



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0044138  
(43) 공개일자 2020년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/81 (2006.01) A61K 38/57 (2006.01)  
A61P 13/08 (2006.01) A61P 15/10 (2006.01)  
A61P 19/06 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 31/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/8125 (2013.01)  
A61K 38/57 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7011059(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2012년06월22일  
심사청구일자 2020년04월16일  
(62) 원출원 특허 10-2014-7001915  
원출원일자(국제) 2012년06월22일  
심사청구일자 2017년06월20일  
(85) 번역문제출일자 2020년04월16일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/043869  
(87) 국제공개번호 WO 2012/178102  
국제공개일자 2012년12월27일  
(30) 우선권주장  
61/500,795 2011년06월24일 미국(US)

(71) 출원인  
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 콜로라도, 어  
바디 코포레이트  
미국 콜로라도 80203 덴버 제8 플로어 그랜트 스트리트 1800  
건국대학교 산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
(72) 발명자  
디나렐로 찰스 에이.  
미국 콜로라도주 80302 보울더 15번 스트리트 333  
김수현  
미국 콜로라도주 80111 그린우드 빌리지 에스. 엠포리아 웨이  
(74) 대리인  
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 24 항

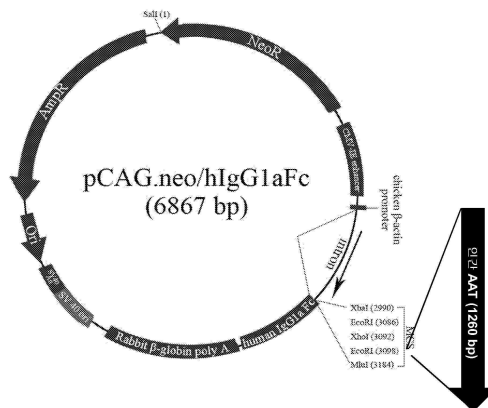
(54) 발명의 명칭 알파-1 안티트립신 융합 분자용 조성물, 방법 및 용도

(57) 요약

본 명세서에 있어서 구현에는 알파-1 안티트립신 융합 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 유도체의 조성물을 제시한다. 어떤 구현예에 있어서, 조성물 및 방법은 알파-1 안티트립신 요법 및 치료를 필요로 하는 개체에 처리하기 위한 약학적으로 허용가능한 조성물에서 사용되는 구조체의 생성에 관한 것이다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 있어서 개시된 조성물 및 방법은 알파-1 안티트립신 또는 이의 유도체를 면역 단편으로 연결하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도1

pCAG.neo/hulgG1aFc-AAT



(52) CPC특허분류

*A61P 13/08* (2018.01)  
*A61P 15/10* (2018.01)  
*A61P 19/06* (2018.01)  
*A61P 29/00* (2018.01)  
*A61P 31/00* (2018.01)  
*A61P 31/04* (2018.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*A61P 39/00* (2018.01)  
*C12N 15/62* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

알파-1 안티트립신(AAT) 폴리펩티드를 포함하는 제1 폴리펩티드; 및 IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgD의 면역글로불린 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제2 폴리펩티드;를 포함하는 융합 폴리펩티드로서,

상기 AAT 폴리펩티드의 단편은 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 43, 및 서열번호 44로 표시되는 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

면역글로불린 Fc 폴리펩티드는 IgG4 Fc인 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 융합 폴리펩티드는 상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드 사이에 링커를 추가로 포함하는 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 융합 폴리펩티드는 서열번호 32, 서열번호 47, 서열번호 48 또는 서열번호 49로 표시되는 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드를 포함하는 단리된 세포.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 구조체를 포함하는 단리된 벡터.

#### 청구항 7

융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 구조체로서, 상기 핵산 구조체는 서열번호 51로 표시되는 핵산 구조체.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 융합 폴리펩티드 또는 상기 융합 폴리펩티드를 암호화하는 청구항 7의 핵산 구조체; 및 약학적으로 허용가능한 부형제;를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드 또는 서열번호 1 또는 서열번호 33으로 표시되는 AAT의 제1 폴리펩티드 및 IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgD의 면역글로불린 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 Fc 융합 폴리펩티드; 및 약학적으로 허용가능한 부형제;를 포함하는, 개체에서 AAT-결핍 증상 또는 염증-연관 증상의 치료에 사용하는 약학적 조성물로서,

상기 AAT-결핍 증상은 AAT 결핍이고, 상기 염증-연관 증상은 크론병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 염증성 장질환 (IBD), 전신성 염증 반응 증후군(SIRS), 알레르기 및 연관된 염증, 천식, 류마티스 관절염, 화농성 관절염, 폐렴, 패혈증, 강직성 척추염, 이식의 부작용, 이식 거부, 세포 이식 거부, 이식편대숙주병(GvHD), 낭포성 섬유

증, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 폐기종, 폐암, 낭포성 섬유증, 폐쇄성 세기관지염, 관상 동맥의 만성 염증, 허혈 재관류 기능장애, 당뇨병, 염증성 골용해, 만성 염증, 뇌염, 건선, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 폐섬유증, 미분화 관절증, 미분화 척추관절증, 염증으로 인한 성형 수술의 부작용, 및 통풍으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 AAT의 제1 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 33으로 이루어지고; 면역글로불린 Fc 폴리펩티드를 포함하는 상기 제2 폴리펩티드는 IgG4 Fc인 약학적 조성물.

#### 청구항 11

청구항 9 또는 청구항 10에 있어서,

상기 약학적 조성물은 흡입에 의해, 비강내로, 진피내로, 복강내로, 질내로, 기관지내로, 경구로, 국부적으로, 이식에 의해, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 또는 다른 투여 방법에 의해 상기 개체에 투여되는 약학적 조성물.

#### 청구항 12

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 AAT 결핍을 갖는 약학적 조성물.

#### 청구항 13

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 폐 증상을 갖고, 상기 약학적 조성물은 상기 개체의 폐 및 림프 조직에서의 AAT 수준을 증가시키는 약학적 조성물.

#### 청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 개체는 폐의 감염 또는 호흡기 증상으로부터 선택되는 폐 증상을 갖는 약학적 조성물.

#### 청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 개체에서의 호흡기 증상은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 폐기종, 낭포성 섬유증, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 폐섬유증, 또는 세기관지염 중 하나 이상을 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 16

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 위장관의 염증 증상을 갖는 약학적 조성물.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 개체는 크론병, 염증성 장질환(IBD) 또는 과민성 장질환(IBD), 궤양성 대장염 또는 다른 염증-연관 위장관 증상을 갖는 약학적 조성물.

#### 청구항 18

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 이식을 받았고, 이식 거부 위험이 있는 약학적 조성물.

#### 청구항 19

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 이식편대숙주병(GVHD)을 갖거나, 이식편대숙주병(GVHD)이 발생할 위험이 있는 약학적 조성물.

#### 청구항 20

청구항 9 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 류마티스 관절염을 갖는 약학적 조성물.

#### 청구항 21

청구항 9 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 매크로라이드 또는 비-매크로라이드 항생제, 항균제, 항-살진균제, 항바이러스제, 항기생충제, 항염증제, 면역억제제, 거부반응 억제제 또는 면역조절제 중 적어도 하나가 추가로 투여되는 약학적 조성물.

#### 청구항 22

청구항 9 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 인간 또는 다른 포유동물인 약학적 조성물.

#### 청구항 23

청구항 9 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 폴리펩티드는 IgG4 Fc인 약학적 조성물.

#### 청구항 24

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩티드 또는 서열번호 1 또는 서열번호 33으로 표시되는 AAT의 제1 폴리펩티드 및 IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgD의 면역글로불린 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 Fc 융합 폴리펩티드; 및 약학적으로 허용가능한 부형제;를 포함하는, 개체에서 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 자가면역 질환은 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 경피증, 혼합 결합 조직병, 피부근염, 다발성근염, 라이터증후군, 베체트병, 다발성 경화증, 중증근무력증, 뇌척수염, 스푸루우, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 포도막염, 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 혈소판감소, 수포성 유선포창, 심근증, 셀리악 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 처그 스트라우스 증후군, 반흔성 유선포창, CREST 증후군, 원판성 루푸스, 본태성 복합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소증 자반증(ITP), IgA 신경병증, 청소년 관절염, 편평태선, 메니에르병, 1형 또는 면역 매개 당뇨병, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다연골염, 다분비선 증후군, 다발성 류마티스, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이놀드 증상, 라이터 증후군, 유육종증, 근육강직 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염, 거대 세포 동맥염, 포진성 피부염 혈관염, 백반증, 베게너 육아종증, T 세포 매개 자가면역 질환, 류마티스 질환, 급성 파종성 뇌척수염(ADEM), 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 루게릭 병, 항합성효소 증후군, 아토피성 알레르기, 아토피성 피부염, 면역 재생 불량성 빈혈, 자가면역성 심근증, 자가면역성 장질환, 자가면역성 내이 질환, 자가면역성 림프구 증식 증후군, 자가면역성 말초신경병증, 자가면역성 채장염, 자가면역성 다선증후군, 자가면역성 프로게스테론 피부염, 자가면역성 혈소판 감소성 자반증, 자가면역성 두드러기, 자가면역성 포도막염, 발로병/발로 동심성 경화증, 버거스씨병, 비커스태프(Bickerstaff) 뇌염, 블라우 증후군, 암, 캐슬만병, 샤가스병, 만성 재발성 다발성 골수염, 만성 폐쇄성 폐질환, 코진 증후군, 한랭응집소 질환, 구성 요소 2 결핍, 접촉성 피부염, 두개골 동맥염, 쿠싱 증후군, 피부의 백혈구 파괴성 혈관염, 데고스병, 텔캬병, 포진성 피부염, 1형 당뇨병, 확산 피부 전신 경화증, 드레슬러 증후군, 약물-유발 루푸스, 원반상 홍반성 루푸스, 습진, 자궁내막증, 골부착부위염 관련 관절염, 호산구성 근막염, 호산구성 위장염, 후천성 수포성 표피박리증, 결절성 홍반, 적아세포증, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 에반 증후군, 진행성 골화성 섬유이형성증, 섬유화 폐포염, 특발성 폐 섬유증, 위염,

위장관 유전포창, 구드패스슈어 증후군, 길랑-바레 증후군(GBS), 하시모토 뇌병증, 헤노호-헨라인 자반증, 임신성 포진, 임신성 유전포창, 화농성 한선염, 휴-스토빈 증후군, 저감마글로불린혈증, 특발성 염증성 탈수초성 질환, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신병증, 봉입체 근염, 가와사키병, 람베르트-이튼 근무력증 증후군, 백혈구 파쇄성 혈관염, 경화성 태선, 선상 IgA 질환(LAD), 근위축성 측삭경화증, 루포이드 간염, 마지드 증후군, 현미경적 다발혈관염, 밀러-피셔 증후군, 혼합 결합 조직 질환, 반상경피증, 뮌샤-하버만 질환, 급성 두창상 태선양 비강진, 중증 근무력증, 근염, 기면증, 시신경 척수염, 테빅병, 신경근긴장증, 눈의 반흔성 유전포창, 안구간대경련-근간대경련 증후군, 오드 갑상선염, 재발성 류머티즘, PANDAS(구균 감염과 관련된 소아 자가면역성 신경정신 장애), 부종양성 소뇌 변성, 발작성야간 혈색소뇨증(PNH), 패리-롬버그 증후군, 파르소니지-터너 증후군, 주변부 포도막염, 정맥주위성 빈혈, 정맥주위성 뇌척수염, POEMS 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, POEMS 증후군, 다발성 근염, 원발성 경화성 담관염, 진행성 염증성 신경병증, 괴저성 농피증, 순직혈구 무형성증, 라스무센 뇌염, 레이노 현상, 재발성 다발 연골염, 하지 불안 증후군, 후복막 섬유증, 류마티스 열, 정신분열증, 슈미트 증후군, 슈니츨러 증후군, 공막염, 혈청 병, 척추관절병증, 스틸병, 스티프맨 증후군, 아급성 세균성 심내막염(SBE), 수작 증후군, 스윗 증후군, 시덴함 무도병, 교감성 안염, 혈소판 감소증, 톨로사-헌트 증후군, 횡단성 척수염, 미분화 척추 관절병증, 미분화 결합 조직 질환, 두드러기성 혈관염, 두드러기성 혈관염, 및 혈관염 백반증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 우선권

[0002] 본 PCT 출원은 2011년 6월 24일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/500,795에 대하여 우선권을 주장한다. 상기 출원은 모든 목적을 위하여 그것의 전체에 있어서 참조로서 본 발명에 포함된다.

#### [0003] 분야

[0004] 본 명세서에 있어서 구현예는 재조합 알파-1 안티트립신( $\alpha$ -1 안티트립신, AAT)에 관한 것이다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 재조합 AAT는 AAT의 다른 형태보다 더 용이하게 정제될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 재조합 AAT는 자연적으로 발생하는 AAT 또는 AAT의 다른 상업적 제형(formulation)에 비해 향상된 항염증 및 항면역 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에 있어서, 2배, 10배 또는 100배 더 적은 재조합 AAT(rAAT)가 개체에서 증상 또는 질환의 예방 또는 치료를 위한 혈장 유래 AAT의 임의의 및 모든 현재 형태들을 대신하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에 있어서, rAAT는 다양한 조직 또는 기관의 염증, 감염 또는 다른 건강상태와 같은 증상을 갖는 개체를 치료하는데 사용될 수 있다.

### 배경 기술

#### [0005] AAT

[0006] 알파-1 안티트립신(AAT)의 정상 혈장 농도는 1.3 이상 3.5 mg/mL 이하의 범위이다. 어떤 조건하에서, AAT는 조직 공간으로 쉽게 확산되고 표적 프로테아제, 특히 호중구 엘라스타제와 1:1 복합체를 형성한다. 트립신, 키모트립신, 카텝신 G, 플라스민, 트롬빈, 조직 칼리크레인, 및 인자 Xa와 같은 다른 효소들은 기질로서 작용할 수 있다. 그런 다음 상기 효소/억제제 복합체는 세르핀-효소 복합체(serpin-enzyme complex, SEC) 수용체에 결합함으로써 혈액순환에서 제거되고 간 및 비장에 의해 대사된다.

### 발명의 내용

[0007] 본 명세서에 있어서 구현예는 상업적으로 입수가 가능한 AAT 조성물보다 뛰어난 특성을 갖는 알파-1 안티트립신의 재조합 구조체(construct)의 생성 및 용도를 제시한다. 다른 구현예는 치료학적 용도를 위한 재조합 AAT 산물의 정제 및 스케일링 업(scaling-up) 방법을 제시한다. 이러한 구현예에 따르면, 재조합 AAT는 임의의 AAT 관련 활성, 예를 들어, 항염증제, 면역조절제 및/또는 세린 프로테아제 억제제로서의 용도를 위해 단리될 수 있다.

[0008] 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 재조합 AAT는 본 기술분야에 공지된 임의의 재조합 기술에 의해 생성된 전장 분자 또는 이의 카복시 말단 펩티드 유도체를 포함한다. 일부 구현예는, 예를 들어, AAT의 신속한 정제 및 활성 보존을 위한 용도를 위하여 또는 AAT 또는 그것의 펩티드의 활성을 증가시키기 위하여, AAT와 연

결된 면역학적 요소를 갖는 AAT 또는 이의 카르복시 말단 유도체를 포함하는 구조체에 관한 것이다. 다른 구현예에는 면역학적 요소(예를 들어, Fc 단편)와 각각 연결된 AAT 분자를 갖고 하나의 단위로서 함께 정제된 하나 이상의 구조체의 동시 합성에 관한 것이다. 다른 구현예에는 예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물용 구조체를 형성하기 위한 하나 이상의 면역 분자와 연결된 분자의 마지막 80개 아미노산의 단편(카르복시 말단에서) 또는 이의 하위 단편(예를 들어, 약 40개, 약 30개, 약 20개 또는 약 10개 아미노산, 또는 약 5개 아미노산)을 포함하는, AAT의 하나 이상의 카르복시 말단 유도체(들) 또는 단편(들)의 구조체 생성, 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0009] 본 명세서에서 고려되는 구조체의 AAT 분자는 자연적으로 발생하는 알파-1 안티트립신(예를 들어, 인간) 또는 AAT의 가장 풍부한 형태 또는 이의 다른 자연적으로 발생하는 형태, 또는 이의 단편, 또는 유도체, 또는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 AAT의 돌연변이 형태, 또는 이의 대립유전자(예를 들어, 약 100개의 자연적으로 발생하는 AAT 변이체가 있고, 임의의 이러한 변이체는 본 명세서에 개시된 구조체에 사용될 수 있다), 또는 이의 유사체 또는 이의 융합 단백질(예를 들어, 인간 IgG 또는 인간 IgG의 단편)에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따르면, 최종 구조체 또는 융합 폴리펩티드는 2 AAT 분자 또는 혼한 면역학적 단편(예를 들어, Fc 단편)과 연결된 각 융합 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 상기 AAT 면역 단편 구조체는 이량체 AAT 면역 단편 융합 분자를 형성하기 위하여 이황화 결합에 의해 함께 연결된다(예를 들어, 도 2a, 도 6a 및 도 6b 참조).

[0010] 본 명세서에 개시된 어떤 방법에 있어서, 상기 AAT 또는 면역 분자와 연결된 AAT-펩티드의 정제는 상업적으로 입수가능한 제형 또는 천연 AAT에 비해 AAT 조성물의 활성이 현저하게 증가한다. 게다가, 상기 구조체 또는 융합 분자의 중요한 활성은 보존하는 반면에 정제 시간은 다수의 정제 단계를 제거함으로써 급격하게 감소된다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 고려되는 융합 분자의 향상된 회수는 상기 AAT 분자와 면역 단편 사이에 링커 분자를 사용함으로써 더 용이하게 달성할 수 있다. 본 명세서에 개시된 어떤 융합 분자는 대조군(예를 들어, 자연적으로 발생하는 AAT의 전형적인 정제 및 상업적으로 입수가능한 제형의 정제)에 비해 사이토카인을 저해할 수 있거나 면역 및 염증 작용을 조절한다. 이러한 구현예에 따르면, 두 개 이상의 AAT 면역 구조체(또는 AAT 단편)를 포함하는 하나의 단위가 정제될 수 있고 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. Fc-huAAT는 본 명세서에서 고려되는 임의의 방법 또는 조성물에 사용될 수 있다. 다른 구현예는 상기 AAT 분자의 활성을 보존하기 위하여 신속한 정제 방법에 의해 정제된 AAT 분자와 연결된 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IGD Fc 단편의 용도를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 어떤 구현예는 본 기술분야에 공지된 다른 방법들의 유해한 효과를 방지하기 위하여 최소 단계(예를 들어, 한 단계) 정제로서의 단백질 A의 용도에 관한 것이다. 본 명세서의 일부 구현예는 상업적으로 입수가능한 제품(예를 들어, Aralast™, Prolastin™)에 사용되는 표준 정제에 비해 및/또는 혈액 혈장에서 발견되는 자연적으로 발생하는 AAT에 비해 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 항염증 활성 보존에 관한 것이다. 한 구현예에 있어서, 본 출원의 재조합 분자는 상업적으로 입수가능한 제형에 비해 2배 내지 10배, 10배 내지 100배, 어떤 구현예에서는 2배 내지 100배 더욱 높은 활성을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 것은 생체 내에서 또는 천연 AAT와 유사하고 어떤 구현예에 있어서는 뛰어난 활성을 갖는 구조체의 제조 및 회수 방법이다. AAT에 대해 관심있는 것으로 알려진 어떤 활성은 이에 한정되지 않으나, 면역조절 또는 염증 조절 활성을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 융합 분자는 IL-1 수용체 길항제(IL-1Ra), CTLA-4, IL-18 결합 단백질 및/또는 IL-10 등과 같이 자연적으로 발생하는 항염증 분자의 유도 때문에 항염증 분자로서 작용할 수 있다. 기재된 구조체는 분리될 수 있고, 세린 프로테아제 억제제 활성이 아닐 수 있는 활성에 대해 평가될 수 있다는 것이 본 명세서에서 고려된다. 일부 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 구조체는 상업적으로 입수가능한 조성물에 비해 높은 IL-1 수용체 길항제 활성을 갖는다.

[0011] 어떤 구현예에 있어서, 조성물(예를 들어, 구조체 또는 융합 폴리펩티드 조성물) 및 방법은 개체에 대한 방사선의 부작용 조절에 관한 것이다. 일부 구현예에 있어서, 조성물 및 방법은 예를 들어, 암에 걸렸거나 악성 종양이 발생한 것으로 의심되는 개체에게 또는 조절되지 않는 세포 성장에 대해 투여될 경우, 방사선 치료 또는 방사선을 받은 개체의 치료에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 다른 구현예는 예를 들어, 사고에 의해 또는 목적 있는 행동에 의해, 방사선에 노출된 개체의 치료에 관한 것이다.

[0012] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 방사선 및/또는 화학요법을 받은 개체에 매번 개체에 투여될 수 있다. 본 명세서에 개시된 일부 구현예는 암 치료를 받은 개체의 치료에 관한 것이다. 암 치료는, 이에 한정되지 않으나, 방광, 유방, 신장, 백혈병, 폐, 골수종, 지방육종, 림프종, 혀, 전립선, 위, 결장, 자궁암, 흑색종, 췌장, 눈 및 다른 공지의 암에 대한 치료를 포함한다.

[0013] 본 명세서에 개시된 일부 구현예는 전립선암에 걸린 개체의 치료에 관한 것이다. 이러한 구현예에 있어서, 전립선암에 걸린 남성 개체는 발기불능 또는 발기부전의 발생, 전립선암 치료의 혼한 부작용을 감소시키기 위하여



방사선 및/또는 화학요법 전, 동안 또는 후에 본 명세서에 개시된 조성물로 치료될 수 있다.

- [0014] 다른 구현예는 암 관련 치료를 받은 개체의 치료를 위한 병용 요법에 관한 것으로, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물은 개체에서 종양을 줄어든게 하거나 제거하는 것 또는 종양의 전이를 감소시키는 것 또는 개체에서 암의 다른 측면을 치료하는 것으로 알려진 임의의 다른 약제와 병용할 수 있다.
- [0015] 어떤 구현예에 있어서, 정상 세포 손상을 조절하기 위하여 본 명세서에 포함된 조성물에 의한 개체의 치료는 상기 조성물로 치료받지 않은 개체에 비해 적어도 10%, 또는 적어도 20% 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40% 이상, 또는 적어도 50% 이상, 또는 적어도 60% 이상, 또는 적어도 70% 이상, 또는 적어도 80% 이상, 또는 적어도 90% 이상일 수 있다.
- [0016] 일부 구현예는 AAT 치료를 필요로 하는 개체에게 재조합 기술을 사용함으로써 생성된 AAT의 투여에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따르면, 개체는 AAT 결핍, 염증 또는 면역 증상 또는 본 기술분야에 공지된 다른 AAT 관련 증상을 가질 수 있다. 본 명세서에 있어서 어떤 구현예는 적어도 하나의 구조체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 갖는 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에 있어서, 개체에 투여된 용량은 상업적으로 입수가능한 제형에 비해 상기 개체에 대한 용량에 있어서 2배, 10배 또는 100배 감소를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 용량은 10 mg/kg 내지 100 mg/kg(Aralast™ or Prolastin C™와 같이 주로 사용되는 상업적으로 입수가능한 AAT의 농도)에 비해 개체에 대하여 약 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일부 구현예는 심장 조직 리모델링(예를 들어, 심장 조직의 확장 및 괴사), 예를 들어, 좌 또는 우심실(left or right ventricular, LV) 리모델링의 개시 또는 진행의 조절을 제시한다. 이러한 구현예에 따르면, 본 발명은 예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물을 투여함으로써, 심근 손상을 야기할 수 있는 심장 사건의 전, 동안, 또는 후에 개시, 중증도(예를 들어, 손상) 또는 진행을 조절할 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 초기 또는 후기 심근경색 크기를 감소시키기 위하여 심장 증상을 갖는 개체에 투여될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 초기 심근경색은 수술 또는 다른 심장 사건 전(예를 들어, 기준치), 동안 또는 그 후 48시간 이내에 측정된 것일 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 후기 심근경색은 수술 또는 다른 심장 사건 뒤 48시간 후 또는 수일 또는 수주일까지, 예를 들어 심장 사건 뒤 7일 후일 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은, 심장 사건의 결과로서 심장 확장 및 기능장애를 조절하기 위하여 이러한 조성물로 치료되지 않은 개체에 비해 약 5%, 또는 약 10%, 또는 약 15%, 또는 약 20% 또는 약 25%, 또는 약 30% 이상 또는 그 이상으로 심장 사건(예를 들어, 심근경색증)을 갖는 개체의 치료에 사용될 수 있다.
- [0018] 어떤 구현예는 심장 사건에 걸린 개체의 치료용 조성물에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따르면, 조성물은 재조합 알파-1 안티트립신(예를 들어, 인간), 또는 이의 융합 단백질 또는 펩티드 또는 재조합체, 또는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 이의 돌연변이체, 또는 이의 대립유전자(예를 들어, 약 100개의 자연적으로 발생하는 AAT 변이체가 있다), 또는 이의 유사체 또는 이의 융합 단백질(예를 들어, 인간 IgG 또는 인간 IgG의 단편(Fc))을 포함할 수 있다. 일부 구현예는 LV 리모델링을 조절하기 위하여 자연적으로 발생하는 AAT를 심장 사건에 걸렸거나 걸린 적이 있는 개체에 투여하는 것에 관한 것이다. 다른 구현예는 예를 들어, 394 AA의 자연적으로 발생하는 AAT(서열번호 1 및 33)의 마지막 80개 아미노산 단편을 포함하는 AAT의 하나 이상의 카복시 말단 유도체(들) 또는 단편(들)의 조성물을 투여하는 것에 관한 것일 수 있다. 어떤 구현예는 심장 사건을 개선하기 위하여 심장 사건에 걸린 개체를 본 명세서에 개시된 재조합으로 제조된 융합 AAT 펩티드로 치료하는 것에 관한 것이다.
- [0019] 다른 구현예는 본 명세서에 개시된 조성물을 사용하여 감염(예를 들어 박테리아 또는 바이러스성 감염)에 걸린 개체를 치료하거나 또는 감염되는 것을 예방하는 것을 포함한다.
- [0020] 일부 구현예는 이식 거부를 감소시키거나 또는 예방하기 위한 본 명세서에 개시된 조성물에 관한 것이다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 이식편대숙주병(Graft versus Host disease, GVHD)의 발생 정도를 감소시키고 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 세포 이식 거부 또는 이의 부작용을 감소시키기 위하여 사용될 수 있다. 세포 이식은 췌도세포(islet cell), 줄기세포, 각막상피세포, 간세포, 피부 또는 다른 유사한 이식을 포함할 수 있다. 일부 구현예는 이식을 받은 개체에서 염증 활성 및/또는 부정적인 면역반응을 감소시키는 것에 관한 것이다.
- [0021] 본 명세서에 있어서 다른 구현예는 개체에서 증상의 치료 및/또는 해로운 면역반응의 억제를 위하여 자가면역 장애를 갖는 개체를 치료하는 것에 관한 것이다.



- [0022] 어떤 구현예에 있어서, 투여용 조성물은 제형 ml 또는 ml 당 약 0.1 ng과 약 10 mg 사이의 범위일 수 있다. AAT 또는 펩티드로서 유사한 활성을 갖는 AAT 펩티드 또는 구조체의 치료학적 유효량은 몰농도로 측정될 수 있고 약 1 nM과 약 10 mM 사이의 범위일 수 있다. 또한 상기 제형은 약학적으로 또는 화장용으로 허용가능한 담체와 결합하여 고려될 수 있다. 정확한 용량은 과도한 실험 없이 잘 공지된 통상적인 임상 실험에 의해 규명될 수 있다. 한 구현예에 있어서, 개체는 활성제(예를 들어, AAT 구조체 또는 이의 AAT 펩티드 유도체)의 1회 용량(예를 들어, 대조군에 비해 상기 구조체 조성물의 효능에 따라 IV 투여로 0.6 mg/kg 내지 0.8 mg/kg)으로 증상이 치료될 수 있다. 이 구현예에 따르면, 상기 개체는 의료 종사자의 판단에 따라 속행(follow-on) 치료(예를 들어, 단일 용량 또는 그 이상 후의 5 내지 10일)로 치료될 수 있다. 다른 구현예는 위약(placebo)(예를 들어, 인간 혈청 알부민 투여 또는 다른 비슷한 위약)을 투여한 대조군 개체군의 사용 및 본 명세서에 개시된 조성물을 투여받은 개체군에 대한 위약 효과의 비교를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에 개시된 조성물 투여를 위한 임의의 방법이 고려된다. 어떤 구현예에 있어서, 조성물은 정맥내로, 비강내로, 피하로, 구강으로, 흡입으로, 피부에 처리, 예를 들어 국부적으로, 좌약으로, 질로 또는 본 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 이를 필요로 하는 개체에 투여될 수 있다.
- [0024] 어떤 구현예에 있어서, 상기 개체는 포유동물이다. 일부 구현예에 있어서, 상기 포유동물은 인간이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 개체는 임신한 여성 또는 영아이다. 다른 구현예에 있어서, 상기 개체는 애완동물, 집에서 길러지는 동물 또는 가축이다.
- [0025] 다른 구현예에 있어서, 상기 개체 또는 포유동물은 포획되거나 또는 풀려있는 야생 동물과 같이 집에서 길러지지 않는 포유동물일 수 있다.
- [0026] 어떤 구현예에 있어서, 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 인간 AAT 돌연변이체를 포함하는 조성물은 제시된 방법에 사용되기 위하여 본 명세서에 개시된 구조체에 사용될 수 있다(예를 들어, AAT 융합 펩티드 유도체 또는 반응 중심 루프(Reactive Center Loop, RCL) 관련 돌연변이체 융합 폴리펩티드). 이러한 구현예에 따르면, 본 명세서에 개시된 재조합 분자 또는 융합 단백질 구조체는 현저한 세린 프로테아제 억제 활성을 갖지 않는다. 이러한 구조체는 면역 분자(예를 들어, Fc)와 연결되어 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역 분자와의 융합은 융합 폴리펩티드의 신속한 정제를 위한 편리한 방법을 제공할 수 있고, 그렇게 함으로써 정제 단계를 줄여서 상기 AAT 또는 이의 카르복시 말단의 활성을 보존할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 상기 정제 단계는 친화성 방법(예를 들어, 단백질 A)을 사용한 단일 단계이다. 이러한 방법은 다른 상업적으로 입수가능한 제형(예를 들어, Aralast™, Prolastin C™)에 사용되는 유해한 정제 단계를 감소시킴으로써 본 명세서에 개시된 상기 구조체의 형태를 보존한다. 다른 구현예는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 것으로 조정된 AAT 유래 단편 구조체에 관한 것이다. 본 명세서에 있어서 다른 구조체는, 이에 한정되지 않으나, AAT에 대응하는 카르복시 말단 펩티드 또는 아미노 말단 펩티드, 이의 유사체, 세르핀-효소 복합체(SEC) 수용체에 결합하는 AAT 카르복시 말단의 유도체 또는 면역 분자(예를 들어, IgG 분자)와 연결된 이의 조합을 포함하는 구조체를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 고려되는 약학적 조성물은 개체의 필요에 따라 항염증제, 면역억제제, 면역조절제, 항바이러스제, 항병원성제, 항균제, 프로테아제 억제제, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 약제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약제는, 이에 한정되지 않으나, 하나 이상의 인터페론, 베타세론, 베타-인터페론을 포함한 인터페론 유도체, 일로프로스트, 시카프로스트를 포함한 프로스탄 유도체; 코르티솔, 프레드니솔론, 메틸-프레드니솔론, 텍사메타손을 포함한 글루코코르티코이드; 사이클로스포린 A, FK-506, 메톡살렌, 탈리도마이드, 설파살라진, 아자티오프린, 메토타렉세이트를 포함한 면역억제제; 질레우톤, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-41661A, BI-L-357을 포함한 리폭시게나아제 억제제; 류코트리엔 길항제; ACTH 및 이의 유사체를 포함한 펩티드 유도체; 가용성 TNF-수용체; TNF-항체; 인터루킨, 다른 사이토카인, T-세포-단백질의 가용성 수용체; 인터루킨, T-세포-단백질 수용체에 대한 항체; 및 칼시포트리올; 셀셉트®, 마이코페놀레이트 모페틸, 및 이의 유사체를 단독 또는 조합으로 포함한다.
- [0028] 이와 같이, 본 기술분야의 기술자들은 이러한 개시에 기초한 사상이 본 발명의 구현예의 여러 특성 및 장점을 수행하기 위하여 다른 방법들을 설계하기 위한 기초로서 용이하게 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0029] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 구성하고 본 명세서에 개시된 어떤 구현예를 추가로 설명하기 위하여 포함된다. 구현예는 본 명세서에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이러한 도면을 참조함

으로써 더 잘 이해될 수 있을 것이다.

도 1은 본 명세서에 개시된 일부 구현예에 대한 용도로 고려되는 AAT 구조체의 개략도를 나타낸다.

도 2a는 본 명세서에 개시된 일부 구현예에 대한 용도로 고려되는 면역 분자와 연결된 인간 AAT 구조체의 개략도를 나타낸다.

도 3은 Fc-AAT의 존재 또는 부재하에서 세포 모델에서 IL-8 생산의 히스토그램 그래프를 나타낸다

도 4는 본 명세서에 개시된 어떤 구현예의 융합 분자(예를 들어, Fc-AAT)의 존재하에서 항염증성 분자(IL-1 수용체 길항제(IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra)의 발현 생산의 히스토그램 그래프를 나타낸다.

도 5는 본 명세서에서 고려되는 제안된 융합 분자를 나타낸다.

도 6a 및 도 6b는 본 명세서에서 고려되는 예시적인 구조체를 나타낸다.

도 7은 본 명세서에서 고려되는 융합 분자의 증가한 양의 존재하에서 IL-1 수용체 길항제(IL-1Ra)의 생산을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

**정의:**

본 명세서에 사용된 바와 같이, "한" 또는 "하나"는 하나 또는 하나 이상의 항목을 의미할 수 있다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, "약"은 10% 안팎을 의미할 수 있고, 예를 들어, 약 10분은 9분 내지 11분을 의미할 수 있다.

하기 부분에 있어서, 본 발명의 상세하고 다양한 구현예를 위하여 다양하고 예시적인 조성물 및 방법이 제시된다. 다양한 구현예의 실시는 본 명세서에 개략적으로 나타난 특정한 상세한 설명의 모든 또는 일부의 구현예를 요구하는 것이 아니라 농도, 시간 및 다른 특정 상세한 설명이 통상적인 실험을 통해 변형될 수 있다는 것은 본 기술분야의 기술자에게 명백할 것이다. 일부 경우에 있어서, 잘 공지된 방법, 또는 구성요소는 본 설명에 포함되지 않는다.

AAT(알파-1 안티트립신) 항염증 활성이 세린 프로테아제, 특히 호중구 엘라스타제를 억제하는 그것의 능력에 기여한다는 것은 통상적으로 여기고 있었다. 이는 AAT 결핍을 갖는 인간에 대한 대체 요법에 있어서 그것의 용도에 기초한다. 인간에 대한 용도로 현재 상업적으로 입수가 가능한 AAT는 다른 AAT 관련 활성이 아닌 그것의 항엘라스타제 단위에 의해 표준화된다. 이러한 상업적으로 입수가 가능한 제제는 혼합 인간 혈장으로부터 정제되나, 그것은 다른 인간 혈청 단백질들을 포함하기 때문에 순수하지 않다(비록 일부는 다른 것들보다 더욱 순수할 수 있다). 생체 내 모델뿐만 아니라 시험관 내에서도 인간 AAT에 대한 연구의 대다수는 세린 프로테아제 억제 활성이 있고, 각각 인간에게 사용이 허용된, 이러한 상업적으로 입수가 가능한 제제의 사용에 의존한다. 비록 다양한 AAT 결핍 상태를 갖는 인간에 있어서 AAT의 투여가 안전한 것으로 여겨지나, 오염 단백질의 역할에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 명세서에 있어서 어떤 구현예는 함께 정제된 오염 혈장 단백질들의 문제를 극복하기 위하여 고순도 및 고효율의 AAT 재조합 형태의 신속한 제조를 제시한다.

과다 염증 또는 염증 활성은 몇몇의 만성 질환, 예를 들어 만성 파괴성 또는 소모성 질환의 개시, 진행 및 파괴성 특성을 일으킬 수 있다. 이는, 이에 한정되지 않으나, 류마티스관절염, 인슐린 생산 베타 세포가 면역 공격에 의해 파괴될 수 있는 1형 당뇨병과 같은, 자가면역 질환을 포함한다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있는 다른 증상은 2형 당뇨병을 포함한다. 자가면역 질환과 더불어, 관상 동맥의 만성 염증은 심근경색 또는 뇌졸중의 위험을 증가시킬 수 있다. 만성 염증은 또한 장에서의 염증(예를 들어, 크론병, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD) 또는 궤양성 대장염)에 기여한다. 개체에서 염증을 조절하는 몇몇의 자연적으로 발생하는 단백질들은 개체에서 매일 생성된다. AAT는 이러한 단백질 중 하나이다. AAT에 의한 치료의 하나의 문제점은 상업적으로 입수가 가능한 AAT가 인간 혈액 공여자의 혈장으로부터 분리되므로 사용 가능한 혈장에 대한 공급이 제한적이라는 것이다. 그것의 적용이 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 및 AAT 대체 요법과 같은 현재의 용도에 제한적이지 않기 때문에 치료학적 AAT의 용도는 증가하고 있다.

AAT에 의한 치료의 하나의 문제점은 상업적으로 입수가 가능한 AAT가 인간 혈액 공여자의 혈장으로부터 분리되므로

사용가능한 혈장에 대한 공급이 제한적이라는 것이다. 그것의 적용이 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 낭포성 섬유증, 세기관지염, 폐섬유증, 및 AAT 대체 요법과 같은 현재의 용도에 제한적이지 않기 때문에 치료학적 AAT의 용도는 증가하고 있다.

[0038] 어떤 구현예에 있어서, Fc 분자는 예를 들어, 면역 분자를 통해 이황화 결합에 의해 연결된, Fc-AAT 이량체를 만들기 위하여 AAT 분자와 연결될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, Fc-AAT의 단량체 분자가 생성될 수 있고, 본 명세서에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 상기 분자는 활성을 보존하기 위한 신속한 분리를 위하여, 예를 들어, 단백질 A 컬럼, 다른 친화성 정제 방법 또는 매트릭스 또는 다른 신속한 정제 또는 농축 방법을 사용하여 신속하게 정제될 수 있다.

[0039] 본 명세서에 있어서 구현예는 현재 상업적으로 입수가능한 AAT 조성물에 대해 뛰어난 특성을 갖는 알파-1 안티 트립신(AAT) 또는 이의 카르복시 말단 단편의 구조체 생성을 나타낸다. 다른 구현예는 융합 단백질 또는 펩티드의 신속한 정제 방법 및 이어서 본 명세서에 개시된 정제된 AAT 융합 분자에 대한 용도를 나타낸다. 혈액 혈장으로부터 유래된 상업적으로 입수가능한 AAT는 공급이 부족하고, AAT의 중요한 특성을 파괴하는 방법에 의해 현재 정제되고 있으며, AAT의 천연 형태 또는 AAT 유래 펩티드보다 좋지 않다면 합성적으로 제조된 AAT도 실시될 수 있는 이러한 분자의 합성 버전 또는 최신의 정제 방법에 대한 필요성이 존재한다.

[0040] 세린 프로테아제 억제 외에 AAT 활성에 관하여, AAT는 몇몇의 메커니즘에 의해 항염증 특성을 나타낸다. 항프로테아제 부위의 돌연변이(예를 들어, 근소한 수준까지 항프로테아제 활성을 감소시키기 위하여)를 사용한 예비테이터는 일부 AAT의 활성이 AAT의 항프로테아제 특성을 필요로 하지 않는다는 개념을 뒷받침한다. 어떤 구현예에 있어서, 자연적으로 발생하는 인간 AAT의 상이한 재조합형의 불완전하고 돌연변이의 형태(예를 들어, 394개 아미노산,  $M_r$  약 51,000 또는 다른 AAT 제형)가 상기 분자의 항염증 특성을 평가하기 위하여 생성된다. 이러한 접근법은 다양한 조성물의 AAT 분자를 제조하게 하고, 이는 혈장 유래 AAT의 표준 방법을 사용하는 것이 매우 어렵다. AAT의 항염증 특성은 상업적으로 입수가능한 조성물의 현재 사용되는 정제 과정에 의해 산화될 수 있기 때문에, AAT의 융합 분자 제조 및 정제를 위한 즉각적인 방법은 현재 방법보다 우수하다는 것이 고려되었다. 본 명세서에 개시된 방법은 본 명세서에 기재된 융합 분자 및 구조체에서 AAT 관련 활성을 보존하기 위한 뛰어나고 신속한 정제 방법을 제공한다.

[0041] 이미 개시된 어떤 방법에 있어서, AAT는 마우스 모델 및 인간 췌도 세포에서 IL-1 $\beta$ 의 독성 활성을 막는 것으로 알려져 왔다. 본 명세서에 일부 구현예는 융합 분자 또는 AAT 융합 분자의 재조합 산물이 이러한 활성을 모방하는지 시험 및 입증하는 것에 관한 것이다. 어떤 구현예에 있어서, 인간 AAT의 카르복시 말단 부위의 재조합으로 제조된 융합 펩티드는 IL-1 $\beta$ 의 독성 활성 또는 생성을 방지하고 카스파제-1 활성을 감소시키기 위하여 생성된다. 이러한 융합 펩티드는 전염증성 분자의 생산 또는 활성을 방지하거나 감소시키는데 유용하고 따라서 조절되지 않는 염증 반응과 관련된 많은 건강 증상의 치료 및 예방에 유용하다.

[0042] AAT는 세르핀 수퍼패밀리에 속하는 프로테아제 억제제로서 최초로 분류되었다. 그것은 일반적으로 혈청 트립신 억제제로서 알려져 있다. 또한 AAT는 그것이 다양한 종류의 프로테아제를 억제할 수 있기 때문에 알파-1 프로티나제 억제제(A1PI)로서 불릴 수 있다. AAT는 호중구 엘라스타제와 같은, 면역 세포의 효소로부터 조직을 보호하고, 약 1.5 내지 3.5 g/l의 혈액 내 범위를 전형적으로 갖는다.  $\alpha_1$ -안티트립신의 100개 이상의 상이한 변이체가 다양한 개체군에 있어서 설명된바 있다. AAT의 가장 흔한 종류는 IEF 겔에서 그것의 이동에 근거하여, M으로 일컫는다. 다른 종류는 그들이 상기 M 밴드에 근접하거나 또는 멀리 움직이는지에 따라, A-L 및 N-Z로 일컫는다. IEF 상에서 벗어나는 밴드의 존재는 AAT 결핍이 있음을 의미할 수 있다. 상기 나타난 바와 같이, M 유형 AAT는 여러 서브타입을 갖고 이러한 모든 서브타입은 본 명세서에서의 용도로 고려된다. 임의의 AAT 종류는 본 명세서에 개시된 구조체 설계를 사용한 융합 분자로서 사용될 수 있다는 것이 고려된다.

[0043] AAT의 치료학적 농도를 수득하기 위한 현재의 경향은 혈액 공여자(예를 들어, 인간 공여자)의 혈액 혈장으로부터 AAT를 제조하기 위한 것이다. 이는 매우 제한적인 재료이고 시장성 있는 제품을 얻기 위해서 대규모의 정제 단계가 요구된다. 지금까지, 미국 식품의약품안전청은 인간 혈장으로부터 유래된 몇몇의 상업적인 제품의 사용을 승인하고 있다. 예를 들어, 이러한 제품으로는 프로라스틴®(Prolastin®), 프로라스틴 C®(Talecris (지금은 Grifols, Raleigh, N.C.)), 제마이라®(Zemaira®), 및 아랄라스트(Aralast®)(Baxter) 및 에어로졸과 정맥 주사 제품을 모두 갖는 카마다(Kamada)(Kamada, Israel)를 포함한다. 이러한 제형의 대부분은 AAT 결핍 환자에 있어서 AAT 치료를 위해 정맥주사로 투여되고 환자당 1년에 \$100,000까지 비용이 들 수 있다. 혈장에서 단리된 AAT는 혈액으로부터 유래된 AAT에 비해 감소된 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 게다가, 현재의 정제 프로토콜은 일반적으로 현저히 감소된 활성과 혈장 유래의 AAT를 야기한다. 본 명세서에 개시된 조성물은 혈장 유래

AAT가 아닌 혈액의 것과 유사한 증가된 항염증 활성; 및 항염증 활성이 아닌 항프로테아제 활성에 기초한 활성을 갖는 현재의 상업적으로 입수가능한 제형보다 높은 활성을 갖는다.

[0044] 한 연구는 그것의 일차 구조 및 글리코실화에 대하여 세 개의 FDA 허가 제품을 분석 및 비교하였다. 제품 중 몇몇은 정상 인간 혈장 AAT에 비해 정제 과정 동안 도입될 수 있다는 차이점을 나타냈다. 게다가, 어떤 연구에서는 상업적인 제형의 비교가 세린 프로테아제 억제 활성 및 AAT 순도에 관한 큰 변동성을 갖는다는 것을 이미 나타낸 바 있다. 최근에, 최종 제품에 있어서 항프로테아제 활성(예를 들어, 세린 프로테아제 억제 활성)을 증가시키기 위하여, 표준적인 상업적으로 입수가능한 제형 중 하나인, 프로라스틴®이 평가되었고 새로운 제형인 프로라스틴C®가 프로라스틴®과 상이하게 정제되었다. 이러한 상업적인 제품들에 대해 보고된 모든 활성은 항염증 또는 면역 조절 활성 또는 대체적인 AAT 관련 활성이 아닌 세린 프로테아제 억제 활성의 평가로 이어진다. 따라서, 현재 상업적인 제품은 자연적으로 발생하는 제형에 대하여 양적으로 부족할 뿐만 아니라 질적으로도 낮다.

[0045] AAT 제형을 향상시키려는 노력에도 불구하고, 사용가능한 혈장 AAT의 공급이 한정적이고 따라서 재조합 AAT 분자는 지금까지 거의 성공 없이 시도되고 있다. 이전에 생성된 재조합 분자들은 세린 프로테아제 억제제 분석에 의해 분석할 경우 이미 알려진 상업적으로 입수가능한 제형에 비해 때때로 동등하지만 대개는 덜 활성적이었다. 따라서, 과거의 혈장의 제한된 공급과 질 낮은 재조합 AAT 분자는 이전에 그리고 최근에 발견된 방법론에서 사용하기 위한 AAT의 충분한 공급을 일으키는데 허점으로 남아있다.

[0046] 본 명세서에 있어서 일부 구현에는 본 기술분야에서 공지된 임의의 AAT 방법 또는 치료에서의 용도를 위하여 상업적으로 입수가능한 제형과 관련하여 매우 활성적이고, 매우 기능적인 재조합 AAT 구조체 생성에 관한 것이다. 어떤 구현에 있어서, 본 명세서에 개시된 재조합 AAT는 전장 분자 또는 이의 카르복시 말단 펩티드 유도체를 포함한다. 일부 구현에는 면역학적 요소(예를 들어, 이황화 결합에 의해 연결된 Fc 단편 또는 다른 단편)와 각각 연결되고 이량체 생성을 위해 함께 정제된 AAT 분자를 갖는 하나 이상의 구조체의 동시 합성에 관한 것이다. 다른 구현에는, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 방법 및 용도를 위한 구조체를 형성하기 위하여 하나 이상의 면역 분자(들)와 연결 또는 융합된 분자의 카르복시 말단의 마지막 80개, 70개, 60개, 50개, 40개, 30개 아미노산의 단편 또는 다른 단편을 포함하는, AAT의 하나 이상의 카르복시 말단 유도체(들) 또는 단편(들)의 구조체 생성에 관한 것일 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 고려되는 구조체의 AAT 분자는 전체, 또는 이의 단편, 또는 유도체, 또는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 AAT의 돌연변이 형태, 임의의 AAT 분자, 또는 이의 대립유전자(예를 들어, 약 100개의 자연적으로 발생하는 AAT 변이체), 또는 이의 유사체 또는 이의 융합 단백질(예를 들어, 인간 IgG 또는 인간 IgG의 단편)에 있어서 자연적으로 발생하는 알파-1 안티트립신(예를 들어, 인간 또는 다른 포유동물)에 관한 것일 수 있다. 이러한 구현에 따르면, 구조체는 면역학적 단편(예를 들어, 두 분자의 AAT와 연결된 Fc 단편)과 연결된 이량체의 AAT 구조체를 포함하고 상기 Fc-AAT 구조체는 하나 이상의 이황화 결합(들)에 의해 함께 연결된다. 본 명세서에 개시된 실시예, 도 2a, 도 6a 및 도 6b를 참조한다. 어떤 방법에 있어서, 재조합 AAT 또는 AAT 펩티드 및 면역 분자 복합체의 정제는 AAT 또는 AAT 펩티드의 현저히 감소한 정제 단계 및 현저히 증가한 효능에 의해 상기 AAT 또는 AAT-펩티드의 활성을 증가시킨다. 이러한 구현에 따라서, 본 명세서에서 고려되는 재조합 AAT 분자는 융합 폴리펩티드(예를 들어, 이량체 또는 단량체 형태)로서 사용될 수 있거나 또는 정제 후 그것의 면역 분자로부터 절단되어 상업적으로 입수가능한 제형에 비해 감소된 농도로 사용될 수 있다. 일부 구현에는 상업적으로 입수가능한 제형에 비해 1/2, 1/4, 1/10<sup>th</sup>, 1/100<sup>th</sup>까지 농도의 사용에 관한 것이다. 어떤 실시예에 있어서, 이러한 분자는 대조군(예를 들어, 자연적으로 발생하는 AAT의 전형적인 정제 및 상업적으로 입수가능한 제형의 정제)에 비해 사이토카인을 억제하고 면역 또는 염증 작용을 조절하기 위한 조성물에 사용될 수 있다. 한 구현에 있어서, 본 출원의 재조합 분자는 현재의 상업적으로 입수가능한 제제보다 더욱 활성적인 것으로 나타났다. 본 발명의 AAT 구조체에 대해 관심있는 것으로 알려진 어떤 활성은 면역조절 또는 염증 조절 활성을 포함한다. 일부 구현에 있어서, 본 명세서에 개시된 구조체는 상업적으로 입수가능한 조성물에 비해 증가된 IL-1 $\beta$  수용체 길항제 활성을 갖는다.

[0048] 어떤 구현에 있어서, 상기 개체는 포유동물이다. 일부 구현에 있어서, 상기 포유동물은 인간이다. 또 다른 구현에 있어서, 상기 개체는 남성, 여성, 임신한 여성, 유아 또는 청소년이다.

[0050] 건강상태의 치료에 있어서 재조합 AAT에 대한 일부 용도



- [0051] 본 명세서에 제시된 일부 구현에는 AAT 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 재조합 AAT 또는 이의 융합 단백질 또는 카르복시 말단 단편 융합 분자의 용도에 관한 것이다. AAT 치료는 이에 한정되지 않으나, 세포사멸 관련 증상, 일산화질소 관련 증상, 허혈 재관류 기능장애로 유도된 증상, 이식 거부 및 세포 거부, 당뇨병, 폐기종, 다른 폐 증상을 포함하는 다양한 증상, 박테리아성 감염의 치료 및 예방, 바이러스성 감염의 치료 및 예방, 방사선으로 유도된 상처 등에 있어서의 용도를 나타낸다.
- [0052] 본 명세서에 있어서 일부 구현에는 염증 장애(예를 들어, IBD, 관절염)를 치료하기 위한 용도의 조성물에 관한 것이고, 상기 증상을 치료하기 위한 상기 조성물은 세린 프로테아제 활성을 감소시키거나 제거시킨다.
- [0053] 어떤 구현에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 개체에서 염증성 장 장애의 개시를 감소하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 구현에 따르면, 개체에 있어서 IBS와 연관된 증상에서의 감소는 약 10~20%, 또는 약 30~40%, 또는 약 50~60%, 또는 약 75~100% 감소 또는 억제될 수 있다. 이러한 구현에 따르면, 조성물을 투여받지 않은 대조군 개체에 비해 소모를 줄이거나 또는 손실을 줄이거나 또는 장벽 기능을 회복하기 위하여 IBS 또는 IBD에 걸린 개체는 AAT의 재조합체 또는 융합 단백질 또는 AAT 카르복시 말단 펩티드의 약학적으로 허용가능한 조성물로 치료될 수 있다.
- [0054] 본 명세서에 있어서 일부 구현에는 급성 또는 만성 증상에 걸린 개체에서 창자 또는 장 과투과성의 회복에 관한 것이다. 이러한 구현에 따르면, 창자 또는 장 과투과성 또는 장벽 기능의 손실은 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 염증성 장질환, 1형 당뇨병, 알레르기, 및 천식과 같은 만성 질환 때문일 수 있다. 어떤 구현에 있어서, 창자 또는 장 과투과성을 갖는 개체는 매일 1회, 매주 2회, 매주 1회와 같이 미리 결정된 요법에 의해 또는 다른 미리 결정된 요법에 의해 의료 종사자에 의해 치료될 수 있다.
- [0055] 어떤 구현에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 이에 한정되지 않으나, 당뇨병(예를 들어, 1형 및 2형), 자가면역 질환과 같은 면역 질환, 염증 질환, 심장 장애, 감염성 질환 및 다른 것들을 포함하는 어떤 징후를 치료하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 일부 질환들은 감염성 질환, 자가면역 질환 또는 폐질환 또는 다른 것들로 여겨질 수 있는 천식과 같이 하나 이상의 카테고리에 해당될 수 있다. 어떤 구현에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 이에 한정되지 않으나, 류마티스 관절염과 같은 류머티즘성 질환, 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 1형 당뇨병, 및 갑상선, 소화관, 및 중추신경계의 자가면역 질환(예를 들어, 류마티스 관절염, 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 경피증, 혼합 결합 조직병, 피부근염, 다발성근염, 라이터증후군, 및 베헤트병); 중추신경계의 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증, 중증근무력증, 또는 뇌척수염); 위장계의 자가면역 질환(예를 들어, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 셀리악병, 스프루우); 갑상선의 자가면역 질환(예를 들어, 하시모토 갑상선염, 또는 그레이브스병); 및 눈의 자가면역 질환(예를 들어, 포도막염)을 포함하는 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 자가면역 장애는, 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 혈소판감소, 베헤트병, 수포성 유천포창, 심근증, 셀리악 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능장애 증후군(chronic fatigue immune dysfunction syndrome, CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 처그 스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 크론병, 원판성 루푸스, 본태성 복합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 길랑바레, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소증 자반증(idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP), 과민성 장질환(irritable bowel disease, IBD), IgA 신경병증, 청소년 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합 결합 조직병, 다발성 경화증, 1형 또는 면역 매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다연골염, 다분비선 증후군, 다발성 류마티스, 다발성근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이놀드 증상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 근육강직 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 타카야수동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진성 피부염 혈관염과 같은 혈관염, 백반증, 베헤너 육아종증, T 세포 매개 자가면역 질환, 류마티스 질환, 류마티스 관절염, 홍반성 루푸스에 관한 것일 수 있다.
- [0056] 어떤 구현에는 본 명세서에 개시된 조성물에 의한 간 증상의 치료에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 간 증상은, 이에 한정되지 않으나, 간질환, 간경변증, 바이러스성 감염(예를 들어, 간염), 및 과도한 염증 또는 면역 장애에 의해 야기된 임의의 다른 간 증상을 포함한다.
- [0057] 본 명세서에 개시된 어떤 구현에 있어서, 조성물은 개체에서 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

본 명세서에서 고려되는 자가면역 질환은, 이에 한정되지 않으나, 급성 파종성 뇌척수염(Acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), 에디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형탈모증, 루게릭 병, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 항합성효소 증후군, 아토피성 알레르기, 아토피성 피부염, 면역 재생 불량성 빈혈, 자가면역성 심근증, 자가면역성 장질환, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 내이 질환, 자가면역성 림프구 증식 증후군, 자가면역성 말초신경병증, 자가면역성 췌장염, 자가면역성 다선증후군, 자가면역성 프로게스테론 피부염, 자가면역성 혈소판 감소성 자반증, 자가면역성 두드러기, 자가면역성 포도막염, 발로병/발로 동심성 경화증, 베체트병, 버거스씨병, Bickerstaff 뇌염, 블라우 증후군, 수포성 유천포창, 암, 캐슬만병, 셀리악병, 샤가스병, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 만성 재발성 다발성 골수염, 만성 폐쇄성 폐질환, 처그-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, 코건 증후군, 한랭응집소 질환, 구성 요소 2 결핍, 접촉성 피부염, 두개골 동맥염, CREST 증후군, 크론병(특발성 염증성 장질환 "IBD"의 두 가지 유형 중 하나), 쿠싱 증후군, 피부의 백혈구 파괴성 혈관염, 데고스병, 텔캬병, 포진성 피부염, 피부근염, 1형 당뇨병, 확산 피부 전신 경화증, 드레슬러 증후군, 약물-유발 루푸스, 원반상 홍반성 루푸스, 습진, 자궁내막증, 골부착부위염 관련 관절염, 호산구성 근막염, 호산 구성 위장염, 후천성 수포성 표피박리증, 결절성 홍반, 적아세포증, 본체성 혼합 한랭글로불린혈증, 에반 증후군, 진행성 골화성 섬유이형성증, 섬유화 폐포염(또는 특발성 폐 섬유증), 위염, 위장관 유천포창, 거대 세포 동맥염, 사구체신염, 구드패스슈어 증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome, GBS), 하시모토 뇌병증, 하시모토 갑상선염, 헤노흐-셴라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 임신성 포진, 임신성 유천포창, 화농성 한선염, 휴-스토티 증후군, 저감마글로불린혈증, 특발성 염증성 탈수초성 질환, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반증(자가면역성 혈소판 감소성 자반증), IgA 신병증, 봉입체 근염, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 가와사키병, 람베르트-이튼 근무력증 증후군, 백혈구 과쇄성 혈관염, 편평태선, 경화성 태선, 선상 IgA 질환(Linear IgA disease, LAD), 루게릭병, 근위축성 측삭경화증, 루포이드 간염으로 알려진 자가면역성 간염, 홍반성 루푸스, 마지드 증후군, 현미경적 다발혈관염, 밀러-피셔 증후군, 길랑-바레 증후군, 혼합 결합 조직 질환, 반상경피증, 뮌샤-하버만 질환, 급성 두창상 태선양 비강진, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 기면증, 시신경 척수염, 대뇌병, 신경근긴장증, 눈의 반흔성 유천포창, 안구간대경련-근간대경련 증후군, 오드 갑상선염, 재발성 류머티즘, PANDAS(구균 감염과 관련된 소아 자가면역성 신경정신 장애), 부종양성 소뇌 변성, 발작성야간 혈색소뇨증(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH), 페리-롬버그 증후군, 파르소니지-터너 증후군, 주변부 포도막염, 심상성천포창, 악성 빈혈, 정맥주위성 빈혈, 정맥주위성 뇌척수염, POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, 류마티스성 다발성 근육통, POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 진행성 염증성 신경병증, 건선, 건선성 관절염, 괴저성 농피증, 순적혈구 무형성증, 라스무센 뇌염, 레이노 현상, 재발성 다발연골염, 라이트 증후군, 하지 불안 증후군, 후복막 섬유증, 류마티스 관절염, 류마티스 열, 유육종증, 정신분열증, 슈미트 증후군, 슈니צל러 증후군, 공막염, 경피증, 혈청 병, 쇼그렌 증후군, 척추관절병증, 스틸병, 소아 류마티스 관절염, 스티프맨 증후군, 아급성 세균성 심내막염(Subacute bacterial endocarditis, SBE), 수작 증후군, 스윗 증후군, 시텐함 무도병, 교감성 안염, 전신성 홍반성 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염, 혈소판 감소증, 톨로사-헌트 증후군, 횡단성 척수염, 궤양 성 대장염, 미분화 척추 관절병증, 미분화 결합 조직 질환, 두드러기성 혈관염, 두드러기성 혈관염, 혈관염 백반증 및 베게너 육아종증을 포함한다.

[0058] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은, 이에 한정되지 않으나, 예를 들어, 관절염, 염증성 골용해, 만성 염증(예를 들어, 만성 바이러스성 또는 박테리아성 감염), 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 뇌염, 염증성 장질환(IBD), 건선(예를 들어, 플라크 건선, 농포성 건선, 홍포성 건선, 적상건선 또는 간찰부 건선), 폐섬유증, 미분화 관절증, 미분화 척추관절증과 같은 알레르기 장애를 포함하는 염증 증상과 같은 증상의 치료를 포함할 수 있다. 다른 증상은, 이에 한정되지 않으나, 예를 들어, 천식, COPD, 폐기종과 같은 호흡기 증상을 포함한다. 다른 폐 증상은, 낭포성 섬유증 및 세기관지염 경화증과 같은 것이 고려된다.

[0060] 방사선 방호 및 암

[0061] 어떤 구현예에 있어서, 조성물(예를 들어, 구조체 조성물) 및 방법은 개체에 대한 방사선의 부작용 조절에 관한 것이다. 일부 구현예에 있어서, 조성물 및 방법은 예를 들어, 암에 걸렸거나 또는 악성종양이 발생한 것으로 의심되는 개체에게 또는 조절되지 않는 세포 성장을 위해 투여될 경우, 방사선 치료 또는 방사선을 받은 개체의 치료에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 다른 구현예는 방사선 치료의 해로운 부작용을 감소시키기 위하여 예를 들어, 사고에 의해 또는 목적있는 행동에 의해, 방사선에 노출된 적이 있는 개체의 치료에 관한 것이다.

[0062] 본 명세서에 개시된 일부 구현예는 암 치료를 받은 개체의 치료에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따라서, 암

치료를 받은 개체는 상기 치료의 해로운 영향(예를 들어, 방사선 및/또는 화학요법으로부터)을 감소 또는 예방하기 위하여 본 명세서에 개시된 조성물로 치료될 수 있다. 암 치료는, 이에 한정되지 않으나, 방광암, 유방암, 신장암, 백혈병, 폐암, 골수종, 지방육종, 림프종, 혀암, 전립선암, 위암, 결장암, 자궁암, 흑색종, 췌장암, 뇌암, 안암, 피부암 및 다른 공지된 암에 대한 치료를 포함한다.

[0063] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 암에 걸린 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 구현예를 위해 고려되는 암들은, 이에 한정되지 않으나, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 카포시 육종, 림프관혈관내피육종, 활액막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 횡문육종, 대장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 흑색종, 편평 상피 세포암, 기저 세포암, 선암, 땀샘암, 피지샘암, 유두 암, 유두상선암, 낭종암, 수질암, 기관지암, 신세포암, 간암, 담도암, 용모막암, 정상피종, 배아암종, 빌름스종, 자궁경부암, 고환 종양, 난소암, 폐암, 소세포 폐암, 방광암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 회소돌기아교세포종, 뇌수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종, 백혈병, 또는 다른 공지된 암을 포함할 수 있다.

[0064] 다른 구현예는 방사선 방호에 대해 포함하고 본 명세서에 개시된 조성물은, 호르몬 요법과 병용함에 있어서, 및/또는 면역치료 조합으로서, 화학요법 동안에, 삼차 신경통의 치료, 중증 갑상선 안구 질환의 치료, 익상편의 치료, 색소 용모 결절성 활막염의 치료, 켈로이드 상처 성장의 예방, 이소성 골화증의 예방, 미용, 성형 또는 재건의 외과적 적응 수술(예를 들어, 상처 형성의 제거)에 관한 것이다. 본 명세서의 어떤 구현예에 있어서, 융합 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 성형 수술을 받거나 받았던 개체에 있어서 염증을 감소시키는데 사용될 수 있다. 이러한 조성물의 투여는 상기 개체의 염증 및 흉터를 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0065] 어떤 부작용은 방사선 노출시에도 방사선 치료 또는 화학요법의 부작용으로 발생할 수 있다. 본 명세서에 있어서 일부 구현예는 본 명세서에 개시된 조성물로 개체를 치료함에 따라 개체에서 이러한 부작용의 감소 또는 예방에 관한 것이다. 조성물은 AAT의 재조합 형태 및/또는 AAT 카르복시 말단 펩티드(예를 들어, 80머, 36머 등)의 재조합 형태를 포함할 수 있다. 방사선 치료의 부작용은, 이에 한정되지 않으나, 세포 손상, 통증, 부종, 국소 자극, 섬유증, 놀람, 조직 온전성의 손실, 증가된 조직 파쇄, 연하에 있어서 어려움, 방사선 치료 또는 노출과 연관된 다른 증상을 포함할 수 있다. 감소시키거나 예방할 수 있는 다른 부작용은 예를 들어 골수 이식과 같은, 전신 방사선 치료(total body irradiation, TBI)에서의 부작용에 관한 것이다. 이러한 부작용은 상기와 더불어, 급성 또는 만성 면역결핍 및 기회감염을 포함할 수 있다.

[0066] 본 명세서에 개시된 일부 구현예는 전립선암에 걸렸거나 발생한 것으로 의심되는 환자의 치료에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따르면, 전립선암에 걸렸거나 발생한 것으로 의심되는 남성 개체는 이러한 치료에 의한 부작용을 감소시키기 위하여 방사선 및/또는 화학요법 치료 전, 동안 또는 후에 본 명세서에 개시된 조성물로 치료될 수 있다. 예를 들어, 부작용은, 이에 한정되지 않으나, 발기불능 또는 발기부전의 발생일 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 고려되는 다른 증상은 전신성 홍반성 루푸스(SLE 또는 루푸스), 류마티스 관절염, 패혈증, 전신성 홍반성 루푸스(SLE 또는 루푸스), 류마티스 관절염, 염증성 장질환, 패혈증, 자가면역 질환, 동맥경화증, 알츠하이머병, 관절염, 근육 영양 장애, 다운 증후군, 다발성 경화증, 뇌졸중, 퇴행성 신경 질환, 다른 염증성 질환 또는 증상 및 혈청 음성 척추 관절증을 포함한다.

[0069] 이식 거부 및 이식 생존율

[0070] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 고려되는 재조합 또는 융합 폴리펩티드(예를 들어, Fc-AAT 또는 Fc-AAT 단편)는 기관 또는 비기관(예를 들어, 세포) 이식과 같은, 이식을 받은 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 세포 이식은 골수, 췌도 세포(예를 들어, 췌도 동종이식), 각막 세포, 줄기 세포, 피부(예를 들어, 세포 또는 그 이상), 피부의 임시 사체 이식(예를 들어, 연조직, 얼굴 등) 또는 이식편대숙주질환(GVHD)과 같은 세포 이식 거부와 관련된 증상을 포함할 수 있다. 본 발명의 구현예는 이식을 받거나 필요로 하는 개체에 의해 경험된 증상 또는 징후를 개선하기 위한 방법을 제공한다. 이러한 구현예에 따르면, 증상 또는 징후는 이식편대숙주질환(GVHD), 또는 이식 거부와 연관된 증상을 포함할 수 있다. 한 실시예에 있어서, 본 명세서에 개시된 방법은 골수 이식을 받은 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 방법은 줄기 세포 또는 다른 세포 이식을 받은 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 개체는 이식 거부를 감소시키고, 이식된 세포를 보존하고 및/또는 이식된 세포(이식편) 생존을 연장시



키기 위해 치료될 수 있다. 다른 구현예에는 심장, 폐, 장, 간, 췌장, 신장 또는 다른 장기 이식과 같은 장기 이식을 받은 개체의 치료를 포함할 수 있다.

[0071] 한 실시예에 있어서, 본 명세서에 개시된 방법은 골수 이식을 받은 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 개체에 있어서 이식 거부 및/또는 GVHD를 감소시키기 위하여 개체는 골수 이식 전, 동안 또는 후에 치료될 수 있다.

[0072] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 조직 이식 거부의 발생의 예방 또는 감소에 관한 것이다. 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 기관 이식의 연장에 관한 것이다. 본 발명에서 고려되는 이식은 신장, 심장, 간, 연조직의 이식, 얼굴 구성요소 이식, 장 이식, 및 췌장 이식에 관한 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 조성물은 기관 또는 비기관의 이식과 연관된 증상의 감소 또는 예방에 관한 것일 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물로 이식을 받은 개체를 치료함으로써 감소시키거나 또는 예방할 수 있는 증상은, 이식 거부, 신부전증, 폐부전증, 심부전증, 점막 궤양, 감소된 췌도 기능(증가된 포도당, 당뇨병), 이식편대숙주질환(GVHD), 위장관질환(GI), 궤양, 폐부전증, 피부 궤양, 응고장애, CNS 기능장애, 및 혼수상태를 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명의 구현예에는 재조합 AAT 또는 이의 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 부형제 물질을 포함하는 약학적으로 유효한 양의 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 연장된 이식 생존 및 기능을 증진하는 방법을 제공한다.

[0074] 어떤 구현예에 있어서, 상기 개체는 포유동물이다. 일부 구현예에 있어서, 상기 포유동물을 인간이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 개체는 남성, 여성, 임신한 여성, 유아 또는 청소년이다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면은 이식 전에 기관 또는 세포 보존에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명에 개시된 조성물에 대해 운반 동안의 동결보존 또는 보존 또는 다른 보존 방법이 기관, 조직 또는 세포를 노출시킴으로써 강화될 수 있다. 본 발명에 있어서 어떤 구현예는 이식 또는 동결보존을 위해 제조된 기관, 조직 또는 세포를 보존하기 위한 본 발명에 개시된 조성물의 용도에 관한 것이다. 이러한 구현예에 따르면, 기관, 조직 또는 세포는, 예를 들어, 췌도 세포, 줄기 세포, 골수 세포, 신장, 간, 폐, 및 다른 기관 또는 세포 이식과 같이, 본 발명에 개시된 임의의 것들을 포함한다.

[0076] 본 발명의 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 추가로 병용 요법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 병용 요법은 하나 이상의 인터페론, 베타세론, 베타-인터페론을 포함한 인터페론 유도체, 일로프로스트, 시카프로스트를 포함한 프로스탄 유도체; 코르티솔, 프레드니솔론, 메틸-프레드니솔론, 텍사메타손을 포함한 글루코코르티코이드; 사이클로스포린 A, FK-506, 메톡살렌, 탈리도마이드, 설파살라진, 아자티오프린, 메토타렉세이트를 포함한 면역억제제; 질레우톤, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-41661A, BI-L-357을 포함한 리폭시게나아제 억제제; 류코트리엔 길항제; ACTH 및 이의 유사체를 포함한 펩티드 유도체; 가용성 TNF-수용체; TNF-항체; 인터루킨, 다른 사이토카인, T-세포-단백질의 가용성 수용체; 인터루킨, 다른 사이토카인, T-세포-단백질의 수용체에 대한 항체; 및 칼시포트리올; 셀셉트®, 마이코페놀레이트 모페틸, 및 이의 유사체를 단독 또는 조합으로 포함할 수 있다.

[0077] 어떤 구현예에 있어서, 심근경색증에 걸렸거나 걸린 것으로 의심되는 환자는 심장 증상의 증상 또는 부작용을 개선하기 위하여 본 명세서에 개시된 조성물이 투여될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 심실 리모델링을 감소 또는 예방하기 위해서 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 증상의 치료 방법은 심장 사건 전, 동안 또는 후에 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 개체에서 발생한 심장 사건 후에 최적 효용성을 위하여 조성물은 의료 종사자에 의해 결정된 기간 동안 개체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 개체는 사건 후 1주일까지, 2주일 또는 그 이상까지 조성물로 치료될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 개체에 투여되는 조성물은 용량당 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg의 재조합체 또는 AAT 융합 단백질과 같이, 상업적으로 입수가 가능한 AAT 제형(예를 들어, Aralast™, Prolastin C™)의 사용보다 5배, 10배, 100배 또는 1,000배 더 적을 수 있다.

[0079] 당뇨병

[0080] 또한, 본 명세서에 개시된 조성물은 개체에서 질환을 치료하기 위하여 당뇨병에 걸린 임의의 개체에 투여될 수 있다. 1형 또는 2형 당뇨병에 걸린 개체는 질환을 치료하거나 질환 증상을 치료하기 위하여 본 명세서에 개시된 조성물을 투여할 수 있다. 이러한 치료는 본 기술분야에 공지된 당뇨병에 대한 임의의 치료와 병용할 수 있

다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 당뇨병에 걸린 개체를 치료하기 위하여 현재 사용가능한 상업적인 제형에 비해 감소된 수준(예를 들어, 농도)으로 개체에 투여될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 당뇨병에 걸린 개체는 예를 들어, 검출가능한 c-펩티드 수준, 및/또는 검출가능한 인슐린 생산, 및/또는 잔류 췌도 세포 기능을 갖는 5년 내에 진단된 것과 같이 초기 시작된 1형 당뇨병에 걸린 개체일 수 있다.

[0081] 다른 구현예는 생체 내에서(예를 들어, 췌도 세포 기능을 보존 또는 회복하기 위하여) 또는 시험관 내에서(예를 들어, 이식을 위한 운반 동안에) 췌도 세포를 보호하기 위한 본 명세서에 개시된 조성물의 용도에 관한 것일 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 일부 췌도 세포 기능이 남아있는 당뇨병에 걸린 개체의 치료 및/또는 췌도 세포 보존을 위하여 개체에 있어서 이식 전에 췌도 세포의 처리에 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 따라서, 개체는 췌도 세포 이식 전, 동안 또는 후에 치료될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 당뇨병 치료는 1형 및 형, 인슐린 저항성 당뇨병에 걸린 개체의 치료를 포함할 수 있다.

[0083] 심장 증상

[0084] 본 발명의 일부 구현예는 심장 증상에 걸렸거나 또는 관상동맥 중재술(예를 들어, 수술, 예방 치료)을 받은 개체의 치료를 포함한다. 이러한 구현예에 따르면, 심장 증상에 걸린 개체는, 이에 한정되지 않으나, 심근경색, 심근 허혈, 만성 전신성 동맥 및 정맥 고혈압, 폐동맥 및 정맥 고혈압, 선천성 심장질환(심장 내의 선팅이 있거나 없는), 심장 판막증, 특발성 확장성 심근증, 감염성 및 비감염성 심근염, 스트레스성 심근증(중요한 치료 질병, 신체적, 및 정서적 스트레스, 및 두개내 출혈 및 뇌졸중과 연관된 것과 같은), 폐혈성 심근증, 심방 및 심실 부정맥, 심장내막염, 심낭염, 심장 근육의 손상, 심장마비, 심장 정지, 급성 심근경색(acute myocardial infarction, AMI), 심근의 재관류 허혈 손상, 심실 리모델링, 구심성 비대, 편심성 좌심실 비대 및 임의의 다른 공지된 심장 증상을 포함하는 하나 이상의 하기 증상을 가질 수 있다.

[0085] 어떤 구현예에 있어서, 심근경색에 걸렸거나 걸린 것으로 의심되는 개체는 상기 심근경색의 증상 또는 부작용을 개선하기 위하여 본 명세서에 개시된 조성물을 투여할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 심실 리모델링을 감소시키거나 예방하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 증상 치료 방법은 심장 사건 전, 동안 또는 후에 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에 있어서, 개체에서 발생한 심장 사건 후에 최적 효용성을 가지기 위하여 조성물은 의료 종사자에 의해 결정된 기간 동안 개체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 개체는 사건 후 1주일까지, 2주일 또는 그 이상까지 조성물로 치료될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 개체에 투여되는 조성물은 용량당 0.001 mg/kg 내지 10 mg/kg의 재조합체 또는 AAT 용합 단백질과 같이, 상업적으로 입수가 가능한 AAT 제형(예를 들어, Aralast™, Prolastin C™)의 사용보다 5배, 10배, 100배 또는 1,000배 더 적을 수 있다.

[0087] 위장 장애

[0088] 본 발명의 일부 구현예에 있어서, 위장 질환 또는 증상(예를 들어, 간헐적인, 단독 또는 만성 상태)을 갖는 개체의 치료를 포함한다. 이러한 구현예에 따르면, 위장 장애를 갖는 개체는, 이에 한정되지 않으나, 염증성 장질환(예를 들어, IBS 또는 IBD), 궤양성 대장염(UC), 크론병(CD), 전신성 염증성 반응 증후군(SIRS), 알레르기 및 연관된 장질환, 1형 당뇨병과 연관된 장질환, 다른 대장염 유형(예를 들면, 교원성 대장염, 허혈성 대장염, 전환성 대장염, 불확정성 대장염), 장의 염증과 연관된 베체트병 및 다른 장 장애를 포함하는 하나 이상의 증상을 가질 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 장 장애의 증상 또는 부작용은 본 명세서에 개시된 조성물로 치료될 수 있다. 예를 들어, 장 장애의 부작용은, 이에 한정되지 않으나, 피부 증상, 체중 감소, 대장 단축, 장 점막, 창자 또는 장 과투과성을 포함한다. 어떤 구현예는 상기 장애를 갖는 개체에 있어서 체중 감소를 감소시키거나 예방하기 위하여 본 명세서에 개시된 조성물에 의한 장 장애를 갖는 개체의 치료를 포함할 수 있다.

[0090] 박테리아성 증상

[0091] 본 발명의 일부 구현예는 박테리아성 감염에 걸린 개체의 치료를 포함한다. 다른 구현예는 개체에 있어서 박테리아성 감염을 예방하기 위하여 본 발명에서 개시된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 박테리아성 감염은, 이에 한정되지 않으나, 그람음성 또는 그람양성 세균 또는 마이코박테리아 생물체를 포함할 수 있다. 그람음성세균은, 이에 한정되지 않으나, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis*, *H.*

*injiuenzae*, *E. coli*, 모든 *Klebsiela spp.*, 모든 *Enterobacter spp.*, 모든 *Serratia spp.*, 모든 *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, 모든 *Providencia spp.*, 모든 *Morganella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, 모든 *Citrobacter spp.*, 모든 *Pasteurella spp.*, 모든 *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas cepacia*, 모든 *Shigella spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, 모든 *Acinetobacter spp.*, 모든 *Legionella spp.*, *Y. enterocolitica*, 다른 *Yersinioiosis*, *H. ducreyiei*, 모든 *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma pneumonia*, *Mycoplasma hominis*, *Bacteroides fragilis*, *P. melaninogenica*, 모든 *Moraxella spp.*, 모든 *Bordetella spp.*, 및 *P. multocida*를 포함할 수 있다.

[0092] 본 명세서에서 고려되는 마이코박테리아는, 이에 한정되지 않으나, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium complex (MAC)* 생물체, *M. intracellular*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *leprosy causing (M. leprae)*, *M. flavescens*, *M. lepraemurium*, *M. microti*, *M. chelonae*, *M. africanum*, *M. marinum*, *M. buruli*, *M. fortuitum*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. littorale*, *M. malmoense*, *M. marianum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. phlei*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. trivial*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. vaccae*를 포함할 수 있다.

[0093] 본 명세서에서 고려되는 그람양성세균은, 이에 한정되지 않으나, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, Group A, B, C, 및 G *Streptococcus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus milleri group*, *Viridans streptococcus*, 모든 *Listeria spp.*, 모든 *Staphylococcus spp.*, *S. aureus (MSSA)*, *S. aureus (MRS A)*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, 모든 *Clostridium spp.*, *C. diphtheriae*, *C. jeikium*, 모든 *Rhodococcus spp.*, 모든 *Leukonostoc spp.* 및 *Bacillus anthracis*(예를 들어, 탄저병을 일으키는 것)를 포함한다.

[0094] 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 박테리아성 증상을 갖는 개체의 치료, 박테리아성 연관 증상의 감소 또는 개시의 예방에 사용될 수 있다.

#### [0096] 바이러스성 증상

[0097] 본 발명의 일부 구현예는 바이러스성 감염에 걸린 개체의 치료를 포함한다. 다른 구현예는 개체에 있어서 바이러스성 감염을 예방하거나 바이러스성 감염을 치료하기 위하여 본 발명에 개시된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 바이러스성 감염은, 이에 한정되지 않으나, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 에이즈, 인플루엔자 바이러스(예를 들어, A형, B, C, 인플루엔자 A H1N1, H1N2, H3N2, H9N2, H7N2, H10N7), 대상포진, 단순포진, 인유두종 바이러스, 천연두 주요 바이러스(작은 수두), 라사열 바이러스, 조류 독감, 에이즈 관련 합병증, 수두(Varicella), 거대세포 바이러스, 콜로라도 진드기 열, 탕기열, 에볼라 출혈열, 수족구병, 간염, 인유두종 바이러스, 전염성 단핵구증, 유행성 이하선염, 소아마비, 진행성 다소성 백질뇌증, 광견병, 풍진, SARS, 바이러스성 뇌염, 바이러스성 위장염, 바이러스성 뇌막염, 웨스트 나일 질환, 황열병, 마르부르그 출혈열, 홍역 및 다른 바이러스 관련 장애를 포함할 수 있다.

[0098] 본 명세서에 개시된 다른 구현예는 개체에서 바이러스 복제 및/또는 감염을 억제함으로써 바이러스에 의해 유도되는 암의 감소 또는 예방에 관한 것이다. 바이러스들에 의해 유도되는 암은, 이에 한정되지 않으나, 라우스 육종에 의한 암, 인유두종 바이러스(HPV)에 의한 암, 폴리오마에 의한 암, B형 간염 바이러스에 의한 암, 섬유육종, 점액 육종, 지방 육종, 연골 육종, 골육종, 혈관 육종, 척삭종, 내피 육종, 림프관 육종, 림프혈관내피 육종, 중피종, 활액막종, 유잉 종양, 평활근 육종, 횡문근 육종, 횡문육종, 대장암, 췌장암, 유방암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 편평 상피 세포암, 기저 세포암, 피지샘암, 선암, 땀샘암, 유두암, 간암, 낭종암, 유두상선암, 기관지암, 수질암, 신세포암, 정상피종, 담도암, 자궁경부암, 윌름스 종양, 배아암, 폐암, 융모막암, 고환종양, 방광암, 상피암, 소세포 폐암, 두개인두종, 수모세포종, 성상세포종, 신경교종, 상피세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 뇌수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예는 바이러스성 폐렴 및 기관지 폐렴에 관한 것이다.

[0099] 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시되는 조성물은 바이러스성 감염에 걸린 개체의 치료, 바이러스 연관 증상의 감소 또는 개시 예방에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물은 개체에서 바이러스의 전염을 감소시키고 바이러스 복제를 감소시키기 위하여(예를 들어, 인플루엔자 또는 개체로부터 개체로 전염되는 다른 질환) 바이러스성 감염에 걸린 개체를 치료하는데 이용될 수 있다.

[0100] 또 다른 예시적인 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 조성물은 개체에서 염증 및 요산 결정의 생성을 감소시키기 위하여 개체에서 통풍을 치료하는데 이용될 수 있다. 이를 위하여, 통풍성 관절염 모델은 통풍의 염증에 있어서 IL-1 $\beta$ 의 역할에 근거하여 사용될 수 있다(상업적으로 입수가 가능한 제형을 사용하여 이미 제시된 모델). 이 모델에 있어서, MSU 및 C18 지방산이 혼합되어 마우스 모델로서 C57 블랙 6 마우스의 슬개골하 공간 내로 주입될 수 있다. 재조합 인간 Fc-AAT는 단독으로 마우스의 슬개골하 공간 내에 관절 내로(i.a.) 2 g이 주입되고 검사될 수 있다. 다른 시험군에서는, 마우스에 MSU/C18이 주입될 수 있다. 또 다른 마우스 세트에 있어서는, MSU/C18과 함께 본 발명에 개시된 조성물의 조합이 주입될 수 있다. 그런 다음, 마우스의 무릎은 혈장 유래 AAT를 처리한 모델에 있어서 수행한 바와 같이 염증에 대해 검사할 수 있다. 한 실시예에 있어서, 활액막을 침윤하는 세포수가 확인되었다.

[0102] 다양한 펩티드들의 구조체

[0103] 본 명세서에 있어서 구현예들은 재조합 AAT 또는 AAT로부터 유래된 하나 이상의 카르복시 말단 펩티드(예를 들어, AAT의 마지막 80개 아미노산에서 발견되는 AAT의 카르복시 말단 펩티드 또는 AAT의 마지막 36개 아미노산에서 발견되는 AAT의 카르복시 말단 펩티드 등)를 갖는 재조합체의 제조 및 용도를 제공한다. 이러한 구현예에 따르면, 융합 폴리펩티드는 예를 들어, 상기 펩티드의 반감기를 증가시키기 위하여 면역 분자에 연결하여 제조할 수 있고 및/또는 면역 분자가 결합된 것들을 통해 추가로 상기 융합 폴리펩티드를 보내기 위하여 면역 분자가 사용된다. 본 명세서에서 설계되는 구조체는 상업적으로 입수가 가능한 제형만큼 활성적이고, 예를 들어, 항염증 활성과 같은 특정 활성에 있어서는 상업적인 제형보다 더욱 활성적일 수 있다.

[0104] 본 발명의 한 구현예에 있어서, 조성물은 예를 들어, AAT에 대응하는 카르복시 말단 아미노산 펩티드를 포함하는 일련의 펩티드 및 이의 유도체의 투여와 같은 AAT 요법을 필요로 하는 개체(예를 들어, 포유동물 유래 AAT 치료 또는 보충)의 치료용 구조체를 포함할 수 있다. 이러한 펩티드들은, 융합 구조체의 일부분인 FVFLM(서열번호 2), FVFAM(서열번호 3), FVALM(서열번호 4), FVFLA(서열번호 5), FLVFI(서열번호 6), FLMI(서열번호 7), FLFLV(서열번호 8), FLFVV(서열번호 9), FLFLI(서열번호 10), FLFFI(서열번호 11), FLMMI(서열번호 12), FMLLI(서열번호 13), FIIMI(서열번호 14), FLFCI(서열번호 15), FLFAV(서열번호 16), FVYLI(서열번호 17), FAFLM(서열번호 18), AVFLM(서열번호 19), 및 이의 임의의 조합을 포함하는, 다섯 개의 펩티드(pentapeptides)를 포함할 수 있다.

[0105] 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에 구조체, 약학적 조성물 및 방법에 있어서의 용도로 고려되는 AAT 펩티드들은 또한 상기 카르복시 말단의 아미노산과 연결된 서열번호 1 내지 서열번호 33의 임의의 및 모든 특정 AAT 펩티드들(394개 아미노산인 자연적으로 발생하는 AAT, 가장 흔한 형태는 M1, M2, M3 등의 아형을 갖는 M형이고, 이는 또한 본 명세서에서 고려된다)을 포함하는 것을 의미한다. 항염증 활성 및/또는 면역 조절 활성을 소유하는, 모든 AAT 폴리펩티드들은 본 명세서에 개시된 방법에서의 용도로 고려된다. 315~394 범위의 아미노산, 325~384, 358~394, 340~380 등 범위의 아미노산과 같은, AAT 또는 AAT 유사 활성을 자극하는 연속적인 아미노산의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 또한, 카르복시 말단의 5-머(mer), 10-머, 15-머, 20-머, 25-머, 30-머, 35-머 등과 같은 연속적인 아미노산의 조합이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 314~394로부터의 5-머, 10-머, 15-머, 20-머의 연속적인 아미노산의 임의의 조합이 본 명세서에서 고려되는 구조체의 생성 또는 정제에 사용될 수 있다.

[0106] 어떤 구현예는, IgG 또는 이의 단편에 대한, 전체 AAT 분자(예를 들어, 서열번호 1 내지 33) 또는 AAT의 카르복시 말단 아미노산 부위로부터 유래된 펩티드 분자의 연결을 포함하는 재조합 융합 폴리펩티드 또는 단백질의 제조에 관한 것이다. AAT의 하나의 흔한 형태는 서열번호 33으로 나타난다. 본 명세서에서 고려되는 하나의 구조체는 서열번호 32(예를 들어, 전체 AAT, 면역글로불린 분자의 리더 서열 및 Fc 부분) 및 서열번호 48(링커를 갖는 전체 AAT 및 면역글로불린 분자의 Fc 부분)로서 참조된다. 이러한 구조체는 본 명세서에 개시된 조성물에서 이량체로서 또는 단량체 형태로서 사용될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 약학적으로 허용가능한 조성물은 Fc-AAT의 이량체 또는 Fc-AAT의 단량체 또는 Fc로부터 절단된 AAT 또는 이의 조합, 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 또한, 힌지 영역(hinge region)의 유연성을 감소시키고 신규한 Fc-AAT 분자를 제조하기 위하여 점돌연변이가 상기 Fc 부위에서 만들어질 수 있다.

[0107] 서열번호 33:  
EDPQGDAQAQKTDTSHTDQDHPFNKIPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTIEPAQIHEGFQELLRT  
LNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFKFLVDKLYHSEAFVTNFGDTEEAQINDYVEKGTQGIIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKGKWERPFVVKDTEE



EDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNTAIFFLPDEGKLQHLNELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTDLKSVLGQLGITKVSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAULTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

- [0108] 다른 구현예에 있어서, AAT 프로테아제 결합 도메인은 상기 분자의 프로테아제 기능을 감소 또는 제거하고 엘라스타제 활성을 억제하지 않기 위하여 돌연변이될 수 있고; 이러한 분자들은 본 명세서에 제시된 임의의 구조체에 사용될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 돌연변이된 AAT는 본 명세서에 개시된 방법들에 의해 AAT 구조체를 제조하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 돌연변이된 분자(예를 들어, 감소 되었거나 또는 근본적으로 프로테아제 활성이 없는)는 그것의 항염증 효과 및/또는 면역조절 효과를 유지하고 AAT 요법을 필요로 하는 개체에 있어서 항염증 분자로서 사용될 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 자연적으로 발생하는 AAT의 카르복시 말단의 마지막 80개 아미노산으로 일컫는 것뿐만 아니라 AAT의 비프로테아제 결합 부위도 인지할 것이다.
- [0109] 상기 언급된 각각의 방법에 있어서,  $\alpha$ 1-안티트립신 또는 이의 카르복시 말단 펩티드 유도체는 본 발명에 조성물에서의 용도가 고려된다. 이러한 펩티드 유도체들은 이에 한정되지 않으나 AAT의 마지막 80개 카르복시 말단 유래 아미노산을 포함하는 아미노산 펩티드, GITKVSNGA(서열번호 20), DLSGVTEEAP(서열번호 21), LKLSKAVHKA(서열번호 22), VLTIDEKGTE(서열번호 23), AAGAMFLEAI(서열번호 24), PMSIPPEVKF(서열번호 25), NKPFVFLMIE(서열번호 26), QNTKSPLFMG(서열번호 27), KVVNPTQK(서열번호 28), LEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLM(서열번호 29); 및 LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF(서열번호 30), GADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAULTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK(서열번호 31), 서열번호 34 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 상기 AAT의 카르복시 말단 펩티드는 서열번호 33으로 확인되는 자연적으로 발생하는 M형 아미노산 서열과 80%, 또는 85%, 또는 90% 이상, 또는 95%, 또는 99% 동일하다. 어떤 구현예에 있어서, 약 2, 약 3, 또는 약 4, 또는 약 5개 아미노산이 M형 서열의 카르복시 말단으로부터의 80머와 다를 수 있다(예를 들어, 다양한 점돌연변이).
- [0110] 어떤 구현예는 서열번호 32 내지 서열번호 48의 구조체의 조성물을 포함한다. 이러한 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.
- [0111] 어떤 구현예에 있어서, SEC 수용체에 결합할 수 있는 재조합 AAT 또는 AAT 유래 카르복시 말단 펩티드의 조성물 또는 AAT 유사 활성을 갖는 조성물이 이를 필요로 하는 개체에 투여될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같이 상기 AAT의 카르복시 말단 부위는 서열번호 31 또는 서열번호 33 또는 다른 인간 AAT 분자 또는 다른 자연적으로 발생하는 AAT 분자의 마지막 80개 아미노산을 포함한다. 다른 구현예에 있어서, AAT로부터 유래된 펩티드는 AAT 분자의 5-머, 10-머, 20-머, 25-머, 30-머, 35-머, 40-머, 50-머, 및 80-머까지 포함할 수 있고 상기 고려되는 임의의 펩티드는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성이 없고, AAT의 카르복시 말단으로부터 유래되며 사고 또는 다른 이유에 의해 방사선을 받거나 많은 양의 방사선에 노출된 개체의 치료에 사용될 수 있다.
- [0112] 한 구현예에 있어서, 구조체는 SEC 수용체와 맞물리거나 연결된 화합물을 포함할 수 있다. 상기 언급된 일부 방법에 있어서, 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 AAT-돌연변이체 또는 AAT 유래 펩티드(예를 들어, 포유동물 유래)는 상기 조성물 내에서의 용도 및 AAT에 대응하는 카르복시 말단 아미노산 펩티드를 포함하는 일련의 펩티드를 포함할 수 있는 본 발명의 용도로 고려된다. 또한, 5-머 또는 10-머 또는 20-머 또는 30-머 또는 그 이상의 아미노산의 조합이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 5-머 또는 10-머 또는 20-머 등은 서열번호 1로서 나타난 자연적으로 발생하는 AAT의 315 아미노산에서 시작하여 394 아미노산에서 끝나는 연속적인 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 것과 같이, 카르복시 끝에 대한 서열의 뒤쪽 절반을 카르복시 말단이라고 나타낸다. 어떤 구현예에 있어서, 상기 카르복시 말단으로부터 뒤로 향하는 상기 AAT의 카르복시 도메인은 상이한 중간에서 가장 보존된 아미노산이고 AAT의 프로테아제 결합 도메인에 참여하지 않는 것으로 확인된다. 또한, 다른 구현예에 있어서, AAT 프로테아제 결합 도메인은 상기 분자의 프로테아제 기능을 감소 또는 제거하기 위하여 돌연변이될 수 있고, 이 분자는 본 명세서에서 고려되는 임의의 조성물에 사용될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 돌연변이된 AAT 관련 분자는 그것의 항염증 및/또는 면역조절 효과가 유지될 수 있다. 또한 상기 카르복시 도메인은 다른 AAT 활성을 갖는 비프로테아제 결합 도메인이라는 것이 본 명세서에서 고려된다. 본 기술분야의 기술자는 AAT의 비프로테아제 결합 도메인을 인지할 것이다.
- [0113] 상기 언급된 각각의 방법에 있어서, 본 명세서에 조성물은 AAT의 카르복시 말단으로부터 유래된 펩티드를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 상기 방법 및 조성물에서 사용되는 AAT 관련 분자는, 이에 한정되지 않으나, 서열번호 1, 자연적으로 발생하는 AAT(혈청으로부터 분리된 AAT의 약 90%를 구성하는 394 아미노산 길이의 분자), 다른 AAT M형 또는 다른 AAT 분자의 조성물을 포함할 수 있다.
- [0114] 본 명세서에서 유용한, 본 명세서에 개시된 융합 분자의 재조합체와 비교 및/또는 조정을 위한 상업적으로 입수

가능한 제형은 Aralast™(Baxter), Zemaira™(Aventis Behring), Prolastin™ 또는 ProlastinC™(Talecris), Aprotonin™ 또는 Trasylol™(Bayer Pharmaceutical Corporation), Ulinistatin™(Ono Pharmaceuticals, Inc.), 및 흡입 및/또는 주사용 AAT(Kamada, Ltd., Israel), 또는 임의의 다른 상업적으로 입수가능한 AAT 조성물 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0115] 다른 구현에는 인간 AAT의 돌연변이체에 관한 것이고 상기 돌연변이체는 증가된 항염증 활성을 갖는다. 돌연변이체 제조를 위해 본 기술분야에 공지된 임의의 방법이 고려된다. 일부 구현에는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 hAAT를 제조하기 위해 위치 선택적 돌연변이의 사용을 포함한다(실시예 부분 및 pEF-hAAT 참조). 일부 구현예에 있어서, 조성물은 돌연변이된 인간 알파-1 안티트립신(hAAT)을 갖는 약학적 조성물일 수 있고 상기 AAT는 AAT의 반응 중심루프(RCL) 내 AAT의 프로테아제 결합 부위에 하나 이상의 점돌연변이를 갖는 AAT를 포함한다. 이러한 하나 이상의 점돌연변이는 대조군 인간 AAT에 비해 상기 AAT의 세린 프로테아제 억제제 활성을 현저하게 감소 또는 제거할 수 있다. 다른 방법은 세린 프로테아제 억제제 활성을 제거하거나 급격하게 감소시키기 위하여 hAAT의 가열, 또는 상기 RCL내 357 부위에 프롤린이 시스테인 잔기로 변형된 RCL 돌연변이체와 같은 또 다른 돌연변이체의 제조와 같이 다른 파괴 방법에 의한 hAAT의 세린 프로테아제 억제 부위의 파괴를 포함한다. 어떤 구현예에 있어서, 융합 분자는 상기 RCL내 하나 이상의 아미노산에서(예를 들어, 천연 AAT의 355~363 아미노산) 하나 이상의 점돌연변이를 갖는 AAT 돌연변이체에 대한 Fc(예를 들어, IgG1, 2, 3 또는 4)의 연결을 포함할 수 있고, 상기 AAT 돌연변이체는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않고 상기 RCL은 온전하게 남아있다.

[0117] 약학적 조성물

[0118] 본 명세서에 있어서 구현에는 생물학적으로 호환가능하고 생체 내 약학적 투여에 적합한 형태로 개체에 대한 조성물의 투여를 제공한다. "생물학적으로 호환가능하고 생체 내 투여에 적합한 형태"는 활성제의 치료학적 효과가 임의의 독성 효과를 능가하는 것에 대해 투여되는 활성제의 형태(예를 들어, 상기 구현예의 약학적 화합물, 단백질, 유전자, 항체 등)를 의미한다. 상기 치료학적 조성물의 치료학적 유효량의 투여는 원하는 결과를 얻기 위해 필요한 시간의 기간 동안 용량에 있어서, 효과적인 양으로서 결정된다. 예를 들어, 화합물의 치료학적 유효량은 개인의 질환 상태, 나이, 성별 및 체중, 및 개인에 있어서 원하는 반응을 유도하기 위한 항체의 능력과 같은 인자들에 따라 다를 수 있다. 용량 체계는 최적 치료학적 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다.

[0119] AAT 또는 이의 펩티드 단편, 또는 이의 유사체, 또는 이의 돌연변이체, 또는 이의 기능적 유도체(예를 들어, 일부 구현예의 약학적 화합물, 단백질, 펩티드)를 포함하는 약학적 조성물은, 예를 들어, 피하내, 정맥내, 심장내, 동맥내, 근육내, 경구 투여에 의해, 흡입에 의해, 경피 투여, 질내 투여, 국소 투여, 비강내 또는 직장 투여에 의해, 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 효소, 산 및 화합물을 비활성 시키는 다른 자연적 조건에 의해 분해되는 것으로부터 화합물을 보호하기 위하여 물질 내에 코팅될 수 있다. 바람직한 구현예에 있어서, 상기 화합물은 경구로 투여될 수 있다. 또 다른 바람직한 구현예에 있어서, 상기 화합물은 정맥내로 투여될 수 있다. 하나의 특정 구현예에 있어서, 상기 조성물은 흡입과 같이, 비강내로 투여될 수 있다.

[0120] 본 명세서에 개시된 일부 구현에는 암에 걸렸거나 또는 치료된 것으로 의심되는 개체에 하나 이상의 화학 치료제(예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물과 함께)를 전달하기 위한 스텐트 또는 카테터의 용도에 관한 것이다. 하나 이상의 약제를 종양 부위로 직접 전달할 수 있는 임의의 스텐트 또는 본 기술분야에 공지된 다른 전달 방법이 고려된다. 이러한 전달 기술은 단독으로 또는 다른 전달 방법과 병용하여 사용될 수 있다.

[0121] 화합물(예를 들어, 펩티드, 단백질, 융합 단백질 또는 이의 혼합물)은 적합한 담체 또는 희석제 내에서, 효소 억제제와 함께 투여되거나 또는 리포솜과 같은 적합한 담체 내에서 개체에 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 상기 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 식염수 및 수성 완충액과 같은 희석제를 포함하는 것을 의미한다. 상기 화합물의 비활성화를 방지하기 위한 물질로 상기 화합물을 코팅하거나, 또는 상기 화합물과 함께 투여하는 것이 필요할 것이다. 또한 활성제가 비경구적으로 또는 복강내로 투여될 수 있다. 또한 분산제가 글리세롤, 폴리에틸렌글리콜액, 및 이의 혼합물 및 오일내에서 제조될 수 있다. 보관 및 사용의 통상적인 조건하에서, 이러한 제조물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 방부제를 포함할 수 있다.

[0122] 주사적 용도에 적절한 약학적 조성물은 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 살균

주사가능액 또는 분산제의 즉석 제조를 위하여 살균 수용액(수용성) 또는 분산제 및 살균 분말이 사용될 수 있다.

[0123] 살균 주사가능액은 필요에 따라, 상기에 열거된 성분 중의 하나 또는 조합을 갖는 적합한 용매 내에서 필요량으로 활성 화합물을 혼입함으로써 제조될 수 있고, 그 다음 여과 살균한다.

[0124] 수성 조성물은 유효한 양의 치료학적 화합물, 펩티드, 에피토픽 코어 부위(epitopic core region), 자극제, 억제제 등을 포함할 수 있고, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 수성 매질에서 용해되거나 분산된다. 본 명세서에 개시된 화합물 및 생물학적 물질들은 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 정제될 수 있다. 유리 염기 또는 약학적으로 허용가능한 염으로서 상기 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은, 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다.

[0125] 제형에 따라, 용액은 투여 제형과 호환가능한 방식으로 그리고 치료학적 유효량으로 투여될 것이다. 상기 제형은 상기 기재된 주사가능액의 형태와 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여된다. 또한 서방형 캡슐, 점진적으로 방출되는 미세입자 등이 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 이러한 특정 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적절하다.

[0126] 상기 활성 치료제는 용량당 약 0.0001 내지 1.0 mg, 또는 약 0.001 내지 0.1 mg, 또는 약 0.1 내지 1.0 또는 약 1 내지 10 g으로 포함하기 위하여 혼합물 내에 제형화될 수 있다. 또한 단일 투여 또는 다중 투여가 매일, 격주, 매주, 격월 등과 같이 미리 결정된 조건에 대하여 적합한 일정에 따라 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 부작용을 조절하는데 효과적인, 양 및 빈도로, 투여될 수 있다. 정확한 용량 및 치료기간은 공지된 검사 프로토콜을 사용하거나 또는 본 기술분야에 공지된 모델 시스템에서 상기 조성물을 검사하고 그것으로부터 추정함으로써 경험적으로 결정될 수 있다. 또한 용량은 증상의 중증도에 따라 다를 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 매일 또는 매주 개체에 도입되는 상기 조성물 범위는 10과 75mg/kg 사이일 수 있다. 또한  $\alpha 1$ -안티트립신 또는 펩티드와 유사한 활성들을 갖는 치료학적 유효량의  $\alpha 1$ -안티트립신, 펩티드, 또는 약제는 물농도로 측정될 수 있고 약 1 nM에서 약 2 mM 사이의 범위일 수 있다.

[0127] 또 다른 구현예에 있어서, 비강액 또는 스프레이, 에어로졸 또는 흡입제는 상기 관심 화합물을 전달하기 위하여 사용될 수 있다. 다른 방식의 투여를 위해 적절한 추가적인 제형은 좌제 및 폐서리를 포함할 수 있다. 또한 직장 폐서리 또는 좌제가 사용될 수 있다. 일반적으로, 좌제에 대하여, 통상적인 결합제 및 담체는, 예를 들면, 폴리알킬렌글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함할 수 있으며, 이러한 좌제는 0.5 내지 10%, 바람직하게는 1%~2%의 범위로 활성 성분을 포함하는 혼합물로부터 형성될 수 있다.

[0128] 리포솜 또는 미세입자는 치료학적 전달계로서 사용될 수 있고 공지된 실험 기술에 따라 제조될 수 있다. 또한, 전술한 바와 같이 제조된 건조된 지질 또는 동결건조된 리포솜은 활성제(예를 들어, 핵산, 펩티드, 단백질 또는 화학제)의 용액, 및 본 기술분야의 기술자에게 공지된 적절한 용매를 사용하여 적절한 농도로 희석된 용액에서 재구성될 수 있다. 캡슐화된 활성제의 양은 표준 방법에 따라 결정될 수 있다.

[0129] 일부 구현예에 있어서, 약학적 구조체 조성물은 개체를 치료하기 위한 단일 치료 용량, 급성 방법 또는 만성 방법에 사용될 수 있는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않지만 다른  $\alpha 1$ -안티트립신 활성을 갖는 AAT 분자 또는 이의 유사체로부터 유래된 구조체에 관한 것이다. 예를 들어, 본 명세서에서 고려되는 상기 융합 폴리펩티드는 현저한 프로테아제 억제 활성을 갖지 않는 융합 폴리펩티드일 수 있다.

[0130] 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 조성물은 경구로, 전신적으로, 이식을 통해, 점진적으로 방출되는 또는 서방형 조성물(예를 들어, 겔, 미세입자 등), 정맥내, 국소, 경막내, 피하, 흡입에 의해, 비강, 또는 본 기술분야에 공지된 다른 방법 또는 이들의 조합에 의하여 투여될 수 있다.

#### [0132] 단백질 및 구조체 발현

[0133] 표적 유전자 또는 유전자의 부분이 결정되면, 상기 유전자는 적합한 발현 시스템 내로 삽입될 수 있다. 상기 유전자는 폴리펩티드 산물의 대량 생성을 위하여 임의의 개수의 상이한 제조용 DNA 발현 시스템으로 발현될 수 있고, 그런 다음 정제되고 본 명세서에 개시되는 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0134] 본 기술분야의 기술자에게 공지된 발현 시스템의 예로는 *E. coli*와 같은 박테리아, *Pichia pastoris*와 같은 효모, 바쿠로바이러스, 및 Cos 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 발현 시스템을 포함한다. 완전한 유전자가 발현될



수 있거나, 대안적으로는, 폴리펩티드의 유전자 암호화 부분의 단편이 제조될 수 있다.

- [0135] 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 AAT 유전자 또는 유전자 단편이 표준 서브클로닝 기술에 의해 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. *E. coli* 발현 벡터는 단백질의 신속한 친화성 정제를 할 수 있는, 융합 단백질로서 재조합 폴리펩티드를 제조하는데 사용될 수 있다. 이러한 융합 단백질 발현 시스템의 예로는 글루타치온 S-트랜스퍼라제 시스템(Pharmacia, Piscataway, NJ), 말토스 결합 단백질 시스템(NEB, Beverley, MA), FLAG 시스템(ABI, New Haven, CT), 및 6xHis 시스템(Qiagen, Chats worth, CA)이다.
- [0136] 또한 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체가 제조될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 집단 내 자연적 변이 때문에 발생하거나 다른 종에서 발견되는 동족체일 수 있는 상기 폴리펩티드의 소수 서열 변이체일 수 있다. 또한 그들은 자연적으로 발생하지 않으나 상기 폴리펩티드의 천연 형태와 상호작용하는 면역 반응과 유사하게 기능 및/또는 유도하는 충분히 유사한 서열일 수 있다. 서열 변이체는 막관통 서열을 제거하기 위하여 본 명세서에 기재된 것들과 같은 위치 선택적 돌연변이의 표준 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0137] 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 치환, 삽입 또는 결실 변이체일 수 있다. 결실 변이체는 기능 또는 면역원성 활성화에 필수적이지 않은 천연 단백질 중의 하나 이상의 잔기가 결여되고, 막관통 서열이 결여된 변이체에 의해 예시된다.
- [0138] 원핵 또는 진핵 시스템에서의 발현을 위한 DNA 분절(들)의 조작은 재조합 발현에 있어서 본 기술분야의 기술자에게 일반적으로 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 이는 사실상 임의의 발현 시스템이 청구된 핵산 서열의 발현에 이용될 수 있다고 여겨진다.
- [0139] 본 명세서에서 사용되는 상기 용어 "조작" 및 "재조합" 세포는 인간의 손을 통해 도입된 cDNA 또는 유전자와 같이, 외인성 DNA 분절 또는 유전자가 유입된 세포를 의미한다. 따라서, 조작된 세포는 재조합으로 도입된 외인성 DNA 분절 또는 유전자를 포함하지 않는 자연적으로 발생하는 세포와 구별된다. 재조합 세포는 cDNA 또는 게놈 유전자를 갖는 것들을 포함하고, 또한 특별히 도입된 유전자와 자연적으로 연결되지 않은 이중 프로모터에 인접하여 위치한 유전자들을 포함한다.
- [0140] 단백질 및 펩티드를 암호화하는 재조합체를 발현하기 위하여, 돌연변이체 또는 야생형은 중 하나가, 본 명세서에 일부 구현예에 따라 하나 이상의 프로모터의 조절하에서, 또는 동작가능하게 연결된 청구된 단리된 핵산 중 하나를 포함하는 발현 벡터를 제조할 수 있다. 프로모터의 "조절하에서" 암호화 서열을 가져오기 위하여, 전사 리딩 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단 부분은 일반적으로 선택된 프로모터의 약 1과 약 50 뉴클레오타이드 "하류(downstream)"(즉, 3') 사이이다. 상기 "상류(upstream)" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 재조합 단백질의 발현을 촉진한다. 이는 본 맥락에서 "재조합 발현"의 의미이다.
- [0141] 많은 표준 기술은 다양한 숙주 발현 시스템의 단백질 또는 펩티드 발현을 달성하기 위하여 적합한 핵산 및 전사/번역 조절 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 발현 가능한 세포 유형은, 이에 한정되지 않으나, 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 *E. coli* 및 *B. subtilis*와 같은, 박테리아를 포함한다.
- [0142] 원핵세포 숙주의 어떤 예로는 *E. coli* W3110(F<sup>-</sup>, 람다<sup>-</sup>, 독립영양, ATCC No. 273325)뿐만 아니라 *E. coli* 스트레인 RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X1776(ATCC No. 31537); *Bacillus subtilis*와 같은 바실러스들; 및 다른 *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, 및 다양한 *Pseudomonas* 종과 같은 다른 장내세균이다.
- [0143] 일반적으로, 숙주세포와 호환가능한 종들로부터 유래된 레플리콘 및 조절 서열을 포함하는 플라스미드 벡터가 이러한 숙주와 관련되어 사용된다. 상기 벡터는 대개는 형질전환된 세포에서 표현형적 선별을 제공할 수 있는 표시 서열뿐만 아니라 복제 부위를 갖는다. 예를 들어, *E. coli*는 주로 pBR322, *E. coli* 종들로부터 유래된 플라스미드를 사용하여 형질전환된다. pBR322는 암피실린 및 테트라사이클린 저항성에 대한 유전자를 포함하고 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 쉬운 방법을 제공한다. 또한 상기 pBR 플라스미드, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 파아지가 포함되어야 하고, 또는 그 자신의 단백질의 발현을 위해 미생물에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 포함하도록 변형된다.
- [0144] 또한, 숙주 미생물과 호환가능한 레플리콘 및 조절 서열을 포함하는 파아지 벡터는 이러한 숙주와 관련되어 형질전환 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 파아지 람다 GEM™-11은 *E. coli* LE392와 같은, 숙주세포를 형질전환하는데 사용될 수 있는 재조합 파아지 벡터를 만드는데 이용될 수 있다.

- [0145] 추가로 유용한 벡터는, 추후 정제 및 분리 또는 절단을 위한 글루타치온 S-트랜스퍼라제(GST) 가용성 융합 단백질 생성에 사용하기 위하여, pIN 벡터(Inouye et al, 1985); 및 pGEX 벡터를 포함한다. 다른 적절한 융합 단백질은  $\beta$ -갈락토시다제, 유비퀴틴 등을 갖는 것들이다.
- [0146] 재조합 DNA 구조에서 가장 흔히 사용되는 프로모터는  $\beta$ -락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 이들이 가장 흔히 사용되지만, 다른 미생물 프로모터가 발견되고 이용되고 있고, 그들의 뉴클레오타이드 서열에 관한 세부 사항이 공개되고 있으며, 본 기술분야의 기술자는 플라스미드 벡터와 그들을 기능적으로 연결할 수 있게 한다.
- [0147] *Saccharomyces*에서 발현을 위하여, 예를 들어, 플라스미드 YRp7이 흔히 사용된다(Stinchcomb et al, 1979; Kingsman et al, 1979; Tschemper et al, 1980). 이 플라스미드는, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1(Jones, 1977)와 같은, 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이 스트레인에 대한 선택 마커를 제공하는 *trp1* 유전자를 이미 포함한다. 효모 숙주 세포 계능의 특성으로서 *trp1* 손상의 존재는 트립토판의 부재하에서 성장에 의한 형질전환 검출을 위한 유효한 환경을 제공한다.
- [0148] 효모 세포내 적절한 촉진 서열은, 엔올라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 디카복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이성질화효소, 3-포스포글리세레이트 무타아제, 피루베이트 키나제, 트리오세포스페이트 이성질화효소, 포스포글루코스 이성질화효소, 및 글루코키나제와 같은, 3-포스포글리세레이트 키나제(Hitzeman et al, 1980) 또는 다른 해당작용 효소(Hess et al, 1968; Holland et al, 1978)에 대한 프로모터를 포함한다. 구조화하는데 적절한 발현 플라스미드에 있어서, mRNA의 폴리아데닐화 및 종결을 제공하기 위하여 이러한 유전자에 연결된 종결 서열은 발현되기를 원하는 서열의 발현 벡터 3'으로 또한 연결될 수 있다.
- [0149] 다른 적절한 프로모터, 이는 성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가적 장점을 갖고, 알코올 디하이드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산성 포스타파제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 및 전술한 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 맡고 있는 효소에 대한 프로모터 부위를 포함한다.
- [0150] 미생물과 더불어, 다세포 생물로부터 유래된 세포의 배양은 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 원칙적으로, 임의의 이러한 세포 배양은, 척추동물 또는 무척추동물로부터 실시 가능하다. 포유동물 세포와 더불어, 이들은 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 및 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus, CaMV); 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV))로 감염된 식물 세포 시스템 또는 하나 이상의 암호화 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 것을 포함한다.
- [0151] 유용한 곤충 시스템에 있어서, *Autographa californica* 핵다면체 바이러스(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV)는 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 사용된다. 상기 바이러스는 *Spodoptera frugiperda* 세포에서 성장한다. 단리된 핵산 암호화 부위는 상기 바이러스의 비필수 부위(예를 들어 상기 polyhedrin 유전자)내로 복제되고 AcNPV 프로모터(예를 들어 상기 polyhedrin 프로모터)의 조절하에 놓인다. 상기 암호화 서열의 성공적인 삽입은 상기 polyhedrin 유전자의 비활성 및 비폐색 재조합 바이러스(즉, polyhedrin 유전자에 의해 암호화된 단백질성 코트가 결핍된 바이러스)의 생산을 야기한다. 그런 다음 이러한 재조합 바이러스들은 삽입된 유전자가 발현되는 *Spodoptera frugiperda* 세포를 감염시키는데 사용된다(예를 들어, 미국 특허번호 4,215,051(Smith)).
- [0152] 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예로는 VERO 및 헬라세포, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포주, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주이다. 또한, 숙주 세포주는 삽입된 서열의 발현을 조절하고, 원하는 특정 방식으로 유전자 산물을 변형하고 처리하는 것이 선택될 수 있다. 이러한 단백질 산물의 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 처리(예를 들어, 절단)는 암호화된 단백질의 기능에 중요할 수 있다.
- [0153] 상이한 숙주 세포는 단백질의 번역후 처리 및 변형을 위한 특정 및 특정 메커니즘을 갖는다. 적합한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 처리를 위해 선택될 수 있다. 포유동물 세포에서 사용하기 위한 발현 벡터는 대개 임의의 필요한 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결 서열과 함께, 하나의 복제원점(필요에 따라), 발현되는 유전자의 앞쪽에 위치한 프로모터를 포함한다. 상기 복제원점은, SV40 또는 다른 바이러스성(예를 들어, 폴리오마, 아데노, VSV, BPV) 재료로부터 유래될 수 있는 것과 같은, 외인성 원점을 포함하기 위한 벡터의 구조에 의해, 또는 숙주세포 염색체 복제 메커니즘에 의해 제공될 수 있는 것을 제공할 수 있다. 상기 벡터가 숙주 세포 염색체 내로 삽입된다면, 후자가 대체로 충분

하다.

- [0154] 상기 프로모터는 포유동물 세포(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터)의 게놈으로부터 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래될 수 있다. 또한, 원하는 유전자 서열과 정상적으로 연결된 프로모터 또는 조절 서열을 이용하는 것 또한 가능하고, 필요할 수 있으며, 이러한 조절 서열은 숙주 세포 시스템과 호환가능하다.
- [0155] 많은 바이러스 기반 발현 시스템이 본 명세서에서 고려되는 분자를 제조하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 흔히 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 가장 흔하게는 시미안 바이러스(Simian Virus 40, SV40)로부터 유래 된다. SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 모두 상기 SV40 바이러스 복제원점을 또한 포함하는 단편으로서 상기 바이러스로부터 용이하게 수득할 수 있기 때문에 특히 유용하다. 작거나 또는 큰 SV40 단편이 또한 사용될 수 있고, 바이러스 복제원점에 위치한 Hind III 부위로부터 Bgl I 부위까지 연장된 약 250 bp 서열이 포함된다.
- [0156] 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 어떤 경우에 있어서, 상기 암호 서열은 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 셋으로 나뉘어진 리더 서열에 연결될 수 있다. 이 키메라 유전자는 시험관 내에서 또는 생체 내에서의 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈(예를 들어, 부위 E1 또는 E3)의 비필수 부위의 삽입은 감염된 숙주에서 생존은 하지만 침습 및 단백질 발현은 할 수 없는 재조합 바이러스를 야기할 것이다.
- [0157] 또한 특정 개시 서열이 청구된 단리된 핵산 암호 서열의 효과적인 번역을 위해 필요할 것이다. 이러한 신호는 ATG 개시 코돈과 인접 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는, 외인성 번역 조절 신호가 추가로 제공될 필요가 있다. 본 기술분야의 기술자는 용이하게 이를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다. 전체 삽입의 번역을 보장하기 위하여 개시 코돈은 필요한 암호 서열의 리딩 프레임과 같이 프레임(또는 같은 위상에서) 해야 한다는 것이 잘 공지되어 있다. 이러한 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성 모두, 다양한 기원일 수 있다. 발현의 효율은 적합한 전사 인핸서 요소 또는 전사 종결의 포함에 의해 향상될 수 있다.
- [0158] 어떤 구현예에 있어서, 진행 숙주 세포는 원하는 폴리펩티드를 발현할 수 있고, 대체로 그 목적을 위해 사용된다. 그들은 세포 내로, 바람직하게는 발현 카세트의 형태로, 본 명세서에 개시되는 DNA 분자의 도입에 의해 얻을 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 상기 발현 카세트는 상기 관심 숙주 세포의 게놈에 삽입되고, 이는 다양한 숙주 세포에서 상이한 위치에 있을 수 있으며, 선별은 이식 유전자가 적절한 위치에서 삽입된 클론을 위해 제공할 것이고, 발현 수준, 안정성 및 성장 특성 등에 대하여 원하는 특성을 갖는 숙주 세포 클론으로 이어진다. 표적 분자의 DNA를 포함하는 세포에 대한 선별은 본 기술분야의 기술자에 의해 공지된 통상적인 방법을 이용하여, 선별 마커 폴리펩티드에 대한 선택에 의해 수행될 수 있다.
- [0159] 숙주 세포는 본 기술분야의 기술자에게 공지된 표준 절차에 따라 선택되고 증식될 수 있는 안정한 클론 유래이다. 이러한 클론의 배양은 관심 폴리펩티드를 제조할 수 있다.
- [0160] 세포에서 발현되어야 하는 핵산의 도입은, 여러 방법 중 하나에 의해 행해질 수 있고, 이는 본 기술분야의 기술자에게 공지된 것이며, 또한 도입될 핵산의 형식에 따른다. 방법은, 이에 한정되지 않으나 형질감염, 감염, 주사, 형질전환 등을 포함할 수 있다. 관심 폴리펩티드를 발현하는 적절한 숙주 세포는 본 기술분야에 공지된 임의의 선별 과정에 의해 얻어질 수 있다.
- [0161] 어떤 구현예에 있어서, 관심 DNA 분자는 진행 숙주 세포의 게놈으로 삽입된다. 선별 마커 폴리펩티드의 존재에 대한 선별, 및 이에 따른 발현은, 세포의 초기 수득 동안에 수행될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 선별제는 선별 마커 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 선택에 충분한 농도에서 또는 낮은 농도에서, 배양하는 동안 시간 중 적어도 일부에 배양 배지에 존재한다. 어떤 구현예에 있어서, 선별제는 폴리펩티드가 발현될 때 생산 단계 동안 더 이상 배양 배지에 존재하지 않는다. 관심 폴리펩티드는 임의의 펩티드 또는 단백질일 수 있고, 단량체 단백질 또는 다중체 단백질(의 일부)(예를 들어, 이량체)일 수 있다. 다중체 단백질은 적어도 두 개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다.
- [0162] 어떤 측면에 있어서, 본 발명의 DNA 분자 또는 발현 카세트를 복수의 전구 세포로 도입하는 단계, 선별 조건하에서 상기 제조된 세포를 배양하는 단계 및 상기 관심 폴리펩티드를 생산하는 적어도 하나의 숙주 세포를 선별하는 단계를 포함하는, 관심 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0163] 또한 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 관심 폴리펩티드의 제조 방법이 제공된다.

세포 배양은 세포가 대사, 및/또는 성장 및/또는 분열 및/또는 관심 재조합 단백질의 생산을 하기 위해서 수행된다. 이는 본 기술분야에 잘 공지된 방법에 의해 수행될 수 있고, 이에 한정되지 않으나, 모든 세포에 영양분을 제공하는 단계를 포함한다. 배양은 비연속, 유가식, 관류 시스템과 같은 연속 시스템 등을 사용하여, 예를 들어 접시, 회전병 또는 생물반응기에서 수행될 수 있다. 세포 배양을 통한 재조합 단백질의 대규모(연속) 생산을 달성하기 위하여, 현탁액에서 성장 가능한 세포를 갖는 것이 본 기술분야에서 바람직하고, 동물 또는 인간 유래 혈청 또는 동물 또는 인간 유래 혈청 요소의 부재하에서 배양될 수 있는 세포를 갖는 것이 바람직하다.

[0164] 성장 또는 증식하는 세포(예를 들어, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973) 참조) 및 재조합 산물의 발현을 위한 조건은 본 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 일반적으로, 원리, 프로토콜 및 포유동물 세포 배양의 생산성을 극대화하기 위한 실용적인 기술은 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach(M. Butler, ed., IRL Press, 1991)에서 확인할 수 있다.

[0165] 어떤 구현예에 있어서, 발현된 단백질은 세포 또는 배양 배지 중 하나로부터 또는 둘 모두로부터 수득(단리)된다. 그런 다음, 본 기술분야에 일반적으로 공지된 방법으로, 공지된 방법, 예를 들어, 여과, 컬럼 크로마토그래피 등을 사용하여 추가로 정제될 수 있다.

[0166] 진핵 세포 발현에 있어서, 원래의 복제된 분절 내에 포함되지 않은 경우, 하나는 전사 단위 적합한 폴리아데닐화 부위(예를 들어, 5'-AATAAA-3') 내로 도입하는 것이 전형적으로 필요할 것이다. 전형적으로는, 폴리 A 삽입 부위는 전사 종결 전 위치에서 단백질의 종결 부위의 약 30 내지 2,000 뉴클레오티드 "하류"에 위치한다.

[0167] 재조합 단백질의 장기간, 고수율 생산을 위하여, 안정한 발현이 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질을 암호화하는 구조체를 안정적으로 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제원점을 포함하는 발현 벡터를 사용하기보다, 숙주 세포를 적합한 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결, 폴리아데닐화 부위, 등) 및 선별 마커로 조절되는 벡터로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포는 농축 배지에서 1~2일 동안 성장하도록 할 수 있고, 그런 다음 선별 배지로 전환된다. 재조합 플라스미드에서 선별 마커는 선별에 대한 저항력을 부여하고 세포가 안정적으로 자신의 염색체에 플라스미드를 삽입하고 세포주로 차례로 복제 및 확장될 수 있도록 하는 지점을 형성하기 위해 성장하도록 한다.

[0168] 많은 선별 시스템은, 이에 한정되지 않으나, 각각 tk, hgp<sup>r</sup>t 또는 ap<sup>r</sup>t 세포에, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제, 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제, 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 유전자를 포함한다. 또한, 항 대사물질 저항성은 메토타렉세이트에 대한 저항성을 부여하는, dhfr; 마이코페놀산에 대한 저항성을 부여하는, gpt; 아미노글리코사이드 G-418에 대한 저항성을 부여하는 neo 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 하이그로에 대한 선별 또는 본 기술분야에 공지된 임의의 다른 방법에 기초하여 사용될 수 있다.

[0169] 본 발명의 단리된 핵산은 예를 들어, 인간 전립선, 방광 또는 유방 세포에서 그것의 자연적 발현과 관련하여 또는 심지어 재조합 숙주 세포에서 다른 단백질의 발현과 관련하여 증가된 수준으로 발현되는, "과발현"될 수 있다는 것이 고려된다. 이러한 과발현은 이에 한정되지 않으나, 방사선-표지 및/또는 단백질 정제를 포함하는, 다양한 방법에 의해 평가될 수 있다. 그러나, 단순하고 직접적인 방법은, 예를 들어, 단일 단계 정제 과정과 관련된 것(예를 들어, 단백질 A 친화성), SDS-PAGE 및 단백질 염색 또는 웨스턴 블랏팅, 그 다음 그 결과로 생긴 겔 또는 블랏의 농도계 스캐닝과 같은, 정량 분석이 바람직하다. 상기 숙주 세포에 의해 생성된 다른 단백질과 관련하여 표적 단백질의 상대적인 존재도이고, 예를 들어, 본 명세서에서 고려되는 방법에 의해 겔 상에서 볼 수 있고 용이하게 단리가 가능한 것과 같이. 대조군에서의 수준과 비교하여 융합 단백질 또는 펩티드의 수준에 증가는 과발현을 나타낸다.

[0170] 본 명세서에서 제조된 구조체는 면역 분자(예를 들면, Fc 부분)를 사용하여 다양한 친화성 컬럼 또는 친화성 매트릭스(예를 들어, 단백질 A)를 사용하여 단리될 수 있다는 것이 고려된다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 구조체의 정제는 단백질 A 컬럼 또는 단백질 A 매트릭스 또는 이와 같은 것(예를 들어, Pierce, Bio-Rad 또는 다른 IgG 정제/단리 키트)의 사용을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에 개시된 구조체의 정제는 분해 등으로부터 항염증 또는 면역 조절 활성 또는 다른 AAT 관련 활성을 보존하기 위하여 최소 단계를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 본 명세서에서 고려되는 구조체의 정제는 단일 단계(예를 들어, Fc-AAT 분자의 단백질 A 컬럼 정제)를 사용할 수 있다(예를 들어 Kin-Ming et al. Protein Engineering vol.11 no.6 pp.495-500, 1998; expression/Fc/Fc-X/fusion protein; and diabody technologies 참조).

[0171] 그것에 가역적으로 결합할 수 있는(예를 들어, 이황화 또는 다른 결합을 통해) 임의의 단백질 또는 펩티드를 암



호화하는 핵산이 본 명세서에 개시되는 AAT 구조체를 제조하기 위해 사용될 수 있다는 것이 본 명세서에서 고려된다. 이러한 구조체는 감소된 기능 손실을 갖는 증가된 정제를 증가시키기 위하여 AAT의 더블릿 또는 이합체로서 사용할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 이러한 구조체는 치료학적 응용 또는 연구 목적으로 사용될 수 있는 이량체 분자로서 본 명세서에 개시된 조성물에 사용될 수 있다. 일부 이러한 구현예에 따르면, AAT 또는 카르복시 말단 단편에 연결된 면역 분자의 단편 또는 부분은 증가된 면역원성이 치료 목적을 위해 요구되지 않는 한 불활성 또는 실질적으로 비면역원성일 수 있다. 본 명세서에 기재된 구조체는 예를 들어, 어떤 전염증성 사이토카인의 존재를 감소시킴으로써 이로인 면역 또는 염증 효과를 유도하거나, 또는 해로운 면역 또는 염증 반응을 감소 또는 제거하는데 사용될 수 있다는 것이 고려된다.

[0173] 단리된 단백질

[0174] 어떤 구현예는 단리된 단백질, 및 생물학적으로 유효한 이의 펩티드와 관계가 있다. 한 구현예에 있어서, 천연 폴리펩티드는 표준 단백질 정제 기술을 사용한 적합한 정제 방식에 따라 세포 또는 조직 재료로부터 단리될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 천연 폴리펩티드는 세린 프로테아제 억제제 활성을 감소 또는 제거하기 위하여 돌연변이 되거나 그렇지 않으면 처리되고, 그런 다음 본 명세서에 기재된 구조체에 사용하기 위해 단리될 수 있다. 어떤 특정 구현예에 있어서, 세린 프로테아제 억제제 활성은 현저한 활성이 남아 있지 않은 것으로 감소된다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 명세서에서 고려되는 폴리펩티드는 주로 제조함 DNA 기술에 의해 제조된다. 제조함 발현에 대한 대체로, 폴리펩티드는 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물에서의 용도로 고려되는 임의의 상기 펩티드 또는 단백질 분자는 개체의 필요 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 사용하는 것에 따라 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖거나 또는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 조성물일 수 있다. 예를 들어, AAT 조성물은 세린 프로테아제 억제제 활성을 감소 또는 제거하기 위하여 처리될 수 있거나 또는 AAT 폴리펩티드는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성이 감소되거나 또는 없는 폴리펩티드로 단리될 수 있다. 그런 다음, 이러한 AAT 분자는 신속한 제조 및 정제를 위하여 본 명세서에 개시된 구조체에 사용될 수 있다.

[0175] "단리된" 또는 "정제된" 단백질 또는 이의 생물학적으로 활성적인 부분은 세포로부터(예를 들어, 클론으로부터) 세포 물질 또는 다른 오염 단백질들이 또는 이로부터 조직 재료들이 상당히 제거된 것이고 화학적으로 합성된 경우 상기 단백질이 유래되거나, 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 상당히 제거된다. 따라서, 세포 물질이 상당히 제거된 단백질은 이형 단백질(또한 본 명세서에서 "오염 단백질"로 나타낸다)을 약 30%, 20%, 10% 이상, 또는 5%(건조중량에 대하여) 미만으로 갖는 단백질의 제조를 포함한다. 상기 단백질 또는 이의 생물학적으로 활성적인 부분이 제조함으로 제조된 경우, 배양 배지의 상당한 제거도 바람직하다. 상기 단백질이 화학적 합성에 의해 제조된 경우, 화학적 전구체 또는 다른 화학 물질의 상당한 제거가 바람직하다. 예를 들어, 상기 단백질의 이러한 제조물은 관심 폴리펩티드보다 약 30%, 20%, 10% 이상, 5% 이상(건조중량에 대하여) 미만의 화학적 전구체 또는 화합물을 갖는다.

[0176] 어떤 구현예에 있어서, 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드는 펩티드 또는 단백질을 제조하기 위하여 본 기술분야에 공지된 임의의 구조체에 삽입될 수 있다. 이러한 펩티드는 AAT 또는 AAT 대립 유전자의 카르복시 말단의 마지막 80 아미노산의 일부 또는 전부에 대응하는 연속된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 유용한 단백질은 천연 대립 유전자 변이 또는 돌연변이 때문에 아미노산 서열에 차이는 있으나 카르복시 말단의 임의의 부분과 상당히 동일하고, 대응하는 자연적으로 발생하는 단백질의 펩티드의 기능적 활성을 유지한다. 이러한 폴리펩티드는 본 명세서에서 고려되는 임의의 구조체에 사용될 수 있다(예를 들어, 구조체에 연결된 면역 분자(Fc)).

[0177] 본 명세서에 개시되는 일부 조성물은 과도한 세린 프로테아제 활성에 의하여 전체 또는 부분적으로 야기된 생리적 증상의 치료에 있어서 치료제로서 사용될 수 있다. 또한, 생리학적 증상은 전체 또는 부분적으로 억제될 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 펩티드는 이의 유리 펩티드 구조체 또는 약학적으로 허용가능한 염으로서 조성물로 투여될 수 있다. 펩티드는 약학적 조성물로서 개체에 투여될 수 있고, 이는 대부분 경우에, 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 상기 펩티드 구조체 및/또는 이의 약학적 염을 포함할 수 있다.

[0178] 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적으로 활성적인 부분은 상기 단백질과 충분히 동일하거나 또는 단백질의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다(예를 들면, 세린 프로테아제 억제 활성 이외, 대응하는 전장 단백질의 적어도 하나의 활성을 나타내는 서열 번호 2 내지 31, 34 중 임의의 것으로 나타낸 아미노산 서열). 본 발명의 단백질의 생물학적으로 활성적인 부분은, 예를 들어, 5개, 10개, 20개, 30개,

40개 또는 그 이상의 길이의 아미노산인, 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 상기 단백질의 다른 영역이 삭제된 것에 있어서 다른 생물학적으로 활성성질 부분은, 재조합 기술에 의해 제조될 수 있고 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 천연 형태의 기능적 활동 중 하나 이상에 대해 평가될 수 있다. 이러한 임의의 폴리펩티드는 면역 분자에 연결될 수 있고 여기서 상기 펩티드는 항면역 및/또는 항염증 활성 또는 세린 프로테아제 억제 활성을 유지한다.

[0179] 현저한 세린 프로테아제 활성을 갖지 않는 AAT 분자의 변이체는 예를 들어, 불연속 점돌연변이 또는 절단과 같은, 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 점돌연변이는 AAT 또는 펩티드와 세린 프로테아제 결합 능력을 방해 또는 방지하지만 방사선 부작용을 조절하는 능력을 유지하는 여전히 반응 중심 루프(RCL)가 남아있는 AAT 또는 이의 펩티드 유도체에서 생성될 수 있다. 작용제는 상당히 동일하게 유지할 수 있거나, 또는 현저하지 않은 세린 프로테아제 활성을 제외한 단백질의 자연적으로 발생하는 형태의 생물학적 활성의 일부가 남아 있다. 단백질의 길항제는 예를 들어, 관심 단백질을 포함하는 세포 신호 캐스케이드의 하류 또는 상류 구성원에 경쟁적으로 결합하는 것에 의하여 단백질의 자연적으로 발생하는 형태의 활성 중 하나 이상을 억제할 수 있다. 따라서, 특정 생물학적 효과는 제한된 기능의 변이를 이용한 치료에 의해 유도될 수 있다. 단백질의 자연적으로 발생하는 형태의 생물학적 활성의 일부를 갖는 변이체를 이용한 개체의 치료는 단백질의 자연적으로 발생하는 형태를 이용한 치료와 관련하여 개체에서 더 적은 부작용을 가질 수 있다.

[0181] 융합 폴리펩티드

[0182] 어떤 구현예에 있어서, 이러한 AAT 및/또는 그의 유사체, 또는 펩티드 유도체 또는 이의 단편과 같은 약제는 융합 폴리펩티드(AAT 관련 분자)의 일부일 수 있다. 어떤 실시예에 있어서, 융합 폴리펩티드는 AAT(예를 들어, 자연적으로 발생하는 포유동물  $\alpha 1$ -안티트립신) 또는 이의 펩티드 단편 및 상이한 아미노산 서열 또는 IgG 단편과 같은 면역 단편(예를 들어, Fc 또는 이의 돌연변이)일 수 있는 AAT 관련 분자와 연결 또는 연관된 펩티드를 포함한다. 또한, 본 명세서에 개시되는 융합 폴리펩티드는 이를 필요로 하는 개체에게 전달하기 위하여 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 융합 단백질 또는 융합 펩티드를 제조하기 위한 임의의 공지된 방법은 본 명세서에서 고려된다.

[0183] 또 다른 구현예에 있어서, AAT 폴리펩티드 또는 펩티드 융합 단백질은 GST 서열의 C-말단에 융합된 GST 융합 단백질일 수 있다. 융합 발현 벡터 및 정제 및 검출 방법은 본 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터는 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 원핵생물(예를 들어, *E. coli*) 또는 진핵 세포(예를 들어, 곤충 세포(바큘로바이러스 발현 벡터를 사용한), 효모세포 또는 포유동물 세포)에서 본 발명의 융합 폴리펩티드의 발현을 위해 통상적으로 설계될 수 있다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 핵산은 본 기술분야에 설명된 포유동물 발현 벡터를 사용하여 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, AAT 폴리펩티드는 his-표지 융합 분자일 수 있다.

[0185] 클론

[0186] 본 명세서에 개시된 다른 구현예는 본 명세서에 개시된 융합 또는 재조합 분자의 생성 및 단리된 클론을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 본 명세서에서 고려되는 클론은 대조군 AAT(예를 들어, 상업적으로 입수가능한 또는 천연 단리된 AAT)에 비해 증가된 활성을 갖는 링커 부위를 갖는 Fc-AAT 분자(예를 들어, 전장 AAT 또는 이의 펩티드 절편) 유래일 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 다른 클론은 AAT 또는 이의 단편 유도체와 연결된 IgG2 분자에 관한 것이다.

[0188] 병용 요법

[0189] 본 명세서에 기재된 임의의 구현예는 하나 이상의 치료학적 유효량의 암 관련 약물을 포함할 수 있다. 이러한 치료는, 이에 한정되지 않으나, 아스피린 및 예를 들어, 클로피도그렐, 프라수그렐, 티카그렐러, 암식시판, 엠티피바타이드, 티로피반을 포함하는 다른 항혈소판 요법; 헤파린 및 유도체; 직접적 트롬빈 억제제 또는 Xa 억제제; 와파린, 안지오텐신 전환 효소 저해제 또는 안지오텐신 수용체 차단제; 베타- 및 알파-아드레날린 수용체 차단제; 칼슘 채널 차단제; HMGCoA 환원효소 억제제(예를 들어, 스타틴); 니아신 및 이의 유도체; 페노피브레이트; 생선 기름; 알도스테론 차단제; 하이드랄라진 및 질소 유도체; 포스포디에스테라제 억제제; 직접적 구아닐

릴사이클라제 활성제, 항균성 약물, 항염증제, 면역조절제 또는 면역억제제 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0190] 항균제의 예로는, 이에 한정되지 않으나, 페니실린, 퀴놀론, 아미노글리코시드, 반코마이신, 모노박탐, 세팔로스포린, 카바세렘, 세파마이신, 카바페넴, 및 모노박탐 및 그들의 다양한 염, 산, 염기, 및 다른 유도체를 포함한다.

[0191] 본 명세서에서 사용에 고려되는 항진균제는, 이에 한정되지 않으나, 캐스포펄진, 테르비나핀 하이드로클로라이드, 니스타틴, 암포테리신 B, 그리세오폴빈, 케토코나졸, 미코나졸, 질산, 플루시토신, 플루코나졸, 이트라코나졸, 클로트리마졸, 벤조산, 살리실산, 및 셀레늄 설파이드를 포함할 수 있다.

[0192] 본 명세서에서 사용에 고려되는 항바이러스제는, 이에 한정되지 않으나, 발간시클로비어, 아만타딘 하이드로클로라이드, 리만타딘, 아시클로비어, 팜 시클로비어, 포스카넷, 간시클로비어 소듐, 이독수리딘, 리바비린, 소리부딘, 트리플루리딘, 발라시클로비어, 비다라빈, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 지도부딘, 인터페론 알파, 및 에독수딘을 포함할 수 있다.

[0193] 본 명세서에서 사용에 고려되는 항기생충제는, 이에 한정되지 않으나, 피레트린/피페로닐 부톡시드, 퍼메스린, 이오도퀴놀, 메트로니다졸, 디에틸카바마진 시트레이트, 피페라진, 피란텔 파모에이트, 메벤다졸, 티아벤다졸, 프라지퀀텔, 알벤다졸, 프로구아닐, 퀴니딘 글루코네이트 주입, 퀴닌 설페이트, 클로로퀸 포스페이트, 메플로퀸 하이드로클로라이드, 프리마퀸 포스페이트, 아토바쿠온, 코-트리목사졸(설파메톡사졸/트리메토프림), 및 펜타미딘 이세티오네이트를 포함할 수 있다.

[0194] 면역조절제는 예를 들어, 면역계에서 세포의 세포 활성을 자극 또는 억제함으로써(예를 들어, T-세포, B-세포, 마크로파지, 또는 항원제시세포(APC)), 또는 차례로, 면역계를 자극, 억제, 또는 조절하는 면역계 외부 구성요소(예를 들어, 호르몬, 수용체 작용제 또는 길항제, 및 신경전달물질)에 작용함으로써, 직접 또는 간접적으로, 면역계에 작용하는 약제를 포함할 수 있고; 다른 면역조절제는 면역억제제 또는 면역자극제를 포함할 수 있다. 항염제는, 예를 들어, 염증 반응, 상처에 대한 조직 반응을 치료하는 약제, 면역, 혈관, 또는 림프계를 치료하는 약제 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0195] 본 명세서에서 사용에 고려되는 항염증 또는 면역조절 약물 또는 약제는, 이에 한정되지 않으나, 인터페론 유도체, 예를 들어, 베타세론,  $\beta$ -인터페론; 프로스탄 유도체, 일로프로스트, 시카프로스트; 코르티솔, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 덱사메타손과 같은 글루코코르티코이드; 사이클로스포린 A, FK-506, 메톡살렌, 탈리도마이드, 설파살라진, 아자티오프린, 메토크세이트와 같은 면역억제제; 리폭시게나제 억제제, 예를 들어, 질루톤, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-41661A, BI-L-357; 펩티드 유도체 예를 들어 ACTH 및 유사체; 가용성 TNF(종양 괴사 인자)-수용체; TNF-항체; 인터루킨의 가용성 수용체, 다른 사이토카인, T-세포 단백질; 인터루킨의 수용체에 대한 항체, 다른 사이토카인, 및 T-세포-단백질을 포함한다.

[0196] 본 명세서에 조성물과 조합하여 사용하는 다른 약제는 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖는 분자일 수 있다. 예를 들어 본 명세서에서 사용이 고려되는 다른 세린 프로테아제 억제제는, 이에 한정되지 않으나, 백혈구 엘라스타제, 트롬빈, 카텝신 G, 키모트립신, 플라스미노겐 활성제 및 플라스민을 포함할 수 있다.

[0197] 또한, 본 명세서에 개시된 방법의 다른 조합 조성물은 어떤 항체 기반 요법을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로는, 폴리클로날 항원구 항체, T-세포 항원 수용체 복합체에 대한 단일클론 항체(OKT3, TIOB9), 인터루킨-2 수용체 알파를 포함하는 추가적 세포 표면 항원에 대한 단일클론 항체를 포함한다. 어떤 구현예에 있어서, 항체 기반 요법은 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법과 조합하여 유도 요법으로서 사용될 수 있다.

[0198] 본 명세서에서 고려되는 개체는 인간 개체, 남성 또는 여성, 성인 또는 어린이, 유아, 또는 태아, 또는 이에 한정되지 않지만, 영장류, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 기니피그, 새 및 설치류를 포함하는 비인간 개체와 같은 다른 개체를 포함할 수 있다.

[0200] AAT

[0201] 인간의 AAT는 내부 이황화 결합을 갖지 않고 시스테인 또는 글루타티온 중 하나에 일반적으로 분자간 이황화 결합된 단일 시스테인 잔기를 가진 단일 폴리펩티드 사슬이다. AAT의 하나의 반응 부위는 메티오닌 잔기를 포함하고, 이는 담배 연기 또는 다른 산화 오염물질에 대한 노출로 산화에 대해 불안정하다. 이러한 산화는 AAT의 엘라스타제 억제 활성을 감소시킬 수 있으므로; 그 위치에 또 다른 아미노산으로, 예를 들어, 알라닌, 발린, 글리신, 페닐알라닌, 아르기닌 또는 리신의 치환이 더욱 안정한 AAT의 형태를 생산한다. 천연 AAT는 서열번호 1



내지 33의 화학식으로 표시될 수 있거나 또는 포유동물 개체에서 발견되는 다른 공지된 자연적으로 발생하는 AAT 분자일 수 있다.

[0202] 본 명세서에 개시된 분자(예를 들어, 융합 또는 재조합 분자들)들을 제조하기 위하여 임의의 공지된 방법이 고려된다(예를 들어, 포유동물 세포에서, 박테리아에 의해, 균류에 의해, 조류 또는 다른 생물체 또는 식물에서 제조되는 것에 의해).

[0204] 키트

[0205] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 기재된 조성물, 구조체(예를 들어, 재조합 및/또는 융합 분자) 및 방법과 함께 편리하게 사용하기 위한 키트가 고려된다. 키트는 AAT 융합 또는 재조합 구조체(예를 들어, Fc-AAT; Fc-돌연변이체 AAT, Fc-AAT 펩티드 단편, AAT와 연결된 IgG2 돌연변이체 또는 AAT의 카르복시 말단 유도체), AAT로부터 유래된 하나 이상의 펩티드의 구조체, 돌연변이체 AAT 구조체 조성물, 유전자 치료 전달체와 연결된 돌연변이체 AAT 분자 또는 다른 조합을 포함할 수 있다. 소분자, 단백질 또는 펩티드는 개시된 조성물 중 어느 하나에 사용하기 위해 이용될 수 있다. 또한, 항균제, 면역억제제, 항염제와 같은 다른 약제가 상기 키트에 제공될 수 있다. 키트는 적절한 수용 수단(예를 들어, 용기, 유리병, 튜브 등), 단백질 또는 펩티드 또는 유사제, 및 선택적으로 하나 이상의 첨가제를 포함할 수 있다.

[0206] 상기 키트는 암호화되는 단백질 또는 폴리펩티드 항원의 적절한 분주된 구조체 조성물을 추가로 포함할 수 있고, 표지 또는 표지되지 않은, 본 명세서에 개시된 구조체의 발현을 위한 클론은, 기재된 치료학적 적용을 위하여 본 명세서에 개시된 조성물에 사용되는 본 명세서에 기재된 구조체를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0207] 상기 키트의 용기는 일반적으로 적어도 하나의 유리병, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단 또는 다른 전달 장치(예를 들면, 스텐트 또는 카테터)를 포함할 것이다. 또한 키트는 일반적으로 그 안에 다른 조합제가 있을 수 있는 두 번째, 세 번째 또는 다른 추가적인 용기가 포함될 것이다. 이러한 용기는 원하는 유리병이 안에 유지되는 주사 또는 블로우형 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0208] 어떤 구현예에 있어서, 키트는, 이에 한정되지 않으나, AAT, AAT 단편, 또는 AAT 유사체 또는 폴리펩티드의 구조체를 포함하는, 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에 따르면, 키트는 현저한 세린 프로테아제 억제제 활성을 갖지 않는 AAT 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[0210] 실시예

[0211] 하기 실시예는 다양한 구현예를 설명하기 위하여 포함되어 있다. 이는 청구된 방법, 조성물 및 장치의 실시예에 있어서 잘 기능하도록 확인된 기술을 나타내는 실시예에 개시된 기술들은 본 기술분야의 기술자에게 이해되어야 한다. 그러나, 본 기술분야의 기술자는 본 개시 내용을 고려하여, 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어나지 않으면서 같거나 또는 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있는 개시된 일부 구현예들에서 변화가 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0213] 재조합 인간 AAT의 제조용 발현 플라스미드의 생성

[0214] 실시예 1

[0215] 한 예시적인 방법에 있어서, Fc-AAT 구조체는 도 1에 나타낸 바와 같이 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 AAT 서열은 발현 벡터, pCAGGS 내에 삽입될 수 있다. 이 예시적인 방법에 있어서, 도 1에 나타낸 바와 같이 1260 염기쌍의 인간 AAT cDNA를 인간 간 라이브러리로부터 단리하였고, pCAGGS 내에 삽입하였다. 원하는 경우 다른 AAT 분자 또는 이의 펩티드 단편은 상기 1260 염기쌍 서열 대신에 사용될 수 있다. 본 실시예에 있어서, 중국어 햄스터 난소(CHO) 세포를 구조체를 생산할 수 있는 세포를 생성하는 플라스미드로 형질감염시켰다. 한계희석을 사용하여, AAT 클론을 무혈혈 배지에서 선별 및 성장시켰다. 상등액을 수득, 모으고 AAT 융합 분자에 대해 분석하였다. 인간 AAT에 대한 항체를 사용하여, 약 55 kDa의 밴드가 웨스턴 블랏에서 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). 본 실시예에 있어서, 인간 IgG1 Fc 수용체는 단백질 A를 사용하여 재조합 AAT를 정제하기 위하여 사용되었다. 융합 분자를 생산하는 클론이 선별되었고 분액은 추후 사용을 위하여 동결되었다.

- [0217] 실시예 2
- [0218] 또 다른 예시적인 방법에 있어서, 도 1 및 2A에 기술된 구조체는 정제될 수 있고 상업적으로 입수가 가능한 AAT 조성물 또는 다른 개시된 AAT 조성물에 관련된 공지된 임의의 조건에 대한 방법 또는 치료법에 사용될 수 있다. 어떤 구현예에 있어서, 면역 분자에 연결된 AAT 또는 AAT 단편의 이량체를 사용할 수 있다.
- [0219] 어떤 예시적인 방법에 있어서, 인간 Fc IgG 플라스미드(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 또한 IgD 등)는 Qiagen에서 구입할 수 있다(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 또한 IgD 등). 인간 cDNA를 잘라내어 PCR 복제를 통해 인간 Fc 벡터에 삽입했다. 인-프레임 서열은 확인이 수행되었다. 상기 플라스미드는 CHO 세포 내로 형질감염되었고 단일 클론을 얻기 위해 한계희석한 후, 몇몇 안정적인 클론이 단리되었다. 상기 안정적인 클론은 증식되고 무혈청 배지를 사용하여 추가로 선별되었다. 대량 세포 배양을 수행하였고 상등액을 수집하고 모았다.
- [0220] 상기 상등액 구조체는 단일 단계 단백질 A 매트릭스를 사용하여 정제되었다. 인간 Fc-AAT는 글리신(pH 2.4)을 사용하여 용출한 다음 pH 7.4까지 신속하게 중화하였다. SDS PAGE는 환원 조건하에서 단일 밴드를 나타냈다. 한 예시적인 방법에 있어서, 상기 정제된 Fc-AAT는 엘라스타제 활성의 억제를 위해 상업적으로 입수가 가능한 Aralast™와 비교하였다. Fc-AAT 구조체를 갖는 클론이 확인, 증식되었고 분액은 추후 사용을 위하여 냉동 보관되었다.
- [0221] 인간 AAT Fc의 정제: 융합 분자의 웨스턴 블랏은 두 Fc-AAT 분자의 온전한 이량체를 의미하는 밴드(약 170 kDa)를 나타냈다. 웨스턴 블랏 상에 다른 레인은 Fc-AAT의 두 단량체 분자를 형성하기 위하여 모든 이황화 결합이 융합 분자에서 부서진 경우 나타냈다. 환원 겔 뿐만 아니라 비환원 겔은 상기 AAT 구조체의 높은 순도를 보여주었다. 따라서, Fc-AAT는 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 포유동물 세포 배양 상등액으로부터 단일 단계로 정제될 수 있다는 것으로 나타났다.
- [0222] 도 3은 사이토카인 발현에 대한 본 명세서에 기재된 융합 분자의 효과의 항염증 모델을 나타낸다. 본 실시예에 있어서, IL-8 발현은 LPS의 존재 또는 부재하에서 측정된다. 이 모델은 LPS 자극제를 사용하여 세포에서 염증 활성을 측정하기 위하여 잘 공지된 모델이다. 인간 혈액 호중구는( $3 \times 10^6$  세포/ml) 6시간 동안 단독 또는 LPS(10 ng/ml), 밀리리터당 10 마이크로그램의 Fc-AAT(rAAT) 또는 LPS 및 Fc-AAT의 조합의 존재하에서 배양하였다. IL-8 수준은 배양 상등액에서 측정하였다(N=3). Fc-AAT의 존재하에 LPS로 처리된 호중구는 LPS 단독에 비해 현저하게 감소된 IL-8의 수준을 나타냈다. 따라서, Fc-AAT는 항염증 활성을 나타냈다.
- [0223] 본 명세서에 개시된 어떤 구현예에 있어서, Fc-AAT 구조체는 감소되거나 또는 현저하지 않은 세린 프로테아제 억제 활성을 가질 수 있다. 본 명세서에서 생성된 다른 융합 분자는 세린 프로테아제 억제 활성을 포함한다.
- [0225] 실시예 3
- [0226] 도 4는 항염증 분자, IL-1 수용체 길항제(IL-1Ra)의 자극에 대한 본 명세서에 기재된 구조체의 농도 범위를 사용한 히스토그램 그래프를 나타낸다. 이 예시적인 방법에 있어서, 호중구 세포는 본 명세서에서 생성된 융합 분자의 감소된 농도로 배양하였다(예를 들어, 링커 영역을 갖는 Fc-AAT). 대조군 시료는 비교를 보여주기 위하여 사용되었다. 이러한 분자는 상업적인 제형(예를 들어, Aralast™)의 비교적인 양보다 약 100배 이상 활성적이다. 이 실험에서 N=2.
- [0228] 실시예 4
- [0229] **Fc-AAT의 절단된 변이체의 구축.** 어떤 예시적인 구현예에 있어서, AAT의 프로테아제 절단은 AAT의 서열 내에서, 예를 들면 담배 모자이크 바이러스 프로테아제의 프로테아제 부위의 단순 삽입이 될 수 있다. 상기 프로테아제 인식 부위의 삽입은 AAT의 절단된 카르복실 말단을 생성한다. 이 부위는 자연적으로 발생하는 AAT의 카르복시-36-말단 펩티드로부터 상류이다(예를 들어, 도 5 참조): SIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK(서열 번호 34)
- [0230] 이러한 절단된 AAT 분자는 LPS에 의해 유도된 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF  $\alpha$ 를 억제할 수 있다. 2가 절단된 융합 분자

는 증가된 혈장 반감기의 측면에서 펩티드 자체가 뛰어날 수 있다. 천연 AAT는 세포막의 지질 뗏목에서 발견될 가능성이 있다면, 삽입이 N-말단이 아니라 C-말단일 가능성은 없다. 따라서, 2가 구조를 위하여 Fc에 연결된 C-말단 36개 아미노산을 갖는 것은 지질 뗏목에서 더욱 효과적일 것이다. C-36 펩티드는 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도에서 18 시간 LPS에 의해 유도된 IL-1 $\beta$ 를 감소시킨다는 것을 나타냈다(데이터는 나타내지 않음).

[0231] 상기 펩티드의 크기(약 4 kDa)는 짧은 반감기를 가질 것이고 따라서, 어떤 구현예에 있어서, 담체와 제형화 될 것이다. 따라서, 상보적 수용체(FcR)에 결합할 수 있는 그것의 능력에 이름을 따서 명명된, Fc 도메인이라고도 불리는, 인간 IgG1 도메인의 Fc 불변 영역이 사용될 수 있다. 융합 단백질의 하나의 장점은 개체의 순환에 있어서 반감기를 연장한다는 것이다. 여기서, 상기 Fc 융합 단백질에 대한 적어도 두 가지 장점이 있다: 1) 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 미정제 세포 상등액으로부터 간편하게 정제하고, 2) Fc 융합 단백질은 인간에 있어서 여러 질환을 치료하는데 사용될 수 있고, 확립된 안전 기록을 갖는다. 나타낸 바와 같이, Fc-AAT의 다른 절단된 버전의 효과가 용이하게 평가될 수 있다. 예를 들어, 담배 모자이크 바이러스 프로테아제에서 프로테아제 절단은 CHO 세포 상등액에서 수행될 것이다. 그런 다음 혼합물을 단백질 A 컬럼에 적용하고 산성 완충액으로 분획물을 용출한 후, 신속하게 중화할 것이다. 어떤 절단된 Fc-AAT는 항엘라스타제 활성을 갖지 않을 것이다. 예를 들어, 36-C 펩티드는 이 활성을 포함하지 않는다. 따라서, 이러한 분자의 활성은 세린 프로테아제 억제 활성이 아닌 다른 것일 것이다. 이러한 절단된 분자는 도 5에 나타낸 바와 같이 C-80 또는 C-60 등과 같은, C-36 분자보다 클 수 있다.

[0232] **Fc 도메인의 절단.** 원하는 경우, 또 다른 절단 부위는 AAT 또는 AAT-유래 펩티드에서 Fc 단편을 제거하기 위하여, Fc 자체의 것일 수 있다. 이 부위는 AAT 또는 절단된 AAT로부터 단량체를 생성한다. 그러나, Fc-IgG1에 대한 효소는 본 명세서에서 고려되는 Fc-IgG2 및 다른 IgG 분자의 것과 상이하다.

[0233] **N-말단의 융합 단백질.** N-말단 AAT의 구조체는 AAT의 항염증(또는 항면역) 특성이 엘라스타제 저해 특성과 무관하다는 것을 나타내는 데이터를 기반으로 하는 신규한 개념이다. 따라서, 인프레임 구조체에 대한 N-말단을 사용하여 2가의 C-말단과 분자의 형성을 촉진한다. 각 구조체에 대하여, 글리코실화가 분자의 중요한 구성 요소로서 CHO에서의 발현은 필수적이다. 따라서, CHO 세포는 절단된 Fc-AAT뿐만 아니라 야생형의 발현에 사용될 것이다.

[0234] **절단된 Fc-AAT의 정제 및 분석.** 프로테아제 삽입 부위의 경우에 있어서, 분자를 절단하는 프로테아제가 먼저 도입될 수 있고 그런 다음 단편만을 분리하기 위하여 단백질 A를 사용할 수 있다. 이는 산물의 거의 순수한 형태를 얻을 것이다. 어떤 방법에 있어서, Fc 절단 부위의 경우와 같이, 상기 분자는 단백질 A상에서 정제될 수 있고, Fc 절단 프로테아제를 첨가하고 그런 다음 잔여 펩티드 또는 단백질이 거의 순수하게 남아있는 단백질 A상에서 상기 Fc 단편을 제거한다.

[0235] 도 7은 Poly I :C(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 존재하에서 Fc-AAT(서열번호)의 존재하에서 인간 혈액 단핵구에서 IL-1 수용체 길항제(IL-Ra)의 생성의 히스토그램 그래프를 나타낸다(N=1).

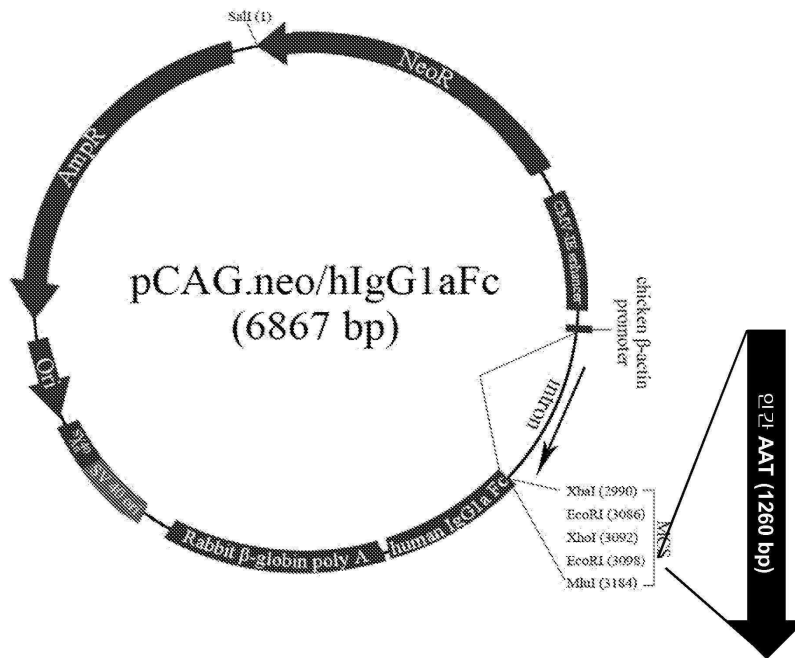
[0236] 한 예시적인 실험에 있어서, 인간 혈액 단핵구는 다량의 인터페론을 유도함으로써 바이러스 감염을 모방하는 Poly I :C(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 존재하에서 제조한 Fc-AAT 또는 Prolatin C®(상업적으로 입수가 가능한 AAT의 형태)의 증가한 농도로 배양하였다. 어떤 경우에 있어서, 본 기술분야의 기술자는 이 모델(Poly I :C를 사용한)을 LPS를 사용하는 것보다 더 적절한 모델로서 여긴다. Fc-AAT 및 상업적으로 입수가 가능한 AAT 제형의 농도는 0.008 내지 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다. 우수한 효과가 항염증성 분자의 유도에 대해서 관찰되었고, Fc-AAT에 의한 IL-1 수용체 길항제(IL-1RA)가 관찰되었다. 도 7은 Prolastin C®에 비해 IL-1RA의 약 1.5 내지 2배 증가를 유도하는 상기 Fc-AAT 융합 분자(링커가 있는), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 나타내는 예시적인 히스토그램 그래프를 나타낸다.

[0238] 본 명세서에 개시된 청구되는 모든 조성물 및 방법은 본 공개를 고려하여 과도한 실험없이 실행될 수 있다. 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기재되었지만, 본 기술분야의 기술자는 본 발명의 사상, 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법 및 방법의 단계 또는 일련의 단계에 있어서 변화가 적용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 보다 구체적으로는, 동일하거나 유사한 결과를 획득할 수 있지만 화학적으로 및 생리학적으로 모두 관련된 어떤 약제가 본 명세서에 기재된 약제를 대체할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 본 기술분야의 기술자에게 명백한 모든 이러한 유사한 대체 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 규정된 본 발명의 정신, 범위 및 사상 내에 있는 것으로 간주된다.

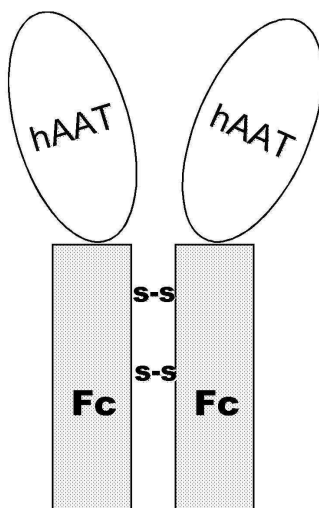
도면

도면1

pCAG.neo/hulgG1aFc-AAT

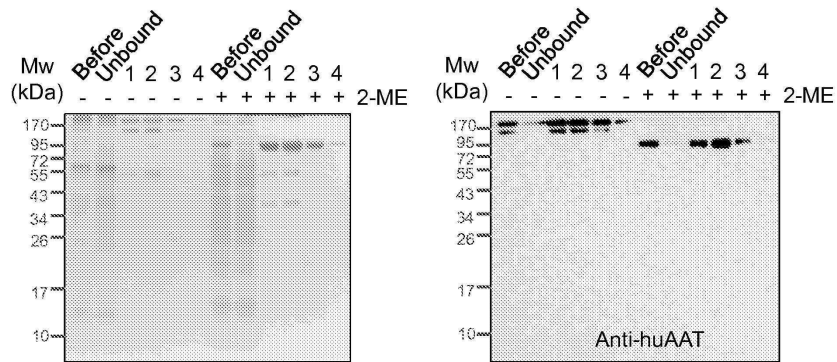


도면2a

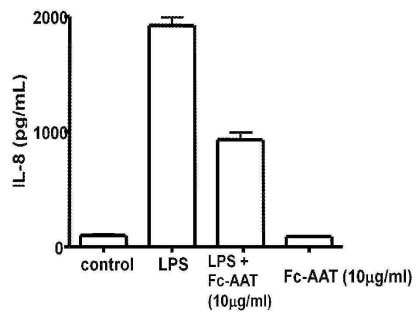




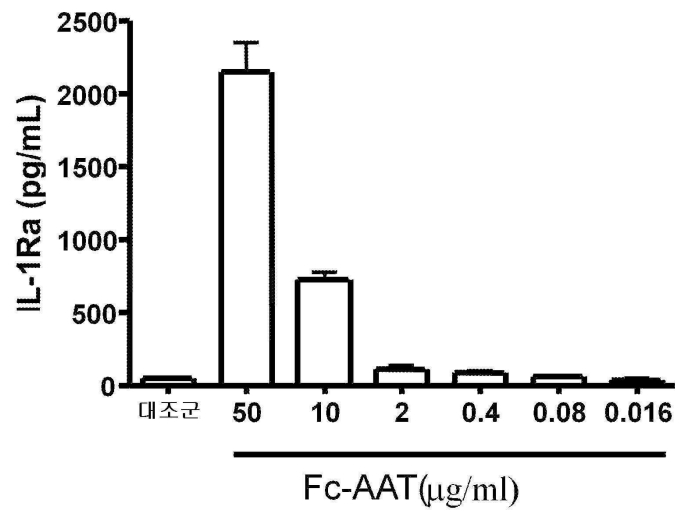
도면2b



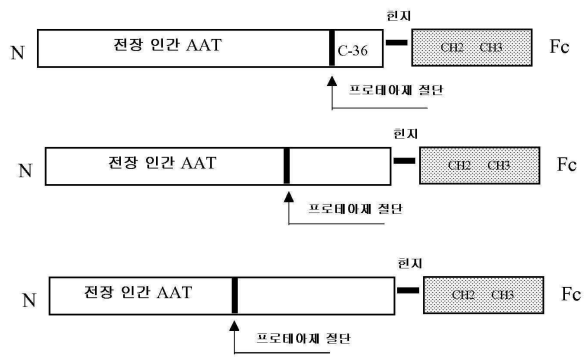
도면3



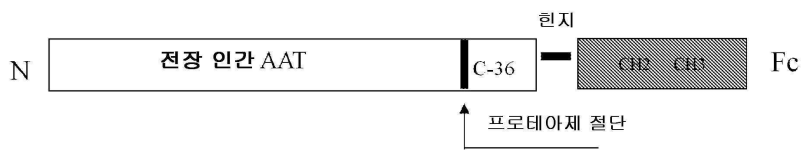
도면4



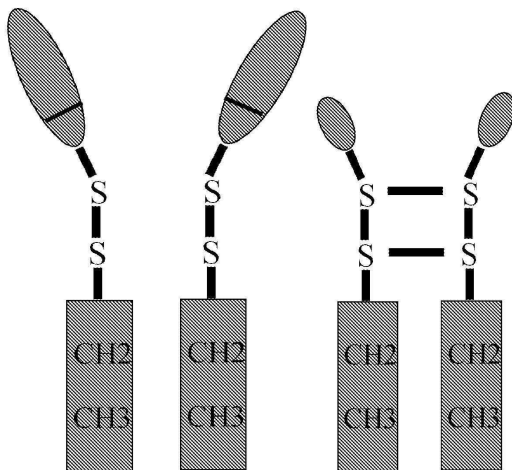
도면5



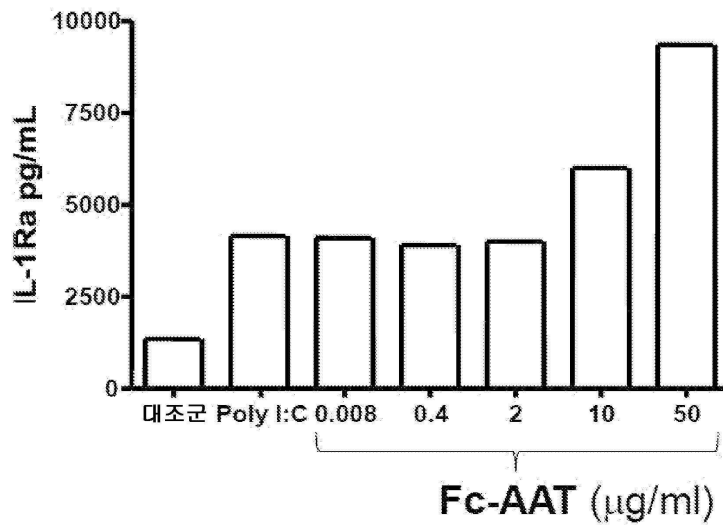
도면6a



도면6b



도면7



### 서열 목록

- <110> Regents of the University of Colorado, a body corporate  
Konkuk University Industrial Cooperation Corp
- <120> COMPOSITIONS, METHODS AND USES FOR ALPHA-1 ANTITRYPSIN FUSION  
MOLECULES
- <130> 2020-FPA-9928D
- <150> 61/500,795
- <151> 2011-06-24
- <160> 51
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 394
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
1 5 10 15

Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
20 25 30

Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr  
35 40 45

Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu

50                      55                      60  
 Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
  
                     85                      90                      95  
 Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
                     100                      105                      110  
 Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp  
                     115                      120                      125  
 Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr  
                     130                      135                      140  
 Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr  
 145                      150                      155                      160  
  
 Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu  
                     165                      170                      175  
 Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly  
                     180                      185                      190  
 Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe  
                     195                      200                      205  
 His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu  
                     210                      215                      220  
 Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu  
  
 225                      230                      235                      240  
 Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp  
                     245                      250                      255  
 Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile  
                     260                      265                      270  
 Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu  
                     275                      280                      285  
 Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly  
                     290                      295                      300



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

370 375 380  
 Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys

385 390

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 2

Phe Val Phe Leu Met

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 3

Phe Val Phe Ala Met

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 4

Phe Val Ala Leu Met

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 5

Phe Val Phe Leu Ala

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 6

Phe Leu Val Phe Ile

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 7

Phe Leu Met Ile Ile

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 8

Phe Leu Phe Val Leu

1 5  
 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 9  
 Phe Leu Phe Val Val

1 5  
 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 10  
 Phe Leu Phe Leu Ile

1 5  
 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 11  
 Phe Leu Phe Phe Ile

1 5  
 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 12  
 Phe Leu Met Phe Ile

1 5  
 <210> 13

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 13  
 Phe Met Leu Leu Ile  
 1 5

<210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 14  
 Phe Ile Ile Met Ile  
 1 5

<210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 15  
 Phe Leu Phe Cys Ile  
 1 5

<210> 16  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 16  
 Phe Leu Phe Ala Val  
 1 5

<210> 17  
 <211>  
 > 5



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 17  
 Phe Val Tyr Leu Ile  
 1 5  
 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 18  
 Phe Ala Phe Leu Met  
 1 5  
 <210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 19  
 Ala Val Phe Leu Met  
 1 5  
 <210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 20  
 Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala  
 1 5 10  
 <210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 21

Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 22

Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 23

Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 24

Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 25  
Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe  
1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 26

Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu  
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 27

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly  
1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 28

Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys  
1 5

<210> 29

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 29

Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys

1                      5                      10                      15  
 Pro Phe Val Phe Leu Met  
                          20  
 <210>      30  
 <211>      20  
  
 <212>      PRT  
 <213>      Artificial Sequence  
 <220><223>      Synthetic peptide  
 <400>      30  
 Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys  
 1                      5                      10                      15  
 Pro Phe Val Phe  
                          20  
 <210>      31  
 <211>      80  
 <212>      PRT  
 <213>      Artificial Sequence  
 <220><223>      synthetic peptide  
 <400>      31  
 Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu  
  
                          20                      25                      30  
 Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro  
                          35                      40                      45  
 Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn  
                          50                      55                      60  
 Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys  
                          65                      70                      75                      80  
 <210>      32  
 <211>      652  
 <212>      PRT  
 <213>      Artificial Sequence



<220><223> FC-AAT fusion polypeptide with linker and leader sequence

<220><221> SITE

<222> (419)..(420)

<223> linker between immune molecule and AAT

<400> 32

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys

1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala

20 25 30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn

35 40 45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln

50 55 60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser

65 70 75 80

Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr

85 90 95

His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro

100 105 110

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn

115 120 125

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu

165 170 175

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys

180 185 190

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu

195 200 205

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val  
210 215 220

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Ala Thr Thr Val  
225 230 235 240

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys  
245 250 255

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala  
260 265 270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu  
275 280 285

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp  
290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr  
305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe  
325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys  
340 345 350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly  
355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile  
370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu  
385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr  
405 410 415

Gln Lys Thr Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
420 425 430

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
435 440 445

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
450 455 460

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 465 470 475 480  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 485 490 495  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 500 505 510  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 515 520 525  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 530 535 540  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 545 550 555 560  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 565 570 575  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 580 585 590  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 595 600 605  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 610 615 620  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 625 630 635 640  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 645 650  
 <210> 33  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 33  
 Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu

20                                      25                                      30  
 Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr  
  
 35                                      40                                      45  
 Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu  
 50                                      55                                      60  
 Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
 85                                      90                                      95  
 Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
 100                                      105                                      110  
  
 Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp  
 115                                      120                                      125  
 Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr  
 130                                      135                                      140  
 Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu  
 165                                      170                                      175  
 Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly  
  
 180                                      185                                      190  
 Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe  
 195                                      200                                      205  
 His Val Asp Gln Ala Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu  
 210                                      215                                      220  
 Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp  
 245                                      250                                      255  
  
 Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile  
 260                                      265                                      270



Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu  
275 280 285  
Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly  
290 295 300  
Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly  
305 310 315 320  
Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala  
325 330 335  
Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe  
340 345 350  
Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys  
355 360 365  
Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe  
370 375 380  
Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys  
385 390

<210> 34

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 34

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

Pro Thr Gln Lys

35

<210> 35

<211> 62

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

tttagaggcc atacccatgt ctatccccc cgaggtaag ttcaacaaac ccctttgtct 60

tt 62

<210> 36

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant

<400> 36

tttagaggcc atatgcatgt ctatccccc cgaggtaag ttcaacaaac ccctttgtct 60

tt 62

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Ile Pro Arg Ser Ile Pro Pro Glu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 38

Ala Ile Pro Val Ser Ile Pro Pro Glu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> syntehtic peptide

<400> 39

Ala Ile Pro Val Ser Ile Pro Pro Glu

1 5

<210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 40  
 Ala Ile Pro Leu Ser Ile Pro Pro Glu

1 5  
 <210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 41  
 Ala Ile Cys Met Ser Ile Pro Pro Glu

1 5  
 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> syntehtic peptide  
 <400> 42  
 Ala Ile Pro Ala Ser Ile Pro Pro Glu

1 5  
 <210> 43  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > synthetic peptide  
 <400> 43  
 Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Lys

1 5  
 <210> 44

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 44  
 Ala Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Glu  
 1 5

<210> 45  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 45

Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn  
 1 5

<210

> 46

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 46

Ile Ala Gly Arg Leu Leu Asn Pro Asn  
 1 5

<210> 47  
 <211> 650  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Fc-AAT with leader sequence without linker  
 <400> 47

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys  
 1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala

20

25

30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn  
35 40 45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln  
50 55 60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser  
65 70 75 80

Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr  
85 90 95

His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro  
100 105 110

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn  
115 120 125

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu  
130 135 140

Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys  
145 150 155 160

Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu  
165 170 175

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys  
180 185 190

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu  
195 200 205

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val  
210 215 220

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Ala Thr Thr Val  
225 230 235 240

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys  
245 250 255

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala  
260 265 270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu  
275 280 285



Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp  
 290 295 300  
 Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe  
 325 330 335  
 Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys  
 340 345 350  
 Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly  
 355 360 365  
 Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile  
 370 375 380  
 Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu  
 385 390 395 400  
 Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr  
 405 410 415  
 Gln Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 420 425 430  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 435 440 445  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 450 455 460  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 485 490 495  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 500 505 510  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 515 520 525  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

530 535 540  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 565 570 575  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 580 585 590  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

595 600 605  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 610 615 620  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 625 630 635 640  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

645 650

<210> 48

<211> 628

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc-AAT fusion polypeptide with linker without leader sequence

<220><221> SITE

<222> (395)..(396)

<223> linker between immune molecule and AAT

<400> 48

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

50

55

60

Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
65 70 75 80  
Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
85 90 95  
Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
100 105 110  
Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp  
115 120 125  
  
Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr  
130 135 140  
Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr  
145 150 155 160  
Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu  
165 170 175  
Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly  
180 185 190  
Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe  
195 200 205  
His Val Asp Gln Ala Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu  
210 215 220  
Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu  
225 230 235 240  
Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp  
245 250 255  
Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile  
260 265 270  
  
Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu  
275 280 285  
Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly  
290 295 300  
Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly  
305 310 315 320

Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala  
325 330 335

Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe  
340 345 350

Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys  
355 360 365

Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe  
370 375 380

Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys Thr Arg Glu Pro Lys Ser  
385 390 395 400

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
405 410 415

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
420 425 430

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
435 440 445

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
450 455 460

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
465 470 475 480

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
485 490 495

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
500 505 510

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
515 520 525

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
530 535 540

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
545 550 555 560

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

565 570 575  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 580 585 590  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 595 600 605  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 610 615 620  
 Ser Pro Gly Lys  
 625

<210> 49  
 <211> 626  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Fc-AAT fusion polypeptide without linker or leader sequence  
 <400> 49

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
 20 25 30  
 Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr  
 35 40 45

Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu  
 50 55 60  
 Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
 85 90 95  
 Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
 100 105 110  
 Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp

115 120 125  
 Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr

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



385                      390                      395                      400  
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

                    405                      410                      415  
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

                    420                      425                      430  
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

                    435                      440                      445  
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

                    450                      455                      460  
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

465                      470                      475                      480

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

                    485                      490                      495  
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

                    500                      505                      510  
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

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

                    530                      535                      540  
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

545                      550                      555                      560

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

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

                    580                      585                      590  
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

                    595                      600                      605  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

                    610                      615                      620

Gly Lys

625

<210> 50  
 <211> 1887  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cDNA for Fc-AAT with linker without leader sequence  
 <400> 50

gaggatcccc agggagatgc tgcccagaag acagatacat cccaccacga tcaggatcac 60  
 ccaaccttca acaagatcac ccccaacctg gctgagttcg ccttcagcct ataccgccag 120  
 ctggcacacc agtccaacag caccaatatc ttcttctccc cagtgagcat cgctacagcc 180  
 ttgcaatgc tctccctggg gaccaaggct gacactcacg atgaaatcct ggagggcctg 240  
 aatttcaacc tcacggagat tccggaggct cagatccatg aaggcttcca ggaactcctc 300

cgtagcctca accagccaga cagccagctc cagctgacca ccggcaatgg cctgttcctc 360  
 agcgagggcc tgaagctagt ggataagttt ttggaggatg ttaaaaagtt gtaccactca 420  
 gaagccttca ctgtcaactt cggggacacc gaagaggcca agaaacagat caacgattac 480  
 gtggagaagg gtactcaagg gaaaattgtg gatttggta aggagcttga cagagacaca 540  
 gtttttgctc tggigaatta catcttcttt aaaggcaa at gggagagacc ctttgaagtc 600  
 aaggacaccg aggaagagga ctccacgtg gaccaggcga ccaccgtgaa ggtgcctatg 660  
 atgaagcggt taggcatggt taacatccag cactgtaaga agctgtccag ctgggtgctg 720

ctgatgaaat acctgggcaa tgccaccgcc atcttcttcc tgcctgatga ggggaaacta 780  
 cagcacctgg aaaatgaact caccacgat atcatcacca agttcctgga aaatgaagac 840  
 agaaggtctg ccagcttaca ttaccctaaa ctgtccatta ctggaaccta tgatctgaag 900  
 agcgtcctgg gtcaactggg catcactaag gtcttcagca atggggctga cctctccggg 960  
 gtacacagagg aggcaccctt gaagctctcc aaggccgtgc ataaggctgt gctgaccatc 1020  
 gacgagaaag ggactgaagc tgctggggcc atgttttttag aggccatacc catgtctatc 1080  
 cccccgagg tcaagttcaa caaacctttt gtcttcttaa tgattgaaca aaataccaag 1140

tctccctct tcatgggaaa agtgggtgaat cccacccaaa aaacgcgtga gcccaaatct 1200  
 tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 1260  
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 1320  
 acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 1380  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 1440  
 taccgtgtgg tcacgctcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1500

aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1560

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1620

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1680

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1740

tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1800

gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1860

agcctctccc tgtctccggg taaatga 1887

<210> 51

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA for Fc-AAT with linker and leader sequence

<400> 51

atgccgtctt ctgtctcgtg gggcctcttc ctgctggcag gcctgtgctg cctggctcct 60

gtctcctctg ctgaggatcc ccaggagat gctgccaga agacagatac atcccaccac 120

gatcaggatc acccaacctt caacaagatc accccaacc tggctgagtt cgccttcagc 180

ctataccgcc agctggcaca ccagtcacac agcaccaata tcttcttctc cccagtgcgc 240

atcgctacag cctttgcaat gctctccctg gggaccaagg ctgacactca cgatgaaatc 300

ctggaggggc tgaatttcaa cctcacggag attccggagg ctgagatcca tgaaggcttc 360

caggaactcc tccgtacct caaccagcca gacagccagc tccagctgac caccggcaat 420

ggcctgttcc tcagcgaggg cctgaagcta gtggataagt ttttggagga tgttaaaaag 480

ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttcggggaca ccgaagaggc caagaaacag 540

atcaacgatt acgtggagaa gggctactca gggaaaattg tggatttggc caaggagctt 600

gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttct ttaaaggcaa atgggagaga 660

ccctttgaag tcaaggacac cgaggaagag gacttcacg tggaccaggc gaccaccgtg 720

aaggtgccta tgatgaagcg tttaggcatg ttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc 780

agctgggtgc tgctgatgaa atacctgggc aatgccaccg ccattcttct cctgcctgat 840

gaggggaaac tacagcact ggaaaatgaa ctcaccacg atatcatcac caagttcctg 900

gaaaatgaag acagaagtc tgccagctta catttaccca aactgtccat tactggaacc 960

tatgatctga agagcgtcct gggctcaactg ggcatcacta aggtcttcag caatggggct 1020

gacctctccg gggctcacaga ggaggcacc ctaagctct ccaaggccgt gcataaggct 1080

gtgctgacca tcgacgagaa agggactgaa gctgctgggg ccatgttttt agaggccata	1140
cccatgtcta tccccccga ggtcaagttc aacaaacct ttgtcttctt aatgattgaa	1200
caaaatacca agtctccctt cttcatggga aaagtggatg atcccacca aaaaacgcgt	1260
gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	1320
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg	1380
accttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	1440
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatccaaga caaagccgcg ggaggagcag	1500
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1560
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1620
atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	1680
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaagctt ctatccagc	1740
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct	1800
cccgctgtgg actccgacgg ctcttcttct cttacagca agctcacct ggacaagagc	1860
aggtggcagc aggggaacct cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtct gcacaaccac	1920
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga	1959