



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월24일

(11) 등록번호 10-1504969

(24) 등록일자 2015년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/34 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7026971

(22) 출원일자(국제) 2007년04월04일

심사청구일자 2012년03월28일

(85) 번역문제출일자 2008년11월03일

(65) 공개번호 10-2009-0018894

(43) 공개일자 2009년02월24일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2007/000177

(87) 국제공개번호 WO 2007/112757

국제공개일자 2007년10월11일

(30) 우선권주장

PA 2006 00488 2006년04월04일 덴마크(DK)

PA 2006 00922 2006년07월05일 덴마크(DK)

(56) 선행기술조사문헌

WO20050573367 A1

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 폴리펩타이드의 농축 방법

**(57) 요약**

본 발명의 일측면은 다음을 포함하는 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 농축 방법에 관한 것이다:

- a) 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 원심분리 및/또는 여과 단계;
- b) a) 단계에서 얻어진 상청액 또는 보전액을 각각 농축하는 단계.

본 발명의 다른 측면은 목적 폴리펩타이드를 적어도 10 mg/ml 포함하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은 목적 폴리펩타이드를 75-250 mg/ml 포함하는 조성물의 포유동물에게 피하주사하기 위한 약의 제조용 용도에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은 PBGD 500-300 mg/ml의 조성물을 피하주사하는 것을 포함하는 포유동물의 급성 간헐성 포르피리아의 치료방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은 아릴설파타아제 A 50-300 mg/ml의 조성물의 피하주사를 포함하는 포유동물의 이염색성 백질이영양증용의 치료방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은 리소조밀 알파-만노시다아제 50-300 mg/ml의 조성물의 피하주사를 포함하는 포유동물의 리소좀 저장 장애 알파-만노시도시스의 치료방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 측면은 갈락토실세레브로시다아제 50-300 mg/ml의 조성물의 피하주사를 포함하는 포유동물의 크라베병의 치료방법에 관한 것이다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

다음을 포함하는 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물의 농축 방법:

- a) 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물의 원심분리 또는 여과에 의하여 집합체를 제거하는 단계;
- b) a) 단계에서 얻어진 원심분리한 상청액 또는 여과한 보전액을 각각 농축하는 단계;
- c) b) 단계에서 얻어진 농축된 상청액 또는 농축된 보전액으로부터 적어도 아릴설파타아제 A 25 mg/ml를 포함하는 등장액을 얻는 단계; 및
- d) c) 단계로부터 얻어진 등장액을 주사제로 포뮬레이션하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아릴설파타아제 A는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 방법:

- i ) SEQ ID NOs 18, 19 및 20 중 어느 하나에 의해 정의된 아미노산 서열; 및
- ii) SEQ ID NOs 18, 19 및 20 중 어느 하나와 적어도 75% 동일한 아미노산 서열.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, b) 단계는 동결건조 또는 증발에 의하여 수행되는 것인 방법.

### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, b) 단계는 한외여과법에 의하여 수행되는 것인 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, b) 단계는 접선 유동 여과에 의하여 수행되는 것인 방법.

### 청구항 6

제4항에 있어서, b) 단계는 원심분리 장치에 의하여 수행되는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 아릴설파타아제 A를 포함하는 상기 조성물은 글라이신, L-세린, 슈크로오즈 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 더 포함하는 방법.

### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 아릴설파타아제 A를 포함하는 상기 조성물은 TRIS-HCL, 구연산 나트륨 및  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 버퍼를 더 포함하는 방법.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, b) 단계로부터 얻어진 아릴설파타아제 A를 포함하는 농축된 조성물의 멸균 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, b) 단계로부터 얻어진 아릴설파타아제 A를 포함하는 농축된 조성물의 동결건조 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, a) 단계의 원심분리는 1800-2500 g에서 수행되는 것인 방법.

### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, a) 단계의 여과에서 사용되는 필터는 0.20-5.0 마이크로미터 범위의 기공 크기를 갖는 것인 방법.

### 청구항 13

제1항에 있어서, a) 단계 이전에 다음 단계들 중 하나 이상을 더 포함하는 방법:

- i ) 배양 상태의 원핵세포 또는 척추동물 세포에서 아릴설파타아제 A의 재조합 발현 단계;
- ii ) 하나 이상의 크로마토그래피 단계에 의한 아릴설파타아제 A의 정제 단계; 및
- iii) 단계 ii)에서 정제된 아릴설파타아제 A가 있는 용액을 포뮬레이션 버퍼를 위해 교체하는 단계.

### 청구항 14

제13항에 있어서, ii) 단계의 크로마토그래피는 친화 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 하이드록시아파타이트 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 15

제13항에 있어서, a) 단계 이전에 다음 단계들을 포함하는 방법:

- i ) 아릴설파타아제 A의 재조합 발현 단계;
- ii) i ) 단계로부터의 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 친화 크로마토그래피시키는 단계; 및
- iii) ii) 단계의 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 이온교환 크로마토그래피시키는 단계.

### 청구항 16

제13항에 있어서, a) 단계 이전에 다음 단계들을 포함하는 방법:

- i ) 아릴설파타아제 A의 재조합 발현 단계;
- ii) i ) 단계로부터의 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 친화 크로마토그래피시키는 단계;
- iii) ii) 단계로부터의 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 이온교환 크로마토그래피시키는 단계; 및
- iv) iii) 단계로부터의 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 하이드록시아파타이트 컬럼시키는 단계.

### 청구항 17

제13항에 있어서, 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 핵산 서열을 사용한 재조합 발현 단계를 포함하는 방법:

- i ) SEQ ID NOS 16 및 17 중 어느 하나에 의하여 정의된 핵산 서열; 및
- ii) SEQ ID NOS 16 및 17 중 어느 하나와 적어도 75% 동일한 핵산 서열.

### 청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서, ii) 단계로부터 얻어진 아릴설파타아제 A를 포함하는 조성물을 희석 또는 정용여과하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 19

삭제

### 청구항 20

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**명세서**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 목적 폴리펩타이드의 농축 방법, 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 피하주사용 약으로서의 용도 및 목적 폴리펩타이드를 적어도 10 mg/ml 포함하는 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 몇몇의 폴리펩타이드는 특정 질병의 예방 및/또는 치료용 약으로서 유용하다. 약을 피하주사할 수 있음은 환자가 그들 자신에게 약을 투여하는 것을 쉽게 만드는 것과 같은 이점이 있다.

[0003] 얼마나 큰 부피를 피하주사하는 것이 가능한지에 대하여 생리학적인 제한이 있다. 그러므로, 피하 투여되는 약의 장점은 환자들이 충분한 양의 약을 투여받는 것을 보장하고 및/또는 다수의 피하주사를 피하게 하기 위하여, 고농도의 적용이 가능하다는 것이다.

[0004] 국제특허 WO 99/37325는 햄 생합성 경로(heme biosynthetic pathway)에 속하는 효소들의 활성이 전혀 없거나 또는 결핍된 것에 의해 야기되는 질병의 치료 및 예방의 방법을 개시하고 있다. 국제특허 WO 03/002731은 상업적인 스케일에서 재조합 포르포빌리노겐 디아미나아제(porphobilinogen deaminase)의 정제 공정과 정제된 포르포빌리노겐 디아미나아제의 약 제조용 용도를 발표하고 있다. 유사하게, 국제특허 WO 02/099092 및 WO 2005/094874는 리소조밀 알파-만노시다아제(lysosomal alpha-mannosidase) 및 이것의 치료상의 용도를 제공한다. 마지막으로, 국제특허 WO2005/073367는 아릴설피타아제 A(aryl sulfatase A)의 정제 공정 및 이염색성

백질이영양증(metachromatic leukodystrophy)의 치료에서의 효소의 용도를 제공한다.

본 발명은 목적 폴리펩타이드의 농축 방법 및 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 포유동물에게 피하주사하기 위한 약의 제조용 용도에 관한 것이다.

## 발명의 상세한 설명

### [정의]

본 발명의 목적을 위하여, 서열의 배열과 상동성은 단백질뿐만 아니라 DNA 배열에도 유용한 완전 스미스-워터만 배열(full Smith-Waterman alignment)을 이용하여 수행될 수 있다. 디폴트 점수를 계산하는 매트릭스 BLOSUM50과 동일성 매트릭스는 단백질과 DNA 배열에 각각 사용된다. 캡(gap)의 첫번째 잔기(residue)에 대한 폐널티(penalty)는 단백질에 대해서는 -12이고 DNA에 대해서는 -16인 반면 캡의 추가적인 잔기에 대한 폐널티는 단백질에서는 -2이고 DNA에 대해서는 -4이다.

배열은 FASTA 패키지 버전 v20u6(W. R. Pearson and D. J. Lipman(1988), “Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85:2444-2448 및 W. R. Pearson(1990) “Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA”, Methods in Enzymology, 183:63-98)에 의하여 만들어질 수 있다.

단백질 서열의 다중배열은 “ClustalW” (Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680)을 사용하여 만들어질 수 있다. DNA 서열의 다중배열은 아미노산을 DNA 서열로부터 상응하는 코돈으로 대체하는 주형(template)으로서 단백질 배열을 사용하여 수행될 수 있다.

본 발명에서, “E. C.” (Enzyme Class; 효소 분류)라는 용어는 국제적으로 인정되는 효소 분류 시스템인 Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, Inc.을 인용한다.

아미노산 서열, 예를 들어 단백질, 또는 핵산 서열의 본 발명에서 사용된 용어 “유래(origin)”는 그것이 파생된 유기체(organism)를 인용하는 것으로 이해된다. 상기 서열은 해당 기술 분야에서 당업자에게 잘 알려진 유전자 기술 방법을 사용하여 다른 유기체에 의해 발현될 수 있다. 이는 또한 화학적으로 합성되어온 서열을 포함한다. 게다가, 상기 서열은 코돈 최적화와 같은 사소한 변화, 즉 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 핵산 서열에서의 변화를 포함할 수 있다.

### 목적 폴리펩타이드

(endoglucanase), 에스테라아제(esterase), 알파-갈락토시다아제(alpha-galactosidase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 알파-글루코시다아제(alpha-glucosidase), 베타-글루코시다아제(beta-glucosidase), 인베르타아제(invertase), 라카아제(laccase), 리파아제(lipase), 만노시다아제(mannosidase), 뮤타나아제(mutanase), 옥시다아제(oxidase), 팩틴분해효소(pectinolytic enzyme), 페록시다아제(peroxidase), 포스포리파아제(phospholipase), 피타아제(phytase), 폴리페놀록시다아제(polyphenoloxidase), 단백질분해효소(proteolytic enzyme), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 트랜스글루타미나아제(transglutaminase), 자일리나아제(xylanase), 또는 베타-자일로시다아제(beta-xylosidase)일 수 있다.

[0014] 목적 폴리펩타이드는 특히 약으로서 유용한 폴리펩타이드일 수 있다.

[0015] 적당한 목적 폴리펩타이드의 예는 포르포빌리노겐 디아미나아제(phorphobilinogen deaminase), 아릴설파타아제, 알파-만노시다아제 및 갈락토세레브로시다아제(galactocerebrosidase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 원칙적으로 어떤 근원으로부터 유래될 수 있는 목적 폴리펩타이드는 본 발명의 방법에 따라 처리될 수 있다. 특정한 구현예에서 목적 폴리펩타이드는 인간 유래의 것일 수 있다. 특히, 본 발명에서 인간에게 투여되는 약의 제조용 목적 폴리펩타이드를 사용하는 것은 원하지 않는 알레르기 반응의 위험을 최소화할 수 있기 때문에 인간 유래의 폴리펩타이드일 수 있다. 예를 들어 동질이형(polymorphism)에 기인하는 인간 폴리펩타이드의 자연적인 변화는 본 발명에서 “인간 유래” 용어에 포함된다.

[0017] 목적 폴리펩타이드는 특히 재조합 단백질과 같이 생산될 수 있다. 즉, 목적 폴리펩타이드를 부호화한 뉴클레오파이드 서열은 목적 폴리펩타이드의 발현을 위한 세포에 도입될 수 있다. 재조합 발현은 상동(homologous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 즉, 목적 폴리펩타이드는 자연적으로 발현된 세포에서 발현(상동 발현)되거나 또는 자연적으로 발현되지 않은 세포에 의해 발현(이종 발현)될 수 있다.

[0018] 목적 폴리펩타이드의 재조합은 특정 목적 폴리펩타이드의 재조합 생산에 적당한 어떤 세포에 의해 발현될 수 있다. 적당한 세포의 예는 *E.coli* 세포 또는 *Bacillus* 세포와 같은 원핵세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적당한 진핵세포의 예는 효모 세포 또는 중국 햄스터 난소 세포(chinese hamster ovary, CHO)와 같은 포유류의 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 선택적으로, 인간 세포일 수 있다.

[0019] 글리코실화된 폴리펩타이드의 발현을 위한 적당한 숙주세포는 다세포생물로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 그러나, 숙주세포는 척추동물 세포일 수도 있고, 배양액(조직 배양액) 내에서 척추동물 세포의 증식은 일반적인 과정이 된다.

[0020] “재조합 폴리펩타이드” 또는 “재조합 목적 폴리펩타이드” 용어는 여기서 재조합 생산된 폴리펩타이드를 나타낸다.

[0021] 특정 목적 폴리펩타이드에 대한 참조예는 또한 본 발명에서 목적 폴리펩타이드와 기능적으로 동등한 부분 또는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 만약 목적 폴리펩타이드가 효소이면, 상기 효소와 기능적으로 동등한 부분은 도메인(domain) 또는 서브시퀀스(subsequence)가 완전-길이 효소(full-length enzyme) 또는 선택적으로 촉매에 대한 유전자 부호화와 같이 실질적으로 동일한 효소 활성을 발휘할 수 있게 하는 필수적인 촉매 부위(catalytic site)를 포함하는 효소의 도메인 또는 서브시퀀스일 수 있다. “실질적으로 동일한 효소 활성” 용어는 자연 효소의 활성의 적어도 50%, 바람직하게 적어도 60%, 보다 바람직하게 적어도 70%, 보다 바람직하게 적어도 75%, 보다 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 85%, 보다 바람직하게 적어도 90%, 보다 바람직하게 적어

도 95%, 및 가장 바람직하게 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 갖는 동등한 부분 또는 유사체를 언급 한다. 효소적으로 동등한 효소의 유사체의 예는 기능적 형태의 효소의 촉매 부위를 포함하는 융합 단백질(fusion protein)일 수 있으나, 또한 다른 종으로부터 유래된 효소의 상동 변형체일 수도 있다. 또한, 상응하는 효소의 특정 효소 활성을 흡내낸 완전 합성된 분자는 또한 “효소의 동등한 유사체”를 구성한다.

[0022]

일반적으로, 당업자는 효소 활성의 결정을 위한 적당한 분석(assays)을 쉽게 고안할 수 있다. 그러나, PBGD의 경우, 적당한 분석표가 국제특허 WO 03/002731의 실시예 2 뿐만 아니라 본 명세서의 실험 부분에 기재되어 있다. 아릴설파타아제 뿐만 아니라 이의 자연의 기질은 또한 합성체(synthetic), 색원체 기질(chromogenic substrate), 파라-니트로카테콜 설페이트(Nitrocatechol sulfate, pNCS)의 가수분해를 촉진할 수 있다. 생산물, 파라-니트로카테콜(pNCS)은 515 nm의 빛을 흡수한다. 아릴설파타아제 활성의 결정을 위한 분석은 국제특허 WO 2005/073367와 Fluharty et al. 1978, Meth. Enzymol. 50:537-47에 상세하게 기술되어 있다. LAMAN의 경우, 적당한 효소 활성 분석은 국제특허 WO 02/099092에 개시되어 있다.

#### 포르포빌리노겐 디아미나아제

일 구현예에서 본 발명의 목적 폴리펩타이드는 포르포빌리노겐 디아미나아제(또는 포르포빌리노겐 암모니아-리아제(중합된)로 알려진), E.C. 4.3.1.8(Waldenström 1937, J. Acta. Med. Scand. Suppl. 8)일 수 있다. 포르포빌리노겐 디아미나아제는 햄 생합성 경로의 세번째 효소이다. E.C. 4.3.1.8은 E.C. 2.5.1.61로 이동되었고, 그리하여 포스포빌리노겐 디아미나아제(PBGD)는 현재 이 E.C. 번호하에 놓여 있다.

포스포빌리노겐 디아미나아제는 4 포스포빌리노겐 + H<sub>2</sub>O = 히드록시메틸빌란(hydroxymethylbilane) + 4NH<sub>3</sub>의 반응을 촉진시킨다.

PBGD는 PBGD의 결합(활성의 50% 감소)에 의해 야기되는 남성의 상염색체 우성질병(autosomal dominant disorder)인 급성 간헐성 포르피리아(acute intermittent porphyria, AIP)와 관련하여 중요하다(이와 관련한 더 상세한 내용은 국제특허 WO 01/07065을 참조).

포르포빌리노겐 디아미나아제는 짧게 말하면 PBGD로 알려져 있으며 본 발명에서 이를 두 용어는 서로 호환성 있게 사용될 수 있다.

PBGD의 재조합 발현을 위해서 숙주세포는 특히 효모 세포 또는 *E. coli* 세포일 수 있다.

재조합 *E. coli* 세포 구조의 상세한 예에 대한 것은 국제특허 WO 01/07065의 실시예 1에 따라 만들어지고, 생쥐 PBGD 발현이 가능한 HeLa 세포 및 NIH 3T3 세포에 대한 것은 국제특허 WO 01/07065의 실시예 6에 따라 만들어진다.

“재조합 포르포빌리노겐 디아미나아제(rPBGD)” 용어는 여기서 재조합 생산된 PBGD를 나타낸다. 다음에서, 이 효소와 재조합 인간 형태는 각각 “PBGD”와 “rhPBGD”로 불리울 것이다. 이 용어는 또한 PBGD의 효소적으로 동등한 부분 또는 유사체 내에 포함된다. 효소의 효소적으로 동등한 부분의 일례는 도메인 또는 서브시퀀스가 완전-길이 효소 또는 대안적으로 촉매에 대한 유전자 부호화와 같이 실질적으로 같은 효소 활성을 발휘할 수 있게 하는 필수적인 촉매 부위를 포함하는 효소의 도메인 또는 서브시퀀스일 수 있다. “실질적으로 같은 효소 활성” 용어는 국제특허 WO 03/002731의 실시예 2에서 기술된 rhPBGD 활성 분석에서 측정된 자연 인간 rhPBGD의 활성의 적어도 50%, 바람직하게 적어도 60%, 보다 바람직하게 적어도 70%, 보다 바람직하게 75%, 보다 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 85%, 보다 바람직하게 적어도 90%, 보다 바람직하게 적어도

95%, 및 가장 바람직하게 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 갖는 동등한 부분 또는 유사체 효소를 의미한다. 효소적으로 동등한 효소의 유사체의 예는 기능적 형태의 효소의 촉매 부위를 포함하는 융합 단백질일 수 있으나, 또한 다른 종으로부터 유래된 효소의 상동 변형체일 수도 있다. 또한, 상응하는 효소의 특정 효소 활성을 흡내낸 완전 합성된 분자는 또한 “효소의 동등한 유사체”를 구성한다.

[0031] 본 발명에서 사용될 수 있는 PBGD의 예는 본 명세서의 서열 1-10, 또는 Genebank no. X04217, X04808 또는 M95623에 나타낸 것들 중 어떤 것을 포함한다.

아릴설파타아제

[0032] 본 발명의 다른 구현예에서 목적 폴리펩타이드는 아릴설파타아제 A일 수 있다.

[0034] 아릴설파타아제 A는 세레브로시드(cerebroside) 3-설페이트(sulfate) + H<sub>2</sub>O = 세레브로시드 + 설페이트(sulphate)의 반응을 촉진시킨다.

[0035] ASA(arylsulfatase A)는 인간의 간, 태반, 및 소변을 포함하는 다양한 근원으로부터 정제되어왔다. 그것은 낮은 등전점(isoelectric point)을 갖는 산성의 당단백질이다. pH 6.5 이상에서, 효소는 약 110 kDa의 분자량을 갖는 이량체(dimer)로서 존재한다. ASA는 pH 4.5에서 팔량체(octamer)를 형성하는 pH-의존적인 중합을 겪는다. 인간의 소변에서, 효소는 63과 54 kDa의 두개의 동일하지 않은 서브유니트(subunit)로 구성되어 있다. 인간의 간, 태반, 및 섬유아 세포로부터 정제된 ASA는 또한 55와 64 kDa 사이에서 변화하는 다소 다른 크기의 두개의 서브유니트로 구성되어 있다. 다른 리소좀 효소의 경우에서와 같이, ASA는 글리코실화된 전구체로서 막-부착 리소좀(membrane-bound ribosomes)에서 합성된다. 그 다음에 소포체와 골지체를 통하여 통과하고, 여기에서 ASA의 N-링크된 다당류는 복합체 유형의 인산화 및 황산화된 다당류의 형성으로 처리된다(Waheed A et al. Biochim Biophys Acta. 1985, 847, 53-61, Braulke T et al. Biochem Biophys Res Commun. 1987, 143, 178-185). 정상의 배양된 섬유아 세포에서, 62 kDa의 전구체 폴리펩타이드가 생산되고, 이것은 산성의 용해소체전이 엔도좀(prelysosomal endosome)(Kelly BM et al. Eur J Cell Biol. 1989, 48, 71-78)에 결합하는 만노오스-6-인산염(mannose-6-phosphate) 리셉터(Braulke T et al. J Biol Chem. 1990, 265, 6650-6655)를 경유하여 이동시킨다.

[0036] 아릴설파타아제 A는 특히 인간의 유래일 수 있다. 인간 ASA 신호 웨პ타이드의 길이(18 아미노산)는 공통배열과 신호 서열에 대한 특정 처리 부위(processing site)에 기초로 한다. 그러므로, 유래된 인간 ASA cDNA(EMBL GenBank accession numbers J04593 and X521151)로부터 신호 웨პ타이드의 분할은 잔기 번호 18(Ala) 후에 모든 세포에서 수행되어야만 하며, 결과적으로 인간 ASA의 성숙된 형태가 된다. 다음에서, 재조합 아릴설파타아제 A는 rASA로 줄여서 쓸 것이고, 인간 ASA의 성숙한 형태를 포함한 아릴설파타아제 A의 성숙한 형태는 “mASA”로 불리울 것이며 성숙한 재조합 인간 ASA는 “mrhASA”로 불리울 것이다.

[0037] 단백질 변형은 두개의 진핵생물 설파타아제(ASA와 아릴설파타아제 B(ASB))에서와 남조류 식물 *Volvox carteri*(Schmidt B et al. Cell. 1995, 82, 271-278, Selmer T et al. Eur. J. Biochem. 1996, 238, 341-345)로부터 하나에 대해서 동등시되어 왔다. 이러한 변이는 알려진 설파타아제들 사이에서 보존되는 시스테인 잔기의 2-아미노-3-옥소프로파온산 잔기로의 전환을 인도한다(Schmidt B et al. Cell. 1995, 82, 271-278). 신규한 아미노산 유도체는 또한 C\*-포르밀글리신(FGly)으로 인정된다. MSD 세포로부터 유래된 ASA와 ASB에서, Cys-69 잔기는 유지된다. 결과적으로, Cys-69에서 FGly-69로의 전환은 촉매적으로 활성이 있는 ASA와 ASB의 발생이 요구되며, 이러한 단백질 변형의 결핍은 MSD의 원인이다. Cys-69은 18 잔기 신호 웨პ타이드를 갖는 전구체 ASA로 언급된다. mASA에서 언급된 시스테인 잔기는 Cys-51이다. 그 이상의 조사는 mASA의 Cys-51 주위의 16 잔기의 선형 서열이 전환을 지시하는데 충분하며, 단백질 변형은 폴리펩타이드가 아직 그 본래의 구조로 접어지지 않았을 때 소포체로의 동시 번역의 단백질 전좌(co-translational protein translocation) 후기단계

또는 그 이후에 일어날 수 있음을 나타낸다(Dierks T et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94, 11963-1196, Wittke, D. et al. (2004), Acta Neuropathol. (Berl.), 108, 261-271).

[0038] ASA의 다중 형태는 인간 소변, 백혈구, 혈소판, 배양된 섬유아 세포 및 간으로부터 효소 제조의 전기영동 (electrophoretic)과 등전조법(isoelectric focusing)으로 증명되어왔다. 엔도글리코시다아제 H(endoglycosidase), 시알리다아제(sialidase), 및 알칼리 인산염에 의한 처리는 분자 크기와 전기영동 패턴의 복잡성을 감소시키며, 이것은 ASA의 많은 전위 이질성이 효소의 탄수화물 함량의 변동에 기인한다는 것을 제안한다.

[0039] 아릴설파타아제 A는 특히 혈액뇌관문을 가로지를 수 있는 아릴설파타아제 A의 형태 및/또는 뇌 안의 목적 세포로의 입장을 위한 특정 표시를 갖는 rASA의 형태일 수 있다. 특히, 아릴설파타아제 A는 만노오스-6-인산염 경로를 경유하여 생체 안에서 충분히 흡수되는 rASA일 수 있다.

[0040] 그러므로, ASA는 특히 혈액뇌관문에 걸쳐 및/또는 일반적으로 세포막을 가로지르는 ASA의 수송을 증가 및/또는 용이하게 할 수 있는 소위 표지, 웹타이드 또는 매개체(vehicles)이거나 매개체로서의 독소와 같은 단백질에 공유결합될 수 있다(Schwarze et al., Trends Cell Biol. 2000; 10(7):290-295; Lindgren et al., Trends Pharmacol. Sci. 2000; 21(3):99-103). 그러한 웹타이드 서열을 함유하는 ASA 분자는 발현 기술에 의해 생산될 수 있다. 단백질 형질도입(protein transduction) 공정은 특정한 세포 형태가 아니며 형질도입 공정이 일어나는 메커니즘은 완전히 밝혀진 것은 아니나, 이것이 몇몇 종류의 막 교란(membrane perturbation)과 수용체(receptor)에 독립적인 침투 공정에 의해 일어나는 것으로 여겨지고 있다. 부분적으로 접히지 않은 상태의 분자는 공정을 용이하게 할 수 있으나 필수적인 것은 아니다.

[0041] 적당한 표지의 예는 만노오스-6-인산염 표지를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 매개체로서의 웹타이드 또는 단백질의 예는 소위 단백질-형질도입 도메인을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적당한 단백질-형질도입 도메인의 예는 참고에 의해 여기에 편입된 국제특허 WO 2005/073367에 언급된 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러므로 단백질-형질도입 도메인은 HIV TAT단백질-YGRKKRRQRR(Schwarze et al., Trends Cell Biol. 2000; 10(7):290-295), 서열에 대한 그 이상의 알파-헬리시티(alpha-helicity)와 양친매 성질을 주는 TAT-YARAARQARA의 합성 베플(Ho et al., Cancer Res. 2001; 61(2):474-477), 베타-3 인테그린(integrin) 또는 Kaposi의 육종 FGF로부터 소수성 신호 서열 부분을 기초로 한 다른 아미노산 및 웹타이드와 조합된 폴리 -R 또는 기본 -R 및 -K 잔기의 혼합물로 이루어진 합성 선도자 웹타이드(Duncan et al. Biopolymers 2001; 60(1):45-60)로부터의 11 잔기 기본 웹타이드일 수 있다.

[0043] 용액과 같은 적당한 독소의 예는 참조에 의해 여기에 편입된 국제특허 WO 2005/073367를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] ASA는 특히 부호화하는 다음의 핵산 서열을 포함한다:

[0045] (a) 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 2의 아미노산 서열;

[0046] (b) 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등한, (a)의 서열의 일부

[0047] (c) (a) 또는 (b)의 서열 중 어느 하나와 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 유사체, 상기 유사체는 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등함.

[0048] 본 발명에서, 아미노산 서열 또는 아미노산 서열의 일부는 많은 양의 아릴설파타아제 A 기질 pNCS를 37°C에서

국제특허 WO 2005/073367의 실시예 1에 기술되어 있는 아릴설파타아제 A 활성을 측정하기 위한 분석에 의해 결정되는 적어도 20 U/mg 폴리펩타이드(바람직하게는 50 U/mg 폴리펩타이드)의 특정 활성에 대응하는 속도로 가수분해할 수 있는 폴리펩타이드, 및/또는 국제특허 WO 2005/073367의 실시예 2에 기술되어 있는 분석에서 25 mU/mg의 투약 수준에서 배양에 의해 분석되었을 때 MLD 섬유아 세포에 로딩된 라벨을 붙인 아릴설파타아제 A 기질, fx. 14C 팔미토일 설파타이드(palmitoyl sulfatide)의 적어도 40%를 가수분해할 수 있는 폴리펩타이드이다.

[0049] 다른 구현예에서 ASA는 특히 다음을 포함한다:

[0050] (a) 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 1의 핵산 서열;

[0051] (b) 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등한, 아미노산 서열을 부호화한 (a)의 서열의 일부;

[0052] (c) (a) 또는 (b)의 서열 중 어느 하나와 적어도 75%의 서열 동일성을 갖으며 동시에 아미노산 서열을 부호화하는 핵산 서열 유사체, 상기 유사체는 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등함.

[0053] 위에서 언급된 핵산 서열과 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 1 간의 서열 동일성 정도는 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 것이 바람직하다. 위에서 언급된 핵산 서열에 의해 부호화된 아미노산 서열과 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 2 간의 서열 동일성 정도는 적어도 88%, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 것이 마찬가지로 바람직하다.

[0054] 본 발명의 목적을 위하여, 아릴설파타아제 A는 재조합 효소인 것이 바람직하고, 보다 바람직한 것은 재조합 인간 아릴설파타아제 A(rhASA)이다.

[0055] rhASA는 포유동물의 세포 또는 세포주에서 생산되고, 상기 포유동물의 세포 또는 세포주는 만노오스-6-인산염 경로를 경유하여 생체 안에서 충분히 세포이물흡수되는 rASA의 복합당질(glycoform)을 생산하는 것이 바람직하다. 특히, 바람직한 rASA의 복합당질은 만노오스-6-인산염 경로를 경유하여 생체 안에서 충분한 세포이물흡수를 가능하게 하는 많은 양의 노출된 만노오스-6-인산염을 포함한다.

[0056] 특정 구현예에서, rASA의 생산된 복합당질의 적어도 하나는 CHO 세포에서 생산된 복합당질과 유사하다.

[0057] 성숙한 인간 아릴설파타아제 A의 51 위치의 시스테인 잔기의 후번역 변형(post translational modification)은 효소의 활성과 상응한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서 아릴설파타아제 A 또는 그의 동등물의 생산은, 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 2의 Cys-69에 대응하는 아미노산이 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 3의 Fgly-51에 상응하는 포르밀글리신으로 전환되는 효소의 아형(isoform)을 포함하는 생산물을 생기게 하는 속도와 조건 하에서 일어난다. 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID 4는 18 아미노산 신호 펩타이드의 분할 후, 그러나 C-51의 변이 이전에 성숙한 인간 아릴설파타아제 A를 나타낸다.

[0058] 그러므로, 본 발명의 다른 구현예에서 ASA 또는 그의 효소적 동등물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0059] (a) 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 3의 아미노산 서열;

[0060] (b) 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등한 (a)의 서열의 일부;

[0061] (c) (a) 또는 (b)의 서열 중 어느 하나와 적어도 75%의 서열 동일성을 가지며 동시에 재조합 인간 아릴설파타아제 A와 효소적으로 동등한 아미노산 서열.

[0062] 본 발명에 따라 생산된 효소와 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 3 또는 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 4 간의 서열 동일성 정도는 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 것이 바람직하다.

[0063] 생물학적 활성과 생체 안에서 효소의 효과를 위하여 최적화되는 것이 요구되며, 만약 충분한 양의 효소가 위에서 기술된 바와 같이 글리코실화 패턴을 획득하고 51 위치에서 후변역으로 변이된다면 유리하다. 그러므로, 본 발명의 ASA의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%는 위에서 기술된 복합당질/아형일 수 있다.

[0064] 본 발명의 ASA는 그것의 구조에서 보면 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO 3에 따른 rASA와 다를 수 있다. Cys-51 주위의 아미노산 잔기의 서열은 동일하거나 또는 SEQ ID NO 3의 상응하는 서열에 대한 높은 서열 동일성을 가진다는 것은 유리하다. 그러므로, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5와 같은 20 아미노산의 선형서열 또는 아릴설파타아제 A의 Cys-51 주위의 4 아미노산 잔기는 2005/073367의 SEQ ID NO 3에 상응하는 서열과 동일하거나 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%와 같은 적어도 90% 동일한 것이 바람직하다. 리소좀 내의 rASA의 활성 형태가 팔량체인 것과 같이 본 발명의 ASA는 특히 팔량체이거나 또는 생리학적인 조건 하에서 팔량체로 회합하는 rASA일 수 있다.

[0065] rASA의 촉매 활성으로서 이해되고 있는 ASA의 효소 활성은 검출할 수 있는 기질 또는 검출할 수 있는 최종 생산물을 인도하는 기질의 rASA 매개의 가수분해에 기초한 효소 분석표에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 측면에서, 분석은 최종 생산물, 515 nm의 빛을 흡수하는 파라-니트로카테콜(pNC)을 갖는 합성체, 색원체 기질, 파라-니트로카테콜 설레이트(pNCS)에 기초한 것이 바람직하다.

#### 리소조멸 알파-만노시다아제

[0066] 또 다른 구현예에서 목적 폴리펩타이드는 리소조멸 알파-만노시다아제(LAMAN)일 수 있다. 리소조멸 알파-만노시다아제는 EC 3.2.1.24에 속하며, N-링크된 당단백질의 예정된 분해(ordered degradation) 동안에 알파-D-만노사이드에서 비환원성 말단으로부터 비환원성 알파-만노시다아제 잔기를 가수분해하는 엑소글리코시다아제(exoglycosidase)이다(Aronson and Kuranda FASEB J 3:2615-2622. 1989). 본 발명에서 리소조멸 알파-만노시다아제 용어는 약어인 LAMAN과 호환성있게 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 LAMAN은 특히 인간의 유래일 수 있다. 인간 효소는 15, 42 및 70 kD의 세개의 주요 당펩타이드(glycopeptide)에서 처리되는 49 잔기의 추정 단일 웨بت이드와 함께 1011 아미노산의 단일 폴리펩타이드로서 합성된다(Nilssen et al. Hum. Mol. Genet. 6, 717-726. 1997).

[0069] LAMAN(MANB)의 유전자 부호화는 염색체 19(19cen-q12)에 위치된다(Kaneda et al. Chromosoma 95:8-12. 1987). MANB는 길이 21.5 kb인 24 엑손(exon)으로 구성되어 있다(GenBank accession numbers U60885-U60899; Riise et al. Genomics 42:200-207. 1997). LAMAN 전사(transcript)는 3,500 뉴클레오타이드(nts) 이상이고, 1,011 아미노산을 부호화하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 함유한다(GenBank U60266.1).

[0070] 클로닝(cloning)과 LAMAN을 부호화하는 인간 cDNA의 서열분석은 세개의 논문에서 발표되었다(Nilssen et al. Hum. Mol. Genet. 6, 717-726. 1997; Liao et al. J. Biol. Chem. 271, 28348-28358. 1996; Nebes et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 239-245. 1994). 이상하게도, 세개의 서열은 동일하지 않다. Nilssen 등의 서열(accession # U60266.1)과 비교하였을 때, 발린에서 아스파르트산 치환을 야기하는 1670과 1671 위치에서 TA에서 AT로의 변화는 Liao 등과 Nebes 등에 의해 발견되었다.

- [0071] 가장 바람직한 구현예에서, 리소조멸 알파 만노시다아제는 국제특허 WO 2005/094874의 SEQ ID NO 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0072] 실용적이고 경제적인 이유에서 본 발명의 LAMAN은 제조합으로 생산되는 것이 바람직하다. 재조합 생산에 의해 큰 단편이 만노오스-6-인산염을 함유하고 있는 효소의 제조품(preparation)을 얻는 것이 가능할 수 있다. 재조합 생산은 국제특허 WO 2005/094874의 SEQ ID NO 2의 서열을 포함하는 핵산 서열을 사용한 세포의 핵내주입(transfection) 후에 달성될 수 있다.
- [0073] 알파-만노시다아제는 이를테면 신체의 내장 기관의 세포에서 충분한 수용체 매개 업테이크(uptake)를 보장하는 글리코실화 프로파일(profile)을 유발하는 것과 같이 포유동물의 세포 시스템에서 만들어지는 것이 바람직하다. 특히, CHO, COS 또는 BHK 세포의 효소의 생산은 만노오스-6-인산염 잔기의 추가에 의한 효소의 충분한 후변역 변형을 보장한다는 것이 발견되었다. 게다가, 올바른 시알릴화(sialylation) 프로파일이 얻어진다. 노출된 갈락토오스 잔기 때문에 올바른 시알릴화는 간에 의한 업테이크를 예방하기 위하여 중요한 것으로 알려져 있다.
- [0074] 보다 바람직한 구현예에서 포유동물의 세포 시스템은 그러므로 CHO, COS, 세포 또는 BHK 세포를 포함하는 군으로부터 선택된다(Stein et al. J. Biol. Chem. 1989, 264, 1252-1259). 포유동물의 세포 시스템은 인간의 섬유아세포 세포주인 것이 바람직할 수 있다.
- [0075] 가장 바람직한 구현예에서, 포유동물의 세포 시스템은 CHO 세포주이다.
- [0076] 다른 구현예에서 리소조멸 알파-만노시다아제는 제조품의 단편이 만노오스 6-인산염 군을 운반하는 하나 이상의 N-링크된 올리고당을 갖는 리소조멸 알파 만노시다아제를 구성하는 리소조멸 알파-만노시다아제의 제조품일 수 있다.
- [0077] 상기 리소조멸 알파-만노시다아제 제조품의 단편이 만노오스 6-인산염 리셉터에 결합할 수 있는 것이 보다 바람직하다.
- [0078] 만노오스-6-인산염 수용체에 결합하는 효소의 능력은 국제특허 WO 2005/094874의 실시예 1에서 기술된 바와 같은 시험관 내 분석에서 결정될 수 있다. 여기서, MPR 친화력 300 매트릭스에 대한 효소의 결합은 만노오스-6-인산염 수용체에 결합능의 측정을 제공한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서 만노오스-6-인산염 수용체에 대한 효소의 결합은 시험관 내에서 일어난다.
- [0079] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에서 이러한 단편은 리조소멸 알파-만노시다아제의 제조품의 활성의 1-75%, 예를 들어 2-70%, 예를 들어 5-60%, 예를 들어 10-50%, 예를 들어 15-45%, 예를 들어 20-40%, 예를 들어 30-35%와 같은 1-75%에 상응한다.
- [0080] 따라서, 리소조멸 알파-만노시다아제는 만노오스 6-인산염 의존의 결합이 Man-6-P-리셉터 매트릭스에 대한 효소 양의 2-100%, 5-95%, 10-90%, 20-80%, 30-70% 또는 40-60%가 되도록 하는 만노오스 6-인산염 잔기의 용량을 갖는 것이 바람직하다. 현재, 인산화반응 정도는 효소의 몇몇 배치(batch)에서 분석되었으며, 전형적으로, 30-45%의 효소는 인산화되고 친화 매트릭스를 결합한다.
- [0081] 상기 리소조멸 알파-만노시다아제 양의 2-100%, 5-90%, 10-80%, 20-75%, 30-70%, 35-65% 또는 40-60%를 구성하

는 단편은 높은 친화력으로 Man-6-P-수용체에 결합하는 것이 보다 바람직하다. 이론적으로, 두개의 만노오스 6-인산염 군은 효소가 높은 친화력으로 Man-6-P-리셉터에 결합하도록 하기 위하여 서로 근접하게 위치되어야 한다. 최근의 관찰은 높은 친화력 결합을 얻기 위해서는 인산화된 만노오스 잔기 간의 거리는 40 Å 이하이어야 한다는 것을 제안한다. 국제특허 WO 2005/094874의 SEQ ID NO 1에 따른 인간 리소조밀 알파-만노시다아제에서 두개의 만노오스 6-인산염 잔기는 367과 766 위치의 아스파라긴(asparagine) 잔기에 놓여질 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 약은 리소조밀 알파-만노시다아제, 만노오스 6-인산염 군을 이들 양쪽의 아스파라긴 잔기에 운반하는 단편을 포함하는 것이 바람직하다.

[0082] 바람직하게, 알파-만노시다아제는 재조합 기술에 의해 만들어진다. 그 이상의 구현예에서, 알파-만노시다아제는 인간의 오리진의 것(hLAMAN)이고 보다 더 바람직하게는 성숙한 인간 알파-만노시다아제(mhLAMAN) 또는 이의 단편이다. 단편은 변형될 수 있으나, 효소의 활성 부위는 보존되어야 한다.

[0083] 다른 단편들은 약 55와 70 kDa의 단백질 가수분해적으로 처리된 형태를 나타내는 반면, 본 발명에 따른 알파-만노시다아제의 제조에서 효소의 하나의 단편은 그것의 전구체 형태에 의해 나타내어지는 것으로 기대된다.

#### 갈락토세레브로시다아제

[0085] 다른 구현예에서 목적 폴리펩타이드는 GALC로 단축될 수 있는 갈락토세레브로시다아제일 수 있다. 갈락토세레브로시다아제는 E.C. 3.1.6.46에 속하고 D-갈락토실-N-아실스핀고신(D-galactosyl-N-acylsphingosine) + H<sub>2</sub>O = D-갈락토오스 + N-아실스핀고신의 반응을 촉진할 수 있는 효소이며, 그로므로 GALC는 예를 들어 미엘린(myelin)에서 갈락토리피트(galactolipid)의 분해를 촉진시킨다.

[0086] 인간으로부터 유래된 GALC 효소는 643 아미노산을 포함하고 분자량이 72.8 kDa인 글리코실화된 리소조밀 효소이다. 본 발명의 GALC는 특히 인간 유래의 것일 수 있다. 그 이상의 구현예에서 GALC는 이전에 언급된 숙주 세포들 중 하나에서 발현된 재조합체일 수 있다. GALC의 재조합 발현을 위한 숙주 세포는 특히 CHO 세포일 수 있다.

[0087] 명세서 및 청구항에서 참조예는 다음의 아미노산 및 핵산 서열로 만들어진다.

서열 기술	서열 식별자
PBGD 부호화 서열 1	SEQ ID NO.: 1
PBGD 부호화 서열 2	SEQ ID NO.: 2
PBGD 부호화 서열 3	SEQ ID NO.: 3
PBGD 부호화 서열 4	SEQ ID NO.: 4
PBGD 부호화 서열 5	SEQ ID NO.: 5
PBGD 부호화 서열 6	SEQ ID NO.: 6
PBGD 부호화 서열 7	SEQ ID NO.: 7
PBGD 부호화 서열 8	SEQ ID NO.: 8
PBGD 부호화 서열 9	SEQ ID NO.: 9
PBGD 부호화 서열 10	SEQ ID NO.: 10
PBGD 부호화 서열, GenBank Acc. No. X04217	SEQ ID NO.: 11
PBGD 부호화 서열, GenBank Acc. No. X04808	SEQ ID NO.: 12
PBGD 부호화 서열, GenBank Acc. No. M95623	SEQ ID NO.: 13
부호화 서열로부터 PBGD aa 서열, GenBank Acc. No. M95623, 구조적 형태	SEQ ID NO.: 14
부호화 서열로부터 PBGD aa 서열, GenBank Acc. No. M95623, 적혈구 조혈성(erythropoietic) 형태	SEQ ID NO.: 15
ASA 부호화 서열 Genbank Acc. No. J04593	SEQ ID NO.: 16
ASA 부호화 서열 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO.: 17
ASA aa 서열 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO.: 18
ASA aa 서열 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO.: 19

ASA aa 서열 국제특허 WO 2005/073367의 SEQ ID NO. 4	SEQ ID NO.: 20
LAMAN aa 서열 국제특허 WO 2005/094874의 SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO.: 21
LAMAN 부호화 서열 국제특허 WO 2005/094874의 SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO.: 22
갈락토세레브로시다아제 부호화 서열	SEQ ID NO.: 23
갈락토세레브로시다아제 aa 서열	SEQ ID NO.: 24

[0089] 이러한 서열에 대한 참조예와 함께, 본 발명의 바람직한 구현예에 따른 목적 폴리펩타이드는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산을 포함한다:

[0090] i ) SEQ ID NOs 14, 15, 18, 19, 20, 21 및 24 중 어느 하나에 의해 정의된 아미노산 서열;

[0091] ii) i )에서 정의된 아미노산 서열과 기능적으로 동등한 부분; 및

[0092] iii) i ) 또는 ii)에서 정의된 아미노산 서열과 기능적으로 동등한 유사체이며, 상기 유사체의 아미노산 서열은 i ) 또는 ii)에서 정의된 아미노산 서열과 적어도 75% 동일함.

[0093] 특정 구현예에서, iii)의 유사체는 i ) 또는 ii)에서 정의된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 예를 들어 i ) 또는 ii)에서 정의된 서열과 적어도 99.5% 동일하다.

[0094] 나아가, 목적 폴리펩타이드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 핵산 서열을 사용한 재조합 발현에 의해 얻어질 수 있다:

[0095] i ) SEQ ID NOs 1-13, 16, 17, 22 및 23 중 어느 하나에 의하여 정의된 핵산 서열;

[0096] ii) i )에서 정의된 핵산 서열과 적어도 75% 동일한 핵산 서열.

[0097] 폴리펩타이드의 재조합 생산을 위하여, ii)의 산 서열은 i )에서 정의된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 예를 들어 i )에서 정의된 서열과 적어도 99.5% 동일한 것이 보다 바람직하다.

[0098] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물

[0099] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 다음의 기술은 본 발명의 방법에 따라 농축된 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 또한 목적 폴리펩타이드를 적어도 10 mg/ml 포함하는 본 발명의 조성물에 관한 것이다.

[0100] 본 발명은 또한 목적 폴리펩타이드가 특히 rhPBGD, 아릴 셀파타아제, 알파-만노시다아제 또는 갈락토세레브로시다아제와 같은 본 발명에 따른 폴리펩타이드 중 어느 하나인 목적 폴리펩타이드를 적어도 10 mg/ml 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 특히 목적 폴리펩타이드를 적어도 25 mg/ml, 예를 들어 목적 폴리펩타이드를 50 mg/ml 또는 적어도 75 mg/ml 또는 적어도 100 mg/ml를 포함할 수 있다. 그러므로, 상기 조성물은 특히 목적 폴리펩타이드를 10-1000 mg/ml 사이, 예를 들어 목적 폴리펩타이드 10-500 mg/ml 사이 또는 10-300 mg/ml 사이 또는 10-200 mg/ml 사이 또는 25-500 mg/ml 사이 또는 25-400 mg/ml 사이 또는 40-400 mg/ml 사이 또는 40-300 mg/ml 사이 또는 50-400 mg/ml 사이 또는 50-300 mg/ml 사이 또는 75-400 mg/ml 사이 또는 75-300 mg/ml 사이 또는 100-200 mg/ml 사이 또는 100-150 mg/ml 사이를 포함할 수 있다.

[0101] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 수용액일 수 있다.

[0102]

게다가 높은 농도의 목적 폴리펩타이드를 포함하는 상기 조성물은 특히 목적 폴리펩타이드의 집합체를 더 포함하지 않거나 적어도 단지 매우 적은 집합체를 더 포함할 수 있다. 그러므로, 집합체로서 존재하는 목적 폴리펩타이드의 양은 특히 조성물의 목적 폴리펩타이드의 총 양의 5 w/w% 이하를 구성할 수 있다. 특히, 상기 집합체는 목적 폴리펩타이드 총 양의 4 w/w% 이하, 예를 들어 3 w/w% 이하, 또는 2 w/w% 이하, 또는 1 w/w% 이하, 또는 0.5 w/w% 이하, 또는 0.1 w/w% 이하를 구성할 수 있다. 본 문맥에서 “집합체” 용어는 단량체가 아닌 목적 폴리펩타이드의 어떠한 형태를 의미한다. 그러므로, 용어는 목적 폴리펩타이드의 어떠한 이량체 또는 다량체를 포함한다.

[0103]

게다가, 만약 상기 조성물이 목적 폴리펩타이드만으로 또는 다른 단백질, 즉 목적 폴리펩타이드와 다른 단백질의 소량만을 포함한다면 유리하다. 그러므로, 특정한 구현예에서 상기 조성물은 목적 폴리펩타이드와 다른 단백질을 1 w/w% 이하, 예를 들어 0.5 w/w% 이하, 또는 0.1 w/w% 이하, 또는 0.05 w/w% 이하, 또는 0.01 w/w% 이하로 포함한다.

[0104]

요인(factor)의 범위는 폴리펩타이드의 안정성과 활성에 영향을 미치며, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 그러므로 특히 목적 폴리펩타이드를 가능한한 안정하게 유지하도록 최적화될 수 있다.

[0105]

pH는 일반적으로 목적 폴리펩타이드의 안정성에 영향을 미치므로, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 pH는 특히 7.5-8.5 범위, 예를 들어 특히 pH 7.7-8.2 사이, 보다 바람직하게 pH 7.8-8.0 사이 또는 pH 7.85-7.95, 예를 들어 pH 7.8 또는 pH 7.9일 수 있다. 이는 만약 목적 폴리펩타이드가 PBDG이면 특히 그렇다.

[0106]

그러므로, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 조성물을 기술된 pH 범위 내로 유지할 수 있는 버퍼를 포함할 수 있다. 그러한 버퍼의 예는 TRIS-HCL, 구연산 나트륨 및  $Na_2HPO_4$ 를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러한 버퍼의 농도는 특별한 버퍼의 선택과 조성물 내의 다른 성분의 존재에 의존할 수 있다. 만약 버퍼가  $Na_2HPO_4$ 이면,  $Na_2HPO_4$ 의 농도는 0.5-15 mM 범위, 예를 들어 1-10 mM 범위, 또는 1.5-7.5 mM 범위, 예를 들어 1.83-7.4 mM 범위, 또는 1.5-3 mM 범위, 예를 들어 1.83-3.7 mM 범위, 또는 1.83-2.45 mM 범위, 또는 3.5-7.5 mM 범위, 예를 들어 3.6-7.4 mM 범위, 또는 5.4-7.4 mM 범위, 예를 들어 1.84 mM, 또는 2.45 mM, 또는 3.67 mM 또는 5.51 mM 또는 7.34 mM일 수 있다.

[0107]

만약 버퍼가 TRIS-HCL이면, TRIS-HCL의 농도는 특히 2.50 mM 범위, 예를 들어 2-40 mM, 또는 2-30 mM, 또는 2-20 mM, 또는 2-10 mM, 또는 5-25 mM, 또는 5-20 mM, 또는 8-12 mM, 또는 9-11 mM, 예를 들어 10 mM일 수 있다.

[0108]

목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 포함할 수 있는 다른 화합물의 예는 아미노산, 당류, 알콜류 및 세정제(detergent)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러한 적당한 화합물의 예는 글라이신, 만니톨, 슈크로오즈, L-세린, 트립신 80 또는 상기 화합물들 중 하나 이상의 조합물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 화합물의 농도는 특정한 화합물에 의존하나, 글라이신의 경우 농도는 특히 1-200 mM 범위, 예를 들어 5-190 mM 범위, 또는 10-180 mM 범위, 또는 10-170 mM 범위, 또는 20-160 mM 범위, 또는 20-150 mM 범위, 또는 25-125 mM 범위, 또는 5-100 mM 범위, 또는 5-90 mM 범위, 또는 5-80 mM 범위, 또는 5-70 mM 범위, 또는 5-60 mM 범위, 또는 10-100 mM 범위, 또는 10-90 mM 범위, 또는 10-80 mM 범위, 또는 10-70 mM 범위, 또는 10-60 mM 범위, 또는 12-60 mM 범위, 또는 12-55 mM 범위, 또는 13.5-54 mM 범위, 또는 10-30 mM 범위, 예를 들어 13.5-27 mM 범위, 또는 13.5-18 mM 범위, 또는 25-55 mM 범위, 예를 들어 27-54 mM 범위, 또는 40-55 범위, 예를 들어 40.5-54 mM 범위, 예를 들어 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 또는 53, 53.5, 53, 54.5 또는 55 mM일 수 있다.

[0109]

만니톨의 농도는 특히 50-1000 mM 범위, 예를 들어 50-900 mM 범위, 또는 50-800 mM 범위, 또는 50-700 mM 범

위, 또는 50-600 mM 범위, 또는 100-900 mM 범위, 또는 100-800 mM 범위, 또는 100-700 mM 범위, 또는 100-600 mM 범위, 또는 100-500 mM 범위, 또는 120-525 mM 범위, 또는 125-500 mM 범위, 또는 100-300 mM 범위, 예를 들어 120-275 mM 범위, 또는 120-170 mM 범위, 또는 200-600 mM 범위, 예를 들어 225-550 mM 범위, 또는 240-510 mM 범위, 또는 370-525 mM 범위, 예를 들어 120, 125, 130, 160, 165, 166.7, 170, 175, 200, 221, 225, 250, 275, 300, 365, 370, 375, 380, 385, 490, 495, 500, 505 또는 510 mM일 수 있다.

[0110] 슈크로오즈의 농도는 특히 1-200 mM 범위, 예를 들어 5-190 mM 범위, 또는 10-180 mM 범위, 또는 10-170 mM 범위, 또는 20-160 mM 범위, 또는 20-150 mM 범위, 25-125 mM 범위, 또는 5-100 mM 범위, 또는 5-90 mM 범위, 또는 5-80 mM 범위, 또는 5-70 mM 범위, 또는 5-60 mM 범위, 또는 10-100 mM 범위, 또는 10-90 mM 범위, 또는 10-80 mM 범위, 또는 10-70 mM 범위, 또는 10-60 mM 범위, 또는 12-60 mM 범위, 또는 12-55 mM 범위, 또는 13.5-54 mM 범위, 또는 10-30 mM 범위, 예를 들어 13.5-27 mM 범위, 또는 13.5-18 mM 범위, 또는 25-55 mM 범위, 예를 들어 27-54 mM 범위, 또는 40-55 mM 범위, 예를 들어 40.5-54 mM 범위, 예를 들어 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 또는 53, 53.5, 53, 54.5 또는 55 mM일 수 있다. 만약 슈크로오즈가 또한 만니톨을 포함하는 조성물에 포함된다면, 만니톨의 농도는 특히 슈크로오즈의 농도에 상응하여 낮아질 수 있는데, 즉 만니톨과 슈크로오즈 함께의 농도는 특히 만약 만니톨이 단독으로 사용되어진다면 만니톨의 농도에서와 같을 수 있다.

[0111] 트윈 80의 농도는 특히 0.001-1 w/v% 범위, 예를 들어 0.005-1 w/v% 범위, 또는 0.01-1 w/v% 범위, 또는 0.001-0.5 w/v% 범위, 또는 0.005-0.5 w/v% 범위, 또는 0.01-0.5 w/v% 범위, 또는 0.05-0.4 w/v% 범위, 또는 0.05-0.3 w/v% 범위, 또는 0.05-0.2 w/v% 범위, 또는 0.075-0.4 w/v% 범위, 또는 0.075-0.3 w/v% 범위, 또는 0.075-0.2 w/v% 범위, 또는 0.09-0.2 w/v% 범위, 예를 들어 0.075, 0.08, 0.09, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 또는 0.2 w/v%일 수 있다.

[0112] 폴리펩타이드가 특히 PBGD, 아릴 살파타아제, 리소조멸 알파-만노시다아제 또는 갈락토세레브로시다아제일 수 있는 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 상기 언급된 화합물의 하나 이상의 조합물을 포함할 수 있다. 그러한 조성물의 적당한 예는 목적 폴리펩타이드 이외에도  $Na_2HPO_4$ , 글라이신 및 만니톨을 포함하는 것일 수 있다. 조성물의 pH와 다른 화합물의 농도는 위에서 기술된 바와 같을 수 있다. 그러므로, 상기 조성물은 일 구현예에서 0.5-15 mM의  $Na_2HPO_4$ , 1-200 mM의 글라이신, 50-1000 mM의 만니톨과 pH 7.5-8.5 범위를 포함할 수 있다. 위에서 언급된 화합물의 농도와 pH의 어떠한 조합은 본 발명에 의해 포함된다. 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에서 다른 화합물의 적당한 조합과 pH의 특정한 예는 3.67 mM의  $Na_2HPO_4$ , 27 mM의 글라이신, 250 mM의 만니톨을 포함하고 pH 7.7-7.9 범위를 갖는 것이다.

[0113] 적당한 조성물의 다른 예는 다음 중 어떤 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] · 1.84 mM의  $Na_2HPO_4$ , 13.5 mM의 글라이신, 125 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0115] · 2.45 mM의  $Na_2HPO_4$ , 18 mM의 글라이신, 167 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0116] · 5.51 mM의  $Na_2HPO_4$ , 40.5 mM의 글라이신, 375 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0117] · 7.34 mM의  $Na_2HPO_4$ , 54 mM의 글라이신, 500 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0118] · 3.67 mM의  $Na_2HPO_4$ , 27 mM의 글라이신, 220 mM의 만니톨, 30 mM의 슈크로오즈와 pH 7.7-7.9 범위

[0119] · 3.67 mM의  $Na_2HPO_4$ , 245 mM의 만니톨, 32 mM의 슈크로오즈와 pH 7.7-7.9 범위

[0120] · 3.67 mM의  $Na_2HPO_4$ , 27 mM의 L-세린, 250 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0121] · 10 mM의 TRIS-HCL, 27 mM의 글라이신, 250 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0122] · 3.67 mM의 구연산 나트륨, 27 mM의 글라이신, 250 mM의 만니톨과 pH 7.7-7.9 범위

[0123] · 3.67 mM의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27 mM의 글라이신, 220 mM의 만니톨, 29 mM의 슈크로오즈, 0.1 %(w/v)의 트윈 80과 pH 7.7-7.9 범위

[0125] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 포유동물의 치료상의 응용에 사용될 수 있다. 그러므로, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 포유동물의 조직에 관해서는 등장(isotonic)일 수 있는데, 예를 들어 조직은 특히 200-400 mOsm/kg 범위, 예를 들어 250-350 mOsm/kg 범위 또는 275-325 mOsm/kg 범위 또는 295-305 mOsm/kg 범위, 예를 들어 295 mOsm/kg 또는 300 mOsm/kg 또는 305 mOsm/kg의 삼투질 농도(osmolality)를 갖는 것일 수 있다.

[0126] 목적 폴리펩타이드의 농축 방법

[0127] 본 발명의 방법은 a) 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 원심분리 및/또는 여과 단계 및 b) a) 단계에서 얻어진 조성물을 농축하는 단계를 포함한다. 본 발명의 발명자들은 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 농축하기 이전에 원심분리 및/또는 여과함에 의해서 목적 폴리펩타이드의 어떠한 집합체도 없거나 또는 적어도 단지 매우 적은 목적 폴리펩타이드 집합체를 갖는 고농도로 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 얻는 것이 가능하다는 것을 발견하였다. 게다가, 폴리펩타이드 집합체의 양이 감소한다는 것은 예를 들면 폴리펩타이드에 대한 면역 응답을 유도하는 위험을 증가시킬 수 있는 것과 같은 치료상의 응용에 일반적으로 유리하다.

[0128] 폴리펩타이드의 피하적인 투여를 위하여, 폴리펩타이드 조성물은 단지 적은 부피가 피하적으로 주사될 수 있는 것과 같이 적은 부피에서 높은 활성을 갖는 것이 유리하다.

[0129] 단백질 또는 폴리펩타이드는 일반적으로 농축될 때 집합체를 형상할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 목적 폴리펩타이드의 농축에 사용될 때 폴리펩타이드 집합체 형성을 높은 속도로 야기하지 않는 이점이 있다. 예에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 농축 방법에 의해 얻어진 조성물 내의 PBGD 집합체의 양은 농축되지 않은 PBGD 조성물에서의 양과 유사하다.

[0130] 특정한 구현예에서 방법의 a) 단계는 b) 단계 이전에 수행된다.

[0131] a) 원심분리 및/또는 여과 단계

[0132] 본 발명의 발명자들은 전처리에 의해서 많은 또는 대부분의 폴리펩타이드 집합체가 제거되기 때문에 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 농축 이전에 조성물의 원심분리 및/또는 여과에 의해 조성물을 전처리하는 것이 유리하다는 것을 발견하였다.

[0133] b) 단계의 조성물의 농축이 한외여과법(ultrafiltration)과 같은 필터 또는 막의 사용에 의지하는 방법에 의해 수행될 때, 집합체의 존재는 필터 또는 막을 막아서 작은 분자와 액체가 필터 또는 막을 통과할 수 없게 한다. 이는 조성물이 농축되는 속도를 감소킬 수 있으며 및/또는 그 이상의 어떤 농축을 완전히 막을 수 있다.

[0134] 그러므로, 이러한 유형의 농축에서 a) 단계에 따른 전처리는 집합체의 제거가 상기 조성물이 전처리되지 않았을 때보다 더 농축된 목적 폴리펩타이드 조성물을 얻을 수 있게 하기 때문에 유리하다.

[0135] b) 단계에서 조성물의 농축이 동결건조 또는 증발과 같이 물의 제거에 기초한 방법에 의해 수행될 때, a) 단계

의 전처리는 농축된 조성물에 존재하는 집합체의 양을 줄이는 데 유리하다.

[0136] a) 단계는 다음의 세개의 대안 중 하나에 의해 수행될 수 있다.

[0137] · 원심분리

[0138] · 여과, 또는

[0139] · 원심분리와 여과

[0140] 만약 a) 단계가 원심분리와 여과 모두를 포함한다면, 본 발명의 발명자들이 원심분리가 대부분의 큰 집합체들을 제거하며 여과는 그 다음에 남은 더 작은 집합체들을 제거한다는 것을 발견하였기 때문에 여과 이전에 원심분리를 수행하는 것이 유리하다.

[0141] 원심분리

[0142] 집합체들을 제거할 수 있기 위하여, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 1500-3000 g 범위, 예를 들어 1800-2500 g 범위, 또는 2000-2300 g 범위의 힘으로 원심분리될 수 있다.

[0143] 적형적으로 조성물은 10-60분 동안, 예를 들어 15-50분 동안 또는 20-40분 동안 원심분리될 수 있다.

[0144] 온도는 목적 폴리펩타이드의 안정성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 원심분리는 2-20 °C 범위, 예를 들어 3-15 °C 또는 3-10 °C 범위, 또는 3-8 °C 범위, 예를 들어 4 °C 또는 5 °C 또는 6 °C에서 수행될 수 있다.

[0145] 원심분리는 개개의 목적 폴리펩타이드 분자가 용액 내에 머무르는 동안에 목적 폴리펩타이드가 침전물을 결집시키는, 즉 펠렛을 형성하는 것을 초래한다. 그래서, 본 발명의 방법에서 결과적으로 사용된 것은 원심분리된 조성물의 상청액이다.

[0146] 여과

[0147] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 0.20-5  $\mu\text{m}$  범위, 예를 들어 0.2-2.5  $\mu\text{m}$  범위의 기공 크기를 갖는 필터를 통하여 여과될 수 있다.

[0148] 필터의 기공 크기 이외에도 또한 필터가 만들어진 물질은 목적 폴리펩타이드의 여과에 영향을 미칠 수 있다. 적당한 막 필터의 예는 폴리에테르술론(polyethersulfone, PES), 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate), 재생된 셀룰로오스 및 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene flouride, PVDF)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0149] 단백질과 같은 분자가 여과될 때 제거되는 것은 대개 작은 분자이므로, 여과 후에 목적 폴리펩타이드는 일반적으로 보전액에 존재할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 다음의 단계들에서 사용되는 것은 일반적으로 여과로부터의 보전액이다.

[0150] b) 농축 단계

[0151] 원칙적으로 목적 폴리펩타이드 조성물의 어떤 농축방법은 본 발명의 b) 단계에서 사용될 수 있다.

[0152] 그러한 적당한 방법의 예는 한외여과법과 물의 제거에 의한 농축을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0153] 한외여과법

[0154] 한외여과법은 수압이 문자와 용매가 입자 크기, 또한 값의 차단 크기(cut-off size)로 알려진 기공으로 이루어진 막을 가로지르게 하는데 사용되는 분리방법이다. 더 큰 문자량을 가진 문자들은 막을 통과하지 않기 때문에 막의 차단 값보다 더 작은 문자량을 갖는 문자만이 막을 통과할 수 있으며 이른바 보전액을 형성할 수 있다. 그것에 의해 보전액에 존재하는 문자는 용매가 막을 가로질러 흐르는 것과 같이 농축된다.

[0155] 특정한 구현예에서 목적 폴리펩타이드를 포함하는 용액 또는 조성물의 농축은 접선 유동 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 수행될 수 있다. 이 방법은 특히 큰 스케일의 농축, 즉 1 리터로부터 수백 리터에 이르는 부피의 용액의 농축에 유용하다. 그러므로, 이 방법은 특히 산업적 스케일에서 목적 폴리펩타이드의 농축된 용액의 생산에 유용하다.

[0156] TFF 기술은 여과된 용액이 단지 막의 기공보다 더 작은 문자만이 막을 통하여 통과할 수 있는 반투과막을 가로질러 흐르도록 하고, 여과액을 형성하고, 더 큰 물질이 모이도록(보유액) 남겨두는 특정한 장치의 사용에 기초한다. TFF 방법과 함께 두개의 다른 압력이 적용되는데; 하나는 용액을 시스템으로 공급하고 용액을 시스템 안에서 순환하도록 하는 것이고(입구 압력), 다른 압력은 작은 문자와 용매가 막을 가로지르게 하는 막에 걸쳐서 적용된다(막 압력). 입구 압력은 전형적으로 1-3 bar 범위, 예를 들어 1.5-2 bar 사이일 수 있다. 막 압력은 전형적으로 1 bar보다 클 수 있다.

[0157] TFF가 조성물의 농축에 사용될 때 목적 폴리펩타이드의 농축된 조성물은 보전액으로서 모여질 수 있다.

[0158] TFF용으로 유용한 막은 전형적으로 재생된 셀룰로오스 또는 폴리에테르술폰(PES)으로 만들어질 수 있다.

[0159] 막의 기공 크기는 전형적으로 10,000 Mw 보다 작은, 예를 들어 10-10,000 Mw 범위의 문자량 차단을 가질 수 있다.

[0160] 다른 구현예에서, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 농축은 원심분리 장치의 사용에 의해 수행될 수 있다. 이 발명의 원칙은 용액은 막에 대한 원심력의 적용에 의해서 막에 의하여 여과된다는 것이다. 그러한 막은 종종 문자량(Mw) 차단, 즉 막을 통과할 수 있는 화합물의 최대 문자 크기에 의해 특징화되며, 이보다 문자 크기가 더 큰 화합물은 막을 통과할 수 없다. 본 발명에서 사용된 막의 Mw 차단은 특히 30,000 Mw, 예를 들어 10-30,000 Mw 보다 작을 수 있다.

[0161] 막은 특히 폴리에테르술폰(PES) 또는 재생된 셀룰로오스로 만들어질 수 있다.

[0162] 그러한 적당한 상업적인 필터 장치의 예는 Centricon Plus-80 또는 Centricon Plus-15일 수 있다.

[0163] 농축은 전형반적으로 2000-4500 g, 예를 들어 2500-4000 g 사이, 또는 2750-3500 g 사이, 또는 3000-3500 g 사이, 예를 들어 3000 g 또는 3100 g 또는 3200 g 또는 3300 g 또는 3400 g 또는 3500 g에서 수행될 수 있다.

[0164] 전형적으로 농축은 몇몇 시간 동안, 예를 들면 1시간 이상 동안, 예를 들어 1-10시간 동안 계속될 수 있다.

[0165] 목적 폴리펩타이드의 안정성에 미치는 어떤 악영향을 최소화하기 위하여, 농축은 특히 2-20 °C 범위, 예를 들어 3-15 °C 또는 3-10 °C 범위 또는 3-6 °C 범위에서 수행될 수 있다.

#### 물의 제거에 의한 농축

[0166] 물의 제거에 의한 농축의 원칙은 전부 또는 대부분의 물이 고체를 얻기 위하여 제거되고, 그리고 나서 그 다음에 먼저 희석 또는 용해되었던 것 보다 적은 물의 부피 내에 이 고체를 희석 또는 용해하는 것이다. 그러나, 원칙적으로 다음에 화합물을 재희석 또는 재용해하는 것 없이 원하는 농도를 얻기 위해서는 단지 필요한 물의 양을 제거하는 것에 의해 수행될 수 있다.

[0168] 물의 제거에 의한 적당한 농축 방법의 예는 동결건조 또는 증발을 포함한다.

[0169] 동결건조와 증발 모두에서, 세개의 가장 상응하는 파라미터는 온도, 압력 및 시간이다.

[0170] 동결건조 방법은 다음의 세개 또는 네개의 단계를 포함할 수 있다; 동결 상태, 첫번째 건조 상태 및 두번째 건조 상태 및 동결 상태 후에 가열냉각(annealing)하는 선택적인 단계. 동결건조는 특히 본 발명의 방법의 추가 단계에서와 같이 포함된 동결건조에 관하여 기술된 것과 같이 수행될 수 있다.

#### 추가 단계

[0172] 목적 폴리펩타이드는 자연의 근원, 즉 목적 폴리펩타이드를 자연적으로 발현하는 세포로부터 유래할 수 있으며, 또는 특히 발현된 재조합체일 수 있다.

[0173] 목적 폴리펩타이드가 유래된 곳에 독립적으로, 본 발명의 방법에 실시되기 전에 정제되었을 수 있다.

[0174] 그러한 “정제”는 특히 세포 파편의 제거, 목적 폴리펩타이드 이외의 다른 단백질의 제거 및 목적 폴리펩타이드가 유래되는 근원에 존재할 수 있는 다른 성분들의 제거를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 그러므로, 본 발명의 특정한 구현예에서 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 목적 폴리펩타이드 이외의 다른 단백질을 5 w/w% 이하, 또는 1 w/w% 이하 또는 0.5 w/w% 이하 또는 0.1 w/w% 이하 또는 0.05 w/w% 이하 또는 0.01 w/w% 이하로 포함한다.

[0175] 그러므로, 예를 들어 숙주 세포에 의해 발현되는 다른 단백질은 본 발명의 방법에서 사용되기 전에 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물로부터 제거될 수 있다.

[0176] 그러므로, 특정한 구현예에서 본 발명의 방법은 a) 단계 이전에 다음 단계들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0177] i ) 목적 폴리펩타이드의 재조합 발현 단계

[0178] ii ) 하나 이상의 크로마토그래피 단계에 의한 목적 폴리펩타이드 조성물의 정제 단계

[0179] iii ) 포뮬레이션 베퍼의 교환 단계.

- [0180] 목적 폴리펩타이드의 재조합 발현은 특히 목적 폴리펩타이드와 관련하여 앞에서 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0181] 만약 목적 폴리펩타이드가 PBGD이면 적당한 유형의 크로마토그래피의 예는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography), 이온교환 크로마토그래피(Ion Exchange Chromatography, IEC) 및 하이드록시아파타이트 컬럼(hydroxyapatite column) 위의 크로마토그래피를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 원칙적으로 이들 크로마토그래피 방법의 어떤 조합도 사용될 수 있다. 본 발명의 발명자들은 이전에 PBGD에 대하여서는 적어도 친화 크로마토그래피 단계를 수행하는 것이 유리하며, 만약 이것이 크로마토그래피의 다른 방법 중 어떤 것과 조합된다면 다른 크로마토그래피 단계 이전에 친화 크로마토그래피 단계를 수행하는 것이 유리하다는 것을 발견하였다(국제특허 WO 03/002731 참조).
- [0182] 목적 폴리펩타이드가 PBGD인 구현예에서 상업적으로 이용할 수 있는 친화 크로마토그래피 컬럼은 친화 결합(affinity coupling), 군 특정 친화(group specific affinity), 및 금속 칠레이트 친화(metal chelate affinity) 컬럼을 포함한다.
- [0183] Amersham Pharmacia Biotech사의 제품 카달로그 2001은  $-\text{NH}_2$ 를 함유하는 고정 리간드(immobilising ligands)를 포함하는 컬럼과 첫번째 아미노산 군을 함유하는 리간드를 포함하는 컬럼과 같은 친화 결합 컬럼의 예를 보여준다.
- [0184] 금속 칠레이트 친화 컬럼은 노출된 히스티딘 군을 가지고 금속 이온 캠플렉스 형성을 경유하여 단백질을 정제하는데 특히 바람직하다. 국제특허 WO 01/07065의 실시예 3은 “His-Tag”을 가진 재조합 인간 포르포빌리노겐 디아미나아제(rhPBGD-His)의 구조를 기술한다. rhPBGD-His를 정제하기 위하여, 코발트 금속 친화 수지를 가진 컬럼과 같은 금속 칠레이트 친화 컬럼을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0185] 친화 크로마토그래피의 다른 적당한 방법의 예는 리간드로서 돼지의 헤파린(porcine heparin)을 가진 컬럼 또는 리간드로서 Cibacon Blue 3G으로도 알려진 1-아미노-4-[[4-[[4-클로로-6-[[3 (또는 4)-술포페닐]아미노]-1,3,5-트리아진-2-일]아미노]-3-술포페닐]아미노]-9,10-디하이드로-9,10-디옥소-2-안트라센술폰산을 가진 컬럼 및 리간드 결합 방법으로서 트리아진 결합을 사용하는 방법이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상업적으로 이용할 수 있는 후자의 예는 Amersham Pharmacia Biotech의 Blue Sepharose 6 Fast Flow(FF)이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예는 여기에서 기술된, (i) 단계의 친화 크로마토그래피 컬럼이 리간드 결합 방법으로서 트리아진 결합을 사용하는 컬럼인 공정이고, 보다 바람직하게는 리간드가 Cibacron Blue 3G인 공정이다.
- [0186] “이온 교환 크로마토그래피(IEC)” 용어는 여기서 당업계에 따라, 정전기에 의하여 특정 pH에서 단백질의 총 전위에 기초하여 컬럼의 전위된 군에 결합하는 단백질과 같은 분자를 분리하는 컬럼으로 이해되어진다. 이온 교환은 용액에서 분실된 다른 이온과의 교환으로 컬럼 위에 하나의 유형의 이온의 흡착을 나타낸다.
- [0187] 적당한 IEC 컬럼의 예는 Q Sepharose 컬럼, Q SP Sepharose 컬럼, 또는 CM Sepharose 컬럼과 같은 컬럼이고, 특히 DEAE Sepharose 컬럼일 수 있다.
- [0188] 적당한 하이드록시아파타이트 컬럼의 예는 세라믹 하이드록시아파타이트 컬럼이다. 하이드록시아파타이트 ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ )<sub>2</sub>는 단백질, 효소, 핵산, 바이러스, 및 다른 거대 분자의 분리 및 정제에 사용될 수 있는 칼슘 인산염의 형태이다. 세라믹 하이드록시아파타이트는 하이드록시아파타이트의 구형의, 다공성 형태이다. CHT Type I (Bio-Rad)는 상업적으로 이용할 수 있는 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼의 적당한 예이다.

[0189] 일 구현예에서 본 발명의 방법은 a) 단계 이전에 다음의 단계들을 포함할 수 있다:

i ) PBGD의 재조합 발현 단계

ii) i ) 단계로부터 얻어진 PBGD 조성물을 친화 크로마토그래피시키는 단계

iii) ii) 단계의 PBGD 조성물을 이온교환 크로마토그래피시키는 단계.

[0193] 다른 구현예에서 본 발명의 방법은 a) 단계 이전에 다음 단계들을 포함할 수 있다:

i ) PBGD의 재조합 발현 단계

ii) i ) 단계로부터 얻어진 PBGD 조성물을 친화 크로마토그래피시키는 단계

iii) ii) 단계로부터 얻어진 PBGD 조성물을 이온교환 크로마토그래피시키는 단계

iv) iii) 단계로부터 얻어진 PBGD 조성물을 하이드록시아파타이트 컬럼시키는 단계.

[0198] 이러한 방법 모두는 ii) 단계로부터 얻어진 PBGD 조성물의 희석 또는 정용여과 단계를 더 포함할 수 있다. 그 러므로 상기 단계는 ii) 단계 후 및 iii) 단계 전, 즉 iiia) 단계여야 한다. iiia) 단계는 적당한 전도도, 예를 들어 10 mS/cm 미만에 대한 염의 농도를 줄이는 목적을 갖는다. 만약 DEAE Sepharose가 이온교환 크로마토그래피 단계, 즉 iii) 단계에서 수지로서 사용된다면, 포획된 PBGD의 DEAE Sepharose 수지로의 결합을 용이하게 할 수 있기 때문에 특히 상응할 수 있다. 희석은 정제된 물을 직접 첨가하거나 또는 정제된 물에 반대하여 한와여과법에 의해 얻어질 수도 있다.

[0199] PBGD의 재조합 발현, i ) 단계는 위에서 기술된 방법 중 어떤 것에 의해 수행될 수 있다.

[0200] ii) 단계에서 적당한 친화 크로마토그래피 컬럼의 예는 위에서 언급된 것 중 어떤것일 수 있다.

[0201] iii) 단계에서 이온교환 크로마토그래피를 수행하는 적당한 방법의 예는 위에서 언급된 것들 중 어떤 것일 수 있다.

[0202] iv) 단계에서 적당한 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 컬럼의 예는 위에서 언급된 것들 중에서 어떤 것일 수 있다.

[0203] 특정한 구현예에서 친화 크로마토그래피 컬럼은 리간드 결합 방법과 특히 리간드가 Cibracon Blue 3G인 그러한 방법으로서 트리아진 결합을 사용한 컬럼일 수 있다. 이는 특히 Blue Sepharose 6 Fast Flow 컬럼일 수 있고, 이온 교환 크로마토그래피 컬럼은 DEAE Sepharose 컬럼일 수 있으며, 또한 방법이 iv) 단계를 포함하는 구현예에서 이 컬럼은 특히 세라믹 하이드록시아파타이트 컬럼일 수 있다.

[0204] 본 발명의 방법은 또한 방법의 b) 단계 이후에 추가의 단계들을 포함할 수 있다. 그러한 단계는 다음의 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다:

• 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 동결건조

• 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 버퍼를 변경

• 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 멸균여과

## [0208] · 증발

[0209] 다른 동결건조기, 동결건조되는 용액의 부피 및 다른 파라미터는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 적당한 동결건조기의 예는, 농축된 목적 폴리펩타이드, 즉 이 경우에는 PBGD를 포함하는 용액이 2 및 6 mL 주입 유리병 (Type 1)에 채워지고 고무 마개(클로로부틸)로 마개를 하게 되는, 본 발명의 예에서 사용된 Lyostar(FTM-systems) 동결건조기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 동결건조는 다음의 세 단계에 의해 수행될 수 있다;

[0210] i ) 동결,

[0211] ii) 첫번째 건조, 및

[0212] iii) 두번째 건조.

[0213] i ) 단계 동결은 특히 분당 1 °C에 의해 온도를 -40 °C까지 낮추고 -40 °C에서 30분 동안 유지하기 전에 주변 온도에서 시료를 첫번째 로딩하고 그것을 0 °C까지 냉각하고 0 °C에서 30분 동안 유지함에 의해 수행될 수 있다.

[0214] ii) 단계 첫번째 건조는 특히 진공 압력 126 mTorr을 끌어당기고, 온도를 분당 1 °C에 의해 0 °C 까지 올리고 시료를 0 °C에서 360분 동안 유지함에 의해 수행될 수 있다.

[0215] iii) 단계 두번째 건조는 특히 완전 진공(full vacuum)으로 만들과 동시에 온도를 분당 0.5 °C에 의해 +30 °C까지 올리고 시료를 +30 °C에서 360분 동안 유지함에 의해 수행될 수 있다.

[0216] 두번째 건조 후에 시료는 추가로 진공 하에서 완료되거나 또는 질소로 채운 후에 완료될 수 있다.

[0217] 적당한 동결건조 방법의 예는 본 발명의 실시예에서 기술된 방법을 포함한다.

[0218] 또 다른 구현예에서 동결건조는 첫번째 건조 상태 이전에 가열냉각 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 발명자들은 동결건조 방법에서 가열냉각 단계의 포함은 크랙(crack)이 줄어듦으로써 시각적인 외관을 개선하고, 및/또는 가열냉각 단계 없이 동일한 동결건조 방법을 사용하였을 때와 비교하여 동결건조된 생산물의 재구성 시간이 짧아지게 된다는 것을 발견하였다. 동결건조된 생산물의 재구성을 위한 시간이 줄어드는 것은, 특히 용액으로서 투여되는 제약으로서 사용된다면 유리하다. 개선된 시각적인 외관은 또한 대개 대부분의 생산물에 대하여 유리한 것으로 간주된다.

[0219] 그러므로, 동결건조는 다음 단계들을 포함할 수 있다:

[0220] i ) 동결

[0221] ii) 가열냉각

[0222] iii) 첫번째 건조

[0223] iv) 두번째 건조.

[0224] 동결, 첫번째 건조 및 두번째 건조 단계는 특히 위에서 기술된 바와 같이 수행될 수 있다. 가열냉각 단계, 즉

ii) 단계는 특히 동결의 30분 후에, 온도를 예를 들어 분당 2 °C의 속도로 -10 또는 -20 °C까지 올리고 이 온도를 120 또는 420분 동안 유지하고, 그 다음에 온도를 예를 들어 첫번째 건조 단계를 시작하기 전에 시료가 60-

90분 동안 유지될 수 있는 온도인  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 분당  $2^{\circ}\text{C}$ 의 속도로 낮춰줌으로써 수행될 수 있다.

[0225] 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 벼파의 변경은 특히 a) 벼파 또는 포뮬레이션에서 농축된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 예를 들어 5-15회 희석, b) 희석된 조성물을 다시 농축, 및 상기 단계가 수행된 후에 이들 단계 전에 조성물에 존재하는 벼파 또는 포뮬레이션의 첨가제의 양이 상기 조성물에 존재하는 벼파 또는 포뮬레이션의 첨가제의 예를 들어 5 v/v% 이하 또는 1 v/v% 이하를 구성하도록 하기 위하여 a) 및 b) 단계를 충분한 횟수 만큼 수행하는 것에 의해 수행될 수 있다.

[0226] 특히 본 발명의 b) 단계로부터 얻어진 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 특히 상기 조성물의 멸균여과 단계 및/또는 조성물의 동결건조 단계를 더 포함할 수 있다.

[0227] 멸균여과는 일반적으로  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  또는  $0.20\text{ }\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 갖는 필터를 통하여 조성물을 여과함에 의해 수행된다. 동결건조는 특히 위에서 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0228] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 얻어진 동결건조된 조성물에 관한 것이다.

[0229] 피하주사(Subcutaneous injection)

[0230] 본 발명은 또한 50-300 mg/ml 범위의 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 포유동물에게 피하주사하기 위한 약의 제조용 용도에 관한 것이다.

[0231] 목적 폴리펩타이드는 PBGD, 아릴설파타아제 A, 리소조멸 알파-만노시다아제 및 갈락토세르브로시다아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는 본 발명에 따른 목적 폴리펩타이드 중 어떤 것일 수 있다.

[0232] 용어 피하는 주로 s.c.로 단축되고 두 용어는 본 발명의 문맥에서 호환성있게 사용될 수 있다.

[0233] 주사가 피하적으로 수행될 때, 생리학적인 제약 때문에 1.5 ml 이상 주사하는 것은 대개 불가능하였다.

[0234] 환자는 대개 특정한 양의 특정 목적 폴리펩타이드를 필요로 하는 것과 같이 환자에게 투여되는데 필요한 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 부피와 상기 조성물에서 목적 폴리펩타이드의 농도 간에는 상호관련이 있다.

[0235] 그러므로 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 높은 농도의 목적 폴리펩타이드를 포함한다는 것과 목적 폴리펩타이드의 이러한 높은 농도는 다량의 폴리펩타이드 집합체의 형성이 없이도 얻어질 수 있다는 것은 본 발명의 이점이다. 그러한 농축된 목적 폴리펩타이드 조성물의 사용은 더 적은 부피의 상기 조성물을 주사할 수 있게 만들고, 동시에 환자가 충분한 양의 목적 폴리펩타이드를 받는 것을 보증하므로; 목적 폴리펩타이드를 피하적으로 투여하는 것을 쉽게 만든다.

[0236] 목적 폴리펩타이드를 포함하는 위에서 언급된 조성물은 특히 목적 폴리펩타이드를 75-250 ml/mg 사이, 예를 들어 75-200 ml/mg 사이 또는 75-150 ml/mg 사이 또는 100-150 ml/mg 사이 또는 100-125 ml/mg 사이 또는 125-150 ml/mg 사이로 포함한다.

[0237] 위에서 기술된 바와 같이, 환자가 충분한 양의 목적 폴리펩타이드를 받는다는 것을 보증하기 위하여 환자에게 주사하는데 필요한 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 부피는 상기된 조성물의 목적 폴리펩타이드의 농도와 상호관련있다.

[0238] 그러므로 그러한 조성물의 부피는 일반적으로 조성물의 목적 폴리펩타이드의 농도에 따라 조절될 것이다. 그러나, 부피는 일반적으로 0.1-1.5 ml 범위, 예를 들어 0.1-1.5 ml 범위 또는 0.5-1.5 ml 범위 또는 0.75-1.5 ml 범위 또는 1-1.5 ml 범위일 수 있다.

[0239] 환자에게 투여하는데 상응하는 목적 폴리펩타이드의 양은 일반적으로 개인의 무게와 특정 목적 폴리펩타이드에 의존한다.

[0240] 일 구현예에서 본 발명은 PBGD 50-300 mg/ml의 조성물의 피하주사를 포함하는 포유동물의 급성 간헐성 포르피리아(Acute Intermittent Porphyria)의 치료방법에 관한 것이다.

[0241] PBGD의 투여는 특히 급성 간헐성 포르피리아의 치료에 유용할 수 있다. 그러나, PBGD의 투여는 또한 유전성 코프로포르피리아(hereditary coproporphyrria) 또는 반문상 포르피리아(variegata porphyria)와 같은 다른 포르피리아의 치료에 유용하다는 것이 예상된다. 포리피리아는 햄 생합성 경로에서 다른 결핍에 의해 야기되는 많은 질병을 집합적으로 기술하는데 사용되는 용어이다. 그러므로, 예를 들어 다른 치료학과의 조합에서, 어떤 유형의 포르피리아로 치료하는 환자에게의 PBGD의 투여는 경로 내에서 다른 중간체들의 전반적인 변경을 증가시키도록 도울 수 있다. 예를 들어, Meissner PN et al., 1986, European Journal of Clinical Investigation, vol. 16, 257-261; Hift RJ et al., 1997, S. Afr. Med. J., vol. 87, 718-27과 Meissner P et al., 1993, J. Clin. Invest., vol. 91, 1436-44는 유전성 코프로포르피리아와 반문상 포르피리아에서ALA와 PBG의 축적을 기술하고 있다. 이러한 질병에서ALA와 PBG의 축적은, 각각ALA에서PBG의 변환을 형성하는 네번째 및 다섯번째 아랫단계에 위치한 효소 결합으로부터 유래하고, 두 개의 가장 최근의 논문에서 반문상 포르피리아를 가진 환자에게 축적되는 포르피리노겐이 PBG-디아미나아제를 억제할 수 있는 방법이 기술되어 있다.

[0242] 다른 구현예에서 본 발명은 50-300 mg/ml의 아릴설파타아제 A의 조성물의 피하주사를 포함하는 포유동물의 이염색성 백질이영양증(metachromatic leukodystrophy)의 치료방법에 관한 것이다.

[0243] 이염색성 백질이영양증(MLD)은 리소조밀 효소 아릴설파타아제 A(ASA)의 상염색체 열성의 유전적 결함(autosomal recessive genetic defect)에 의해 야기되며, 미엘린초(myelin sheath) 막의 점진적인 파손(탈미엘린화(demyelination))과 중추신경계(CNS)와 말초신경계 모두의 백질에서 갈락토실 설파타이드(세레브로사이드 세레브로이트)의 축적을 유발한다. 조직 제조에서, 갈락토실 설파타이드는 이염색성 백질적으로 훼손된 구형의 과립의 큰 둉어리를 형성한다. 갈락토실 설파타이드는 또한 신장, 쓸개, 및 특정한 다른 내장기관 내에서 축적되고 소변에서 과량으로 방출된다.

[0244] 갈락토실 설파타이드는 리소조밀 효소 아릴설파타아제 A(EC 3.1.6.8)(Austin et al. Biochem J. 1964, 93, 15C-17C)와 사포신 B(saposin B)로 불리는 스판고리피드 활성인자(sphingolipid activator) 단백질의 조합된 작용을 통하여 갈락토세레브로사이드를 형성하는 3-O-설페이트 결합의 가수분해에 의해 정상적으로 물질대사된다. 아릴설파타아제 A의 심한 결핍은 MLD 상태의 유아기 후기, 소년기 및 성인 환자로부터의 모든 조직에서 나타난다(아래 참조). 다음에서, 아릴설파타아제 A 단백질은 “ASA”로 불리울 것이다. ASA의 심한 결핍은 MLD를 가진 환자로부터의 모든 조직에서 일어난다.

[0245] 또 다른 구현예에서 본 발명은 50-300 mg/ml의 리소조밀 알파-만노시다아제의 조성물의 피하주사를 포함하는 포

유동물의 리소좀 저장 장애 알파-만노시도시스(lysosomal storage disorder alpha-mannosidosis)의 치료방법에 관한 것이다.

[0246] 알파-만노시도시스는 1/1,000,000 및 1/500/000 사이의 빈도로 세계적으로 일어나는 열성의, 상염색체성 질병이다. 만노시도시스는 유럽, 미국, 아프리카 및 또한 아시아의 모든 인종 군에서 발견된다. 리소좀 저장 장애에 대한 좋은 진단 서비스를 가진 모든 나라에서 유사한 빈도로 검출된다. 그들은 외관상으로는 건강하게 태어나나 질병의 징후는 점진적이다. 알파-만노시도시스는 매우 심각한 것으로부터 매우 순한 형태에 이르는 임상의 이질성을 나타낸다. 전형적인 임상의 징후는 정신지체, 골격의 변화, 재발하는 감염을 유발하는 손상된 면역체계, 청각장애이고, 종종 질병은 조악한 얼굴, 두드러진 이마, 납작한 콧등, 작은 코, 및 넓은 입과 같은 전형적인 얼굴의 특성과 관련된다. 대부분의 심각한 경우(만노시도시스 type I)에 어린이는 간비종대(hepatosplenomegaly)로 괴로워하고, 그들은 생애의 첫해동안 죽는다. 아마도 이러한 이른 죽음은 질병에 의해 야기되는 면역결여(immunodeficiency)에 의한 심각한 감염에 의해 야기된다. 더 순한 경우(만노시도시스 type II)에 환자들은 대개 성인 나이에 도달한다. 환자의 골격의 약함은 20-40세에 훨체어의 필요를 유발한다. 질병은 종종 단순한 읽고 쓰기의 가장 기본적인 기술을 제외한 어떤 것도 배제하는 약한 정신의 행동을 가져오는 두뇌의 확산 기능장애(diffuse dysfunction)를 유발한다. 청각 무력함과 다른 임상의 표시들과 연관된 이러한 문제들은 독립적인 생애로부터 환자들을 방해하고, 그 결과 생애의 오랜 관리가 필요하게 된다.

[0247] 또 다른 구현예에서 본 발명은 50-300 mg/ml의 갈락토실세레브로시다아제의 조성물의 퍼하주사를 포함하는 포유동물의 크라베병(Krabbe disease)의 치료방법에 관한 것이다.

[0248] 인간에게 GALC 효소의 결핍은 크라베병 또는 구형체 세포 백질이영양증(globoid cell leukodystrophy)으로 알려진 상염색체의 유전된 유전자의 리소좀 저장 질병을 유발한다. 효소는 일반적으로 인류의 고환, 신장, 태반, 간 및 뇌에서 발현되고, GALC 효소의 결핍은 일반적으로 미엘린 물질대사와 중추 및 말초신경계(각각 CNS 및 PNS)의 장애를 유발한다.

[0249] 크라베병은 나이, 국적 및 성별에 관계 없이 인간에게 관찰되어왔다.

[0250] 본 발명의 일 측면에서 기술된 구현예 및 특징은 또한 발명의 다른 측면에 적용한다는 것을 나타내었다. 특히, 예를 들어 추가의 화합물의 존재, 버퍼 및 pH와 같이, 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에 대하여 기술된 모든 구현예들은 또한 본 용용에 사용된 목적 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에 적용한다.

[0251] 본 발명에 따른 대상 또는 이것의 형태 중 하나 또는 특성이 남다른 것으로 나타났을 때, 이는 또한 복수의 대상 또는 그것의 형태 또는 특성을 나타낸다. 예로서, “폴리펩타이드”로 나타낼 때, 그것은 하나 이상의 폴리펩타이드를 나타내는 것으로 이해된다.

[0252] 본 명세서 전반에 걸쳐 “포함한다” 단어, 또는 “포함한다” 또는 “포함하는”과 같은 어미변화는 어떤 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들의 군, 정수 또는 단계들을 제외하고는 진술된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들의 군, 정수들 또는 단계들의 포함을 암시하는 것으로 이해될 것이다.

[0253] 본 명세서에서 인용된 모든 특허와 특허가 아닌 참고문헌은 이로써 그들의 전체에서 참고문헌에 의해 통합된다.

[0254] 다음의 제한되지 않는 실시예에 따라 발명은 더 상세하게 기술될 것이다.

## 실시예

[0255] 물질

[0256] rhPBGD

[0257] 다음의 실험예에서 사용된 rhPBGD는 IV 단계, 즉 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 단계를 포함하는 공정인, 국제특허 WO 03/002731의 실시예 1의 공정 2에 따라서 얻어졌다.

[0258] 포뮬레이션 버퍼

[0259] 재조합 및 정제된 rhPBGD는 다음의 수용성의 포뮬레이션 버퍼에 존재하였다:

[0260] 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

[0261] 27 mM 글라이신

[0262] 250 mM 만니톨

[0263] 및 pH 7.9

[0264] 포뮬레이션 버퍼는 그 다음에 0.22  $\mu$ m 필터를 통하여 멸균여과되었다.

[0265] 방법

[0266] 동결건조

[0267] 정제된 rhPBGD 용액의 동결건조는 다음의 스케줄에 따라 Lyostar(FTM-systems) 동결건조기에서 수행되었다.

동결 상태	0 °C	30분	760 Torr
	0 °C - -40 °C	1°C/분	760 Torr
	-40 °C	30분	760 Torr
첫번째 건조	-40 °C- 0 °C	1°C/분	169 mTorr
	0 °C	240분	169 mTorr
두번째 건조	0 °C - 30 °C	10°C/60분, 180분	20 mTorr
	30 °C	720분	20 mTorr

[0269] 시각적 관찰(투명도와 색상)

[0270] 액체는 아래의 계획에 따라 색상, 투명도 및 침전에 관하여 시각적으로 관찰되었다.

[0271] 색상: 1: 색 없음; 2: 약간 노란색; 3: 노란색

[0272] 투명도: 1: 투명; 2: 약간 흐림; 3: 흐림

[0273] 다른 주의: 관찰자로부터의 다른 관찰은 여기에 포함된 몇몇의 사례(예를 들어, 침전, 불용성 물질 등)에 있었다.

[0274] pH-측정

[0275] pH-미터(Metrohm 691 pH Meter)와 전극(조합된 LL pH 전극)은 3 표준의 참조 용액(Merck)을 가지고 4.00-9.00 범위로 조정되었다. 액체는 최종적으로 분석되었다.

[0276] 단백질 농도

[0277] 추출물, 제조 공정의 시료, 대량의 약 물질 및 최종 생산물에서의 단백질 농도는 알칼리 매질에서 단백질에 의한  $\text{Cu}^{2+}$ 의  $\text{Cu}^+$ 로의 환원 원칙을 이용하는 방법(Biuret 반응)에 의해 결정되었다. 그 다음에  $\text{Cu}^+$  이온은 고도로 민감하고 선택적인 색도 검출을 초래하는 비신코닌산(bicinchoninic acid)을 함유하는 시약과 반응되었다.

[0278] 순도

[0279] 재조합 인간 포르포빌리노겐 디아미나아제(rhPBGD)와 rhPBGD 변이체는 유동상태에서 유기 변이자(아세토니트릴)의 백분율에 의존하는 실리카 주원료의 고정 담체에 흡착능 및 제거능에 따라 분리되었다.

[0280] rhPBGD 활성

[0281] 포르포빌리노겐 디아미나아제(PBGD)는 효소로부터 방출되고 생체 내에서 우로포르피리노겐 III 신타아제(uroporphyrinogen III synthase)의 작용에 의해 우로포르피리노겐 III을 원형으로 만드는, 선형 사량체, 프레우로포르피리노겐(preuroporphyrinogen)을 형성하기 위하여 4개의 포르포빌리노겐(PBG) 분자의 첨가를 촉진시킨다. 프레우로포르피리노겐은 405 nm에서 빛을 흡수하는 우로포르피린을 형성하기 위하여 벤조퀴논과 화학적으로 산화될 수 있다. 분석은 각각의 시험 경우에 하나의 단일 바이알에서 수행되었다. rhPBGD 활성과 단백질 농도의 결정을 위하여 시험은 각각의 바이알에 대하여 각각 이중 및 삼중으로 수행되었다.

[0282] 삼투성(osmolality)

[0283] 동결건조된 rhPBGD의 한 바이알은 1.00 ml의 밀리Q-수(MilliQ-water)에 다시 부유되었다. 냉동한 rhPBGD 수용액 바이알은 해동되었다. 삼투압계(Vapro osmometer)는 3 표준 수용액으로 100-1000 mOsm/kg(100, 290, 1000 mOsm/kg) 범위로 조정되었다. 그 다음에 액체는 분석되었다.

[0284] 실시예 1[0285] 원심분리 여과 장치를 사용한 농축

[0286] 냉동된 PBGD 대량 용액(7 mg/ml rhPBGD, 3.67 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27 mM 글라이신, 250 mM 만니톨, pH 7.9)은 20 °C의 항온 수조(water-bath)에서 해동되었고, 3200 g에서 10분 동안 원심분리 되었고, 그 후에 0.2  $\mu\text{m}$ 의 PES 필터(Nalgene Polyethersulfone filters)에 의해 멸균여과되었다. PBGD 대량 용액은 원심분리 여과 장치 Centricon Plus-80(Mw cut-off 30000)과 Centricon Plus-15 (Mw cut-off 30000)를 3200 g에서 몇 시간 동안 운행함에 의해 100 mg/ml로 농축되었다. 농축된 용액, 즉 보전액은 0.22  $\mu\text{m}$  필터(Millex GV)에 의해 멸균여과되었으며, 최종적으로 이 용액의 일부는 멸균 포뮬레이션 버퍼로 50 mg/ml가 되도록 희석되었다. 5 mg/ml의 용액은 재조합체와 정제된 rhPBGD를 멸균 포뮬레이션 버퍼와 직접 희석함으로써 제조되었다.

[0287] 그 다음에 상기에서 기술된 바와 같이 5 mg/ml, 50 mg/ml 및 100 mg/ml rhPBGD는 동결건조되었다. 상기에서 기술된 동결건조된 5, 50 및 100 mg/ml rhPBGD를 용액과 수용성의 5 mg/ml rhPBGD 용액의 몇몇의 바이알(vial)은 40°C ± 2°C, 75% ± 5%의 상대습도(RH)에서 저장되었다. 바이알들은 잘 밀폐된 두번째 포장(종이 박스)에서 빛으로부터 보호되어 저장되었다.

[0288] 표시된 시점(즉, 저장시간)에 각각의 동결건조된 시료의 바이알은 1.00 ml의 밀리포아수(Millipore water)에 재현탁되었다.

[0289]

재현탁된 각각의 바이알과 rhPBGD의 방수 바이알은 그 다음에 색상, 투명도 및 침전과 관련하여 시각적으로 관찰되었고, pH, 단백질 농도, 순도 및 rhPBGD 활성은 위에서 기술된 바와 같이 측정되었다.

[0290]

결과는 다음의 표 1-4에 나타내었다:

### 표 1

[0291]

동결건조된 생산물, 5 mg/ml

시점(개월)	활성(U/ml)	농도(mg/ml)	특정 활성(U/mg)	순도(%)	시각적 관찰
0	93.2	4.3	21.5	99.6	색상: 1, 투명도: 1
0.5	81.0	5.2	15.6	ND	색상: 1, 투명도: 1
1	76.6	5.9	13.1	99.9	색상: 1, 투명도: 1
1.5	87.0	5.5	15.9	99.7	색상: 1, 투명도: 1
2	53.3	4.7	11.4	99.6	색상: 1, 투명도: 1
3	50.8	4.8	10.7	99.6	색상: 1, 투명도: 1
6	34.3	5.3	6.5	99.6	색상: 1, 투명도: 1

### 표 2

[0292]

동결건조된 생산물; 50 mg/ml

시점(개월)	활성(U/ml)	농도(mg/ml)	특정 활성(U/mg)	순도(%)	시각적 관찰
0	888	41.4	21.5	99.1	색상: 2, 투명도: 1
0.5	842	50.6	16.6	ND	색상: 2, 투명도: 1
1	746	50.6	14.8	100	색상: 2, 투명도: 1
2	640	52.9	12.1	100	색상: 2, 투명도: 1
3	634	49.0	12.9	100	색상: 2, 투명도: 1
6	422	43.0	9.8	100	색상: 2, 투명도: 1

### 표 3

[0293]

동결건조된 생산물; 100 mg/ml

시점(개월)	활성(U/ml)	농도(mg/ml)	특정 활성(U/mg)	순도(%)	시각적 관찰
0	1944	83.7	23.2	99.1	색상: 3, 투명도: 1
1	1470	98.7	14.9	100	색상: 3, 투명도: 1

2	1282	94.8	13.5	100	색상: 3, 투명도: 1
3	1253	82.6	15.2	100	색상: 3, 투명도: 1
6	739	75.5	9.8	100	색상: 3, 투명도: 1

## 표 4

[0294] 수용성 생산물; 5 mg/ml

시점(개월)	활성(U/ml)	농도(mg/ml)	특정 활성(U/mg)	순도(%)	시각적 관찰
0	95.6	4.0	23.7	99.1	색상: 1, 투명도: 1
0.5	48.1	5.4	8.9	ND	색상: 1, 투명도: 1
1	28.6	5.9	4.8	96.1	색상: 1, 투명도: 1
1.5	12.3	5.6	2.2	91.4	색상: 1, 투명도: 1
2	4.5	4.4	1.0	90.7	색상: 1, 투명도: 1
3	7.1	3.1	2.3	87.3	색상: 2, 투명도: 2
6	4.4	2.1	2.1	58.1	색상: 2, 투명도: 2

[0295] 실시예 2

## [0296] 원심분리 여과 장치에 의한 rhPBGD 조성물의 농축

[0297] 냉동된 PBGD 대량 용액(7 mg/ml rhPBGD, 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 27 mM 글라이신, 250 mM 만니톨, pH 7.9)은 20 °C의 항온 수조(water-bath)에서 해동되었고, 3200 g에서 10분 동안 원심분리 되었고, 그 후에 0.2 μm의 PES 필터(Nalgene Polyethersulfone filters)에 의해 멸균여과되었다. PBGD 대량 용액은 원심분리 여과 장치 Centricon Plus-80(Mw cut-off 30000)과 Centricon Plus-15 (Mw cut-off 30000)를 3200 g에서 몇 시간 동안 운행함에 의해 100 mg/ml로 농축되었다. 농축된 용액, 즉 보전액은 0.22 μm 필터(Millex GV)에 의해 멸균여과되었으며 더 낮은 농도의 용액을 얻기 위하여 멸균여과된 포뮬레이션 베퍼(위 참조)로 희석되었다. 각 농도의 부피에서 단편은 위에서 기술된 바와 같이 동결건조 되었다.

[0298] 동결건조된 rhPBGD와 rhPBGD 수용액의 다른 농도는 5°C±3°C 또는 -20°C±5°C(주변의 상대습도(RH))에서 저장되었다. 모든 바이알들은 잘 밀폐된 두번째 포장(종이 박스)에서 빛으로부터 보호되어 저장되었다.

[0299] 표시된 시점(즉, 저장시간)에서 각각의 동결건조된 시료의 바이알은 1.00 ml의 밀리포아수에 다시 부유되었고, 그 후에 rhPBGD 수용액과 함께 색상, 투명도 및 침전을 시각적으로 관찰하고 pH, 단백질 농도, 순도, 삼투성 및 rhPBGD 활성을 측정함에 의해 시험되었다.

[0300] 결과는 다음의 표 5-19에 나타내었다:

표 5

수용성 생산물; 11 mg/ml; 저장 온도: +5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰
0	10.9	255.0	23.4	100.0	7.80	290	색상: 1-3 투명도: 1-3 용액 집합체
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
1	9.5	216.8	22.8	100.0	7.81	305	색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 거의 없음
3	11.2	226.6	20.2	100.0	7.76	290	색상: 2 투명도: 1 투명 거의 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 몇개 있음
							색상: 2 투명도: 1 투명 몇개 있음
							색상: 2 투명도: 1 투명 몇개 있음

표 6

수용성 생산물: 11 mg/ml; 저장 온도: -20°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰
0	10.4	236.1	22.6	100	7.80	290	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
1	11.7	270.3	23.1	100	7.81	302	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	12.4	247.7	20.0	100	7.77	288	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
6	13.4	291.5	21.8	100	7.77	301	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음
							색상: 2 투명도: 1 투명 없음

표 7

[0303] 동결건조된 생산물, 11 mg/ml; 저장 온도: +5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3; 투명도 1-3; 용액; 집합체
0	10.9	230.0	21.2	100.0	7.80	290	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	13.3	269.3	20.2	100.0	7.74	282	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음
6	14.7	237.9	16.2	100.0	7.76	290	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음

표 8

[0304] 수용성 생산물, 17 mg/ml; 저장 온도: +5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	18.0	471.0	26.1	100.0	7.80	298	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음/거의 없음
1	17.5	360.4	20.6	100.0	7.81	311	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음/거의 없음
2	18.3	397.0	21.7	100.0	7.83	302	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							없음/거의 없음
3	16.6	376.5	22.7	100.0	7.77	294	색상: 2
							투명도: 1
							투명
							거의 없음

6	16.0	257.3	16.1	100.0	7.76	305	색상: 2 투명도: 1 투명 몇개 있음
---	------	-------	------	-------	------	-----	--------------------------------

## 표 9

수용성 생산물, 17 mg/ml; 저장 온도: -20°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	17.9	411.6	23.0	100.0	7.80	298	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
1	17.4	439.5	25.3	100.0	7.80	310	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	16.4	389.4	23.7	100.0	7.77	292	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
6	18.0	373.8	20.8	100.0	7.76	305	색상: 2 투명도: 1 투명 없음

## 표 10

동결건조된 생산물, 17 mg/ml; 저장 온도: 5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	16.9	380.1	22.5	100.0	7.80	298	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	15.6	391.9	25.1	100.0	7.76	285	색상: 2 투명도: 1 투명 없음

6	16.6	341.3	20.6	100.0	7.75	297	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
---	------	-------	------	-------	------	-----	-----------------------------

**표 11**

수용성 생산물; 36 mg/ml; 저장 온도: +5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	36.0	844.4	23.4	100.0	7.81	305	색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
1	35.5	778.1	21.9	100.0	7.82	314	색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
2	35.4	798.5	22.6	100.0	7.81	310	색상: 2 투명도: 1 투명 없음/거의 없음
3	28.9	687.9	23.8	100.0	7.77	303	색상: 2 투명도: 1 투명 거의 없음
6	37.2	537.3	14.4	100.0	7.77	312	색상: 2 투명도: 1 투명 몇개 있음

**표 12**

수용성 생산물; 36 mg/ml; 저장 온도: -20°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	34.0	853.4	25.1	100.0	7.81	305	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
1	38.0	853.6	22.5	100.0	7.83	321	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3	31.6	776.3	24.6	100.0	7.76	299	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
6	30.6	543.8	17.8	100.0	7.75	311	색상: 2 투명도: 1 투명 없음

표 13

[0309] 동결건조된 생산물, 36 mg/ml; 저장 온도: 5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	29.5	657.0	22.3	100.0	7.81	305	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	28.7	747.6	26.0	100.0	7.75	290	색상: 2 투명도: 1 투명 없음
6	29.8	579.3	19.4	100.0	7.76	300	색상: 2 투명도: 1 투명 없음

표 14

[0310] 수용성 생산물, 50 mg/ml; 저장 온도: 5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	46.2	780.9	16.9	96.3	7.59	317	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
1	47.9	915	19.1	90	7.58	305	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음

2	47.2	898.3	19.0	100	7.60	318	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
3	60.8	1102.6	18.1	100	7.72	314	색상: 3 투명도: 1 투명 없음
6	62.5	902.8	14.4	100	7.60	331	색상: 3 투명도: 2 투명 없음
9	41.7	618.5	14.8	100	7.60	336	색상: 3 투명도: 2 투명 없음
12	50.2	540.8	10.8	97.5	7.60	329	색상: 3 투명도: 2 투명 없음

표 15

수용성 생산물, 50 mg/ml; 저장 온도: -20°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	46.2	780.9	16.9	96.3	7.59	317	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
1	47.2	899.1	19.0	93.7	7.58	313	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
2	53	1222.7	23.1	100.0	7.60	315	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
3	61.2	1336.2	21.8	100.0	7.75	320	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
6	52.2	1001.3	19.2	100.0	7.60	321	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
12	50.4	887.9	17.6	100.0	7.60	320	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음

표 16

동결건조된 생산물, 50 mg/ml; 저장 온도: 5°C

[0312]

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰
0	42.7	759.4	17.8	100.0	7.58	292	색상: 1-3 투명도: 1-3 케이크/용액 집합체
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
1	42.6	840.4	19.7	63.1	7.58	293	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
2	42.1	937.0	22.3	100.0	7.60	292	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
3	47.4	1014.7	21.4	100.0	7.75	291	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
6	49.0	876.5	17.9	100.0	7.60	304	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
12	51.3	945.0	18.4	100.0	7.60	308	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음

표 17

[0313]

수용성 생산물, 100 mg/ml; 저장 온도: 5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	81.8	1705.7	20.9	99.9	7.60	350	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
1	85.9	1942.4	22.6	96.9	7.55	352	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
2	95.7	1690.8	17.7	96.9	7.65	357	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
3	104.3	1671.2	16.0	100.0	7.65	350	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
6	96.0	1642.6	17.1	100.0	7.62	360	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
9	102.8	1270.8	12.4	100.0	7.63	352	색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
11	86.2	1140.2	13.2	100.0	7.60	353	색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
12	113.9	1550.6	13.6	100.0	7.58	350	색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
15	114.7	1160.6	10.1	98.3	7.61	350	색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
18	86.2	907.4	10.5	100.0	7.67	340	색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 2 약간 유백색 없음

표 18

[0314]

수용성 생산물, 100 mg/ml; 저장 온도: -20°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰 색상 1-3 투명도 1-3 용액 집합체
0	81.8	1705.7	20.9	99.9	7.60	316	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
1	89.3	2108.8	23.6	100.0	7.56	350	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
2	112.0	2066.5	18.5	100.0	7.65	353	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
3	100.2	2172.4	21.7	96.7	7.65	352	색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
6	87.5	2672.3	30.6	100.0	7.62	352	색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
9	97.1	2040.3	21.0	100.0	7.62	353	색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
11	104.6	2234.0	21.4	100.0	7.60	353	색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
12	94.5	1608.8	17.0	100.0	7.57	350	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
15	118.0	2015.9	17.1	100.0	7.62	351	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
18	90.6	1736.4	19.2	100.0	7.69	338	색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음
							색상: 3 투명도: 1 약간 유백색 없음

표 19

[0315]

동결건조된 생산물, 100 mg/ml; 저장 온도: 5°C

시점 (개월)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/mg)	순도(%)	pH	삼투성 (mOsm/kg)	시각적 관찰
0	76.0	1638.3	21.5	100.0	7.60	316	색상: 1-3 투명도: 1-3 케이크/용액 집합체
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
1	71.6	1747.6	24.4	100.0	7.55	318	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
2	81.6	1769.9	21.7	100.0	7.63	313	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
3	84.1	1616.6	19.2	98.2	7.65	320	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
6	96.7	2197.6	22.7	100.0	7.60	324	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	96.0	1978.4	20.6	100.0	7.57	322	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	80.6	1602.6	19.9	100.0	7.75	310	색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음
							색상: 3 투명도: 1 케이크: 노란색, 몇개 의 크랙 용액: 투명 없음

[0316] 실시예 3

[0317] 접선 유동 여과(TFF)에 의한 rhPBGD 조성물의 농축

- [0318] PBGD 대량 용액은 그 다음에 5 °C, 암실에서 최소 3일 동안 해동되었다.
- [0319] 해동된 용액은 그 다음에 200 mL 원뿔의 원심분리 튜브를 이용하여 2200 g에서 대략 10분 동안 원심분리되었다.
- [0320] 용액은 그 다음에 접선 유동 여과(TFF)에 의해 농축되기 전에 다음의 기공 크기: 5.0  $\mu$ m; 0.65  $\mu$ m; 0.45  $\mu$ m; 및 0.20  $\mu$ m를 갖는 일련의 필터를 통하여 여과되었다.
- [0321] TFF에 의한 농축은 대략 20-25 psi의 펌프 입구 압력과 대략 4-6 psi의 Pellicon® XL Filter에 걸친 압력을 가진 Millipore Labscale TFF 시스템과 Millipore Pellicon® XL Filter를 이용하여 수행되었다. rhPBGD는 알루미늄 호일 시트에 의해 TFF 시스템의 시료 용기를 덮음으로써 절차 동안에 빛으로부터 보호되었다.
- [0322] TFF 절차로부터 얻어진 농축된 rhPBGD 용액은 그 다음에 멸균수에서 제조된 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 27 mM 글라이신 및 220 mM 만니톨을 함유하는 포뮬레이션 버퍼에 대하여 버퍼-변경되었다. 이는 상기 버퍼를 TFF-시스템에 연속적으로 첨가하고 상기 버퍼가 이전의 버퍼를 대체할 때까지 막을 통과하도록 가압함에 의해 수행되었다.
- [0323] 농축된 및 버퍼-변경된 rhPBGD 용액은 그 다음에 0.22  $\mu$ m의 기공 크기를 갖는 필터를 통과함에 의해 멸균여과되었다. 이러한 멸균여과는 각각의 시간에 새로운 필터로 두번 수행되었다.
- [0324] 멸균 농축된 rhPBGD 용액은 그 다음에 방법 부분에서 기술된 바와 같이 동결건조되기 전에 바이알에 놓여졌다.
- [0325] 실시예 4
- [0326] 다른 방식의 동결건조 및/또는 첨가제의 양이 재구성 시간에 미치는 영향
- [0327] PBGD는 실시예 3에서 기술된 바와 같이 농축되었고 버퍼의 교환 후에 PGBD의 농도는 결정되었다.
- [0328] 농축된 PBDG 용액은 그 다음에 Lyostar (FTM-systems) 동결건조기에서 동결건조되었다. 용액은 2 및 6 mL 주사 유리 바이알(type I)들에 채워졌고 고무 마개(클로로부틸)로 마개를 하게 되었다.
- [0329] 원래의 동결건조 사이클:
- [0330] 시료는 주변 온도에 로드되었고 선반들은 0 °C에서 30분 동안 냉각되었다. 온도는 -40 °C(분당 1 °C씩)까지 낮춰졌으며 거기에서 30분 동안 유지되었고, 그 다음에 진공 압력은 230 mTorr까지 끌어당겨졌으며 첫번째 건조는 온도를 0 °C(분당 1 °C씩)까지 올림에 의해 시작되었다. 첫번째 건조의 360분 후에 온도는 +30 °C(분당 0.5 °C씩)까지 올려졌고 동시에 완전 진공이 만들어졌다(두번째 건조의 시작). 온도는 +30 °C에서 360분 동안 유지되었으며 바이알은 그 다음에 진공 하에 마개를 하게 되었다.
- [0331] 가열냉각 단계를 포함하는 동결건조:
- [0332] -40 °C에서 30분 후, 분당 2 °C의 속도로 온도가 다시 분당 2 °C씩 -40 °C까지 다시 낮춰지기 전에 온도는 120 또는 420분 동안 유지되는 온도인 -10 °C 또는 -20 °C까지 올려졌으며, 시료는 첫번째 건조의 시작 전에 60-90분 동안 유지되었다.

[0333]

결과는 첨가제를 고려하여 짧은 기간이 사용된 표 20에 나타냈으며, 동결건조 사이클은 다음을 의미한다:

[0334]

1× 첨가제 양은 PBGD 용액이 멸균수에서 제조된 3.67 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 27 mM 글라이신 및 220 mM 만니톨을 포함하는 것을 나타낸다.

[0335]

1.5× 첨가제 양은 PBGD 용액이 멸균수에서 제조된 5.51 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 40.5 mM 글라이신 및 375 mM 만니톨, 즉 1× 벼파에 존재하는 각 성분의 1.5×을 포함하는 것을 나타낸다.

[0336]

2× 첨가제 양은 PBGD 용액이 멸균수에서 제조된 7.34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 54 mM 글라이신 및 500 mM 만니톨, 즉 1× 벼파에 존재하는 각 성분의 2×을 포함하는 것을 나타낸다.

[0337]

원래의 동결건조 사이클은 위에서 기술된 바와 같다.

[0338]

가열냉각 동결건조 사이클은 다시 -40 °C까지 낮추기 전에 가열냉각 단계가 온도를 -10 °C까지 올리고, 이 온도에서 시료를 120분 동안 유지하는 것을 포함하는, 위에서 기술된 바와 같다.

[0339]

확장된 가열냉각 동결 건조 사이클은 다시 -40 °C까지 낮추기 전에 가열냉각 단계가 온도를 -20 °C까지 올리고, 이 온도에서 시료를 420분 동안 유지하는 것을 포함하는, 위에서 기술된 바와 같다.

표 20

[0340]

첨가제 양	단백질 농도 (mg/ml)	다른 동결건조 사이클을 위한 재구성 시간		
		원래	가열냉각	확장된 가열냉각
1×	198	600	550	480
1×	175	540	500	450
1×	150	450	480	180
1×	125	330	100	10
1×	100	40	10	10
1×	80	25	10	10
1.5×	200	480	40	60
1.5×	175	220	10	10
1.5×	150	60	10	10
1.5×	125	15	10	10
1.5×	100	10	10	10
2×	200	120		20
2×	175	40		20
2×	150	20		10
2×	100	10		10

[0341]

실시예 5

[0342]

동결건조의 다른 방식 및/또는 첨가제의 양이 동결건조된 생산물의 외관에 미치는 영향

[0343]

농축 및 동결건조된 PBGD 용액은 실시예 4에서 기술된 바와 같이 제조되었고, 첨가제의 양에 대한 참고예 및 동결건조 사이클의 유형은 실시예 4에서와 같은 의미를 갖는다.

[0344] 다음 결과는 동결건조된 생산물의 시각적인 검사에 의해 얻어졌다:

[0345] A: 각각  $4.6 \text{ mg/mL}$ ,  $66.6 \text{ mg/mL}$  및  $109.4 \text{ mg/mL}$  rhPBGD를 포함하는 용액으로부터 제조된 세개의 생산물의 비교는 동결건조된 생산물에서의 크랙의 수가 rhPBGD의 농도가 증감에 따라 증가한다는 것을 나타내었다.

[0346] B:  $150 \text{ mg/mL}$  rhPBGD를 포함하는 용액, 및 첨가제의  $1\times$  및  $1.5\times$  양을 포함하는 용액으로부터 제조된, 두개의 생산물의 비교는 동결건조된 생산물에서의 크랙의 수가  $1\times$  첨가제 양을 포함하는 생산물보다  $1.5\times$  첨가제 양을 포함하는 생산물에서 더 낮은 것을 나타내었다.

[0347] C:  $1\times$  및  $2\times$  첨가제 양을 포함하는,  $150 \text{ mg/mL}$  rhPBGD 용액으로부터 제조된 두개의 동결건조된 생산물의 비교는  $2\times$  첨가제 양을 가진 동결건조된 생산물에서의 크랙의 수가  $1\times$  첨가제 양을 포함하는 생산물보다 더 낮은 것을 나타내었다.

[0348] D: 원래의, 가열냉각 및 확장된 가열냉각 동결건조 사이클의 사용에 의해  $150 \text{ mg/mL}$  rhPBGD로부터 제조된 세개의 동결건조된 생산물의 비교는, 동결건조된 생산물에서의 크랙의 수가 원래의 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물에서보다 가열냉각 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물에서 더 낮은 것을 나타내었다. 게다가, 확장된 가열냉각 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물에서의 크랙의 수는 가열냉각 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물에서보다 더 낮았다.

[0349] E: 세개의 동결건조된 생산물은 각각  $150$ ,  $175$  및  $200 \text{ mg/mL}$ 의 rhPBGD 용액으로부터 제조되었다. 동결건조된 생산물은 각각 첨가제  $1.5\times$  양을 포함하였고 그들은 가열냉각 사이클에 의해 동결건조되었다. 동결건조된 생산물의 중 아무것도 어떤 크랙도 포함하지 않았다.

[0350] F: 두개의 동결건조된 rhPBGD 생산물은  $150 \text{ mg/mL}$  rhPBGD 용액으로부터 제조되었다. 이것들 중 하나는 첨가제  $1\times$  양을 포함하였고 원래의 동결건조 사이클에 따라서 제조된 반면, 다른 하나는 첨가제  $1.5\times$  양을 포함하였고 확장된 동결건조 사이클에 따라 제조되었다. 첨가제  $1.5\times$  양을 포함하고 확장된 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물은 첨가제  $1\times$  양을 포함하고 원래의 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물보다 크랙이 더 적었다.

[0351] G: 두개의 동결건조된 rhPBGD 생산물은  $150 \text{ mg/mL}$  rhPBGD 용액으로부터 제조되었다. 그들 중 하나는 첨가제  $1\times$  양을 포함하였고 원래의 동결건조 사이클에 따라서 제조된 반면, 다른 하나는 첨가제  $1\times$  양과 조합하여 0.1%의 트윈 80을 포함하였고 확장된 동결건조 사이클에 따라 제조되었다. 첨가제  $1\times$  양과 조합하여 0.1%의 트윈 80을 포함하는 생산물은 첨가제  $1\times$  양을 포함하고 원래의 동결건조 사이클에 따라 제조된 생산물보다 크랙이 더 적었다.

[0352] 실시예 6

[0353] 회수 부피, 첨가제 양 및 동결건조 방식이 동결건조된 rhPBGD의 안정성에 미치는 영향

[0354] 농축된 rhPBGD 용액 동결건조된 시료는 실시예 4에서 기술된 바와 같이 제조되었다.

[0355] “대량 용액”은 동결건조 전에 PBGD의 농축된 용액이다.

[0356] 표 21은 rhPBGD의 농도, 첨가제 양(실시예 4에서 사용된 것과 같은 같은 정의이다), 동결건조 방식(실시예 4에서 사용된 것과 같은 같은 정의이다) 및 회복 부피(Rec. vol 동결건조된 생산물이 재현탁되는 부피이다)에 대한 채우는 부피(fill. Vol 동결건조 되기 전에 조성물의 부피이다)의 비율과 관련된 다음의 특성들을 갖는 rhPBGD 용액의 결과를 나타낸다.

[0357] 용액 1:

[0358] · 약 5 mg/ml rhPBGD

[0359] · 첨가제 1× 양

[0360] · 원래의 동결건조 사이클

[0361] · Fill. vol = Rec. vol

[0362] 용액 2:

[0363] · 약 70 mg/ml rhPBGD

[0364] · 첨가제 1× 양

[0365] · 원래의 동결건조 사이클

[0366] · Fill. vol = 2× Rec. vol

[0367] 용액 3:

[0368] · 약 110 mg/ml rhPBGD

[0369] · 첨가제 1× 양

[0370] · 원래의 동결건조 사이클

[0371] · Fill. vol = Rec. vol

[0372] 용액 4:

[0373] · 약 70 mg/ml rhPBGD

[0374] · 첨가제 1× 양

[0375] · 원래의 동결건조 사이클

[0376] · Fill. vol = 1.5× Rec. vol

[0377] 용액 5:

[0378] · 액 90 mg/ml rhPBGD

[0379] · 첨가제 2/3× 양

[0380] · 원래의 동결건조 사이클

[0381] · Fill. vol = 1.5× Rec. vol

[0382] 용액 6:

[0383] · 약 60 mg/ml rhPBGD

[0384] · 첨가제 1/2× 양

[0385] · 원래의 동결건조 사이클

- [0386] • Fill. vol = 2× Rec. vol

[0387] 용액 7:

- [0388] • 약 110 mg/ml rhPBGD

- [0389] • 첨가제 1× 양

- [0390] • 가열냉각 동결건조 사이클

- [0391] • Fill. vol = Rec. vol

[0392] 용액 8:

- [0393] • 약 60 mg/ml rhPBGD

- [0394] • 첨가제 1× 양

- [0395] • 가열냉각 동결건조 사이클

- [0396] • Fill. vol = 2× Rec. vol

[0397] 용액 9:

- [0398] • 약 150 mg/ml rhPBGD

- [0399] • 첨가제 1× 양

- [0400] • 가열냉각 동결건조 사이클

- [0401] • Fill. vol = Rec. vol

[0402] 용액 10:

- [0403] • 약 150 mg/ml rhPBGD

- [0404] • 첨가제 1× 양

- [0405] • 원래의 동결건조 사이클

- [0406] • Fill. vol = Rec. vol

[0407] 표 21에 나타내지는 않았다 하더라도 순도는 또한 각 시점에서 시험되었고 모든 경우에 100%로 발견되었다.

[0408] 4주와 9시점에서 용액 2의 경우와 1주와 9시점에서 용액 4의 경우 틀린 회복 부피가 사용되었다.

## 표 21

용액	측정 점 (주)	Fill. Vol (ml)	Rec. Vol (ml)	pH	삼투성 (mosmol/kg)	단백질 농도 (mg/ml)	활성 (U/ml)	특정 활성 (U/ml)
1	대량					4.6	78	17.1
	0	0.67	0.67	7.54	274	4.8	85	17.8
	2	0.67	0.67	7.22	274	4.6	87	19.4
	4	0.67	0.67	7.78	279	5.1	75	14.5
	7	0.67	0.67	7.87	284	5.1	68	13.3
	9	0.67	0.67	7.67	403	7.0	93	13.2
2	대량					66.6	1129	16.9
	0	0.67	0.335	7.64	525	113	1915	16.9
	2	0.67	0.335	7.63	459	93.6	1593	17.0
	4	0.67	0.67	7.75	264	64.6	1104	17.1
	7	0.67	0.335	7.95	451	106.4	2106	19.8
	9	0.67	0.67	7.59	247	51.4	859	16.7

3	대량				109.4	1491	13.6	
	0	0.67	0.67	7.75	274	99.9	1598	16.0
	2	0.67	0.67	7.64	269	91.4	1543	16.9
	4	0.67	0.67	7.68	274	101.2	1825	18.0
	7	0.67	0.67	7.71	278	103.4	2045	19.8
	9	0.67	0.67	7.67	274	88.3	1656	18.8
4	대량				71.5	1244	17.4	
	0	0.67	0.45	7.64	448	113.8	1748	15.4
	2	0.67	0.45	7.63	411	86.4	1806	20.9
	4	0.67	0.45	7.77	362	109.9	1897	17.3
	7	0.67	0.45	7.90	379	95.2	686	(7.2)
	9	0.67	0.67	7.63	273	59.7	1090	18.3
5	대량				91.0	1610	17.7	
	0	0.67	0.45	7.65	296	119.4	2014	16.9
	2	0.67	0.45	7.61	285	112.3	2093	18.6
	4	0.67	0.45	7.90	292	125.1	2409	19.3
	7	0.67	0.45	7.88	297	116.4	1928	16.6
	9	0.67	0.45	7.34	278	102.5	1490	14.5
6	대량				60.7	992	16.3	
	0	0.67	0.335	7.63	295	112.6	1753	15.6
	2	0.67	0.335	7.60	288	86.9	1787	20.6
	4	0.67	0.335	7.83	287	116.4	2106	18.1
	7	0.67	0.335	8.20	299	109.7	695	(6.3)
	9	0.67	0.335	7.44	287	95.2	1636	17.2
7	대량				116.4	1926	16.5	
	0	0.67	0.67	7.56	275	101.1	1750	17.3
	2	0.67	0.67	7.51	276	93.4	1831	19.6
	4	0.67	0.67	7.60	270	101.6	1774	17.5
	7	0.67	0.67	7.53	283	102.2	1639	16.0
	9	0.67	0.67	7.46	274	89.9	960	10.7
8	대량				64.5	1119	17.4	
	0	0.67	0.335	7.52	511	100.7	1718	17.1
	2	0.67	0.335	7.51	459	99.3	1900	19.1
	4	0.67	0.335	7.70	482	114.5	1913	16.7
	9	0.67	0.335	7.29	425	102.3	1650	16.1
9	대량				165	3587	21.7	
	0	0.60	0.60	7.71	309	121.4	2819	23.2
	4	0.60	0.60	7.74	-	140.3	2014	14.4
	7.5	0.60	0.60	7.61	292	135.9	1640	12.1
10	대량				165	3587	21.7	
	0	0.60	0.60	7.86	276	142.1	2397	16.9
	3	0.40	0.40	8.20	314	141.9	2381	16.8
	5	0.60	0.60	7.60	302	131.8	2304	17.5

[0410] 실시예 7

[0411] 다른 첨가제가 rhPBGD의 안정성에 미치는 영향

[0412] rhPBGD는 실시예 4에서 기술된 바와 같이 농축되었고 그 후에 버퍼는 아래에 기술된 네개의 버퍼 중 하나로 변경되었다. 생산물은 그 후에 실시예 4에서 기술된 바와 같이 포함된 원래의 냉각단계를 이용하여 동결건조되었고 시료의 안정성은 실시예 6에서 기술된 바와 같이 시험되었다.

[0413] 다음의 네개의 포뮬레이션이 rhPBGD의 안정성에 미치는 영향이 시험되었다:

[0414] 포뮬레이션 A(실시예 6의 용액 9에 상응): 250 mM 만니톨, 27 mM 글라이신 및 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

[0415] 포뮬레이션 B: 250 mM 만니톨, 27 mM 글라이신 및 10 mM TRIS-HCL.

[0416] 포뮬레이션 C: 250 mM 만니톨, 27 mM 글라이신, 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 0.1% 트윈 80.

[0417] 포뮬레이션 D: 221 mM 만니톨, 29 mM 슈크로오즈, 27 mM 글라이신, 3.67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 0.1% 트윈 80.

[0418] 결과는 표 22에 나타내었다.

**표 22**

포뮬레이션	측정 점 (주)	Fill. Vol (mℓ)	Rec. Vol (mℓ)	pH	삼투성 (mosmol/kg)	단백질 농도 (mg/mℓ)	활성 (U/mℓ)	특정 활성 (U/mℓ)
A	대량			7.69	366	165	3587	21.7
	0	0.60	0.60	7.71	309	121.4	2819	23.2
	4	0.60	0.60	7.74	-	140.3	2014	14.4
	7.5	0.60	0.60	7.61	292	135.9	1640	12.1
				7.54	320	173	3595	20.8
B	대량			7.58	284	148.1	3726	25.2
	0	0.60	0.60	7.57	280	165.4	2947	17.8
	3	0.60	0.60	7.69	-	167.5	2367	14.1
	4	0.60	0.60	7.60	283	150.4	2235	14.9
				7.40	338	178	3606	20.2
C	대량			7.76	290	142.9	2662	18.6
	0	0.60	0.60	7.43	285	181.7	2332	12.8
	3	0.60	0.60	7.42	-	173.1	1436	8.3
	4	0.60	0.60	7.55	274	156.6	1254	7.4
	6	0.60	0.60	7.34	274	141.5	1252	8.9
D	대량			7.41	337	175	3869	22.1
	0	0.60	0.60	7.80	292	127.5	2355	18.5
	3	0.60	0.60	7.35	288	143.9	1988	13.8
	4	0.60	0.60	7.26	-	159.3	1644	10.3
	6	0.60	0.60	7.30	281	135.7	1236	9.1
	7.5	0.60	0.60	7.28	282	125.7	1146	9.1

### 서 열 목록

<110> Zymenex A/S Stefan Nilsson

<120> A process for concentration of polypeptides

<130> 08PC157

<150> DK PA 2006 00488

<151> 2006-04-04

<150> DK PA 2006 00922  
 <151> 2006-07-05

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 1  
 atgagagtga ttgcgtggg taccgcgaag agccagctt ctcgcataca gacggacagt 60  
 gtggtggcaa cattgaaagc ctgcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120  
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180  
 accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggtgt tcactcctt 240  
 aaggacctgc ccactgtgct tcctccggc ttcaccatcg gaggcatctg caagcggaa 300  
 aaccctcatg atgctgttgt ctacccatca aaattgttg ggaagaccct agaaaccctg 360  
 ccagagaaga gtgtggggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaaag 420  
 ttccgcatac tggagttcag gatattcgg gaaacctca acacccggct tcggaagctg 480  
 gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca ggcacatggc 540  
 tggcacaacc gggttggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtggccag 600  
 gggcccttgg gcgtggaaat gcgagccaaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt 660  
 ctgcacgatc ccgagactct gttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacatc 720  
 gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780

ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct	840
accatccatg tccctgccca gcatgaagat ggcctgagg atgacccaca gttggtaggc	900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaacct gggcatcagc	960
ctggccaact ttttgcttag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgtgc acggcaattg	1020
aacgatgccc attaa	1035
<210> 2	
<211> 1035	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
atgagagtga ttgcgtggg taccgcgaag agccagcttgc ttcgcataca gacggacagt	60
tggtggcaa cattgaaagc ctgttacccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt	180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggtgt tcactccttg	240
aaggacctgc ccactgtgtct tcctcctggc ttccatcg gagccatctg caagcgggaa	300
aaccctcatg atgctgttgt ctccaccca aaattgttg ggaagaccct agaaaccctg	360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaaag	420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg gaaacctca acaccggct tcggaagctg	480
gacgagcagc aggagttcag tgcacatcatc ctggcaacag ctggcctgca ggcgcattggc	540
tggcacaacc ggggtggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtggccag	600
ggggccttgg gcgtggaaat gcgagccaaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt	660
ctgcacgatc ccgagactct gtttcgtgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg	720

gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac	780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct	840
accatccatg tccctgccca gcatgaagat ggcctgagg atgaccacata gttggtaggc	900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaacctt gggcatcagc	960
ctggccaact tggctgtag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattt	1020
aacgatgccca attaa	1035
<210> 3	
<211> 1035	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

atgagagtga ttgcgtggg tacccgaag agccagcttgc ttcgcataca gacggacagt	60
tggtggcaa cattgaaagc ctcttacccct ggcctgcgtt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt	180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggtgt tcactccttgc	240
aaggacctgc ccactgtgtc ttccctggc ttccaccatcg gagccatctg caagcggaa	300
aaccctcatg atgctgttgtt cttcacccaa aatttggatgg ggaagaccctt agaaacccttgc	360
ccagagaaga gtgtggggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaaag	420
ttcccgcatc tggagttcag gaggattcgg ggaaacctca acacccggct tcggaagctg	480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca ggcgcattggc	540
tggcacaacc gggggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tggggccag	600

ggggccttgg gcgttggaaat ggcggccaaat gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt	660
ctgcacgatc ccgagactct gttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg	720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac	780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct	840
accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggcctgagg atgacccaca gttggtaggc	900
atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaacctt gggcatcagc	960
ctggccaact tggctcgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttc acggcaattt	1020
aacgatgccc attaa	1035

<210> 4  
 <211> 1034  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 4 atgagagtga ttgcgtggg tacccgcaag agccagctg ctgcataca gacggacagt	60
tggtggcaa cattgaaagc ctcttaccctt ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgtt	180
accaaggaggc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggttgc tcaactccttgc	240
aaggacctgc ccactgtgct tcctcctggc ttccatcg gagccatctg caagcgggaa	300
aaccctcatg atgctgttgtt ctccacccaa aatttgggaa gaagacccta gaaaccctgc	360
cagagaagag tgggtgggaa accagctccc tgcaagagc agccagctg cagagaaagt	420
tcccgcatct ggagttcagg agtattcggg gaaacctcaa cacccggctt cgaaagctgg	480
acgagcagca ggagttcagt gccatcatcc tggcaacagc tggctgcag cgcatggct	540

ggcacaaccg ggtggggcag atcctgcacc ctgaggaatg catgtatgct gtggggcagg	600
gggccttggg cgtggaagtg cgagccaagg accaggacat cttggatctg gtgggtgtgc	660
tgcacgatcc cgagactctg cttcgctgca tcgctgaaag ggccttcctg aggcacctgg	720
aaggaggctg cagtgtgccca gtagccgtgc atacagctat gaaggatggg caactgtacc	780
tgactggagg agtctggagt cttagacggct cagatagcat acaagagacc atgcaggcta	840
ccatccatgt ccctgcccag catgaagatg gccctgagga tgaccacag ttggtaggca	900
tcactgctcg taacattcca cgagggcccc agttggctgc ccagaacttg ggcatacggcc	960
tggccaactt gttgctgagc aaaggagcca aaaacatcct ggaatttgca cggcaattga	1020
acgatgccca tttaa	1034

<210> 5  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 5 atgagagtga ttgcgtggg tacccgaag agccagcttgc tcgcataca gacggcagt	60
tggtggcaa cattgaaagc ctgcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt	180
accaaggaggc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggttgc tcactccttg	240
aaggacctgc ccactgtgtc tcctcctggc ttaccatcg gagccatctg caagcgggaa	300
aaccctcatg atgctgttgt ctacccatcca aaatttggat ggaagaccctt agaaaccctg	360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaagg	420

ttcccgcatc tggagttcag gagtattcg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg	480
gacgagcagc aggagttcag tgtcatcatc ctggcaacag ctggctgca gccatggc	540
tggcacaacc gggttggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtggccag	600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt	660
ctgcacgatc ccgagactct gttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacctg	720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac	780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catcaggct	840
accatccatg tccctgcaca gcatgaagat ggcctgagg atgaccacata gttggtaggc	900
atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaacctt gggcatcagc	960
ctggccaact tggctgag caagggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattt	1020
aacgatgccc attaa	1035

<210> 6  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6 atgagagtga ttgcgtggg taccgcgaag agccagcttgcctgcataca gacggacagt	60
tggtggcaa cattgaaagc ctgttacccctt ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt	180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggttgt tcactccttgc	240
aaggacctgc ccactgtgttgc ttccctggc ttccacatcg gagccatctg caagcggaa	300
aaccctcatg atgctgttgttgc ttccacccca aaatttggatgg ggaagaccctt agaaacccttgc	360

ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaaag	420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcg ggaaacctca acacccggct tcggaagctg	480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca ggcgtggc	540
tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtggccag	600
ggggccttgg gcgttggaaat gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt	660
ctgcacgatc ccgagactct gttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacctg	720
gaaggaggtt gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac	780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct	840
accatccatg tccctgcaca gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc	900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc	960
ctggccaact tggctgtag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgtgc acggcaattt	1020
aacgatgccc attaa	1035

<210> 7  
 <211> 1034  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7	
atgagagtga ttgcgtggg taccgcgaag agccagcttgc tcgcataca gacggacagt	60
gtgggtggcaa cattgaaagc ctcttacccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc	120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt	180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggtgt tcactccttg	240

aaggacctgc ccactgtgt	300
aaccctcatg atgctgttgt	360
ccagagaaga gtgtggtg	420
ttcccgcatc tggagttcag	480
gacgagcagc aggagttcag	540
tggcacaacc gggtgtggca	600
ggggccttgg cgctggaa	660
ctgcacgatc ccgagactct	720
gaaggaggct gcagtgtgcc	780
ctgactggag gagtctggag	840
accatccatg tccctgccc	900
atcaactgatc gtaacattcc	960
ctggccaaact tggtgctgag	1020
acgatgccca ttaa	1034

<210> 8  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 8	
atgagagtga ttgcgtggg	60
gtggtgccaa cattgaaagc	120
accacagggg acaagattct	180

accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggtgt tcactccttg	240
aaggacctgc ccactgtgct tcctcctggc ttccacatcg gagccatctg caagcggaa	300
aaccctcatg atgctgttgt cttdcaccca aaatttgtt ggaagaccct agaaaccctg	360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct gcagagaaag	420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acacccggct tcggaagctg	480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca ggcacatggc	540
tggcacaacc gggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtggccag	600
ggggccttgg gcgttggaaat gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgt	660
ctgcacgatc ccgagactct gttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacctg	720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac	780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggcc	840
accatccatg tccctaccca gcatgaagat ggcctgagg atgacccaca gttggtaggc	900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc	960
ctggccaact ttttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaatttgc	1020
aacgatgccc attaa	1035

<210>	9
<211>	1260
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	9
cacagggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaaggga	60

acaaaagctg gagctccacc gcgggtggcgcc ccgcctctaga actagtggat ccccccggct	120
gcaggaattc atgagagtga ttgcgtggg tacccgcaag agccagcttgc tcgcataca	180
gacggacagt gtgggtggcaa cattgaaagc ctgcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat	240
tgctatgtcc accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa	300
aagcctgttt accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctgggttgt	360
tcactccttg aaggacactgc ccactgtgct tcctcctggc ttaccatcg gagccatctg	420
caagcggaa aaccctcatg atgctgttgt ctccaccca aaatttggatgg ggaagaccct	480
agaaaccctg ccagagaaga gtgtgggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagccagct	540
gcagagaaag ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct	600
tcggaagctg gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca	660
gcgcatgggc tggcacaacc gggttggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc	720
tgtggccag gggcccttgg gcgtgaaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct	780
ggtgtgggtgtg ctgcacgatc ccgagactct gcttcgtgc atcgctgaaa gggcccttcct	840
gaggcacctg gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg	900
gcaactgtac ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac	960
catgcaggct accatccatg tccctgccc gcatgaagat ggcctgagg atgaccacaa	1020
gttggtaggc atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt	1080
gggcacatcgc ctggccaact tggcgttagc caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc	1140
acggcaatttgc aacgatgccc attaataaagc ttatcgatac cgtcgaccc tggggggggc	1200
ccggtaacca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgtttacaa	1260

1260

<210> 10  
 <211> 1113  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg 60  
 gaagaaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtggta cccgcaagag ccagcttgct 120  
 cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagtt 180  
 gaaatcattt ctagtccac cacagggac aagattctt atactgcact ctctaagatt 240  
 ggagagaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgcc tggagaagaa tgaagtggac 300  
 ctggttttc actccttggaa ggacctgccc actgtgcttc ctctggctt caccatcgga 360  
 gccatctgca agcggaaaa ccctcatgtat gctgtgtctt ttcacccaaa atttgggg 420  
 aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtggggaa ccagctccct gcgaagagca 480  
 gcccagctgc agagaaagt cccgcatttg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540  
 acccggttcc ggaagctggc cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct ggcaacagct 600  
 ggcctgcagc gcatggctg gcacaaccgg gttggcaga tcctgcaccc tgaggaatgc 660  
 atgtatgttgg tggccaggg ggccttggc gtggaaatgc gagccaagga ccaggacatc 720  
 ttggatctgg tgggtgtgt gcacgatccc gagactctgc ttgcgtgc catcgaaagg 780  
 gccttcctga ggcacctggc aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgc tacagctatg 840  
 aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata 900

caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgcccagc atgaagatgg ccctgaggat 960

gaccacacgt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gaggccccca gttggctgcc 1020

cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg 1080

gatgtgcac ggcaattgaa ccatgcccattaa 1113

<210> 11

<211> 1380

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

agcaggctt actatcgctt ccctctagtc tctgcttctt tggatccctg aggagggcag 60

aaggaagaaa acagccaaa gatgagagtattcgcgtgg gtacccgcaa gagccagtt 120

gctcgatac agacggacag tgggtggca acattgaaag cctcgatccc tggcctgcag 180

tttgaatca ttgctatgtc caccacagg gacaagattt ttgatactgc actctctaag 240

attggagaga aaaggctgtt taccaaggag cttaaacatg ccctggagaa gaatgaagt 300

gacctggttt ttcactcctt gaaggacctg cccactgtgc ttccctctgg ctccaccatc 360

ggagccatct gcaagcggga aaaccctcat gatgtgttg tcttcaccc aaaatttgg 420

gggaagaccc tagaaacctt gccagagaag agtgtggtgg gaaccagctc cctgcgaaga 480

gcagcccccgc tgcagagaaa gttccgcatttggatattca gggttattcg gggaaacctc 540

aacacccggc ttggaaagct ggacgaggcag caggatattca gtccatcat cctagcaaca 600

gctggctgc agcgcatggg ctggcacaac cgggttggc agatctgca ccctgaggaa 660

tgcattatgtatgttggccatggggccttggcgttggaaatgcgagccaa ggaccaggac 720

atcttggatc tgggtgggtgt gctgcacatcccggactc tgcttcgttgcatcgat 780

agggcctcc tgaggcacct ggaaggaggc tgcagtgtgc cagtagccgt gcatacagct	840
atgaaggatg ggcaactgta cctgactgga ggagtctgga gtctagacgg ctcagatagc	900
atacaagaga ccatgcaggc taccatccat gtccctgccc agcatgaaga tggccctgag	960
gatgaccac agttggtagg catcaactgct cgtaacattc cacgagggcc ccagttggct	1020
gcccagaact tgggcattcag cctggccaaac ttgttgctga gcaaaggagc caaaaccatc	1080
ctggatgttg cacggcagct taacgatgcc cattaactgg ttgtgggc acagatgcct	1140
gggttgctgc tgtccagtgc ctacatcccg ggcctcagtg cccattctc actgctatct	1200
ggggagtgtat taccgggaa gactgaactg cagggttcaa gcctccagg gattgcctc	1260
accttggggc cttgatgact gccttgcctc ctcaatgtt gggggttca tctctttaga	1320
gaagtccaag caacagcctt tgaatgtaac caatcctact aataaaccag ttctgaaggt	1380
	1380

<210>	12
<211>	1377
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<400>	12
cacacagcctt actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg	60
gaagaaaaaca gccaaagat gagagtgatt cgcgtggta cccgcaagag ccagcttgc	120
cgcatacaga cggacagtgtt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt	180
gaaatcattt cttatgtccac cacagggac aagattctt atactgcact ctctaaaggatt	240
ggagagaaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac	300

ctgggtgttc actccttga ggacctgcc actgtgcttc ctccggctt caccatcgga	360
gccccatctgca agcgggaaaa ccctcatgtat gctgtgtct ttcacccaaa atttgttggg	420
aagacccttag aaaccctgcc agagaagagt gtggggaa ccagctccct gcgaagagca	480
gcccagctgc agagaaagt cccgcacatcg gagttcagga gtattcgggaa aacactcaac	540
acccggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct agcaacagct	600
ggcctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tcctgcaccc tgagaaatgc	660
atgtatgtc tggccaggg ggccttggc gtggaaatgc gagccaaggaa ccaggacatc	720
ttggatctgg tgggtgtct gcacgatccc gagactctgc ttgcgtcat cgctgaaagg	780
gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg	840
aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata	900
caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgcccagc atgaagatgg ccctgaggat	960
gaccacatgt tggtaggcat cactgctgt aacattccac gaggccccca gttggctgcc	1020
cagaacttgg gcatcagccct ggccaaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg	1080
gatgttgac ggcagcttaa cgatgccat taactggttt gtggggcaca gatgcctggg	1140
ttgctgctgt ccagtgccta catccgggc ctcaatgc catttcact gctatctggg	1200
gagtgattac cccgggagac tgaactgcag gttcaagcc ttccaggat ttgcctcacc	1260
ttggggcctt gatgactgcc ttgcctccctc agtatgtggg ggcttcatct cttagagaa	1320
gtccaagcaa cagccttga atgtacccaa tcctactaat aaaccagttc tgaaggt	1377

<210> 13  
 <211> 10024  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400>	13						
aatcatgatt	gttaattatg	ttcatgatta	caggcgccgt	ggctcacgccc	tgtactccca	60	
gcactttggg	aggccgaggt	gggcgaatca	cctgaggtca	ggagttcaag	acctgcctga	120	
ctaacatgga	gaaacctcat	ctctaccaaa	aataaaaaat	tagccgggtg	tggtggtgcg	180	
tgcctgtaat	cccagctact	cggggggctg	aggcaggaga	attgcttcaa	cccgaggc	240	
ggaggttgca	gtgagctgag	atcgtgccat	tgcattccag	cctggcaac	aagagcgaaa	300	
ctccgtctca	aaaaaaaaaa	aaaattatgt	tcatggaaa	gcactttcc	taacaagccc	360	
tttctca	acatgttagt	tttgtgcctcc	acttcagtta	cttgtttta	ggcatgacct	420	
ttaatctctc	tgaaccagg	ttctcattt	aagaattgaa	atgctggctg	ggccagtcgt	480	
cacgcctgta	atcccagcac	tttgggaggc	caaggcgaga	tgactgcttg	agtccaggag	540	
ttcgagacta	gcctggcaa	catagtgagg	ccacccccc	gctgtctcta	taaaaaatc	600	
tagaaattag	tcccacgtgg	tgatgtgcgc	ctgttagtccc	agctgcttgg	gaggctgagg	660	
tggggggatc	gctgaagccg	ggaggtcaag	gctgcagtga	cccggtca	tggcgctgca	720	
ctctagtcg	ggcacacagt	gagacccgt	ataaaaaga	aaaatgctgc	ctattcaag	780	
gttgttagcaa	agctaagg	ttt	gaacagagca	aaggaaagcgc	catagaagct	gcactacttg	840
ctcatgtcac	agctgggaa	tggggaggc	gaatggggag	gtccactgtc	gcaatgttcc	900	
aattcccgcc	cagagggagg	gacctccct	tcgagggagg	gcccggaaag	tgacgcgagg	960	
ctctgcggag	accaggagtc	agactgtagg	acgacccctgg	gtcccacgtg	tcccggtac	1020	
tgcggcccg	gaggcctccgg	cttccgggg	ccgggggacc	ttagcggcac	ccacacacag	1080	

cctactttcc aaggcggagcc atgtctggta acggcaatgc ggctgcaacg gcggtgagtg	1140
ctgagccggt gaccagcaca ctttggcctt ctggacgagc cgtgcagcga ttggcccccag	1200
gttgccatcc tcagtcgtct attggtcaga acggctatct tttttttt tttttttt	1260
tttttggtcc gagtagctt taaaggcca gtagctcggt tgccctccgg aaggaatggg	1320
gaaatcagag agcggtgata ctgggttaag agtggaaagga ttgttggaa cggaactccg	1380
gtccctgcgg gcatctgggt gggattccca tcaggcctgg gatgcacggc tctagattta	1440
gtgacccaga ccaagaacgt tcgtctacac agacgggtc ctitcattcg aggctggct	1500
gaggcggatg cagatacggc cccttggga agacacgttc cactttgat tcataggaga	1560
gagtatcagc caagcctccg aactgcacac aaacgtctta gaagtgcgcc ttctttgt	1620
gttatagtgg tctccagcc acagccaacg ctccaagtcc ccagctgtga cacacctact	1680
gaattactac cgtgggtggg aggccggcgt gggccttcc attacgagcc tgctgccga	1740
gccctggcgt tgtgcacaga caaactgcag agctggtgga ggcactgcc aggccgagat	1800
aagaaagaga tggggagctg ctaatctcc cctgtccagc ctgttggtga gggctggat	1860
cttgctctt gcagtcatc cagagccctg gactaggagt aggaagatct gaattgtggc	1920
cccaactctc ttcggttat tagctctgt accctaggca agtcacctca tcccttgatg	1980
ccacccgttg cttctgtaac atggcccaa aggtgcctgt ctgtccacc tgataggatt	2040
ttttagacga caacaatatg caaaagcaat agcttcaaca tagaagtgct cagtgttttta	2100
tttttaatg aaacggtttgc acttggatata gctgtgcaca ttcaatgaac ttaaggatt	2160
gtttgaacct agtagttctg ggacctttaga gtccttctg tggctccct gtggcccaaga	2220
tttttggtgg ccacgtttaa tatcaagcct agcctaattt gcaaagggtc tcccagggtt	2280

atattattgg agtgcatac tggagtagac cagagtctga gggcagaaag ctgtcacctg	2340
cctcggaat agaggccca gatgtctgg tgcaaaagaa ctcctatgca ccccgaccaa	2400
catggtaaaa ccccgctct actaaaaata taaaaattag gccgagcaca gtggctcatg	2460
cctgttatcc tagcactttg ggaggccgag gcaggtggat tgcctgagct caggagttcg	2520
agaccagccct agggaaacaca gtgaaacccc gtttctacta aaaatacataaa aaattagccg	2580
acgtggtgcc atgcgcctgc agtcccagct acttgggagg ctaagacagg agaatcgctt	2640
gaacctggga ggtggagggt gcactgagcc gagaccgcgc cattgcactc cagcctgggt	2700
gacagagcgc aactccccct caaaaaaaaga aaaaaatata tatatatata tatatatata	2760
tacacacata ttttagctgg gcatggtggt gtgcgtctgt agtagtccca gctacttggg	2820
aggctgagtc aggagaatcg cttaaacctg gaaggcagtg gttttagtta gctgagaaca	2880
tgcactgca ctccagectg ggcaacagag ggagactctg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa	2940
aggaactaca taggatgaac atcccagatc aggaaatgtt gactgtcgac agtatacgta	3000
tctacagtgg ctactgtctg atgtagaaag aatgggatc aggctaggcg tggggctca	3060
cgccctgtat cccagcttt tgggaggctg gggcaggagg atcacaagtt cgagaccagc	3120
ctggccaaca cagtggaaacc cggctctac taaaaatgtg aaaatagct gggcatggtg	3180
gaacatgctg tagttccagc ttgaacccag gggtgaggt tggatgtgagc cttagatcagc	3240
ccactgcaact ccagcctgag caaaacagtg agactctgtc taaaaaaa aaaaaaaaaa	3300
agagaaatgg gacctccgtc ttagactgaa gaattcagtt ctacgtgctt agcagtgaaat	3360
acttttgtcc aaggtaactct ggcaggaggaa agagggctgt ccttttgagt tcttgacttg	3420

ggctctggcc tggtaatatt tccatgtgg tggaaaccaga ggcagcactc taggtgaacg	3480
aacttttaggc agcgacgccc cctagctta tggaaacatct gaggcagaag aaacctgagt	3540
ccaaccccttt catttatag atgaacaac agatcctgat gggacagtgt acccaaggtc	3600
acccagccaa gaggctgagc aggactgtac gtcatcgat tttacctcg tccttaatgc	3660
atgcagtcca gccagattaa gggaccctta atactgtcag ctttccccac tgtggatct	3720
tcatcctctt gacttcctt gtagccagac atctggcct cttgctggag aaggtggcag	3780
tttgctgctc tttagactcta gctactcca tgtggcatct ggaatggact gaaattttct	3840
caagtgcctt gtctgttcta gataatgaat ctatcctcca gtgactcagc acaggttccc	3900
cagtgtggtc ctggctgccc tgccctgcc agctgcaggc cccacccttc ctgtggccag	3960
gctgatgggc cttatcttt taccacacgt gctgtgcaca gcactccac tgacaactgc	4020
cttggtaag gtggcattca gggctcagtg tcctggttac tgcaacggca gcaacagcag	4080
gtcctactat cgccctccctc tagtctctgc ttctctggat ccctgaggag ggcagaagg	4140
actgaggaag gttaaaggga ccagccctgg agtatttccc cactctgaga ctcagctggc	4200
cacaggccag gttctgaatt tcctttcttc caagccagtg attctggttc ttggacaagg	4260
tgttgaggaa cactagaaac agagggact gtgacacgtt gacttttct gcaggaagaa	4320
aacagccaa agatgagagt gattcgcgtg ggtacccgca agagccaggt ggggtgcagga	4380
gccgggggtgg aggaggttg tcagaacagt tatgtatgctc acagcatcac aaattgggg	4440
actcagaggc ttatgttcata gttatgtgg gatgggtgg ctggcgatc agttccccgg	4500
gaaatggcag attacattct atggcaagat catccctagg ctggaaaat tggatggatgt	4560
cagaggcgtc ccaagccct tctcatgccc agatggaaat tccagtcct tcaggatctg	4620

cctaacctgt gacagtctaa agagtcttag cccgtggctgg gaagggcagg actaatccaa	4680
atctctaccc gcagcttgct cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaaggct	4740
cgtaccctgg cctgcagttt gaaatcagtg agtttctgg aaaggagtgg aagctaattgg	4800
gaagccccagt accccgagag gagagaacac aacattctg gcttcgcata tagctaaagc	4860
ccgtccccgtt gccccgagat tccttcgtgg ctgcctccag ttctgaaggt gctttccct	4920
gaataacctcc agctctgact acctggattt gcctggcatt taacatcttgg agctttgggt	4980
ctttttatga gtgtttctgg ttttcctgct cgattgtata tactcagagg gcaggaacca	5040
gggattatgt gcctctgtcc ccatcatgaa tcgttagcaca gtgttaggtt cagtaatgc	5100
tgtcaataa tgagcacccg attgatttgc tcttcctca gttgtatgt ccaccacagg	5160
ggacaagatt ctgtatactg cactctctaa ggtacaaca tcttcctccc cagttttgt	5220
ccccactctt ctttccttcc ctgaagggtt tcactcaggc tcttcgttc cggcagattt	5280
gagagaaaag cctgtttacc aaggagctt aacatgcctt ggagaagaat gagtaagtaa	5340
agataggaga gtgtggtgcc ctcccaagtctt cttgtggta cccttagatg ctaggtctct	5400
tgctgggacc cgggggtgtca gataggctgc tgggcttaaa ccctcagaga ggctgaaggc	5460
agctcatagg tggttttttt caggcttcag aaaaggagag tgtctggttc tgagccatct	5520
ggctgcctgg actgcaagaa tggctggggg aggagggtt ggaggagag taggaggag	5580
agttaggaga gaggatgtttt catgctctg agatcttgc aagggtgtct tcctgaactg	5640
ccctaggctc caccactgaa gtagaggcag ggggtgggtgg agaagggtt aaggctggct	5700
gctcataccctt cccccccttc ccatctctat agagtggacc tggttggttca	5760

ctccttgaag gacctgcca ctgtgcttc tcctggctc accatcgag ccatctgcaa	5820
gtaagagtct tgcaagtaag gggcttggc agggtaggc atcatgtcaa ccttgcctt	5880
tcccttggg gcctgaccct ctgcttcagg gttatctcct ctgcctgag gagtggtgac	5940
tggtggcaga aaactcaaga aataccagt agttggcaat cgagagagaa tagaggtgat	6000
ctgaacttaa atctctccc tcattctgt ccctccctc ctccccagg cgggaaaacc	6060
ctcatgatgc tgggtcttt cacccaaat ttgttggaa gaccctagaa accctgccag	6120
agaagaggtt agtgggcct ggataggcag ctgggtggaa tgigccaga agatgcaggg	6180
atgggaggag gaggaaagga acagtgactg cctagtgtt aaatctcatt gtaacttctc	6240
tctggcagt gtgggtggaa ccagctccct gcgaagagca gcccagctgc agagaaagt	6300
cccgcatctg gagttcagga gtattgtatc cttagaag agtgacggat cttttggaa	6360
gagtgacgga gacagcagcc aaggaaaaag acaaggtcta gaggccttg ggagtccgga	6420
gagtggaagg ggcttccagc aagcagcccg tgggtcagt ggcctgtctg tcttccatg	6480
cactcatccg tccactcatt tacagtcata tgtttctta gccccagaca agtgttcaga	6540
gtgcaaggca ttgggataa tggtgagcaa gataaacatt cccctgcata tgttaggtt	6600
acgtcttact taggataat gcagttatac tgaactgaat agtgactact tctggaggga	6660
tagggagtac ttccttttt tttttttt tttctgagac ggagtctcgc tctgttgccc	6720
aggttggagt gcagtggcgc aatctaggct cactgcaact tctgcctcct gagttcaagc	6780
aatcttcctg cctcagccctc ctaagtagtt gggattacag gtgccaccac acctggctaa	6840
ttttgtatt tttagtagag actgggttc accatgttag tcaggctggt ctcaaactcc	6900
tgacctcagg tgcacca gctcgccct cccaaaggc tgggattaca ggcttgagcc	6960

ccgcacccgg tcagtaactc cattttata tgctactata ttgtcttgac tttacaatg	7020
aatatgtagt acatttata aaactaaatt taaaaatagt atgtgctaag tgctccaata	7080
agtgaagttg ggaattttct ggaaacttct agttggaaca tctaaacaca gaagtctggg	7140
gtgtcaggga aggtttctca gaggcttgc aacctggca agttatgg cctccctatg	7200
tcatttccct tatctgtaaa gtggggataa taatactacc ttccctcacag gtttgtgtg	7260
aagatgaaat gagctgacat atgaaagta cttagagc agtgcgtggc atgttagtaag	7320
tatgatgtaa ctgttagctg ttaacattaa gctgagagct ggaagatgac taaaagttag	7380
ccagctagag agggaaagac agactcaggc agagggaaacc gcacgaggcc ccagattgcc	7440
cgacactgtg gtccttagca actctccaca gcggggaaac ctcaacaccc ggcttcggaa	7500
gatggacgag cagcaggagt tcagtccat catctggca acagctggcc tgcagcgcatt	7560
gggctggcac aaccgggttg ggcaggtagg gcctgcccct atccctccc cagctcatct	7620
gcatctcctt tctgccttac agtcatcccc aatttaggtt ttttagactt tatgattgt	7680
tgaaagcgat atacgttcag tagaaactgt acttagtacc catacagcca ttctgtttt	7740
tacttcagt acagtattca ttacatgaga tattcactt attgtaaaac aggcttggt	7800
tcagatgatt ttgtccaaact ataataaggct aatcttaagt gttctgagca catgtaaagg	7860
aggcttaggtg tattaaatgc atttcagct tttttcaac ttaacaatgg gtttatcagg	7920
atgtaaccct attgtaagtc aaggaccatc tgtcttcact tcttgaccac cccacctcta	7980
acaccgtagg ctggaaagat tgtgaatcag aggccagact ctaggcttc atggagaaaa	8040
tttacaaaaaa aaaaaaaaaaag aggccagact cacacttagg cctaccagg cttagat	8100

gatagggAAC tcccatctca ctgccaggTG ctTTAGACA cccccgtgtc caccTTTTG	8160
actccCTGTT cgcctccac agatcctgca ccctgaggaa tgcatgtatG ctgtgggcca	8220
ggTACACTTG accaggGAAG ccacatggTG acatATgcCT tccCTTgtt ctcaaccaAG	8280
aagCTTgtct cacaacCTtc tgcatctgCT tcccagaAT agcattctca gggaggGGca	8340
gacCTTggGA tgctaccGGT ccaaaggcG ctggggagca agtagatAGA ggtggTcccA	8400
tgctttgcgc cattggTTgg ggaaagatca ggcctgatgt cctaggatgt tttccatca	8460
gggggcCTTG ggcgtggaaG tgcgaggCAA ggaccaggAC atcttggatC tggTgggtGT	8520
gctgcacgat cccgagactc tgTTcgCTg catcgctgaa agggcTTcc tgaggcacCT	8580
ggtagggcCT gtgctccacc tggggaggc tggggacttG gagagctggg aaaggTggca	8640
ggaaagattt cttaCATgaa tgctctgtat acagtgcTAa ctcatTCtG ttGAATgttG	8700
tgtatggata ggaccaggTC tggcccaca gttgcTTT cagtgtatgt ctcaggTctG	8760
tggTcacagg gtggTgttaa gagccCTTgc agtcacaAG aacttCTtG tacaggaagg	8820
aggctgcAGt gtgccAGtag ccgtgcatac agctatgaaG gatggcAAG taagtgggg	8880
gaaatggcG ggaaggcagg gaaaggaggA ctgtggcatt tcttctgtG catcccAGGT	8940
ttcttaggtAG tcccctctca gactgtgctG aggcaactgt tttttcccc agctgtacCT	9000
gactggagGA gtctggagTC tagacggcTC agatagcata caagagacca tgcaGGCTac	9060
catccatgtc cctgcccagg taccaaAGt ggagggcGAG gggtaataa acaagagtgc	9120
atataatctc ttgttctcac caaatcccac ctccTCCtC catacagcat gaagatggcc	9180
ctgaggatga cccacAGtTG gtaggcatca ctgctcgtaa cattccacga gggcccAGt	9240
tggctgcccA gaacttggc atcagcctgg ccaacttGtt gctgagcaAA ggagccAAA	9300

acatcctgga tgttgcacgg cagcttaacg atgccatta actggttgt gggcacaga	9360
tgccctgggtt gctgctgtcc agtgcctaca tcccgccct cagtccccca ttctca	9420
tatctggga gtgattaccc cgggagactg aactgcaggg ttcaagcctt ccaggattt	9480
gcctcacctt gggccttga tgactgcctt gcctccatg tatgtgggg cttcatctct	9540
ttagagaagt ccaagcaaca gccttgaat gtaaccaatc ctactaataa accagttctg	9600
aagggtttgt gtgtgcgcgt gtggagttgg cgggaagata ggaacaaaca caaagccctt	9660
tcatccttac ctcagaggct gggacttttgc cccagatcc tcctggtagc tccttctgc	9720
ttctgcctca atagtttca tttcacacag aataaattgt ctcccaggaa caccaagaaa	9780
cagagccaca atcttaaatt cctatggttt gcccatttcag ttaacagtagt agcgttta	9840
tattgcatgg cccctccac ccctattatc aggaagat agaaagtac taattctaca	9900
actctcttgc aaaatgaaaa caaatgtcc attaaaaaaa aaaacaatcc tttataaaaa	9960
ttagtccatc taaaactccc caatgcctaa gttcttagtc gtggaaagggt tagtgcaga	10020
atcc	10024

<210>	14
<211>	361
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400>	14		
Met Ser Gly Asn Gly Asn Ala Ala Ala Thr Ala Glu Glu Asn Ser Pro			
1	5	10	15

Lys Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg		
20	25	30

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

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

Asp Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser  
 275 280 285

Asp Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln  
 290 295 300

His Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala  
 305 310 315 320

Arg Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile  
 325 330 335

Ser Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp  
 340 345 350

Val Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His  
 355 360

<210> 15

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg Ile  
 1 5 10 15

Gln Thr Asp Ser Val Val Ala Thr Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Gly Leu  
 20 25 30

Gln Phe Glu Ile Ile Ala Met Ser Thr Thr Gly Asp Lys Ile Leu Asp  
 35 40 45

Thr Ala Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Ser Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 50 55 60

Glu His Ala Leu Glu Lys Asn Glu Val Asp Leu Val Val His Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Asp Leu Pro Thr Val Leu Pro Pro Gly Phe Thr Ile Gly Ala Ile  
 85 90 95

Cys Lys Arg Glu Asn Pro His Asp Ala Val Val Phe His Pro Lys Phe

100	105	110
Val Gly Lys Thr Leu Glu Thr Leu Pro Glu Lys Ser Val Val Gly Thr		
115	120	125
Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His Leu		
130	135	140
Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys Met		
145	150	155
Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly Leu		
165	170	175
Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro Glu		
180	185	190
Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val Arg		
195	200	205
Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp Pro		
210	215	220
Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His Leu		
225	230	235
Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys Asp		
245	250	255
Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser Asp		
260	265	270
Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln His		
275	280	285
Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala Arg		
290	295	300
Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile Ser		
305	310	315
Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp Val		
325	330	335

Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His  
340

<210> 16  
<211> 2022  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16	
ccggtaaccgg ctccctctgg gctccctcta gcgccttccc cccggcccgaa ctgcctggtc	60
agcgccaagt gacttacgcc cccgaccctg agccggacc gctaggcgag gaggatcaga	120
tctccgctcg agaatctgaa ggtgccttgg tcctggagga gttccgtccc agccctgcgg	180
tctcccggtta ctgctcgccc cggccctctg gagcttcagg aggccgcgt cagggtcggg	240
gagtatattgg gtccggggtc tcagggaaagg gcggcgccctg ggtctgcgtt atcggaaaga	300
gcctgctgga gccaagttagc cctcccttc ttgggacaga cccctcggtc ccatgtccat	360
gggggcaccc cggtccctcc tcctggccct ggctgctggc ctggccgttgc cccgtccgccc	420
caacatcgta ctgatctttg ccgacgacct cggctatggg gacctgggtt gctatggca	480
ccccagctt accactccca acctggacca gctggcgccgg ggagggtgc ggttacaga	540
cttctacgtt cctgtgtctc tgtcacacc ctctaggccc gcctccctga cccggccgtt	600
cccggttccgg atgggcattgt accctggcggtt cctgggtccc agctcccggtt ggggcctgccc	660
cctggaggag gtgaccgtgg ccgaagtctt ggctgcccga ggctacctca caggaatggc	720
cggaagtgg caccttgggg tggggcctga gggggcccttc ctggccccc atcagggttt	780
ccatcgattt ctaggcatcc cgtactccca cgaccaggcc ccctggccaga acctgacctg	840
cttccccccg gccactcctt ggcacgggtgg ctgtgaccag ggctgggtcc ccatcccact	900

gttggccaac ctgtccgtgg aggccgcagcc cccctggctg cccggactag aggcccgcta	960
catggcttgc gcccatttgc tcatggccga cgcccaaggcgc caggatcgcc ccttcttct	1020
gtactatgcc tctcaccaca cccactaccc tcagttcagt gggcagagct ttgcagagcg	1080
ttcaggccgc gggccatttg gggactccct gatggagctg gatgcagctg tggggaccct	1140
gatgacagcc ataggggacc tggggctgct tgaagagacg ctggtcatct tcactgcaga	1200
caatggacct gagaccatgc gtagtcccg aggccgtgc tccggctct tgcggtgtgg	1260
aaaggaaacg acctacgagg gcggtgtccg agagcctgcc ttggcttct gcccaggta	1320
tatcgctccc ggcgtgaccc acgagctggc cagctccctg gacctgctgc ctaccctggc	1380
agccctggct gggccccac tgcccaatgt cacctggat ggcttgacc tcagccccct	1440
gctgctggc acaggcaaga gccctcgca gtctcttcc ttctaccctg cctaccaga	1500
cgaggtccgt ggggttttg ctgtgcggac tggaaagtac aaggctcact tcttcaccca	1560
gggctctgcc cacagtata ccactgcaga ccctgcctgc cacgcctcca gctctctgac	1620
tgctcatgag ccccgctgc tctatgaccc gtccaaaggac cctggtgaga actacaacct	1680
gctgggggt gtggccgggg ccacccaga ggtgctgcaa gccctgaaac agttcagct	1740
gctcaaggcc cagttagacg cagctgtgac cttcgcccc agccaggtgg cccggggcga	1800
ggaccccgcc ctgcagatct gctgtcatcc tggctgcacc cccggccag ctgtgcaca	1860
ttgcccagat ccccatgcct gagggccctt cggctggctt gggcatgtga tggctcctca	1920
ctgggagcct gtgggggagg ctcaggtgtc tggaggggggt ttgtgcctga taacgtaata	1980
acaccagtgg agacttgac atctgaaaaaa aaaaaaaaaa aa	2022

<211> 1524  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 17	
atggggcac cgccgtccct ctcctggcc ctggctgctg gcctggccgt tgcacgtccg	60
cccaacatcg tgctgatctt tgccgacgac ctccgtatg gggacctggg ctgctatggg	120
caccccagct ctaccactcc caacctggac cagctggcgg cgggagggtc gcggttcaca	180
gacttctacg tgcctgtgtc tctgtgcaca ccctctaggg ccgcctcct gaccggccgg	240
ctcccggttc ggatggcat gtaccctggc gtccctggc ccagctcccg gggggccctg	300
cccttgagg aggtgaccgt ggccgaagtc ctggctgccc gaggctacct cacaggaatg	360
gccggcaagt ggcacccctgg ggtggggcct gaggggcct tcctcccccc ccatcaggc	420
ttccatcgat ttcttaggcat cccgtactcc caagaccagg gcccctgcca gaacctgacc	480
tgcttccgc cggccactcc ttgcgacggt ggctgtgacc agggcctggt cccatccca	540
ctgttggcca acctgtccgt ggaggcgcag cccctggc tgccggact agaggccgc	600
tacatggctt tcgccccatga cctcatggcc gacgcccagc gccaggatcg ccccttctc	660
ctgtactatg cctctcacca caccactac cctcgttca gtggcagag ctttgagag	720
cgttcaggcc gcggggcatt tggggactcc ctgatggagc tggatgcagc tgtgggacc	780
ctgatgacag ccatagggga cctggggctg cttgaagaga cgctggcat cttcactgca	840
gacaatggac ctgagaccat gcgtatgtcc cgaggcggct gctccggct ctgcgggt	900
ggaaaggaa cgacctacga gggcgggtgc cgagagccctg cttggccctt ctggccaggt	960
catatcgctc cggcgtgac ccacgagctg gccagctccc tggacctgct gcctaccctg	1020

gcagccctgg ctggggcccc actgcccaat gtcacccatgg atggcttga cctcagcccc	1080
ctgctgctgg gcacaggcaa gagccctcg gactctctct tcttctaccc gtcctaccca	1140
gacgagggtcc gtggggttt tgctgtgcgg actggaaagt acaaggctca cttttcacc	1200
cagggctctg cccacagtga taccactgca gaccctgcct gccacgcctc cagctctctg	1260
actgctcatg agcccccgct gctctatgac ctgtccaagg accctggta gaactacaac	1320
ctgctgggg gtgtggccgg ggccacccca gaggtgctgc aagccctgaa acagcttcag	1380
ctgctcaagg cccagtiaga cgcagctgtg accttcggcc ccagccaggt ggccggggc	1440
gaggaccccg ccctgcagat ctgctgtcat cctggctgca ccccccgc agcttgctgc	1500
cattgcccag atccccatgc ctga	1524

<210>	18
<211>	507
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400>	18		
Met Gly Ala Pro Arg Ser Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Gly Leu Ala			
1	5	10	15

Val Ala Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly		
20	25	30

Tyr Gly Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn		
35	40	45

Leu Asp Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val		
50	55	60

Pro Val Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg			
65	70	75	80

Leu Pro Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser		
85	90	95

Arg Gly Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala  
 100 105 110  
  
 Ala Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val  
 115 120 125  
  
 Gly Pro Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe  
 130 135 140  
  
 Leu Gly Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr  
 145 150 155 160  
  
 Cys Phe Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu  
 165 170 175  
  
 Val Pro Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro  
 180 185 190  
  
 Trp Leu Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu  
 195 200 205  
  
 Met Ala Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala  
 210 215 220  
  
 Ser His His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu  
 225 230 235 240  
  
 Arg Ser Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala  
 245 250 255  
  
 Ala Val Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu  
 260 265 270  
  
 Glu Thr Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg  
 275 280 285  
  
 Met Ser Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr  
 290 295 300  
  
 Thr Tyr Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly  
 305 310 315 320  
  
 His Ile Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu

325 330 335

Leu Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr  
 340 345 350

Leu Asp Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser  
 355 360 365

Pro Arg Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg  
 370 375 380

Gly Val Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr  
 385 390 395 400

Gln Gly Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala  
 405 410 415

Ser Ser Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser  
 420 425 430

Lys Asp Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala  
 435 440 445

Thr Pro Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala  
 450 455 460

Gln Leu Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly  
 465 470 475 480

Glu Asp Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg  
 485 490 495

Pro Ala Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala  
 500 505

<210> 19  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

<220>  
 <221> FORMYLATION  
 <222> 51

&lt;223&gt; C-alpha Formylglycine

&lt;400&gt; 19

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

His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser

210

215

220

Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val  
 225 230 235 240

Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr  
 245 250 255

Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser  
 260 265 270

Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr  
 275 280 285

Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly His Ile  
 290 295 300

Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu Leu Pro  
 305 310 315 320

Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr Leu Asp  
 325 330 335

Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser Pro Arg  
 340 345 350

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

Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr Gln Gly  
 370 375 380

Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser  
 385 390 395 400

Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Lys Asp  
 405 410 415

Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro  
 420 425 430

Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu  
 435 440 445

Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp  
 450 455 460

Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala  
 465 470 475 480

Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala  
 485

<210> 20  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20  
 Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly  
 1 5 10 15

Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn Leu Asp  
 20 25 30

Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val  
 35 40 45

Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro  
 50 55 60

Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly  
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg  
 85 90 95

Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro  
 100 105 110

Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly  
 115 120 125

Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe  
 130 135 140

Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu Val Pro

145 150 155 160

Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro Trp Leu  
 165 170 175

Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu Met Ala  
 180 185 190

Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Ser His  
 195 200 205

His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser  
 210 215 220

Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val  
 225 230 235 240

Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr  
 245 250 255

Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser  
 260 265 270

Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr  
 275 280 285

Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly His Ile  
 290 295 300

Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu Leu Pro  
 305 310 315 320

Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr Leu Asp  
 325 330 335

Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser Pro Arg  
 340 345 350

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

Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr Gln Gly  
 370 375 380

Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser  
 385 390 395 400

Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Lys Asp  
 405 410 415

Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro  
 420 425 430

Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu  
 435 440 445

Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp  
 450 455 460

Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala  
 465 470 475 480

Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala  
 485

<210> 21  
 <211> 1011  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Met Gly Ala Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Val Cys Ala Arg Gly Cys Leu  
 1 5 10 15

Asp Ser Ala Gly Pro Trp Thr Met Ser Arg Ala Leu Arg Pro Pro Leu  
 20 25 30

Pro Pro Leu Cys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Arg  
 35 40 45

Ala Gly Gly Tyr Glu Thr Cys Pro Thr Val Gln Pro Asn Met Leu Asn  
 50 55 60

Val His Leu Leu Pro His Thr His Asp Asp Val Gly Trp Leu Lys Thr  
 65 70 75 80

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

85 90 95

Val Gln Tyr Ile Leu Asp Ser Val Ile Ser Ala Leu Leu Ala Asp Pro  
 100 105 110

Thr Arg Arg Phe Ile Tyr Val Glu Ile Ala Phe Phe Ser Arg Trp Trp  
 115 120 125

His Gln Gln Thr Asn Ala Thr Gln Glu Val Val Arg Asp Leu Val Arg  
 130 135 140

Gln Gly Arg Leu Glu Phe Ala Asn Gly Gly Trp Val Met Asn Asp Glu  
 145 150 155 160

Ala Ala Thr His Tyr Gly Ala Ile Val Asp Gln Met Thr Leu Gly Leu  
 165 170 175

Arg Phe Leu Glu Asp Thr Phe Gly Asn Asp Gly Arg Pro Arg Val Ala  
 180 185 190

Trp His Ile Asp Pro Phe Gly His Ser Arg Glu Gln Ala Ser Leu Phe  
 195 200 205

Ala Gln Met Gly Phe Asp Gly Phe Phe Gly Arg Leu Asp Tyr Gln  
 210 215 220

Asp Lys Trp Val Arg Met Gln Lys Leu Glu Met Glu Gln Val Trp Arg  
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Ser Leu Lys Pro Pro Thr Ala Asp Leu Phe Thr Gly Val  
 245 250 255

Leu Pro Asn Gly Tyr Asn Pro Pro Arg Asn Leu Cys Trp Asp Val Leu  
 260 265 270

Cys Val Asp Gln Pro Leu Val Glu Asp Pro Arg Ser Pro Glu Tyr Asn  
 275 280 285

Ala Lys Glu Leu Val Asp Tyr Phe Leu Asn Val Ala Thr Ala Gln Gly  
 290 295 300

Arg Tyr Tyr Arg Thr Asn His Thr Val Met Thr Met Gly Ser Asp Phe  
 305 310 315 320

Gln Tyr Glu Asn Ala Asn Met Trp Phe Lys Asn Leu Asp Lys Leu Ile  
 325 330 335

Arg Leu Val Asn Ala Gln Gln Ala Lys Gly Ser Ser Val His Val Leu  
 340 345 350

Tyr Ser Thr Pro Ala Cys Tyr Leu Trp Glu Leu Asn Lys Ala Asn Leu  
 355 360 365

Thr Trp Ser Val Lys His Asp Asp Phe Phe Pro Tyr Ala Asp Gly Pro  
 370 375 380

His Gln Phe Trp Thr Gly Tyr Phe Ser Ser Arg Pro Ala Leu Lys Arg  
 385 390 395 400

Tyr Glu Arg Leu Ser Tyr Asn Phe Leu Gln Val Cys Asn Gln Leu Glu  
 405 410 415

Ala Leu Val Gly Leu Ala Ala Asn Val Gly Pro Tyr Gly Ser Gly Asp  
 420 425 430

Ser Ala Pro Leu Asn Glu Ala Met Ala Val Leu Gln His His Asp Ala  
 435 440 445

Val Ser Gly Thr Ser Arg Gln His Val Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Gln  
 450 455 460

Leu Ala Ala Gly Trp Gly Pro Cys Glu Val Leu Leu Ser Asn Ala Leu  
 465 470 475 480

Ala Arg Leu Arg Gly Phe Lys Asp His Phe Thr Phe Cys Gln Gln Leu  
 485 490 495

Asn Ile Ser Ile Cys Pro Leu Ser Gln Thr Ala Ala Arg Phe Gln Val  
 500 505 510

Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg Lys Val Asn Trp Met Val Arg Leu  
 515 520 525

Pro Val Ser Glu Gly Val Phe Val Val Lys Asp Pro Asn Gly Arg Thr  
 530 535 540

Val Pro Ser Asp Val Val Ile Phe Pro Ser Ser Asp Ser Gln Ala His  
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Gly Phe Ser  
 565 570 575  
  
 Thr Tyr Ser Val Ala Gln Val Pro Arg Trp Lys Pro Gln Ala Arg Ala  
 580 585 590  
  
 Pro Gln Pro Ile Pro Arg Arg Ser Trp Ser Pro Ala Leu Thr Ile Glu  
 595 600 605  
  
 Asn Glu His Ile Arg Ala Thr Phe Asp Pro Asp Thr Gly Leu Leu Met  
 610 615 620  
  
 Glu Ile Met Asn Met Asn Gln Gln Leu Leu Leu Pro Val Arg Gln Thr  
 625 630 635 640  
  
 Phe Phe Trp Tyr Asn Ala Ser Ile Gly Asp Asn Glu Ser Asp Gln Ala  
 645 650 655  
  
 Ser Gly Ala Tyr Ile Phe Arg Pro Asn Gln Gln Lys Pro Leu Pro Val  
 660 665 670  
  
 Ser Arg Trp Ala Gln Ile His Leu Val Lys Thr Pro Leu Val Gln Glu  
 675 680 685  
  
 Val His Gln Asn Phe Ser Ala Trp Cys Ser Gln Val Val Arg Leu Tyr  
 690 695 700  
  
 Pro Gly Gln Arg His Leu Glu Leu Glu Trp Ser Val Gly Pro Ile Pro  
 705 710 715 720  
  
 Val Gly Asp Thr Trp Gly Lys Glu Val Ile Ser Arg Phe Asp Thr Pro  
 725 730 735  
  
 Leu Glu Thr Lys Gly Arg Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Gly Arg Glu Ile  
 740 745 750  
  
 Leu Glu Arg Arg Arg Asp Tyr Arg Pro Thr Trp Lys Leu Asn Gln Thr  
 755 760 765  
  
 Glu Pro Val Ala Gly Asn Tyr Tyr Pro Val Asn Thr Arg Ile Tyr Ile  
 770 775 780  
  
 Thr Asp Gly Asn Met Gln Leu Thr Val Leu Thr Asp Arg Ser Gln Gly

785 790 795 800

Gly Ser Ser Leu Arg Asp Gly Ser Leu Glu Leu Met Val His Arg Arg  
 805 810 815

Leu Leu Lys Asp Asp Gly Arg Gly Val Ser Glu Pro Leu Met Glu Asn  
 820 825 830

Gly Ser Gly Ala Trp Val Arg Gly Arg His Leu Val Leu Leu Asp Thr  
 835 840 845

Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gly His Arg Leu Leu Ala Glu Gln Glu Val  
 850 855 860

Leu Ala Pro Gln Val Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ala Tyr Asn  
 865 870 875 880

Leu Gly Ala Pro Pro Arg Thr Gln Phe Ser Gly Leu Arg Arg Asp Leu  
 885 890 895

Pro Pro Ser Val His Leu Leu Thr Leu Ala Ser Trp Gly Pro Glu Met  
 900 905 910

Val Leu Leu Arg Leu Glu His Gln Phe Ala Val Gly Glu Asp Ser Gly  
 915 920 925

Arg Asn Leu Ser Ala Pro Val Thr Leu Asn Leu Arg Asp Leu Phe Ser  
 930 935 940

Thr Phe Thr Ile Thr Arg Leu Gln Glu Thr Thr Leu Val Ala Asn Gln  
 945 950 955 960

Leu Arg Glu Ala Ala Ser Arg Leu Lys Trp Thr Thr Asn Thr Gly Pro  
 965 970 975

Thr Pro His Gln Thr Pro Tyr Gln Leu Asp Pro Ala Asn Ile Thr Leu  
 980 985 990

Glu Pro Met Glu Ile Arg Thr Phe Leu Ala Ser Val Gln Trp Lys Glu  
 995 1000 1005

Val Asp Gly  
 1010

<210> 22  
 <211> 8079  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Expression plasmid pLamanExp1

<400> 22	
agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatacgat aaatcaat	60
tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc	120
atgtccaata tgaccgcatt gttggcattt attattgact agttataat agtaatcaat	180
tacggggtca ttagttcata gcccataat gtagttccgc gttacataac ttacgttaaa	240
tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccggccattt acgtcaataa tgacgtatgt	300
tcccatagta acgccaatag ggacttcca ttgacgtcaa tgggtggagt attacggta	360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtt tcatatgcca agtccgcctt ctattgacgt	420
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc	480
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggtttggca	540
gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctacgggta tttccaagtc tccacccat	600
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gacttccaa aatgtcgtaa	660
caactgcat cggccgcctt gttgacgaa atggcgta ggcgtgtacg gtgggaggc	720
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttaat tgccgttagtt	780
tatcacagtt aaattgctaa cgcatcgat gcttcgaca caacagtctc gaacttaagc	840
tgcatgtact ctcttaaggt agccttgcag aagttggcgt tgaggcactg ggcaggtaag	900

tatcaagggtt acaagacagg ttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag	960
aagactcttg cgtttctgat aggcacctat tggcttact gacatccact ttgccttct	1020
ctccacaggt gtccactccc agtcaatta cagcttaa ggctagagta cttatacga	1080
ctcactatag gctagcctcg agaattcgcc gccatggcg cctacgcgcg ggcttcgggg	1140
gtctgcgcic gaggctgcct ggactcagca ggcccttgga ccaigtcccg cgccctgcgg	1200
ccaccgctcc cgccctctcg cttttcctt ttgttgcgtt cggctgccc tgctcggcc	1260
gggggatacg agacatgccc cacagtgcag ccgaacatgc tgaacgtgca cctgctgcct	1320
cacacacatg atgacgtggg ctggctaaa accgtggacc agtacttttta tggaatcaag	1380
aatgacatcc agcacgcgg tgtgcagtac atcctggact cggcatctc tgccttgctg	1440
gcagatccca cccgtcgctt cattacgtg gagatgcct tctctcccg ttggtggcac	1500
cagcagacaa atgccacaca ggaagtcgtg cgagacctg tgccgcaggg ggcctggag	1560
ttcgccaatg gtggctgggt gatgaacgt gaggcagcca cccactacgg tgccatcgt	1620
gaccagatga cacttggct gcgccttcgt gaggacacat ttggcaatga tggcgaccc	1680
cgtgtggcct ggcacattga ccccttcggc cactctcggg agcaggcctc gctgttgctg	1740
cagatggcgt tcgacggctt cttttggg cgccttgatt atcaagataa gtgggtacgg	1800
atgcagaagc tggagaatgga gcaggtgtgg cggccagca ccagctgaa gccccgacc	1860
gcggacctct tcactgggtt gttcccaat gttacaacc cgccaaggaa tctgtgctgg	1920
gatgtgctgt gtgtcgatca gccgctgggt gaggaccctc gcagccccga gtacaacgcc	1980
aaggagctgg tcgattactt cctaaatgtg gccactgccc agggccggta ttaccgcacc	2040

aaccacactg tcatgaccat gggctggac ttccaatatg agaatgcca catgtggttc	2100
aagaaccttg acaagctcat cggctggta aatgcgcagc aggccaaagg aagcagtgtc	2160
catgttctct actccacccc cgcttggta ctctgggagc tgaacaaggc caacccacc	2220
tggtcagtga aacatgacga cttttccct tacggatg gccccacca gttctggacc	2280
ggttactttt ccagtcggcc ggccctcaaa cgctacgagc gcctcagcta caacttcctg	2340
caggtgtgca accagctgga ggcgctggc ggcctggcg ccaacgtgg accctatggc	2400
tccggagaca gtgcacccct caatgaggcg atggctgtgc tccagcatca cgacccgtc	2460
agcggcacct cccgccagca cgtggccaaac gactacgcgc gccagcttc ggcaggctgg	2520
gggccttgcg aggttcttct gagcaacgacg ctggcgccgc tcagaggctt caaagatcac	2580
ttcaccttt gccaacagct aaacatcagc atctggccgc tcagccagac ggcggcgcc	2640
ttccaggta tcgttataa tccctgggg cgaaaggta attggatggt acggctgccc	2700
gtcagcgaag gcgtttcgt tgtgaaggac cccatggca ggacagtgcc cagcgatgt	2760
gtaatatttc ccagctcaga cagccaggcg caccctccgg agctgctgtt ctcagcctca	2820
ctgcccggcc tgggcttcag cacattca gtggccagg tgccctcgctg gaagccccag	2880
ccccgcgcac cacagcccat cccagaaga tcctggccc ctgtttaac catcgaaaat	2940
gagcacatcc gggcaacgtt tgatcctgac acaggctgt tgatggagat tatgaacatg	3000
aatcagcaac tcctgctgcc tggccag accttcttct ggtacaacgc cagtataggt	3060
gacaacgaaa gtgaccaggc ctctgggcc tacatctca gaccaacca acagaaaccg	3120
ctgcctgtga gggctggc tcagatccac ctggtaaga caccctggt gcaggaggt	3180
caccagaact tctcagcttg gtgttcccg gtggccgc tgtacccagg acagccgcac	3240

ctggagctag agtggtcggt ggggcccata cctgtggcg acacctggg gaaggaggc	3300
atcagccgtt ttgacacacc gctggagaca aaggagcgt tctacacaga cagcaatggc	3360
cgggagatcc tggagaggag gcgggattat cgaccacct ggaaactgaa ccagacggag	3420
cccggtggcag gaaactacta tccagtcaac acccgattt acatcacgga tggaaacatg	3480
cagctgactg tgctgactgaa ccgctccag gggggcagca gcctgagaga tggctcgctg	3540
gagctcatgg tgcaccgaag gctgctgaag gacgatggac gcggagatc ggagccacta	3600
atggagaacg ggtcgaaaaa gtgggtgcga gggccacc tgggtgtggc ggacacagcc	3660
caggctgcag cgcgggaca cggctctg gcggagcagg aggtcctggc ccctcagggt	3720
tggtggcccg cgggtggcgg cgccgcctac aatctgggg ctccctcgac cacgcgttc	3780
tcagggctgc gcagggacct gccgcctcg gtgcacctgc tcacgctggc cagctgggc	3840
cccgaaatgg tgctgctgca cttggagcac cagttggcg taggagagga ttccggacgt	3900
aacctgagcg ccccggttac ctgtaaactt agggacctgt tctccacatt caccatcacc	3960
cgcctgcagg agaccacgt ggtggccaa cagctcccg aggccctc caggctcaag	4020
tggacaacaa acacaggccc cacacccac caaactccgt accagctgga cccggccaa	4080
atcacgctgg aacccatgga aatccgact ttccctggct cagttcaatg gaaggagggt	4140
gatgggttagg tctgctggaa tggccctct agagtgcacc cggccggccg ctccctta	4200
gtgagggtta atgcttcgag cagacatgt aagatacatt gatgagttt gacaaccac	4260
aactagaatg cagtggaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgtatgta ttgtttatt	4320
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc atttatgtt	4380

tcaggttcag gggagatgt gggaggttt ttaagcaag taaaacctct acaaatgtgg	4440
taaaatccga taaggatcga tccggctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc	4500
cttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggacgc gccctgttagc ggcgcattaa	4560
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc	4620
ccgctcctt cgttttcttc cttccttgc tcgccccgtt cgccggcttt ccccgtaag	4680
ctctaaatcg gggctccct ttagggttcc gatttagagc tttacggcac ctcgaccgca	4740
aaaaacttga ttgggigat gttcacgtt gttggccatc gccctgatag acggtttttc	4800
gccctttgac gttggagtcc acgttctta atagttggact ctgttccaa actggaacaa	4860
cactcaaccc tatctcggtc tattctttt attataagg gattttgggg atttcggcct	4920
attggtaaaa aatgagctg atttaacaaa aattaacgc gaattaattc tgtgaaatgt	4980
gtgtcagttt ggggtggaa agtccccagg ctccccaggc aggagaagt atgcaaagca	5040
tgcatactcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa	5100
gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccata actccgcccc	5160
tcccgccccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaattttt	5220
ttatattatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag	5280
gctttttgg aggccttaggc ttttgcaaaa agtccccggg atggttcgac cattgaactg	5340
catcgtcgcc gtgtccaaa atatgggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc	5400
gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag aatgaccaca acctttcag tggaaaggtaa	5460
acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctgggtctcc attcctgaga agaatcgacc	5520
ttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc aaagaaccac cacgaggagc	5580

tcattttctt gccaaaagtt tggatgatgc cttaaagactt attgaacaac cgaaattggc	5640
aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct gtttaccagg aagccatgaa	5700
tcaaccaggc caccttagac tctttgtac aaggatcatg caggaatttg aaagtgacac	5760
gtttttccca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc ccagaatacc caggcgtcct	5820
ctctgaggc caggagaaaa aaggcatcaa gtataagttt gaagtctacg agaagaaaaga	5880
ctaattcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgatggc cgcaataaaa	5940
tatctttatt ttcattacat ctgtgtgtt gtttttgtt tgaatcgata gcgataagga	6000
tccgcgtatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagttt agccagcccc	6060
gacacccgccc aacacccgct gacgcgcctt gacgggctt gctgctcccg gcacccgctt	6120
acagacaagc tgtgaccgtc tccggagct gcatgtgtca gaggtttca ccgtcatcac	6180
cggaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgta tacgcattt ttataggaa aatgtcatga	6240
taataatggt ttcttagacg tcaggtggca ctttcgggg aatgtgcgc ggaaccccta	6300
tttggattt tttctaaata cattcaaata tgtatccgtt catgagacaa taaccctgtt	6360
aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagttt tcaacatttc cgtgtcgccc	6420
ttattccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggta	6480
aagtaaaaga igtgaagat cagttgggtt cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	6540
acagcggtaa gatccttgag agtttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagactt	6600
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccggcaa gagcaactcg	6660
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc	6720

atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	6780
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgttttt	6840
tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag	6900
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgttagc aatggcaaca acgttgcgca	6960
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttccggca acaattaata gactggatgg	7020
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggttattt	7080
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggtat catgcagca ctggggccag	7140
atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg	7200
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcaactgat taagcattgg taactgtcag	7260
accaagttt atcataatata cttagattt attaaaact tcattttaa tttaaaagga	7320
tcttaggtgaa gatcctttt gataatctca tgaccaaaat ccctaacgt gagtttgcgt	7380
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc	7440
tgcgcgtaat ctgctgtttt caaacaaaaa aaccaccgtt accagcggtg gttgtttgc	7500
cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga ggcgagatac	7560
caaatactgt cttcttagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgttagcac	7620
cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	7680
cgtgttttac cgggttggac tcaagacgtt agttaccgga taaggcgcag cggcggct	7740
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccgat tggagcgaac gacccatacc gaactgagat	7800
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gccggacaggt	7860
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg	7920

cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccaccttg acttgagcgt cgattttgt 7980

gatgctcgtc agggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt 8040

tcctggcctt ttgctggct tttgctcaca tggctcgac 8079

<210> 23  
 <211> 3761  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 ggctactctc ggcttcctgg caacgcggag cgaaagctat gactgcggcc gcggttcgg 60

cggccgcgc cgccgtgccc ttgctgtgt gtgcgtgt ggcgcggc ggccgtacg 120

tgctcgacga ctccgacggg ctggccggg agttcgacgg catcgccgcg gtcagcggcg 180

gcggggcaac ctcccgactt ctagtaaatt acccagagcc ctatcggtct cagatattgg 240

attatctctt taagccaat ttgggtgcct cttgcataat tttaaaagtg gaaataggtg 300

gtgatggca gacaacagac ggcactgagc cttccacat gcattatgca ctagatgaga 360

attatcccg aggatacggag tgggtgttga tgaaagaagc taagaagagg aatccaaata 420

ttacactcat tgggttgcca tggtcattcc ctggatggct gggaaaagggt ttcgactggc 480

tttatgtcaa tcttcagctg actgcctatt atgtcgac ctggattgtg ggcgcac 540

gttaccatga ttggacatt gattatattg gaatttggaa tgagaggta tataatgcca 600

attatattaa gatattaaga aaaatgctga attatcaagg tctccagcga gtgaaaatca 660

tagcaagtga taatctctgg gagtccatct ctgcattccat gtccttgat gccgaactct 720

tcaagggtgg tggatgttata ggggctcatt atcctggAAC ccattcagca aaagatgcaa 780

agttgactgg gaagaagctt tggcttctg aagacttag cacttaat agtgacatgg	840
gtcaggctg ctgggtcgc atttaaatc agaattatat caatggctat atgacttcca	900
caatcgcatg gaatttatg gctagttact atgaacagtt gccttatggg agatgcgggt	960
tgtatgacggc ccaagagcca tggagtggc actacgttgtt agaatctcct gtctgggtat	1020
cagctcatac cactcagttt actcaacctg gctggattt cctgaagaca gttggccatt	1080
tagagaaagg aggaagctac gtagctctga ctgtatggcctt agggAACCTC accatcatca	1140
ttgaaaccat gagtcaataa cattctaagt gcatacgcc atttcttcc tatttcaatg	1200
tgtcacaaca atttgccacc ttgttctta agggatctt tagtgaataa ccagagctac	1260
aggtatggta taccaaactt ggaaaaacat ccgaaagatt tcttttaag cagctggatt	1320
ctctatggct cttgacagc gatggcagtt tcacactgag cctgcatgaa gatgagctgt	1380
tcacactcac cactctcacc actggtcga aaggcagta cccgttccct ccaaataccc	1440
agcccttccc aagtacctat aaggatgatt tcaatgttga ttacccattt tttagtgaag	1500
ctccaaactt tgctgatcaa actgggtgtat ttgaatattt tacaatattt gaagaccctg	1560
gcgagcatca cttcacgcta cgccaaatgc tcaaccagag acccattacg tggctgccc	1620
atgcataccaa cacaatcagt attataggag actacaactg gaccaatctg actataaagt	1680
gtgatgttta catagagacc cctgacacag gaggtgtgtt cattgcagga agagtaaata	1740
aaggtggat tttgatttta agtgccagag gaattttctt ctggatttt gcaaatggat	1800
cttacagggat tacaggtgtat tttagctggat ggattatata tgcttagga cgtgttgaag	1860
ttacagcaaa aaaatggat acactcacgt taactattaa gggcatttc gcctctggca	1920
tgctgaatga caagtctctg tggacagaca tccctgtgaa tttccaaag aatggctggg	1980



tagaattatt tataagaatt actcatgaa ctaattctac tatttaggaa ttataagag	3180
tctaacatag gcttagctac agtgaagttt tgcattgctt ttgaagacaa gaaaagtgt	3240
agaataaata agattacaga gaaaattttt tgtaaaacc aagtgattt cagctgatgt	3300
atctaattttt aacattatag aggtgtattt tattacaat aaaatgttcc	3360
tactttaat atacaattca gtgagtttg ataaattgtt atacccatgt aaccaacact	3420
ccagtcaagg ttcagaatat ttccatcacc ccagaaggctt ctctgtata cctgctcagt	3480
cagttccittt cactccaaat tggcgcgc cattgatagg aattctatca ctataggtt	3540
gttttctttt ttccagaaca tcatgaaagg ggcgtcatgt actgtgtattt ctatgaatg	3600
gtttctttcc atcagcataa tgatttggaa ttggccatgtt tggtgtattt cagtggtttt	3660
ttccttctta tttctgaaga gtttccattt gtatgaatattt accacaattt gtttctccc	3720
caccagtttc tgatactaca attaaaactg tctacatttac	3761

<210> 24  
 <211> 669  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Met Thr Ala Ala Ala Gly Ser Ala Gly Arg Ala Ala Val Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Cys Ala Leu Leu Ala Pro Gly Gly Ala Tyr Val Leu Asp Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Leu Gly Arg Glu Phe Asp Gly Ile Gly Ala Val Ser Gly Gly  
 35 40 45

Gly Ala Thr Ser Arg Leu Leu Val Asn Tyr Pro Glu Pro Tyr Arg Ser  
 50 55 60

Gln Ile Leu Asp Tyr Leu Phe Lys Pro Asn Phe Gly Ala Ser Leu His

65 70 75 80

Ile Leu Lys Val Glu Ile Gly Gly Asp Gly Gln Thr Thr Asp Gly Thr  
 85 90 95

Glu Pro Ser His Met His Tyr Ala Leu Asp Glu Asn Tyr Phe Arg Gly  
 100 105 110

Tyr Glu Trp Trp Leu Met Lys Glu Ala Lys Lys Arg Asn Pro Asn Ile  
 115 120 125

Thr Leu Ile Gly Leu Pro Trp Ser Phe Pro Gly Trp Leu Gly Lys Gly  
 130 135 140

Phe Asp Trp Pro Tyr Val Asn Leu Gln Leu Thr Ala Tyr Tyr Val Val  
 145 150 155 160

Thr Trp Ile Val Gly Ala Lys Arg Tyr His Asp Leu Asp Ile Asp Tyr  
 165 170 175

Ile Gly Ile Trp Asn Glu Arg Ser Tyr Asn Ala Asn Tyr Ile Lys Ile  
 180 185 190

Leu Arg Lys Met Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Gln Arg Val Lys Ile Ile  
 195 200 205

Ala Ser Asp Asn Leu Trp Glu Ser Ile Ser Ala Ser Met Leu Leu Asp  
 210 215 220

Ala Glu Leu Phe Lys Val Val Asp Val Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly  
 225 230 235 240

Thr His Ser Ala Lys Asp Ala Lys Leu Thr Gly Lys Lys Leu Trp Ser  
 245 250 255

Ser Glu Asp Phe Ser Thr Leu Asn Ser Asp Met Gly Ala Gly Cys Trp  
 260 265 270

Gly Arg Ile Leu Asn Gln Asn Tyr Ile Asn Gly Tyr Met Thr Ser Thr  
 275 280 285

Ile Ala Trp Asn Leu Val Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Leu Pro Tyr Gly  
 290 295 300

Arg Cys Gly Leu Met Thr Ala Gln Glu Pro Trp Ser Gly His Tyr Val  
 305 310 315 320

Val Glu Ser Pro Val Trp Val Ser Ala His Thr Thr Gln Phe Thr Gln  
 325 330 335

Pro Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Thr Val Gly His Leu Glu Lys Gly Gly  
 340 345 350

Ser Tyr Val Ala Leu Thr Asp Gly Leu Gly Asn Leu Thr Ile Ile Ile  
 355 360 365

Glu Thr Met Ser His Lys His Ser Lys Cys Ile Arg Pro Phe Leu Pro  
 370 375 380

Tyr Phe Asn Val Ser Gln Gln Phe Ala Thr Phe Val Leu Lys Gly Ser  
 385 390 395 400

Phe Ser Glu Ile Pro Glu Leu Gln Val Trp Tyr Thr Lys Leu Gly Lys  
 405 410 415

Thr Ser Glu Arg Phe Leu Phe Lys Gln Leu Asp Ser Leu Trp Leu Leu  
 420 425 430

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Thr Leu Ser Leu His Glu Asp Glu Leu Phe  
 435 440 445

Thr Leu Thr Thr Leu Thr Thr Gly Arg Lys Gly Ser Tyr Pro Leu Pro  
 450 455 460

Pro Lys Ser Gln Pro Phe Pro Ser Thr Tyr Lys Asp Asp Phe Asn Val  
 465 470 475 480

Asp Tyr Pro Phe Phe Ser Glu Ala Pro Asn Phe Ala Asp Gln Thr Gly  
 485 490 495

Val Phe Glu Tyr Phe Thr Asn Ile Glu Asp Pro Gly Glu His His Phe  
 500 505 510

Thr Leu Arg Gln Val Leu Asn Gln Arg Pro Ile Thr Trp Ala Ala Asp  
 515 520 525

Ala Ser Asn Thr Ile Ser Ile Ile Gly Asp Tyr Asn Trp Thr Asn Leu  
 530 535 540

Thr Ile Lys Cys Asp Val Tyr Ile Glu Thr Pro Asp Thr Gly Gly Val  
 545 550 555 560

Phe Ile Ala Gly Arg Val Asn Lys Gly Gly Ile Leu Ile Arg Ser Ala  
 565 570 575

Arg Gly Ile Phe Phe Trp Ile Phe Ala Asn Gly Ser Tyr Arg Val Thr  
 580 585 590

Gly Asp Leu Ala Gly Trp Ile Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Val Glu Val  
 595 600 605

Thr Ala Lys Lys Trp Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Ile Lys Gly His Phe  
 610 615 620

Ala Ser Gly Met Leu Asn Asp Lys Ser Leu Trp Thr Asp Ile Pro Val  
 625 630 635 640

Asn Phe Pro Lys Asn Gly Trp Ala Ala Ile Gly Thr His Ser Phe Glu  
 645 650 655

Phe Ala Gln Phe Asp Asn Phe Leu Val Glu Ala Thr Arg  
 660 665

<210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 11 residue basic peptide from HIV TAT protein

<400> 25  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> synthetic TAT peptide

<400> 26  
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala  
1 5 10