340 345 350

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 355 360 365

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 370 375 380

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 420 425 430
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe
 435 440 445
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 450 455 460
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 465 470 475 480
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 13
 <211> 2163
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2160)
 <223> TNFR2-TNFR2/Fc

<400> 13
 atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60
 gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac 240
 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt 288
 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys

85	90	95	
ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg			336
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg			
100	105	110	
gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc ggc tgg tac tgc gcg ctg			384
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu			
115	120	125	
agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc			432
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg			
130	135	140	
ccg ggc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg			480
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val			
145	150	155	160
tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg			528
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr			
165	170	175	
gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg			576
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly			
180	185	190	
aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt			624
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser			
195	200	205	
atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc			672
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser			
210	215	220	
caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc			720
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser			
225	230	235	240
ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc gga tcc			768
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser			
245	250	255	
aac gca act aca ccc tac gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc			816
Asn Ala Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu			
260	265	270	
aga gaa tac tat gac cag aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg			864
Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser			
275	280	285	
ccg ggc caa cat gca aaa gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg			912
Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val			

290	295	300	
tgt gac tcc tgt gag gac agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt			960
Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val			
305	310	315	320
ccc gag tgc ttg agc tgt ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa			1008
Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu			
	325	330	335
act caa gcc tgc act cgg gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc			1056
Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro			
	340	345	350
ggc tgg tac tgc gcg ctg agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg			1104
Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala			
	355	360	365
ccg ctg cgc aag tgc cgc ccg ggc ttc ggc gtg gcc aga cca gga act			1152
Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr			
	370	375	380
gaa aca tca gac gtg gtg tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc			1200
Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser			
385	390	395	400
aac acg act tca tcc acg gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac			1248
Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn			
	405	410	415
gtg gtg gcc atc cct ggg aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc			1296
Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser			
	420	425	430
acg tcc ccc acc cgg agt atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag			1344
Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln			
	435	440	445
cca gtg tcc aca cga tcc caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc			1392
Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser			
	450	455	460
act gct cca agc acc tcc ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca			1440
Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro			
465	470	475	480
gct gaa ggg agc act ggc gac gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act			1488
Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	485	490	495
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca			1536
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			

500	505	510	
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg			1584
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
515	520	525	
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct			1632
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
530	535	540	
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc			1680
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
545	550	555	560
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc			1728
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
565	570	575	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac			1776
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
580	585	590	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc			1824
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
595	600	605	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg			1872
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
610	615	620	
ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc			1920
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
625	630	635	640
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc			1968
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
645	650	655	
aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac			2016
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
660	665	670	
tcc gac ggc tcc tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc			2064
Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
675	680	685	
agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct			2112
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
690	695	700	
ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa			2160
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255

Asn Ala Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu
 260 265 270

Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser
 275 280 285

Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val
 290 295 300

Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val
 305 310 315 320

Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu
 325 330 335

Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro
 340 345 350

Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala
 355 360 365

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr
 370 375 380

Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser
 385 390 395 400

Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn
 405 410 415

Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser
 420 425 430

Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln
 435 440 445

Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser
 450 455 460

Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro
 465 470 475 480

Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 485 490 495

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser


```

                    500                      505                      510
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
    515                      520                      525

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
    530                      535                      540

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
545                      550                      555                      560

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    565                      570                      575

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    580                      585                      590

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
    595                      600                      605

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
    610                      615                      620

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
625                      630                      635                      640

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    645                      650                      655

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
    660                      665                      670

Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
    675                      680                      685

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
    690                      695                      700

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705                      710                      715                      720

```

```

<210> 15
<211> 1314
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1311)
<223> CD2/Fc

```

<400> 15
atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat 48
Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
1 5 10 15

ggt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa 96
Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
20 25 30

acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt 144
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
35 40 45

caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac 192
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
50 55 60

aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa 240
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
65 70 75 80

aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat 288
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
85 90 95

ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca 336
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
100 105 110

aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag 384
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
115 120 125

agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg 432
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
130 135 140

acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa 480
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
145 150 155 160

gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg 528
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
165 170 175

acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc 576
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
180 185 190

agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct gca gag ccc aaa 624
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys

195	200	205	
tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc			672
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
210	215	220	
ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc			720
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
225	230	235	240
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg			768
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
245	250	255	
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg			816
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
260	265	270	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc			864
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
275	280	285	
acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg			912
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
290	295	300	
aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc			960
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
305	310	315	320
ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca			1008
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
325	330	335	
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag			1056
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln			
340	345	350	
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc			1104
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
355	360	365	
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg			1152
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
370	375	380	
cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc			1200
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
385	390	395	400
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc			1248
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			

405	410	415	
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc			1296
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
420	425	430	
ctg tct ccg ggt aaa tga			1314
Leu Ser Pro Gly Lys			
435			
<210> 16			
<211> 437			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 16			
Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn			
1	5	10	15
Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu			
20	25	30	
Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe			
35	40	45	
Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp			
50	55	60	
Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu			
65	70	75	80
Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His			
85	90	95	
Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr			
100	105	110	
Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu			
115	120	125	
Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu			
130	135	140	
Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln			
145	150	155	160
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp			
165	170	175	
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val			
180	185	190	

Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Ala Glu Pro Lys
 195 200 205

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 210 215 220

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 225 230 235 240

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 245 250 255

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 260 265 270

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 275 280 285

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 290 295 300

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 325 330 335

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 340 345 350

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 355 360 365

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 370 375 380

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 385 390 395 400

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 405 410 415

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 420 425 430

Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 17
 <211> 1854
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1851)

<223> CD2-CD2/Fc

<400> 17

atg agc ttt cca tgt aaa ttt gta gcc agc ttc ctt ctg att ttc aat 48
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15

gtt tct tcc aaa ggt gca gtc tcc aaa gag att acg aat gcc ttg gaa 96
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac att cct agt ttt 144
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45

caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa aaa act tca gac 192
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60

aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag act ttc aag gaa 240
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80

aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg aaa att aag cat 288
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca ata tat gat aca 336
 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110

aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg aag att caa gag 384
 Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125

agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc aac aca acc ctg 432
 Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140

acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta aac ctg tat caa 480
 Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160

gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc aca cac aag tgg 528
 Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175

acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca ggg aac aaa gtc 576
 Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190

agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct aaa gag att acg 624
 Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr
 195 200 205

aat gcc ttg gaa acc tgg ggt gcc ttg ggt cag gac atc aac ttg gac 672
 Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp
 210 215 220

att cct agt ttt caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa tgg gaa 720
 Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu
 225 230 235 240

aaa act tca gac aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag aaa gag 768
 Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu
 245 250 255

act ttc aag gaa aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga act ctg 816
 Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu
 260 265 270

aaa att aag cat ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag gta tca 864
 Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser
 275 280 285

ata tat gat aca aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt gat ttg 912
 Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu
 290 295 300

aag att caa gag agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act tgt atc 960
 Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile
 305 310 315 320

aac aca acc ctg acc tgt gag gta atg aat gga act gac ccc gaa tta 1008
 Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu
 325 330 335

aac ctg tat caa gat ggg aaa cat cta aaa ctt tct cag agg gtc atc 1056
 Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile
 340 345 350

aca cac aag tgg acc acc agc ctg agt gca aaa ttc aag tgc aca gca 1104
 Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala
 355 360 365

ggg aac aaa gtc agc aag gaa tcc agt gtc gag cct gtc agc tgt cct 1152
 Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro
 370 375 380

gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca 1200
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
385 390 395 400

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 1248
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
405 410 415

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg 1296
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
420 425 430

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac 1344
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
435 440 445

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag 1392
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
450 455 460

cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac 1440
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His
465 470 475 480

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 1488
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
485 490 495

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag 1536
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
500 505 510

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg 1584
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
515 520 525

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 1632
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
530 535 540

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 1680
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
545 550 555 560

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1728
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
565 570 575

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1776
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
580 585 590

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1824
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1854
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 18
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30

Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45

Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60

Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95

Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110

Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125

Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140

Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160

Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175

Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190

Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Lys Glu Ile Thr

195	200	205	
Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp			
210	215	220	
Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu			
225	230	235	240
Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu			
245	250	255	
Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu			
260	265	270	
Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser			
275	280	285	
Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu			
290	295	300	
Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile			
305	310	315	320
Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu			
325	330	335	
Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile			
340	345	350	
Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala			
355	360	365	
Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro			
370	375	380	
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
385	390	395	400
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
405	410	415	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
420	425	430	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
435	440	445	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
450	455	460	
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His			
465	470	475	480

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 485 490 495

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 500 505 510

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 515 520 525

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 530 535 540

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

<210> 19
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1131)
 <223> CTLA4/Fc

<400> 19
 atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15

gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30

agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45

aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag 192
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60

gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80

ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95

aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc 336
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 100 105 110

tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc 384
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 115 120 125

aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tct 432
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 130 135 140

gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca 480
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 145 150 155 160

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 528
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg 576
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac 624
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 195 200 205

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag 672
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220

cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac 720
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 768
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag 816
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 260 265 270

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg 864
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 275 280 285

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 912
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 960
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1008
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1056
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 340 345 350

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1104
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 355 360 365

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1134
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 20
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 21
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1506)
 <223> CTLA4-CTLA4/Fc

<400> 21
 atg agg acc tgg ccc tgc act ctc ctg ttt ttt ctt ctc ttc atc cct 48
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 gtc ttc tgc aaa gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc 96
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 20 25 30
 agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc 144
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 35 40 45
 aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag 192
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 50 55 60
 gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc 240
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 65 70 75 80
 ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg 288
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 85 90 95
 aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc 336
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 100 105 110
 tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc 384
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 115 120 125

aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tcg 432
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 130 135 140

gat aac atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga 480
 Asp Asn Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 145 150 155 160

ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act 528
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 165 170 175

gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa 576
 Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 180 185 190

gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat 624
 Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 195 200 205

gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act 672
 Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 210 215 220

atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg 720
 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 225 230 235 240

gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc 768
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 245 250 255

cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca gat tct gca gag ccc 816
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
 260 265 270

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa 864
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285

ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac 912
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300

acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac 960
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc 1008
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac 1056
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 340 345 350

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc tgt cac cag gac tgg 1104
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp
 355 360 365

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca 1152
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 370 375 380

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa 1200
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac 1248
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 405 410 415

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1296
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1344
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1392
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1440
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1488
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1509
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 22
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys His Gln Asp Trp
 355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 370 375 380

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 23
 <211> 1335
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1332)
 <223> TNFR1/Fc

<400> 23
atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg ctg ctg ccg ctg gtg ctc ctg 48
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

gag ctg ttg gtg gga ata tac ccc tca ggg gtt att gga ctg gtc cct 96
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

cac cta ggg gac agg gag aag aga gat agt gtg tgt ccc caa gga aaa 144
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

tat atc cac cct caa aat aat tcg att tgc tgt acc aag tgc cac aaa 192
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac 240
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc 288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
85 90 95

aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg 336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg 384
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc 432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag 480
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa 528
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg 576
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

aag ttg tgc cta ccc cag att gag aat gtt aag ggc act gag gac tca 624
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser

195	200	205	
ggc acc aca gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca			672
Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
210	215	220	
ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc			720
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc			768
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc			816
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
260	265	270	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg			864
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc			912
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc			960
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc			1008
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
325	330	335	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg			1056
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
340	345	350	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc			1104
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
355	360	365	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg			1152
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
370	375	380	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc			1200
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
385	390	395	400
tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag			1248
Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 25
 <211> 2028
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2025)

<223> TNFR2-TNFR1/Fc

<400> 25

atg gcg ccc gtc gcc gtc tgg gcc gcg ctg gcc gtc gga ctg gag ctc 48
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

tgg gct gcg gcg cac gcc ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac 96
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

gcc ccg gag ccc ggg agc aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag 144
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

aca gct cag atg tgc tgc agc aaa tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa 192
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

gtc ttc tgt acc aag acc tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac 240
 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

agc aca tac acc cag ctc tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt 288
 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

ggc tcc cgc tgt agc tct gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg 336
 Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

gaa cag aac cgc atc tgc acc tgc agg ccc gcc tgg tac tgc gcg ctg 384
 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

agc aag cag gag ggg tgc cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc 432
 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

ccg gcc ttc gcc gtg gcc aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg 480
 Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

tgc aag ccc tgt gcc ccg ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg 528
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

gat att tgc agg ccc cac cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg 576
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

aat gca agc atg gat gca gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt 624
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

atg gcc cca ggg gca gta cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc 672
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

caa cac acg cag cca act cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc 720
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

ttc ctg ctc cca atg ggc ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc gga tcc 768
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255

ggg aac att tca ctg gtc cct cac cta ggg gac agg gag aag aga gat 816
 Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp
 260 265 270

agt gtg tgt ccc caa gga aaa tat atc cac cct caa aat aat tcg att 864
 Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile
 275 280 285

tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca 912
 Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro
 290 295 300

ggc ccg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc 960
 Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe
 305 310 315 320

acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc 1008
 Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys
 325 330 335

cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg 1056
 Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg
 340 345 350

gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt 1104
 Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser
 355 360 365

gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg acc 1152
 Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
 370 375 380

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag 1824
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 595 600 605

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc 1872
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 610 615 620

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc tcc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg 1920
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 625 630 635 640

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg 1968
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 645 650 655

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct 2016
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 660 665 670

ccg ggt aaa tga 2028
 Pro Gly Lys
 675

<210> 26
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125
 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140
 Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Gly Ser
 245 250 255
 Gly Asn Ile Ser Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp
 260 265 270
 Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile
 275 280 285
 Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro
 290 295 300
 Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe
 305 310 315 320
 Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys
 325 330 335
 Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg
 340 345 350
 Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser
 355 360 365
 Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
 370 375 380
 Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His

Pro Gly Lys
675