

명세서

청구범위

청구항 1

혈관활성 장 펩티드(vasoactive intestinal peptide, VIP)를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 펩티드는, (i) VPAC1에 비하여 VPAC2에 대한 상기 VIP의 선호를 증가시키는 N-말단 메티오닌; 및 (ii) 위치 2에서 N-말단 히스티딘을 갖는 서열 번호. 13의 아미노산 서열;을 포함하고, C-말단에 주사 부위로부터 흡수 국면을 연장시키고, 순환 반감기를 연장시키는 엘라스틴-유사 펩티드 (ELP)를 갖는, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 ELP는, 서열번호. 1-12의 아미노산 서열 중 어느 하나의 60개의 반복을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 ELP는 VPGXG (서열 번호. 3), IPGXG (서열 번호. 5), 또는 LPGXG (서열 번호. 7)의 반복을 포함하고, 상기 X는 유전적으로 인코딩된 아미노산인 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 ELP는 60번의 VPGXG의 반복을 포함하되, 상기 X는 독립적으로 Val, Ala 및 Gly 중에서 선택되거나, 또는 상기 ELP는 120번의 VPGXG의 반복을 포함하되, 상기 X는 독립적으로 Val, Ala 및 Gly 중에서 선택되는 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 X는 5:2:3의 비율로 Val, Ala, 및 Gly인 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,
상기 X는 Val인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 VIP 펩티드는 VPAC1에 비하여 VPAC2에 대한 2:1 또는 50:1의 상대적 결합 선호를 갖는 약학 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 비경구 투여용으로 조제되는 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 피하, 근육내, 또는 정맥내 투여용으로 조제되는 조성물.

청구항 10

개체에서 고혈압, 심부전, 심근섬유증 또는 염증성 반응을 치료하는 방법에 사용하기 위한 제8항의 조성물로서,

상기 방법은 상기 조성물의 치료 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 고혈압 치료에 사용하기 위한 조성물로서,

상기 개체는 폐 고혈압, 조절되지 않는 본태성 고혈압, 및 저항성 고혈압 중에서 선택되는 고혈압을 갖는,

고혈압 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물은 염증성 반응 치료에 사용하기 위한 조성물로서,

상기 개체는 자연성 과민 반응, 자기반응성 T-세포의 발생, 및 TH1-형 염증 또는 TH1 자가면역으로 정의되는 질환 중에서 선택되는 염증성 반응을 갖는,

염증성 반응 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 개체는 관절염, 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식 거부반응, 쇼그렌 증후군, 췌장염, 포도막염(uveoretinitis), 각막염, 및 패혈 쇼크 중에서 선택되는 TH1-형 염증 또는 TH1 자가면역으로 정의되는 질환을 갖는,

염증성 반응 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 14

제10항에 따른 조성물로서,

상기 방법에서 상기 조성물은 주 1회 내지 3회 투여되거나, 또는 매일 투여되는,

치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2009년 8월 14일 제출된 U.S. 특허가출원 Serial No. 61/234,151에 우선권을 주장하고, 이의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0003]

[0004]

본 발명의 기술 분야

[0005]

본 발명은 연장된 순환 반감기를 갖는 VIP, 그리고 변형되지 않은 성숙 웨티드와 상이한 수용체 결합 프로필을 갖는 VIP를 비롯한 혈관활성 장 웨티드 (VIP) 및 이들을 포함하는 제약학적 조성물에 관계한다.

[0006]

전자적으로 제출된 텍스트 파일에 관한 설명

[0007]

본 출원과 함께 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다: 서열 목록(파일명: PHAS_01US_SeqList_ST25.txt, 기록 일자: 2010년 8월 4일, 파일 크기 44 킬로바이트)의 컴퓨터 가독성 형식 사본.

배경 기술

[0008]

배경 기술

[0009]

혈관활성 장 펩티드 (VIP)는 지혈 (hemostasis), 면역계, 그리고 신경계에 대하여 다수의 생물학적 효과를 갖는다. 예로써, Delgado et al., *The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation*, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004)를 참고한다. 가령, VIP는 혈압과 폐압에 대한, 그리고 넓은 범위의 면역학적 질환 및 염증 질환에 대한 유익한 효과를 갖는다. VIP는 예로써, 폐 고혈압, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 관절염, 염증성 장 질환 (IBD), 그리고 천식에 대한 활성 작용제로서 높은 잠재력을 갖는다.

[0010]

VPAC1과 VPAC2를 비롯하여, VIP에 대한 적어도 2가지 수용체가 존재한다. 이들 수용체는 VIP 및 어느 정도까지, 관련된 분자 뇌하수체 아데닐레이트 시클라아제-활성화 폴리펩티드 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP)에 결합한다. 양쪽 수용체는 7-막통과 G-단백질 결합된 수용체 패밀리의 구성원이다. VPAC1은 예로써, CNS, 간, 폐, 장 및 T-림프구에 분포된다. VPAC2는 예로써, CNS, 췌장, 골격근, 심장, 신장, 지방 조직, 고환, 그리고 위에서 발견된다.

[0011]

VIP 펩티드는 짧은 반감기로 인하여, 제약학적 작용제로서 비실용적이다. Pozo D, et al., *Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune disorders*. *Peptides* 28(9):1833-1846 (2007)를 참고한다. 실제로, 여러 연구에서, 혈액 내에서 VIP의 반감기는 2분 이하인 것으로 밝혀졌다 (Domschke et al., 1978, Gut 19: 1049-53; Burhol et al., 1978, *Scand J Gastroenterol* 13: 807-813). 게다가, VIP의 다수의 생물학적 효과는 임의의 특정 징후에 대한 이의 개발을 복잡하게 만든다. 이런 이유로, VIP의 변형된 이형은 예로써, 반감기를 연장하고 및/또는 바람직한 수용체-결합 프로필을 갖는 분자를 설계함으로써 상기 작용제를 치료 실용적으로 만드는데 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012]

본 발명의 개요

[0013]

본 발명에서는 변형된 혈관활성 장 펩티드 (VIP), 인코딩 폴리뉴클레오티드와 벡터, 그리고 이들 변형된 VIP를 포함하는 제약학적 조성을 제시한다. 게다가, 본 발명에서는 이들 변형된 VIP 분자를 만드는 방법, 그리고 환자의 치료를 위하여 이들 변형된 VIP 작용제를 이용하는 방법을 제시한다. 본 발명에 따라서, 변형된 VIP는 변형되지 않은 VIP에 대하여, 체내에서 연장된 순환 반감기 또는 지속성, 및/또는 필적하는 수용체-결합 및/또는 생물학적 효능, 및/또는 변경된 수용체 결합 프로필을 나타낸다.

[0014]

한 측면에서, 본 발명에서는 변형된 VIP 분자 및 이들을 포함하는 제약학적 조성을 제시한다. 이들 변형된 VIP 분자는 체내에서 더욱 긴 순환 반감기 또는 지속성, 필적하는 생물학적 효능, 및/또는 변경된 수용체 결합 프로필을 제공하기 위하여, 하나 또는 그 이상의 아미노산의 부가에 의해, 및/또는 이종기원성 아미노산 서열에 융합에 의해 N- 및/또는 C-말단에서 재조합 방식으로 또는 화학적으로 변형된다. 가령, 일부 구체예에서, N-말단 His로 시작하는 28개-아미노산 성숙 VIP는 추가적 N-말단 아미노산, 예를 들면, N-말단에서 단일 아미노산 (가령, Met)을 포함한다. 이들 또는 다른 구체예에서, 변형된 VIP는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 엘라스탄-유사-펩티드 (ELP)에 N- 또는 C-말단 융합을 내포한다. 이런 변형된 VIP 분자는 체내에서 증가된 순환 반감기 또는 지속성, 및/또는 VPAC1에 비하여 VPAC2에 대한 변경된 결합 선호를 나타낼 수 있다.

[0015]

가령, VIP는 ELP의 N-말단에 융합될 수 있다(가령, 재조합 수단에 의해). 자연 성숙 VIP의 히스티딘은 N-말단에 위치할 수 있다. 이를 치료제는 융합되지 않은 대응물보다 훨씬 적은 빈도의 투약, 예를 들면, 대략 주 1-7회의 투약 (가령, 하루 1회 또는 주 1회 투약)을 필요로 한다.

[0016]

대안적 구체예에서, VIP-ELP 융합은 위치 2에서 자연 성숙 VIP 산물의 His와 함께, N-말단에서 메티오닌을 내포한다. 또 다른 구체예에서, VIP-ELP 분자는 메티오닌 알라닌 알라닌으로 시작된다. 세균에서 생산될 때, 첫 번째 메티오닌은 상실되고, 그리고 산물은 N-말단에서 Ala-Ala를 내포한다. Ala-Ala는 DPP-IV 펩티다아제의 작용에 의해 시험관내에서 또는 생체내에서 제거되고, 따라서 자연 성숙 VIP N-말단이 남게 된다. N-말단에서 추가적 아미노산을 내포하는 이들 구조체는 VPAC1과 VPAC2 수용체에서 결합 활성에 대하여 조사될 때 매우 상이한 활성을 나타낸다. 가령, 양쪽 구조체는 VPAC2 수용체를 유사한 EC50으로 활성화시킬 수 있는 반면, N-말단에서 메티오닌 (및 위치 2에서 His)을 보유하는 구조체는 VPAC1 수용체에서 적어도 100배 낮은 활성을 갖는다.

[0017]

다양한 구체예에서, N-말단 Met를 보유하는 본 발명의 변형된 VIP는 자연적인 또는 원하는 VIP N-말단을 노출시

키는 추가의 발현-후 제조 과정 없이, 재조합 수단에 의해, 예를 들면, 대장균(*E. coli*) 또는 기타 발현 시스템에서 생산에 의해 획득될 수 있는 이점을 갖는다.

[0018] 또 다른 구체예에서, VIP는 본 명세서에서 상세하게 기술된 바와 같이 예로써, 하나 또는 그 이상의 PEG 또는 다른 화학적 모이어티의 부가(가령, N-말단에서 또는 N-말단 인근에서)에 의해 화학적으로 변형될 수 있다.

[0019] 다른 측면에서, 본 발명에서는 본 발명의 변형된 VIP를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 벡터, 그리고 이들을 내포하는 숙주 세포를 제시한다. 공지된 발현 시스템에서 이용하기 적합한 세균 또는 효모 세포와 같은 이들 숙주 세포는 변형된 VIP의 재조합 생산에 적합하다,

[0020] 다른 측면에서, 본 발명에서는 포유동물에서 질환을 치료하거나, 개선하거나, 또는 예방하는 방법을 제시한다. 이런 질환에는 다양한 심혈관 질환, 면역학적 (가령, 자가면역) 질환, 그리고 신경학적 질환이 포함된다. 가령, 변형된 VIP는 자가면역 질환 또는 염증 질환을 앓는 환자를 비롯한 환자에서 친-염증성 효과기 (effector)와 항-염증성 효과기 사이에 균형을 조정하는데 이용될 수 있다. 변형된 VIP에 대한 예시적인 징후에는 특히, 고혈압, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 당뇨병, 심근섬유증, 심부전, 심근증, 관절염, 염증성 장 질환 (IBD), 그리고 천식이 포함된다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 상세한 설명

[0022] 본 발명에서는 변형된 혈관활성 장 펩티드 (VIP), 인코딩 폴리뉴클레오티드와 벡터, 그리고 이들 변형된 VIP를 포함하는 제약학적 조성을 제시한다. 게다가, 본 발명에서는 환자의 치료를 위한 변형된 VIP 작용제를 만들고 이용하는 방법을 제시한다. 본 발명에 따라서, 이러한 VIP는 변형되지 않은 VIP에 대하여 체내에서 연장된 순환 반감기 또는 지속성, 필적하는 수용체-결합 또는 생물학적 효능, 및/또는 변경된 수용체 결합 프로필을 나타낼 수 있다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 변형되지 않은 대응물과 비교하여 감소된 투약 빈도를 나타낸다.

혈관활성 장 펩티드

[0024] 혈관활성 장 펩티드 (VIP)는 28개 아미노산 잔기를 내포하는 펩티드 호르몬이고 장, 췌장 및 뇌에서 시상하부의 위교차핵 (suprachiasmatic nucleus)을 비롯한 인체의 많은 구역에서 생산된다. VIP는 동물과 인간에서 전신 혈관계확장 (systemic vasodilation), 저혈압 (hypotension), 증가된 심박출량 (cardiac output), 호흡 자극 (respiratory stimulation), 고혈당증 (hyperglycemia), 관상동맥 확장 (coronary dilation), 기관지 확장 (bronchodilation)을 비롯한 다양한 생물학적 작용을 나타낸다. VIP는 또한, 면역계의 균형에 영향을 준다.

[0025] VIP는 신체의 여러 부분에서 효과를 나타낸다. 소화계 (digestive system)에 대하여, VIP는 평활근 이완(하부식 도팔약근, 위, 쓸개)을 유도하고, 췌액과 담즙 내로 물의 분비를 자극하고, 그리고 장 내강으로부터 위산 분비와 흡수의 저해를 유발한다. 장 내에서 이의 역할은 장 평활근을 확장하고, 말초 혈관을 확장하고, 췌장 중탄산 염 분비를 자극하고, 그리고 가스트린-자극된 위산 분비를 저해할 뿐만 아니라 물과 전해질의 분비를 자극하는 것이다. 이들 효과는 함께 작용하여 운동성 (motility)을 증가시킨다. VIP는 으뜸 세포 (chief cell)에 의한 펩시노겐 분비를 자극하는 기능을 갖는다.

[0026] VIP는 심장에서 발견되고 심혈관계에 대한 유의미한 효과를 갖는다. 이것은 양성 변력성 (inotropic)과 변시성 (chronotropic) 효과뿐만 아니라 관상동맥 혈관확장 (coronary vasodilation)을 유발한다.

[0027] VIP는 염증 및 TH1-형 자가면역 질환을 치료하는데 유용한 면역조절 펩티드이다 (참조: Delgado et al., *The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation*, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004)). VIP는 신경퇴행성 질환의 치료에 유용하다 (참조: 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는 US Patent No. 5,972,883). VIP 및 이의 구조적으로 관련된 펩티드 뇌하수체 아데닐레이트 시클라아제-활성화 폴리펩티드 (PACAP)는 만성 염증성 류마티스성 질환의 염증성 성분과 자가면역 성분 둘 모두를 하향-조절함으로써, 만성 염증성 류마티스성 질환, 예를 들면, 골관절염 (OA) 및 류마티스성 관절염 (RA)에서 중요한 치료적 효과를 나타낸다 (Juarranz et al., *Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells*, *Rheumatology*, 2004, 43:416-422). 이에 더하여, VIP는 친-염증성 효과기와 항-염증성 효과기 사이에 균형을 조절함으로써, 또는 자가-반응성 T-세포에 대한 억제자 활성을 갖는 T-세포의 출현을 유도함으로써 면역 관용 (immune tolerance)을 유지하는데 참여한다 (Pozo et al., *Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune*

disorders, *Peptide*, 2007, 28(9):1833-1846).

[0028] 성숙 VIP는 하기 서열의 28개 아미노산 잔기를 갖는다: HSDAVFTDNYTRLRKOMAVKKYLN SILN (서열 번호: 13). VIP는 170-아미노산 전구체 분자 prepro-VIP의 가공으로부터 발생한다. VIP 및 예시적인 유사체의 구조는 US Patent 4,835,252, 4,939,224, 5,141,924, 4,734,400, 4,605,641, 6,080,837, 6,316,593, 5,677,419, 5,972,883, 6,489,297, 7,094,755, 그리고 6,608,174에서 기술되었는데, 이들 각각은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0029] 프로테아제 등에 대한 웨티드 안전성을 향상시키기 위한 다수의 돌연변이는 기존 문헌에서 상세하게 보고되었다 (참조: 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는 Onune *et al. Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009). 이들 변형된 VIP 웨티드는 서열 번호: 21 (M17L, Met의 산화를 예방하기 위해), 서열 번호: 22 (K15R, K20R 및 K21R, 단백질분해 안전성을 증가시키기 위해), 그리고 서열 번호: 23 (N24A 및 S25A, 단백질분해/열 안전성을 증가시키기 위해)의 서열을 갖는다. 본 발명에서는 이들 변형 중에서 하나 또는 그 이상, 그리고 본 명세서에서 기술된 추가적 VIP 변형을 포함하는 변형된 VIP 웨티드를 제시한다. 변형된 VIP 분자의 실례에는 서열 번호: 14-15, 17-27, 40, 42, 44, 그리고 50의 변형된 VIP 웨티드가 포함된다.

[0030] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 변형된 VIP (가령, 서열 번호: 13을 포함) (또는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 기능적 유사체)가 제시된다. 일반적으로, VIP의 기능적 유사체에는 1개, 2개, 3개, 또는 최대 대략 5개 아미노산을 비롯한 1개 내지 10개 아미노산에 의해 N- 또는 C-말단에서 절두된 기능적 단편이 포함된다 (서열 번호: 13에 대하여). 이들 기능적 유사체는 고유 서열 (가령, 서열 번호: 13)에 대하여 1개 내지 5개 아미노산 삽입, 결실, 및/또는 치환 (집합적으로)을 내포할 수 있고, 그리고 각 경우에, 상기 웨티드의 활성을 유지한다 (가령, VPAC2 및/또는 VPAC1 결합을 통해). 이런 활성은 본 명세서에서 기술된 분석평가, 그리고 Delgado *et al.*, *The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation*, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004)에서 기술된 활성을 측정하거나 정량하는 임의의 적절한 분석평가를 비롯한 임의의 가용한 분석평가를 이용하여 확증되거나 평가될 수 있다. 이를 또는 다른 구체예에서, 본 발명의 변형된 VIP의 VIP 성분은 고유 성숙 서열 (서열 번호: 13)과 적어도 대략 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 97% 동일성을 갖는다. 두 서열 사이에 (가령, 고유 서열 및 기능적 유사체 사이에) 서열 동일성의 결정은 Tatusova *et al.*, *Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*, *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250 (1999)을 비롯한 임의의 정렬 도구를 이용하여 달성될 수 있다.

[0031] 한 측면에서, 본 발명에서는 변형되지 않은 VIP (가령, 서열 번호: 13의 아미노산 서열로 구성되는 웨티드)와 비교하여 VPAC2 또는 VPAC1에 대한 수용체 선호 (preference)를 갖는 변형된 VIP 분자를 제시한다. 가령, 변형된 VIP는 VPAC1에 비하여 VPAC2에 대한 적어도 대략 2:1, 대략 5:1, 대략 10:1, 대략 25:1, 대략 50:1, 대략 100:1, 대략 500:1 또는 그 이상의 상대적 결합 선호를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 변형된 VIP는 VPAC2에 비하여 VPAC1에 대한 적어도 대략 2:1, 대략 5:1, 대략 10:1, 대략 25:1, 대략 50:1, 대략 100:1, 대략 500:1, 또는 그 이상의 상대적 결합 선호를 가질 수 있다. 가령, 일정한 구체예에서, 변형된 VIP는 성숙, 변형되지 않은, 인간 VIP와 실질적으로 동일하게, 다시 말하면, 성숙, 변형되지 않은, 인간 VIP (서열 번호: 13)의 대략 2의 계수 (factor) 내에 EC50으로 VPAC2 수용체를 활성화시킨다. 하지만, 이러한 동일한 변형된 VIP는 VPAC1 수용체를 활성화시키는 효과가 성숙, 변형되지 않은, 인간 VIP보다 50- 또는 100-배 또는 그 이상 작다.

[0032] 이들 변형된 VIP 분자는 이종기원성 포유동물 아미노산 서열을 포함하는 변형된 N-말단 영역, 예를 들면, VIP의 N-말단 히스티딘에 1개 내지 대략 500개 아미노산의 부가를 내포할 수 있다. 가령, 변형된 VIP는 성숙 VIP의 자연 N-말단 히스티딘의 N-말단 쪽에서 단일 메티오닌을 내포할 수 있다. 이러한 분자는 또한, 대장균 (*E. coli*) 또는 기타 세균 발현 시스템에서 편의하게 제조되는데, 그 이유는 인접 아미노산이 히스티딘일 때 메티오닌이 대장균 (*E. coli*)에 의해 제거되지 않을 것이기 때문이다. 대안으로, N-말단 아미노산은 자연-발생 아미노산, 다시 말하면, 알라닌, 아르기닌, 아스파라гин, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린, 그리고 프롤린 중에서 한 가지일 수 있다.

[0033] VIP의 N-말단에 부가된 추가적 서열은 1개 내지 대략 100개, 1개 내지 대략 50개, 1개 내지 대략 20개, 1개 내지 대략 10개, 그리고 1개 내지 대략 5개 아미노산의 생물학적으로 활성 서열 및 생물학적으로 비활성 서열을 비롯한 임의의 서열일 수 있다.

[0034] 변형된 VIP의 N-말단은 구조 M-N을 가질 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고, 그리고 N은 VIP 분자의 N-말단이다 (가령, 서열 번호: 14, 도 1). 이러한 메티오닌은 세균 또는 진핵 숙주 세포에서 단백질의 번역을 뒷받침한

다. 따라서 변형된 VIP는 세균과 효모 발현 시스템 (가령, 대장균(*E. coli*))을 비롯한 생물학적 시스템에서만 들어질 수 있다. 메티오닌이 때때로, 세균 발현 시스템 내에서 메티오닌 아미노펩ти다아제 (MA)에 의해 제거될 수 있긴 하지만, 히스티딘 (H)은 위치 2에서 MA에 대한 가장 선호되지 않는 잔기 중의 하나이다.

[0035] 또 다른 구체예에서, N-말단은 포유동물 이종기원성 단백질, 예를 들면, 치료적 분자의 반감기를 연장시키는데 효과적인 포유동물 단백질과의 융합에 의해 변형된다. 이런 서열은 포유동물 서열, 예를 들면, 알부민, 트랜스페린, 또는 항체 Fc 서열일 수 있다. 이들 서열은 예로써, US Patent No. 7,238,667 (특히, 알부민 접합체에 대하여), US Patent No. 7,176,278 (특히, 트랜스페린 접합체에 대하여), 그리고 US Patent No. 5,766,883에서 기술되고, 이들은 각각, 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0036] 다른 구체예에서, VIP는 웨პ티다아제 또는 프로테아제, 예를 들면, 내인성 웨პ티다아제 또는 프로테아제에 의해 활성화가능하다. 이런 활성화가능 서열은 International Application No. PCT/US2009/068656에서 기술되는데, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 본 명세서에서, 용어 "웨პ티다아제" 및 "프로테아제"는 교체가능하다. 가령, VIP는 디펩티딜 웨პ티다아제에 의해 활성화가능하도록 설계될 수 있다. 예시적인 디펩티딜 웨პ티다아제에는 디펩티딜 웨პ티다아제-1 (DPP-I), 디펩티딜 웨პ티다아제-3 (DPP-III), 디펩티딜 웨პ티다아제-4 (DPP-IV), 디펩티딜 웨პ티다아제-6 (DPP-VI), 디펩티딜 웨პ티다아제-7 (DPP-VII), 디펩티딜 웨პ티다아제-8 (DPP-VIII), 디펩티딜 웨პ티다아제-9 (DPP-IX), 디펩티딜 웨პ티다아제-10 (DPP-X)이 포함된다. 이런 디펩티다아제에 대한 기질 서열은 공지되어 있다.

[0037] 활성화가능 VIP의 N-말단은 구조 Z-N을 가질 수 있는데, 여기서 Z는 디펩티다아제에 대한 기질이고 (가령, Z는 디펩티다아제 노출에 의해 제거된다), 그리고 N은 VIP의 N-말단이다. 활성화가능 VIP는 화학식 M-X-N을 갖는 N-말단 서열을 보유할 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고, X는 Pro, Ala, 또는 Ser이고, 그리고 N은 VIP 또는 VIP 유사체의 N-말단이다. 이러한 방식으로, M과 X는 숙주 세포 (가령, 대장균(*E. coli*)), 및/또는 차후에, 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 민감하고, 그리고 이에 의해 제거될 것이다. 대안으로, 활성화가능 VIP의 N-말단 서열은 X1-X2-N일 수 있고, 여기서 X1은 Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val, 또는 Pro이고; X2는 Pro, Ala, 또는 Ser이고; 그리고 N은 VIP의 N-말단이다. X1-X2는 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 대한 기질이고, 그리고 디펩티다아제 절단은 N을 노출시켜 VIP 또는 VIP 유사체의 원하는 N-말단을 산출할 것이다 (가령, 서열 번호: 15, 도 2). 이들 구체예에서, 단백질은 숙주 세포 (가령, 대장균(*E. coli*))에서 M-X1-X2-N (여기서 M은 메티오닌)을 인코딩하는 구조체의 발현에 의해 생산될 수 있는데, 그 이유는 두 번째 위치에서 Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val, 또는 Pro가 Met의 제거를 신호하고, 따라서 N-말단 상에 X1-X2가 남겨질 것이고, 이는 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 의해 생체내에서 활성화될 수 있다. 활성화되면 자연 성숙 VIP N-말단을 보유하는 이런 활성화가능 VIP 분자는 수용체 선호를 나타내지 않는다.

[0038] 다른 구체예에서, 변형된 활성화가능 VIP의 N-말단은 구조 M-Z-N를 가질 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고, Z는 디펩티다아제에 대한 기질이고 (가령, Z는 디펩티다아제 노출에 의해 제거된다), 그리고 N은 활성 VIP (변형된 VIP)의 비-His N-말단이다. 가령, 변형된 활성화가능 VIP는 화학식 M-X-N을 갖는 N-말단 서열을 보유할 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고; X는 Pro, Ala, 또는 Ser이고; 그리고 N은 활성 VIP의 비-His N-말단이다. 이러한 방식으로, M과 X는 숙주 세포 (가령, 대장균(*E. coli*)), 및/또는 차후에, 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 민감하고, 그리고 이에 의해 제거될 것이다. 대안으로, 활성화가능 VIP의 N-말단 서열은 X1-X2-N일 수 있는데, 여기서 X1은 Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val, 또는 Pro이고; X2는 Pro, Ala, 또는 Ser이고; 그리고 N은 활성 VIP의 비-His N-말단이다. X1-X2는 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 대한 기질이고, 그리고 디펩티다아제 절단은 N을 노출시켜 VIP의 원하는 비-His N-말단을 산출할 것이다.

[0039] 또 다른 구체예에서, 변형된 활성화가능 VIP의 N-말단은 구조 M-Z-S-N을 가질 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고; Z는 디펩티다아제에 대한 기질이고 (가령, Z는 디펩티다아제 노출에 의해 제거된다); N은 성숙 VIP (His)의 N-말단이고; 그리고 S는 디펩티다아제 절단 이후에 노출되고, 그리고 앞서 기술된 바와 같이 변형된 VIP를 제공하는 하나 또는 그 이상의 아미노산이다. 가령, 변형된 활성화가능 VIP는 화학식 M-X-S-N을 갖는 N-말단 서열을 보유할 수 있는데, 여기서 M은 메티오닌이고, X는 Pro, Ala, 또는 Ser이고; N은 성숙 VIP의 N-말단이고; 그리고 S는 디펩티다아제 절단 이후에 노출되고, 그리고 수용체 선호를 제공하는 하나 또는 그 이상의 아미노산이다. 대안으로, 활성화가능 VIP의 N-말단 서열은 X1-X2-S-N일 수 있는데, 여기서 X1은 Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val, 또는 Pro이고; X2는 Pro, Ala, 또는 Ser이고; N은 VIP의 비-His N-말단이고; 그리고 S는 디펩티다아제 절단 이후에 노출되는 하나 또는 그 이상의 아미노산이다. X1-X2는 디펩티다아제 (가령, DPP-IV)에 대한 기질이고, 그리고 디펩티다아제 절단은 S를 노출시킬 것이다.

[0040]

이들 또는 다른 구체예에서, VIP N-말단에 대한 N-말단 화학적 변형은 수용체 선호를 제공할 수 있다. 단백질의 화학적 변형 및 이들의 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 무제한적 예시적인 화학적 변형은 PEG화, 메틸글리وك살화 (methylglyoxalation), 환원성 알킬화 (reductive alkylation), 과산화포름산 산화 (performic acid oxidation), 숙시닐화 (succinylation), 아미노에틸화 (aminoethylation), 그리고 리피데이션 (lipidation)이다 (Clifton, New Protein Techniques, New Jersey: Humana Press, 1985. ISBN. 0-89603-126-8. Volume. 3 of. Methods in Molecular Biology). 화학적 기, 예를 들면, PEG화는 기존 문헌에서 기술된 바와 같이 시스테인, 메티오닌, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 트립토판, 티로신, 카르복실 기의 변형에 의해 부착될 수 있다 (참조: Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press, 1995).

[0041]

생물탄력성 중합체에 응합

[0042]

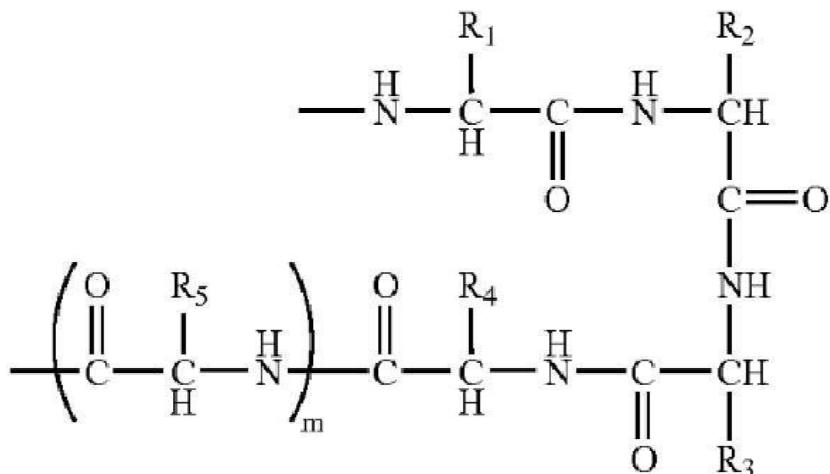
일부 구체예에서, 본 발명의 VIP는 N-말단 및/또는 C-말단 생물탄력성 중합체 성분을 내포한다. "생물탄력성 중합체 (bioelastic polymer)"는 역 온도 전이 (inverse temperature transition)를 나타낼 수 있다. 생물탄력성 중합체는 공지되어 있고 예로써, U.S. Pat. No. 5,520,672 (Urry *et al*)에서 기술된다. 생물탄력성 중합체는 펜타펩티드, 테트라펩티드, 및/또는 노나펩티드의 탄성중합체 단위를 포함하는 폴리펩티드 (가령, "엘라스틴-유사 펩티드")일 수 있다. 본 발명을 수행하는데 이용될 수 있는 생물탄력성 중합체는 생물탄력성 중합체를 형성하는데 이용될 수 있는 다수의 테트라펩티드와 펜타펩티드 반복 단위를 기술하는 U.S. Pat. No. 4,474,851에서 진술된다. 특정한 생물탄력성 중합체는 또한, U.S. Pat. No. 4,132,746; 4,187,852; 4,500,700; 4,589,882; 그리고 4,870,055에서 기술된다. 생물탄력성 중합체의 또 다른 실례는 U.S. Pat. No. 6,699,294, U.S. Pat. No. 6,753,311, 그리고 U.S. Pat. No. 6,063,061에서 진술된다. 이런 생물탄력성 중합체의 구조는 본 발명에 참고로서 포함된다.

[0043]

한 구체예에서, 생물탄력성 중합체는 일반식 $(VPGXG)_m$ 의 폴리펩티드인데, 여기서 X는 임의의 아미노산 (가령, Ala, Leu, Phe)이고 m은 대략 20 내지 대략 2000, 또는 대략 50 내지 대략 180이다. 예시적인 구체예에서, m은 60, 90, 120, 150, 또는 180이다. X의 실체뿐만 아니라 네 번째 아미노산으로서 다양한 아미노산의 빈도 역시 변할 수 있다.

[0044]

가령, 생물탄력성 중합체는 생물탄력성 펜타펩티드와 테트라펩티드에서 선택되는 반복 탄성중합체 단위를 포함할 수 있고, 여기서 이들 반복 단위는 소수성 아미노산 및 글리신 잔기로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 잔기를 포함하고, 그리고 이들 반복 단위는 하기 화학식의 베타-턴 (beta-turn)을 갖는 형태로 존재한다:



[0045]

여기서 R₁-R₅는 아미노산 잔기 1-5의 측쇄를 나타내고, 그리고 m은 반복 단위가 테트라펩티드일 때 0이고, 또는 반복 단위가 펜타펩티드일 때 1이다. 노나펩티드 반복 단위는 일반적으로, 순차적 테트라-와 펜타펩티드로 구성된다. 소수성 아미노산 잔기는 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 그리고 메티오닌에서 선택된다. 많은 경우에, 반복 단위의 첫 번째 아미노산 잔기는 발린, 류신, 이소류신 또는 페닐알라닌의 잔기이고; 두 번째 아미노산 잔기는 프롤린의 잔기이고; 세 번째 아미노산 잔기는 글리신의 잔기이고; 그리고 네 번째 아미노산 잔기는 글리신 또는 극소수성 잔기, 예를 들면, 트립토판, 페닐알라닌 또는 티로신이다. 특정

실례에는 테트라펩티드 Val-Pro-Gly-Gly, 테트라펩티드 GGVP, 테트라펩티드 GGFP, 테트라펩티드 GGAP, 펜타펩티드 Val-Pro-Gly-Val-Gly, 펜타펩티드 GVGVP, 펜타펩티드 GKGVP, 펜타펩티드 GVGFP, 펜타펩티드 GFGFP, 펜타펩티드 GEGVP, 펜타펩티드 GFGVP, 그리고 펜타펩티드 GVGIP가 포함된다. 예로써, U.S. Pat. No. 6,699,294를 참고한다.

- [0047] 일정한 예시적인 구체예에서, 본 발명의 VIP는 N-말단 및/또는 C-말단 ELP 성분을 내포한다. ELP 성분은 엘라스틴 단백질에 관련되거나, 또는 엘라스틴 단백질로부터 유래되는 구조 웹티드 단위 또는 서열을 포함하거나, 또는 이들로 구성된다. 이들 서열은 생물학적이용효율 (bioavailability), 치료 효과량 및/또는 투여 빈도, 생물학적 작용, 제제 용화성 (formulation compatibility), 단백질분해에 대한 내성, 용해도, 투여 이후에 체내에서 반감기 또는 지속성의 다른 척도, 및/또는 신체로부터 제거율 중의 하나 또는 그 이상에서 치료적 단백질의 특성을 향상시키는데 유용하다. 예로써, 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는 WO 2008/030968을 참고한다.
- [0048] ELP가 VIP의 C-말단에 배치될 때, VIP N-말단에서 앞서 기술된 바와 같은 추가적 변형, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 아미노산의 부가가 만들어질 수 있다. 대안적 구체예에서, VIP N-말단에서 이런 변형이 존재하지 않는다.
- [0049] ELP 성분은 3개 내지 대략 20개 아미노산, 또는 일부 구체예에서, 4개 내지 10개 아미노산, 예를 들면, 5개 또는 6개 아미노산의 구조 단위로부터 구축된다. 특정 ELP 성분 내에서 개별 구조 단위의 길이는 달라지거나 균일 할 수 있다. 일정한 구체예에서, ELP 성분은 반복 구조 단위의 폴리테트라-, 폴리펜타-, 폴리헥사-, 폴리헵타-, 폴리옥타, 그리고 폴리노나펩티드 모티프로 구축된다. 예시적인 구조 단위는 서열 번호: 1-12 (하기 참조)에 의해 정의된 단위를 포함하는데, 이들은 직렬-반복 단위를 비롯한 반복 구조 단위로서 이용되거나, 또는 일부 조합에서, 치료 성분의 특성을 향상시키는데 효과적인 ELP를 산출하는데 이용될 수 있다. 따라서 ELP 성분은 하기에 정의된 바와 같이, 서열 번호: 1-12에서 선택되는 구조 단위(들)를 포함하거나 이러한 구조 단위로 본질적으로 구성될 수 있다.
- [0050] 이런 구조 단위를 포함하는 ELP 성분은 다양한 크기를 가질 수 있다. 가령, ELP 성분은 서열 번호: 1-12에 의해 정의된 하나의 단위 또는 단위의 조합을 비롯하여, 대략 10개 내지 대략 500개 구조 단위, 또는 일정한 구체예에서 대략 20개 내지 대략 200개 구조 단위, 또는 일정한 구체예에서 대략 50개 내지 대략 150개 구조 단위, 또는 대략 75개 내지 대략 130개 구조 단위를 포함하거나 이를 구조 단위로 본질적으로 구성될 수 있다. ELP 성분은 서열 번호: 3 (하기에 정의됨)에 의해 정의된 구조 단위의 반복과 같은 대략 120개 구조 단위를 포함할 수 있다. 따라서 ELP 성분은 대략 50개 내지 대략 2000개 아미노산 잔기, 또는 대략 100개 내지 대략 600개 아미노산 잔기, 또는 대략 200개 내지 대략 500개 아미노산 잔기, 또는 대략 200개 내지 대략 400개 아미노산 잔기의 길이를 가질 수 있다.
- [0051] 일부 구체예에서, ELP 성분, 또는 일부 경우에, 치료제는 대략 150 kDa 이하, 또는 대략 100 kDa 이하, 또는 대략 55 kDa 이하, 또는 대략 50 kDa 이하, 또는 대략 40 kDa 이하, 또는 대략 30 또는 25 kDa 이하의 크기를 갖는다.
- [0052] 일부 구체예에서, 전이되지 않은 상태에서 ELP 성분은 신장 여과를 피하기 위하여, 연장되고 상대적으로 체계화되지 않은 비-구형 형태를 가질 수 있다. 이런 구체예에서, 본 발명의 치료제는 신장을 통한 여과에 대한 일반적으로 인정되는 컷-오프 (cut-off) 이하의 분자량, 예를 들면, 대략 60 kD 이하, 또는 일부 구체예에서, 대략 55, 50, 45, 40, 30, 또는 25 kDa 이하의 분자량을 갖고, 그리고 그럼에도 불구하고, 결합되지 않은 (가령, 융합되지 않은 또는 접합되지 않은) 치료적 대응물보다 적어도 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 또는 100-배 길게 체내에서 존속한다.
- [0053] 이들 또는 다른 구체예에서, ELP 성분은 치료적 웹티드의 생물학적 작용에 실질적으로 또는 유의미하게 영향을 주지 않는다. 따라서 본 발명의 VIP와 ELP 융합은 융합되지 않은 대응물과 동일하거나 유사한 효능 (생물학적 작용)을 나타낼 수 있다. 본 발명의 VIP와 ELP 융합은 동일한 분석평가에서 융합되지 않은 대응물이 나타내는 생물학적 작용 (가령, 시험관내에서 또는 생체내에서 조사될 때)의 효능 또는 수준의 10-100% 효능 또는 수준을 나타낼 수 있다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 (활성화된) VIP와 ELP 융합은 융합되지 않은 대응물이 나타내는 생물학적 작용 (가령, 시험관내에서 또는 생체내에서 조사될 때)의 효능 또는 수준의 적어도 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 효능 또는 수준을 나타낼 수 있다.
- [0054] 일정한 구체예에서, ELP 성분은 가역적 역상 전이 (reversible inverse phase transition)를 겪는다. 다시 말하면, 이들 ELP 성분은 전이 온도 (transition temperature, T_t) 이하에서 구조적으로 무질서하고 물에서 고도

로 용해성이지만, 온도가 Tt 이상으로 상승될 때 가파른 (2-3°C 범위) 무질서에서 질서로의 상 전이 (disorder-to-order phase transition)를 나타내고, 이들 ELP 성분의 탈용매화와 집합으로 이어진다. 가령, ELP는 충분한 크기에 도달할 때 불용성 중합체를 형성하고, 이들 중합체는 원심분리에 의해 용액으로부터 쉽게 제거되고 분리될 수 있다. 이런 상 전이는 가역적이고, 그리고 분리된 불용성 ELP는 온도가 이들 ELP의 Tt 이하로 되돌아갈 때 완충액 용액에 완전히 재용해될 수 있다. 따라서 본 발명의 치료제는 일부 구체예에서, 역 전이 사이클링 절차 (inverse transition cycling procedure)를 이용하여, 예를 들면, 치료제의 온도-의존성 용해도, 또는 매체에 염 부가를 이용하여 다른 오염 단백질로부터 높은 순도로 구분될 수 있다. 높은 정도의 순도를 획득하기 위하여 연속적인 역상 전이 사이클이 이용될 수 있다. 온도 및 이온 강도 이외에, 치료제의 역 전이를 조절하는데 유용한 다른 환경 변수에는 pH, 무기와 유기 용질과 용매의 첨가, 측쇄 이온화 또는 화학적 변형, 그리고 압력이 포함된다.

- [0055] 일정한 구체예에서, ELP 성분은 가역적 역상 전이를 겪지 않거나, 또는 생물학적으로 관련된 Tt에서 이런 전이를 겪지 않고, 따라서 이러한 분자의 생물학적 및/또는 생리학적 특성 (본 명세서의 다른 곳에서 기술됨)에서 향상은 임의의 상 전이 특성과 완전히 또는 실질적으로 무관할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이런 상 전이 특성은 예로써, 이런 분자의 회수와 정제에 관하여 추가적인 실용적 이점을 제공할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 실시에서, ELP 성분은 치료 조성물에서 VIP 성분을 안정화시키거나, 또는 달리 향상시키는 기능을 한다. VIP 치료제가 필요한 환자에 결합된 VIP-ELP 구조체의 투여 이후에, VIP 성분 및 ELP는 서로 결합된 상태로 존속하고, 이때 상기 VIP는 예로써, 질환 상태 또는 생리학적 장애의 치료 또는 예방, 또는 다른 치료적 개입을 위하여 치료 활성적이다.
- [0057] 일정한 구체예에서, ELP 성분(들)은 하기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 구조 단위로 형성될 수 있다:
- [0058] (a) 테트라펩티드 Val-Pro-Gly-Gly, 또는 VPGG (서열 번호: 1);
- [0059] (b) 테트라펩티드 Ile-Pro-Gly-Gly, 또는 IPGG (서열 번호: 2);
- [0060] (c) 웅타펩티드 Val-Pro-Gly-X-Gly (서열 번호: 3), 또는 VPGXG, 여기서 X는 임의의 자연 또는 비-자연 아미노산 잔기이고, 그리고 X는 선택적으로, 중합성 또는 소중합성 반복 사이에서 변한다;
- [0061] (d) 웅타펩티드 Ala-Val-Gly-Val-Pro, 또는 AVGVP (서열 번호: 4);
- [0062] (e) 웅타펩티드 Ile-Pro-Gly-X-Gly, 또는 IPGXG (서열 번호: 5), 여기서 X는 임의의 자연 또는 비-자연 아미노산 잔기이고, 그리고 X는 선택적으로, 중합성 또는 소중합성 반복 사이에서 변한다;
- [0063] (e) 웅타펩티드 Ile-Pro-Gly-Val-Gly, 또는 IPVG (서열 번호: 6);
- [0064] (f) 웅타펩티드 Leu-Pro-Gly-X-Gly, 또는 LPGXG (서열 번호: 7), 여기서 X는 임의의 자연 또는 비-자연 아미노산 잔기이고, 그리고 X는 선택적으로, 중합성 또는 소중합성 반복 사이에서 변한다;
- [0065] (g) 웅타펩티드 Leu-Pro-Gly-Val-Gly, 또는 LPGVG (서열 번호: 8);
- [0066] (h) 핵사펩티드 Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly, 또는 VAPGVG (서열 번호: 9);
- [0067] (I) 옥타펩티드 Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly, 또는 GVGVPVG (서열 번호: 10);
- [0068] (J) 노나펩티드 Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Gly-Ala-Gly, 또는 VPGFGVGAG (서열 번호: 11); 그리고
- [0069] (K) 노나펩티드 Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Gly, 또는 VPGVGVPGG (서열 번호: 12).

- [0070] 서열 번호:1-12에 의해 정의된 이런 구조 단위는 구조 반복 단위를 형성하거나, 또는 본 발명에 따른 ELP 성분을 형성하기 위하여 조합으로 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, ELP 성분은 서열 번호: 1-12에서 선택되는 하나 또는 조합 (가령, 2, 3 또는 4개) 구조 단위로 완전히 (또는 거의 완전히) 형성된다. 다른 구체예에서, ELP 성분의 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%는 서열 번호: 1-12에서 선택되는 하나 또는 조합의 구조 단위로 형성되고, 그리고 이들은 반복 단위로서 존재할 수 있다.
- [0071] 일정한 구체예에서, ELP 성분(들)은 웅타펩티드 Val-Pro-Gly-X-Gly (서열 번호: 3)의 직렬 반복 단위를 비롯한 반복 단위를 내포하고, 여기서 X는 앞서 정의된 바와 동일하고, 그리고 여기서 전체 ELP 성분 (이는 VPGXG (서열 번호: 3) 이외의 구조 단위를 포함할 수 있다)에 대하여 취해진 Val-Pro-Gly-X-Gly (서열 번호: 3) 웅타펩티

드 단위의 비율은 ELP 성분의 대략 75% 이상, 또는 대략 85% 이상, 또는 대략 95% 이상이다. ELP 성분은 서열 번호: 3의 펜타펩티드의 5 내지 15-단위 반복 (가령, 대략 10-단위 또는 대략 12-단위 반복)를 갖는 모티프를 내포할 수 있는데, 게스트 잔기 (guest residue) X는 각 반복 내에서 적어도 2개 또는 적어도 3개의 구조 단위 사이에서 변한다. 이들 게스트 잔기는 예로써, 아미노산 V, I, L, A, G, 그리고 W에서 독립적으로 선택될 수 있다 (그리고 원하는 역상 전이 특성을 유지하도록 선택될 수 있다). 예시적인 모티프에는 VPGXG (서열 번호: 3) 가 포함되고, 여기서 게스트 잔기는 V (이는 구조 단위의 40% 내지 60%로 존재할 수 있다), G (이는 구조 단위의 20% 내지 40%로 존재할 수 있다), 그리고 A (이는 구조 단위의 10% 내지 30%로 존재할 수 있다)이다. 반복 모티프 자체가 예시적인 ELP 성분을 산출하기 위하여 예로써, 대략 5 내지 대략 20회, 예를 들면, 대략 8 내지 15회 (가령, 대략 12회) 반복될 수 있다. 본 단락에서 기술된 바와 같은 ELP 성분은 당연히, 서열 번호: 1-12에 의해 정의된 구조 단위 중에서 임의의 한 가지, 또는 이들의 조합으로부터 구축될 수 있다. VIP의 C-말단에 융합된 예시적인 ELP 성분은 도 1에서 도시된다.

[0072] 일부 구체예에서, ELP 단위는 엘라스틴-유사 특성 (가령, 역상 전이)을 제공하는 β -턴 구조를 형성할 수 있다. β -턴 구조를 산출하는데 적합한 예시적인 펩티드 서열은 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는 International Patent Application PCT/US96/05186에서 기술된다. 가령, 엘라스틴 펜타펩티드 서열, VPGXG (서열 번호: 3)에서 네 번째 잔기 (X)는 β -턴의 형성을 제거하지 않으면서 변경될 수 있다.

[0073] 일정한 구체예에서, ELP 성분은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호: 3)의 중합성 또는 소중합성 반복을 포함하고, 여기서 게스트 잔기 X는 임의의 아미노산이다. X는 자연 발생 또는 비-자연 발생 아미노산일 수 있다. 일부 구체예에서, X는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린에서 선택된다. 일부 구체예에서, X는 프롤린 또는 시스테인 이외의 자연 아미노산이다.

[0074] 게스트 잔기 X (가령, 서열 번호: 3, 또는 다른 ELP 구조 단위에 대하여)는 비-고전적 (비-유전적으로 인코딩된) 아미노산일 수 있다. 비-고전적 아미노산의 실례에는 하기가 포함된다: 일반 아미노산의 D-이성질체, 2,4-디아미노부티르산, α -아미노 이소부티르산, A-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, γ -Abu, ε -Ahx, 6-아미노 헥사노익산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테란, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, β -알라닌, 플루오르-아미노산, 디자이너 아미노산, 예를 들면, β -메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, N α -메틸 아미노산, 그리고 전반적으로, 아미노산 유사체.

[0075] X의 선택은 각 ELP 구조 단위 (가령, 게스트 잔기 X를 보유하는 본 명세서에서 정의된 각 구조 단위)에서 독립적일 수 있다. 가령, X는 각 구조 단위에 대하여, 양으로 하전된 측쇄를 갖는 아미노산, 음으로 하전된 측쇄를 갖는 아미노산, 또는 일부 구체예에서, 소수성 측쇄를 비롯한 중성 측쇄를 갖는 아미노산으로서 독립적으로 선택될 수 있다.

[0076] 또 다른 구체예에서, ELP 성분(들)은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3), IPGXG (서열 번호:5) 또는 LPGXG (서열 번호:7), 또는 이들의 조합의 중합성 또는 소중합성 반복을 포함할 수 있고, 여기서 X는 앞서 정의된 바와 동일하다.

[0077] 각 구체예에서, ELP 서열의 이를 구조 단위, 또는 일부 경우에, 중합성 또는 소중합성 반복은 상기 문자의 전반적인 효과, 다시 말하면, 기술된 바와 같은 치료 성분에 일정한 향상의 제공을 제거하지 않는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에 의해 구분될 수 있다. 일정한 구체예에서, 이런 하나 또는 그 이상의 아미노산은 또한, ELP 성분의 상 전이 특성을 제거하지 않거나, 또는 이들 특성에 실질적인 영향을 주지 않는다 (이런 하나 또는 그 이상의 아미노산의 결실에 상대적).

[0078] 결과의 ELP 성분의 구조는 표기법 ELP k [X $_i$ Y $_j$ -n]을 이용하여 기술될 수 있는데, 여기서 k는 특정 ELP 반복 단위를 표시하고, 괄호안 대문자는 단일 문자 아미노산 코드이고, 그리고 이들의 상응하는 첨자는 구조 단위 내에서 각 게스트 잔기 X (적용가능하면)의 상대적 비율을 표시하고, 그리고 n은 구조 반복의 총수에서 ELP의 총 길이를 표시한다. 가령, ELP1 [V₅A₂G₃-10]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 10개 반복 단위를 내포하는 ELP 성분을 표시하고, 여기서 X는 5:2:3의 상대적 비율에서 발린, 알라닌, 그리고 글리신이고; ELP1 [K₁V₂F₁-4]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 4개 반복 단위를 내포하는 ELP 성분을 표시하고, 여기서 X는 1:2:1의 상대적 비율에서 리신, 발린, 그리고 페닐알라닌이고; ELP1 [K₁V₂F₁-9]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 9개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고, 여기서 X는 1:7:1의 상대적 비율에서 리신, 발린, 그리고 페닐알라닌이고;

ELP1 [V₁A₈G₇-10]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 10개 반복 단위를 내포하는 ELP 성분을 표시하고, 여기서 X는 1:8:7의 상대적 비율에서 발린, 알라닌, 그리고 글리신이고; ELP1 [V-5]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 5개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고, 여기서 X는 베타적으로 발린이고; ELP1 [V-20]은 펜타펩티드 VPGXG (서열 번호:3)의 20개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고, 여기서 X는 베타적으로 발린이고; ELP2 [5]는 펜타펩티드 AVGVP (서열 번호:4)의 5개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고; ELP3 [V-5]은 펜타펩티드 IPGXG (서열 번호:5)의 5개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고, 여기서 X는 베타적으로 발린이고; ELP4 [V-5]는 펜타펩티드 LPGXG (서열 번호:7)의 5개 반복 단위를 내포하는 폴리펩티드를 표시하고, 여기서 X는 베타적으로 발린이다. 본 단락에서 기술된 바와 같은 이들 ELP 성분은 본 발명과 관련하여, 치료 성분의 치료적 특성을 증가시키는데 이용될 수 있다.

[0079] 게다가, Tt는 게스트 잔기의 소수성의 함수이다. 따라서 게스트 잔기(들)의 실체 및 그들의 몰 분율 (mole fraction)(들)을 변화시킴으로써, 0-100°C 범위 이상에서 역 전이를 나타내는 ELP가 합성될 수 있다. 따라서 소정의 ELP 길이에서 Tt는 ELP 서열 내에 더욱 큰 분율의 소수성 게스트 잔기를 함입함으로써 감소될 수 있다. 적절한 소수성 게스트 잔기의 실례에는 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함된다. 중간 정도로 소수성인 티로신 역시 이용될 수 있다. 반대로, Tt는 잔기, 예를 들면, 글루타민산, 시스테인, 리신, 아스파르트산염, 알라닌, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 글리신, 아르기닌, 그리고 글루타민으로 구성된 군에서 선택되는 잔기; 바람직하게는, 알라닌, 세린, 트레오닌 및 글루타민으로 구성된 군에서 선택되는 잔기를 함입함으로써 증가될 수 있다.

[0080] ELP 성분은 일부 구체예에서, 대략 10 내지 대략 80°C, 예를 들면, 대략 35 내지 대략 60°C, 또는 대략 38 내지 대략 45°C 범위의 Tt (생리학적 조건 하에)를 제공하도록 선택되거나 설계된다. 일부 구체예에서, Tt는 대략 40°C 이상, 또는 대략 42°C 이상, 또는 대략 45°C 이상, 또는 대략 50°C 이상이다. 전이 온도는 일부 구체예에서, 개체 또는 환자의 체온 이상이고 (가령, >37°C), 따라서 생체내에서 가용성 상태로 남아있거나, 또는 다른 구체예에서, Tt는 체온 이하이고 (가령, < 37°C), 따라서 대안적 이점, 예를 들면, 치료제의 지속된 방출을 위한 약물 저장소 (drug depot)의 생체내 형성을 제공한다. 예로써, 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는 US 2007/0009602를 참고한다.

[0081] ELP 성분의 Tt는 ELP 사슬 길이를 변화시킴으로써 변경될 수 있는데, 그 이유는 Tt가 일반적으로, MW가 감소함에 따라 증가하기 때문이다. 문자량 > 100,000을 갖는 폴리펩티드의 경우에, Urry 등 (PCT/US96/05186, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입됨)에 의해 개발된 소수성 등급 (hydrophobicity scale)은 특정 ELP 서열에 대한 근사 Tt를 예측하기 위한 한 가지 수단을 제공한다. 하지만, 일부 구체예에서, ELP 성분 길이는 ELP 서열 내에 더욱 큰 분율의 소수성 게스트 잔기 (가령, 소수성 측쇄를 보유하는 아미노산 잔기)를 함입함으로써, 표적 Tt를 유지하면서 상대적으로 작게 유지될 수 있다. 문자량 <100,000을 갖는 폴리펩티드의 경우에, Tt는 하기 이차 함수 (quadratic function)에 의해 예측되거나 결정될 수 있다: $Tt = M_0 + M_1X + M_2X^2$, 여기서 X는 용합 단백질의 MW이고, 그리고 $M_0 = 116.21$; $M_1 = -1.7499$; $M_2 = 0.010349$ 이다.

[0082] ELP 성분, 그리고 그 결과로서, 치료 성분에 결합된 ELP 성분의 Tt가 게스트 잔기, X의 실체와 소수성에 의해 영향을 받긴 하지만, 상기 문자의 추가적 특성 역시 영향을 받을 수 있다. 이런 특성에는 상기 문자의 용해도, 생물학적이용효율, 지속성, 반감기, 효능 및 안전성이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0083] 하기 실시예 섹션에서, ELP-결합된 VIP 작용체는 VIP의 용합되지 않은 형태와 비교하여, 고유 VIP의 생물학적 활성의 상당량을 유지하는 것으로 확인된다. 부가적으로, ELP는 긴 반감기를 나타내는 것으로 확인된다. 따라서 ELP는 본 발명에 따라서, 유리 (접합되지 않은) 형태의 치료제의 반감기와 비교하여, ELP와 접합될 때 VIP의 반감기를 실질적으로 (가령, 특정 구체예에서 10%, 20%, 30%, 50%, 100%, 200% 또는 그 이상) 증가시키는데 이용될 수 있다. 연장된 순환 반감기를 갖는 변형된 VIP는 주 1회 내지 대략 10회, 예를 들면, 주 1회 내지 대략 5회, 또는 주 1회 내지 대략 3회 투여될 수 있다. 변형된 VIP 또는 이를 포함하는 제약학적 조성물은 대략 하루 1회, 또는 대략 2일 마다 1회, 또는 대략 3일 마다 1회, 또는 대략 주 1회 (즉, 매주 1회 투약) 투여될 수 있다.

접합 (conjugation) 및 결합 (coupling)

[0084] 본 발명의 일정한 구체예에 따라서, 재조합-생산된 VIP 용합 단백질은 유전적 융합 (genetic fusion)에 의해 서로 연결된 융합 성분 (가령, ELP) 및 VIP 또는 VIP 유사체를 포함한다. 가령, 융합 단백질은 ELP 성분과 인-프레임 (in-frame)으로 클로닝된 VIP 또는 VIP 유사체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 번역에 의해 산출될 수

있다.

[0086] 일정한 구체예에서, ELP 성분 및 VIP 또는 VIP 유사체는 더욱 큰 물리적 구분을 제공하고 융합된 부분 간에 더욱 높은 공간적 이동성 (spatial mobility)을 허용하고, 따라서 예로써, 동계 수용체 (cognate receptor)에 결합을 위한 VIP 또는 VIP 유사체의 접근성 (accessibility)을 극대화시키기 위하여, 다양한 길이의 링커 웨티드를 이용하여 융합될 수 있다. 링커 웨티드는 유연하거나 덜 견고한 아미노산으로 구성될 수 있다. 가령, 유연성 링커는 상대적으로 작은 측쇄를 보유하고 친수성이 아미노산을 포함할 수 있다. 제한 없이, 유연성 링커는 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함할 수 있다. 더욱 견고한 링커는 예로써, 입체구조적으로 더욱 방해성 아미노산 측쇄, 예를 들면, (제한 없이) 티로신 또는 히스티딘을 내포할 수 있다. 링커는 대략 50, 40, 30, 20, 10, 또는 5 개 아미노산 잔기 이하일 수 있다. 링커는 예로써, 재조합 융합을 통해, VIP 또는 VIP 유사체 및 ELP 성분에, 그리고 이를 사이에 공유 연결될 수 있다.

[0087] 링커 또는 웨티드 스페이서는 프로테아제-절단가능성 또는 비-절단가능성일 수 있다. 실례로써, 절단가능성 웨티드 스페이서에는 제한 없이, 다양한 유형의 프로테아제 (시험관내 또는 생체내), 예를 들면, Tev, 트롬빈, 인자 Xa, 플라스민 (혈액 프로테아제), 메탈로프로테아제, 카텝신 (가령, GFLG, 서열 번호: 47 등), 그리고 다른 유체 구획 (corporeal compartment)에서 관찰되는 프로테아제에 의해 인식되는 웨티드 서열이 포함된다. 절단가능성 링커를 이용하는 일부 구체예에서, 융합 단백질은 융합체로서 비활성이거나, 덜 활성적이거나, 또는 덜 효과적일 수 있고, 이것은 이후, 생체내에서 스페이서의 절단 시에 활성화된다. 대안으로, 치료제가 융합체로서 충분히 활성적인 경우에, 비-절단가능성 스페이서가 이용될 수도 있다. 비-절단가능성 스페이서는 예로써, 화학식 $[(\text{Gly})_n-\text{Ser}]_m$ 을 갖는 비-절단가능성 스페이서 모이어티 (여기서 n은 1 내지 4, 총괄적이고, 그리고 m은 1 내지 4, 총괄적이다)를 비롯한 임의의 적절한 유형일 수 있다. 대안으로, 중추 ELP와 상이한 짧은 ELP 서열이 필요한 효과를 달성하면서, 링커 또는 스페이서 대신에 이용될 수 있다.

[0088] 또 다른 구체예에서, 치료제는 각 말단에서 ELP 성분에 의해 접하는 치료 성분을 갖는 재조합 융합체이다. 상기 ELP 성분 중에서 적어도 하나는 절단가능성 스페이서를 통해 부착될 수 있고, 따라서 치료 성분은 비활성화지만, 단일 ELP 성분의 단백질분해 제거에 의해 생체내에서 활성화된다. 결과의 단일 ELP 융합체는 활성적이고, 그리고 생체내에서 증강된 반감기 (또는 본 명세서에서 기술된 다른 특성)를 갖는다.

[0089] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 VIP 또는 VIP 유사체 및 ELP 성분의 화학적 접합체를 제시한다. 이를 접합체는 당분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 ELP 성분을 VIP 또는 VIP 유사체에 화학적으로 결합시킴으로써 만들 어질 수 있다 (참조: Nilsson et al., 2005, *Ann Rev Biophys Bio Structure* 34: 91-118). 일부 구체예에서, 화학적 접합체는 직접적으로, 짧은 또는 긴 링커 모이어티를 통해, 또는 치료적 단백질성 성분 상에서 하나 또는 그 이상의 기능기, 예를 들면, 아민, 카르복실, 폐닐, 티올 또는 히드록실 기를 통해, VIP 또는 VIP 유사체를 ELP 성분에 공유 연결하여 공유 접합체를 형성함으로써 형성될 수 있다. 다양한 전통적인 링커, 예를 들면, 디이소시아네이트, 디이소티오시아네이트, 카르보디이미드, 비스 (히드록시숙신이미드) 에스테르, 말레이이미드-히드록시숙신이미드 에스테르, 글루타르알데히드 등이 이용될 수 있다.

[0090] 비-웨티드 화학적 스페이서는 부가적으로, 예로써 *Bioconjugate Techniques*, Greg T. Hermanson, published by Academic Press, Inc., 1995에서 기술된 기능적 링커, 그리고 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Illinois)로부터 입수 가능한 Cross-Linking Reagents Technical Handbook에서 명시된 것들을 비롯한 임의의 적절한 유형일 수 있고, 이들의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 예시적인 화학적 스페이서에는 Lys의 아민 기에 부착될 수 있는 동종이중기능적 링커, 그리고 한쪽 말단에서 Cys 및 다른 말단에서 Lys에 부착될 수 있는 이중이중기능적 링커가 포함된다.

[0091] 일정한 구체예에서, 실온 (또는 인간 체온, 예를 들면, $T_t > 37^\circ\text{C}$)에서 전이되지 않는 상대적으로 작은 ELP 성분 (가령, 대략 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 또는 10 kDa 이하의 ELP 성분)은 화학적으로 결합되거나 교차 연결된다. 가령, 동일하거나 상이한 특성을 갖는 2개의 상대적으로 작은 ELP 성분이 화학적으로 결합될 수 있다. 이런 결합은 일부 구체예에서, ELP의 C-말단에서 또는 C-말단 인근에서 단일 시스테인 잔기의 부가에 의해 생체내에서 일어날 수 있다. 이들 ELP 성분은 각각, 표적에서 활성 또는 친화력 (avidity)을 증가시키기 위하여, 하나 또는 그 이상의 치료 성분에 융합될 수 있다.

폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포, 그리고 생산 방법

[0093] 다른 측면에서, 본 발명에서는 본 발명의 변형된 VIP를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제시한다. 이런 폴리뉴클레오티드는 VIP 또는 VIP 유사체 및 융합 서열을 인코딩하는 서열 이외에, 하나

또는 그 이상의 발현 제어 요소 (control element)를 더욱 포함할 수 있다. 가령, 폴리뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 프로모터 또는 전사 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 신호, 그리고 폴리아데닐화 신호를 발현 제어 요소로서 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 적절한 벡터 내에 삽입될 수 있고, 상기 벡터는 발현을 위한 임의의 적절한 숙주 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*) 내에 포함될 수 있다.

[0094] 일반적으로, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 치료제의 발현을 위하여 세포 내로 도입될 수 있다. 벡터는 치료제를 인코딩하는 삽입체가 전사될 수만 있으면, 에피솜 상태로 남아있거나, 또는 염색체에 통합될 수 있다. 벡터는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 작제될 수 있다. 벡터는 플라스미드, 파지 (phage), 코스미드 (cosmid), 파지미드 (phagemid), 바이러스, 또는 원핵 또는 진핵 세포에서 복제와 발현에 이용되는 당분야에 공지된 임의의 다른 유형일 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 매우 다양한 전사 신호, 예를 들면, 프로모터 및 프로모터 상에 RNA 중합효소의 결합을 조절하는 기타 서열을 비롯하여 당분야에 공지된 매우 다양한 성분 (가령, 발현 제어 요소)이 이런 벡터 내에 포함될 수 있다. 벡터가 발현될 세포에서 효과적인 것으로 공지된 임의의 프로모터가 치료제의 발현을 개시하는데 이용될 수 있다. 적절한 프로모터는 유도성 또는 구조성일 수 있다.

[0095] 일정한 구체예에서, 변형된 VIP는 대장균(*E. coli*) 또는 기타 세균 발현 시스템으로부터 발현된다. 대장균(*E. coli*)은 일반적으로, 발현 동안 N-말단 메티오닌을 제거하지 않을 것이고, 따라서 변형된 VIP 분자는 수용체 특이성을 유지한다. 효모 발현 시스템, 포유동물 세포 발현 시스템, 그리고 배콜로바이러스 시스템을 비롯한 다른 발현 시스템이 본 발명에 따라서 이용될 수도 있다.

[0096] 치료적 단백질은 ELP 융합 서열을 이용할 때, 역 온도 사이클링 (inverse temperature cycling)에 의해 회수될 수 있다. 구체적으로, 앞서 기술된 바와 같이, ELP 성분은 가역적 역상 전이를 겪는다. 다시 말하면, 이들 ELP 성분은 전이 온도 (transition temperature, Tt) 이하에서 구조적으로 무질서하고 물에서 고도로 용해성이지만, 온도가 Tt 이상으로 상승될 때 가파른 (2-3°C 범위) 무질서에서 질서로의 상 전이 (disorder-to-order phase transition)를 나타내고, 이들 ELP 성분의 탈용매화와 집합으로 이어진다. 가령, ELP는 충분한 크기에 도달할 때 불용성 중합체를 형성하고, 이들 중합체는 원심분리에 의해 용액으로부터 쉽게 제거되고 분리될 수 있다. 이런 상 전이는 가역적이고, 그리고 분리된 불용성 ELP는 온도가 이들 ELP의 Tt 이하로 되돌아갈 때 완충액 용액에 완전히 재용해될 수 있다. 따라서 본 발명의 치료제는 일부 구체예에서, 역 전이 사이클링 절차 (inverse transition cycling procedure)를 이용하여, 예를 들면, 치료제의 온도-의존성 용해도, 또는 매체에 염 부가를 이용하여 다른 오염 단백질로부터 높은 순도로 구분될 수 있다. 높은 정도의 순도를 획득하기 위하여 연속적인 역상 전이 사이클이 이용될 수 있다. 온도 및 이온 강도 이외에, 치료제의 역 전이를 조절하는데 유용한 다른 환경 변수에는 pH, 무기와 유기 용질과 용매의 첨가, 측쇄 이온화 또는 화학적 변형, 그리고 압력이 포함된다.

제약학적 조성물 및 투여 방법

[0097] 더 나아가, 본 발명에서는 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제와 함께 본 발명의 변형된 VIP (앞서 기술된 바와 같음)의 효과량을 포함하는 제약학적 조성물을 제시한다. 이런 제약학적 조성물은 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예로써 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하거나 개선하는데 효과적이다.

[0099] 본 발명의 치료제는 제약학적으로 허용되는 에스테르, 염, 그리고 이들의 다른 생리학적으로 기능적 유도체를 비롯한 다양한 형태뿐만 아니라 그 자체로 투여될 수 있다. 이런 제약학적 제제에서, 이들 치료제는 단독으로, 또는 다른 치료적 성분, 예를 들면, 항-염증제 또는 면역억제제와 함께 (이들과 함께 조제 포함) 이용될 수 있다.

[0100] 담체(들)는 제제의 다른 성분과 융화성이고 이의 수용자에게 과도하게 유해하지 않다는 의미에서 제약학적으로 허용되어야 한다.

[0101] 치료제의 제제에는 비주사형 (non-parenteral) 투여뿐만 아니라 비경구 투여에 적합한 것들이 포함된다. 예시적인 투여 양식에는 특히, 경구, 협점막, 국소, 비부, 피하, 근육내, 그리고 정맥내가 포함된다. 비경구 투여에 적합한 제제가 바람직하다.

[0102] 본 발명의 치료제를 포함하는 제제는 단위 제형 (unit dosage form)으로 편의하게 제공될 수 있고 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이런 방법은 일반적으로, 이들 치료제를 하나 또는 그 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 전형적으로, 제제는 치료제를 액상 담체, 미세하게 갈라진 고형 담체, 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 결합시키고, 이후 필요하면, 산물을 원하는 제제의 제형으로 구현함으로써 제조된다.

[0103] 비경구 투여에 적합한 제제는 치료제의 무균 수성 제조물을 편의하게 포함하는데, 이것은 바람직하게는, 수용자

의 혈액과 등장성이다 (가령, 생리학적 염수 용액). 이런 제제는 혼탁제 (suspending agent)와 농후제 (thickening agent), 또는 치료제를 순환계 또는 하나 또는 그 이상의 장기로 표적화시키도록 설계된 기타 미립자 시스템 (microparticulate system)을 포함할 수 있다. 이들 제제는 단위-투약 또는 다중-투약 형태로 제공될 수 있다.

[0104] 전술한 성분 이외에, 본 발명의 제제는 희석제, 완충제, 방향제, 봉해제, 표면활성제, 농후제, 윤활제, 보존제 (항산화제 포함) 등에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 보조 성분(들)을 더욱 포함할 수 있다.

[0105] 당업자가 각 경우에서 바람직한 용량 (저장소 투여를 위한 단위 용량 포함)을 결정할 수 있긴 하지만, 치료적 혜택의 달성을 위한 치료제의 적절한 용량은 예로써, 수용자의 체중 킬로그램 당 대략 1 마이크로그램 (μg) 내지 대략 100 밀리그램 (mg)의 범위, 또는 체중 킬로그램 당 대략 10 μg 내지 대략 50 mg의 범위, 또는 체중 킬로그램 당 대략 10 μg 내지 대략 10 mg의 범위 내에 있을 수 있다. 원하는 용량은 1회 복용량, 또는 투약 기간 (가령, 1주, 2주 등) 내내 적절한 간격에서 투여되는 2회 또는 그 이상의 하위-복용량으로서 제공될 수 있다. 이들 하위-복용량은 단위 제형에서 투여될 수 있고, 예로써 단위 제형 당 대략 10 μg 내지 대략 500 mg, 또는 대략 50 μg 내지 대략 200 mg, 또는 대략 50 μg 내지 대략 100 mg의 활성 성분을 내포한다. 대안으로, 수용자의 상태에 의해 요구되면, 용량은 연속 주입으로서 투여될 수도 있다.

[0106] 투여 양식 및 제형은 당연히, 소정의 치료 적용에 바람직하고 유효한 펩티드 활성 치료제의 치료량에 영향을 줄 것이다. 가령, 경구 투여된 용량은 비경구 투여 방법에 이용된 용량 수준의 적어도 2배, 예를 들면, 2-10배일 수 있다. 저장소 제제는 또한, 훨씬 많은 치료제가 전달될 수 있도록 할 것이고, 따라서 상기 작용제는 시간의 흐름에서 지속된 방출을 가질 것이다.

[0107] 정상 개체의 혈장에서 순환하는 VIP는 위장관 내에 VIP-내포 신경 섬유 (nerve fiber)로부터 기원하고, 또한 맥관벽 신경 (vascular nerve)으로부터 펩티드 유출을 반영한다 (Cugini *et al.*, 1991, *Reg Pept* 34: 141-8). 대부분의 혈관활성 단백질과 유사하게, VIP는 상대적으로 짧은 반감기를 갖는다. 혈액 내에서 VIP의 반감기는 2분 이하이다 (Domschke *et al.*, 1978, *Gut* 19: 1049-53; Burhol *et al.*, 1978, *Scand J Gastroenterol* 13: 807-813). 본 명세서에서 기술된 변형된 VIP의 한 가지 이점은 체내에서 연장된 반감기 또는 지속성이다. 본 발명의 일정한 구체예에 따라서, VIP는 주 1회 내지 대략 10회, 예를 들면, 주 1회 내지 대략 5회, 또는 주 1회 내지 대략 3회 투여될 수 있다. 변형된 VIP 또는 이를 포함하는 제약학적 조성물은 대략 하루 1회, 또는 대략 2일 마다 1회, 또는 대략 3일 마다 1회, 또는 대략 주 1회 투여될 수 있다.

[0108] 일정한 구체예에서, 변형된 VIP는 비경구, 예를 들면, 피하 또는 근육내 주사로 투여된다. 투여는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 변형된 VIP의 단위 용량일 수 있다.

[0109] 변형된 VIP는 비경구 투여될 때, 하루 1회, 또는 주 1회 또는 2회, 또는 월 1회 내지 5회 투여될 수 있다. 이들 구체예에서, 변형된 VIP는 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 상대적으로 적은 빈도의 투여로 지속된 활성을 제공하기 위하여, 순환 상태에서 존속하는 가용성 융합 펩티드로서 투여될 수 있다. 변형된 VIP는 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 시간의 흐름에서 순환계 내로 융합 펩티드의 지속된 방출을 제공하기 위하여 약물 저장소로서 투여될 수 있다. 본 발명에 참조로서 편입되는 US 2007/0009602를 참고한다.

이용 방법

[0111] 다른 측면에서, 본 발명에서는 포유동물에서 질환을 치료하거나, 개선하거나, 또는 예방하는 방법을 제시한다. 이런 질환에는 다양한 심혈관 질환, 면역학적 (가령, 자가면역) 질환, 그리고 신경학적 질환이 포함된다. 가령, 변형된 VIP는 자가면역 질환 또는 염증 질환으로 고통받는 환자를 비롯하여, 환자에서 친-염증성 효과기와 항-염증성 효과기 사이에 균형을 조정하는데 이용될 수 있다. 변형된 VIP에 대한 예시적인 정후에는 특히, 고혈압, 심근섬유증, 심부전, 심근증, 당뇨병, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 관절염, 염증성 장 질환 (IBD), 파킨슨씨병, 뇌 외상, 그리고 천식이 포함된다.

[0112] 따라서 본 발명에서는 자가면역 또는 염증으로 특징되는 질환을 비롯한 다양한 질환을 치료하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 본 발명의 변형된 VIP의 효과량을 병든 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

고혈압

[0114] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 고혈압을 치료하거나 예방하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 변형된 VIP의 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 변형된 VIP로 치료가능한

고혈압의 형태에는 폐 고혈압, 조절되지 않는 본태성 고혈압, 그리고 저항성 고혈압이 포함된다.

[0115] 폐 고혈압은 우심실 부전 (right ventricular failure)으로 완결되는 진행성 폐 동맥 고혈압 및 더욱 작은 폐 동맥과 소동맥의 증가된 농후 (thickening)로 특징되는 상대적으로 드물지만 매우 치명적인 질환이다 (Said et al., 2007, *Circulation* 115: 1260-8). VIP는 폐 순환 (pulmonary circulation) 및 전신 순환 (systemic circulation)에 연관된다. 폐혈 관상 (pulmonary vascular bed) 및 폐 고혈압에서 이의 변경에 대하여, VIP는 몇몇 포유동물 종으로부터 폐 혈관 평활근을 시험관내에서 이완시키고, 엔도텔린 (endothelin)과 기타 혈관수축제 (vasoconstrictor)의 작용을 중화시키거나 약화시키고, 저산소성 폐혈관 수축 (hypoxic pulmonary vasoconstriction)을 감소시키고, 그리고 폐 고혈압 환자로부터 폐 혈관 평활근의 증식을 저해한다. 게다가, VIP는 폐 혈관 평활근 이완의 생리학적 비아드레날린성 (nonadrenergic), 비콜린성 (noncholinergic) 시스템의 공동전달체 (cotransmitter)이다. 게다가, 폐 동맥 내에서 평상 상태에서 풍부한 VIP-내포 신경은 폐 고혈압 환자로부터 폐 동맥에서 부재하는 것으로 보고되었고, 그리고 상기 웨პ티드의 흡입은 이들 환자에 유익한 치료적 효과를 유발하였다 (Petkov et al., 2003, *J. Clin Invest.* 111: 1339-1346). 최종적으로, 여러 연구에서 VIP^{-/-} 생쥐에서 VIP 대체 요법은 폐 고혈압에서 핵심적인 병리학적 변화의 진행을 예방하거나, 또는 이들 변화의 진행을 적어도 지연시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다 (Said et al., 2007, *Circulation* 115: 1260-8). 따라서 폐 고혈압 환자에 VIP의 적용은 상기 질환의 혈류역학적 파라미터 및 진단적 파라미터의 실질적인 향상을 유발할 것으로 예상될 수 있다 (Petkov et al., 2003, *J. Clin Invest.* 111: 1339-1346).

[0116] 조절되지 않는 본태성 고혈압은 고혈압의 원인이 밝혀지지 않을 때, 정상보다 지속적으로 높은 혈압이다. 본태성 고혈압은 가장 우세한 고혈압 유형이고, 고혈압 환자 중에서 90-95%에 영향을 주고 (Carretero et al., 2000, *Circulation* 101: 329-35), 그리고 전문가들은 본태성 고혈압이 아직 밝혀지지 않은 몇몇 인자에 의해 유발되는 것으로 생각하고 있다. VIP의 농도는 뇌출중에 걸리기 쉬운 본태성 고혈압 쥐에서 감소하고 (Mori et al., 1993, *Jpn Heart J.* 34: 785-94), 그리고 입체 구조적으로 안정화된 리포좀과 함께 인간 VIP의 이용은 자발성 고혈압 햄스터에서 전신 동맥 혈압을 정상화시킬 수 있다 (Onyuksel et al., 2006, *Peptides* 27: 2271-5).

[0117] 저항성 고혈압은 치료에 반응하지 않는 고혈압의 한 가지 형태이다 (즉, 약물의 조합이 투여될 때에도 혈압이 여전히 높다). 불량한 혈압 제어의 원인은 다양하다. 가장 가능성 있는 원인은 과도한 나트륨 섭취, 약제 과민성, 비순응 (noncompliance) 및 이차 고혈압 중에서 한 가지에 따른 체액용적 과부하 (volume overload)이다 (Graves JW, 2000, *Mayo Clin Prac* 75: 278-84). 강력한 전신 혈관확장제로서, VIP는 저항성 고혈압의 징표를 생산하는 환자에서 고혈압의 치료와 예방에 유용성을 갖는다.

[0118]

심장 질환

[0119] [0120] 추가적 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 심장 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 변형된 VIP의 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 변형된 VIP로 치료가능한 심장 질환의 형태에는 심근섬유증, 심부전, 그리고 심근증이 포함된다.

[0121] [0122] 심장 내에서 VIP의 합성과 분비에서 변화는 몇몇 질환, 예를 들면, 심부전과 심근섬유증의 병인에서 일정한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Dvorakova MC, 2005, *Drug News Perspect.* 18: 387-91). 가령, VIP의 농도는 심근증 환자로부터 조직 및 심부전의 동물 모형으로부터 심장 조직 둘 모두에서 유의미하게 감소한다 (Unverferth et al., 1986, *J. Lab Clin Med* 108: 11-16). 게다가, VIP의 분해가 섬유증을 앓는 심장에서 증가되고 결과적으로, 심근 VIP 농도가 감소한다. 따라서 감소된 VIP는 상기 질환의 병인에서 중요한 인자인 것으로 생각되고 (Ye et al., 2003, *Acta Physiol Scand* 179: 353-60), 그리고 감소된 VIP 농도는 심부전의 진행성 악화와 연관된다. VIP의 대사 제거율 (metabolic clearance rate)을 감소시키는 것으로 알려져 있는 바소펩티다제 저해물질 오마파트릴라트 (omapatrilat)의 이용은 대조와 비교할 때, 심근섬유증에서 감소뿐만 아니라 수축기 혈압에서 감소를 유발하였다 (Ye et al., 2004, *Eur J Pharmacol* 485: 235-42). VIP의 보호 효과는 혀혈 심근 및 재판류된 심근에서도 보고되었다 (Kalfin et al., 1994, *J Pharmacol Exp Ther* 268: 952-8). 이런 이유로, 본 발명의 변형된 VIP의 적용은 심부전, 심근증, 그리고 심근섬유증을 비롯한 다양한 병리학적 장애에서 유익한 효과를 가질 것으로 예상될 수 있다.

[0123] 2형 진성 당뇨병

[0124] 추가적 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 당뇨병을 치료하거나 예방하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 변형된 VIP의 효과량을 투여하는 단계를 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 변형된 VIP는 2형 진성 당뇨병의 치료와 예방에 유용성을 갖는다.

[0125] 여러 연구에서, 당뇨병 쥐의 유문동 (gastric astrum)과 십이지장 (duodenum)의 VIP 함량이 정상 쥐에서보다 훨씬 낮은 것으로 밝혀졌다 (Gozes *et al.*, 2004, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18: 623-640). 위십이지장 관 (gastrooduodenal tract) 내에서 VIP의 낮은 조직 수준은 당뇨병 환자에서 관찰되는 비정상적 장 운동성에 부분적으로 기여할 수 있다 (Adeghate *et al.*, 2001, *Arch Phys Bioc* 109: 246-51). VIP는 인슐린종 세포, 생쥐 췌장 섬 및 관류된 쥐 췌장으로부터 인슐린 분비를 자극한다. VPAC1의 활성화는 상승된 포도당 생산 (glucose output)에 관여하고 (Gozes *et al.*, 2004, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18: 623-640), 반면 VIP 수용체 VPAC2는 췌장 섬 β -세포에서 발현되고 이의 활성화는 환형 AMP의 상승 및 인슐린 분비의 자극을 유발한다 (DeSouza *et al.*, 2009, *Nature Reviews* 8: 361-7). 게다가, VIP는 인간에서 글루카곤 분비를 자극하고 간으로부터 포도당 방출 (glucose release)을 유발한다. 종합하면, 이들 연구는 VIP가 포도당 대사에 대한 광범위한 직접적인 효과를 갖는다는 것을 드러낸다. 따라서 VIP 및 VIP의 변형된 형태, 예를 들면, 본 발명에서 개시된 융합 웹티드는 2형 당뇨병의 치료와 예방에 유용한 요법일 것으로 예상될 수 있다.

[0126] VPAC2 수용체 선호

[0127] 일부 구체예에서, 예를 들면, 변형된 VIP가 변형되지 않은 VIP와 비교하여 VPAC2에 대한 더욱 높은 선호를 갖는 경우에, 이러한 변형된 VIP는 환자에서 염증성 반응, 예를 들면, 지연형 과민 반응 (delayed-type hypersensitivity response)을 감소시킬 수 있다. 이와 같은 일부 구체예에서, 변형된 VIP는 자기반응성 T-세포의 발생을 감소시킨다. 이들 구체예에서, 환자는 TH1-형 염증 또는 TH1 자가면역으로 정의되는 하나 또는 그 이상의 질환, 예를 들면, 관절염 (RA 포함), 염증성 장 질환 (가령, 크론병), 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 이식 거부반응, 쇼그렌 증후군, 췌장염, 포도막염, 각막염, 그리고 폐혈 쇼크의 환자일 수 있다.

[0128] VPAC1 수용체 선호

[0129] 일부 구체예에서, 예를 들면, 변형된 VIP가 변형되지 않은 VIP와 비교하여 VPAC1에 대한 더욱 높은 선호를 갖는 경우에, 이러한 변형된 VIP는 환자에서 TH1 염증성 반응, 예를 들면, 지연형 과민 반응을 조장할 수 있다. 이들 구체예에서, 환자는 TH2 면역과 연관된 하나 또는 그 이상의 질환, 예를 들면, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)의 환자일 수 있다.

[0130] COPD는 기도의 만성 염증성 질환인데, 이것은 선진국 국민 중에서 많게는 8%에서 발생한다. COPD를 앓는 여성과 남성의 숫자가 증가하고 있다. 폐 고혈압은 장기 기류 폐색 (airflow obstruction)의 일반적인 증상이긴 하지만, 증가된 혈관 저항 (vascular resistance)의 정확한 기전은 불확실하다. COPD에서 폐 고혈압의 잠재적 원인에는 모세혈관상 (capillary bed)의 기종성 파괴 (emphysematous destruction), 폐 혈관의 재형성 (remodeling) 및 저산소성 폐혈관 수축 (hypoxic pulmonary vasoconstriction)이 포함된다.

[0131] VIP는 기도에서 관찰되는 가장 풍부한 분자 중의 하나이다. 항-염증성 및 기관지확장성으로 인하여, VIP는 COPD 와 천식에 대한 신규한 치료제로서 제안되었다. VPAC1 상향-조절이 우세하긴 하지만, VPAC1과 VPAC2 둘 모두 최적 항-염증성 신호전달에 필요하다 (Burian *et al.*, 2010, *Peptides* 31: 603-8). 따라서 VIP 및 VIP의 변형된 형태, 예를 들면, 본 발명에서 개시된 융합 웹티드로 치료는 COPD와 천식 환자의 폐에서 만성 염증을 감소시키는데 도움을 줄 것으로 예상된다.

[0132] 본 발명은 하기 실시예에 의해 더욱 예증되는데, 이들 실시예는 제한으로서 간주되지 않는다. 본 출원 전역에서 인용된 모든 참고문헌, 특히 및 공개된 특히 출원의 내용, 그리고 도면은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

도면의 간단한 설명

[0133] 도면의 설명

도 1에서는 N-말단에서 Met 및 C-말단에서 VIP에 융합된 120개 ELP1 단위 (VPGXG, 서열 번호: 3)를 갖는 변형된 VIP-ELP 융합 단백질의 아미노산 서열 (M-VIP-ELP1-120, 서열 번호: 14)을 도시한다.

도 2에서는 자연 성숙 VIP 웨티드로 활성화될 수 있는 N-말단에서 Met-Ala-Ala, 그리고 C-말단에서 VIP에 융합된 120 ELP1 단위 (VPGXG, 서열 번호: 3)를 갖는 변형된 VIP-ELP 융합 단백질의 아미노산 서열 (MAA-VIP-ELP1-120, 서열 번호: 15)을 도시한다.

도 3은 재조합 융합체의 편의한 생산을 위한 ELP1-120을 인코딩하는 pPB1031의 플라스미드 지도이다.

도 4에서는 M-VIP-ELP1-120 (서열 번호: 39와 40) 융합 단백질을 인코딩하는 pPB1046을 도시한다. 상기 재조합 유전자의 작제를 위한 프라이머 (P0045, 서열 번호: 31, P0048, 서열 번호: 32, 그리고 P0065, 서열 번호: 34)가 도시된다.

도 5에서는 MAA-VIP-ELP1-120 (서열 번호: 41과 42) 융합 단백질을 인코딩하는 pPB1047을 도시한다. 상기 재조합 유전자의 작제를 위한 프라이머 (P0066, 서열 번호: 35, P0064, 서열 번호: 33, P0067, 서열 번호: 36)가 도시된다.

도 6에서는 ELP1-120-VIP (서열 번호: 43과 44) 융합 단백질을 인코딩하는 pPB1048을 도시한다. 상기 재조합 유전자의 작제를 위한 프라이머 (P0068, 서열 번호: 37, P0069, 서열 번호: 38)가 도시된다.

도 7은 열 변성되거나 열 변성이 없는 정제된 VIP-ELP 융합 단백질의 10% Tris-아세테이트 NuPAGE 겔 분석 결과이다.

도 8에서는 VPAC2 수용체에 대한 고유 VIP와 VIP-ELP 융합 단백질 PB1046과 PB1047의 시험관내 활성을 도시한다.

도 9에서는 VPAC1 수용체에 대한 고유 VIP와 VIP-ELP 융합 단백질 PB1046과 PB1047의 시험관내 활성을 도시한다.

도 10에서는 쥐 혈액에 대한 VIP-ELP 융합 단백질의 생체내 효과를 도시한다. 왼쪽 패널은 수축기 혈압을 도시한다. 오른쪽 패널은 확장기 혈압을 도시한다. VIP-ELP는 12 시간 기간 동안 혈압을 낮춘다.

도 11은 VIP-ELP1-120을 인코딩하는 pPB1120 (서열 번호: 48)의 플라스미드 지도이다.

도 12에서는 VPAC1 수용체에 대한 고유 VIP와 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120과 PB1046의 시험관내 활성을 도시한다.

도 13에서는 VPAC2 수용체에 대한 고유 VIP와 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120과 PB1046의 시험관내 활성을 도시한다.

도 14A에서는 원숭이 ($n = 3$)에서 3 mg/kg의 단일 피하 주사후 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 약물동력학적 프로필을 선형 축으로 도시한다. 도 14B에서는 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 약물동력학적 프로필을 반-대수 축으로 도시한다.

도 15A, 15B, 그리고 15C에서는 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 또는 5 mg/kg 용량에서 PB1120이 피하 주사된 쥐에서, 3 시간 간격 동안 각각 수축기, 확장기, 그리고 평균 동맥 혈압에서 평균 변화를 도시한다. 도 15D에서는 PB1120의 투여후 3 시간 간격 동안 개별 쥐의 평균 심박동수를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0134] 실시예

[0135] 실시예 1

[0136] VIP-ELP 구조체의 클로닝

[0137] VIP 웨티드에 대한 DNA 서열은 본 발명에 순전히 참조로서 편입되는, 잔기 17이 고유 메티오닌이고 앞서 기술된 C-말단 신장 중에서 어느 것도 보유하지 않는 점을 제외하고, Simoncsits *et al.* (Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of artificial genes coding for biologically active elongated precursors of the vasoactive intestinal polypeptide, Eur. J. Biochem. 1988, 178(2):343-350에서 기술된 바와 동일하였다 (서열 번호: 16 참조).

[0138] 2가지 초기 변이체가 만들어졌는데, 한 변이체 (PB1046, 서열 번호: 17)는 요구되는 ATG 출발 코돈으로 인하여 N-말단에서 메티오닌을 보유하고, 그리고 다른 변이체 (PB1047, SEQ ID 18)는 N-말단에서 트리웨티드 MAA를 보

유하였다. PB1046 상에서 메티오닌은 메티오닌 아미노펩티다아제 (MA)에 의해 정상적으로 제거되어야 하지만 히스티딘이 두 번째 잔기이고 상기 위치에서 MA에 대한 가장 선호되지 않는 아미노산 중의 하나이기 때문에, 상기 메티오닌은 제거되지 않는다. PB1047 상에서 메티오닌은 제거되어 AA가 남게 되고, 이것은 이후, DPPIV에 의해 시험관내에서 또는 생체내에서 제거되어 히스티딘이 N-말단 잔기로서 제공될 수 있다. VIP DNA 서열은 ELP1-120 DNA 서열을 갖는 벡터 pPB1031 (도 3 참조) 내로 클로닝되어 T7 프로모터의 제어 하에 발현 카세트가 제공되었다.

[0139] 합성 올리고뉴클레오티드 P0045 (서열 번호: 31), P0048 (서열 번호: 32), P0064 (서열 번호: 33) 및 P0065 (서열 번호: 34)는 함께 어닐링되고, 제한 효소 XbaI로 절단되고, 플라스미드 pPB1031 내로 결찰되고, 이것은 제한 효소 XbaI/KpnI로 절단되어 발현 플라스미드 pPB1046이 제공되었다 (도 4 참조).

[0140] 합성 올리고뉴클레오티드 P0066 (서열 번호: 35), P0064 (서열 번호: 33), P0067 (서열 번호: 36) 및 P0065 (서열 번호: 34)는 함께 어닐링되고, 제한 효소 XbaI로 절단되고, 플라스미드 pPB1031 내로 결찰되고, 이것은 제한 효소 XbaI/KpnI로 절단되어 발현 플라스미드 pPB1047이 제공되었다 (도 5 참조).

[0141] 이에 더하여, 그리고 N-말단이 활성을 위한 절대적인 필요조건이 아니라는 가정 하에, C-말단 융합체 pPB1048 역시 만들어졌다 (도 6 참조). 합성 올리고뉴클레오티드 P0068 (서열 번호: 37) 및 P0069 (서열 번호: 38)는 함께 어닐링되고 플라스미드 pPB1031 내로 결찰되고, 이것은 제한 효소 BglII/NheI로 절단되어 발현 플라스미드 pPB1048이 제공되었다.

실시예 2

VIP-ELP 구조체의 발현

[0144] 대장균(*E. coli*) 생산 균주 BLR (Novogen)은 플라스미드 pB1046, pPB1047 및 pPB1048로 형질전환되고 진탕 플라스크 내에 영양분이 풍부한 배지에서 37°C에서 하룻밤동안 성장되었다. 세포 펠릿은 TE pH 8.0 완충액에서 재현탁되고, 고압균질기 (Microfluidics)를 통해 용해되고, 원심분리되어 불용성 물질이 제거되고, 그리고 산물은 3M에 NaCl의 첨가로 '전환시킴 (transitioning)' (ref)에 의해 결과의 가용성 용해물로부터 정제되었다. 이들 샘플은 추가 2회 라운드의 전환시킴이 수행되어 최종 정제된 샘플이 제공되었다. 이들은 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 그리고 PB1046과 PB1047은 2개의 띠를 제공하는 것으로 밝혀졌다 (도 7 참조). 이것이 단백질분해의 결과라는 가정 하에, 이들 배양액은 다시 성장되지만 이번에는 용해에 앞서, 15분간 60°C로 가열되었다. 10% Tris-아세테이트 NuPAGE 젤에 의한 분석 결과는 이러한 단백질분해가 저해되었음을 지시하였다 (도 7 참조).

[0145] 단백질분해는 펩티드 내에서, 그리고 아마도, 펩티드와 ELP의 접합부 인근에서 발생할 가능성이 가장 높았는데, 그 이유는 C-말단 융합 PB1048에서 파괴가 관찰되지 않았기 때문이다. 이러한 단백질분해는 세포의 용해에 앞서 프로테아제(들)의 열 변성에 의해 예방될 수 있었는데, 이것은 세포질 프로테아제보다는 주변세포질 프로테아제(들), 또는 용해 시에 상이하게 활성화되거나 행동하는 세포질 프로테아제가 연루된다는 것을 시사할 것이다.

실시예 3

시험관내에서 변형된 VIP-ELP 융합 단백질의 활성

[0148] VIP 또는 VIP-ELP 융합 단백질의 시험관내 생물학적 활성과 효능을 측정하기 위하여, 세포-기초된 생물검정법이 이용되었다. 상기 분석평가는 인간 혈관활성 장 펩티드 수용체 2 (VPAC2) 또는 인간 혈관활성 장 펩티드 수용체 1 (VPAC1)을 발현하도록 조작된 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 VIP 또는 VIP-ELP 융합 단백질로 치료에 대응하여 세포내 환형 아데노신 모노포스페이트 (cAMP) 농도에서 증가를 측정한다. VIP 및 VIP-ELP 융합 단백질 둘 모두 이들 세포에서 cAMP의 생산을 자극할 수 있는데, 이것은 상기 융합 단백질이 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 능력을 유지한다는 것을 지시한다. 수용체-매개된 리간드 결합과 활성화 이후 세포 내에 cAMP 측정의 양이 존재하는 본래의 펩티드 또는 융합 단백질의 양에 직접적으로 비례하기 때문에, 상기 분석평가는 생물활성 및 상대적 효능을 결정하는데 이용될 수 있다.

[0149] 본 실시예에서, VIP-ELP 융합 단백질 PB1046과 PB1047의 활성이 조사되었다. 구조체 PB1046은 N-말단에서 Met를 보유하는 VIP를 내포하고, 그리고 구조체 PB1047은 N-말단에서 Ala-Ala를 보유하는 VIP를 내포한다. 양쪽 구조체는 그들의 C-말단에서 ELP(1-120)를 갖는다. 첫 번째 실험에서, 이들 구조체의 활성은 VIP 수용체 VPAC2를 발

현하는 CHO 세포를 이용하여 조사되었다. 상기 세포와 함께 다양한 농도의 이들 융합 단백질의 30분간 배양후, 이들 세포는 용해되고 상업적 키트를 이용하여 생산된 cAMP의 양이 측정되었다. PB1047은 세포에 첨가에 앞서 DPP-IV 처리되었다. **도 8**에서는 획득된 결과를 도시한다. 도시된 바와 같이, 변형된 VIP 융합 단백질 PB1046은 고유 VIP 단백질보다 활성이 약간 높은 반면, PB1047은 활성이 덜하였다.

[0150] PB1046과 PB1047의 활성 역시 VIP 수용체 VPAC1을 발현하는 CHO 세포를 이용하여 조사되었다. 상기 CHO 세포와 함께 다양한 농도의 이들 융합 단백질의 30분간 배양후, 세포는 용해되고 상업적 키트를 이용하여 생산된 cAMP의 양이 측정되었다. PB1047은 세포에 첨가에 앞서 DPP-IV 처리되었다. **도 9**에서는 획득된 결과를 도시한다. 이번에, 변형된 VIP 융합 단백질 PB1046은 고유 VIP 단백질보다 활성이 훨씬 덜한 반면, 고유 VIP에 대한 PB1047의 상대적 활성은 VPAC2 수용체에 대한 조사에서와 거의 동일하다. 이들 결과는 PB1046이 VPAC1 수용체에 비하여 VPAC2 수용체를 선택성으로 활성화시킨다는 것을 암시한다.

실시예 4

VIP-ELP 융합 단백질의 혈압 효과

변형된 VIP-ELP 융합 단백질 PB1047의 활성은 또한, 생체내에서 조사되었다. 구체적으로, 혈압에 대한 VIP-ELP 융합 단백질의 효과가 조사되었다. 자발성 고혈압 쥐는 PB1047 (10 mg/kg) 또는 완충액 대조로 피하 치료되고, 그리고 상기 융합 단백질의 투여후 여러 시점에서 그들의 혈압이 측정되었다. 각 군에는 5마리 동물이 이용되고, 그리고 그래프는 평균 및 표준 편차를 보여준다. PB1047은 투여후 적어도 12 시간 동안 이들 동물에서 수축기와 확장기 혈압을 유의미하게 감소시켰는데 (**도 10** 참조), 이것은 VIP-ELP 융합 단백질이 활성적이고, 그리고 VIP-관련된 질환을 치료하는 약제로서 잠재적으로 이용될 수 있음을 지시한다.

실시예 5

추가적 VIP-ELP 융합 단백질

PB1047의 DPP IV 처리는 N-말단으로부터 AA와 HS 둘 모두의 제거를 유발하고, 그리고 상기 웨티드의 비활성화를 유발하였다. 이런 이유로, 플라스미드 pPB1064가 삭제되었는데, 여기서 N-말단은 MAAHS, 서열 번호: 46 대신에 MAAHG, 서열 번호: 45로 변경되었는데, 그 이유는 HG가 HS보다 DPP IV에 더욱 저항성이기 때문이다.

플라스미드 pPB1056 역시 삭제되었는데, 이것은 ELP 앞에서, VPGXG, 서열 번호: 3 반복에 기초하여 반대로 채워진 링커 (서열 번호: 20)를 보유하는 VIP를 인코딩한다.

[0158]

실시예 6

추가적 VIP-ELP 융합 단백질, PB1120의 클로닝, 발현, 그리고 분석

VIP DNA 서열은 ELP1-120 DNA 서열을 갖는 벡터 pPB1120 (서열 번호: 48) (**도 11** 참조) 내로 클로닝되어 T7 프로모터의 제어 하에 발현 카세트가 제공되었다. 그 다음, 대장균(*E. coli*) 생산 균주 BLR은 앞서 기술된 바와 같이, pPB1120 플라스미드로 형질전환되고 영양분이 풍부한 배지에서 성장되었다. 결과의 VIP-ELP1-120 융합 웨티드, PB1120의 샘플은 SDS-PAGE를 통해 정제되고 분석되었다.

PB1120 융합 웨티드의 활성은 시험관내에서 조사되었다. 상기 활성은 실시예 3에서 기술된 바와 같이, VIP 수용체 (VPAC1)를 발현하는 CHO 세포를 이용한 분석평가를 이용하여 조사되었다. **도 12**에서 증명되는 바와 같이, PB1120은 VPAC1 수용체에 대한 활성이 고유 VIP 웨티드보다 대략 1.4배 덜하였다. 그에 비해, N-말단 메티오닌 잔기를 내포하는 구조체 PB1046은 활성이 고유 VIP 웨티드보다 대략 11-배 덜하였다. 복합 실험의 경과 동안, PB1120은 VPAC1 수용체에 대한 활성이 고유 VIP 웨티드보다 대략 1.4- 내지 6-배 덜하였다.

도 13에서는 VPAC2 수용체에 대한 PB1120의 활성을 도시한다. VPAC1 수용체에 대하여 관찰된 결과와 유사하게, PB1120은 VPAC2에 대하여 고유 VIP 웨티드보다 약간 낮은 (~1.5배 낮은) 활성을 보인다. 하지만, VPAC1에서 관찰되는 결과와 대조적으로, PB1046은 고유 웨티드와 비교하여 VPAC2에 대하여 등력성이었다. 복합 실험의 경과 동안, PB1120은 VPAC2 수용체에 대한 활성이 고유 VIP 웨티드보다 대략 1.5- 내지 7-배 덜하였다.

[0164] 실시예 7

변형된 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 약물동력학적 프로필

앞서 기술된 생물학적 효능 분석평가에 더하여, VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 약물동력학적 프로필 역시 조사되었다. 원숭이는 PB1120의 단일 투여 (SC) 주사 (3 mg/kg으로 투약)가 제공되고, 그리고 혈장 약물 농도는 1주의 경과 동안 매일 측정되었다. 3마리 동물이 이용되고, 그리고 그래프는 평균 및 표준 편차를 보여준다. PB1120의 초기 복용량 중에서 절반 이상이 4일 시점까지 순환 상태에서 존속하였다 (각각, 선형 축 및 반-대수 축을 이용하여, SC 투여후 PB1120의 평균 혈장 농도를 도시하는 **도 14A와 14B** 참조).

이러한 데이터에 기초하여, PB1120의 투여 후 연장된 흡수 국면 (absorption phase)이 있는 것으로 생각되는데, 이것은 투여 부위로부터 느린 흡수와 일치한다. 혈장 농도의 감소에 기초한 겉보기 제거 반감기 (apparent elimination half-life) ($t_{1/2}$)는 9.9 내지 45.8 h 범위에서 변하였고, 그리고 실제 제거보다는 느린 흡수를 반영할 것으로 생각된다. 이들 데이터는 VIP-ELP 융합 단백질이 고유 VIP와 비교하여 극적으로 연장된 반감기를 갖고, 그리고 연장된 간격 (가령, 대략 하루 1회, 대략 2일 마다 1회, 대략 3일 마다 1회, 또는 대략 주 1회)에서 잠재적으로 투여될 수 있다는 것을 지시한다.

[0168] 실시예 8

혈압에 대한 변형된 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 효과

수축기, 확장기, 그리고 평균 동맥 혈압에 대한 변형된 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120의 효과를 측정하기 위하여, 쥐는 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 또는 5 mg/kg의 PB1120이 단일 투여 주사되고 3-시간 간격 동안 평가되었다. **도 15A, 15B,** 그리고 **15C**에서는 각각 수축기, 확장기, 그리고 평균 동맥 혈압에서 평균 변화를 도시한다. **도 15D**에서는 PB1120의 투여후 3 시간 간격 동안 평균 심박동수를 도시한다. **도 15A-C**에서 증명되는 바와 같이, 1 mg/kg 또는 5 mg/kg의 PB1120이 주사된 쥐는 주사후 9 시간 시점에 수축기, 확장기, 그리고 평균 동맥 혈압에서 현저한 감소를 보였는데, 이것은 VIP-ELP 융합 단백질 PB1120이 병든 개체에서 고혈압을 치료하거나 예방하는 목적으로 잠재적으로 투여될 수 있음을 지시한다.

[0171] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 명세서에서 기술된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수 있긴 하지만, 선호되는 방법과 재료가 본 명세서에서 기술된다. 인용된 모든 간행물, 특히, 그리고 특허 공보는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0172] 본 명세서에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일에 앞서 그들의 발표 목적으로만 제공된다. 본 명세서에서 어느 것도 본 발명이 선행 발명에 의해서 이들 간행물에 앞서는 권리가 없음을 인정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0173] 본 발명이 특정 구체예와 관련하여 기술되긴 했지만, 본 발명은 추가 변형이 가능하고, 그리고 본 출원은 일반적으로, 본 발명의 원리에 따라서, 그리고 본 발명이 속하는 분야에서 공지된 또는 통례의 실시 내에서 본 발명의 개시로부터 이탈을 비롯한 본 발명의 임의의 변형, 용도, 또는 개작을 포함하는 것으로 의도되고, 따라서 상기에서 및 하기 첨부된 특허청구범위에서 진술된 본질적인 특징에 적용될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

도면

도면1

서열 번호: 14

M-VIP ELP1-120 (VIP 의 N 말단에 부가된 M)

$$ELP1-120 = (VPGXG)_{120} \text{ 여기서 } X = V_5G_3A_2$$

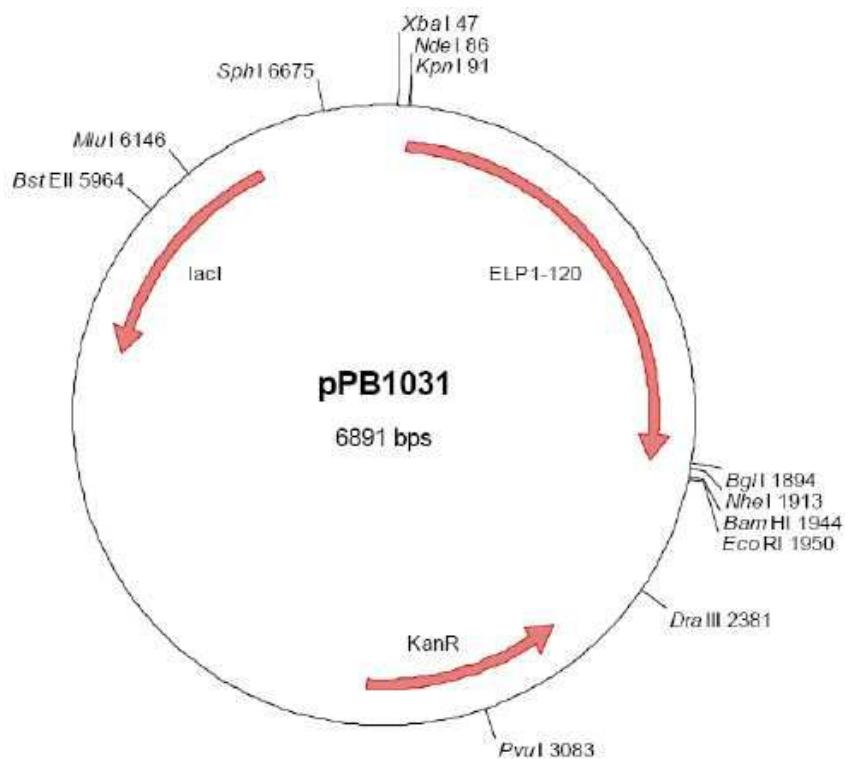
도면2

서열 번호: 15

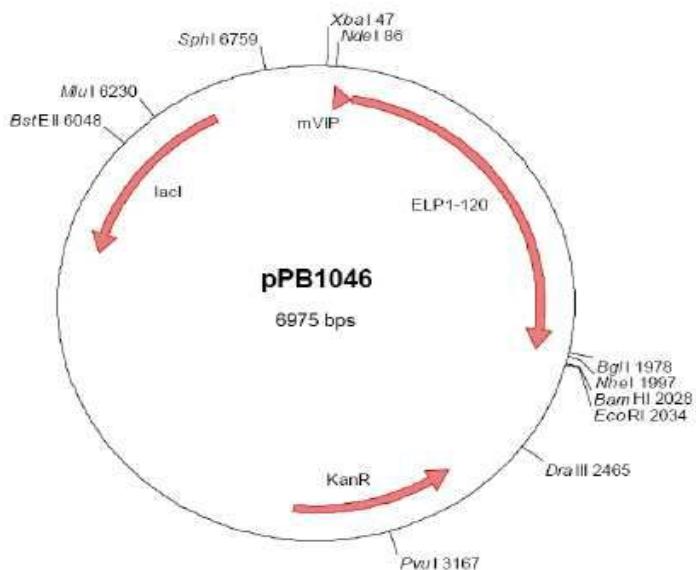
MAA-VIP ELP1-120 (가공에 앞서, VIP 의 N 말단에 부가된 MAA)

$$\text{ELP1-120} = (\text{VPGXG})_{120} \text{ 여기서 } X = \text{V}_5\text{G}_3\text{A}_2$$

도면3



도면4



XbaI

P0045
aattCTCTA GAAATAATT
1 taataacgact cactataggg gaattgttag cgataaaca ttccctctta gaaataattt
attatgtgtga gtgtatccc cttaacactc gcctattgtt aagggggatctt ctttattaaa
GATAT CTTTATTAAT
K P0048

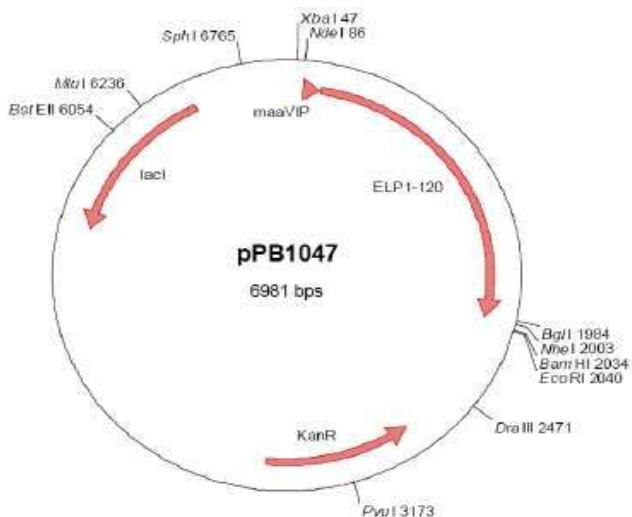
NdeI

P0064
CTGTTTTCA CTGACAACTA
P0045 >
TGTTTAACCTT TAAGGAAGGAG ATATACATAT GCACTCTGAC G
61 tgtttaacctt taagaaggag atatacatat gcactctgac gctgttttca ctgacaacta
acaaattgaa attcttcctc tatatgtata cgtgagactg cgacaaaagt gactgttgat
ACAAAATTGAA ATTCTTCCTC TATAGTATA CGTGAGACTG CGAACAAACT GACTGTGCA
P0046
>>.....mVIP.....>
m h s d a v f t d n

P0064 >
CACTCGTCTG CGTAAACAGA TGGCTGTAA AAAGTACCTG AACTCTATCC TGAACGTC
121 cactcgctg cgtaaacaga tggctgttaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc
gtgacgagac gcatttgtct accgacaatt ttcatggac ttgagatagg acttgcattgg
S
P0045
TGAACGTC GCAATTTCGT ACCGACAATT TTCTGGAC TTGAGATAGG AATTC
K P0065
>.....mVIP.....>>>..
y t r l r k q m a v k y l n s i l n v

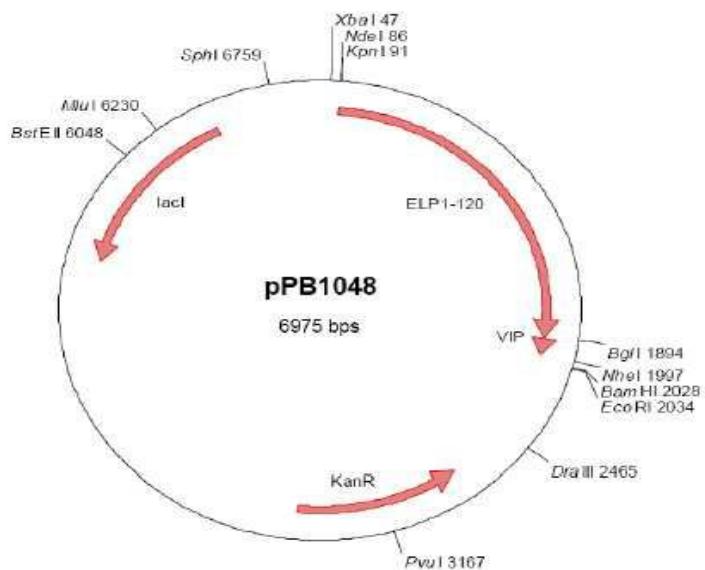
181 gggcgtgggt gttccggcggc tgggtgttcc ggggtgggggt gtgcggggcg cagggtgttcc
cccgaccca caaggccccgc accccacaagg cccacccggca cacggccccgc gtcacacaagg
>>.....ELP1-120.....>
p g v g v p g v s v p a g g v p g a g v

도면5



1 taatacgaact cactataggg gaatttgttag cggtataadaa ttcccttcta gaaataatttt
attatgtctga gtgtatatccc cttaacactc gcctatgtt aaggggagat ctttatttttt
CTA GAATAATT
P0066
NdeI
61 TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GGCGGCCAAC TCTGACG
tgtttaactt taagaaggag statatacatat ggcggccacat tctgacgttg ttttcaactga
acaatttgaa attctttctc tatatgtata ccgcgggtg agactgcac aaaaatgact
ACAAATTCAA ATTCTTCTC TATATGTATA CGCCGGGTG AGACTGCAC AAAAAATGACT
P0066 >
P0064
TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GGCGGCCAAC TCTGACG
tgtttaactt taagaaggag statatacatat ggcggccacat tctgacgttg ttttcaactga
acaatttgaa attctttctc tatatgtata ccgcgggtg agactgcac aaaaatgact
ACAAATTCAA ATTCTTCTC TATATGTATA CGCCGGGTG AGACTGCAC AAAAAATGACT
P0067
>>.....mVIP.....>
m a a h s d a v f t
P0064
CAACTACACT CGTCTGCGTA AACAGATGGC TGTTAAAAAG TACTGAACT CTATCCTGAA
121 caactacact cgtctgctta aacagatggc tgttaaaaag tactgaaact ctatcctgaa
gttgcgtgtga gagacgcat ttgtctacog acaatttttc atggacttga gataggactt
GTTCATG
P0067
>>.....mVIP.....>
< P0065
>.....mVIP.....>
d n y t z l r k q m a v k k y l n s i l.
P0065
G
P0064 >
CGTAC
131 cgtaccgggc gtgggttgc cggcggtggg tggccgggt ggccgtgtgc cggcgccagg
gtatggcccg caccacaaag gccccacccc acaggccca ccccccacacg gccccgggtcc
> mVIP
n
>>.....ELP1-120.....>
v p g v g v p g v g v p g g g v p g a

도면6



```

BglII
-----+-----
P0068
1861 tggccgcact ctgacgctgt
      TGGCCGCACT CTGACGCTGT
      acaaggccccca cgtccgcaga gcccacccaa acaacggcccg accgggggtga gactqegaca
      CCG ACAGGCCGTGA GACTGGGACA
      P0069
>.....ELP1-120.....>>
      g v p g a g v p g g g v p g w p
      >>....VIP....>
      h s d a

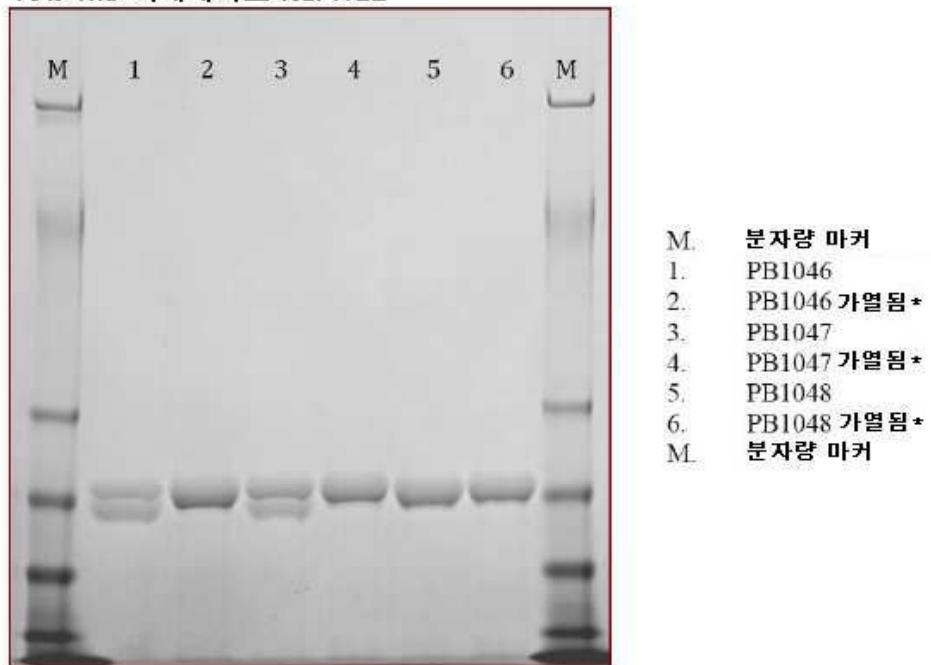
P0068
1921 TTTCACTGAC AACTACACTC GTCTGCCTAA ACAGATGGCT GTTAAAAAAGT ACCTGAACTC
      TTTCACTGAC AACTACACTC GTCTGCCTAA ACAGATGGCT GTTAAAAAAGT ACCTGAACTC
      tttcactgac aactacactc gtctgogtaa acagatgct gttaaaaagt actctgaactc
      aaagtgactg ttgatgttag cagaacgtt tgctaccca caattttca tggacttgag
      AAAGTGACTG TTGATGTGAG CAGA XATT GTCTACCGA TAATTTCGA TGGACCTGAG
      P0069
>.....VIP.....>
      v f t d n y t r l r k q m a v k k y l n

EcoRI
-----+-----
NheI
-----+-----
P0068 >
      TATCCTGAAC TGATAAG
1981 tatectgaaac tgataageta geatgactgg tggacagcaa atgggtcgga tecgaattcg
      ataggacttg actattcgat cgtactgacc acctgtcggtt taccacgct aggcttaagc
      AAGGACTTGG ACTATTGGAT C
      P0069
>....VIP.....>>
      s i i n - -

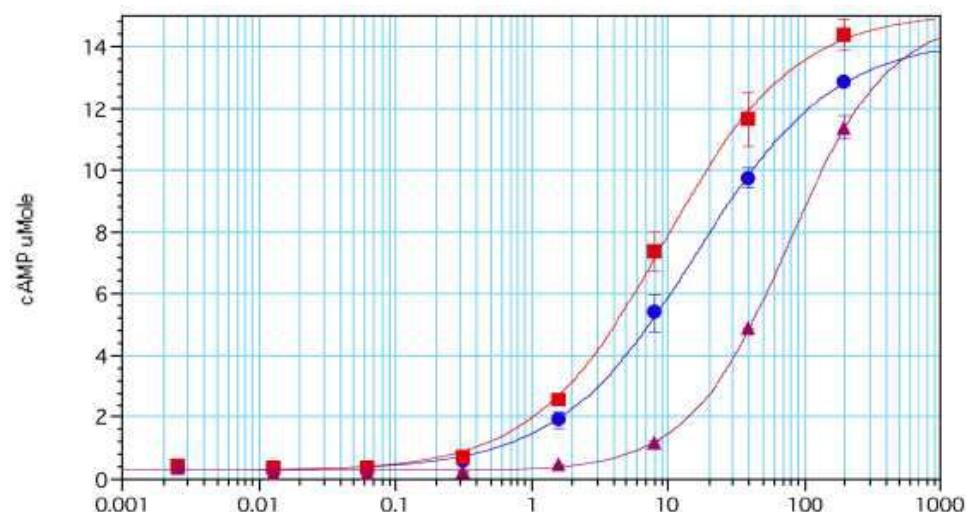
```

도면7

10% Tris-아세테이트 NuPAGE

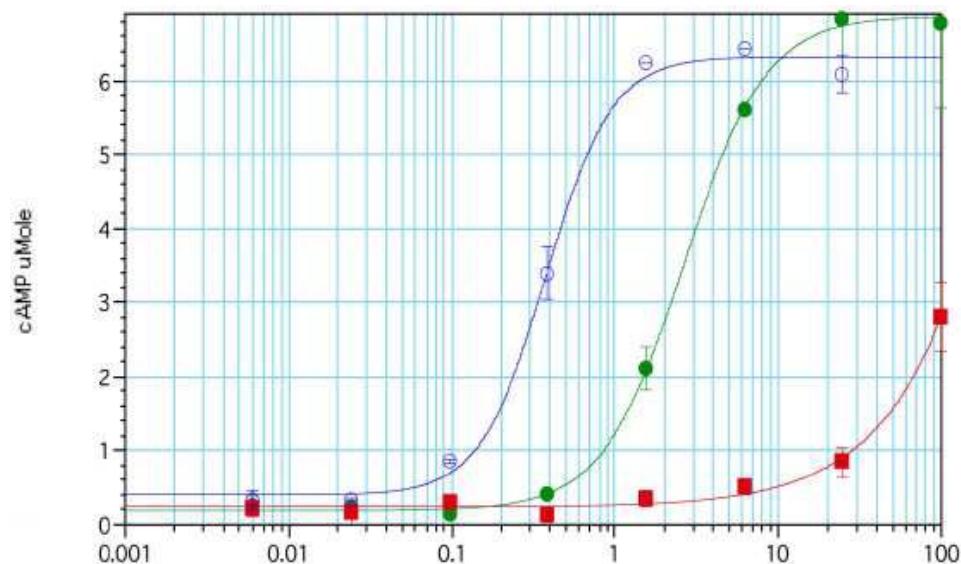


도면8

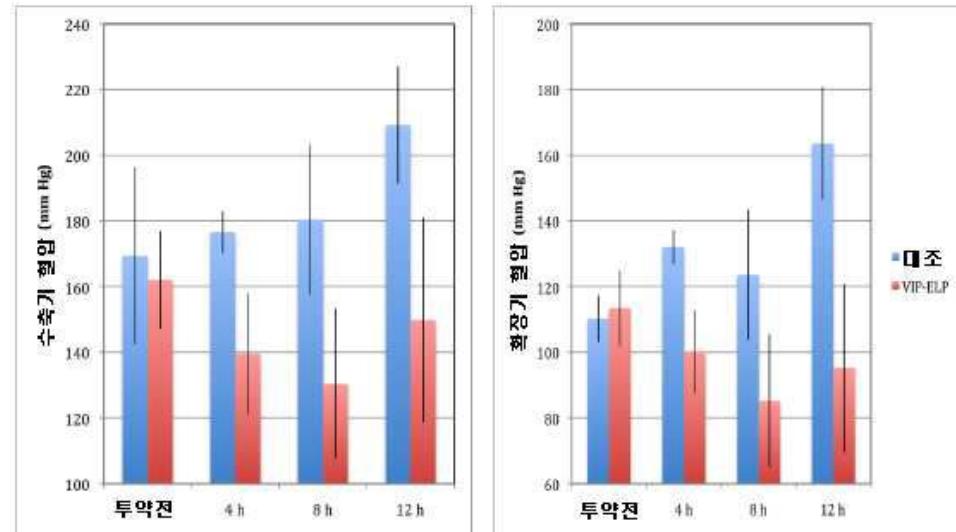


	A	B	C	D	R^2
● VIP-펩티드 (VIP2: 농도 vs 평균 결과)	0.269	0.859	16.2	14.3	0.999
■ PB1046 (A2: 농도 vs 평균 결과)	0.248	0.909	9.53	15.1	0.999
▲ PB1047 (C2: 농도 vs 평균 결과)	0.237	1.19	77.3	15	1

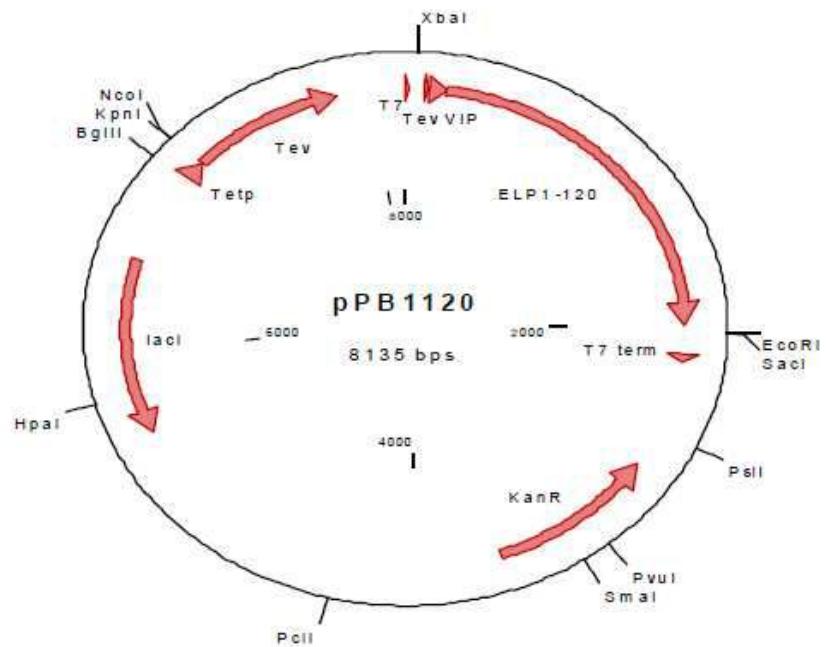
도면9



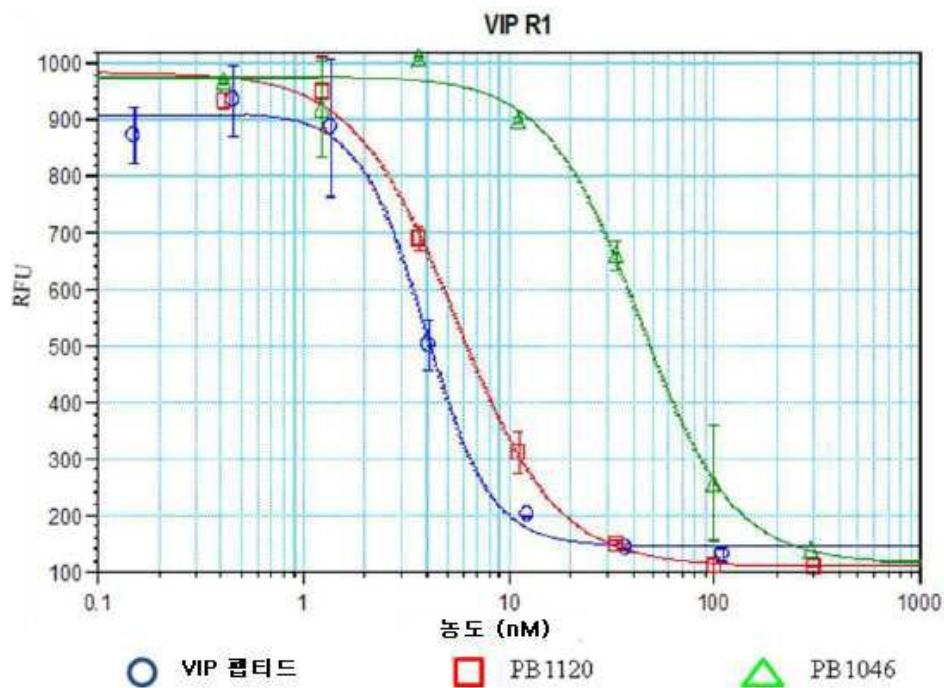
도면10



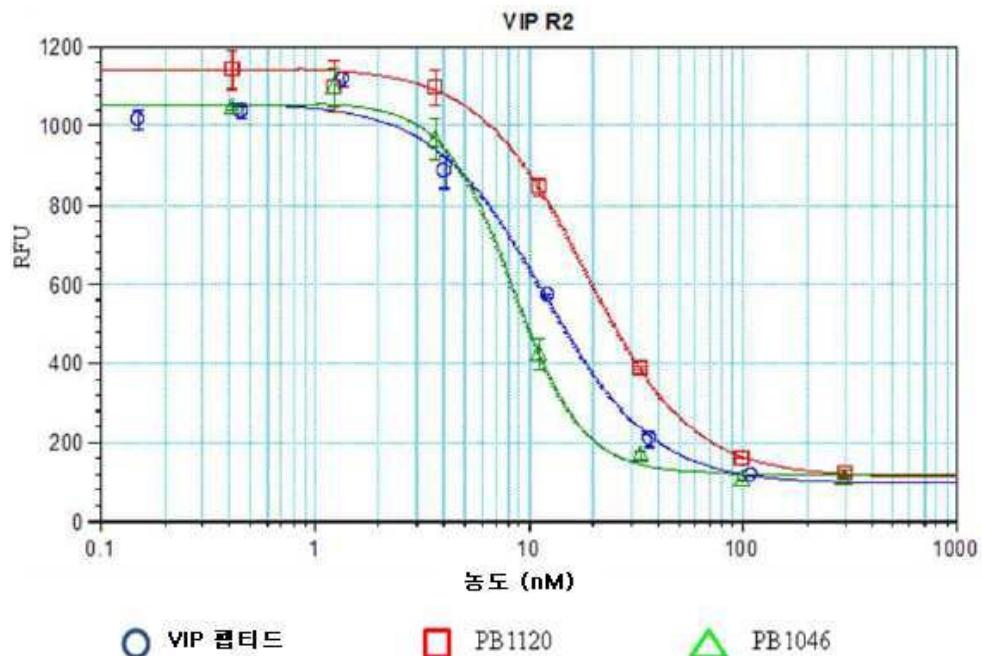
도면11



도면12

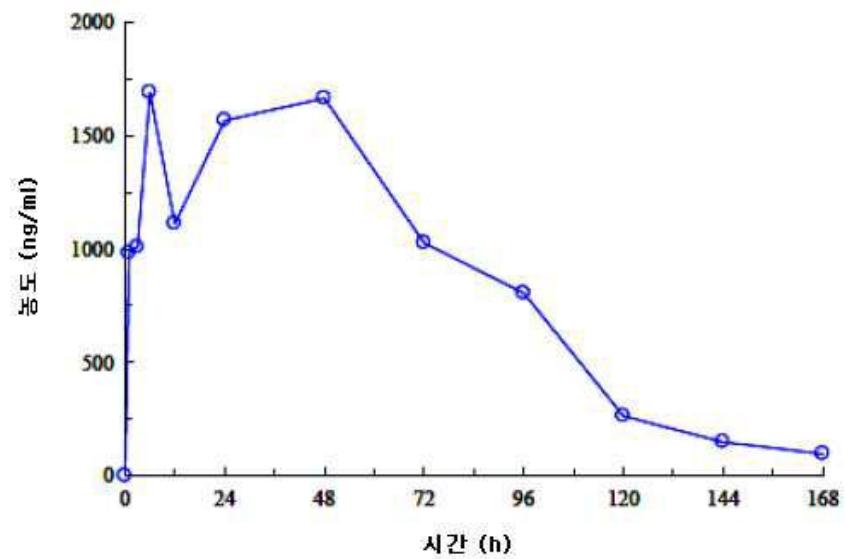


도면13

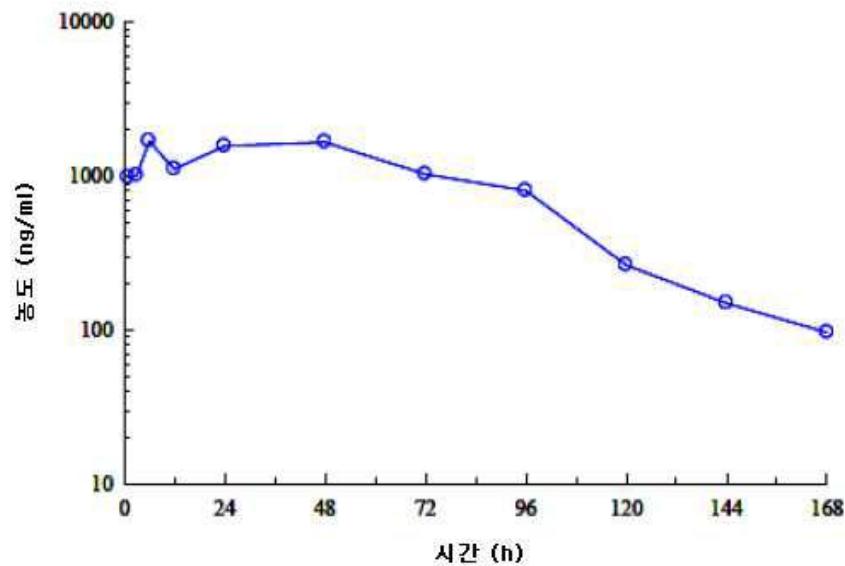


도면14

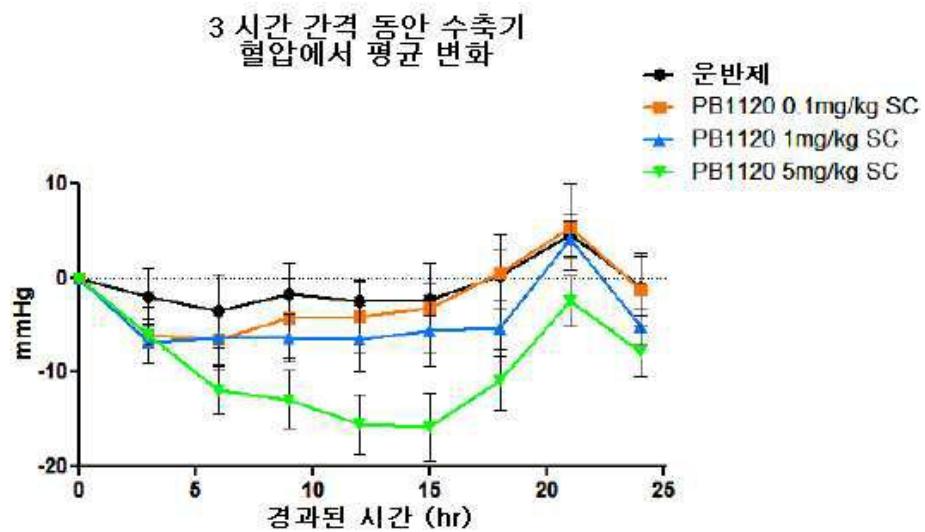
A



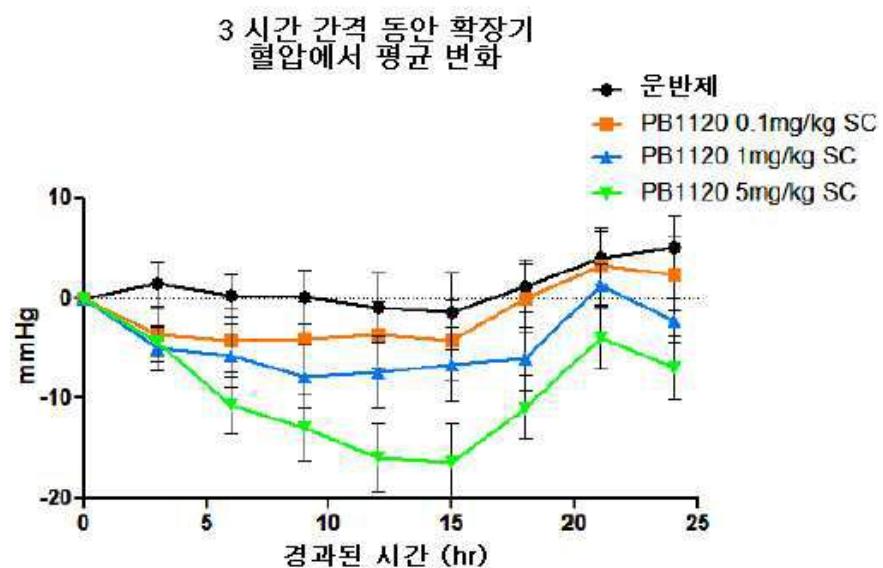
B



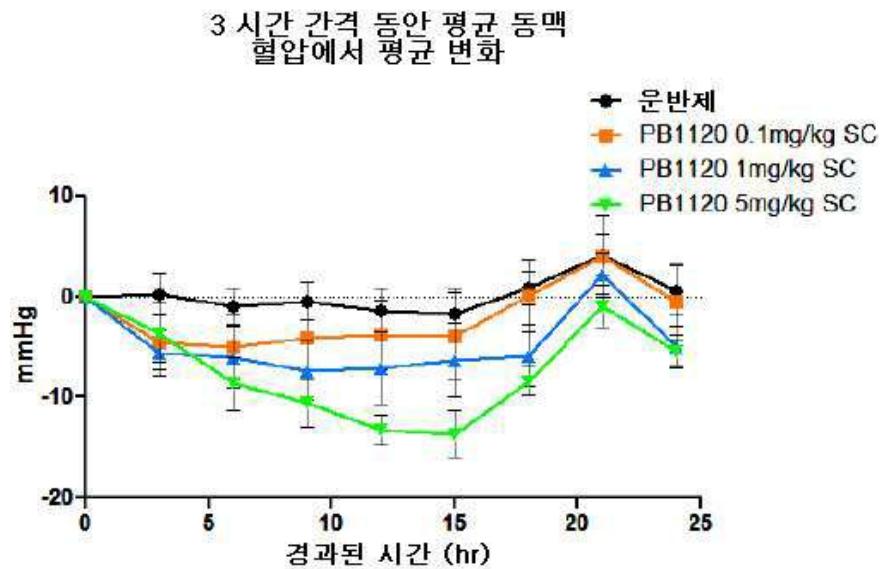
도면15a



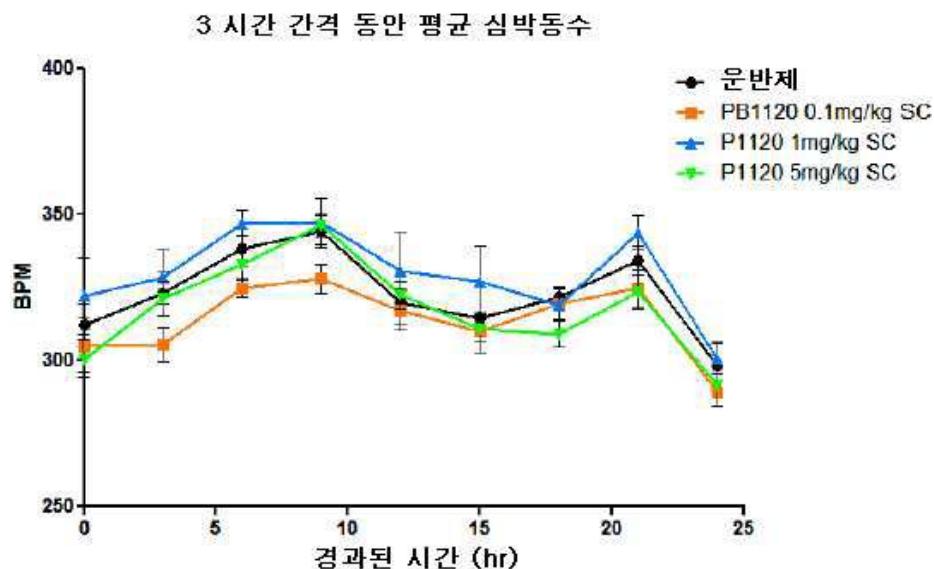
도면15b



도면15c



도면15d



서 열 목 록

- <110> SADEGHI, Homayoun
 TURNER, Andrew
 DAGHER, Suzanne
- <120> Modified Vasoactive Intestinal Peptides
- <130> PHAS-019/01US
- <160> 50
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP tetrapeptide

<400> 1

Val Pro Gly Gly

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP tetrapeptide

<400> 2

Ile Pro Gly Gly

1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP pentapeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa may be any natural or non-natural amino acid residue, and
where Xaa optionally varies among polymeric or oligomeric repeats

<400> 3

Val Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP pentapeptide

<400> 4

Ala Val Gly Val Pro

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP pentapeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa may be any natural or non-natural amino acid residue, and
where Xaa optionally varies among polymeric or oligomeric repeats

<400> 5

Ile Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP pentapeptide

<400> 6

Ile Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP pentapeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa may be any natural or non-natural amino acid residue, and
where Xaa optionally varies among polymeric or oligomeric repeats

<400> 7

Leu Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 8

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ELP pentapeptide
<400> 8

Leu Pro Gly Val Gly

1 5
<210> 9

<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ELP hexapeptide
<400> 9

Val Ala Pro Gly Val Gly

1 5
<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ELP octapeptide
<400> 10

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

1 5
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ELP nonapeptide
<400> 11

Val Pro Gly Phe Gly Val Gly Ala Gly

1 5

<210> 12
<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP nonapeptide

<400> 12

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

1 5

<210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25

<210> 14

<211> 634

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M-VIP ELP1-120

<400> 14

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys

1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly

20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala

35 40 45

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

50 55 60

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val

65 70 75 80

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro

85 90 95

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 100 105 110
 Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
 115 120 125

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
 130 135 140
 Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 145 150 155 160
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 165 170 175
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 180 185 190
 Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

195 200 205
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 210 215 220
 Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 245 250 255
 Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly
 260 265 270

Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 275 280 285
 Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
 290 295 300
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 325 330 335
 Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly

340	345	350
Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly		
355	360	365
Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly		
370	375	380
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val		
385	390	395
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro		
405	410	415
Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly		
420	425	430
Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala		
435	440	445
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly		
450	455	460
Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val		
465	470	475
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro		
485	490	495
Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly		
500	505	510
Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly		
515	520	525
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly		
530	535	540
Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val		
545	550	555
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro		
565	570	575
Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly		
580	585	590
Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val		

595 600 605

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Ala Gly
 610 615 620
 Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro

625 630

<210> 15

<211> 636

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAA-VIP ELP1-120

<400> 15

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val

20 25 30

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly

65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

85 90 95

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro

115 120 125

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

130 135 140

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly

165	170	175
Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val		
180	185	190
Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro		
195	200	205
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly		
210	215	220
Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val		
225	230	235
Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly		
245	250	255
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val		
260	265	270
Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro		
275	280	285
Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly		
290	295	300
Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly		
305	310	315
Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly		
325	330	335
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val		
340	345	350
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro		
355	360	365
Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly		
370	375	380
Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala		
385	390	395
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly		
405	410	415

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val

420 425 430

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro

435 440 445

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

450 455 460

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly

465 470 475 480

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

485 490 495

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

500 505 510

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro

515 520 525

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

530 535 540

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

545 550 555 560

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly

565 570 575

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

580 585 590

Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

595 600 605

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly

610 615 620

Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro

625 630 635

<210> 16

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16
atggcgcccc actctgacgc tggtttcaact gacaactaca ctgcgtcg taaacagatg 60
gctgttaaaa agtacctgaa ctctatcctg aac 93

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN PB1046

<400> 17

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys

1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN PB1047

<400> 18

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN PB1064

<400> 19

Met Ala Ala His Gly Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25 30

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN PB1056
<400> 20

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val
20 25 30

Pro Gly Glu Gly Val Pro Gly Asp Gly Val Pro Gly Glu Gly Val Pro
35 40 45

Gly Asp Gly

50

<210> 21
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<400> 21

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN
<400> 22

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<400> 23

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn

20 25

<210> 24

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa may be Ser or Gly

<400> 24

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20 25 30

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa may be Ser or Gly

<400> 25

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Lys Gln Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn

20	25	30
----	----	----

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa may be Ser or Gly

<400> 26

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20	25	30
----	----	----

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VIP : MODIFIED PROTEIN

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa may be Ser or Gly

<400> 27

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn

20	25	30
----	----	----

<210> 28
<211> 27
<212> PRT
<213> Unknown

<220><223> PACAP-27 : NATIVE PROTEIN

<400> 28

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20 25

<210> 29
<211> 38
<212> PRT
<213> Unknown

<220><223> PACAP-38 : NATIVE PROTEIN

<400> 29

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

<210> 30
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> PACAP : MODIFIED PROTEIN

<400> 30

Met Ala Ala His Gly Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr

1 5 10 15

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Val

20 25 30

Pro Gly Glu Gly Val Pro Gly Asp Gly

35	40	
<210>	31	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P0045 : PRIMER	
<400>	31	
aattctctag aaataattt gttaacttt aagaaggaga tatacatatg cactctgacg		60
		60
<210>	32	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P0048 : PRIMER	
<400>	32	
gtagttgtca gtgaaaacag cgtcagagtg catatgtata ttccttctt aaagttaaac		60
aaaattattt cttagag		76
<210>	33	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P0064: PRIMER	
<400>	33	
ctgtttcac tgacaactac actcgctgc gtaaacagat ggctgttaaa aagtacctga		60
actctatcct gaacgtac		78
<210>	34	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P0065 : PRIMER	
<400>	34	
gttcaggata gagttcaggt acttttaac agccatctgt ttacgcagac gagt		54
<210>	35	

<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P0066 : PRIMER
<400> 35
ctagaataa tttgttaa cttttaagaag gagatataca tatggcgcc cactctgacg 60
60
<210> 36
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P0067 : PRIMER
<400> 36
gtatgtca gtgaaaacag cgtcagatg ggccgcata tgtatatctc cttcttaag 60
ttaacaaaa ttattt 76
<210> 37
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P0068 : PRIMER
<400> 37
tggccgact ctgacgctgt ttcactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct 60
gttaaaaagt acctgaactc tattctgaac tgataag 97
<210>
> 38
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P0069 : PRIMER
<400> 38
ctagttatc agttcaggat agagttcagg tacttttaa cagccatctg tttacgcaga 60
cgatgttagt tgtcagtcaa aacagcgtca gagtgccggcc agcc 104
<210> 39
<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPB1046-mVIP-ELP 1-120 fusion sequence

<400> 39

taatacact cactataggg gaattgttag cgataacaa ttccctcta gaaataattt 60

tgttaactt taagaaggag atatacatat gcactctgac gctgtttca ctgacaacta 120

cactcgctg cgtaaacaga tggctgttaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc 180

gggcgtgggt gtccggcgc tgggtgtcc gggtggcggt gtgccggcgc caggtgtcc 240

240

<210> 40

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mVIP-ELP 1-120 fusion sequence

<400> 40

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys

1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly

20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala

35 40 45

Gly Val

50

<210> 41

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPB1047 mVIP-ELP 1-120 fusion sequence

<400> 41

taatacact cactataggg gaattgttag cgataacaa ttccctcta gaaataattt 60

tgttaactt taagaaggag atatacatat ggccggccac tctgacgctg tttcactga 120

caactacact cgtctgcgta aacagatggc tgttaaaaag tacctgaact ctatcctcaa 180

cgtaccggc gtgggtgttc cggcggtgg tgccgggt ggcggtgtgc cggcgcagg 240

240

<210> 42

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mVIP-ELP 1-120 fusion sequence

<400> 42

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Val Pro

20	25	30
----	----	----

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly

35	40	45
----	----	----

Ala

<210> 43

<211> 180

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPB1048 ELP 1-120-VIP fusion sequence

<400> 43

tgtccgggt gcaggcggttc cgggtggcgg tgtgccggc tggccgact ctgacgctgt 60

tttcaactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct gttaaaaagt acctgaactc 120

tatcctgaac tgataagcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgga tccgaattcg 180

180

<210> 44

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ELP 1-120-VIP fusion sequence

<400> 44

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro

1	5	10	15
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln			
20	25	30	
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn			
35	40		
<210>	45		
<211>	5		

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Modified VIP N-terminus
<400> 45

Met Ala Ala His Gly

1	5		
<210> 46			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Modified VIP N-terminus			
<400> 46			

Met Ala Ala His Ser

1	5		
<210> 47			
<211> 4			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Peptide spacer sequence			
<400> 47			

Gly Phe Leu Gly

1			
<210> 48			
<211> 8135			
<212>			
DNA			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> pPB1120

<400> 48

taatacact cactataggg gaattgttag cgataacaa ttccctcta gaaataattt	60
tgttaactt taagaaggag atatacatat ggagaacctg tatttccaac actctgacgc	120
tgtttcaact gacaactaca ctgcgtcg taaacagatg gctgttaaaa agtacctgaa	180
ctctatcctg aacgtaccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	240
gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	300
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	360
tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	420
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	480
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	540
gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	600
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	660
tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	720
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	780
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	840
gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	900
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	960
tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1020
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	1080
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	1140
gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	1200
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	1260
tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1320
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	1380
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	1440
gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	1500
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	1560
tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt gccggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1620
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	1680
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccggcggt ggtgtccgg gtggcggtgt	1740

gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt	1800
accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt	1860
tccgggcgtg ggtgtccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1920
gccgggtgtt ggigtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttcctg gtgcaggcgt	1980
tccgggtggc ggtgtgccgg gctggccgtg ataagctagc atgactggc gacagcaaat	2040
gggtcggatc cgaattcgag ctccgtcgag caccaccacc accaccacca ccactaattg	2100
attaataacct aggctgctaa acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc	2160
tgagaataaa cttagataaac cccttgggc ctctaaacgg gtcttggagg gtttttgct	2220
gaaaggagga actatatccg gattggcga tgggacgcgc ctgttagcgg cgcatiaagc	2280
gcggcgggtg tggtggttac ggcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgc	2340
gctccttcg ctttttccc ttctttctc gccacgttcg cggcttcc ccgtcaagct	2400
ctaaatcggg ggctccctt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaa	2460
aacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac gttttcgc	2520
cctttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tttccaaac tggaacaaca	2580
ctcaacccta tctcggtcta ttctttgtat ttataaggga tttgcccgtt ttcggctat	2640
tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga atttaacaa aatattaacg	2700
tttacaattt caggtggcac tttcgggaa aatgtgcgcg gaacccttat ttgtttattt	2760
ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgaattaat tcttagaaaa actcatcgag	2820
catcaaatga aactigcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag	2880
ccgttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagtgc cataggatgg caagatcctg	2940
gtatcggtct gcgattccga ctgcgtccaaatcatacataa cctattaaatt tccctcg	3000
aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg	3060
caaaagtta tgcatttctt tccagacttg ttcaacaggc cagccattac gctcgatc	3120
aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgatgat tgccctgag cgagacgaaa	3180
tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa	3240
cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga tattttctatc atacctggaa	3300
tgctgtttc ccggggatcg cagtggtagt taaccatgca tcatcaggag tacggataaa	3360
atgcgttgcgt gtcggaaagag gcataaaattc cgtcagccag ttttagtctga ccatctcatc	3420
tgttaacatca ttggcaacgc taccttgcctt atgtttcaga aacaactctg ggcgcacgg	3480
cttcccatatc aatcgataga ttgtcgacc tgattgcccc acattatcgc gagccattt	3540
ataccatataat aatcagcat ccatgttgaa atttaatcgc ggcctagagc aagacgttcc	3600

ccgttgaata tggctataa cacccttgt attactgtt atgtaagcag acagtttat	3660
tgttcatgac caaaaatccct taacgtgagt ttgcgttcca ctgagcgtca gaccggtag	3720
aaaagatcaa aggatcttct ttagatcatt ttttctgct cgtaatctgc tgctgaaa	3780
caaaaaaacc accgctacca gcgggtgtt gtttgcggta tcaagagcta ccaactctt	3840
ttccgaaggta aactggcttc agcagagcgc agataccaa tactgtcatt ctgtgtac	3900
cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacataacctc gctctgctaa	3960
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa	4020
gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc	4080
ccagcttggaa gcaaacgacc tacaccgaac tgagataacct acagcgttag ctatgaaaa	4140
gcgcacgct tccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcgaa	4200
caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg	4260
gtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgcgtat ctcgtcaggg gggcgagcc	4320
tatgaaaaaa cgccagcaac gcggccttt tacggccctt ggcctttgc tggcctttg	4380
ctcacatgtt cttccctgct ttatcccctg attctgtgaa taaccgtatt accgcctttg	4440
agtgagctga taccgctcgc cgccagcggaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcggagg	4500
aagcggaa ggcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc	4560
gcataatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagttat	4620
actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcgg gacaccgcac aacaccgcct	4680
gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgcctt acagacaagc tgtgaccgtc	4740
tccggagct gcatgtgtca gaggtttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg	4800
cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagg gattcacaga tgtctgcctg ttcatcccg	4860
tccagctgt ttagttctc cagaagcgaa atatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg	4920
ttaaggcgg tttttccctg tttggtact gatgcctcgc tctaaggggg atttctgttc	4980
atggggtaa tgataccat gaaacgagag aggtgtcga cgatacgggt tactgtat	5040
gaacatgccc gtttactgga acgttgttag ggttaacaaac tggcggtatg gatgcggcgg	5100
gaccagagaa aaatcactca gggtaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgttaggttt	5160
ccacaggta gccagcagca tcctgcgtat cagatccgaa acataatggt gcagggcgt	5220
gactccgcg ttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgggtttgt	5280
caggcgcag acgtttgca gcagcgtcg cttcacgttc gctcgctat cggtgattca	5340

ttctgtaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg	5400
atcatgctag tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga ctgggttcaa ggctctcaag	5460
ggcatcggtc gagatcccg tgcctaata gtagactaac ttacattaaat tgccgttgcc	5520
tcaactgccccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcatataat aatcgccaa	5580
cgcgcggggg gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gttttctt tcaccagtga	5640
gacgggcaac agctgattgc ctttcaccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc	5700
cacgctggtt tgccccagca ggcaaaaatc ctgtttgatg gtggtaacg gcgggatata	5760
acatgagctg tcttcggtat cgtcgatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag	5820
cccgactcg gtaatggcgc gcattgcgc cagcgccatc tgatcggttgg caaccagcat	5880
cgcagtggga acgatgcct cattcagcat ttgcattgtt tggtaaaaac cgacatggc	5940
actccagtcg cttcccggtt ccgctatcg ctgaatttga ttgcgagtga gatattttag	6000
ccagccagcc agacgcagac gcccgcagac agaacttaat gggccgccta acagcgcat	6060
ttgctggta cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcttaccgt cttcatggg	6120
aaaaataataa ctgttgatgg gtgtctggc agagacatca agaaataacg ccggAACATT	6180
agtgcaggca gttccacag caatggcatc ctggcatcc agcggatagt taatgatcag	6240
cccaactgacg cttgcgcga gaagattgtg caccgcgcgtt ttacaggctt cgacgcgcgt	6300
tcgttctacc atcgacacca ccacgcgttgc acccagttga tcggcgcgag atttaatcg	6360
cgcgacaatt tgcgacggcg cgtgcaggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa	6420
cgactgtttg cccgcgcgtt gttgtgccac gcgggtggaa atgttaattca gctccgcatt	6480
cgccgcgttcc acttttcccc gcgtttcgcc agaaacgtgg ctggcctggc tcaccacgcg	6540
ggaaacggtc tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt	6600
cacattcacc accctgaatt gactcttcc cgggcgcstat catgccatac cgccaaaggt	6660
tttgcgcatt tcgatgggtt ccggatctc gacgctctcc cttatgcgc tcctgcatta	6720
ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcacccgc cgccgcgaagg aatggtgcat	6780
gcaaggagat ggcgcacaac agtccccgg ccacggggcc tgccaccata cccacgcga	6840
aacaagcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatctc cccatgggtg atgtcgccg	6900
tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggtgatgcc ggccacgatg cgtccggcgt	6960
agaggatcga gatcttgtac atccctatca gtgatagaga ttgacatccc tatcagtgtat	7020
agagatactg agcacatcag caggacgcac tgaccgattt cattaaagag gagaaaggta	7080

ccatggaga aagttgtt aaggaccac gtgattaca cccatatcg agcaccattt	7140
gtcatttgc gaatgaatct gatggcaca caacatgtt gtatggatt ggattggtc	7200
ccttcatcat tacaacaag cacttgtt aagaataa tggacactg ttggccaat	7260
cactacatgg tgtattcaag gtcaagaaca ccacgactt gcaacaacac ctcatigatg	7320
ggagggacat gataattt cgcatgccta aggattccc accattctt caaaagctga	7380
aatttagaga gccacaaagg gaagagcgca tatgtttgt gacaaccaac ttccaaacta	7440
agagcatgtc tagcatggtg tcagacacta gttcacatt ccctcatct gatggcatat	7500
tctggaagca ttggattcaa accaaggatg ggcagtgtgg cagtccatta gtatcaacta	7560
gagatgggtt catgttggt atacactcg catcaattt caccaacaca aacaattt	7620
tcacaagcgt gccaaaaaac ttcatgaaat tggtgacaaa tcaggaggcg cagcagtgg	7680
ttagtgggtt gcgattaaat gctgactcg tattgtgggg gggccataaa gtttcatgg	7740
tgaaacctga agagccttt cagccagttt aggaagcgac tcaactcatg aatgaatttg	7800
tgtactcgca atgataggga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaaagc tgagttggct	7860
gctgccaccg ctgagcaata actagcataa cccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg	7920
ggttttgc tgaaggagg aactatatcc gatatcccc caagaggccc ggcagtaccg	7980
gcataacca gcctatgcct acagcatcca gggtacggt gccgaggatg acgtgagcg	8040
cattgttaga ttccatacac ggtgcctgac tgcgttagca attaactgt gataaactac	8100
cgcattaaag ctatcgatc tcgatccgc gaaat	8135
<210> 49	
<211> 1905	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VIP ELP1-120	
<400> 49	
cactctgacg ctgtttcac tgacaactac actcgctgc gtaaacagat ggctgttaaa	60
aagtacctga actctatccct gaacgtaccg ggcgtgggtg ttccggcgt ggggtttccg	120
ggtgccgggtg tgccggcgc aggtgttctt ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgc	180
gggtgtgggtg taccaggtgg cgggtttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cgggtgtgcgc	240
ggcgtgggtg ttccggcgt ggggtttccg ggtggcggtg tgccggcgc aggtgttctt	300
gggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgc ggtgtgggtg taccaggtgg cgggtttccg	360
ggtgcaggcg ttccgggtgg cgggtgtgcgc ggcgtgggtg ttccggcgt ggggtttccg	420

ggtgtgcgtg tgccgggcgc aggtgttctt ggtgttagtg tgccgggtgt tggtgtgcgg	480
ggtgttgtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg	540
ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttctt	600
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg ggtgttgggt taccaggtgg cggtgttccg	660
ggtcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg	720
ggtgtgggtg tgccgggcgc aggtgttctt ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg	780
ggtgttgtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg	840
ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttctt	900
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg ggtgttgggt taccaggtgg cggtgttccg	960
ggtcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg	1020
ggtgtgggtg tgccgggcgc aggtgttctt ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg	1080
ggtgttgtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg	1140
ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttctt	1200
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg ggtgttgggt taccaggtgg cggtgttccg	1260
ggtcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg	1320
ggtgtgggtg tgccgggcgc aggtgttctt ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg	1380
ggtgttgtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg	1440
ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttctt	1500
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg ggtgttgggt taccaggtgg cggtgttccg	1560
ggtcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg	1620
ggtgtgggtg tgccgggcgc aggtgttctt ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg	1680
ggtgttgtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg	1740
ggcgtgggtg ttccggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttctt	1800
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgcgg ggtgttgggt taccaggtgg cggtgttccg	1860
ggtcaggcg ttccgggtgg cggtgtgcgg ggctggccgt gataa	1905
<210> 50	
<211> 633	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VIP ELP1-120	
<400> 50	

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly Val

20 25 30

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly

35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

50 55 60

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro

65 70 75 80

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly

85 90 95

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

100 105 110

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly

115 120 125

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val

130 135 140

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

145 150 155 160

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly

165 170 175

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

180 185 190

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

195 200 205

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val

210 215 220

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

245	250	255	
Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala			
260	265	270	
Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly			
275	280	285	
Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val			
290	295	300	
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro			
305	310	315	320
Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly			
325	330	335	
Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val			
340	345	350	
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly			
355	360	365	
Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val			
370	375	380	
Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro			
385	390	395	400
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly			
405	410	415	
Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val			
420	425	430	
Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly			
435	440	445	
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val			
450	455	460	
Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro			
465	470	475	480
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly			
485	490	495	
Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val			

500 505 510
Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val
515 520 525

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val
530 535 540
Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
545 550 555 560
Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
565 570 575
Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
580 585 590
Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

595 600 605
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
610 615 620
Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630