(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0003821
(43) 공개일자 2020년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/164 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-7032830
(22) 출원일자(국제) 2018년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년11월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/026447
(87) 국제공개번호 WO 2018/187682
국제공개일자 2018년10월11일
(30) 우선권주장
62/482,963 2017년04월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
세컨드 게놈, 아이엔씨.
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341
(72) 발명자
한 앤드류 원희
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
굿이어 앤드류 윗먼
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 107 항

(54) 발명의 명칭 **상피 장벽 기능 장애 치료용 단백질**

(57) 요 약

본 발명은 상기 단백질을 포함하는 치료 단백질 및 제약학적 조성물에 관한 것으로, 이는 다양한 인간 질환들을 치료함에 유용성을 가진다. 특정 양상들에서, 개시된 치료 단백질은 상피 세포 장벽 기능 또는 완전성 감소와 관련된 인간 위장관 염증 질환 및 위장관 병태들을 치료함에 유용하다. 또한, 개시된 치료 단백질은 *그 중에서도*, 크론병 및 궤양성 대장염을 비롯한 인간 염증성 장 질환 치료에 유용하다.

(52) CPC특허분류
A61P 37/02 (2018.01)
C07K 14/195 (2013.01)

(72) 발명자
구즈랄 타룬미트
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
데산티스 토드 자캐리
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
다바흐 카림
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
타케우치 토시히코
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
진 예
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
윌콕슨 미치 이주미
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.
바나스 스테파니
미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코, 알레르톤 애버뉴 341, 씨/오 세컨드 게놈 아이엔씨.

(30) 우선권주장
62/607,706 2017년12월19일 미국(US)
62/611,334 2017년12월28일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애의 치료 방법:

a. 필요로 하는 환자에게 다음을 포함하는 제약학적 조성물을 투여하는 단계:

i. 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및

ii. 제약학적으로 허용가능한 담체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 위장관 벽 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 위장관 점막 상피 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 장 상피 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 최소한 하나인, 방법: 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 낭염, 과민성 장 증후군, 장 감염, *클로스트리디움 디피실레* 감염, 대사 질환, 비만, 유형 2 당뇨병, 비-알콜성 지방간염, 비-알콜성 지방간 질환, 간 장애, 알콜성 지방간염, 복강 질환, 괴사 소장대장염, 위장 장애, 단장 증후군, GI 점막염, 화학요법 유도된 점막염, 방사선 유도된 점막염, 구강 점막염, 간질성 방광염, 신경계 장애, 인지 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 자폐증, 화학요법 관련 지방간염 (CASH), 및 전술한 질환들의 소아 버전.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 염증성 장 질환인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 크론병인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 궤양성 대장염인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 방법: 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 21

청구항 1에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 22

청구항 1에 있어서, 상기 투여는 직장, 비경구, 정맥내, 국소, 경구, 피부, 경피, 또는 피하 투여를 포함하는, 방법.

청구항 23

청구항 1에 있어서, 환자의 입, 위장관 내강, 및/또는 장으로 투여되는 방법.

청구항 24

청구항 1에 있어서, 환자는 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애와 관련된 최소한 하나의 증상의 감소를 경험하는, 방법.

청구항 25

청구항 1에 있어서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애와 관련된 최소한 하나의 증상의 감소를 경험하는, 방법: 복부 통증, 대변의 혈액, 대변의 고름, 열, 체중 감소, 빈번한 설사, 피로, 식욕 감소, 후중감, 및 직장 출혈.

청구항 26

청구항 1에 있어서, 투여는 환자의 위장관 염증을 감소시키는, 방법.

청구항 27

청구항 1에 있어서, 투여는 환자의 장 점막 염증을 감소시키는, 방법.

청구항 28

청구항 1에 있어서, 투여는 환자의 장 조직에서 뮤신의 생성을 증가시키는, 방법.

청구항 29

청구항 1에 있어서, 투여는 환자의 장 상피 상처 치유를 증가시키는, 방법.

청구항 30

청구항 1에 있어서, 투여는 환자의 장 상피 세포 증식을 증가시키는, 방법.

청구항 31

청구항 1에 있어서, 최소한 하나의 제 2 치료제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

청구항 1에 있어서, 최소한 하나의 제 2 치료제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 제 2 치료제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택되는 방법: 지사제, 5-아미노살리실릭 애시드 화합물, 항염제, 항생제, 항체, 항-사이토카인제, 항-염증성 사이토카인제, 스테로이드, 코르티코스테로이드, 및 면역억제제.

청구항 33

다음을 포함하는, 제약학적 조성물:

a. 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및

b. 제약학적으로 허용가능한 담체.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 35

청구항 33에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 36

청구항 33에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 37

청구항 33에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 38

청구항 33에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 39

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물: 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

청구항 40

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 41

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 42

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 43

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 44

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 45

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 46

청구항 33에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

청구항 47

청구항 33에 있어서, 직장, 비경구, 정맥내, 국소, 경구, 피부, 경피, 또는 피하 투여를 위해 제형화된, 제약학적 조성물.

청구항 48

청구항 33에 있어서, 치료 단백질이 환자의 위장관 내강 및/또는 장에서 활성을 가지도록 제형화된, 제약학적 조성물.

청구항 49

다음을 포함하는 발현 벡터: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 51

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 52

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 53

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 54

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 55

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

청구항 56

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 57

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 58

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 59

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 60

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 61

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 62

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 63

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 64

청구항 49에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 65

다음을 포함하는 숙주 세포: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드하는 외인성 폴리뉴클레오티드.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 67

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 68

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 69

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 70

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 71

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

청구항 72

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 73

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 74

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 75

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 76

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 77

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 78

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 79

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 80

청구항 65에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 81

청구항 65에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 특이적 신호 서열을 추가로 인코드하는, 숙주 세포.

청구항 82

청구항 65에 있어서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 핵산 서열과 최소한 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하는, 숙주 세포: 서열 번호: 4, 서열 번호: 6, 서열 번호: 8, 서열 번호: 10, 서열 번호: 12, 서열 번호: 14, 서열 번호: 16, 서열 번호: 18, 및 서열 번호: 20.

청구항 83

청구항 65에 있어서, 상기 숙주 세포는 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 84

청구항 65에 있어서, 숙주 세포는 *대장균* 세포인, 숙주 세포.

청구항 85

청구항 65에 있어서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 86

청구항 65에 있어서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 세포인, 숙주 세포.

청구항 87

다음 단계를 포함하는, 단백질 제조 방법: 청구항 65의 숙주 세포를, 인코드되는 단백질의 발현에 충분한 조건 하에서 배양하는 단계.

청구항 88

다음을 포함하는, 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 89

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 90

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 91

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 92

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 93

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

청구항 94

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

청구항 95

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3의 아미노산 서열.

청구항 96

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 5의 아미노산 서열.

청구항 97

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 7의 아미노산 서열.

청구항 98

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 9의 아미노산 서열.

청구항 99

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 11의 아미노산 서열.

청구항 100

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 13의 아미노산 서열.

청구항 101

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 15의 아미노산 서열.

청구항 102

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 17의 아미노산 서열.

청구항 103

청구항 88에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 19의 아미노산 서열.

청구항 104

청구항 88에 있어서, 상기 단백질은 *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

청구항 105

청구항 88에 있어서, 상기 단백질은 단백질 부재시에 수행된 분석과 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 최소한 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 만큼 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

청구항 106

청구항 88에 있어서, 상기 단백질은 키나제 억제제 대조와 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

청구항 107

청구항 88항에 있어서, 상기 단백질은 스타우로스포린 또는 미오신 경쇄 키나제 대조와 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 12월에 출원된 미국 가특허출원 제 62/611,334, 2017년 12월 19일에 출원된 미국 가특허출원 제 62/607,706호, 및 2017년 4월 7일에 출원된 미국 가특허출원 제 62/482,963호에 대한 우선권 이익을 주장하며, 상기 출원 각각은 그 전문이 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.

[0003] **전자적으로 제출된 문서 파일의 설명**

[0004] 본 출원과 함께 전자적으로 제출된 문서 파일의 내용은 그 전문이 참고문헌으로 본 명세서에 포함된다: 다음과 같은 파일명의 컴퓨터 판독가능한 형식의 서열 목록 사본: 2018년 4월 4일에 생성된 SEGE_001_03WO_SeqList_ST25.txt, 파일 크기 ≈ 45.3 킬로바이트.

[0005] **분야**

[0006] 본 발명은, *그 중에서도*, 위장관 염증 질환 및 상피 장벽 기능 장애의 치료에 적용되는 신규한 단백질 및 이러

한 단백질을 포함하는 제약학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 단백질 및 제약학적 조성물은 이상 투과성 상피 장벽과 연관된 질환 상태 및 염증성 장 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 특히 적용된다.

배 경 기 술

[0007] **배경**

[0008] 염증성 장 질환 (IBD)은 위장관 점막에 대한 조직병리학적 손상에 수반되는 빈번하고 출혈이 있는 장 운동을 초래하는 원인불명의 이종성 질환이다 (Zhang 외, 2017, Front Immunol, 8:942). 질환의 구체적인 유발 요인은 잘 밝혀지지 않았으나, 질환 진행에 관한 한 가지 제안은 장 장벽 기능의 파열이 박테리아 또는 박테리아 성분들이 점막 조직 내부로 전위할 수 있게 함을 제시한다 (Coskun, 2014, Front Med (Lausanne), 1:24; Martini 외, 2017, Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 4:33-46). 박테리아 전위는 염증 신호전달을 활성화시키고 이는 또 다른 장벽 파열을 촉발시켜, 장벽 파열, 박테리아 전위 및 염증의 순환 증폭 고리를 생성한다. 현재 많은 치료법이 염증을 목표로 하지만, 점막 치유를 촉진하는 요법의 부족은 상피 복구 및 장 장벽 완전성을 촉진시키는 새로운 요법에 대한 기회를 제공한다.

[0009] 박테리아 전위가 IBD를 촉발시킬 수 있다는 가설을 확장하여, 보다 최근의 연구들은 장 미생물총의 유해한 변화, 또는 불균형이, IBD 발달을 촉진시킬 수 있음을 증명하였다.

[0010] 현재, 시장에서 구입가능한 많은 IBD 치료제들은 단순히 IBD와 관련된 상기 논의한 염증 반응을 표적하여 억제하는 것을 목표로 한다. 비록 도움이 되긴 하지만, 이러한 좁은 치료 작용 방식은 상피 장벽 완전성이 질환의 병인에 일정한 역할을 한다는 중요한 기여를 간과하는 것이다.

[0011] 그러므로, 면역계의 염증 반응을 억제할 뿐만 아니라 개체의 상피 장벽 기능을 회복시키는 작용을 하는 치료제의 개발이 해당 분야에 크게 요구되고 있다. 또한, 장기 보관 조건하에서 뿐만 아니라 단백질 치료제의 제조 및/또는 가공을 통해 안정한 본 명세서에 기재된 바와 같은 단백질 치료제의 제조가 필요하다.

발명의 내용

[0012] **발명의 요약**

[0013] 본 발명은 위장관 장애, 가령, 염증성 장 질환 (IBD)을 앓고 있는 대상체를 효과적으로 치료할 수 있는 치료제에 대한 의약 업계의 중요한 필요성을 해결하여 준다. 한 양상에서, 상피 장벽 완전성을 유지시키고 및/또는 상피 장벽 복구를 개선할 수 있는 신규한 단백질 치료제들이 제공된다. 일부 구체예들에서, 상피 장벽는 장 상피 장벽이다. 이들 단백질 치료제들은 또한 대상체의 장의 염증을 감소시키고 및/또는 장의 염증과 관련된 증상들을 감소시킬 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 제공되는 단백질 치료제는 위장관 상피 세포 장벽 기능 또는 완전성 감소와 관련될 수 있는 수많은 질환들 및/또는 증상들의 치료에 유용하다.

[0015] 일부 구체예들에서, 본 명세서는 마이크로바이옴으로부터 유래한 신규한 단백질 치료제 및 이러한 단백질 치료제의 사용 방법을 개시한다. 한 특정 구체예에서, 마이크로바이옴에서 유래한 그리고 서열 번호:19에 대하여 최소한 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 제공된다. 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 서열 번호:3과 동일한 아미노산 서열을 포함하지 않는다. 또 다른 구체예들에서, 치료 단백질은 자연 발생이 아닌 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:1, 서열 번호:3, 서열 번호:5, 서열 번호:7, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 또는 서열 번호:19의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:19의 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:19에 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이 때 상기 아미노산 서열은 서열 번호:19 또는 서열 번호:3에 대해 최소한 1, 2, 3 또는 4개 아미노산 치환을 가진다. 다른 구체예들에서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호:3에 대하여 최소한 2 내지 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35개 미만의 아미노산 치환을 가진다. 또 다른 구체예들에서, 치료 단백질은 자연 발생이 아닌 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함한다. 서열 번호:3과 관련된 다른 구체예들에서, X53은 N, S, T, M, R, Q 이고 및/또는 X83은 N, R 또는 K이고, 및/또는 X84는 G 또는 A이고, 및/또는 X147은 C, S, T, M, V, L, A, 또는 G이고, 및/또는 X151은 C, S, T, M, V, L, A, 또는 G이다. 또 다른 구체예들에서, X53은 N, S 또는 K이고 및/또는 X83은 N 또는 R이고 및/또는 X84는 G 또는 A이고 및/또는 X147은 C, V, L 또는 A이고 및/또는 X151은 C, S, V, L 또는 A이다.

[0019] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 약 200 내지 250개 아미노산, 210 내지 250개 아미노산, 220 내지 250개 아미노산, 220 내지 240개 아미노산, 230 내지 250개 아미노산, 230 내지 240개 아미노산, 또는 230 내지 235개 아미노산, 220 내지 275개 아미노산, 220 내지 260개 아미노산, 230 내지 260개 아미노산, 240 내지 250개 아미노산, 250 내지 260개 아미노산, 230 내지 256개 아미노산, 240개 아미노산 내지 256개 아미노산, 245개 아미노산 내지 256개 아미노산 길이이다. 다른 구체예들에서, 치료 단백질은 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259 또는 260개 아미노산 길이이다.

[0020] 일부 구체예들에서, 본 발명은 서열 번호:19를 포함하는 치료 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편 또는 이의 변이체를 개시한다. 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:3과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 결합하지 않는다. 또 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:19와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 결합하지만 서열 번호:3과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질에는 결합하지 않는다.

[0021] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 시험관내 분석에서 상피 세포층의 장벽 기능을 증가시키며, 이 때 이러한 증가는 단백질 부재시 분석에서의 장벽 기능에 상대적이다. 다른 구체예들에서, 시험관내 분석법은 경상피 전기 저항 (TEER) 분석법이다. 또 다른 구체예들에서, 장벽 기능의 증가는 단백질 부재시 분석에서의 전기 저항보다 최소한 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 큰 전기 저항 증가이다. 일부 구체예들에서, 상피 세포층은 장 상피 세포층이다. 또 다른 구체예들에서, 장 상피 세포층은 장세포 및 잔세포를 포함하는 세포층이다.

[0022] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 시험관내 분석법에서 세포로부터 전-염증성 사이토카인의 분비를 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 시험관내 분석은 단백질의 존재 및 부재시 열 사멸된 *대장균*과 함께 단핵구 세포의 배양을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인은 TNF-α, IL-17, IL-1b, IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3α, CXCL1, 및 IL-23으로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0023] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 시험관내 분석에서 세포로부터 항-염증성 사이토카인의 분비를 증가시킨다. 다른 구체예들에서, 시험관내 분석은 단백질의 존재 및 부재시 열 사멸된 *대장균*과 함께 단핵구의 배양을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0024] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체에서 장 조직 병리학을 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 대상체는 화학물질을 처리하여 장 조직 손상을 가지도록 유도되었다. 다른 구체예들에서, 대상체를 화학물질 덱스트란 소듐 설페이트 (DSS)로 처리하여 장 조직 손상을 유도하였다. 또 다른 구체예들에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 구체예들에서, 동물은 설치류이다. 다른 구체예들에서, 대상체는 비 인간 영장류이다.

[0025] 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체의 위장관 염증을 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체의 장 점막 염증을 감소시킨다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체의 장 상피 세포 장벽 기능 또는 완전성을 개선한다.

[0026] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체의 장 조직에서 뮤신의 양을 증가시킨다.

[0027] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체의 장 상피 세포 상처 치유를 증가시킨다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 시험관내 분석에서 장 상피 세포 상처 치유를 증가시킨다.

[0028] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체에서 상기 단백질을 투여받은 대상체의 결장 단축을 방지 또는 감소시킨다.

[0029] 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 상기 단백질을 투여받은 대상체의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 사이토카인을 조절한다 (즉, 증가시키거나 감소시킨다).

[0030] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인 수준을 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인은 TNF-α, IL-17, IL-1β, IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3α, CXCL1, 및 IL-23으로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0031] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 수준을 증가시킨다. 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0032] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 수준을 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0033] 일부 구체예들에서, 본 발명은 신규한 단백질 치료제를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 및 숙주 세포에서 상기 핵산의 발현 방법을 개시한다. 한 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:19와 최소한 약 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%, 또는 100% 동일한 단백질을 인코드하는 서열을 포함한다. 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:19에 최소한 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일하고 서열 번호:3에 100% 미만 동일한 단백질을 인코드하는 서열을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:1 또는 서열 번호:3의 비-자연 발생 변이체인 단백질을 인코드한다. 또 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 또 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 *대장균*에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0034] 일부 구체예들에서, 본 발명은 서열 번호:20에 최소한 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 핵산을 개시한다. 다른 구체예들에서, 상기 핵산은 서열 번호:20에 최소한 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하고 서열 번호:4에 100% 미만 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 상기 핵산은 서열 번호:2 또는 서열 번호:4의 비-자연 발생 변이체인 서열을 포함한다.

[0035] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 N-말단 및/또는 C-말단에서 화학적으로 변형된다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질의 N-말단은 아세틸화에 의해 화학적으로 변형된다. 또 다른 구체예들에서, C-말단은 아마이드화에 의해 화학적으로 변형된다.

[0036] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 페길화된다.

[0037] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 실질적으로 순수하며 이는 당화, 유비퀴틴화, 나이트로실화, 메틸화, 아세틸화, 또는 지질화에 의해 변형된다.

[0038] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 제 2 단백질에 융합된다. 다른 구체예들에서, 제 2 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인 또는 인간 혈청 알부민 단백질 도메인이다.

[0039] 일부 양상들에서, 본 발명은 다음을 포함하는 염증성 장 질환 치료를 위한 제약학적 조성물을 제공한다: 서열 번호:19에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질 및 제약학적으로 허용가능한 담체. 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 순수하거나 실질적으로 순수하다. 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함한다. 한 대안적 구체예에서, 상기 단백질은 서열 번호:3과 동일한 서열을 포함하지 않거나 또는 상기 단백질은 서열 번호:3의 비-자연 발생 변이체이다. 다른 구체예들에서, 상기

단백질은 서열 번호:5, 서열 번호:7, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 및 서열 번호:19로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3, 서열 번호:7 또는 서열 번호:19의 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 직장, 비경구, 정맥내, 국소, 경구, 피부, 경피, 또는 피하 투여를 위해 제형화된다. 다른 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 액체, 겔, 또는 크림이다. 또 다른 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 장용 코팅을 포함하는 고체 조성물이다.

[0041] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 크림, 캡슐, 액체, 겔 또는 에멀전이다.

[0042] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 지연된 방출을 제공하도록 제형화된다. 다른 구체예들에서, 지연된 방출은 위장관 내부로의 방출이다. 또 다른 구체예들에서, 지연된 방출은 입, 소장, 대장 및/또는 직장 내부로이다.

[0043] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 서방형 방출 (sustained release)을 제공하도록 제형화된다. 다른 구체예들에서, 서방형 방출은 위장관 내부로의 방출이다. 또 다른 구체예들에서, 서방형 방출은 입, 소장, 대장 및/또는 직장 내부로이다. 또 다른 구체예들에서, 서방형 방출 조성물은 약 1 내지 20 시간, 1 내지 10 시간, 1 내지 8 시간, 4 내지 12 시간 또는 5 내지 15 시간의 시기에 걸쳐 치료 제제를 방출한다.

[0044] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 제 2 치료제를 추가로 포함한다. 다른 구체예들에서, 제 2 치료제는 지사제, 5-아미노살리실릭 애시드 화합물, 항염제, 항생제, 항-사이토카인제, 항-염증성 사이토카인제, 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제, JAK 억제제, 항-인테그린 생물학제제, 항-IL12/23R 생물학제제, 및 비타민으로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0045] 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 프로테아제 억제제를 추가로 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 프로테아제 억제제는 대변 물질의 존재시 및/또는 혈액의 존재시 치료 단백질의 분해를 억제한다.

[0046] 전술한 바와 같이, 이들 신규한 단백질 치료제는 대상체의 상피 장벽 기능 및 완전성을 촉진시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상피 장벽 기능은 장 상피 장벽 기능이다. 추가적으로, 상기 단백질의 치료 효과는 IBD 개체에서 염증 면역 반응의 억제를 포함한다. 그러므로, 본 발명은 위장관 염증 병태, 및 손상된 위장관 상피 장벽 완전성이 관여하는 질환 상태의 숙주를 치료하기 위한, 개시된 치료 단백질의 이용 방법에 대한 상세한 지침을 제공한다.

[0047] 일부 구체예들에서, 다음을 포함하는, 염증성 장 질환 또는 장애 환자의 염증성 장 질환 또는 장애 치료 방법을 제공한다: 다음을 포함하는 제약학적 조성물을 환자에게 투여하는 것: i) 서열 번호:3, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 또는 서열 번호:19에 최소한 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%, 또는 100% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및 ii) 제약학적으로 허용가능한 담체. 상기 방법의 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 또는 서열 번호:19와 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:3과 동일하지 않거나 서열 번호:3의 비-자연 발생 변이체이다.

[0048] 일부 구체예들에서, 환자는 장 염증을 진단 받았다. 다른 구체예들에서, 장 염증은 소장 및/또는 대장에 존재한다. 또 다른 구체예들에서, 장 염증은 직장에 존재한다. 또 다른 구체예들에서, 환자는 낭염을 진단 받았다.

[0049] 일부 구체예들에서, 환자는 장 궤양을 진단 받았다. 다른 구체예들에서, 환자는 배출성 장피 및/또는 직장 누공을 진단 받았다.

[0050] 일부 구체예들에서, 환자는 크론병 (CD)을 진단받았다. 다른 구체예들에서, CD는 약한 활성의 CD이다. 또 다른 구체예들에서, CD는 보통 내지 중증 활성 CD이다. 또 다른 구체예들에서, 환자는 소아 CD를 진단 받았다.

[0051] 일부 구체예들에서, 환자는 단장 증후군 또는 과민성 장 증후군을 진단 받았다.

[0052] 일부 구체예들에서, 환자는 점막염을 진단 받았다. 다른 구체예들에서, 점막염은 경구 점막염이다. 또 다른 구체예들에서, 점막염은 화학요법-유발된 점막염, 방사선 요법-유발된 점막염, 화학요법-유발된 경구 점막염, 또는 방사선 요법-유발된 경구 점막염이다. 또 다른 구체예들에서, 점막염은 위장관 점막염이다. 또 다른 구체예들에서, 위장관 점막염은 소장, 대장, 또는 직장의 점막염이다.

[0053] 일부 구체예들에서, CD를 진단받은 환자에 대한 투여는 배출성 장피 및/또는 직장 누공의 수를 감소시켰다. 다른 구체예들에서, 상기 투여는 누관 질환이 있는 성인 환자들에서 누공 봉합을 유지시킨다.

[0054] 다른 구체예들에서, 환자는 궤양성 대장염 (UC)을 진단받았다. 다른 구체예들에서, UC는 약한 활성의 UC이다. 또 다른 구체예들에서, UC는 보통 내지 중증 활성의 UC이다. 또 다른 구체예들에서, 환자는 소아 UC를 진단 받았다.

[0055] 일부 구체예들에서, 환자는 IBD로부터 임상적으로 완화된다. 다른 구체예들에서, 환자는 UC, 소아 UC, CD 또는 소아 CD로부터 임상적으로 완화된다.

[0056] 일부 구체예들에서, 환자는 크론병 또는 궤양성 대장염 이외의 염증성 장 질환 또는 장애를 가진다. 다른 구체예들에서, 환자는 염증성 장 질환과 연관된 최소한 하나의 증상을 가진다.

[0057] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 위장관 염증을 감소시키고 및/또는 환자의 염증성 장 질환과 연관된 장 점막 염증을 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 장 상피 세포 장벽 기능 또는 완전성을 개선한다.

[0058] 일부 구체예들에서, 상기 투여 후 환자는 염증성 장 질환 또는 장애와 연관된 최소한 하나의 증상 감소를 경험한다. 다른 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 증상은 복부 통증, 대변의 혈액, 대변의 고름, 열, 체중 감소, 빈번한 설사, 피로, 식욕 감소, 메스꺼움, 경련, 빈혈, 후중감, 및 직장 출혈로 구성된 그룹에서 선택된다. 또 다른 구체예들에서, 상기 투여 후 환자는 설사 빈도 감소, 대변의 혈액 감소 및/또는 직장 출혈 감소를 경험한다.

[0059] 일부 구체예들에서, 환자는 종래의 요법에 대하여 부적절한 반응을 경험하였다. 다른 구체예들에서, 종래의 요법은 아미노살리실레이트, 코르티코스테로이드, 싸이오퓨린, 메토트렉세이트, JAK 억제제, 스핑고신 1-포스페이트 (S1P) 수용체 억제제, 항-인테그린 생물학제제, 항-IL12/23R 또는 항-IL23/p10 생물학제제, 및/또는 항-종양괴사 인자 제제 또는 생물학제제를 이용한 치료이다.

[0060] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 점막 또는 조직에서의 사이토카인 수준을 조절한다 (즉, 증가시키거나 감소시킨다).

[0061] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자에서의 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인 수준을 억제한다. 다른 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인은 TNF-α, IL-17, IL-1b, IL-2, IFN-ɣ, IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3α, CXCL1, 및 IL-23으로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0062] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 수준을 증가시킨다. 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0063] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 조직 및/또는 점막에서 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 수준을 감소시킨다. 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0064] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 장 내강에서 뮤신의 양을 증가시킨다.

[0065] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자에서의 장 상피 세포 상처 치유를 증가시킨다.

[0066] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자에서의 결장 단축을 방지 또는 감소시킨다.

[0067] 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자에 대한 상기 제약학적 조성물의 직장, 정맥내, 비경구, 경구, 국소, 피부, 경피 또는 피하 투여를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 투여는 위장관 내강에 대한 것이다.

[0068] 일부 구체예들에서, 환자에게 또한 최소한 하나의 제 2 치료제가 투여된다. 다른 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 제 2 치료제는 지사제, 항염제, 항체, 항생제, 또는 면역억제제로 구성된 그룹에서 선택된다. 또 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 제 2 치료제는 아미노살리실레이트, 스테로이드, 또는 코르티코스테로이드이다. 다른 구체예들에서, 최소한 하나의 제 2 치료제는 아달리무맙, 페골, 골리무맙, 인플릭시맙, 베돌리주맙, 우스테키누맙, 토파시티닙 및 세톨리주맙 또는 세톨리주맙 페골로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0069] 일부 양상들에서, 서열 번호:19에 최소한 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 제

공된다.

[0070] 일부 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:5, 서열 번호:7, 서열 번호:9 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 또는 서열 번호:19에 최소한 99% 또는 100% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드한다. 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드한다. 또 다른 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:3과 동일하지 않은 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드한다.

[0071] 일부 양상들에서, 숙주 세포 및 전술한 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 발현 시스템이 제공된다.

[0072] 일부 구체예들에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵이다. 다른 구체예들에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 효모 세포 또는 박테리아 세포이다. 또 다른 구체예들에서, 박테리아 세포는 *대장균 (대장균)*이다. 또 다른 구체예들에서, 포유동물 세포는 CHO 세포이다.

[0073] 일부 양상들에서, 상기 단백질의 제조 방법이 제공된다.

[0074] 일부 구체예들에서, 상기 단백질의 제조 방법은 전술한 숙주 세포를 전술한 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염하는 단계, 이러한 형질전환된 또는 형질감염된 숙주 세포를 전술한 외인성 폴리뉴클레오티드에 의해 인코드되는 전술한 단백질의 발현에 충분한 조건하에서 배양하는 단계를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 방법은 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포 및 배양 배지로부터 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0075] 일부 구체예들에서, 질환-가령, 장 상피 장벽 기능 연관 질환-의 치료 방법이 제공되며, 이 방법은 본 명세서 및 서열 목록에 개시된 임의의 서열을 이용한다.

도면의 간단한 설명

[0076] **도면의 간단한 설명**

도 1A 및 도 1B는 실시예 2에 기재된 바와 같이, 염증 유발된 파열 후 SG-11에 의한 상피 장벽 완전성의 복원을 보여준다.

도 2A는 실시예 3에 기재된 바와 같이, 열 사멸된 *대장균* (HK *대장균*)에 의해 유발된 TNF-α에 대한 SG-11 투여 효과를 보여준다.

도 2B는 실시예 3에 기재된 바와 같이 HK *대장균*에 의해 유발된 IL-23 생성에 대한 SG-11 투여 효과를 보여준다.

도 3은 실시예 4에 기재된 바와 같이 HK *대장균*에 의해 유발된 IL-10 생성에 대한 SG-11 투여 효과를 보여준다.

도 4는 실시예 5에 기재된 바와 같이 HK *대장균*으로 자극 후 뮤신 발현에 대한 SG-11 투여 효과를 보여준다.

도 5는 실시예 6에 기재된 바와 같이 상피 세포 상처 치유에 대한 SG-11 투여 효과를 보여준다.

도 6은 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 상피 중심 장벽 기능 판독값들에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 7은 실시예 7에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 손상된 장벽 기능에 반응하는 염증 판독값에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 8은 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 체중에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 9는 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 육안 병리에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 10A, 10B 및 **10C**는 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델로부터 얻은 근위 (**도 10A**), 원위 (**도 10B**) 및 근위와 원위 모두의 (**도 10C**) 조직에 관한 조직병리학적 분석 결과를 보여준다.

도 11A는 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 길이에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 11B는 실시예 7에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 중량-대-길이 비율에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 12는 실시예 8에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델의 SG-11 처리 후 상피 장벽 완전성을 보여준다.

도 13은 실시예 8에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 장벽 기능의 염증 중심 판독값을 보여준다.

도 14는 실시예 8에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 체중 감소의 방지를 보여준다.

도 15A는 실시예 8에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 길이에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 15B는 실시예 8에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 중량-대-길이 비율에 대한 SG-11 투여의 효과를 보여준다.

도 16A, 16B 및 **16C**는 실시예 8에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델로부터 얻은 근위 (**도 16A**), 원위 (**도 16B**) 및 근위와 원위 모두의 (**도 16C**) 조직에 관한 조직병리학적 분석 결과를 보여준다.

도 17은 *로세부리아 (Roseburia)* 종으로부터의 유사한 단백질 서열들과 SG-11 (서열 번호:7)의 다수 서열 정렬 분석 결과를 보여준다.

도 18은 SG-11 안정성에 대한 **도 18A**, **도 18B**, **도 18C**, **도 18D**, **도 18E**, **도 18F**, **도 18G**, **도 18H**, 및 **도 18I**의 조건들의 효과를 보여준다. **도 18A** 내지 **도 18I**와 관련된 조건들에 관하여 실시예 14를 참고하라.

도 19는 SG-11V5 안정성에 대한 **도 19A**, **도 19B**, **도 19C**, **도 19D**, **도 19E**, **도 19F**, **도 19G**, **도 19H**, 및 **도 19I**의 조건들의 효과를 보여준다. **도 19A** 내지 **도 19I**와 관련된 조건들에 관하여 실시예 14를 참고하라.

도 20은 실시예 15에 기재된 바와 같이, 염증 유발된 파열 후 SG-11 및 SG-11 변이체에 의한, 상피 장벽 완전성의 복원을 보여준다.

도 21A 및 **도 21B**는 실시예 16에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델의 SG-11 및 SG-11의 변이체 처리 후 상피 장벽 완전성을 보여준다.

도 22A 및 **도 22B**는 실시예 16에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 장벽 기능의 염증 중심 판독값을 보여준다.

도 23A 및 **도 23B**는 실시예 16에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 체중 감소에 대한 SG-11 또는 SG-11의 변이체 처리 효과를 보여준다.

도 24는 실시예 16에 기재된 바와 같이 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 육안 병리에 대한 SG-11 또는 SG-11의 변이체 투여의 효과를 보여준다.

도 25A 및 **도 25B**는 실시예 16에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 길이에 대한 SG-11 또는 SG-11의 변이체 처리 효과를 보여준다.

도 26A 및 **도 26B**는 실시예 16에 기재된 바와 같이, 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 중량-대-길이 비율에 대한 SG-11 또는 SG-11의 변이체 처리 효과를 보여준다.

도 27A는 SG-11 (서열 번호:7)과 SG-11 변이체 (서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 서열 번호:19)의 다중 서열 정렬 분석 결과를 보여주며, **도 27B**는 다중 서열 정렬 분석에 기초한 퍼센트 동일성 행렬 결과를 보여준다. 본 명세서에 기재된 다중 정렬 분석을 위해 EMBL-EBI사가 제공하는 Clustal Omega 프로그램을 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] **상세한 설명**

[0078] 본 발명은 위장관 장애와 연관된 증상을 앓고 있는 대상체의 치료에 유용한 신규한 단백질 치료제를 제공한다. 예를 들면, 이들 단백질은 상피 장벽 기능 및/또는 완전성을 촉진 또는 개선할 수 있다. 상기 단백질은 또한 IBD 개체에서 염증 면역 반응을 억제할 수 있다. 본 명세서에 제공된 단백질 치료제는 위장관 상피 세포 장벽

기능 또는 장의 완전성 및 염증 감소와 연관된 수많은 질환들을 치료함에 유용하다

[0079] 본 발명에서, 원래의 단백질에 필적하는 또는 이보다 우수한 치료 활성을 가지는 단백질 변이체들이 제공되지만, 상기 단백질 변이체들은 단백질 치료 제품의 제조 및 가공에 걸쳐 그리고 장기간 보관 조건들하에서 개선된 안정성을 가진다.

[0080] **정의**

[0081] 본 명세서에 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에서 사용되는 과학 및 기술 용어들은 해당 분야의 숙련된 기술자들이 통상적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 화학, 분자 생물학, 세포 및 암 생물학, 면역학, 미생물학, 약동학 및 단백질과 핵산 화학의 기술들과 연관되어 사용되는 명명법은 해당 분야에 널리 공지이며 통상적으로 사용된다. 그러므로, 하기 용어들은 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 이해되는 거승로 생각되지만, 하기 정의들은 본 명세서에 개시된 주제들의 설명을 용이하게 하기 위해 제시된다.

[0082] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다" 또는 변화형들, 가령, "포함하다" 또는 "포함하는"은 언급된 성분, 또는 성분들의 그룹의 포함을 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 임의의 다른 성분 또는 성분들의 그룹을 배제시키는 것은 아니다.

[0083] 용어 "하나 (a 또는 an)"는 해당 엔터티 하나 이상을 지칭한다, 즉, 복수의 지시대상을 지칭할 수 있다. 이와 같이, 용어 "하나"("a" 또는 "an"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 또한, 부정 관사 "a" 또는 "an"에 의한 "한 원소"의 지칭은 해당 내용이 해당 원소들 중 하나가 그리고 오직 하나만 존재함을 명확하게 필요로 하지 않는 한 해당 원소들이 하나 이상 존재하는 가능성을 배제시키지 않는다.

[0084] 용어 "포함하는"은 "포함하지만 이에 제한되는 것은 아님"을 의미하기 위해 사용되며 "포함하는" 및 "포함하지만 이에 제한되는 것은 아님"은 호환적으로 사용된다.

[0085] 본 명세서에서 사용되는 용어 "위장관" 또는 "위장관", "소화관", 및 "장"은 입에서 항문까지 연장하는, 그리고 입, 식도, 위, 소장, 대장, 직장 및 항문을 포함하는 일련의 중공 장기들을 지칭하기 위해 호환적으로 사용될 수 있다. 용어 "위장관" 또는 "위장관", "소화관", 및 "장"은 항상 소화관의 특정 부분을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0086] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SG-11"은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 또한 본 명세서에 기재된 동일 또는 유사한 기능적 활성을 가지는 이의 변이체들을 지칭한다. 따라서, SG-11은 본 명세서에서 서열 번호:1, 서열 번호:3, 서열 번호:5, 서열 번호:7, 또는 서열 번호:9를 포함하는 또는 이들로 구성된 단백질, 또는 이의 변이체 또는 단편들을 지칭할 수 있다. SG-11 변이체들의 예들에는 서열 번호:11 (SG-11V1), 서열 번호:13 (SG-11V2), 서열 번호:15 (SG-11V3), 서열 번호:17 (SG-11V4), 및 서열 번호:19 (SG-11V5)를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 미국 가특허 출원 (2017년 4월 7일 출원된 62/482,963; 2017년 12월 19일 출원된 62/607,706; 2017년 12월 28일 출원된 62/611,334, 본 명세서는 이들에 대한 우선권을 주장하며 이들 각각은 본 명세서에 그 전문이 참고문헌으로 포함됨)에서 용어 "실험 단백질 1" 및 이의 변이체들이 사용되며 이는 본 명세서에서 사용되는 SG-11 또는 이의 변이체들의 동의어이다.

[0087] "신호 서열" (또한 "전구서열", "신호 펩티드", "리더 서열" 또는 "리더 펩티드"로 명명)은 발생기 단백질의 N-말단에 위치한 아미노산의 서열을 지칭하며, 이는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진할 수 있다. 생성된 세포외 단백질의 성숙 형태는 신호 서열이 없으며, 이는 분비 과정 중에 절단되어 나간다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 "서열 동일성", "퍼센트 동일성", "퍼센트 상동성" 또는 예를 들어, "~와 50 % 동일한 서열"을 포함하는 용어들은 비교 범우에 걸쳐 해당 서열이 뉴클레오티드마다 또는 아미노산마다를 기준으로 하여 동일한 정도를 지칭한다. 그러므로, "서열 동일성의 백분율"은 해당 비교 범위에 걸쳐 2개의 최적 정렬된 서열들을 비교하고, 상기 동일한 핵산 염기 (*예컨대*, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (*예컨대*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 두 서열덜 모두에서 나타나는 위치들의 수를 결정하여 매치된 위치들의 수를 산출하고, 상기 매치된 위치들의 수를 비교 범위 내 총 위치수 (즉, 범위 크기)로 나누고, 결과값에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다.

[0089] 서열들 간의 서열 유사성 또는 서열 동일성 (이 용어들은 본 명세서에서 호환적으로 사용됨)의 계산은 다음과 같이 수행될 수 있다. 2개 아미노산 서열들, 또는 2개 핵산 서열들의 퍼센트 동일성을 결정하기 위하여, 상기 서열들은 최적의 비교를 위해 정렬될 수 있다 (*예컨대*, 최적 정렬을 위해 제 1 및 제 2 아미노산 또는 핵산 서

열 중 하나 또는 둘 모두에 갭이 도입될 수 있으며 비교를 위해 비-상동성 서열들은 무시될 수 있다). 특정 구체예들에서, 비교 목적으로 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열 길이의 최소한 30%, 바람직하게는 최소한 40%, 더욱 바람직하게는 최소한 50%, 60%, 그리고 더 더욱 바람직하게는 최소한 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 이어서 상응하는 아미노산 위치들 또는 뉴클레오티드 위치들에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제 1 서열에서의 위치가 제 2 서열의 상응하는 위치에서와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 점유되면, 이 때 이 분자들은 해당 위치에서 동일하다. 2개 서열들 간 퍼센트 동일성은, 갭의 수, 그리고 2개 서열들의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 각 갭의 길이를 고려한, 해당 서열들이 공유하는 동일한 위치들의 수의 함수이다.

[0090] 최소한 두 개의 핵산 또는 폴리펩티드에 관한 내용에서 어구 "실질적으로 유사한" 그리고 "실질적으로 동일한"은 통상적으로 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가, 기준 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 비교하여, 최소한 약 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7% 또는 심지어 99.8% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함함을 의미한다. 일부 구체예들에서, 실질적으로 동일한 폴리펩티드는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해서만 상이하다. 일부 구체예들에서, 실질적으로 동일한 폴리펩티드는 면역학적으로 교차-반응성이다. 일부 구체예들에서, 실질적으로 동일한 핵산 분자들은 엄격한 조건하에서 (*예컨대*, 중간 내지 높은 엄격성 범위내에서) 서로에 혼성화한다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오티드 변화"는, *예컨대*, 뉴클레오티드 치환, 결실, 및/또는 삽입을 지칭하며, 이는 해당 분야에서 용이하게 이해된다. 예를 들면, 돌연변이는, 침묵 치환, 부가, 또는 결실을 생성하지만, 인코드되는 단백질의 성질 또는 활성 또는 단백질이 제조되는 방식을 변화시키지 않는 변화들을 포함한다.

[0092] 관련 (그리고 유도체) 단백질은 "변이체" 단백질을 포함한다. 변이체 단백질은 또 다른 (즉, 비경구) 단백질과 및/또는 서로와 적은 수의 아미노산 잔기만큼 상이할 수 있다. 변이체는 이것이 유도된 모체 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 돌연변이 (*예컨대*, 아미노산 결실, 삽입 또는 치환)를 포함할 수 있다.

[0093] "보존적으로 변형된 변이체들"은 아미노산 및 핵산 서열들 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열들과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일한 아미노산 서열들, 또는 하나 이상의 "보존적 치환"을 가지는 아미노산 서열들을 인코드하는 핵산을 지칭한다. 보존적 치환의 한 예는 동일한 그룹의 또 다른 아미노산에 대하여 다음과 같은 그룹들 중 하나에서의 아미노산 변화이다 (미국 특허 제 5,767,063; Kyte 및 Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132 참고). (1) 소수성: 노르류신, Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg; (5) 사슬 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe; 및 (7) 소형 아미노산: Gly, Ala, Ser. 그러므로, 아미노산과 관련하여 용어 "보존적 치환"은 하나 이상의 아미노산이 화학적으로 유사한 또 다른 잔기로 대체됨을 나타내며, 이 때 상기 치환은 일반적으로 단백질의 기능적 성질에 영향을 주지 않는다. 예들에는, 유사한 특성을 가진 아미노산 잔기, *예컨대*, 소형 아미노산, 산성 아미노산, 극성 아미노산, 염기성 아미노산, 소수성 아미노산 및 방향족 아미노산의 치환이 포함된다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 서열 번호:3 또는 서열 번호:17에 식별된 아미노산 서열과 비교하여 최소한 하나의 비-자연 발생의, 보존적 아미노산 치환을 가지는 단백질을 제공한다. 몇 가지 통상적인 보존적 아미노산 치환들의 예시적 예들이 하기에 제공된다.

[0094] 용어 "아미노산" 또는 "임의의 아미노산"은 자연 발생 아미노산 (*예컨대*, α-아미노산), 비자연 아미노산, 변형된 아미노산, 및 비자연 또는 비-자연 아미노산을 비롯한 임의의 그리고 모든 아미노산을 지칭한다. 이는 D- 및 L-아미노산 모두를 포함한다. 자연 아미노산은 자연에서 발견되는 것들, 가령, *예컨대*, 펩티드 사슬들로 조합되어 광범위한 단백질의 빌딩 블록들을 형성하는 23개 아미노산을 포함한다. 이들은 주로 L 입체이성질체이지만, 예컨대, 박테리아 외피 및 일부 항생제들에서 몇몇 D-아미노산도 나타난다. 20가지 "표준" 자연 아미노산들이 상기 표에 나열되어 있다. "비-표준" 자연 아미노산들은 피롤리신 (메테인생성 유기체 및 다른 진핵생물에서 발견됨), 셀레노시스테인 (많은 비진핵생물 뿐만 아니라 대부분의 진핵생물에 존재), 및 N-포르밀메티오닌 (박테리아, 미토콘드리아 및 엽록체에서 출발 코돈 AUG에 의해 인코드됨)이다. "비자연" 또는 "비-자연" 아미노산은 자연적으로 발생된 또는 화학적으로 합성된 비-단백질생성 아미노산 (즉, 자연 인코드되지 않은 또는 유전자 코드에서 발견되지 않은 것들)이다. 140개 이상의 비자연 아미노산이 공지되어 있으며 수천개의 더 많은 조합이 가능하다. "변형된" 아미노산은 아미노산 상에 자연적으로 존재하지 않는 그룹, 그룹들 또는 화학적 모이어티를 포함하도록 화학적으로 변형되어 있는 아미노산 (*예컨대*, 자연 아미노산)을 포함한다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는, "합성 뉴클레오티드 서열" 또는 "합성 폴리뉴클레오티드 서열"은 자연에서 발생하는

것으로 공지되어 있지 않은, 또는 자연적으로 발생하지 않는 뉴클레오티드 서열이다. 일반적으로, 이러한 합성 뉴클레오티드 서열은 임의의 다른 자연 발생 뉴클레오티드 서열과 비교시 최소한 하나의 뉴클레오티드 차이를 포함할 것이다. 본 명세서에서 사용되는, "합성 아미노산 서열" 또는 "합성 펩티드 서열" 또눈 "합성 폴리펩티드 서열" 또는 "합성 단백질 서열"은 자연에서 발생하는 것으로 공지되어 있지 않은 또는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 서열이다. 일반적으로, 이러한 합성 아미노산 서열은 임의의 다른 자연 발생 아미노산 서열과 비교시 최소한 하나의 아미노산 차이를 포함할 것이다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는, "합성 단백질" 또는 "합성 치료 단백질"은 자연 발생 아미노산 서열과 비교하여 상이한 아미노산으로 치환된 하나 이상의 아미노산을 내포하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 즉, "합성 단백질"은 자연 발생 아미노산 서열과 비교하여 주어진 아미노산 위치(들)에서 최소한 하나의 비-자연 발생 치환 변형을 내포하도록 변형되어 있는 아미노산 서열을 포함한다.

[0097] 핵산 서열, 또는 아미노산 서열의 % 서열 동일성, 또는 % 서열 상동성과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 0.1% 증분으로 ±1.0% 이하를 의미한다. 예를 들면 "약 90%" 서열 동일성은 89.0%, 89.1%, 89.2%, 89.3%, 89.4%, 89.5%, 89.6%, 89.7%, 89.8%, 89.9%, 90%, 90.1%, 90.2%, 90.3%, 90.4%, 90.5%, 90.6%, 90.7%, 90.8%, 90.9%, 및 91%를 포함한다. % 서열 동일성과 관련하여 사용되지 않는 경우라면, "약"은 문제되는 값의 내용에 따라 ±1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 또는 10%를 의미한다.

[0098] 대부분의 경우, 본 명세서에서 사용된 자연 및 비-자연 아미노아실 잔기의 명칭은 "Nomenclature of α-Amino Acids (Recommendations, 1974)" Biochemistry, 14(2), (1975)에 제시된 바와 같이 IUPAC 유기 화학 명명법 위원회 및 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 제안한 명명 규칙을 따른다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 아미노산 및 아미노아실 잔기의 명칭 및 약어가 이러한 제시내용과 상이한 정도까지, 이들은 독자에게 명백해질 것이다.

[0099] 본 명세서 전반에 걸쳐, 자연 아미노산이 전체 명칭 (*예컨대,* 알라닌, 아르기닌 등)으로 지칭되지 않는 한, 이들은 종래의 3글자 또는 단일-글자 약어들 (*예컨대,* 알라닌에 대해 Ala 또는 A, 아르기닌에 대해 Arg 또는 R, 등)로 표시된다. 달리 지시되지 않는 한, 아미노산에 관한 3글자 및 단일-글자 약어들은 아미노산의 L-이성질체 형태를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "L-아미노산"은 펩티드의 "L" 이성질체 형태를 지칭하며, 역으로 용어 "D-아미노산"은 펩티드의 "D" 이성질체 형태를 지칭한다 (*예컨대*, Dasp, (D)Asp 또는 D-Asp; Dphe, (D)Phe 또는 D-Phe). D 이성질체 형태의 아미노산 잔기들은 필요한 기능이 해당 펩티드에 의해 유지되는 한 임의의 L-아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 단일-글자 약어들을 사용하여 지칭될 때 D-아미노산은 보다 적은 사례에서 관습적으로 표시될 수 있다.

[0100] 덜 통상적인 또는 비-자연 아미노산의 경우, 이들이 전체 명칭 (*예컨대,* 사르코신, 오르니틴, 등)으로 지칭되지 않는 한, 이의 잔기들에 대하여, Sar 또는 Sarc (사르코신, 즉, N-메틸글리신), Aib (α-아미노아이소뷰티릭 애시드), Dab (2,4-다이아미노뷰타노익 애시드), Dapa (2,3-다이아미노프로파노익 애시드), γ-Glu (γ-글루타믹 애시드), Gaba (γ-아미노뷰타노익 애시드), β-Pro (피롤리딘-3-카복실릭 애시드), 및 8Ado (8-아미노-3,6-다이옥사옥타노익 애시드), Abu (2-아미노 뷰티릭 애시드), βhPro (β-호모프롤린), βhPhe (β-호모페닐알라닌) 및 Bip (β,β-다이페닐알라닌), 및 Ida (이미노다이아세틱 애시드)를 비롯한 3- 또는 4-글자 코드가 빈번하게 사용된다.

[0101] 본 명세서에 개시된 서열들 중에서, 해당 서열의 아미노 말단 (N-말단) 서열에 "Hy-" 모이어티를, 그리고 해당 서열의 카복시 말단 (C-말단)에 "-OH" 모이어티 또는 "-NH_2" 모이어티를 혼입시킨 서열들이 존재한다. 이러한 경우에, 그리고 달리 지시되지 않는 한, 문제되는 서열의 N- 말단에서 "Hy-"부분은 N-말단에서 수소 원자를 나타내고 이는 유리 1차 또는 2차 아미노 그룹의 존재에 상응하며, 해당 서열의 C-말단의 "-OH" 또는 "-NH_2" 모이어티는 하이드록시기 또는 아미노기를 나타내고 이는 각각 C-말단에서 아마이도 ($CONH_2$) 기의 존재에 상응한다. 본 발명의 각 서열에서, C-말단 "-OH" 모이어티는 C-말단 "-NH_2" 모이어티에 대한 치환일 수 있거나, 그 역일 수 있다.

[0102] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Ac"는 폴리펩티드의 C- 또는 N-말단의 아실화를 통한 아세틸 보호를 지칭한다. 본 명세서에 제시된 특정 펩티드들에서, 해당 펩티드의 C-말단에 위치하는 NH_2는 아미노 그룹을 나타낸다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "카복시"는 -CO_2H를 지칭한다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 용어 "제약학적으로 허용가능한 염"은 본 발명의 펩티드, 단백질 또는 화합물의 염 또

는 양쪽성이온 형태를 나타내는데, 이는 수용성 또는 유용성 또는 분산성이고; 과도한 독성, 자극 및 알레르기 반응이 없이 질환 치료에 적합하며; 합리적인 이익/위험 비율에 적합하며, 그리고 의도한 용도에 효과적이다. 이러한 염들은 상기 화합물들의 최종 단리 및 정제 동안 제조될 수 있고 또는 아미노 그룹을 적합한 산과 반응시켜 별도로 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가 염에는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설페이트, 뷰티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 다이글루코네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 포르메이트, 퓨마레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트 (이세싸이오네이트), 락테이트, 말레에이트, 메시틸렌설포네이트, 메테인설포네이트, 나프틸렌설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3- 페닐프로프리오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 트라이클로로아세테이트, 트라이플루오로아세테이트, 포스페이트, 글루타메이트, 바이카보네이트, 파라-톨루엔설포네이트 및 운데카노에이트가 포함된다. 또한 본 발명의 화합물들에서 아미노 그룹은 메틸, 에틸, 프로필, 및 뷰틸 클로라이드, 브로마이드, 및 아이오다이드; 다이메틸, 다이에틸, 다이뷰틸, 및 다이아밀 설페이트; 데실, 라우릴, 미리스틸, 및 스테릴 클로라이드, 브로마이드 및 아이오다이드; 및 벤질 및 펜에틸 브로마이드로 4차화될 수 있다. 치료적으로 허용가능한 부가 염들을 형성하기 위해 사용될 수 있는 산들의 예들에는 무기산, 가령, 염산, 브롬산, 황산, 및 인산; 그리고 유기산, 가령, 옥살산, 말레산, 숙신산 및 시트르산이 포함된다. 제약학적으로 허용가능한 염은, 적절하게는, *예컨대*, 산 부가 염 및 염기성 염 중에서, 선택된 하나의 염일 수 있다. 산 부가 염의 예들에는 클로라이드 염, 시트레이트 염 및 아세테이트 염이 포함된다. 염기성 염의 예들에는 알칼리 금속 양이온, 가령, 나트륨 또는 칼륨 이온, 알칼리 토금속 양이온, 가령, 칼슘 또는 마그네슘 이온, 뿐만 아니라 치환된 암모늄이온 중에서 선택되는 염들이 포함된다. 제약학적으로 허용가능한 염들의 다른 예들은 "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (그리고 이의 최신본), "Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology", 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, 및 J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977)에 기재되어 있다. 또한, 적합한 염들에 대한 검토로, Stahl 및 Wermuth의 *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* (Wiley-VCH, 2002)를 참고하라.

[0104] 본 명세서에서 사용되는 용어 핵산 또는 폴리펩티드의 "최소한 일부분" 또는 "단편"은 전장 길이 이하의 분자인, 이러한 서열들의 최소 크기 특성들을 가지는 일 부분, 또는 전장 길이 분자의 보다 큰 임의의 단편을 의미한다.

[0105] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 표적 폴리뉴클레오티드로 어닐링할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.

[0106] 본 명세서에서 사용되는 어구 "재조합 구조체", "발현 구조체", "키메라 구조체", "구조체" 및 "재조합 DNA 구조체"는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며 숙련된 기술자들에게 널리 공지되어 있다.

[0107] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 폴리펩티드의 생성을 위한 재조합 발현 벡터가 폴리펩티드의 발현을 위해 내부에 도입될 수 있는 세포 또는 세포주를 지칭한다.

[0108] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된", "정제된", "분리된" 및 "회수된"은 해당 재료가 자연적으로 결합되는 최소한 하나의 성분으로부터 제거된, 예를 들어, 해당 재료가 포함된 샘플의 최소한 90 중량%, 또는 최소한 95 중량%, 또는 최소한 98 중량% 농도의 재료 (*예컨대*, 단백질, 핵산, 또는 세포)를 지칭한다. 예를 들면, 이들 용어들은 재료 그 고유 상태에서, 가령, 예를 들어, 완전성 생물학적 시스템에서 발견될 때 통상적으로 수반하는 성분들이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 재료를 지칭할 수 있다.

[0109] 용어 "환자, "대상체, 및 "개체"는 호환적으로 사용될 수 있으며 인간 또는 비-인간 동물을 지칭할 수 있다. 이들 용어들은 포유동물, 가령, 인간, 비-인간 영장류, 가축 동물 (*예컨대*, 소, 돼지), 반려 동물 (*예컨대*, 개, 고양이) 및 설치류 (*예컨대*, 생쥐 및 쥐)를 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 용어들은 인간 환자를 지칭한다. 예시적인 구체예들에서, 상기 용어는 위장관 염증 병태를 앓고 있는 인간 환자를 지칭한다.

[0110] 본 명세서에서 사용되는 "개선된"은 확인된 질병 상태의 특성의 개선을 포괄하도록 광범위하게 의미되어야 하며, 상기 특성은, 대조에 비해, 또는 문제되는 특성과 관련하여 공지된 평균 양에 비해 해당 분야의 숙련된 기술자가 문제되는 질환과 일반적으로 상관되는 것으로 간주하는 또는 이러한 질환을 나타내는 것으로 간주된다. 예를 들면, 본 발명의 단백질 분야와 관련하여 "개선된" 상피 장벽 기능은 본 발명의 단백질로 치료된 인간의 상피 장벽 완전성을 치료받지 않은 인간의 상피 장벽 완전성과 비교하여 증명될 수 있다.

대안적으로, 본 발명의 단백질로 치료된 인간의 상피 장벽 완전성을 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지된 과학 또는 의학 문헌들에서 설명된 인간의 평균 상피 장벽 완전성과 비교할 수 있다. 본 발명에서, "개선된"은 해당 데이터가 통계적으로 유의할 수 있음 (*즉*, $p < 0.05$)을 반드시 요구하는 것은 아니며; 그보다는, 하나의 값 (*예컨대* 평균 처리 값)이 또 다른 값 (*예컨대* 평균 대조 값)과 상이함을 나타내는 임의의 정량가능한 차이가 "개선된" 수준을 높일 수 있다.

[0111] 본 명세서에서 사용되는 "억제 및 억압" 등의 용어들은, 일부 구체예들에서 바람직할 수 있으나 완전한 억제 또는 억압을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 그러므로, "억제된 면역 반응" 또는 "염증성 사이토카인의 억제"는 절대 억제를 요하는 것은 아니다.

[0112] 그러므로, 본 명세서에서 사용되는 용어 "증가하다", "억압하다" 또는 "감소시키다" 또는 이의 문법적 균등용어는, 기준 (*예컨대*, 기준선) 측정치, 가령, 본 명세서에 기재된 유사한 조건들하에서 측정된 측정치 (*예컨대*, 본 명세서에 기재된 치료 개시 이전 동일한 개체에서, 또는 치료 없이 한 대조 개체 (또는 다수의 대조 개체들)에서의 측정치에 상대적인 값들을 나타낸다. 일부 구체예들에서, 적합한 대조는 기준선 측정치, 가령, 본 명세서에 기재된 치료 개시 전 동일한 개체에서의 측정치, 또는 본 명세서에 기재된 치료 없이 한 대조 개체 (또는 다수의 대조 개체들)에서의 측정치이다.

[0113] 본 명세서에서 사용되는 용어 "IBD" 또는 "염증성 장 질환"은 개체들이 위장 (GI)관의 만성 또는 재발성 면역 반응을 가지는 병태를 지칭한다. 두 가지 가장 통상적인 염증성 장 질환은 궤양성 대장염 (UC) 및 크론병 (CD)이다.

[0114] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료적 유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험 비율에서 치료받은 대상체에 치료 효과를 부여하는, 치료 물질 (*예컨대*, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질)의 양을 지칭한다. 이러한 치료 효과는 객관적 (*즉*, 몇 가지 테스트 또는 마커에 의해 측정가능함) 또는 주관적 (*즉*, 대상체가 효과 표시를 제공하거나 효과를 느낌)일 수 있다. 일부 구체예들에서, "치료적 유효량"은 관련 질환 또는 병태를 치료, 완화, 또는 예방 (*예컨대*, 발병 지연)함에, 및/또는, 해당 질환과 관련된 증상들을 완화, 해당 질환의 발병을 예방 또는 지연, 및/또는 또한 해당 질환의 중증도 또는 증상들의 빈도를 감소시킴에 의하여와 같은 탐지가능한 치료 또는 예방적 효과를 나타냄에 유효한 치료 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 통상적으로 복수회 단위 투여량을 포함할 수 있는 투약 요법으로 투여된다. 임의의 특정 치료 물질에 있어서, 치료적 유효량 (및/또는 유효 투약 요법에 속하는 적절한 단위 용량)은, 예를 들면, 투여 경로, 또는 다른 치료 물질과의 조합에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 임의의 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량 (및/또는 단위 용량)은 치료되는 질환의 특정 형태; 병태 또는 선행-병태의 중증도; 이용되는 구체적인 치료 물질의 활성; 이용되는 구체적인 조성; 환자의 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로, 및/또는 사용되는 구체적인 치료 물질의 배출 또는 대사 속도; 치료 기간; 및 의학 분야에 널리 공지되어 있는 인자들을 비롯하여 다양한 요인들에 따라 달라질 수 있다. 본 발명은 다양한 질환들, 가령: 위장관 상피 장벽 기능이상에 관계된 질환 또는 위장관 염증 질환들을 치료하기 위해 신규한 단백질, 및 이를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 이용한다. 투여되는 단백질, 또는 이를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 일부 구체예들에서 IBD와 연관된 염증을 감소시키거나 또는 위장관 상피 장벽 완전성 및/또는 기능을 복구시킬 것이다.

[0115] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"(또한 "치료하다"또는 "치료하는 것)는 특정 질환, 장애 및/또는 병태 (*예컨대*, 위장관 (GI)의 만성 또는 재발성 면역 반응 및 염증)의 하나 이상의 증상 또는 특징의 부분적 또는 완전한 경감, 개선, 완화, 억제, 발병 지연, 중증도 감소 및/또는 발생 빈도를 감소시키는 바람직한 효과를 구현하는 치료 요법에 따른 임의의 치료 물질 (*예컨대*, 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질)의 임의의 투여를 지칭하며; 일부 구체예들에서, 상기 치료 요법에 따른 치료 물질의 투여는 원하는 효과의 달성과 상관된다. 이러한 치료는 관련 질환, 장애 및/또는 병태의 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 상기 질환, 장애, 및/또는 병태의 단지 초기 징후들만 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 이러한 치료는 상기 관련 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 확립된 징후들을 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 일부 구체예들에서, 치료는 상기 관련 질환, 장애, 및/또는 병태를 진단받았던 또는 앓았던 대상체의 치료일 수 있다. 일부 구체예들에서, 치료는 상기 관련 질환, 장애, 및/또는 병태의 발병 위험 증가와 통계적으로 상관관계가 있는 하나 이상의 감수성 인자들을 가지는 것으로 공지된 대상체의 치료일 수 있다.

[0116] "제약학적"은 조성물, 시약, 방법 등이 제약학적 효과를 가질 수 있고 또한 조성물이 대상체에게 안전하게 투여될 수 있음을 의미한다. "제약학적 효과"는, 제한없이, 조성물, 시약 또는 방법이 포유 동물 대상체, 예를

들면, 인간과 같은 하나 이상의 개체에서, 예를 들어, 대상체 집단의 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 50% 이상 등에서, 원하는 생화학, 유전자, 세포, 생리학적 또는 임상적 효과를 자극 할 수 있음을 의미 할 수 있다. "제약학적으로 허용가능한"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 동물에서 안전하게 사용하기 위해, 더욱 특히 인간에서 안전하게 사용하기 위해 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거되어 있음을 의미한다. "제약학적으로 허용가능한 비히클" 또는 "제약학적으로 허용가능한 부형제"는 본 명세서에 기재된 단백질과 함께 투여되는 희석제, 보강제, 부형제 또는 담체를 지칭한다.

[0117] "예방하는 것" 또는 "예방"은 질병 또는 장애에 걸릴 (즉, 질병에 노출되거나 걸리기 쉬운 그러나 아직 질병의 증상을 경험하거나 나타내지 않는 대상체에서 질병의 임상 증상 중 하나 이상을 유발 또는 치료가 없을 때에 비해 보다 적은 중증도의 증상을 유발) 위험이 감소되는 것을 의미한다. "예방 (prevention 또는 prophylaxis)"은 질환 또는 장애의 발병 지연을 지칭 할 수 있다.

[0118] 본 명세서에 제시된 치료적 제약학적 조성물은 하나 이상의 자연 산물을 포함할 수 있다. 그러나, 특정 구체예들에서, 치료적 제약학적 조성물 자체는 자연에서 발생되지 않는다. 또한, 특정 구체예들에서, 치료적 제약학적 조성물은 자연적으로 존재할 수 있는 임의의 개별 자연 발생 대응물 또는 조성물 성분과 비교하여 현저하게 상이한 특성을 가진다. 즉, 특정 구체예들에서, 치료적 유효량의 정제된 단백질을 포함하는 본 명세서에 제시된 제약학적 조성물은, 자연적으로 존재할 수 있는 조성물의 단일 개별 성분과 비교하여, 전체로서 조성물에 현저하게 상이한 특성을 부여하는 하나 이상의 구조적 및/또는 기능적 특성을 보유한다. 법원은 자연적으로 존재할 수 있는 임의의 개별 성분과 비교하여 현저하게 상이한 특성을 갖는 자연 산물을 포함하는 조성물은 법정 특허 보호대상이 된다고 결정한 바 있다. 그러므로, 제시된 치료적 제약학적 조성물은 전체로서 뚜렷하게 상이한 특성들을 보유한다. 이러한 특성들은 본 명세서에 제시된 데이터 및 실시예에서 설명된다.

[0119] 발명의 상세는 본 명세서에 제시된다. 본 출원에 기재된 것들과 유사하거나 균등한 방법들 및 재료들이 본 발명을 실시 또는 테스트함에 사용될 수 있으나, 본 명세서에 예시적인 방법들 및 재료들을 기재한다. 본 발명의 그 외 다른 특징, 목적 및 이점들은 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 명확해 질 것이다.

[0120] **마이크로바이옴으로부터 유도된 치료 단백질- 본 발명의 개요**

[0121] 수많은 질환 및 장애들은 위장관 상피 세포 장벽 기능 또는 완전성 감소와 관련되어 있다. 이들 질환 및 장애들은 여러 가지면에서 다양하며 진단적으로 무수히 존재한다. 이러한 질환 중 하나는 염증성 장 질환 (IBD)이며, 발병률과 유병률은 시간이 지남에 따라 전 세계 다른 지역에서 증가하고 있어, 염증성 장 질환이 세계적 질병이 되었음을 나타낸다. (Molodecky *외*, Gastroenterol 142:46-54, 2012). IBD는 만성 또는 재발성 면역 반응 및 위장관 (GI) 염증이 있는 병태를 설명하는 집합적 용어이다. 두 가지 가장 통상적인 염증성 장 질환은 궤양성 대장염 (UC) 및 크론병 (CD)이다. 둘 다 GI 면역계의 비정상적인 반응에 의해 표시된다. 일반적으로 면역 세포는 신체를 감염으로부터 보호한다. 그러나 IBD 환자의 경우,이 면역계는 장내 음식, 박테리아 및 기타 물질을 병원균으로 오인하고 염증 반응이 장의 내벽으로 시작되어 만성 염증을 유발한다. 이 경우 환자는 IBD 증상을 경험한다.

[0122] IBD는 소화관의 전부 또는 일부의 만성 염증을 수반한다. UC 및 CD 모두는 통상적으로, 예를 들어 심한 설사, 복통, 피로 및 체중 감소와 관련이 있다. IBD 및 관련 장애는 쇠약해 질 수 있으며 때로는 생명을 위협하는 합병증을 초래할 수 있다.

[0123] 장 장벽 완전성과 관련하여, 장 상피의 완전성 상실은 IBD에서 주요 병원성 역할을 한다. *Maloy, Kevin J.; Powrie, Fiona, "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease," (2011) Nature. 474 (7351): 298-306.* 장 미생물총의 유해한 변화는 장 상피에 손상을 가져오는 부적절하거나 통제되지 않은 면역 반응을 유발하는 것으로 가정된다. 이러한 중요한 장 상피 장벽에서의 파열은 미생물총의 추가 침윤을 허용하고, 결과적으로, 추가 면역 반응을 이끌어낸다. 그러므로, IBD는 상피 장벽 기능의 결함을 유발할 수 있는 장 미생물총에 대한 과장된 면역 반응에 의해 부분적으로 유도되는 다인성 질환이다.

[0124] IBD 환자들의 마이크로바이옴 프로파일링은 뚜렷한 프로파일들, 가령, 종종 *로세부리아 종*과 같은 잠재적으로 유익한 미생물들을 훼손시키면서 부착성-침습성 *대장균*을 비롯한 프로테오박테리아 증가를 나타내었다 (Machiels 외, 2014, Cut, 63:1275-1283; Patterson 외, 2017, Front Immunol, 8:1166; Shawki and McCole, 2017, Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 3:41-50). 또한, *로세부리아 호미니스* 감소는 궤양성 대장염 환자의 불균형과 관련되어 있다. IBD 영향을 받은 개체는, 페르미큐테스 (즉, 라크노스피라세아에) 및 박테로이데테스의 감소와 같은, 30-50 % 감소된 공생 박테리아의 생물 다양성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 염증성 장 질환의 원

인에서 장내 박테리아의 역할에 대한 추가 증거는 IBD 영향을 받은 개체가 영향을 받지 않은 개체보다 진단 전 2-5 년의 기간 내에 항생제를 처방받았을 가능성이 더 높다는 것이다. *Aroniadis OC, Brandt LJ*, "Fecal microbiota transplantation: past, present and future," (2013) Curr. Opin. Gastroenterol. 29 (1) (2013): 79-84 참고.

[0125] 보호성 박테리아 군집, 프로바이오틱스 및 박테리아 유래 대사산물은 다양한 임상 및 전임상 연구에서 질병을 개선시킴이 입증되었다. 예를 들어, 분변 미생물 이식 (FMT) 실험들은 IBD 환자들에서 일부 성공을 보여주었으나, FMT와 관련한 문제점은 여전히 존재한다 (Moayyedi 외, 2015, Gastroenterology, 149:102-109 e106; Qazi 외, 2017, Gut 미생물, 8:574-588; Narula 외, 2017, Inflamm Bowel Dis, 23:1702-1709). 다른 연구에서 VSL#3, *락토바실러스 속* 및 *비피도박테리움 속* 또한 인간과 동물 모델에 유리한 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Srutkova 외, 2015, PLoS One, 10:e0134050; Pan 외, 2014, Benef Microbes, 5:315-322; Huynh 외, 2009, Inflamm Bowel Dis, 15:760-768; Bibiloni 외, 2005, Am J Gastroenterol, 100:1539-1546). 또한, *락토바실러스 람노서스 (L. rhamnosus)* GG의 p40 및 *아커만시아 뮤시니필라 (A. muciniphila)*의 Amuc-1100과 같은 박테리아 산물은 IBD와 대사성 질환의 동물 모델에서 장벽 기능을 촉진하고 보호하는 것으로 나타났다 (Yan 외, 2011, J Clin Invest, 121:2242-2253; Plovier 외, Nat Med, 23:107-113).

[0126] 질병을 치료하기 위해 살아있는 미생물 집단을 사용하는 것이 점점 일반화되고 있지만, 이러한 방법은 투여되는 박테리아가 숙주 또는 환자에서 생존하고 유익하고 치료적인 방식으로 숙주 조직과 상호작용하는 능력에 의존한다. 본원에서 제공되는 대안적인 접근법은 숙주에서 세포 기능에 영향을 미치고 치료적 이점을 제공 할 수 있는 미생물-인코드된 단백질 및 이의 변이체를 확인하는 것이다. 이러한 단백질은, 예를 들어 실질적으로 단리되거나 정제된 치료적인, 박테리아 유래 단백질을 포함하는 제약학적 조성물로서 또는 치료 단백질을 외인성 단백질로서 발현하도록 조작된 생 바이오치료제 (박테리아)로서 투여 될 수 있다. 더욱이, 치료 단백질의 투여를 포함하는 치료 방법은 장 (소장, 대장, 직장)에 제한되지 않으나 또한 구강 점막염과 같은 소화관 내의 다른 장애의 치료를 포함 할 수도 있다.

[0127] 위장관 염증 장애에 치료적으로 이용 할 수 있는 미생물-유래 단백질을 확인하기 위해, 건강하거나 IBD (UC)로 진단된 인간으로부터 얻은 점막 생검을 분석하여 이들 점막 생검의 미생물 조성을 결정하였다. 건강한 대상체 그리고 질환에 걸린 대상체들로부터 얻은 박테리아 프로파일의 비교는 유익 할 수 있는 (질환에 걸린 대상체보다 건강한 대상체의 수가 더 많은) 또는 유해한 (질환에 걸린 대상체보다 건강한 대상체의 수가 더 적은) 박테리아를 확인시켜 주었다. 유익한 것으로 확인된 박테리아 종 중에는 상기 언급된 연구결과와 일치하는 *로세부리아 호미니스 (Roseburia hominis)*가 있었다. 박테리아에 의해 인코드되는 단백질을 예측하고 박테리아에 의해 분비될 가능성이 있는 단백질을 확인하기 위해 광범위한 생물정보학 분석을 수행하였다. 분비된 단백질인 것으로 예측된 단백질을 일련의 시험관내 분석을 사용하여 특성화하여 상피 장벽 완전성, 사이토카인 생성 및/또는 방출 및 상처 치유에 대한 각 단백질의 효과를 연구하였다. 이어서 상피 장벽 완전성을 증가시키는 기능을 하는 것으로 확인된 단백질을 대장염에 대한 생체내 마우스 모델에서 평가하였다. 아래에서 보다 상세히 기재되는 바와 같이, 본 명세서에서 "SG-11"로 표시되는 하나의 이러한 단백질은 상피 장벽 완전성을 개선하고 상피 장벽 완전성과 관련된 질환 및 장애를 치료하고 염증 위장관 질환, 가령, IBD를 치료하는 치료적 이점을 제공하는 능력을 나타내는, 시험관내 및 생체내 활성 모두를 입증하였다.

[0128] **SG-11 단백질**

[0129] SG-11로 본 명세서에서 지칭되는 단백질은 *로세부리아 호미니스*의 게놈에 존재하는 768개 뉴클레오티드 서열 (서열 번호:2) 내에서 인코드된다. *R. 호미니스* 균주에 대한 완전한 게놈 서열은 GenBank 수탁 번호 CP003040 (그 전체가 참고문헌으로 본 명세서에 포함되는 서열)에서 찾을 수있다. *로세부리아 호미니스* 균주에 대한 16S rRNA 유전자 서열은 GenBank 수탁 번호 AJ270482에서 찾을 수 있다. R. 호미니스 게놈 서열에 의해 인코드되는 전장 단백질은 256개 아미노산 길이 (서열 번호: 1)이며, 여기서 잔기 1-24는 *생체내*에서 절단되어 232개 아미노산의 성숙한 단백질 (서열 번호:3, 서열 번호:4에 의해 인코드됨)을 생성하는 신호 펩티드인 것으로 예측된다. 재조합 SG-11은 N-말단 메티오닌(코돈 ATG에 의해 인코드됨)으로 발현되어 233개 아미노산의 성숙 단백질 (서열 번호:7)을 생성 할 수 있다.

[0130] 실시예, 예컨대, 실시예 1에 상세히 기재된 바와 같이, SG-11은 시판되고 일상적으로 사용되는 상이한 발현 벡터들로부터 재조합적으로 발현되었다. 예를 들면, SG-11 (서열 번호:3을 포함하는 단백질)은, 발현 및 정제 후 절단되는 GST 태그 및 프로테아제 부위를 가지는 관심 단백질을 발현시키는 pGEX 발현 벡터, N-말단 FLAG 태그를 추가하는 pET-28 발현 벡터, 및 서열 번호:7로 구성되고 N-말단 태그가 없는 SG-11 단백질을 발현하기 위해

사용되었던 pD451 발현 벡터를 사용하여 발현되었다. 이들 단백질로 수행되고 반복된 실험은 상이한 단백질 발현 시스템 및 DNA 구조체의 사용으로 인해 생기는 소수의 N-말단 및/또는 C-말단 변이가 생체내 및 시험관내 분석에서 동등한 기능적 활성을 유지한다는 것을 보여 주었다. 달리 언급이 없는 한, 용어 "SG-11"은 본 명세서에서 서열 번호:3으로 본 명세서에 제시된 아미노산 서열 및 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 이러한 단백질의 변이체 (서열 번호:1, 서열 번호:5, 서열 번호:7을 포함하나 이에 제한되는 것은 아님)를 지칭하는 것으로 이해된다. SG-11 변이체는 아미노산 잔기의 변이 (치환, 삽입, 결실) 뿐만 아니라 변형, 가령, 융합 구조체 및 번역 후 변형 (인산화, 당화, 등)을 포함할 수 있다. SG-11 단백질 및 인코딩 핵산의 일부 예시적인 구체예는 하기 표 1에 제공된다.

[0131] **표 1**

아미노산 서열	인코딩 핵산 서열
서열 번호:1	서열 번호:2
MKRLVCTVCSVLLCAGLLSGCGTSL	ATGAAGAGATTAGTGTGCACGGTCTGCAGTGTACTGTTGTGTGCGGG
EGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQ	ACTTCTCTCCGGATGCGGTACCTCGCTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCG
SYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGK	TGTACGTGGGAAAGAAAGGCGTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAGAC
NAVKVESLKVEDGVAKLKMKYKTP	GCTCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGGAACTGAAGTCCTATGTGG
EDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGYV	ATGCAGAGGTGGAAGATTACACCGCGGAGCATGGTAAAAATGCAGT
YDGEFARVEEGKVVGAATKQDIYSE	CAAGGTGGAGAGCCTTAAGGTGGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAG
DDLKVAIIRANTDVKVDGEICYVSC	ATGAAGTACAAGACACCGGAGGATTATACCGCATTTAATGGAATTGA
QNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVT	ACTCTATCAGGGGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGGATACGTCT
ASVDVTGQESVGTEQLSGTEQME	ACGACGGGGAGTTCGCCCGCGTGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGGAGC
MTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSF	TGCCACAAAACAGGATATTTACTCTGAGGATGATTTGAAAGTTGCCAT
ETDVYTFIVYK	CATCCGTGCCAATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGATCTGCTATG
	TCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGACCGGAAAAGACAGTGTGTCGATC
	CGTGACGGATATTATCTTGAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGTGGA
	TGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAGCTTTCGGGAACC
	GAACAGATGGAGATGACCGGGGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCG
	AGCAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTCGTTCGAGACAGACGT
	ATATACTTTCATTGTCTACAAA

[0132]

서열 번호: 3	서열 번호: 4
LEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLD	CTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGGCGTGA
QSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHG	TAGCGTCGCTGGATGTGGAGACGCTCGATCAGTCCTACTACGATGAG
KNAVKVESLKVEDGVAKLKMKYKT	ACGGAACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGTGGAAGATTACACCGC
PEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGY	GGAGCATGGTAAAAATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGGTGGAA
VYDGEFARVEEGKVVGAATKQDIY	GACGGTGTGGCGAAGCTTAAGATGAAGTACAAGACACCGGAGGATT
SEDDLKVAIIRANTDVKVDGEICYV	ATACCGCATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGGGGAAAGTCGTTGCTT
SCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGS	CCCTGGCGGCAGGATACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCGCGTGGA
VTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQM	GGAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTGCCACAAAACAGGATATTTACTCTG
EMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGS	AGGATGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCAATACGGATGTGAAG
FETDVYTFIVYK	GTGGACGGTGAGATCTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGAC
	CGGAAAAGACAGTGTGTCGATCCGTGACGGATATTATCTTGAGACGG
	GAAGCGTGACGGCATCCGTGGATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGG
	GACCGAGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGGGGAG
	CCGGTGAATGCGGATGATACCGAGCAGACAGAGGCGGCGGCCGGTG
	ACGGTTCGTTCGAGACAGACGTATATACTTTCATTGTCTACAAA
서열 번호:7	**서열 번호:8**
MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETL	ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTGGGTAAGAAAGGTGT
DQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEH	GATCGCGTCCCTGGACGTCGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATG
GKNAVKVESLKVEDGVAKLKMKYK	AAACCGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACACG
TPEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAG	GCCGAGCACGGCAAAAATGCCGTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTG
YVYDGEFARVEEGKVVGAATKQDI	AGGACGGCGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCCCAGAGGA

YSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEICY VSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETG SVTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQ MEMTGEPVNADDTEQTEAAAGD GSFETDVYTFIVYK	CTACACGGCGTTCAATGGTATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCG CATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCGCGTC GAAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAGATATCTACA GCGAAGATGACCTGAAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTT AAAGTTGATGGCGAGATTTGCTACGTTAGCTGTCAAAACGTAAAGCT GACGGGTAAAGATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATTATCTGGAAA CCGGTAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGT GGGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAACAGATGGAAATGACCGGT GAACCGGTTAACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCGCGGCA GGCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTGTACACCTTTATCGTGTACAA G
서열 번호:9 MDYKDDDDKGSSHMLEGEESVVY VGKKGVIASLDVETLDQSYYDETEL KSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVES LKVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFN GIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFAR VEEGKVVGAATKQDIYSEDDLKVAII RANTDVKVDGEICYVSCQNVKLTG KDSVSIRDGYYLETGSVTASVDVTG QESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVN ADDTEQTEAAAGDGSFETDVYTFIV YK	**서열 번호:10** ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCAGCAGCCATATGCTGG AGGGAGAGGAAAGTGTCGTGTACGTGGGAAAGAAAGGCGTGATAGC GTCGCTGGATGTGGAGACGCTCGATCAGTCCTACTACGATGAGACGG AACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGGTGGAAGATTACACCGCGGA GCATGGTAAAAATGCAGTCAAGGTGGAGAGCCTTAAGGTGGAAGAC GGTGTGGCGAAGCTTAAGATGAAGTACAAGACACCGGAGGATTATAC CGCATTTAATGGAATTGAACTCTATCAGGGGAAAGTCGTTGCTTCCCT GGCGGCAGGATACGTCTACGACGGGGAGTTCGCCCGCGTGGAGGAA GGCAAGGTTGTGGGAGCTGCCACAAAACAGGATATTTACTCTGAGGA TGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTGCCAATACGGATGTGAAGGTGG ACGGTGAGATCTGCTATGTCTCCTGTCAGAATGTGAAGCTGACCGGA

	AAAGACAGTGTGTCGATCCGTGACGGATATTATCTTGAGACGGGAAG
	CGTGACGGCATCCGTGGATGTGACCGGACAGGAGAGCGTCGGGACC
	GAGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGATGGAGATGACCGGGGAGCCGG
	TGAATGCGGATGATACCGAGCAGACAGAGGCGGCGGCCGGTGACGG
	TTCGTTCGAGACAGACGTATATACTTTCATTGTCTACAAA
서열 번호:19	**서열 번호:20**
MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETL	ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTGGGTAAGAAAGGTGT
DQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEH	GATCGCGTCCCTGGACGTCGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATG
GKSAVKVESLKVEDGVAKLKMKYK	AAACCGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACACG
TPEDYTAFSGIELYQGKVVASLAAG	GCCGAGCACGGCAAATCCGCCGTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTGA
YVYDGEFARVEEGKVVGAATKQDI	GGACGGCGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCCCAGAGGAC
YSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIVY	TACACGGCGTTCAGCGGTATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCGC
VSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETG	ATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCGCGTCG
SVTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQ	AAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAGATATCTACAG
MEMTGEPVNADDTEQTEAAAGD	CGAAGATGACCTGAAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTTA
GSFETDVYTFIVYK	AAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAGCAGCCAAAACGTAAAGCTG
	ACGGGTAAAGATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATTATCTGGAAAC
	CGGTAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGTG
	GGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAACAGATGGAAATGACCGGTG
	AACCGGTTAACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCGCGGCAG
	GCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTGTACACCTTTATCGTGTACAAG

[0133] **질병에서 상피 장벽 기능**

[0134] 최근 몇 년간의 연구에서 IBD의 발병 기전에서 유전적 요인과 환경적 요인 모두의 주요한 역할이 확인되었다. Markus Neurath, "Cytokines in Inflammatory Bowel Disease," Nature Reviews Immunology, Vol. 14., 329-342 (2014). 이들 IBD 위험 요인들이 조합되어 상피 장벽 기능에서 유해한 변화를 시작하여 내강 항원 (예를 들어, 공생 미생물 총으로부터의 박테리아 항원)을 장벽 내부로 전위시킬 수 있는 것으로 보인다. *Id.* 결과적으로, 이러한 환경적 유발 요인들에 대한 전-염증성 사이토카인 방출 증가와 같은 비정상적이고 과도한 반응은 유전적으로 취약한 숙주에서 무증상 또는 급성 점막 염증을 일으킨다. *Id.* 따라서, 급성 장 염증을 해결하지 못하는 대상체에서 제어되지 않은 점막 면역계의 활성화에 의해 유도되는 만성 장 염증이 발생하기 때문에, IBD에서 적절한 상피 장벽 기능의 중요성은 명백하다. 특히, 점막 면역 세포들, 가령, 대식세포, T 세포, 및 선천성 림프계 세포들 (ILCs)의 부분집합은, 예컨대, 위장관의 만성 염증을 촉진시킬 수 있는 사이토카인을 생성함으로써 공생 미생물총으로부터의 미생물 산물 또는 항원들에 대하여 반응하는 것으로 보인다. 결과적으로, 환자에게 적절한 상피 장벽 기능을 회복시키는 것이 IBD를 해결하는데 중요 할 수 있다.

[0135] SG-11의 치료 활성은 시험관내 및 생체내 상피 장벽 기능에 대한 이의 유익한 효과에 의해 부분적으로 확인되었다. 실시예 2에 나타낸 바와 같이, SG-11은 시험관내 경상피 전기 저항 (TEER) 분석에서 알 수 있는 바와 같이 상피 장벽 완전성을 증가시킴에 활성이었다. TEER 분석은 상피 세포층의 구조적 및 기능적 완전성에 대한 효과를 측정하기 위한 널리 공지된 방법이다 (Srinivasan 외, 2015, J Lab Autom, 20:107-126; Beduneau 외, 2014, Eur J Pharm Biopharm, 87:290-298; Zolotarevsky 외, 2002, Gastroenterology, 123:163-172; Dewi, *외*

(2004) J. Virol. Methods. 121:171-180, 및 in Mandic, 외 (2004) Clin. Exp. Metast. 21:699-704.). 본 명세서에서 수행되고 기재된 분석은 장 상피의 구조적 및 기능적 구성성분들을 보다 정확하게 모델링하기 위해 장 상피세포 및 배상 세포로 구성된 상피 단일층으로 구성된다. 단단한 접합 형성이 일어날 때까지 세포를 배양하고 장벽 기능 능력을 경상피 전기 저항의 측정에 의해 평가한다. 손상 (insult), 가령, 열 사멸된 *대장균* 추가시, 상피층을 경유하는 전기 저항이 감소된다. TEER 분석에 유용한 대조 시약은 스타우로스포린 및 미오신 경쇄 키나제 억제제를 포함한다. 스타우로스포린은 세포자멸을 유도하는 *스트렙토마이세스 스타우로스포레우스* (*Streptomyces staurosporeus*)에서 유래한 광범위한 키나제 억제제이다. 이 시약은 간극 연접의 약 98%를 파열하여 TEER 분석에서 전기 저항 감소를 가져온다. 미오신 경쇄 키나제 (MLCK)는 전-염증성 사이토카인에 의해 유도된 신호전달 캐스케이드의 말단 이펙터로서, 연접주변 액토마이오신 고리의 수축을 초래하여 간극 연접을 분리시킨다. MLCK를 억제함으로써 긴밀한 연접의 파열이 방지된다. TEER 분석에서 MLCK 억제제는 TEER 분석에서 전기 저항 감소를 줄이거나 방지해야 한다.

[0136] 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 시험관내 TEER 분석에 의해 평가될 때 상피 장벽 기능 완전성을 증가시키는 이의 능력을 특징으로 할 수 있다. SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 TEER 분석에서 전기 저항을 단백질 부재하에 수행된 TEER 분석과 비교하여 최소한 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 만큼 증가시킬 수 있다.

[0137] 또한, 실시예 6은 SG-11 단백질이 장 또는 점막 상피 장벽과 같은 상피 장벽의 유지 또는 복구에 역할을 할 수 있는 활성인 상피 상처 치유를 향상 또는 촉진 할 수 있음을 보여준다.

[0138] *시험관내* 장벽 기능 완전성을 복구시키는 SG-11의 효과를 고려하여, SG-11은 IBD의 설치류 모델에서 손상을 감소시키는 능력에 대해 생체내에서 분석되었다. 실시예 7 및 8 (SG-11) 및 16 (SG-11 변이체)은 IBD에 대한 작용제 연구를 위해 잘 받아들여지는 모델인 DSS (덱스트란 소듐 설페이트) 동물 모델을 사용하여 수행된 연구를 설명한다 (Chassaign 외, 2014, Curr Protoc Imunol, 104:Unit-15.25; Kiesler 외, 2015, Cell Mol Gastroenterol Hepatol). DSS는 결장 상피에 직접적으로 독성이 있는 황산화 다당류로, 상피 세포 손상을 일으켜 파열된 간극 연접으로 인한 장벽 기능의 손실을 초래한다. 이들 실험에서, 마우스의 대장염 유도 전 (실시예 7) 또는 후 (실시예 8)에 동물들을 SG-11로 처리하였다. 양성 대조로서, 마우스를 글루카곤 유사 펩티드 2 (GLP2)의 안정한 유사체인 Gly2-GLP2로 처리하였다. Gly2-GLP2는 실험 마우스 대장염 모델에서 상피 세포 성장을 촉진하고 결장 손상을 감소시키는 것으로 알려져있다. DSS 연구 결과는 SG-11 단백질은 IBD 치료제에 대한 임상 효능의 중요한 지표인 DSS 모델에서 체중 감량에 효과적이었음을 보여준다. SG-11 처리는 또한 육안 병리 소견 및 장 조직병리학 분석에서 점수를 감소시켰다.

[0139] SG-11 처리는 실시예 7에서 4Kda-FITC 장 투과성 판독결과를 개선시키고 LPS 결합 단백질 (LBP - LPS 노출의 마커)의 혈청 수준을 감소시키는 반면, SG-11 또는 Gly2-GLP2로 처리시 유의한 효과가 없음이 실시예 8에서 관찰되었음이 주목된다. 정상적인 식수로 교체하고 SG-11 또는 Gly2-GLP2로 처리하기 전에 실시예 8의 동물을 7일 동안 DSS로 처리 한 것을 고려할 때 이것은 놀라운 것이 아니다. DSS에 대한 이러한 사전 노출은 장 상피 손상, 파열된 상피 장벽을 경유하는 LPS의 전위 및 LBP 분비의 유도를 가져온다. 그러나, 4KDa-FITC 덱스트란 측정에 기초하여, 상피 장벽 복구는 DSS를 정상적인 식수로 교체 한 후 3-4 일 내에 빠르게 발생하는 것으로 보인다 (데이터 도시되지 않음,도 12). 따라서, 측정 시점 (처리 6 일 후)에서 처리되지 않은 동물에 비해 처리된 동물에서 4KDa-FITC 투과성 판독결과의 개선을 검출하기 어렵다. 또한, 혈청에서 LBP의 수준은 치료적 처리 전에 연장된 시간 동안 DSS에 노출된 동물에서 장벽 기능 복구와 무관 할 수 있다 (실시예 8). 예를 들어, DSS 노출 동안 LPS를 전위시킴으로써 활성화된 간세포는 다량의 LPB를 생성하고 분비한다. 따라서, 이론에 제한되지 않고, 짧은 시기의 연구는 간세포의 불활성화 및 DSS-처리된 동물의 혈청으로부터 LBP를 제거하기에 충분한 시간을 허용하지 않을 수 있다. 그러므로, 나중에 혈청 LBP를 측정하여 연구를 계속하면 혈청 LBP 수준의 감소를 보여주게 되지만, LBP가 혈청에서 제거되기 전에 처리된 동물과 처리되지 않은 동물 모두에서 장벽 기능이 복구되는 경우 혈청 LBP의 감소는 상기 동물 모두에서 유사 할 수 있다.

[0140] **SG-11의 변이체**

[0141] SG-11의 치료적 가치 및 질병 치료를 위한 사용을 고려하여, 약학적 제제 및 단백질의 장기 보관을 최적화하는 방식으로 일차 구조를 변화시키기 위해 단백질을 추가로 특성화하고 이의 서열을 변형시켰다.

[0142] 실시예 9에 기재된 바와 같이, 서열 번호: 7을 사용하여 유사한 아미노산 서열을 가지며 SG-11와 기능적 상동성이거나 SG-11와 유사한 기능(들)을 가질 수 있는 단백질을 확인하기 위해 GenBank 비-중복 단백질 데이터베이스의 BLAST 검색을 수행하였다. 3개의 이러한 단백질이 확인되었고 (N-말단 신호 펩티드가 없는) 각각의 예측된

성숙 서열을 서열 번호: 7과 함께 정렬하여 상대적으로 보존된 단백질 내의 영역 및 개별 위치들을 확인하였다. 이들 3개 단백질들은 본 명세서에서 서열 번호:21 (GenBank 수탁 번호 WP_006857001에서 유래), 서열 번호:22 (GenBank 수탁 번호 WP_075679733에서 유래), 및 서열 번호:23 (GenBank 수탁 번호 WP_055301040에서 유래)로 제시되며 (**도 17**) 따라서, 본 명세서는 이들 3개 단백질 중 1개 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물, 뿐만 아니라 서열 번호:21, 서열 번호:22 및 서열 번호:23 중 어느 하나 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 장벽 기능 장애 및/또는 위장관 질환 또는 장애와 관련된 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0143] SG-11 변이체, SG-11V5 아미노산 서열 및 인코딩 핵산 서열의 예시적인 구체예가 하기 표 2에 제공된다.

표 2

아미노산 서열	인코딩 핵산 서열
서열 번호:19 (SG-11V5)	**서열 번호:20**
MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETL	ATGTTGGAGGGTGAAGAGTCTGTTGTCTATGTGGGTAAGAAAGGTGT
DQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEH	GATCGCGTCCCTGGACGTCGAGACTCTGGACCAGTCTTACTATGATG
GKSAVKVESLKVEDGVAKLKMKYK	AAACCGAGCTGAAGTCGTATGTGGACGCCGAAGTTGAGGATTACACG
TPEDYTAFSGIELYQGKVVASLAAG	GCCGAGCACGGCAAATCCGCCGTCAAAGTTGAGAGCTTGAAAGTTGA
YVYDGEFARVEEGKVVGAATKQDI	GGACGGCGTGGCAAAGCTGAAGATGAAATACAAGACCCCAGAGGAC
YSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIVY	TACACGGCGTTCAGCGGTATCGAGCTGTATCAGGGCAAAGTCGTCGC
VSSQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETG	ATCCCTGGCAGCGGGCTATGTGTACGACGGTGAGTTTGCGCGCGTCG
SVTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQ	AAGAAGGCAAAGTTGTGGGTGCGGCTACGAAACAAGATATCTACAG
MEMTGEPVNADDTEQTEAAAGD	CGAAGATGACCTGAAAGTCGCGATTATTCGTGCTAACACCGATGTTA
GSFETDVYTFIVYK	AAGTTGATGGCGAGATTGTGTACGTTAGCAGCCAAAACGTAAAGCTG
	ACGGGTAAAGATAGCGTGAGCATTCGTGATGGCTATTATCTGGAAAC
	CGGTAGCGTTACGGCGAGCGTCGATGTTACCGGTCAAGAGAGCGTG
	GGTACCGAACAGCTGAGCGGCACCGAACAGATGGAAATGACCGGTG
	AACCGGTTAACGCAGACGACACGGAACAAACCGAAGCCGCGGCAG
	GCGACGGTAGCTTCGAGACTGACGTGTACACCTTTATCGTGTACAAG

[0144]

[0145] 제약학적 제제 및 임상 적용에 사용하기 위한 SG-11 단백질의 안정성을 향상시키기 위해, 정제된 SG-11 단백질의 번역 후 변형 (PTM)을 확인하고 특성화하기 위한 연구를 수행하였다. 이들 실험은 실시예 10-11에 기재되어 있다. 이러한 분석은 SG-11 단백질이 적어도 메티오닌 산화 및 아스파라긴 탈아마이드화의 PTM을 거칠 수 있음을 보여준다. 또한, SG-11의 시스테인은 활성 단백질의 정제된 기능적 형태에서 이황화 결합을 형성하지 않을 것임을 기재하는 실시예 12의 실험들은, SG-11의 유리 설프하이드릴기가 정제된 단백질을 함유하는 용액에서 응집을 유발할 수 있음을 시사한다. 이러한 안정성 연구에 기초하고 다수의 서열 정렬 (도 17)에서 보는 바와 같은 SG-11에서 잔기의 보존된 성질에도 불구하고, (서열 번호: 7에 대해)위치 147 및/또는 151에서 시스테인이 다른 아미노산으로 치환 될 수 있는지 여부를 테스트하기로 결정되었다. 또한, 위치 53 및 83에서 보존된 아스파라긴의 치환이 고려되었다. 예시적 구체예에서, 서열 번호:7의 SG-11 서열은 변형되어 C147V 및 C151S의 치환을 도입하고 서열 번호:11 (SG-11V1)을 생성한다. C147V 및 C151S 치환은 또한 제공되는 SG-11 변이체 SG-11V2 (서열 번호:13; G84D, C147V, C151S를 포함), SG-11V3 (서열 번호:15; N83S, C147V, C151S를 포함), SG-11V4 (서열 번호:17; N53S, G84D, C147V, C151S를 포함) 및 SG-11V5 (서열 번호:19; N53S, N83S, C147V, C151S를 포함)에 존재한다.

[0146] 실시예 13은 PTM (메티오닌 산화 및 아스파라긴 탈아마이드화)이 SG-11 (서열 번호:7)에 비해 SG-11V5에서 유의하게 감소됨을 보여준다. 감소는 상이한 온도 및 상이한 보관 완충제 둘 다에서 관찰되었다. 실시예 14는 시스

테인 치환들 (SG-11V5, 서열 번호:19)을 포함하는 SG-11 변이체가 보관 완충액에서 단백질의 응집에 영향을 주는지 여부를 결정하기 위해 수행된 실험을 기재한다. 결과는 상이한 보관 완충액에서 테스트 될 때 SG-11V5 변이체가 SG-11 (서열 번호:7)에 비해 응집이 감소되었음을 보여준다.

[0147] 특히, SG-11V5를 생성하기 위해 치환된 아미노산들은 비교적 보존된 SG-11 단백질 영역에 존재하지만, 기능적 활성을 잃지 않으면서 이들 4개의 잔기를 치환하는 것이 가능하였다 (실시예 15 및 16, 이하 보다 상세하게 기재됨).

[0148] 본 명세서에 기재된 실험 데이터 및 분석에 기초하여, 고려되는 것은 서열 번호:7의 아미노산 N53, N83, G84, C147 및 C151 중 임의의 하나 이상을 치환하도록 설계된 SG-11의 변이체들 (예컨대, 서열 번호:3 또는 서열 번호:5)이다 (여기서 제시된 치환들은 서열 번호:7에 대한 잔기 위치들에서 존재한다). 이 변이체의 구체예는 서열 번호:33으로 하기 표 3에 제공되며, 여기서 위치 53, 83, 84, 147 및 151 각각의 잔기는 X로 표시되며 이는 이들 5개의 잔기들 중 하나 이상은 각각 가능한 20개의 아미노산으로 치환 될 수 있음을 나타낸다. 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:33의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구체예들에서, X53은 N, S, T, M, R, Q이고 및/또는 X83은 N, R 또는 K이고, 및/또는 X84는 G 또는 A이고, 및/또는 X147은 C, S, T, M, V, L, A, 또는 G이고, 및/또는 X151은 C, S, T, M, V, L, A, 또는 G이다. 또 다른 구체예들에서, X53은 N, S 또는 K이고 및/또는 X83은 N 또는 R이고 및/또는 X84는 G 또는 A이고 및/또는 X147은 C, V, L 또는 A이고 및/또는 X151은 C, S, V, L 또는 A이다.

[0149] 일부 구체예들에서, 상기 단백질은 서열 번호:34의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 X53은 N 이외의 임의의 아미노산이고, X83은 N 이외의 임의의 아미노산이고, X84는 G 이외의 임의의 아미노산이고, X147은 C 이외의 임의의 아미노산이고, 및/또는 X151은 C 이외의 임의의 아미노산이다.

표 3

[0150]

서열 번호:33 및 서열 번호:34 에 관한 아미노산 서열 (상기 정의 참고)
MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGK**X**AVKVESLKVEDGVAKLKMK
YKTPEDYTAF**XX**IELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATKQDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGE
I**X**YVS**X**QNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVTASVDVTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAA
AGDGSFETDVYTFIVYK

[0151] 또 다른 예에서, 개시된 단백질의 특정 아미노산은, 예를 들어, 기질 분자상의 결합 부위, 수용체, 항체의 항원-결합 영역 등과 같은 구조들과의 상호작용 결합 능력의 상당한 손실없이 단백질 구조에서 다른 아미노산으로 치환 될 수 있다. 따라서, 이들 단백질은 개시된 단백질의 생물학적 기능 균등물 (*예컨대*, 서열 번호: 3 또는 이의 변이체를 포함) 일 것이다. 소위 "보존적" 변화는 단백질의 생물학적 활성을 방해하지 않는데, 구조적 변화는 설계된 기능을 수행하는 단백질의 능력에 영향을 미치지 않기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 본 명세서에 개시된 유전자 및 단백질의 서열에서 다양한 변화가 이루어질 수 있으나, 본 발명의 목적을 여전히 달성 할 수 있을 것으로 생각한다.

[0152] 또한 본 발명은 SG-11의 변이체들: 서열 번호:11 (C147V, C151S, "SG11-V1"), 서열 번호:13 (G84D, C147V, C151S "SG11-V2"), 서열 번호:15 (N83S, C147V, C151S "SG11-V3"), 서열 번호:17 (N53S, G84D, C147V, C151S "SG11-V4"), 및 서열 번호:19 (N53S, N83S, C147V, C151S "SG11-V5")의 변이체들을 제공한다.

[0153] 중요하게는, 서열 번호 19를 포함하는 SG-11 변이체 단백질은 TEER 분석 (실시예 15) 및 생체내 DSS 마우스 모델 (실시예 16) 모두와 관련하여 그 활성을 유지하였으며, 이는 SG-11의 변이체가 야생형 SG-11과 동일한 치료 기능을 유지할 수 있음을 보여주는 것이다. 구체적으로, SG-11 (서열 번호:7) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)를 동시에 사용하여 시험관내 TEER 및 생체내 DSS 모델 실험을 수행하였다. 실시예 15는 SG-11 및 SG-11V5가 *시험관내*에서 TEER을 감소시키는 본질적으로 동일한 기능적 능력을 가짐을 보여준다. DSS 처리 전 또는 후에 DSS 모델 마우스를 SG-11로 처리한 실시예 7 및 8에 기재된 바와 같이, SG-11 및 SG-11 변이체의 *생체내* 효능을 비교하기 위해 실시예 16을 수행 하였다. 실시예 16은 또한 DSS 처리 전 (실시예 16A로 기재) 및 DSS 처리 후 (실시예 16B로 기재) 마우스에 대한 단백질 투여를 비교한다. SG-11 및 SG-11 변이체는 체중 감소 (**도 23A 및 23B**) 뿐만 아니라 육안 병리학적 임상 점수 (**도 24**)를 감소시켰다. 다시, SG-11은 장 투과성 및 혈청 LBP 수준을 감소시켰

으며, SG-11V5는 실시예 16A에서 용량-의존적 방식으로 장 투과성 및 혈청 LBP 수준을 감소시키는 것으로 나타난다 (**도 21A 및 도 22A**). 실시예 7 및 8에서 관찰된 결과와 유사하게, SG-11 및 SG-11 변이체 단백질은, DSS로 장기간 공격 후 치료 단백질이 투여되고 제한된 시기에 걸쳐 결과를 관찰하였던 실시예 16B에서 장 투과성 또는 혈청 LBP 수준을 감소시키지 않았다. 상기 논의된 바와 같이, 연구의 지속은 투과성 및 혈청 LBP 수준 둘 모두의 감소를 나타내는 것으로 여겨진다.

[0154] 본 명세서에 제공된 이러한 데이터를 고려할 때, 치료 단백질은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 이의 단편과 최소한 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% 동일하다. 한 대안적 구체예에서, 치료 단백질은 서열 번호:19 또는 서열 번호:7 또는 이의 단편에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 서열 번호:19 또는 서열 번호:5와 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 치료 단백질은 대안적으로 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 7의 변이체 일 수 있으며, 여기서 치료 단백질은 서열 번호 : 7에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 아미노산 치환을 가진다. 일부 구체예들에서, 변이체 치료 단백질은 서열 번호:3의 비-자연 발생 변이체를 포함한다. 대안적으로 언급되는, 치료 단백질은 서열 번호:3에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 비-자연 발생 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 치료 단백질은 서열 번호:7의 잔기 2 내지 233의 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하지 않는다.

[0155] 일부 구체예들에서, SG-11 단백질은 하나 이상의 아미노산 삽입 또는 결실에 의해 변형 또는 변이될 수 있다. 삽입은 상기 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 대한 1 또는 그 이상 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30, 1 내지 40 또는 1 내지 50개)의 아미노산의 부가 일 수 있고 및/또는 N-과 C-말단 아미노산 사이에 배치된 위치에서 1 또는 그 이상 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30, 1 내지 40 또는 1 내지 50개) 아미노산의 삽입일 수 있다. 유사하게, 1 또는 그 이상 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30, 1 내지 40 또는 1 내지 50개)의 아미노산의 결실은 임의의 N- 및 C-말단에서 그리고 내부 일부에서 발생할 수 있다.

[0156] 일부 구체예들에서, 서열 번호:3에 비해 최소한 하나의 비-자연 발생 아미노산 치환을 내포하는 변형된 또는 변이체 단백질이 제공된다. 다른 구체예들에서, 상기 변이체 단백질은 서열 번호:3 또는 서열 번호:7에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환을 포함한다. 추가 구체예들에서, 변형된 단백질은 서열 번호:5, 서열 번호:7, 서열 번호:9, 서열 번호:11 (SG-11V1), 서열 번호:13 (SG-11V2), 서열 번호:15 (SG-11V3), 서열 번호:17 (SG-11V4), 또는 서열 번호:19 (SG-11V5)에 제시된 아미노산 서열을 내포한다.

[0157] 일부 구체예들에서, 본 발명에 따른 치료 단백질은, 변이체 단백질 (예컨대, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17; or 서열 번호:19) 중 어느 하나를 포함하며, 이 또한, 예를 들면, 서열 번호:3 또는 서열 번호:7에 제시된 전장 성숙 단백질의 하나 이상의 활성들을 보유한다.

[0158] 또한 이들 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 서열들이 제시된다. 하나의 폴리펩티드 서열을 인코드하는 2개의 폴리뉴클레오티드 서열들은 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 비교적 낮은 서열 동일성을 공유할 수 있음이 해당 분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 233-아미노산 서열을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 내 모든 코돈이 그 세 번째 위치에서 최소한 1개의 치환을 내포하는 경우, 2개의 폴리뉴클레오티드들 간 서열 동일성은 약 67%로 계산될 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:19와 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 단백질을 인코드하는 서열을 포함한다. 따라서, 일부 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:4 또는 서열 번호:8과 최소한 67% 동일한, 또는 서열 번호:20과 약 67% 내지 100%, 70% 내지 100%, 75% 내지 100%, 80% 내지 100%, 90% 내지 100% 또는 95% 내지 100% 동일한 서열 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 번호:2, 서열 번호:4, 서열 번호:6, 서열 번호:8, 서열 번호:10, 서열 번호:12, 서열 번호:14, 서열 번호:16, 서열 번호:18, 또는 서열 번호:20의 서열 또는 이의 단편을 포함한다.

[0159] 일부 구체예들에서, 개시된 단백질은 서열 번호:3을 포함하는 또는 이로 구성된 단백질에 비해 뚜렷하게 상이한 구조 및/또는 기능적 특성들을 가진다.

[0160] 본 명세서에서 사용되는 용어 "SG-11 변이체"는, 예컨대, 서열 번호:3의 서열을 포함하는 단백질과 동일하지 않은 그리고, 가령, 제 2의 물질, 예컨대, 단백질 또는 펩티드에 대한 PTM 또는 융합 또는 링키지에 의해 추가로 변형된 SG-11 단백질을 포함할 수 있다.

[0161] 단백질 PTM은 생체내에서 발생하며 작용기 또는 단백질의 공유 부가, 조절 서브유닛의 단백질분해성 절단 또는 전체 단백질의 분해에 의해 프로테옴의 기능적 다양성을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 단리된 단백질은 생체내 또는 시험관내 1 또는 그 이상의 PTM을 거칠 수 있다. 변형(들)의 유형은 단백질이 발현되는 숙주 세포에 따라 달라지며 인산화, 당화, 유비퀴틴화, 나이트로실화 (예컨대, S-나이트로실화), 메틸화, 아세틸화 (예컨대, N-아세틸화), 지질화 (미리스토일화, N-미리스토일화, S-팔미토일화, 파르네실화, S-프레닐화, S-팔미토일화) 및 단백질분해를 포함하고 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 거의 모든 양상의 정상 세포 생물학 및 발병기전에 영향을 줄 수 있다. 본 명세서에 개시된 단리된 및/또는 정제된 SG-11 단백질 또는 변이체 또는 이의 단편들은 하나 이상의 하나 이상의 상기 언급된 번역 후 변형을 포함할 수 있다.

[0162] SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 N- 및/또는 C-말단 도메인이 펩티드 결합에 의해 제 2 단백질에 융합되어 있는 융합 단백질 일 수 있다. 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 널리 공지된 통상적으로 사용되는 융합 파트너들에는 인간 혈청 알부민 및 결정성 단편, 또는 IgG, Fc의 불변 도메인이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구체예들에서, SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 이황화 결합에 의해 제 2 단백질 또는 펩티드에 연결되며 여기서 제 2 단백질 또는 펩티드는 시스테인 잔기를 포함한다.

[0163] 전술한 바와 같이, 변형 및/또는 변화 (예컨대, 치환, 삽입, 결실)는 본 명세서에 개시된 단백질의 구조에서 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 이들 단백질의 서열에서의 변화, 이에 따른 핵산 코딩을 고려하며, 이 때, 그럼에도 불구하고, 이들은 다양한 시험관내 및 생체내 검정 및 본 발명의 치료 양상들에서 평가된 기능적 활성과 관련하여 실질적인 활성을 유지할 수 있다. 기능적 균등물과 관련하여, 해당 분야의 숙련된 기술자는 "생물학적 기능적 균등성" 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드의 정의에, 허용가능한 균등한 생물학적 활성 수준을 가지는 분자를 보유하면서 해당 분자의 정의된 부분 내부에서 이루어지 수 있는 변화의 수에 대한 제한이 존재하는 개념이 내재되어 있음을 잘 이해하고 있을 것이다.

[0164] 또한 상기 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은, 대상체에 투여될 때, 대상체에서 질환-관련 체중 감소를 감소시키고, 임상 병리학 점수를 개선하고, 및/또는 결장 단축을 최소화할 수 있는 것으로 간주된다. 일부 구체예들에서, 상기 대상체는 유전적으로 또는 임상적으로 유도된 염증성 장애 또는 기능이상 상피 장벽 기능을 가지는 포유동물이다. 대안적으로, 상기 동물은 상피 장벽 기능의 감소와 연관된 특발성 위장관 장애 또는 장 염증성 장애를 가진다. 다른 구체예들에서, 포유동물은 인간, 비-인간 영장류 또는 설치류이다. 설치류는 생쥐 또는 쥐일 수 있다.

[0165] 일부 구체예들에서, 본 발명에 따른 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 시험관내 분석에서 또는 상기 단백질을 투여받은 대상체에서 사이토카인의 생성 및/또는 분비를 조절할 수 있는 것이다. 일부 구체예들에서, 사이토카인의 분비는 시험관내에서 감소된다. 시험관내 분석 또는 단밸질을 투여받은 대상체에서 생성된 및/또는 분비된 사이토카인 수준은 대상체의 혈액, 혈청 및/또는 혈장에서 측정될 수 있다. 단백질의 투여는 전-염증성 사이토카인, 가령, 하나 이상의 TNF-α, IL-17, IL-1b, IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-25, IL-33, IL-8, MCP-1, MIP-3α, CXCL1, 및 IL-23의 혈청 수준을 감소시킬 수 있다. 대안적으로, 사이토카인은 항-염증성 사이토카인일 수 있으며, 이러한 경우에 단백질의 투여는 항-염증성 사이토카인, 가령, IL-4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 TGF-β의 혈청 수준을 증가시킨다.

[0166] 일부 구체예들에서, SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 대상체, 가령, 포유동물 (예컨대, 설치류, 비인간 영장류 또는 인간)에 투여될 때 위장관 염증을 감소시키는 기능적 능력을 가진다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체에 투여될 때 염증성 (즉, 전-염증성) 사이토카인을 감소시키는 기능적 능력을 가진다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체에 투여될 때 TNF-α 및/또는 IL-23을 감소시킬 수 있다. 또 다른 구체예들에서, 상기 단백질은 대상체에 투여될 때 항-염증성 사이토카인을 증가시키는 기능적 능력을 가진다. 일부 양상들에서, 본 발명의 단백질은 대상체에 투여될 때 IL-10을 증가시킬 수 있다.

[0167] 본 발명에 따른 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 대상체 (예를 들어, 설치류, 비 인간 영장류 또는 인간)에게 투여 될 때, 위장관 상피 세포 장벽 기능을 개선, 질환-관련 체중 감소를 감소, 임상 점수를 개선, 결장 길이 및/또는 결장 중량-대-길이 판독결과를 개선, 뮤신 유전자 발현 (예컨대, muc2 발현)을 유도 또는 증가, 위장관 점막 장벽 (예컨대, 소장, 대장, 구강 및/또는 식도에서) 위장관 점막 장벽의 구조적 완전성 및/또는 기능성을 증가, 및/또는 위장관 염증을 감소시킬 수 있는 것이다.

[0168] 일부 구체예들에서, 서열 번호:3 또는 서열 번호:7에 비해 이러한 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 결실로 생성된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 서열 번호:7 또는 서열 번호:19의 단백질과 실질적으로 동일한 기능적 활성 수준을 유지한다 (예컨대, 상피 세포층이, 예컨대, 열-사멸된 *대장균*에 의해 파열되었을 경우 TEER

분석에서 전기 저항을 증가시킬 수 있다). 상기 변이체 단백질은 위장관 (경구, 식도, 및 장을 포함) 점막의 염증, 손상된 장 상피 세포 간극 연접 완전성을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 염증 병태 및/또는 장벽 기능 장애를 포함하여 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 다양한 병태들의 치료 또는 예방을 위한 치료제로서 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 단백질은 염증 병태 및/또는 장벽 기능 장애를 앓고 있거나 그에 취약한 개체에게 투여 될 때 다음과 같은 효과 중 하나 이상을 가진다: *예컨대*, 염증 유발된 파열 후 상피 장벽 완전성 개선; 하나 이상의 면역 세포(들)에 의한 하나 이상의 전-염증성 사이토카인 (*예컨대*, TNF-α 및/또는 IL-23)의 생성 억제; 상피 세포에서 뮤신 생성의 유도; 및/또는 상피 상처 치유의 개선. 더욱이, 변형된 또는 변이체 SG-11 단백질은 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 크론병, 단장 증후군, GI 점막염, 구강 점막염, 화학요법-유발된 점막염, 방사선-유발된 점막염, 괴사 소장대장염, 낭염, 대사 질환, 복강 질환, 염증성 장 증후군, 또는 화학요법 관련 지방간염 (CASH)과 같은 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 장애 또는 병태의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

[0169] 예컨대, 실시예 6에 설명된 바와 같이, SG-11 단백질은 상피 상처 치유를 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열 번호:3 또는 서열 번호:7의 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 제공하며, 이 때 이러한 단백질은 시험관내 분석에서 상처 치유를 증가시킬 수 있다.

[0170] **치료 방법**

[0171] 변이체 (예컨대, 아미노산 치환, 결실, 삽입), 변형 (예컨대, 당화, 아세틸화), SG-11 단편 및 이의 융합체를 포함하는 본 명세서에 기재된 SG-11 단백질은 위장관 내의 염증 및/또는 위장관 내의 상피 장벽 기능의 기능장애와 관련된 장애로 진단되거나 이를 앓고 있는 대상체를 치료함에 사용하기 위해 고려된다.

[0172] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 SG-11 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 대상체는 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 소아 UC, 크론병, 소아 크론병, 단장 증후군, 점막염 GI 점막염, 구강 점막염, 식도 점막염, 위, 소장 (십이지장, 공장, 회장), 대장 (결장), 및/또는 직장, 화학요법-유발된 점막염, 방사선-유발된 점막염, 괴사 소장대장염, 낭염, 대사 질환, 복강 질환, 과민성 장 증후군, 또는 화학요법 관련 지방간염 (CASH)으로 진단받은 대상체 일 수 있다. 본 명세서에 기재된 SG-11 제약학적 조성물의 투여 또한 상처 치유 분야에 유용할 수 있다.

[0173] **염증성 장 질환**

[0174] 염증성 장 질환 (IBD)은 일반적으로 궤양성 대장염 (UC) 및 크론병 (CD)을 포함한다. 염증성 장 질환의 발병기전은 알려져 있지 않다. 유전적 소인이 제시된 바 있으며, 박테리아, 바이러스 및, 아마도, 식이 항원을 포함한 환경적 요인들이 지속적인 장 염증성 연쇄반응을 유발할 수 있다. *Id*. IBD는 심한 설사, 통증, 피로, 및 체중 감소를 유발할 수 있다. IBD는 쇠약하게 할 수 있으며 때로는 생명을 위협하는 합병증을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 명세서에 기재된 치료 방법은 상기 기재된 임의의 하나 이상의 증상을 감소, 예방 또는 제거하는데 효과적이며, 이 때 이 방법은 필요로 하는 환자에게 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 치료적 유효량의 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 치료 방법은 완화를 가져온다.

[0175] **궤양성 대장염**

[0176] 궤양성 대장염은 대장 (결장)과 직장의 가장 안쪽 내벽에 오래 지속되는 염증과 욕창 (궤양)을 일으키는 염증성 장 질환이다.

[0177] 궤양성 대장염은 전형적으로 많은 환자에서 직장 근위부로부터 전체 결장을 포함하도록 연장되는 얕고 연속적인 염증을 나타낸다. 누공, 열창, 농양 및 소장 침범은 없다. 제한된 질환 (*예컨대*, 직장염)의 환자는 전형적으로 경증이지만 빈번한 재발 증상을 가지는 반면, 췌장염 환자는 보다 일반적으로 중증의 증상을 나타내며, 종종 입원이 필요하다. Botoman *외*, "Management of Inflammatory Bowel Disease," Am. Fam. Physician, Vol. 57(1):57-68 (Jan 01, 1998) (내부 인용내용 생략). 그러므로, 궤양성 대장염은 대장 (결장)과 직장의 가장 안쪽 내벽에 오래 지속되는 염증과 욕창 (궤양)을 일으키는 IBD이다.

[0178] **크론병**

[0179] 궤양성 대장염과는 달리, 크론병은 불연속적인 국소 궤양, 누공 형성 및 항문 주위 침범과 함께 입에서 항문까지 전체 장에 관계 할 수 있다. 말단 회장은 가장 일반적으로 영향을 받으며, 통상적으로 다양한 정도의 결장

침범이 있다. 환자들의 부분집합은 열창 및 누공 형성이 있는 항문주위 질환을 가진다. 크론병 환자의 단 2 내지 3 퍼센트만이 상부 위장관에 임상적으로 유의한 침범이 있다. Botoman *외*, "Management of Inflammatory Bowel Disease," Am. Fam. Physician, Vol. 57(1):57-68 (Jan 01, 1998) (내부 인용내용 생략). 그러므로, 크론병은 소화관 내벽의 염증을 유발하는 IBD이다. 크론병에서, 염증은 종종 영향받은 조직들 내부 심부로 확산된다. 염증은 소화관, *즉*, 대장, 소장, 또는 둘 모두의 상이한 부위들에 관계될 수 있다. 교원성 대장염 및 림프구성 대장염 또한 고려되는 염증성 장 질환이지만, 일반적으로 고전적인 염증성 장 질환과 별도로 간주된다.

[0180] **염증성 장 질환의 임상 파라미터**

[0181] 전술한 바와 같이, 염증성 장 질환은 궤양성 대장염 및 크론병을 포함한다. 이들 병태를 치료함에 있어서 본 명세서에 기재된 투여 단백질의 효능에 접근하기 위해 사용될 수 있는 다수의 점수 및 임상 마커가 해당 분야의 숙련된 기술자에게 공지되어 있다.

[0182] IBD 환자 평가에는 두 가지 일반적인 접근 방식이 있다. 첫 번째는 점막의 육안 검사와 관련이 있으며, IBD가 GI관의 염증과 궤양의 출현에 의해 나타난다는 점에서 점막 손상의 징후 관찰에 의존한다. 점막을 평가할 수 있는 어떠한 절차든 사용할 수 있다. 예에는 바륨 관장, 엑스레이 및 내시경 검사가 포함된다. 내시경검사는 식도, 위 및 십이지장 (식도위내시경 검사), 소장 (내시경 검사) 또는 대장/결장 (대장내시경검사, 구불창자내시경검사)의 내시경검사 일 수 있다. 이 기술은 염증, 궤양 및 비정상적인 성장, 가령, 폴립 영역을 식별하기 위해 사용된다.

[0183] 이러한 GI관의 육안 검사를 기반으로 한 점수 시스템은 IBD의 상태와 중증도를 결정하기위해 존재하며, 이 점수 시스템은 이러한 질병의 진단 및 모니터링과 임상 연구 평가에서 환자가 다른 의료 전문가에 의해 평가 될 수 있다는 사실에도 불구하고 다른 환자들에 대한 균일한 평가가 이루어지도록 하고자 하는 것이다. 육안 검사 of UC의 육안 검사에 기초한 평가의 예들은 Daperno M 외의 문헌 (J Crohns Colitis. 2011 5:484-98)에 논의 및 비교되어 있다.

[0184] 임상 점수화 시스템 또한 같은 목적으로 존재한다. 내시경검사 또는 점막에 대한 다른 검사에서의 결과가 이러한 임상 점수 시스템에 통합될 수 있지만, 이러한 점수 시스템은 대변 빈도, 직장 출혈 및 의사의 전반적 평가와 같은 증상에 근거한 데이터도 포함한다. IBD는 삶의 질에 영향을 미치는 다양한 증상을 가지고 있기 때문에 이러한 점수 시스템 중 일부는 또한 삶의 질에 미치는 영향에 대한 정량적 평가와 증상의 정량화를 고려한다.

[0185] UC에 대한 점수 시스템의 한 예는 Mayo 점수 시스템 (Schroeder 외, N Eng J Med,1987, 317:1625-1629)이 있으나, 통상적으로 덜 사용되어 왔던 그리고 중증도에 관한 궤양성 대장염 내시경 지표 (UCEIS) 점수 (Travis 외, 2012, Gut, 61:535-542), Baron 점수 (Baron 외, 1964, BMJ, 1:89), 중증도에 관한 궤양성 대장염 결장내시경 지표 (UCCIS) (Thia 외, 2011, Inflamm Bowel Dis, 17:1757-1764), Rachmilewitz 내시경 지표 (Rachmilewitz, 1989, BMJ, 298:82-86), Sutherland 지표 (또한 UC 질환 활성 지표 (UCDAI) 점수 시스템으로 공지됨; Sutherland 외, 1987, Gastroenterology, 92:1994-1998), Matts 점수 (Matts, 1961, QJM, 30:393-407), 및 Blackstone 지표 (Blackstone, 1984, Inflammatory bowel disease. In: Blackstone MO (ed.) Endoscopic interpretation: normal and pathologic appearances of the gastrointestinal tract, 1984, pp. 464-494)를 포함하는 다른 점수 시스템들이 존재한다. 검토를 위해, Paine, 2014, Gastroenterol Rep 2:161-168을 참고하라. 따라서, 본 발명은 UC로 진단받은 그리고 이를 앓고 있는 대상체의 치료 방법을 고려하며, 여기서 이러한 치료는 본 명세서에 기재된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 투여하는 단계를 포함하며, UCEIS 점수, Baron 점수, UCCIS 점수, Rachmilewitz 내시경 지표, Sutherland 지표, 및/또는 Blackstone 지표를 측정하여 결정되는 UC 병리학에 있어서의 감소를 가져온다.

[0186] CD에 관한 점수 시스템의 한 예는 CDAI (크론병 활성도)이며 (Sands B et al 2004, N Engl J Med 350 (9): 876-85); 대부분의 주요 연구는 질병의 반응 또는 완화를 정의하기 위해 CDAI를 사용한다. CDAI 점수의 계산에는 7일간의 액체변 회수, 7일간의 복부 통증 사례 및 중증도, 7일간의 일반적 웰빙, 장외 합병증 (예컨대, 관절염/관절통, 홍채염/포도막염, 결절 홍반, 괴저화농 피부증, 아프타성 구내염, 항문 열창/누공/농양, 및/또는 열>37.8℃ 7일간의 지사제 사용, 복부 종괴의 존재, 헤마토크리트, 및 이상/관찰의 비율 또는 표준 체중과의 백분율 편차로서의 체중에 관한 점수가 포함된다. CDAI 점수에 기초하여, CD는 무증상 완화 (0 내지 149점), 경증 내지 중등도 활성 CD (150 내지 220점), 중등도 내지 중증 활성 CD (221 내지 450점), 또는 중증 활성 전격 질환 (451 내지 1000점)으로 분류된다. 일부 구체예들에서, CD로 진단된 환자에게 치료적 유효량의 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 투여하는 단계를 포함하는 상기 치료 방법은 CD의 진단 점수를 감소시킨다. 예를

들면, 상기 점수는 진단을 중증 활성으로부터 경증 또는 중등도 활성으로 또는 무증상 완화로 바꿀 수 있다.

[0187] Harvey-Bradshaw 지표는 오직 임상 파라미터로만 구성된 CDAI의 보다 간단한 버전이다 (Harvey 외, 1980, Lancet 1(8178):1134-1135). 삶의 질에 대한 영향은 또한 염증성 장 질환 설문지 (IBDQ)에 의해서도 평가된다 (Irvine 외, 1994, Gastroenterology 106: 287-296). 대안적인 방법들에는 CDEIS 및 SES CD가 추가로 포함된다 (예컨대, Levesque, 외 (2015) Gastroentrol. 148:37 57 참고).

[0188] 일부 구체예들에서, IBD, 예컨대, UC의 치료 방법이 제공되며, 이 때 이러한 치료는 Mayo 점수를 감소시킴에 효과적이다. Mayo 점수는 UC의 중증도를 평가하기 위해 사용되는 내시경과 임상을 조합한 척도로서 1-12의 척도가 있다. Mayo 점수는 대변 빈도, 직장 출혈, 유연성 직장구불창자내시경검사 또는 대장내시경검사 결과, 및 의사의 전반적 평가에 대한 하위점수들의 조합이다 (Paine, 2014, Gastroenterol Rep 2:161-168). 직장 출혈과 관련하여, 절반 미만의 대변에서 관찰된 혈액 줄무늬는 1점, 대부분의 대변에서의 혈액에 2점, 순수한 혈액 통과에 3점이 할당된다. 대변 빈도와 관련하여, 정상 횟수의 매일의 대변에 0점, 정상보다 1 또는 2회 더 많은 대변에 1점, 정상보다 3 또는 4회 더 많은 대변에 2점, 그리고 정상보다 5회 이상 많은 대변에 3점이 할당된다. 내시경검사 요소와 관련하여, 점수 0은 정상 점막 또는 비활성 UC를 나타내고, 경증 유약성 (friability), 감소된 혈관 패턴, 및 점막 홍반의 증거가 있는 경증 질환에 대해서는 점수 1이 주어지고, 유약성, 미란 (erosions), 혈관 패턴의 완전한 소실, 및 심각한 홍반이 있는 중등도 질환에 대해서는 점수 2가 주어지고, 그리고 궤양화 및 자연 출혈에 대해서는 점수 3이 주어진다 (Schroeder 외, 1987, N Engl J Med, 317:1625-1629). 의사의 전반적인 평가는 정상 소견에 대해 0 점, 경증 대장염에 1 점, 중등도 대장염에 2 점, 중증 대장염에 3 점을 할당한다. 따라서, 일부 구체예들에서, 환자는 SG-11 치료 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편으로 치료받은 환자는 환자가 다음 중 최소한 하나에서 최소한 1, 2 또는 3점 만큼의 Mayo 점수 감소를 경험할 때 성공적으로 치료된다: 직장 출혈, 대변에 비치는 혈액 줄무늬, 내시경검사 하위점수 및 의사의 전반적인 평가. 일부 구체예들에서, UC로 진단된 환자에게 치료적 유효량의 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 투여하는 단계를 포함하는 상기 치료 방법은 UC의 진단 점수를 감소시킨다. 예를 들면, 상기 점수는 진단 점수, 예컨대, Mayo 점수를, 최소한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11점 만큼 변화시킬 수 있다.

[0189] **낭염**

[0190] 추가로 또는 대안적으로, 본 명세서에 기재된 SG-11 치료 단백질 또는 변이체를 포함하는 조성물 및 투여 방법이 낭염을 치료하는데 사용될 수 있다. 낭염은 UC의 치료에서 외과적으로 생성되는 낭(pouch) 내층의 염증이다. 구체적으로, 중증 UC를 갖는 대상체는 병변 결장을 제거하고, 회장 문합술 (IPAA) 또는 J-주머니 수술이라는 절차에 의해 장을 재연결 할 수 있다. 낭염 사례는 많은 환자에서 재발 할 수 있으며, 급성 재발성 낭염 또는 만성의 끊임없는 낭염으로 나타난다. 따라서, 낭염, 급성 낭염 또는 재발성 낭염의 치료 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0191] 낭염 활성은 진정 (활성 낭염 없음), 경증 내지 중등도 활성 (대변 빈도, 급박, 및/또는 드문 실금 증가), 또는 중증 활성 (빈번한 실금 및/또는 환자가 탈수로 입원함)으로 분류될 수 있다. 낭염의 지속 기간은 급성 (4주 이하) 또는 만성 (4주 이상)으로 정의 될 수 있으며 패턴은 드물게 (1-2회 급성 에피소드), 재발성 (3회 이하 에피소드) 또는 연속성으로 분류된다. 의학적 치료에 대한 반응은 치료 반응성 또는 치료 불응성으로 표지 될 수 있으며, 어느 경우든 약물이 특정된다. 따라서, 일부 구체예에서, SG-11 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물로의 치료가 낭염의 중증도 감소 및/또는 진정을 초래하는, 낭염으로 진단된 대상체의 치료 방법이 제공된다.

[0192] **점막염 및 점막 장벽**

[0193] 위장관 (GI) 점막은 상피 장벽, 면역 세포 및 미생물과 관련된 복잡한 미세환경이다. 건강한 결장에서 미묘한 균형이 유지된다. 루미 날 미생물은 상피와 점액으로 구성된 장벽에 의해 숙주 면역계로부터 물리적으로 분리된다. IBD의 발병기전은, 완전히 밝혀지진 않았지만, 기능이상 점막 장벽으로 변형된 공생 균무리에 대한 부적절한 숙주 반응과 관련될 수 있다. Boltin *외*, "Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update," J. Clin. Gastroenterol., Vol. 47(2):106-111 (Feb. 2013)을 참고하라.

[0194] 점막염은 암 치료 (특히 화학요법 및 방사선)가 장관을 (입에서 항문으로) 라이닝하는 급속하게 분할된 상피 세포들을 분해하여 점막 조직이 궤양화 및 감염에 노출 될 때 발생한다. 점막층 또는 점막으로도 알려진 점막 조직은 공기와 소통하는 모든 신체 통로, 가령, 호흡기 및 소화관을 라이닝하며, 점액을 분비하는 세포 및 관련 샘들을 가지고 있다. 구강 점막이라고 불리는 입을 커버하는 이러한 라이닝 부분은 신체의 가장 민감한 부분 중

하나이며 화학요법과 방사선에 특히 취약하다. 구강은 점막염에 가장 통상적인 위치이다. 구강 점막이 가장 빈번한 점막 독성 부위이자 점막염이 생성되는 부위이지만, 점막염은 식도, 위, 소장 (십이지장, 공장, 회장), 대장 (결장) 및 직장을 비롯한 전체 소화관을 따라 발생할 수도 있는 것으로 이해된다. 일부 구체예들에서, SG-11 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물은 입, 식도, 위, 소장 (십이지장, 공장, 회장), 대장 (결장), 및/또는 직장의 점막염을 치료함에 치료적으로 효과적이다.

[0195] 구강 점막염은 통증, 먹지 못함으로 인한 영양 문제 및 점막의 아물지 않은 상처로 인한 감염 위험 증가를 비롯한 여러 가지 문제를 유발할 수 있다. 이는 환자의 삶의 질에 중대한 영향을 미치며 용량을 제한 할 수 있다 (즉, 후속 화학요법 용량을 줄여야 함). 세계 보건기구는 구강 점막염 진단을 위한 다음과 같은 구강 독성 척도를 가지고 있다: 등급 1: 쓰림 ± 홍반, 등급 2: 홍반, 궤양; 환자는 고형 음식을 삼킬 수 있음; 등급 3: 광범위한 홍반이 있는 궤양; 환자는 고형 음식을 삼킬 수 없음; 등급 4: 영양법이 불가능한 정도의 점막염. 등급 3 및 등급 4 구강 점막염은 중증 점막염으로 간주된다. 따라서, 본 발명은 구강 점막염으로 진단된 대상체의 치료 방법을 제공하며, 여기서 SG-11 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물의 투여는 구강 독성 등급을 1 내지 4 등급 척도의 1점 이상 만큼 감소시킨다.

[0196] **결장 단축**

[0197] 궤양성 대장염은 결장 점막에 영향을 미치는 특발성 염증성 장 질환이며, 임상적으로 설사, 복통 및 혈변이 특징이다. 질환 정도는 다양하며 직장 (궤양성 직장염), 비장 굴곡에 대한 결장의 좌측, 또는 전체 결장 (전대장염)만 관련될 수 있다. 이 질환의 중증도는 최소 내지 심한 궤양화 및 이형성증에 이르기까지 조직 학적으로 매우 다양 할 수 있다. 암종이 발생할 수 있다. 궤양성 대장염의 전형적인 조직학적 (미시적) 병변은 선와 농양으로, 선와의 상피가 분해되고 내강이 다형핵 세포들로 채워진다.. 고유층은 백혈구로 침윤된다. 선와가 파열되면서 정상적인 점막 구조가 사라지고 그 결과 흉터가 짧아지고 결장을 좁힐 수 있다. 그러므로, 결장 단축은 대장염 질환의 결과일 수 있으며 종종 진단적으로 사용된다. 예를 들어, 비-침습성 일반 복부 x-선은 급성 환자의 횡단 결장의 가스 윤곽을 보여줄 수 있다. 결장의 단축 및 팽출상의 소실은 또한 일반 필름 뿐만 아니라 이중-조영 바륨 관장에 의해서도 입증 될 수 있다. 궤양성 질환의 표시들에는 점막 세부 사항 상실, 조약돌 충만 결손 (cobblestone filling defects) 및 관련 분절 영역이 포함된다. "Ulcerative Colitis: Introduction - Johns Hopkins Medicine," found at: www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/_pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf를 참조하라.

[0198] 또한, 대장염의 *생체내* 모델에서 인식된 기술은 모델에서 대장염의 중증도를 점수화함에 있어 결장 길이의 단축을 이용할 것이다. Kim *외*, "Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD," Journal of Visualized Experiments, Vol. 60, 2-6 페이지 (2012년 2월)를 참조하라.

[0199] **비-IBD 질환의 상피 장벽 기능**

[0200] 부적절하게 기능하는 상피 장벽은 예컨대, IBD 및 점막염에 더 많이 연관되어 있다. 더욱이, 부적절하게 기능하는 상피 장벽에 의해 유발, 연결, 상관 및/또는 악화되는 것으로 연구에 의해 밝혀진 수많은 다른 질환들이 존재한다. 이러한 질환들에는 다음이 포함된다: (1) 비만, 유형 2 당뇨병, 비-알콜성 지방간염 (NASH), 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 간 장애, 및 알콜성 지방간염 (ASH)을 포함하는 대사 질환; (2) 복강 질환; (3) 괴사 소장대장염; (4) 과민성 장 증후군 (IBS); (5) 장 감염 (*예컨대 클로스트리디움 디피실레*); (6) 다른 일반적인 위장 장애; (7) 간질성 방광염; (8) 신경계 장애 또는 인지 장애 (*예컨대* 알쯔하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 및 자폐증); (9) 화학요법 관련 지방간염 (CASH); 및 (10) 전술한 질환들의 소아 버전. *예컨대*: Everard *외*, "Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice," Diabetes, Vol. 60, (November 2011), pgs. 2775-2786; Everard *외*, "Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity," PNAS, Vol. 110, No. 22, (May 2013), pgs. 9066-9071; Cani *외*, "Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice," Diabetes, Vol. 57, (June 2008), pgs. 1470-1481; Delzenne *외*, "Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics," Nature Reviews, Vol. 7, (November 2011), pgs. 639-646을 참조하라. 결과적으로, 환자에게 적절한 상피 장벽 기능을 회복시키는 것이 전술한 질환 상태를 해결하는데 중요 할 수 있다.

[0201] 입, 식도, 위, 소장, 대장 및 직장을 포함하는 소화관 내강에서 적절하게 기능하는 상피 장벽은 위장관 및 소화관 내에서 마이크로바이옴을 제어하고 유지함에 중요하다. 마이크로바이옴의 생태계에는 위장관과 소화관에 있

는 환경, 장벽, 조직, 점액, 뮤신, 효소, 영양소, 음식 및 미생물 군집이 포함된다. 장 점막 장벽의 완전성과 투과성은 많은 중요한 방식으로 건강에 영향을 미친다.

[0202] 위장 장애에서 뮤신 분비의 변화로 인한 점막 장벽의 완전성 상실은 숙주 면역 변화, 내강 미생물 요인, 또는 직접 작용하는 유전적 또는 환경적 결정요인들과 관련 될 수 있다. 그러므로, 점막 장벽의 불균형은 IBD의 발병기전의 중심 일 수 있다. Boltin *외*, "Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update," J. Clin. Gastroenterol., Vol. 47(2):106-111 (Feb. 2013).

[0203] 뮤신은 위장관을 라이닝하는 점액층의 주요 구성성분이다. 인간 게놈에서 공지된, 분비된 또는 막-결합된 뮤신을 인코드하는 21개 이상의 뮤신 (MUC) 유전자가 존재한다. 정상 결장직장에서의 우세한 점액은 MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC13 및 MUC17.1이며, MUC2는 잔세포에서 생성되는, 1차로 분비되는 장 점액의 겔 형성 성분이다. Boltin *외*, "Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update," J. Clin. Gastroenterol., Vol. 47(2):106-111 (Feb. 2013)을 참고하라. MUC1, 3A, 3B, 4, 13 및 17.1과 같은 또 다른 분비되는 뮤신과 함께, MUC2의 잔세포 분비는 결장 상피 세포에 보호 장벽을 형성하여 상피 세포에 손상을 주거나 면역 반응을 프라이밍 할 수 있는 장 내용물에 대한 노출을 감소시킨다.

[0204] **IBD에서의 염증 메커니즘**

[0205] 특정 사이토카인이 IBD와 관련이 있음을 보여주는 중요한 증거가 있다. 최근의 연구에 따르면 사이토카인은 크론병 및 궤양성 대장염과 같은 염증성 장 질환 (IBD)의 발병기전에 중요한 역할을 하며, 이 때 염증 반응의 여러 양상들을 제어한다. Markus Neurath, "Cytokines in Inflammatory Bowel Disease," Nature Reviews Immunology, Vol. 14., 329-342 (2014). 특히, IBD에서 발생하는 전-염증성 그리고 항-염증성 사이토카인 사이의 불균형은 염증의 해결을 방해하고 대신 질환 지속 및 조직 파열을 초래한다. *Id*. 최근의 연구는 질환 진행에 중요한 영향을 미치는 조절 사이토카인의 네트워크가 존재함을 제시한다. *Id*. 따라서, 전-염증성 및 항-염증성 사이토카인의 생성 및/또는 분비에 대한 SG-11의 효과를 연구하기 위한 실험을 수행하였다.

[0206] **전-염증성 사이토카인**

[0207] 간단히 말하면, 전-염증성 사이토카인은 세포 신호 전달에 중요하고 전신 염증을 촉진하는 사이토카인이다. 이들은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성되며 염증 반응의 상향조절에 관여한다. 전-염증성 사이토카인은 상향조절 후 반응을 유도하는 작은 매개체 분자들의 번역을 코딩하는 유전자들로부터 발생한다. 인터루킨-1 (IL-1), IL6, IL-12, IL-18, IL-23, CD40L, TNF-α와 같은 종양 괴사 인자 (TNF), 감마-인터페론 (IFN- 감마), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 및 MCP-1은 전-염증성 사이토카인으로 잘 특징지워진다. 염증은 전-염증성 및 항-염증성 사이토카인들 사이의 상호작용을 특징으로 한다.

[0208] 전-염증성 사이토카인의 생물학적 활성을 감소시키는 것은 일부 질환들의 치료에 유용 할 수 있다. 예를 들어, IL-1 또는 TNF-α를 차단하는 것은 류마티스 관절염, 염증성 장 질환 또는 이식편 대 숙주 질환 환자에게 도움을 줌에 있어 성공적이었다. Strober W, Fuss IJ (May 2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases," Gastroenterology, Vol. 140 (6): 1756-67을 참조하라.

[0209] **항-염증성 사이토카인**

[0210] 간단히 말하면, 항-염증성 사이토카인은 전-염증성 사이토카인 반응을 조절하는 일련의 면역조절 분자이다. 그러므로 이들 분자들은 전-염증성 사이토카인에 의해 촉발되는 염증 반응들을 조절하여 감소시키는데 도움을 준다. 항-염증성 사이토카인들은 항-염증성 사이토카인들로 인식되는 예컨대, IL4, IL-10, IL-13, IFN-α, 및 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-β)를 포함한다.

[0211] 본 명세서에 제시된 방법들에 관한 일부 구체예들에서, SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 상기 제약학적 조성물의 투여는 상기 조성물을 투여받은 환자의 면역 세포에 의해 최소한 하나의 전-염증성 사이토카인 (*예컨대*, TNF-α 및/또는 IL-23)의 생성을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 면역 세포에 의해 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 (*예컨대*, IL-10)의 생성을 증가시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 면역 세포에 의해 최소한 하나의 항-염증성 사이토카인 (*예컨대*, IL-10)의 생성을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 투여는 환자의 상피 세포에서의 뮤신 생성을 개선시키고 및/또는 상피 상처를 치유할 수 있다.

[0212] 치료에 사용되는 투약 요법은 원하는 치료 효과, 투여 경로, 및 치료 기간에 따라 달라진다. 용량은 질환의 본질 및 중증도, 환자의 체중, 이후 환자가 따르게 되는 특수 식이요법, 동시 약물치료, 및 해당 분야의 숙련된

기술자들이 알고 있는 다른 요인들에 따라, 환자들간에 달라질 것이다.

[0213] 일반적으로, 매일 0.0001 내지 10 mg/체중 kg 용량 수준의 치료 단백질이 환자, *예컨대*, 염증성 장 질환을 앓고 있는 환자들에게 투여된다. 용량 범위는 일반적으로 하루에 환자 당 약 0.5 mg 내지 100.0 g이며, 이는 단회 또는 다회 용량으로 투여 될 수 있다.

[0214] 일부 양상들에서, 용량 범위는 환자 당 일일 약 0.5 mg 내지 10 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 9 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 8 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 7 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 6 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 5 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 4 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 3 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 2 g, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 1 g이 될 것이다.

[0215] 일부 양상들에서, 용량 범위는 환자 당 일일 약 0.5 mg 내지 900 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 800 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 700 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 600 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 500 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 400 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 300 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 200 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 100 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 50 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 40 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 30 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 20 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 10 mg, 또는 환자 당 일일 0.5 mg 내지 1 mg이 될 것이다.

[0216] **치료 단백질을 포함하는 병용 요법**

[0217] 치료 단백질을 포함하는 본 명세서에 제시된 제약학적 조성물은 다른 치료 요법 및/또는 제약학적 조성물과 병용될 수 있다. 예를 들면, 염증성 장 질환을 앓고 있는 환자는, 상기 병태를 치료하기 위해 의사가 처방한 약물을 이미 섭취하고 있을 수 있다. 구체예들에서, 본 명세서에 제시된 상기 제약학적 조성물은 환자의 기존의 약물과 함께 투여될 수 있다.

[0218] 예를 들면, 본 명세서에 제시된 치료 단백질은 다음 중 하나 이상과 병용될 수 있다: 지사제, 5-아미노살리실릭 애시드 화합물, 항염제, 항생제, 항체 (*예컨대,* 염증성 사이토카인을 표적하는 항체, *예컨대,* 항-사이토카인제, 가령, 항-TNF-α를 표적하는 항체, (예컨대, 아달리무맙, 세르톨리주맙 페골, 골리무맙, 인플릭시맙, V565) 또는 항-IL-12/IL-23 (예컨대, 우스테키누맙, 리산키주맙, 브라지쿠맙, 우스테키누맙), JAK 억제제 (예컨대, 토파시티닙, PF06700841, PF06651600, 필고티닙, 우파다시티닙), 항-인테그린제 (예컨대, 베돌리주맙, 에트롤리주맙), S1P 억제제 (예컨대, 에트라시모드, 오자니모드, 아미셀리모드), 재조합 세포-기반 제제 (예컨대, Cx601), 스테로이드, 코르티코스테로이드, 면역억제제 (*예컨대,* 아자티오프린 및 메르캅토푸린), 비타민, 및/또는 특수 식이요법.

[0219] 화학요법 또는 방사선요법 중이며 점막염, 예컨대, 구강 점막염을 앓고 있거나 발병 할 위험이 있는 암 환자들에게는 점막염, 예컨대, 구강 점막염을 치료하는데 사용되는 제제와 함께 본 발명에 따른 제약학적 조성물이 투여 될 수 있다. 일부 구체예들에서, 치료 방법은 점막염을 앓고있는 환자에게 SG-11 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함하는 제약학적 조성물과 아미포스틴, 벤조카인, 벤지다민, 라니티딘, 오메프라졸, 캡사이신, 글루타민, 프로스타글란딘 E2, 비타민 E, 수크랄페이트 및 알로푸리놀로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 제 2 치료제와의 조합물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0220] 본 명세서의 방법드렝 관한 일부 구체예들에서, 제 2 치료제는 본 명세서에 기재된 SG-11 단백질과 함께, 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 단백질 및 제 2 치료제는 상기 질환, 또는 병태 또는 증상의 치료 또는 예방을 위해 상승작용적으로 작용한다. 다른 구체예들에서, 상기 단백질 및 제 2 치료제는 상기 질환, 또는 병태 또는 증상의 치료 또는 예방을 위해 부가적으로 작용한다.

[0221] **SG-11 치료 단백질을 포함하는 제약학적 조성물**

[0222] 본 발명은 본 발명에 따른 SG-11 단백질, 이의 변이체 또는 단편 또는 이의 제약학적으로 허용가능한 염 및 제약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 입, 식도, 소장, 대장, 직장 및/또는 항문을 비롯한 위장관 내강에 투여하기 위하여 제제화된다.

[0223] 일부 구체예들에서, 상기 조성물은 상기 단백질의 출처와 관련된 하나 이상의 다른 물질들, 예를 들면, 생산 숙주 세포로부터의 세포 구성성분들, 또는 상기 단백질의 화학적 합성과 관련된 물질을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 제약학적 조성물은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 제 2 활성 물질을 포함하도록 제제화된다. 더욱이, 상기 조성물은 활성 물질(들)의 또는 조성물 자체의 구조적 및/또는 기능적 활성을 보존하는 성분들을 포함할 수 있다. 이러한 성분들에는 파라벤 (*예컨대*, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산,

티메로살 또는 이의 조합을 포함하는 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 항산화제 및 다양한 항박테리아제 및 항진균제가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0224] 용어 "제약학적" 또는 "제약학적으로 허용가능한"은 동물, 가령, 예를 들어, 인간에 적절하게 투여 될 때 불리하거나, 알레르기성이거나, 또는 다른 무의식적 반응을 일으키지 않거나 바람직하게 생성하지 않는 조성물을 지칭한다. 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990에 예시된 바와 같은 제약학적 조성물 또는 추가 활성 성분의 제조는 본 발명의 내용에 비추어 해당 분야의 숙련된 기술자가 알고 있을 것이다. 더욱이, 동물 (*예컨대*, 인간) 투여를 위해, 제재들은 FDA가 요구하는 생물학적 표준인 무균성, 발열원성, 일반 안전성, 및 순도 표준을 충족시켜야 함이 이해될 것이다.

[0225] 본 발명의 제약학적 조성물은 의도한 투여 경로 및 투여될지 여부에 따라, 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 제형화된다. 바람직한 구체예에서, 상기 조성물은 직장으로 투여 될 수 있지만, 또한 주사에 의해, 주입에 의해, 경구, 경막내, 비강내, 피하, 점막으로, 국소화된 관류 조 표적 세포에 곧바로, 카테터를 통해, 세척을 통해, 또는 해당 분야의 숙련된 기술자에게 알려져 있는 다른 방법 또는 전술한 것들의 임의의 조합에 의해 국소적으로 투여 될 수 있다. 치료적 유효량의 상기 단백질을 포함하는 액체 제제는 관장, 카테터, 벌브 주사기를 사용하여 직장으로 투여 될 수 있다. 좌제는 직장 전달을 위해 제형화된 고형 투약형의 한 예이다. 일반적으로, 좌약의 경우, 전통적인 담체는 예를 들면, 폴리알킬렌 글리콜, 트라이글리세라이드 또는 이들의 조합을 포함 할 수 있다. 특정 구체예들에서, 좌제는, 예를 들면, 약 0.5% 내지 약 10%, 또는 약 1% 내지 약 2 % 범위의 활성 성분을 함유하는 혼합물로부터 형성 될 수 있다. 주사가능한 액체 조성물은 전형적으로 주사가능한 멸균 식염수 또는 포스페이트-완충 식염수 또는 해당 분야에 공지된 다른 주사가능한 담체를 기초로 한다. 다른 액체 조성물은 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 가령, 경구 투여용 고형 조성물은 정제, 환제, 캡슐 (*예컨대*, 경질 또는 연질 외피 젤라틴 캡슐), 협측 조성물, 트로키제, 엘릭시르제, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 또는 이들의 조합의 형태 일 수 있다. 이러한 액체 및 고체 조성물의 활성 물질, 즉, 본 명세서에 기재된 단백질은 전형적으로 약 0.05 중량% 내지 10 중량%인 구성성분이고, 잔부는 주사가능한 담체 등이다.

[0226] 제약학적 조성물은 연장된 시기에 걸쳐, 예컨대, 30-60 분에 걸쳐, 또는 1-10 시간, 2-8 시간, 8-24 시간 등에 걸쳐 본 발명의 치료 단백질을 포함하는 활성 물질(들)의 방출을 제공하는 제어형 또는 지속형 방출 조성물로서 제형화 될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 조성물은 숙주 신체의 특정 부위로 방출되도록 제형화된다. 예를 들면, 상기 조성물은 산성 환경, 가령, 위에서 상기 활성 물질(들)의 방출을 저해하고, 소장, 결장 또는 직장의 보다 중성 또는 염기성 환경에서만 방출할 수 있게 하는 장용 코팅을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 조성물은 입, 소장 또는 대장에서 지연된 방출을 제공하도록 제형화 될 수 있다.

[0227] 상기 제제들 각각은 의도한 투여 경로에 따라 최소한 하나의 제약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체, 예컨대, 직장 투여를 위해 고체 또는 정맥내 또는 비경구 투여 또는 삽입관을 통한 투여를 위해 액체를 내포할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "제약학적으로 허용가능한 담체"는 해당 기술 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 바와 같은, 임의의 그리고 모든 용매들, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예컨대, 항균제, 항진균제), 등장화제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 착향제, 염료, 등과 같은 물질 및 이의 조합물을 포함한다 (예를 들면, 본 명세서에 참고로 포함되는 *Remington's Pharmaceutical* Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329 참고).

[0228] 투여를 위한 제약학적 조성물은 정확한 투약을 용이하게 하는 단위 투약형으로 제공될 수 있다. 전형적인 단위 투약형은 사전충전된, 사전측정된 액체 조성물의 앰플 또는 주사기 또는 고체 조성물의 경우 좌제, 환제, 정제, 캡슐 등을 포함한다. 이러한 조성물들에 관한 일부 구체예들에서, 활성 물질, 즉, 본 명세서에 기재된 단백질은 일 구성성분 일 수 있고 (약 0.1 내지 50 중량/중량%, 1 내지 40 중량/중량%, 0.1 내지 1 중량/중량%, 또는 1 내지 10 중량/중량%) 잔부는 다양한 비히클 또는 담체 그리고 원하는 투약형을 형성함에 도움을 줄 수 있는 가공 보조제일 수 있다.

[0229] 환자에게 투여되는 본 발명의 단위 투약형의 실제 투여량은 신체적 및 생리학적 요인, 가령, 체중, 병태의 중증도, 치료되는 질환의 유형, 이전 또는 동시 치료적 개입, 환자의 특발증 및 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 투여를 담당하는 진료의는 임의의 경우에 조성물 중 활성 성분(들)의 농도 및 개개 대상체에 대한 적절한 용량(들)을 결정할 것이다.

[0230] **단백질 발현 시스템 및 단백질 생산**

[0231] 본 발명은 본 발명의 단리된 단백질을 제조하기위한 조성물 및 방법, 뿐만 아니라 이러한 단백질을 인코드하는

폴리뉴클레오티드 서열을 내포하는 발현 벡터 그리고 이러한 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포를 제공한다.

[0232] 본 발명의 단백질은 통상적인 재조합 방법들, 예컨대, SG-11 치료 단백질, 이의 변이체 또는 단편을 인코드하는 핵산을 내포하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포들을 배양함으로써 제조될 수 있다. 이러한 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포들 또한 제공된다. 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포 일 수 있으며, 숙주 세포의 예는 *대장균*, 효모 또는 포유 동물 세포를 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 단백질을 생산하는 방법이 추가로 제공되며, 원하는 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계 및 세포 배양물로부터 원하는 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 이어서, 회수된 단백질은 시험관내 및 생체내 방법에 사용하기 위하여 뿐만 아니라 제약학적으로 허용가능한 조성물로 제제화하기 위하여 단리 및/또는 정제 될 수 있다. 일부 구체예들에서, 단백질은 대장균과 같은 원핵 세포에서 발현되고 단백질의 단리 및 정제는 인간 또는 다른 동물에서의 치료적 사용에 허용가능한 수준으로 내독소를 감소시키는 단계를 포함한다.

[0233] **발현 벡터**

[0234] 본 명세서는 본 발명의 단백질 또는 이의 변이체 및/또는 단편을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술들을 사용하여 얻을 수 있다. 원하는 인코딩 폴리뉴클레오티드 서열은 공급원 박테리아의 게놈 DNA, 즉, *R. 호미니스*로부터 증폭 될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성장치를 사용하여 합성될 수 있다. 일단 수득되면, 폴리펩티드를 인코드하는 서열들은 숙주 세포에서 이종 (외인성) 폴리뉴클레오티드를 복제하고 발현 할 수 있는 재조합 벡터에 삽입된다. 해당 분야에서 이용가능하고 공지된 많은 벡터들이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환될 특정 숙주 세포에 의존 할 것이다. 각 벡터는 이의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 그것이 존재하는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 함유한다. 벡터 성분들은 일반적으로 복제 원점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0235] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종들로부터 유래된 레플리콘 및 대조 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 이들 숙주와 관련하여 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포들에서 표현형 선택을 제공 할 수 있는 마킹 서열을 보유한다. 예를 들면, *대장균*은 전형적으로 *대장균* 종들로부터 유래된 플라스미드인 pBR322, pUC, pET 또는 pGEX 벡터를 사용하여 형질전환된다. 이러한 벡터는 암피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 인코드하는 유전자를 함유하므로 형질전환된 세포들을 식별하기에 쉬운 수단을 제공한다. 이들 벡터 및 이들의 유도체 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지는 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 함유하도록 변형 될 수 있다.

[0236] 본 발명의 발현 벡터는 상류 (5')에 위치하고 단백질-인코딩 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 번역되지 않는 조절 서열인 프로모터를 포함하므로, 상기 프로모터는 해당 코딩 서열의 전사를 조절할 수 있다. 원핵생물 프로모터들은 통상적으로 유도성 및 항시성의 2가지 분류에 속한다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예컨대, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그 제어하에 인코딩 폴리뉴클레오티드의 전사 수준 증가를 개시하는 프로모터이다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터들이 공지되어 있고 해당 분야의 숙련된 기술자는 원하는 발현 수준에 따라 프로모터를 선택할 수 있다. 원핵 생물 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터에는 *대장균* 프로모터, 가령, *lac, trp, tac, trc* 및 *ara, 대장균*에 의해 인식되는 바이러스 프로모터, 가령, 람다 및 T5 프로모터, 및 T7 박테리오파지로부터 유래된 T7 및 T7*lac* 프로모터가 포함된다. 예컨대, T7 프로모터를 포함하는 벡터를 보유하는 숙주 세포는 T7 중합효소를 발현하도록 조작된다. 이러한 숙주 세포들은 *대장균* BL21(DE3), Lemo21(DE3), 및 NiCo21(DE3) 세포들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 프로모터는 화학적 또는 환경적 요인들의 제어하에 있는 유도성 프로모터이다.

[0237] 추가의 유용한 플라스미드 벡터에는 pIN 벡터 (Inouye 외, 1985); 및 추후 정제 및 분리 또는 절단을 위한 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 가용성 융합 단백질을 생성하는데 사용하기 위한 pGEX 벡터가 포함된다. 다른 적합한 융합 단백질은 â-갈락토시다제, 유비퀴틴 등을 가지는 것들이다.

[0238] 원핵 생물 및 진핵 생물 숙주 세포 모두에서의 발현에 적합한 벡터는 해당 분야에 공지되어 있으며 일부는 본 명세서에 추가로 기재되어 있다.

[0239] 본 발명의 벡터는 번역된 재조합 단백질이 숙주 세포에 의해 인식되고 가공 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단) 될 수 있게 하는 신호 서열을 추가로 포함 할 수 있다. 이종 폴리펩티드에 고유한 신호 서열을 인식 및 처리하

지 않는 원핵 생물 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp 또는 열-안정성 장 독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PeIB, OmpA 및 MBP로 구성된 그룹으로부터 선택된 원핵 생물 신호 서열로 치환된다. 진핵 생물 발현 시스템에 사용하기 위한 잘 알려진 신호 서열은 인터루킨-2, CD5, 면역글로불린 카파 경쇄, 트립시노겐, 혈청 알부민 및 프로락틴을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0240] 본 명세서에 기재된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편은 융합 단백질 또는 폴리펩티드로서 발현 될 수 있다. 통상적으로 사용되는 융합 파트너들에는 인간 혈청 알부민 및 결정성 단편, 또는 IgG, Fc의 불변 도메인이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 히스티딘 태그 또는 FLAG 태그는 또한 발현 배지 또는 재조합 세포 용해물로부터 재조합 단백질의 정제를 간단하게 하는데 사용될 수 있다. 융합 파트너들은 관심 단백질의 N- 및/또는 C-말단에 융합될 수 있다.

[0241] **숙주 세포**

[0242] 본 명세서의 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 원핵 생물, 효모 또는 고등 진핵 생물 세포를 포함한다. 다수의 세포주 및 배양물을 숙주 세포로 사용할 수 있으며, 예를 들면, 살아있는 배양물 및 유전 물질의 보관소 역할을 하는 기관인 미국 균주 은행 (ATCC)을 통해 얻을 수 있다. 벡터 복제 및/또는 발현에 이용가능한 세포 유형들에는, 박테리아, 가령, *대장균* (*예컨대*, *대장균* 균주 RR1, *대장균* LE392, *대장균* B, *대장균* X 1776 (ATCC No. 31537) 뿐만 아니라 *대장균* W3110 (F-, 람다-, 원영양주, ATCC No. 273325), DH5α, JM109, 및 KC8, 바실루스, 가령, *바실루스 서브틸리스* (*Bacillus subtilis*); 및 다른 장내박테리아, 가령, *살모넬라 티피뮤리움* (*Salmonella typhimurium*), *세라티아 마르세센스* (*Serratia marcescens*), 다양한 *슈도모나스* (*Pseudomonas*) 종들, 뿐만 아니라 수많은 상업적으로 구입가능한 박테리아 숙주들, 가령, SURE® Competent Cells 및 SOLOPACK쩨 Gold Cells (STRATAGENE®, La Jolla)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예들에서, 박테리아 세포, 가령, *대장균*은 숙주 세포로 특히 고려된다.

[0243] 벡터의 복제 및/또는 발현을 위한 진핵 생물 숙주 세포들의 예들에는, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, 및 PC12가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 추가적인 진핵생물 숙주 세포들은 효모 (예컨대, *피키아 파스토리스* (*Pichia pastoris*) 및 *사카로마이세스 세레비시아에* (*Saccharomyces cerevisiae*)) 및 곤충들로부터 유래한 세포들 (예컨대, *스포돕테라 프루기페르다* (*Spodoptera frugiperda*) 또는 *트리코플루시아 니* (*Trichoplusia ni*))를 포함한다. 다양한 세포 유형들 및 기관들로부터 얻은 많은 숙주 세포들을 이용가능하며 이는 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 공지되어 있다. 유사하게, 바이러스 벡터는 진핵생물 또는 원핵생물 숙주 세포, 특히 벡터의 복제 또는 발현에 허용되는 세포와 함께 사용될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 해당 분야의 숙련된 기술자들의 능력 범위에 속한다.

[0244] 재조합 DNA, 즉, 발현 벡터를 DNA가 복제 가능하도록 하는 숙주 세포 내로 염색체 외 요소 또는 염색체 통합체로서 도입하여 관심 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포를 생성시키는 방법이 잘 알려져 있다. 예를 들면, $CaPO_4$ 및 전기천공에 의한 형질주입 방법들이 숙련된 기술자들에게 공지되어 있다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 이러한 세포들에 적절한 표준 기술을 사용하여 형질전환이 실시된다. 상기 Sambrook 외의 문헌에 기재된 바와 같은 칼슘 클로라이드를 사용한 칼슘 처리, 또는 전기천공은 일반적으로 진핵생물 또는 실질적인 세포벽 장벽을 내포하는 다른 세포들을 위해 사용된다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환에 관한 일반적인 양상들은 미국 특허 제 4,399,216에 기재되어 있다. 효모로의 형질전환은 전형적으로 Van Solingen 외, J. Bact, 130:946 (1977) 및 Hsiao 외, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)의 방법에 따라 실시된다. DNA를 세포 내부로 도입하는 다른 방법들에는 핵 미세주입, 전기천공, 무손상 세포들과의 박테리아 원형질체 융합, 또는 다가양이온, 예컨대, 폴리브렌, 폴리오르니틴을 사용한 도입이 포함된다. 형질전환 포유동물 세포들을 형질전환시키기 위한 다양한 기술들에 관하여, Keown 외, Methods in Enzymology. 185:527-537 (1990) 및 Mansour 외, Nature, 336:348-352 (1988)를 참고하라.

[0245] 따라서, 본 발명은 상기 기재한 바와 같은 그리고 관심 SG-11 치료 단백질 서열 (예컨대, 본 명세서에 기재된 서열 번호:1, 서열 번호:3, 서열 번호:5, 서열 번호:7, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 또는 서열 번호:19 또는 이의 변이체 및/또는 단편)을 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 또는 발현 벡터를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 서열 번호:2, 서열 번호:4, 서열 번호:6, 서열 번호:8, 서열 번호:10, 서열 번호:12, 서열 번호:14, 서열 번호:16, 서열 번호:18, 또는 서열 번호:20 중 어느 하나 또는 이의 변이체 또는 단편이 될 수 있다. 더욱이, 본 발명은 상기 벡터를 보유하는 숙주 세포를 개시한다. 상기 숙주 세포는 상기 상세히 기재한 바와 같은 진핵생물 또는 원핵생물 세포일 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 원핵생물 세포이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 숙주 세

포는 *대장균*이다.

[0246] 일부 구체예들에서, 관심 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드는 코돈-최적화된다. 발현 숙주의 코돈 사용 편향에 기초하여 주어진 아미노산에 대해 적절한 코돈을 선택하기 위해 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 서열에 코돈 최적화 알고리즘이 적용된다. 많은 코돈 최적화 알고리즘들은 기타 요인들, 가령, mRNA 구조, 숙주 GC 함량, 리보솜 진입 부위 또한 고려한다. 코돈 최적화 알고리즘 및 유전자 합성 서비스 제공업체들의 일부 예들은 다음과 같다: AUTM: www.atum.bio/services/genegps; GenScript: www.genscript.com/codon-opt.html; ThermoFisher: www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html; and Integrated DNA Technologies: www.idtdna.com/CodonOpt. 이후 뉴클레오티드 서열이 합성되고 적절한 발현 벡터 내로 클론된다. 본 발명에서, 본 발명의 코돈-최적화된 서열들은 서열 번호:8, 서열 번호:12, 서열 번호:14, 서열 번호:16, 서열 번호:18 및 서열 번호:20을 포함한다.

[0247] **단백질의 생성 방법**

[0248] 본 발명에 기재된 상기 단백질의 제조 방법들이 제공되지만 이들은 숙련된 기술자들에게 잘 공지되어 있다. 단백질 생성을 위해 본 명세서에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포들은 프로모터를 유도, 형질전환체를 선택 및/또는 유지, 및/또는 원하는 단백질 서열들을 인코드하는 유전자들을 발현하기에 적절하게 변형된 종래의 영양 배지에서 배양된다. 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 과도한 실험없이 숙련된 기술자에 의해 선택 될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양의 원리, 프로토콜, 및 이의 생산성을 최대화하기 위한 실제 기술들은 Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) 및 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 외, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)에서 찾을 수 있다.

[0249] 일반적으로, "정제된"은 비-단백질성 성분들 및 다양한 다른 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 제거하기 위하여 분별을 거친, 그리고, 예를 들면, 하기 본 명세서에 기재된 바와 같은 단백질 분석에 의해 평가될 수 있는 바와 같이, 또는 원하는 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드에 관하여 해당 분야의 숙련된 기술자에게 공지되어 있는 바와 같이, 해당 조성물이 그 활성을 실질적으로 보유하는 특정 단백질 조성물을 지칭할 것이다.

[0250] 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우, 이는 특정 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드가 조성물의 주요 성분을 형성하는, 가령, 조성물 내 단백질의 약 50% 이상을 구성하는 조성물을 지칭할 것이다. 바람직한 구체예에서, 실질적으로 정제된 단백질은 조성물 내 단백질의 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상을 구성할 것이다.

[0251] 본 발명에 적용되는 "균질하게 정제된" 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질은, 해당 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이, 해당 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질에 다른 단백질 및 생물학적 성분들이 실질적으로 없는 순도 수준을 가짐을 의미한다. 예를 들면, 정제된 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질은 종종 다른 단백질 성분들이 충분히 없어, 분해적 시퀀싱이 성공적으로 수행 될 수 있을 것이다.

[0252] 특정 구체예들에서 사용하기에 바람직하다 하더라도, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드가 항상 가장 정제된 상태로 제공되어야 한다는 일반적인 요구 사항은 없다. 실제로, 덜 실질적으로 정제된, 그럼에도 불구하고 자연 상태에 비해 원하는 단백질 조성물이 풍부해진 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드가 특정 구체 예에서 유용 할 것으로 생각된다.

[0253] 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 정제도를 정량화하는 다양한 방법은 본 명세서의 내용에 비추어 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 알려져 있을 것이다. 이들은, 예를 들면, 분획의 특이적 단백질 활성을 결정하거나 분획 내의 폴리펩티드 수를 겔 전기영동에 의해 평가하는 것을 포함한다.

[0254] 또 다른 예는 특이적 결합 파트너를 사용한 특정 융합 단백질의 정제이다. 이러한 정제 방법들은 해당 분야에서 통상적이다. 본 발명은 특정 단백질에 대한 DNA 서열을 제공하므로, 임의의 융합 단백질 정제 방법이 이제 실시될 수 있다. 이는 특정 단백질-글루타티온 S-전달효소 융합 단백질의 생성, *대장균*에서의 발현, 및 글루타티온-아가로스에서 친화성 크로마토그래피를 사용하여 균질해지도록 분리 또는 단백질의 N- 또는 C-말단에서 폴리-히스티딘 태그의 생성, 및 Ni-친화성 크로마토그래피를 사용한 후속 정제에 의해 예시된다. 그러나, 많은 DNA 및 단백질이 공지되어 있음을, 또는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 확인 및 증폭 될 수 있음을 고려하면, 임의의 정제 방법을 사용할 수 있다.

[0255] 다른 구체예들에서, 펩티드가 풍부한 제재가 정제된 제재 대신 사용될 수 있다. 본 명세서에서, 정제가 사용될 때는 언제나 농축 또한 사용될 수 있다. 제재는 정제 방법 뿐만 아니라 야생형과 비교할 때 박테리아에 의한 펩

티드의 과발현 또는 과잉 생산에 의해 농축 될 수 있다. 이는 재조합 방법들을 사용함으로써, 또는 야생형 세포로부터 펩티드의 발현을 유도할 조건들을 선택함으로써 달성 될 수 있다.

[0256] 재조합적으로 발현된 본 발명의 폴리펩티드는 배양 배지로부터 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 적합한 정제 절차들에는, 예를 들면, 이온-교환 (음이온 또는 양이온) 컬럼상에서의 분별; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 DEAE와 같은 양이온 교환 수지에서의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 암모늄 설페이트 침전; 예를 들어, 세파덱스 G-75를 사용한 겔 여과 또는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC); 및 본 발명의 폴리펩티드의 에피토프-태그된 형태에 결합하기 위한 금속 킬레이트화 컬럼에 의한 것이 포함된다. 다양한 단백질 정제 방법이 사용될 수 있으며, 이러한 방법은 해당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)에 기재되어 있다. 선택된 정제 단계(들)는, 예를 들면, 사용되는 생산 공정의 성질 및 생산되는 특정 폴리펩티드에 따라 달라질 것이다.

[0257] 해당 분야에 널리 공지된 대안적인 방법들을 사용하여 본 발명의 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드 또는 이의 일부를 인코드하는 서열은, 고체-상 기술을 사용하는 직접 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다 (예컨대, Stewart 외, 1969, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif.; Merrifield. J. 1963, Am. Chem. Soc., 85:2149-2154를 참고하라). 시험관내 단백질 합성은 수동 기술 또는 자동화에 의해 수행 될 수 있다. 자동 합성은, 예를 들어, 제조업체의 지침을 사용하여 Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, Calif.)를 사용하여 달성 될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 다양한 부분 또는 이의 일부는 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 별도로 화학적으로 합성되고 조합되어 전장 폴리펩티드 또는 이의 일부를 생성 할 수 있다.

[0258] 일부 구체예들에서, 본 발명은 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 본 명세서에 기재된 임의의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자들 및 이러한 키메라 분자들을 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 키메라 분자들의 예들에는 면역글로불린의 Fc 영역인 에피토프 태그 서열에 융합된 본 명세서에 기재된 임의의 폴리펩티드가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0259] **재조합 박테리아 전달 시스템**

[0260] 본 발명은 정제 된 단백질을 포함하는 전통적인 제약학적 제제 외부의 전달 시스템을 이용하는 것을 고려한다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 재조합 박테리아 전달 시스템, 파지-매개 전달 시스템, 키토산-DNA 복합체 또는 AAV 전달 시스템을 이용한다.

[0261] 하나의 특정 재조합 박테리아 전달 시스템은 *락토코쿠스 락티스 (Lactococcus lactis)*에 기초한다. 본질적으로, 치료 단백질을 인코드하는 유전자 (*예컨대*, 서열 번호:3)를 발현 벡터로 클로닝 한 후, 벡터를 *L. 락티스* 내부로 형질전환 시킬 수 있다. 이어서, *L. 락티스*를 환자에게 투여 할 수 있다. *예컨대,* Bratt, *외*, "A phase 1 trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease," Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2006, Vol. 4, pgs. 754-759 ("We treated Crohn's disease patients with genetically modified *Lactococcus lactis* (*LL-Thy12*) in which the thymidylate synthase gene was replaced with a synthetic sequence encoding mature human interleukin-10."); Shigemori, *외*, "Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice," Microbial Cell Factories, 2015, Vol. 14:189 ("Mucosal delivery of therapeutic proteins using genetically modified strains of lactic acid bacteria (gmLAB) is being investigated as a new therapeutic strategy."); Steidler, *외*, "Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10," Science, 2000, Vol. 289, pgs. 1352-1355 ("The cytokine interleukin-10 (IL-10) has shown promise in clinical trials for treatment of inßammatory bowel disease (IBD))를 참조하라. 두 마리 마우스 모델을 사용하여, 우리는 IL-10의 치료 용량이 사이토카인을 분비하도록 유전자 조작된 박테리아의 국소 전달에 의해 감소 될 수 있음을 보여준다. IL-10-분비 *락토코쿠스 락티스*의 위내 투여는 덱스트란 설페이트 소듐으로 처리된 마우스에서 대장염의 50% 감소를 유발하였고 IL-102/2 마우스에서 대장염의 발병을 예방하였다. 이러한 접근방식은 인간에서 IBD의 비용 효율적인 그리고 장기간의 관리를 위한 보다 우수한 방법을 가져올 수 있다; Hanniffy, *외*, "Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection," Journal of Infectious Diseases, 2007, Vol. 195, pgs. 185-193 ("Here, we evaluated *Lactococcus lactis* intracellularly producing the pneumococcal surface protein A (PspA) as a mucosal vaccine in conferring protection against pneumococcal disease."); 및

Vandenbroucke, *외*, "Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice," Gastroenterology, 2004, Vol. 127, pgs. 502-513 ("We have positively evaluated a new therapeutic approach for acute and chronic colitis that involves in situ secretion of murine TFF by orally administered *L. lactis*. This novel approach may lead to effective management of acute and chronic colitis and epithelial damage in humans.").

[0262] 또 다른 구체예에서, "합성 박테리아"는 SG-11 단백질 또는 이의 변이체 또는 단편을 전달하기 위해 사용될 수 있으며, 이 때 프로바이오틱 박테리아는 SG-11 치료 단백질을 발현하도록 조작된다 (예컨대, Durrer and Allen, 2017, PLoS One, 12:e0176286 참고).

[0263] 파지는 특정 DNA 페이로드를 전달하거나 숙주 특이성을 변경하기 위해 유전자 조작되었다. 파지, 플라스미드 및 트랜스포존과 같은 전달 방법은, 조작된 DNA 서열을 공정들, 가령, 형질도입, 형질전환 및 접합을 통해, 미생물 군집으로 전달 및 순환시키는데 사용될 수 있다. 본 발명의 목적으로서, 본 발명의 단백질을 인코드하는 핵산을 파지에 통합시키고 이러한 파지를 이용하여 핵산을 숙주 미생물에 전달함에 의해, 차후 파지가 핵산을 숙주 미생물의 게놈에 전달한 후 상기 단백질을 생성하게 되므로, 조작된 파지는 본 발명의 단백질에 대한 하나의 가능한 전달 시스템 일 수 있음을 이해하는 것으로 충분하다.

[0264] 전술한 조작된 파지 접근방식과 유사하게, 트랜스포존 전달 시스템을 이용하여 치료 단백질을 인코드하는 핵산을 환자의 마이크로바이옴에 상주하는 숙주 미생물에 도입 할 수 있다. Sheth, *외*, "Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering," Trends in Genetics, 2016, Vol. 32, Issue 4, pgs. 189-200을 참조하라.

[0265] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0266] **실시예**

[0267] 하기 실험은 상기 개시된 단백질 및 방법들의 치료 능력을 입증하기 위해 IBD의 *생체내* 모델과 조합하여 *시험관내* 실험의 강력한 혼합물을 이용한다.

[0268] **실시예 1**

[0269] **SG-11 및 이의 변이체의 발현**

[0270] 하기 실시예에 기재된 실험들을 위해, *로세부리아 호미니스* (A2-183; DSM 16839 형 균주; 예컨대, Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., Flint, H. J. (2006). Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. Vol. 56, pgs. 2437-2441. 참고)로부터 얻은 게놈 DNA을 PCR 증폭하여 SG-11 (서열 번호:3)을 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 이어서, 인코딩 폴리뉴클레오티드를 유도성 발현 벡터 내로 서브클로닝하고 해당 분야에서 통상적인 배양 및 정제 방법을 사용하여 하기 상세히 기재된 바와 같이 SG-11 또는 이의 변이체의 발현 및 정제를 위해 *대장균* BL21 (DE3) 세포를 형질전환 시키는데 사용하였다.

[0271] SG-11 (서열 번호:3 포함)의 발현.

[0272] 본 발명에 관한 다양한 실험들에서 사용하기 위한 SG-11의 아미노산 서열 (서열 번호:5)을 포함하는 단백질의 발현 및 정제가 하기에 기재되어 있으며 이는 유전자들 또는 유전자 단편들의 유도성, 고 수준 세포내 발현을 위해 설계된 pGEX 벡터 시스템을 사용하여 이루어졌다. *대장균*에서의 발현은 아미노 말단에서 GST 모이어티 및 카르 복실 말단에서 관심 단백질을 가지는 태그된 단백질을 산출한다. 벡터는 화학적으로 유도가능한, 고-수준 발현을 위한 tac 프로모터 및 임의의 *대장균* 숙주에서 사용하기 위한 내부 $laq1^q$ 유전자를 가진다.

[0273] SG-11 (*R. 호미니스* DSM 16839로부터 얻은 서열 번호:3)을 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA)의 다수의 클로닝 부위 (*Bam*HI 및 *Not*I 부위)에 삽입되어, SG-11을 GST 융합 단백질로서 발현시켰으며, 이후 이 단백질은 선절단 프로테아제 부위에서 절단되어, 하기 표 4에 제시된 서열 번호:5 (서열 번호:6에 의해 인코드됨)의 아미노산 서열을 가지는 SG-11을 생성하였다. 이 단백질은 2가지 다른 방법들에 의해 발현 및 정제되었다. 첫번째로, BL21(DE3) 형질전환체들을 LB 및 100 μg/ml 카르베니실린 및 1 μg/ml 클로람페니콜에서 30℃에서 성장시켰다. 0.6 OD_{600}의 배양 밀도가 도달되었을 때, 0.4 mM IPTG로 4 h 동안 발현을 유도하였다. 세포를 원심 분리에 의해 수확한 다음 초음파 처리

에 의해 용해시키고, 가용성 용해물을 GST-수지 컬럼에 처리하였다. 결합 단백질을 PBS로 세척한 후, 정제된 태그-없는 SG-11C를 선절단 프로테아제를 첨가하여 용리하여 GST-태그에 대한 단백질 C-말단을 절단하였다.

[0274] 동일한 pGEX 발현 구조체를 사용하는 대안적인 발현 및 정제 방법은 37℃에서 50 μg/ml 카르베니실린으로 LB에서 형질전환된 BL21(DE3) 세포를 성장시킴으로써 수행되었다. 배양물이 0.7 OD_{600}의 밀도에 도달하였을 때, 이들을 16℃로 냉각시키고 16℃에서 15h 동안 1 mM IPTG로 발현을 유도하였다. 세포를 초음파 처리에 의해 수확 및 용해시키고, 가용성 용해물을 GSTrap 컬럼에 처리하였다. 결합 단백질을 HEPES 완충액으로 세척한 후, 정제된 태그-없는 SG-11 (서열 번호:5)을 HRV3C 프로테아제를 첨가하여 용리하여 GST-태그에 대한 단백질 C-말단을 절단하였다. SDS-PAGE 및 Coomasie Brilliant Blue 염색법으로 결정된 단백질을 함유하는 용리된 분획들을 확인하고 모은 다음, HiTrap Q HP 음이온 교환 컬럼에, 이어서 Superdex 75 (26/60) 분취용 크기 배제 컬럼 (SEC)에 처리하여 최종 제재를 수득하였다.

표 4

아미노산 서열	인코딩 핵산 서열
서열 번호:5	서열 번호:6
GPLGSLEGEESVVYVGKKGVIASLD	GGGCCCCTGGGATCCCTGGAGGGAGAGGAAAGTGTCGTGTACGTGG
VETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDY	GAAAGAAAGGCGTGATAGCGTCGCTGGATGTGGAGACGCTCGATCA
TAEHGKNAVKVESLKVEDGVAKLK	GTCCTACTACGATGAGACGGAACTGAAGTCCTATGTGGATGCAGAGG
MKYKTPEDYTAFNGIELYQGKVVAS	TGGAAGATTACACCGCGGAGCATGGTAAAAATGCAGTCAAGGTGGA
LAAGYVVYDGEFARVEEGKVVGAAT	GAGCCTTAAGGTGGAAGACGGTGTGGCGAAGCTTAAGATGAAGTAC
KQDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDG	AAGACACCGGAGGATTATACCGCATTTAATGGAATTGAACTCTATCA
EICYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYY	GGGGAAAGTCGTTGCTTCCCTGGCGGCAGGATACGTCTACGACGGG
LETGSVTASVDVTGQESVGTEQLSG	GAGTTCGCCCGCGTGGAGGAAGGCAAGGTTGTGGGAGCTGCCACAA
TEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAA	AACAGGATATTTACTCTGAGGATGATTTGAAAGTTGCCATCATCCGTG
GDGSFETDVYTFIVYKAAAS	CCAATACGGATGTGAAGGTGGACGGTGAGATCTGCTATGTCTCCTGT
	CAGAATGTGAAGCTGACCGGAAAAGACAGTGTGTCGATCCGTGACG
	GATATTATCTTGAGACGGGAAGCGTGACGGCATCCGTGGATGTGACC
	GGACAGGAGAGCGTCGGGACCGAGCAGCTTTCGGGAACCGAACAGA
	TGGAGATGACCGGGGAGCCGGTGAATGCGGATGATACCGAGCAGAC
	AGAGGCGGCGGCCGGTGACGGTTCGTTCGAGACAGACGTATATACTT
	TCATTGTCTACAAAGCGGCCGCATCG

[0275]

[0276] 신호 펩티드가 없는 성숙 SG-11 단백질의 발현 및 정제는 pD451-SR 벡터 시스템 (AUTM, Newark, CA)을 사용하여 수행하였다. 이 발현 벡터는 IPTG-유도성 T7 프로모터를 이용한다. SG-11 (서열 번호:3)을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 (서열 번호:4)는 AUTM (Newark, CA)에서 코돈-최적화되어, 서열 번호:8로 본 명세서에 제시된 코돈-최적화된 코딩 서열을 생성한다. 이러한 코돈-최적화된 코딩 서열을 pD451-SR 벡터 내에 삽입하여 생성된 구조체는 서열 번호:7로 본 명세서에 제시된 233-아미노산 SG-11 단백질의 발현을 제공한다.

[0277] 구조체로 형질전환된 BL21(DE3) 세포들을 자동-유도 배지, MagicMedia (ThermoFisher)에서 성장시켰다. 배양물을 25É에서 8 시간 동안, 이어서 16℃에서 최대 72 h 동안 진탕하면서 배양하였다. 세포들을 원심분리로 펠릿화시키고, 50 mM NaCl, 2mg/ml 라이소자임 및 프로테아제 억제제을 함유하는 pH 8.0 100 mM Tris-HCl에 재현탁시킨 다음, Triton X-100을 상기 현탁액에 추가하였다. 이어서 세포들을 초음파처리하고 표준 컬럼 크로마토그래

피 기술로 단백질을 정제하기 위하여 원심분리하여 맑은 용해물을 준비하였다.

[0278] SG-11 (서열 번호:7)을 2개의 음이온 교환 컬럼, HiTrap Q HP, 이어서 Mono Q로 정제하였다. SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색법으로 결정된 부분적으로 정제된 단백질을 함유하는 분획들을 Mono Q로 추가 정제하였다. Mono Q에 관한 정제 프로토콜은 HiTrap Q과 동일하였다. SG-11을 함유하는 분획들을 모으고 완충액 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 및 10% 글리세롤)에서 투석하였다. 순도 및 균일성은 SDS-PAGE 및 분석 SEC, Superdex 200 Increase 3.2/300으로 분석하였고, 제재는 약 92.7% 순도를 가지는 것으로 평가되었다.

[0279] pD451-SR 벡터 시스템 또한 SG-11 변이체 SG-11V5 (서열 번호:19)를 발현 및 정제하기 위해 사용되었다. 상기 발현 구조체를 생성하기 위하여, SG-11의 코돈-최적화된 서열 (서열 번호:8)을 변형시켜 SG-11V5 (서열 번호:19)를 인코드하는 서열 번호:20의 폴리뉴클레오티드를 생성하였다. SG-11V5 인코딩 서열을 pD451-SR 벡터 내에 클론하였다.

[0280] 상기 구조체로 형질전환된 BL21(DE3) 세포들을 성장시키고 맑은 용해물을 제조하기 위해 SG-11 (서열 번호:7)의 발현에 대해 상기 기재한 바와 같이 가공하였다.

[0281] SG-11V5 단백질은 맑은 용해물로부터 HiTrap Q 정제에 의해, 이어서 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), HiTrap 뷰틸 HP에 의해 정제되었다. SG-11V5를 함유하고 SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색법에 의해 측정된 분획을 완충액 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 및 10% 글리세롤)에 모으고 투석하였다. 상기 제재에 관하여 기재된 모든 컬럼 크로마토그래피는 ÄKTA 단백질 정제 시스템 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)을 사용하여 수행되었다.

[0282] SDS-PAGE 및 Coomassie Brilliant Blue 염색법 이후 정제된 단백질을 소 혈청 알부민을 기준으로 사용하여 밀도측정하여 정량하였다. 내독소 수준은 제조업체의 지침에 따라 Endosafe® nexgen-MCSTM (Charles River, MA, Wilmington, MA)로 측정되었다. 본 명세서에 기재된 분석을 위해 사용된 단백질의 내독소 수준은 1 EU/mg 보다 낮았다.

[0283] SG-11의 N-말단에 FLAG-태그 (DYKDDDDK; 서열 번호:32)를 가지는, SG-11 (서열 번호:3)을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 서열 (서열 번호:4)을 보유하고 발현시키기 위해 pET-28 벡터 (Sigma Millipore)를 사용하는 발현 구조체를 생성하였다. 전장 FLAG-태그된 SG-11 단백질 서열은 본 명세서에서 서열 번호:9로 제시된다 (그리고 서열 번호:10에 의해 인코드됨). 이러한 구조체를 사용한 단백질 발현은 T7 프로모터의 제어하에 있으며, 아이소프로필 β-D-1-싸이오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 사용하여 유도될 수 있다. N-말단의 FLAG-태그는 PCR 및 DYKDDDDK를 인코드하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 상기 구조체에 통합된다. 형질전환된 숙주 세포들을 2xYT 배지에서 37℃에서 하룻밤 동안 성장시켰다. 이어서 하룻밤 배양물을 새로운 2xYT 배지에 접종하고 37℃에서 4 시간 동안 배양하였다. 이후 4-시간 배양물을 MagicMedia™ *대장균* 발현 배지 (ThermoFisher)에 접종하였다 (1% 접종). 세포들을 25℃에서 8 h 동안, 이어서 16℃에서 최대 72 h 동안 성장시킨 후 원심분리로 수확하였다. 단백질이 가용성 형태로 발현되어, 맑은 용해물로 회수될 수 있었다. 발현된 단백질을 HiTrapQ 음이온 교환 컬럼, 이어서 Superdex 200 Increase 10/300 GL SEC를 사용하여 정제하였다. 순도 및 균일성은 SDS-PAGE 및 분석 SEC, Superdex 200 Increase 3.2/300으로 분석하였고, 제재는 약 93.3% 순도를 가지는 것으로 평가되었다.

[0284] 안정성 분석을 위한 SG-11 단백질의 제조

[0285] SG-11 (서열 번호:7) 및 이의 변이체, SG-11V5 (서열 번호:19)를 2개의 음이온 교환 컬럼, HiTrap Q, 이어서 Mono Q로 정제하였다. SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색법으로 결정된 부분적으로 정제된 단백질을 함유하는 분획들을 Mono Q로 추가 정제하였다. Mono Q에 관한 정제 프로토콜은 HiTrap Q과 동일하였다. SG-11을 함유하는 분획들을 모으고 완충액 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 및 10% 글리세롤)에서 투석하였다.

[0286] SG-11V5에 관하여, HiTrap Q 정제 후, 상기 단백질을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), HiTrap 뷰틸 HP로 추가 정제하였다. SG-11V5를 함유하고 SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색법에 의해 측정된 분획을 완충액 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 및 10% 글리세롤)에 모으고 투석하였다. 상기 제재에 관하여 기재된 모든 컬럼 크로마토그래피는 ÄKTA 단백질 정제 시스템 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)을 사용하여 수행되었다.

[0287] SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색법 이후 정제된 단백질을 소 혈청 알부민을 기준으로 사용하여 밀도측정하여

정량하였다. 내독소 수준은 제조업체의 지침에 따라 Endosafe® nexgen-MCSTM (Charles River, MA, Wilmington, MA)로 측정되었다. 본 명세서에 기재된 분석을 위해 사용된 단백질의 내독소 수준은 1 EU/mg 보다 낮았다.

[0288] **실시예 2**

[0289] **염증 유도된 파열 후 상피 장벽 완전성의 복원에 대한 SG-11의 효과**

[0290] 하기 실험은 위장관 상피 장벽 완전성을 복원시키는 본 명세서에 개시된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체의 치료 능력을 입증한다. 따라서, 이 실험은 위장관 염증성 장애 또는 상피 장벽 완전성/기능 손상과 관련된 질환을 치료하기 위한 치료 단백질의 기능적 유용성을 입증한다.

[0291] 세포를 분리하기 위해 투과성 막을 사용하여 다수 세포 유형들의 공-배양을 수행한 트랜스-웰 플레이트에서 하기 기재된 바와 같이 분석을 수행하였다. 정단 (상단) 챔버에서, 장 세포와 잔세포의 혼합물로 구성된 인간 결장 상피 세포를, 경상피 전기 저항 (TEER)으로 측정하여 평가시 세포가 밀착 연접 형성 및 장벽 기능 용량을 얻을 때까지 배양하였다. 기저측 챔버에서 단핵구를 별도로 배양하였다. 상피 세포를 염증성 사이토카인으로 프라이밍하였다. 상기 분석은 상피 장벽 기능, muc2 유전자 발현, 및 사이토카인의 생성에 대한 치료 단백질, 즉, SG-11의 효과를 측정하였다.

[0292] *세포 배양.* HCT8 인간 장상피세포 세포계 (ATCC 카탈로그 번호 CCL-244)를 10% 소 태아 혈청, 100 IU/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 10 mg/ml 겐타마이신 및 0.25 μg/ml 암포테리신 (cRPMI)으로 보충된 RPMI-1640 배지에서 유지시켰다. HT29-MTX 인간 잔세포 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; 카탈로그 번호 12040401)를 10% 소 태아 혈청, 100 IU/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 10 mg/ml 겐타마이신 및 0.25 μg/ml 암포테리신 (cDMEM)을 보유한 DMEM 배지에 유지시켰다. 상피 세포들을 트립신처리하여 계대하고 액체 질소 스톡으로부터 해동시킨 후 5 내지 15 계대 사이에서 사용하였다. U937 단핵구 (ATCC 카탈로그 번호 700928)를 현탁액 배양물로서 cRPMI 배지에서 유지시키고, $5X10^5$ 내지 $2X10^6$ 개 세포/ml의 세포들을 유지시키기 위해 필요에 따라 희석하여 분할하였다. 액체 질소 스톡으로부터 해동 후 U937 세포를 계대 18까지 사용 하였다.

[0293] *상피 세포 배양.* HCT8 장세포 및 HT29-MTX 잔세포의 혼합물을 상기 기재된 바와 같이 트랜스웰 플레이트의 정단 챔버에 각각 9:1 비율로 도말하였다 (Berget 외, 2017, Int J Mol Sci, 18:1573; Beduneau 외, 2014, Eur J Pharm Biopharm, 87:290-298). 총 10^5 개 세포들을 각 웰에 도말하였다 (웰 당 9 X 10^4 개 HCT8 세포 및 1 X 10^4 개 HT29-MTX 세포). 배양물 플라스크로부터 상피 세포들을 트립신처리하고 트립판 블루 계수하여 생존 세포를 결정하였다. 정확한 부피의 각 세포 유형을 하나의 시험관에 조합하여 원심분리하였다. 세포 펠릿을 cRPMI에 재현탁시키고 트랜스웰 플레이트의 정단 챔버에 추가하였다. 세포들을 8 내지 10일 동안 37℃ + 5% CO_2에서 배양하고, 배지를 2일마다 바꾸어주었다.

[0294] *단핵구 배양.* 상피 세포 배양 6일차에 $2X10^5$개의 세포/웰의 U937 단핵구를 96웰 수용체 플레이트에 도말하였다. 세포들을 37℃ + 5% CO_2에서 배양하고 배지를 4일 동안 24시간 마다 바꾸어주었다.

[0295] *공-배양 분석.* 배양 8-10일 후 장세포를 함유하는 트랜스웰 플레이트를 37℃ + 5% CO_2에서 24시간 동안 트랜스웰 플레이트의 기저측 챔버에 추가되는 10 ng/ml IFN-γ로 처리하였다. 24시간 후 새로운 cRPMI를 상피 세포 배양 플레이트에 추가하였다. IFN-γ 처리 후 경상피 전기 저항 (TEER) 판독값들을 측정하여 전처리 TEER 값들로 사용하였다. 이어서 SG-11을 1 mg/ml (40 nM)의 최종 농도로 트랜스웰 플레이트의 정단 챔버에 추가하였다. 50 nM의 미오신 경쇄 키나제 (MLCK) 억제제 펩티드 18 (BioTechne, Minneapolis, MN)을 염증 유도된 장벽 파열을 저해하기 위한 양성 대조로서 사용하였다 (Zolotarevskky 외, 202, Gastroenterology, 123:163-172). 100 nM의 박테리아적으로 유도된 분자 스타우로스포린을 세포자멸을 유도하여 장벽 파열을 악화시키기 위한 음성 대조로 사용하였다(Antonsson and Persson, 2009, Anticancer Res, 29:2893-2898). 화합물들을 1 시간 또는 6 시간 동안 장세포 상에서 배양하였다. 테스트 화합물과 함께 사전-배양 후, 장세포를 함유하는 트랜스웰 삽입물을 U937 단핵구를 함유하는 수용체 플레이트의 상단에 옮겼다. 이어서 열 사멸된 *대장균* (HK *대장균*) (40분 동안 80℃까지 가열된 박테리아)을 정단 및 기저측 챔버 모두에 10의 감염 다중도 (MOI)로 추가하였다. 트랜스웰 플레이트들을 37℃ + 5% CO_2에서 24 시간 동안 배양하고 후 처리 TEER 측정을 실시하였다. 성숙 SG-11 단백질 (서열 번호:5 또는 서열 번호:9)을 사용하여 TEER 분석을 수행하였다.

[0296] *데이터 분석.* 옴 단위 (Ω)의 원 전기 저항 값들을 트랜스웰 삽입물의 표면적 (0.143 cm^2)에 기초하여 평방 센티미터 (Ωcm^2) 당 옴으로 변환하였다. 배양 10일에 걸쳐 발생하는 차등 저항에 대해 조정하기 위해, 개개 웰의 치료 후 Ωcm^2 판독값들을 치료 전 Ωcm^2 판독값에 대해 정규화하였다. 이어서 정규화된 Ωcm^2 값들을 비처리된 샘플들의 평균 Ωcm^2 값으로부터의 퍼센트 변화로 표현하였다.

[0297] 열 사멸된 *대장균* (HK *대장균*)에 상피 세포 및 단핵구 모두를 노출시키기 전 1 시간 (**도 1A**) 또는 6 시간 (**도 1B**)에 SG-11 단백질을 추가하여, 단핵구가 염증 매개체를 생성하도록 유도하였으며, 이러한 염증 매개체는 TEER의 감소로 나타내어지는 상피 단일층의 파열을 가져온다. 미오신 경쇄 키나제 (MLCK) 억제제를 대조 화합물로 이용하였으며, 이는 항박테리아 면역 반응에 의해 촉발되는 역 장벽 손실 및/또는 장벽 파열을 저해하는 것으로 밝혀졌다. 스타우로스포린을 상피 세포 세포자멸 및/또는 사멸을 유발하였던 대조 화합물로 사용하여, TEER가 급격히 감소되었으며, 이는 상피 세포 장벽 완전성/기능의 파열 및/또는 손실을 나타낸다. **도 1A**에서, SG-11은 HK *대장균* 에 의한 파열을 55.8%에서 62%로 증가시켰다. **도 1B**에서, SG-11은 HK 대장균에 의한 파열을 53.5%에서 60.6%로 증가시켰다. **도 1A-1B**의 그래프는 2번의 개별 실험들로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 6).

[0298] **실시예 3**

[0299] **열 사멸된 *대장균*에 의해 유도된 TNF-α 및 IL-23 생성에 대한 SG-11의 효과**

[0300] 하기 실험은 사이토카인 생성으로 측정되는, 면역 활성화를 감소시키는 본 명세서에 개시된 SG-11 단백질 또는 이의 변이체의 치료 능력을 입증한다. 그리하여 이 실험은 위장관 염증 질환, 또는 손상된 상피 장벽 완전성/기능과 관련된 질환을 치료하기 위한 치료 단백질의 잠재적인 기능적 유용성을 입증하며, 여기서 사이토카인 수준의 조절은 숙주의 질환 상태에 영향을 미칠 것이다.

[0301] 단핵구에 의한 전-염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-23의 생성은 실시예 2에서 수행된 공-배양 TEER 분석의 기저측 챔버로부터 얻은 조직 배양물 상청액에서 측정되었다. TEER 판독 후, 상청액들을 4℃에서 5분 동안 10,000 g으로 원심분리하여 세포 파편들을 제거하였다. 제조업체의 지침에 따라 Luminex 분석을 수행하였다 (Magpix instrument and xPonent 소프트웨어 버전 4.2; Luminex Corporation (Austin, TX)). 단핵구에 의해 생성된 TNF-α 및 IL-23의 pg/ml 농도를 결정하기 위해 Luminex 분석을 수행하였다. Luminex 분석은 하나의 샘플로부터 다수의 사이토카인을 정량하기 위해 비드-기반 시스템을 이용한다. ELISA와 유사하게, Luminex 비드들은 포획 항체로 코팅되고, 표적이 포획 항체에 결합할 수 있도록 샘플과 함께 배양된다. 결합된 표적의 정량화를 위해 비드를 세척하고 형광 표지된 검출 항체와 함께 배양한다. 유세포 분석을 사용하여 구분되는 형광 염료 (differential fluorescent dyes)로 부하된 비드 집단들을 구분하고, 검출 항체 신호를 측정함으로써 사이토카인 수준을 정량화한다.

[0302] 비처리 세포 및 HK *대장균* 처리 전 SG-11과 함께 6 시간 동안 사전-배양된 세포들에서의 TNF-α 및 IL-23 생성을 HK *대장균* 에 의해 유도되는 pg/ml 농도에 대해 정규화하고 이를 1.0으로 설정하였다. SG-11과의 사전-배양은 TNF-α 및 IL-23 생성 모두를 감소시켰다. 결과가 **도 2A** (TNF-α) 및 **도 2B** (IL-23)에 도시되어 있다. **도 2A** 및 **도 2B**의 그래프는 2번의 개별 실험들로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 6).

[0303] **실시예 4**

[0304] **열 사멸된 *대장균*에 의해 유도된 IL-10 생성에 대한 SG-11의 효과**

[0305] 하기 실험은 IL-10 생성에 대한 SG-11 투여의 효과를 TEER 분석으로 측정한다.

[0306] 단핵구를 함유하는 실시예 2에 기재된 공-배양 TEER 분석의 기저측 챔버로부터 얻은 조직 배양물 상청액에서 IL-10 생성을 측정하였다. 단핵구에 의해 생성된 IL-10의 pg/ml 농도를 결정하기 위해 Luminex 분석을 수행하였다. 비처리 세포 및 HK *대장균* 처리 전 SG-11과 함께 6 시간 동안 사전-배양된 세포들에서의 IL-10 생성을 HK *대장균* 에 의해 유도되는 pg/ml 농도에 대해 정규화하고 이를 1.0으로 설정하였다. SG-11와의 사전-배양은 IL-10 생성을 0.89로 감소시켰다. 결과가 **도 3**에 도시되어 있다. **도 3**의 그래프는 2번의 개별 실험들로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 6).

[0307] **실시예 5**

[0308] **열 사멸된 *대장균*으로 자극 후 뮤신 발현에 대한 SG-11의 효과**

[0309] 하기 실험은 위장관 조직에서 뮤신 발현을 증가시키는 것으로 본 명세서에 개시된 SG-11 단백질 또는 이의 변이

체의 효과를 측정한다. 따라서, 이 실험은 위장관 염증성 질환 또는 상피 장벽 완전성/기능 손상과 관련된 질환을 치료하기 위한 치료 단백질 SG-11의 기능적 유용성을 입증하며, 이 때 뮤신 발현 증가는 유익할 것이다.

[0310] 실시예 2에 기재된 공-배양 TEER 분석의 정단 챔버로부터 얻은 상피 세포 단일층에서 유전자 발현이 측정되었다. 전체 RNA를 상피 세포 단일층으로부터 단리하고, cDNA를 합성 하였다. 24시간 동안 HK *대장균*을 추가하기 전 6시간 동안 SG-11 (1 mg/ml; 40 nM)로 처리된 HCT8 & HT29-MTX 세포들로부터 생성된 cDNA에 대해 RT-PCR을 수행하였다. muc2 유전자 발현을 평균 배수 변화 ± SEM으로서 그래프화하였다. HK *대장균*과 비교한 일원 ANOVA로 통계 분석을 수행하였고, 다중 비교를 위해 Fishers LSD 테스트를 사용하였다.

[0311] *muc2* 유전자 발현의 분석 결과는 HK *대장균* 단독 처리가 비처리 세포에 비해 13.6-배 증가를 가져옴을 나타냈다 ($p = 0.0007$). HK *대장균*으로 자극되고 SG-11로 처리된 세포는 HK *대장균*보다 추가로 1.4 배 증가하였다 ($p = 0.03$) (**도 4**). **도 4**의 그래프는 1번의 실험으로부터 얻은 데이터를 나타낸다 ($n = 3$). HK *대장균*에 반응하여 muc2 생성의 유의한 증가가 관찰되었다.

[0312] **실시예 6**

[0313] **상피 세포 상처 치유에 대한 SG-11의 효과**

[0314] 하기 실험은 위장관 상피 세포 상처 치유를 증가시키기는 본 명세서에 개시된 단백질의 치료 능력을 입증한다. 따라서, 이 실험은 위장관 염증성 질환 또는 상피 장벽 완전성/기능 손상과 관련된 질환을 치료하기 위한 치료 단백질 SG-11의 기능적 유용성을 입증하며, 이 때 상피 세포 상처 치유 증가는 유익할 것이다.

[0315] 제조업체 (Platypus Technologies, Madison, WI)의 지침에 따라 각 세포의 중심에서의 세포 부착을 저해하는 플러그들을 함유하는 96 웰 Oris 세포 이동 분석을 사용하였다.

[0316] 이동 분석 플레이트를 사용 전 실온으로 가온하고, 세포 추가 전에 플러그를 100% 컨플루언스 웰에서 제거하였다. HCT8 장상피세포 및 HT29-MTX 잔세포 계통을 9:1 비율로 사용하여, 총 $5X10^4$개 전체 세포들이 각 웰에 추가되었다 ($4.5X10^4$ HCT8 세포 및 $0.5X10^4$ HT29-MTX 세포). 세포들을 37℃+ 5% CO_2에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 플러그를 모든 대조 및 샘플 웰들에서 제거하였다. 대조 웰들은 바탕으로서 희석제 비히클로 처리된 세포들을 포함하였으며, 30 ng/ml 표피 성장 인자 (EG)를 양성 대조로, 그리고 100 nM 스타우로스포린을 음성 대조로, 모두 cRPMI에 희석시켜 처리하였다. 샘플 웰들은 cRPMI에 희석하여 1㎍/ml의 농도의 SG-11 단백질 (서열 번호:5 및/또는 서열 번호:9)을 함유하였다. 100% 및 0% 웰들이 cRPMI에서 배양되었다. 처리를 셀들에 추가하고 37℃+ 5% CO_2에서 48 시간 동안 배양하였다. 생존 세포들에 대한 염색에 앞서, 플러그들을 0% 웰들로부터 제거하였다. 처리 배지를 제거하고 세포들을 0.9 mM $CaCl_2$ 및 0.5 mM $MgCl_2$를 함유하는 PBS에서 세척하였다. 녹색 형광 생존력 염료 Calcenin AM을 0.9 mM $CaCl_2$ 및 0.5 mM $MgCl_2$를 함유하는 PBS 중 0.5 ㎍ / ml의 농도로 모든 웰에 첨가하고, 37℃+ 5% CO_2에서 30분 동안 배양하고, 염료를 제거하고 세포를 0.9mM $CaCl_2$ 및 0.5mM $MgCl_2$를 함유하는 PBS로 세척하고 형광을 측정 하였다. 세포 도금 전에 플러그가 제거 된 100% 웰로부터의 상대적 형광 값이 최대 효과로 설정되었고, 염색 직전까지 플러그를 그 자리에 유지시킨 0% 웰이 기준선으로서 사용되었다. 샘플은 100% 내지 0% 의 샘플로 정규화되었고, 값은 퍼센트 성장으로서 표현되었다.

[0317] **도 5**에서 보는 바와 같이, SG-11로 처리시 유의한 성장 증가가 관찰되었다. 대조 화합물은 예상한 바와 같이 상처 치유를 조절하였으며, EGF는 증식을 증가시키고, 스타우로스포린은 세포 증식을 억제하였다. **도 5**의 그래프는 5회 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 ($n = 15$). 상기 데이터는 5회 독립 반복 실험들을 나타내며 이 때 SG-11 서열 번호:5가 1회 실험에서 사용되었고, 서열 번호:9가 4회 실험들에서 사용되었다.

[0318] **실시예 7**

[0319] **SG-11은 염증성 장 질환의 동시 DSS 모델에서 치료 활성을 입증한다**

[0320] 실시예 7 및 8은 *생체내* 모델에서 염증성 장 질환을 치료하는 본 발명에 개시된 단백질의 치료 능력을 입증한다. 그러므로 이 실험은 중요한 기능적 및 가능한 기계적 작용 방식을 설명한 전술한 *시험관내* 모델이 염증성 장 질환의 생체내 모델 시스템으로 번역될 것임을 입증하는 것이다. 구체적으로, 실시예 7 및 8의 마우스는 장 상피 손상을 유도하여 장 장벽 완전성 및 기능을 감소시키는 것으로 알려진 화학물질인 덱스트란 소듐 설페이트 (DSS)로 처리되었다. DSS 마우스는 널리 수용되는 대장염 모델이다. 실시예 7에서, 마우스를 대략 DSS 투여와 동시에 (투여 6시간 전) SG-11 단백질로 처리하였다. 실시예 8에서, 마우스를 SG-11 단백질 처리 전 6일

동안 DSS로 처리하였다.

[0321] 실시예 7에 제시된 그래프는 각각 10마리 마우스를 사용한 3회의 독립 실험들로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n=30). 이들 실험에서 사용된 SG-11 단백질은 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함하며 N-말단 태그가 없는 성숙 단백질 (신호 펩티드 없음)이었다. 2회의 실험들에서, SG-11 단백질은 서열 번호:5로 구성되었으며; 3번째 실험에서, SG-11 단백질은 서열 번호:7로 구성되었다.

[0322] 8주령의 C57BL/6 마우스를 케이지 당 5마리씩 수용하고 7일 동안 음식과 물을 임의로 제공하였다. 7 일 순응 기간 후, 식수에 2.5% DSS를 첨가함과 동시에 치료가 시작되었다. 단백질의 복강내 (i.p.) 주사 후 형광 표지된 소 혈청 알부민을 이용한 예비 추적 연구는 단백질이 i.p. 전달 후 6시간에 결장에 도달하였음을 입증하였다. 이러한 결과에 기초하여, 식수에 2.5% DSS를 추가하기 6시간 전에 마우스에 50 nmoles/kg SG-11 (1.3 mg/kg) 또는 Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)를 i.p 처리하였다. 초기 처리 후 6시간에 식수를 2.5% DSS를 함유하는 물로 바꾸었다. 마우스들을 6일 동안 식수에서의 2.5% 덱스트란 소듐 설페이트 (DSS)로 처리하였다. 하루 2회 (b.i.d.) 아침과 저녁에 (8 및 16 hr 마다) i.p. 주사로 50 nmoles/kg의 SG-11 또는 Gly2-GLP2 처리를 지속하였다. 새로운 2.5% DSS 식수를 2일 마다 준비하였다.

[0323] 6일차에, 마우스들을 4시간 동안 금식시킨 다음, 형광물질 아이소싸이오시아네이트 (FITC)로 표지된 600 mg/kg 4KDa 덱스트란[4KDa-FITC]으로 경구 위관 영양하였다. 4KDa-FITC 위관영양 1시간 후 마우스들을 안락사시키고 1시간 후, 혈액을 수집하고 FITC 신호를 혈청에서 측정하였다. 비히클 처리된 DSS 마우스와 비교하여, 비처리 마우스에서 상피 장벽을 가로지르는 4KDa-FITC 덱스트란 전위의 유의한 증가가 관찰되었다. 또한, 비히클 처리된 DSS 마우스와 비교하여, DSS를 받고 SG-11로 처리한 마우스에서 4KDa-FITC 덱스트란의 유의한 감소가 관찰되었다. SG-11에 대해 관찰된 4KDa-FITC 덱스트란 전위의 크기는 Gly2-GLP2의 양성 대조군과 유사하였다. 결과는 **도 6**에 도시되어 있으며, 평균 ± SEM으로 제시된다. **도 6**의 그래프는 3회의 독립 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 30).

[0324] SG-11은 염증성 장 질환의 동시 DSS 모델에서 장벽 기능의 염증 중심 판독값을 개선한다

[0325] SG-11은 또한 SG-11을 투여 및 투여하지 않은 DSS 동물의 혈액에서 LPS 결합 단백질의 수준에 대한 이의 효과에 대해 평가되었다. 실시예 7에 기재된 DSS 모델에서 테스트된 마우스 혈청에서 염증성 장 질환 대상체에서 임상 질환 활성과 연결되어 왔던 LPS 결합 단백질 (LBP) 또한 ELISA에 의해 측정되었다. DSS에 반응하여 LBP 농도의 유의한 증가가 관찰되었다. 추가적으로, 비히클로 처리된 마우스에 비해 DSS를 제공받은 SG-11 처리된 마우스에서 유의한 LBP 감소가 관찰되었다. 또한, SG-11은 대조 펩티드 Gly2-GLP2와 비교하여 LBP 농도에 더 큰 영향을 미쳤는데, Gly2-GLP2로 처리된 DSS 마우스와 SG-11로 처리된 DSS 마우스 간에 유의한 차이가 관찰되었기 때문이다. 결과는 **도 7**에 도시되어 있으며, 평균 ± SEM으로 제시된다. **도 7**의 그래프는 3회의 독립 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 30).

[0326] SG-11은 염증성 장 질환의 동시 DSS 모델에서 체중 감소를 입증한다.

[0327] 또한 염증성 장 장애을 앓고 있는 동물에서 체중 감소를 개선시키는 본 명세서에 개시된 단백질의 치료 능력을 평가하였다. 체중 감소는 염증성 장 질환의 중요한 그리고 잠재적으로 위험한 부작용이다.

[0328] 본 실시예에 기재된 DSS 모델에 포함된 마우스로부터 매일 체중을 측정 하였다. 0일차에 시작 체중으로부터의 변화 퍼센트를 각각의 마우스에 대해 결정하였다. DSS 처리된 마우스에 대한 SG-11 투여는 비히클 처리된 DSS 마우스와 비교하여 체중을 유의하게 개선시켰다. 6일차에 SG-11로 처리된 마우스의 체중 감소는 Gly2-GLP2에 대해 관찰된 체중 감소와 유사하였다. 결과들은 **도 8**에 도시된다. **도 8**의 그래프는 2회의 독립 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 20).

[0329] SG-11은 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 육안 병리를 유의하게 감소시킨다

[0330] 이 실시예에서 수행된 동시 DSS 모델에 포함된 마우스에서 육안 병리 관찰이 이루어졌다. DSS 처리된 마우스에 대한 SG-11 투여는 비히클 처리된 DSS 마우스와 비교하여 육안 병리를 유의하게 개선시켰다. DSS가 제공된 마우스와 Gly2-GLP2 또는 SG-11이 처리된 마우스 사이에 임상 점수의 차이는 관찰되지 않았다. 사용된 점수 시스템은 다음과 같았다: (0) = 육안 병리 없음, (1) = 대변에서 혈액 줄무늬가 보임, (2) = 완전한 혈변 펠릿, (3) 맹장에서 혈변 물질이 보임, (4) 맹장에서 혈변 물질 및 묽은 변, (5) = 직장 출혈. 결과들은 **도 9**에 도시된다. **도 9**의 그래프는 3회의 독립 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 30). 이들 데이터는 SG-11가 IBD 증상들, 가령, 대변의 혈액을 개선시킴에 치료적으로 유효함을 보여준다.

[0331] 이외에도, DSS 모델 동물들의 근위 및 원위 결장 조직들에 대한 조직병리학 분석이 수행되었다. 근위 (**도 10A**) 및 원위 (**도 10B**) 결장 점수 (0-4 범위), 뿐만 아니라 근위 및 원위 결장 점수의 합을 나타내는 결장에 대한 총점 (**도 10C**) (0-8 척도로 점수화)이 제공된다. LMA = 점막 구조의 소실, Edema = 부종, INF = 염증, TMI = 전층 염증, MH = 점막 과형성, DYS = 이형성증. 그래프는 2회의 독립 실험들로부터 모은 데이터를 나타내고, 평균 ± SEM으로 플롯된다. DSS + 비히클과 비교하여 일원 ANOVA로 통계 분석을 수행한 후 다중 비교를 위해 Fisher's LSD 테스트를 수행하였다.

[0332] SG-11은 DSS 처리에 반응하여 결장 단축 효과를 최소화시킨다

[0333] 하기 실험은 *생체내* 모델에서 염증성 장 질환을 치료하는 본 발명에 개시된 단백질의 치료 능력을, 결장 단축을 저해 또는 최소화하는 능력을 보여줌으로써 입증한다.

[0334] 실시예 7에 기재된 DSS 모델에 포함된 마우스들에서 결장 길이를 측정하였다. DSS 처리된 마우스에 대한 SG-11 투여는 DSS에 의해 유발되는 결장 단축을 저해하였다. Gly2-GLP2에 대해 결장 길이의 유의한 개선이 관찰되었으며 Gly2-GLP2 처리는 SG-11 처리 이상의 유의한 개선을 가져왔다. 결과가 **도 11A**에 도시된다. 추가로, DSS에 노출 된 마우스의 Gly-2-GLP2 또는 SG-11 처리는 결장 중량 대 길이 비율의 유의한 개선을 가져왔다 (**도 11B**). **도 11A** 및 **11B**의 그래프는 3회의 독립 실험으로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 30). 데이터는 평균 ± SEM으로 그래프화되며 3회의 독립 실험으로부터 모은다 (n = 30). 일원 ANOVA, 후속하여 Fisher's LSD 다중 비교 테스트로 통계 분석을 수행하였다.

[0335] **실시예 8**

[0336] SG-11은 염증성 질환의 DSS 모델에서 치료 활성을 나타낸다

[0337] 본 실시예에서, DSS 처리 후 7일 동안 SG-11 단백질이 마우스에 투여될 때 DSS 마우스 모델에서 SG-11의 효과를 연구하기 위한 실험들이 수행되었다. 이는 DSS 처리 바로 전 SG-11 단백질이 마우스에 투여되었던 상기 실시예 7의 처리 요법과 상이하다. 본 실시예는 *생체내* 모델에서 염증성 장 질환을 치료하는 본 발명에 개시된 단백질의 치료 능력을 추가로 입증하므로, 중요한 기능적 및 가능한 기계적 작용 방식을 설명한 전술한 *시험관내* 모델이 염증성 장 질환의 *생체내* 모델 시스템으로 번역될 것임을 입증하는 것이다.

[0338] 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 케이지 당 5마리씩 수용하고 7일 동안 음식과 물을 임의로 제공하였다. 7 일 순응기간 후, 마우스에 일 동안 2.5% DSS를 함유한 식수를 제공하였다. 새로운 2.5% DSS수를 7일의 DSS 투여 동안 2일 마다 준비하였다. 이러한 치료적 DSS 연구를 위해, 동물을 처리하기 위해 사용된 SG-11은 그 N-말단에서 FLAG 태그 (DYKDDDDK; 서열 번호:31)에 융합되었다.

[0339] 7일차에 정상 식수를 복원시키고 50 nmole/kg의 SG-11 (1.3 mg/kg) 또는 Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)의 i.p. 처리를 개시하였다. 치료는 하루 2회 (b.i.d.), 아침과 저녁 투약으로 (8 및 16 시간 마다) 6일 동안 투여되었다.

[0340] 하기 상세히 기재하는 바와 같이, 상기 치료 결과는 체중 및 육안 병리, 결장 조직의 조직병리학, 장벽 파열의 평가, 및 LPS 결합 단백질의 수준을 비롯한 동물 건강에 대하여 분석되었다.

[0341] 아침 치료 동안 매일 체중을 측정하였다. 이후 결장 조직을 수집하고 길이를 센티미터 단위로 측정하고 조직을 계량하였다. 결장으로부터 대변 물질을 플러싱하고 한 쌍의 겸자를 통해 결장 조직을 부드럽게 통과시켜 잔부 PBS를 제거하였다. 이어서 결장 조직을 계량하고 결장 중량 대 길이 비율을 mg/mm 단위로 결정하였다. 중량 측정 후 근위 및 원위 결장 조직을 RNA 및 단백질 분석을 위해 보관시키고 조직병리학을 위하여 잔부 조직들을 10% 중성 완충 포르말린에 고정시켰다. 혈청 4KDa-FITC 전위, 혈청 LBP 농도, 결장 길이, 및 결장 중량 대 길이 비율에 관한 통계 분석은 DSS + 비히클과 비교하여 일원 ANOVA로 수행되었으며, 체중 분석에 관하여는 이원 ANOVA로 수행되었다. 모든 분석에서, Fisher's LSD 테스트가 다중 비교를 위해 사용되었다. 그래프는 2회의 실험들로부터 모은 데이터를 나타내고, 평균 ± SEM으로 플롯된다.

[0342] 이러한 치료 모델은 확립된 DSS 손상의 회복을 측정하였다. 비처리 마우스는 또한 식수로부터 DSS를 제거한 후 회복하기 때문에, 6일의 DSS 처리 후 관찰된 바와 같이 4KDa-FITC 신호의 증가가 없다 (**도 12**). 더욱이, Gly2-GLP2 또는 SG-11 처리 후 LBP의 감소는 관찰되지 않았다 (**도 13**). 그러므로, DSS의 치료 모델에서 장벽 기능 판독값들의 변화는 관찰되지 않았다.

[0343] 장벽 기능 판독값들의 변화가 치료 DSS 모델에서 관찰되지 않았다 하더라도, 임상 파라미터, 가령, 체중 (**도 14**), 결장 길이 (**도 15A**), 및 결장 중량 대 길이 (**도 15B**)에 있어서의 유의한 개선이 관찰되었다. 장벽 판독값과 유사하게, 혈변에 기초한 육안 병리 점수 시스템은 6일의 치료 후 DSS 마우스 조차 회복되었기 때문에 더 이

상 관련이 없었다. 그러나, 결장에 남아있는 눈에 보이는 혈액은 없었으나, 두꺼워진 결장이 여전히 관찰되었다. 육안 병리 관찰로부터, SG-11 처리시 두꺼운 결장들의 빈도 감소가 관찰되었다 (DSS + 비히클에서 88% 그리고 DSS + SG-11에서 25%, $p < 0.0001$, Fisher's Exact 테스트, 데이터 도시되지 않음).

[0344] 상기 기재한 치료 DSS 모델의 근위 및 원위 결장 조직에 대한 조직병리학 분석이 수행되었다. 근위 (**도 16A**) 및 원위 (**도 16B**) 결장 점수 (0-4 범위), 뿐만 아니라 근위 및 원위 결장 점수의 합을 나타내는 결장에 대한 총점 (**도 16C**) (0-8 범위)이 제공된다. LMA = 점막 구조의 소실, Edema = 부종, INF = 염증, TMI = 전층 염증, MH = 점막 과형성, DYS = 이형성증. 그래프는 2회의 독립 실험들로부터 모은 데이터를 나타내고, 평균 ± SEM으로 플롯된다. DSS + 비히클과 비교하여 일원 ANOVA로 통계 분석을 수행한 후 다중 비교를 위해 Fisher's LSD 테스트를 수행하였다.

[0345] SG-11 및 Gly2-GLP2 처리는 점막 구조 소실에 있어서 보통의, 그러나 유의한 점수 감소를 가져왔으며, 염증 및 전층 염증 점수는 변화가 없었다. 실시예 7에 제공된 결과와 유사하게, SG-11 및 Gly2-GLP2에 대하여 유사한 패턴의 조직병리학적 변화가 관찰되었으며, 이는 SG-11이 상피 세포들을 표적할 수 있다는 추가적인 증거를 제공한다.

[0346] **실시예 9**

[0347] **안정한 그리고 치료적 활성 SG-11 변이체의 설계**

[0348] SG-11는 공생 박테리아 *로세부리아 호미니스*로부터 유래한 치료 단백질이다. DSS 모델에서 프로바이오틱으로서 *R. 호미니스*의 투여는 장 장벽 기능 (4KDa-FITC 및 LBP), 체중, 및 임상 점수에 있어서 개선된 효능을 입증하였다 (데이터 도시되지 않음).

[0349] 번역 후 변형 (PTM)은 치료 단백질의 재조합 생성에 영향을 줄 수 있고 치료 단백질 또한 대규모 발현 및 정제 동안, 뿐만 아니라 장기간 보관하는 동안 발생할 수 있는 번역 후 변형 (PTM)에 의해서 영향을 받을 수 있다. 이러한 PTM은 메티오닌의 산화, 아스파라긴의 탈아마이드화 그리고 2개 시스테인들 간의 분자간- 및/또는 분자내 이황화 결합을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. PTM 위험을 감소시키기 위한 노력으로, 단백질 안정성에 영향을 줄 수 있는 잔기들을 대체하여 SG-11의 변형이 이루어졌다. 개선된 단백질 안정성 및 *시험관내* 및 *생체내* 활성의 유지를 설명하는 연구들이 실시예 9-14에 기재되어 있다.

[0350] 1단계로, SG-11 아미노산 서열 (서열 번호:7)을 유사한 원핵생물 단백질에 대해 정렬시켰다. 서치 결과에 기초하여 확인된 잔기들은 치료 단백질(들)의 안정성을 개선시키기 위한 아미노산 치환을 위해 사용될 수 있다.

[0351] 먼저, SG-11에 상동성일 수 있는 다른 원핵생물 단백질을 확인하기 위하여 GenBank 비-중복 단백질 데이터베이스의 Blast 검색 (NCBI BLAST/기본 파라미터/BLOSUM62 행렬)을 수행하였다. 확인된 단백질 서열들이 **도 17**에 도시된다. 서열 번호:21은 *로세부리아 인테스티날리스*의 추정 단백질이고 (GenBank: WP_006857001.1; BLAST E 값: 3e-90); 서열 번호:22는 *로세부리아* sp. 831b의 추정 단백질이고 (GenBank:WP_075679733.1; BLAST E 값: 4e-58); 그리고 서열 번호:23은 *로세부리아 이눌리니보란스*의 추정 단백질이다 (GenBank: WP_055301040.1; BLAST E 값: 1e-83).

[0352] 서열 번호:21, 서열 번호:22 및 서열 번호:23 각각은 표시된 단백질의 예상된 성숙 형태이며 (신호 펩티드가 없음) N-말단 메티오닌을 함유한다. 상기 단백질들 중에서 보존된 영역들을 확인하기 위해 SG-11 (서열 번호:7)과 이러한 서열들의 다수의 서열 정렬들을 수행하였다. 정렬은 **도 17**에 도시되어 있다. 정렬은 특정 아미노산(들)을 치환하는 것의 잠재적 영향을 평가하기 위해 상이한 단백질들 중에서 가장 보존된 잔기를 확인하기 위해 사용되었다. SG-11의 일부는 다소 또는 매우 보존되는데, 여기서 단백질에서 특정 위치의 아미노산은 4개의 정렬된 단백질 모두에서 또는 4개 단백질 중 최소한 2개 (위치) 또는 3개 (위치)에서 동일하다. 이러한 SG-11 동족체 중에서의 높은 서열 보존은 서열 번호:21, 서열 번호:22 및 서열 번호:23이 또한 건강한 상피 장벽을 유지시킴에 중요한 기능을 보유할 수 있음을 제시한다. 그러므로, 본 발명은 본 명세서의 질환을 치료하기 위한 서열 번호 21-23의 이용 방법, 및 이의 제조 방법을 제공한다.

[0353] **실시예 10**

[0354] **SG-11의 번역 후 변형 (PTM) 분석**

[0355] PTMs에 특히 취약한 SG-11의 잔기를 확인하기 위해 LC/MS/MS를 사용하여 연구를 수행하였다. LakePharma사 (Belmont, CA)에 의하여 1) SG11의 아미노산 서열을 확인하고 (서열 번호:9), 그리고 2) 생물학적 활성 및 면역원성을 감소시킬 수 있는 임의의 번역 후 변형, 특히 탈아마이드화 및 산화를 결정하기 위한 분석이

수행되었다.

[0356] For 펩티드 맵핑 및 PTM 분석을 위해, 샘플들을 DTT 및 IAA로 처리하고, 후속하여 트립신 분해시켰다. 이어서 분해된 샘플을 Xevo G2-XS QTOF 질량 분광계와 결합된, Protein BEH C18 컬럼을 사용하는 Waters ACQUITY UPLC로 분석하였다.

[0357] 펩티드 맵핑 및 시퀀싱은 예상 아미노산 서열을 확인시켜주었으며 또한 다수의 탈아마이드화 부위 및 하나의 산화 부위를 나타내었다. 이들 중에서, 7.84%의 N53 및 3.77% N83이 탈아마이드화된다. 표 6에 제시된 이러한 결과는 N53 및 N83이 비-스트레스 조건하에서 주요 탈아마이드화 부위임을 나타낸다. N53은 첫 번째 위치에 메티오닌을 가지는 성숙 SG-11 (서열 번호:7)에서 53번째 위치에 아스파라긴 (Asn; N)이 위치함을 나타낸다.

표 6: SG-11의 번역 후 변형

[0358]

아미노산 [1]	서열 번호	펩티드	변형인자	% 총 이온 [2]	% 펩티드 [3]
N53	30	NAVK	탈아마이드화	0.01	7.84
N83	26	TPEDYTAFNGIELYQGK	탈아마이드화	0.25	3.77
N137	27	ANTDVK	탈아마이드화	0.25	1.03
N153	28	VDGEICYVSCQNVK	탈아마이드화	0.01	0.2
M1	24	MLEGEESVVYVGK	산화	<0.01	N/A

[0359] [1] SG-11 (서열 번호:7) 내 아미노산 위치

[0360] [2] 총 펩티드 이온 강도에 대해 정규화됨

[0361] [3] 변형된 또는 변형되지 않은 상응하는 전구물질의 총 강도에 대해 정규화됨

[0362] **실시예 11**

[0363] **SG-11의 강제 분해**

[0364] 재조합, 정제된 SG-11의 안정성을 추가로 특성화하기 위하여 하기 표 7에 제시한 일련의 스트레스 조건하에서 SG-11 (서열 번호:9)을 또한 테스트하였다. 스트레스 받은 샘플들을 응집체 및/또는 분해물의 존재에 관해 SEC-HPLC로 분석하였다. 탈아마이드화 및 산화 수준을 결정하기 위해 LC/MS/MS를 수행하였다.

표 7

스트레스 요인		분석 방법	기준	관찰
온도 (2 주)	4℃	HPLC	% 단량체 (>90% 통과)	용액 맑음
	25℃	HPLC	% 단량체 (>90% 통과)	용액 맑음
	37℃	HPLC	% 단량체	용액 맑음
	40℃	uPLC LC/MS/MS	% 단량체	용액 맑음
산화	하이드로퍼옥사이드 (0.005%) 40℃, 16 hr	uPLC LC/MS/MS	% 산화 및 부위	용액 맑음
기계적 스트레스	350 rpm 진탕, 4℃, 24 hr	HPLC	% 단량체 (>90% 통과)	용액 맑음
pH	pH 4 및 pH 9	uPLC LC/MS/MS	% 탈아마이드화 부위	용액 맑음
동결 및 해동 (6 회 주기)	-80℃ 내지 실온	HPLC	% 단량체	용액 맑음

[0365]

[0366] 이 분석을 위하여, pH 4 및 pH 9하에서의 테스트를 제외하고 SG-11 (서열 번호:9)은 PBS + 10% 글리세롤 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 8.0)에서의 1 mg/ml 농도로 준비되었다. pH 4에서, SG-11 (서열 번호:9)은 소듐 아세테이트 완충액 (50 mM 소듐 아세테이트, 150 mM NaCl, pH 4)에서의 1 mg/ml 농도로 준비되었다. pH 9에서, SG-11 (서열 번호:9)은 CAPSO (3-사이클로헥실아미노-2-하이드록시-1-프로판설포닉 애시드) 완충액 (50 mM CAPSO, 150 mM NaCl, pH 9)에서의 1 mg/ml 농도로 준비되었다.

[0367] 상기 분석은 4℃ 에서 처리된 SG-11 (서열 번호:9) 샘플이 응집체 수준이 낮음을 보여준다. 온도를 증가시킴에 따라, 응집이 증가하였다. 37℃에서, 다수의 응집이 발생하였다. 대조적으로, 기계적 스트레스 및 반복된 동결과 해동은 단백질 응집 또는 분해를 유발하지 않는다.

[0368] 3개 샘플들을 각각 40℃에서 2주 동안 접종, 산화 (H_2O_2 처리) 또는 높은 pH 9로 처리하고, 실시예 10에 기재된 바와 같이 PTM에 대하여 LC/MS/MS로 분석하였다. 하기 표 8에서 보는 바와 같이, 40℃에서 샘플 처리 후 N83의 유의한 탈아마이드화가 발생하였으며 거의 100% 탈아마이드화되었다. 과산화수소로 처리한 샘플들에서 N83의 유의한 탈아마이드화 (37%) 및 M200의 산화 (63.9%)가 관찰되었다. 7.84%의 N53이 어떠한 처리도 없이 탈아마이드화되었다.

표 8

펩티드	변형 [1]	%			
		40°C	산화	pH 9	처리 없음
MLEGEESVVYVGK (서열 번호:24)	변형 없음	99.82	99.88	99.94	99.78
	M의 산화	0.18	0.12	0.06	0.22
GVIASLDVETLDQSYYDETELK (서열 번호:25)	변형 없음	99.91	99.93	99.95	100
	탈아마이드화 Q30	0.09	0.07	0.05	0
TPEDYTAFNGIELYQGK (서열 번호:26)	변형 없음	0	63	80.9	82.57
	탈아마이드화 N83	99.88	37	19.1	17.43
	탈아마이드화 N83 탈아마이드화 Q89	0.12	0	0	0
ANTDVK (서열 번호:27)	변형 없음	85.39	83.56	76.05	98.96
	탈아마이드화 N137	14.61	16.44	23.95	1.04
VDGEICYVSCQNVK (서열 번호:28)	변형 없음	44.85	63.23	8.76	99.98
	카바마이도메틸화 C147	33.59	34.52	71.71	NA
	카바마이도메틸화 C151	18.45	1.93	12.45	NA
	탈아마이드화 N153 탈아마이드화 Q152	0	0	0.35	0.02
	탈아마이드화 N153	3.1	0.31	0.28	0
	카바마이도메틸화 C151				
GYYLETGSVTASVDVTGQESVGTE QLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQT EAAAGDGSFETDVYTFIVYK (서열 번호:29)	변형 없음	96.38	19.17	88.16	100
	탈아마이드화 N206 탈아마이드화 Q152 산화 M	3.62	0	11.84	0
	산화 M198	0	16.92	0	0
	산화 M200	0	63.9	0	0
NAVK (서열 번호:30)	탈아마이드화 N53	NA	NA	NA	7.84

[0369]

[0370] [1] SG-11 (서열 번호:7) 내 아미노산 위치

[0371] 감소 후, 유리 시스테인들은 분석시 산화로부터 시스테인 잔기를 차단하기 위하여 아이오도아세트아마이드에 의해 인위적으로 카바마이도메틸화되었다.

[0372] 실시예 12

[0373] SG-11의 안정성 및 시스테인 잔기

[0374] 37℃에서 1주 동안 그리고 4℃에서 3주 동안 완충액 C (100 mM 소듐 포스페이트, pH 7.0, 0.5 M 소르비톨)에서 배양 후 SG-11 (서열 번호:9)의 안정성을 평가하였다. 완충액 D (100 mM 소듐 포스페이트, pH 7.0, 10% 글리세롤)로 평형화된 분석 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)로 응집 형성을 모니터함으로써 안정성을 평가하였다. 두 샘플 모두 1.57 mL에서 단일 피크를 나타 내기 때문에 새로 해동 된 단백질과 비교하여 4℃에서 3주 보관 후 현저한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 37℃에서 1 주 배양 후, 샘플은 1.57mL의 단량체 피크와 함께 가장 작은 피크 인 1.29 및 1.41mL에서의 응집 피크를 명확하게 나타내었다. 응집 원인을 다음과 같이 조사하였다. SG-11 내 위치 147 및 151에서 (서열 번호: 7에 대해) 2개의 시스테인 잔기가 발견되었다. Ellman의 시약 분석은 SG-11에서 유리 설프하이드릴기의 존재를 나타내었고 (서열 번호: 9), 이는 Cys^{147} 및/또는 Cys^{151}이 안정한 이황화 결합을 형성하지 않음을 나타냈다. 유리 설프하이드릴기는 바람직하지 않은 분자간 이황화 결합을 형성함으로써 응집을 유발할 수 있기 때문에, β-머캅토에탄올과 같은 환원제의 존재가 응집을 방지 할 수 있는지 여부를 조사하였다. β-머캅토에탄올 없이 형성되었던 응집과 대조적으로, 37℃에서 4 일 배양 후 완충액 (50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 및 10 % 글리세롤) 중 2.5% (v/v) β-머캅토에탄올의 존재하에서 응집은 크게 억제되었다. 상기 결과는 유리 설프하이드릴기를 제공하는 Cys^{147} 및/또는 Cys^{151} 은 응집을 유발하였음을 제시한다.

[0375] 실시예 13

[0376] SG-11 변이체의 번역 후 변형

[0377] SG-11 단백질이 고온에서 안정함에도 불구하고, 37℃에서 1주 이내에 응집을 형성하는 것은 하위 가공 단계들 동안 문제가 될 수 있다. LC/MS/MS에 의해 발견된 아스파라긴 잔기들의 탈아마이드화 또한 위험 요인이다. 서열 번호: 3을 포함하는 단백질 또는 이의 변이체의 제조능력을 개선하기 위해 유해 PTM의 발생을 감소시키기 위한 SG-11 변이체 (예컨대, SG-11V1 (서열 번호:11), SG-11V2 (서열 번호:13), SG-11V3 (서열 번호:15), SG-11V4 (서열 번호:17) 및 SG-11V5 (서열 번호:19))의 설계에서 실시예 10 내지 12의 결과가 고려되었다.

[0378] 실시예 13-16은 SG-11 변이체 SG-11V5 (서열 번호: 19, 서열 번호:7에 대한 N53S, N83S, C147V, C151S를 포함)의 안정성 및 기능에 대한 아미노산 치환의 효과를 특성화하기 위해 수행된 실험을 설명한다. SG-11V5 (실시예 1에 기재된 바와 같이 발현 및 정제됨).

[0379] SG-11 (서열 번호:9)가 스트레스 조건을 받았을 때 관찰되었던 PTM에 따라 (실시예 11), SG-11V5 (서열 번호:19)를 실시예 11에 설명된 방법을 사용하여 번역 후 변형에 대해 LC-MS/MS로 분석하고, SG-11 (서열 번호: 7)에 대한 PTM과 비교하였다.

[0380] 이러한 분석을 위해, 야생형 SG-11 (서열 번호:7) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)의 PTM을 비교하였다. 첫번째 분석에서 (결과는 하기 표 9에 제공됨), 단백질들을 완충액 1 (50 mM $NaPO_4^-$, pH 8, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤)에서 1 mg/ml의 농도로 보관하고 그리고 4℃ 또는 40℃에서 2주 동안 보관하였다. 이후 단백질들을 DTT 및 IAA로 처리하고, 후속하여 트립신 분해시켰다. 이어서 분해된 샘플을 Xevo G2-XS QTOF 질량 분광계와 결합된, Protein BEH C18 컬럼을 사용하는 Waters ACQUITY UPLC로 분석하였다. LC-MS/MS에 의한 단백질 분석은 4℃ 및 40℃ 모두에서 SG11V5 단백질이 출발 메티오닌의 산화 및 N137의 탈아마이드화 백분율을 SG-11에 비해 유의하게 저하시켰음을 보여주었다.

표 9

단백질	PTM 부위	변형	4℃	40℃
SG-11 (서열 번호:7)	MLEGEESVVYVGK (서열 번호:26)	M1 의 산화	8.9%	12.5%
SG-11V5 (서열 번호:19)	MLEGEESVVYVGK (서열 번호:26)	M1 의 산화	2.5%	4.7%
SG-11 (서열 번호:7)	TPEDYTAFNGIELYQGK (서열 번호:26)	N83 의 탈아마이드화	19.4%	98.1%
SG-11V5 (서열 번호:19)	TPEDYTAFSGIELYQGK (서열 번호:28)	N83 의 탈아마이드화	--	--
SG-11 (서열 번호:7)	ANTDVK (서열 번호:24)	N137 의 탈아마이드화	1.0%	0.9%
SG-11V5 (서열 번호:19)	ANTDVK (서열 번호:24)	N137 의 탈아마이드화	0.1%	0.3%

[0381]

[0382] 두 번째 분석에서, SG-11 (서열 번호:7) 및 SG-11V5 (서열 번호:19) 단백질들을 각각 40℃에서 다양한 완충액들에서 보관하였다. 결과가 하기 표 10에 제공된다. 이 실험에서 사용된 보관 완충액은 표 10에 표시된 바와 같이 10% 소르비톨이 있는 (+Sor) 또는 10% 소르비톨이 없는 (-Sor) 그리고 10% 글리세롤이 있는 (+Gly) 또는 10% 글리세롤이 없는 (-Gly) pH7의 100 mM $NaPO_4^-$ 였다. 표 10의 데이터가 입증하는 바와 같이, SG-11 (서열 번호: 7) 단백질과 비교하여 모든 완충액 조건에서 SG-11V5 (서열 번호: 19) 단백질의 첫 번째 위치에서 메티오닌의 산화가 크게 감소했다. 또한 적어도 글리세롤의 존재시 그리고 소르비톨 및 글리세롤 모두가 존재시 두 단백질에 대한 N137 탈아마이드화 수준에 차이가 존재하였으며, 이는 N137 탈아마이드화를 크게 감소시켰다. 이들 데이터는 SG-11 단백질 내 아미노산의 치환은 용액에서 단백질의 PTM에 대해 상당히 유익한 효과를 가질 수 있음을 보여준다.

표 10

단백질	PTM 부위	변형	- Sor - Gly	+ Sor - Gly	- Sor + Gly	+ Sor + Gly
SG-11 (서열 번호:7)	MLEGEESVVYVGK (서열 번호:26)	M1 의 산화	20%	12.1%	38.6%	27.8%
SG-11V5 (서열 번호:19)	MLEGEESVVYVGK (서열 번호:26)	M1 의 산화	2.7%	3.3%	5.6%	5.9%
SG-11 (서열 번호:7)	TPEDYTAFNGIELYQGK (서열 번호:26)	N83 의 탈아마이드화	98.1%	93.9%	96.2%	87.4%
SG-11V5 (서열 번호:19)	TPEDYTAFSGIELYQGK (서열 번호:28)	N83 의 탈아마이드화	--	--	--	--
SG-11 (서열 번호:7)	ANTDVK (서열 번호:24)	N137 의 탈아마이드화	0.9%	2.6%	3.0%	2.5%
SG-11V5 (서열 번호:19)	ANTDVK (서열 번호:24)	N137 의 탈아마이드화	1.5%	3.3%	0.4%	0.1%

[0383]

[0384] 실시예 14

[0385] **SG-11 변이체 제작 및 안정성 분석**

[0386] SG-11 단백질이 고온에서 매우 안정함에도 불구하고, 37℃에서 1주 이내에 응집을 형성하는 것은 하위 가공 단계들 동안 문제가 될 수 있다. LC/MS/MS에 의해 발견된 아스파라긴 잔기들의 탈아마이드화 또한 위험 요인이다. 서열 번호:3 또는 이의 변이체를 포함하는 단백질의 제조능을 개선하기 위하여, SG-11 (서열 번호:7)로 제시된 단백질을 다음과 같은 4가지 치환을 포함하도록 돌연변이시켰다: N53S, N83S, C147V 및 C151S. 이러한 4가지 치환을 가지는 변이체는 SG-11V5로 지칭되고, 본 명세서에서 서열 번호:19로 제공된다. 정제된 SG-11 및 SG-11V5의 안정성을 상이한 보관 완충액 제제들에서 테스트하였다. SG-11V5 (서열 번호:19)는 서열 번호:7과 약 98.3% 서열 동일성을 가진다.

[0387] SG-11의 안정성 분석

[0388] **도 18**은 SG-11 (서열 번호:7) 안정성에 대한 조건들의 효과를 보여준다. 구체적으로, 정제된 SG-11 (서열 번호:7)을 pH 5.2 (**도 18A**, **18B** 및 **18C**), pH 7.0 (**도 18D**, **18E** 및 **18F**) 및 pH 8.0 (**도 18G**, **18H** 및 **18I**)에서 배양하였다. 또한 첨가제의 효과를 다음과 같은 3가지 상이한 pH 조건에서 테스트하였다: 150 mM NaCl (**도 18A**, **18D** 및 **18G**); 150 mM NaCl 및 100 mM 아르기닌 (**도 18B**, **18E** 및 **18H**); 및 150 mM NaCl 및 0.5 M 소르비톨 (**도 18C**, **18F** 및 **18I**). 안정성을 분석 SEC로 분석하였다. 화살표 머리는 단량체 형태의 머무름 시간을 나타낸다.

[0389] SG-11V5의 안정성 분석

[0390] **도 19는** SG-11V5 (서열 번호: 19) 안정성에 대한 조건들의 효과를 보여준다. SG-11V5 (서열 번호:19)를 pH 5.2 (**도 19A**, **19B** 및 **19C**), pH 7.0 (**도 19D**, **19E** 및 **19F**) 및 pH 8.0 (**도 19G**, **19H** 및 **19I**)에서 배양하였다. 또한 첨가제의 효과를 다음과 같은 3가지 상이한 pH 조건에서 테스트하였다: 150 mM NaCl (**도 19A**, **19D** 및 **19G**); 150 mM NaCl 및 100 mM Arg (**도 19B**, **19E** 및 **19H**); 및 150 mM NaCl 및 0.5 M 소르비톨 (**도 19C**, **19F** 및 **19I**). 안정성을 분석 SEC로 분석하였다. 화살표 머리는 단량체 형태의 머무름 시간을 나타낸다.

[0391] pH 7.0에서 100 mM 아르기닌의 존재하에서, 정제된 SG-11 (서열 번호:7) 단백질의 응집체 형성은 크기 억제되었다. 그러나, 일부 작은 피크들이 초기 머무름 시간에서 관찰되었으며, 이는 단량체 형태 이외의 다른 형태들이 존재하였음을 나타내었다. SG-11V5 (서열 번호:19)는 이 실시예에서 테스트한 모든 조건하에서 다량의 응집을 보여주지 않았다. 임의의 첨가제가 없을 때 조차도, 별도의 단량체 피크가 관찰되었다. 1.34 mL에서의 작은 응집 피크는 100 mM 아르기닌 또는 0.5 M 소르비톨에 의해 억제되었다. 정제된 SG-11 (서열 번호:7) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)는 pH 5.2에서 침전되었다.

[0392] 온도 상승은 탈아마이드화로 인한 분해 및 응집에 대한 단백질 감수성을 증가시킬 수 있다. 탈아마이드화 및 응집과 관련하여 있을 수 있는 의존성 (liabilities)을 최소화하기 위해, 돌연변이 N53S, N83S C147V 및 C151S가 SG-11에 도입되었다. 그리하여, SG-11V5는 pH 7.0 및 pH 8.0에서 개선된 안정성을 보여주었다.

[0393] **실시예 15**

[0394] SG-11V5의 시험관내 기능 분석

[0395] SG-11 변이체, 예컨대, SG-11V5가 SG-11 단백질에서 나타난 바와 같은 (예컨대, 실시예 2 참고) 상피 장벽 기능의 유지와 관련된 기능성을 유지함을 입증하기 위하여 시험관내 TEER 분석을 수행하였다.

[0396] 세포 배양을 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간단히 말하면, 배양 8-10일 후 장세포를 함유하는 트랜스웰 플레이트를 37℃ + 5% CO_2에서 24시간 동안 트랜스웰 플레이트의 기저측 챔버에 추가되는 10 ng/ml IFN-γ로 처리하였다. 24시간 후 새로운 cRPMI를 상피 세포 배양 플레이트에 추가하였다. IFN-γ 처리 후 경상피 전기 저항 (TEER) 판독값들을 측정하여 전처리 TEER 값들로 사용하였다. SG-11 (서열 번호:9) 또는 SG-11V5 (서열 번호:19)를 1 mg/ml (40 nM)의 최종 농도로 트랜스웰 플레이트의 정단 챔버에 추가하였다. 50 nM의 미오신 경쇄 키나제 (MLCK) 억제제 펩티드 18 (BioTechne, Minneapolis, MN)을 염증 유도된 장벽 파열을 저해하기 위한 양성 대조로서 사용하였다 (Zolotarevskky 외, 202, Gastroenterology, 123:163-172). 화합물들을 6 시간 동안 장세포 상에서 배양하였다. 테스트 화합물과 함께 사전-배양 후, 장세포를 함유하는 트랜스웰 삽입물을 U937 단핵구를 함유하는 수용체 플레이트의 상단에 옮겼다. 이어서 열 사멸된 *대장균* (HK *대장균*) (40분 동안 80° C까지 가열된 박테리아)을 정단 및 기저측 챔버 모두에 10의 감염 다중도 (MOI)로 추가하였다. 트랜스웰 플레이트들을 37℃ + 5% CO_2에서 24 시간 동안 배양하고 후 처리 TEER 측정을 실시하였다. SG-11 (서열 번호:9)은 HK *대장균* 에 의한 파열을 78.6%로부터 89.5%로 증가시켰으며 ($p < 0.0001$), SG-11V5 (서열 번호:19)는 89.1%로 증가시켰다 ($p < 0.0001$) (**도 20**). HK *대장균*과 비교한 일원 ANOVA, 후속하여 Fisher's LSD 다중 비교 테스트로 통계 분석을 수행하였다. **도 20**의 그래프는 2번의 개별 실험들에서 수행된 4개 플레이트로부터 모은 데이터를 나타낸다 (n = 12).

[0397] **실시예 16**

[0398] **SG-11V5의 생체내 기능 분석**

[0399] 다음으로, SG-11 또는 SG-11V5 (서열 번호:19)를 동시에 테스트하기 위하여 상기 실시예 7 및 8에 기재된 바와 같이 수행된 DSS 동물 모델 실험을 반복하였다. 이들 실험들에서, SG-11 또는 SG-11V5를 DSS 처리시작과 동시에 (실시예 7에 기재) 또는 DSS 투여 전후에 마우스에 투여하였다. 단 하나의 차이점은 실시예 8의 마우스들은 SG-11 또는 SG-11V5 (서열 번호:19) 로 6일이 아닌 4일 동안 처리되었다는 것이다.

[0400] 첫번째 DSS 마우스 모델 (실시예 16A; 실시예 7과 동일한 방법)에서, 마우스들을 0일차에 테스트 화합물을 복강내 (i.p.) 처리하고 6 시간 후 DSS 처리를 시작하였다. SG-11 (서열 번호:9)에 대하여 투여된 용량들은 50 nmoles/kg (1.3 mg/ml), 및 Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)를 포함하였고, SG-11V5 (서열 번호:19)에 대한 용량 반응은 16 nmoles/kg (0.4 mg/ml), 50 nmoles/kg (1.3 mg/ml) 및 158 nmoles/kg (4.0 mg/kg)을 포함하였다. 마우스들을 6일 동안 (0일차 내지 6일차) 식수에서의 2.5% DSS로 처리하였다. 치료 단백질 처리는 DSS 노출 기간 동안 하루 2회 투여되었다.

[0401] 두 번째 실험에서 (실시예 16B; 실시예 8과 동일한 방법), 마우스에게 7일 동안 2.5% DSS를 함유하는 식수를 제공하였다. 7일차에 정상 식수를 복원시키고 50 nmole/kg의 SG-11 (서열 번호:9) (1.3 mg/kg), SG-11V5 (서열 번호:19) (1.3 mg/kg) 또는 Gly2-GLP2 (0.2 mg/kg)의 i.p. 처리를 개시하였다. 치료는 하루 2회 (b.i.d.), 아침과 저녁 투약으로 (8 및 16 시간 마다) 4일 동안 투여되었다. 두 DSS 모델 모두에 대하여 (실시예 16A 및 16B) 새로운 2.5% DSS수를 DSS 투여 동안 2일 마다 준비하였다.

[0402] 각 DSS 실험 종료시에, 마우스들을 4시간 동안 금식시킨 다음, 형광물질 아이소싸이오시아네이트 (FITC)로 표지된 600 mg/kg 4KDa 덱스트란[4KDa-FITC]으로 경구 위관 영양하였다. 4KDa-FITC 위관영양 1시간 후 마우스들을 안락사시키고 1시간 후, 혈액을 수집하고 FITC 신호를 혈청에서 측정하였다. 첫번째 모델에 있어서, 비처리 마우스와 비교하여 비히클 처리 DSS 마우스에서 상피 장벽을 가로지르는 4KDa-FITC 전위의 유의한 증가가 관찰되었다. 결과는 **도 21A**에 도시되어 있다: SG-11 (서열 번호: 9)은 4KDa-FITC 신호를 유의하게 감소시켰다 ($p = 0.04$). SG-11V5 (서열 번호: 19) 또한 4KDa-FITC 신호를 감소시켰으나, 차이는 통계적 유의성에 도달하지 못했다 ($p = 0.21$). **도 21B**에서, 전술한 실시예 8의 결과와 유사하게, 4KDa-FITC의 증가가 관찰되지 않았으므로 SG-11 또는 SG-11V5 처리의 효과는 관찰되지 않았다. 두 그래프의 데이터는 평균 ±SEM으로 표시되며 각 그림은 개별 실험의 데이터를 나타낸다 (그룹당 n = 10).

[0403] 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 장벽 기능의 염증 중심 판독값에 대한 SG-11V5의 효과

[0404] 상기 DSS 모델의 완료시, LBP 수준을 실시예 7에 상세히 기재된 프로토콜에 따라 장벽 기능의 염증 중심 판독값으로서 측정하였다. 두 가지 DSS 모델 모두 (실시예 16A 및 16B) 완료 시 혈액을 채집하여 혈청을 단리하였다. 시판 ELISA 키트 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)를 사용하여 혈청 내 LPS 결합 단백질 (LBP) 수준들을 측정하였다. 결과가 **도 22A** (실시예 16A) 및 **도 22B** (실시예 16B)에 제공된다. 실시예 16A DSS 모델에서 DSS 노출에 반응하여 LBP의 유의한 증가가 관찰되었다. 50 nmoles/kg 용량의 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)에서 유사한 LBP 감소가 관찰되었으나 어느 것도 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나, 보다 높은 용량인 158 nmoles/kg의 SG-11V5 (서열 번호:19) 처리는 LBP 생성을 유의하게 감소시켰다 ($p = 0.003$) (**도 22A**). 실시예 16B DSS 모델에서, DSS에 대한 노출은 LBP 생성을 유의하게 증가시켰다 (**도 22B**). 그러나, 어떠한 처리에 대해서도 LBP 감소가 관찰되지 않았으며 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19) 모두에 대해 유사한 효과가 관찰되었다. 특정 이론에 의해 제한되는 것은 아니지만, 순환하는 LBP의 긴 반감기 (12-24 시간인 것을 보고됨)는 처리 시작 전 LBP 반응이 유도되는 (DSS가 처리됨) 모델에서 전신 LBP 수준의 감소를 관찰하기 어렵게 할 수 있다고 생각된다 (Behrendt, D., J. Dembinski, A. Heep, and P. Bartmann. 2004. Lipopolysaccharide binding protein in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: F551-554).

[0405] 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 체중에 대한 SG-11 및 SG-11V5의 효과

[0406] 실시예 16A 및 실시예 16B 모두에서 실험 모델 전반에 걸쳐 체중을 측정하였다. 실시예 16A DSS 모델에서 (**도 23A**) 50 nmoles/kg의 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19) 처리에 대하여 유사한 경향의 체중이 관찰되었으며, 158 nmoles/kg의 SG-11V5 (서열 번호:19)에 대해 6일차에서 유의한 체중 개선이 관찰되었다. 치료 DSS 모델에서 유사한 패턴이 관찰되었는데, 여기서 50 nmoles/kg 용량의 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)는 체중에 있어서 유사하게 변화하였는데, 두 가지 모두 11일차에서 통계적으로 개선된 체중 변화를 가졌다 ($p < 0.05$). **도 23A** 및 **도 23B**에서, 데이터를 평균 ± SEM으로 그래프화하며, 각 그래프는 개개 실험으로부터 얻은 데이터를 나타낸다. DSS + 비히클 그룹과 비교한 이원 ANOVA 그리고 Fisher's LSD 다중 비교 테스트를 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

[0407] 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 육안 병리에 대한 SG-11 및 SG-11V5의 효과

[0408] 결장 조직에 대한 육안 병리 관찰이, 예를 들면, 상기 실시예 7에 기재된 바와 같이 16A에서 이루어졌다. 간단히 말하면, 눈에 보이는 혈액 및 대변 펠릿 굳기의 수준에 기초한 점수 시스템이 사용되었다. 사용된 점수 시스템은 다음과 같았다: (0) = 육안 병리 없음, (1) = 대변에서 혈액 줄무늬가 보임, (2) = 완전한 혈변 펠릿, (3) 맹장에서 혈변 물질이 보임, (4) 맹장에서 혈변 물질 및 묽은 변, (5) = 직장 출혈. 50 nmoles/kg 용량의 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)에 대해 유사한 결과를 얻었으며 SG-11V5 (서열 번호:19)에 있어서 용량 의존 효과가 관찰되었는데 160 nmoles/kg 용량은 유의한 개선을 가져온다($p < 0.002$). **도 24**에 도시된 데이터는 평균 ± SEM으로 제시되며 개별 실험으로부터 얻응느 데이터를 포함한다. 일원 ANOVA, 후속하여 Fisher's LSD 다중 비교 테스트로 통계 분석을 수행하였다.

[0409] 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 길이에 대한 SG-11 및 SG-11V5의 효과

[0410] 실시예 16의 DSS 모델들을 또한 SG-11 및 SG-11 변이체 단백질의 결장 길이에 대한 효과에 대해 분석하였다. 실시예 16A (**도 25A**) 또는 실시예 16B (**도 25B**) DSS 모델들에 대하여 결장 길이를 측정하였다. 두 가지 DSS 모델 모두에서 SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)에 대해 유사한 결과를 얻었으며 여기서 두 처리 요법 모두 결장 길이를 유의하게 증가시켰다. 그러나, 실시예 16A의 DSS 모델 중 SG-11V5 (서열 번호:19)에서는 결장 길이에 대한 용량-의존 효과가 관찰되지 않았다. 두 그래프 모두에서 데이터는 평균 ± SEM으로 제시되며 개별 실험으로부터 얻은 데이터를 나타낸다. DSS + 비히클과 비교한 일원 ANOVA, 후속하여 Fishers LSD 다중 비교 테스트로 통계 분석을 수행하였다.

[0411] 염증성 장 질환의 DSS 모델에서 결장 중량-대-길이 비율에 대한 SG-11 및 SG-11V5의 효과

[0412] 실시예 16의 DSS 모델들을 또한 SG-11 및 SG-11 변이체 단백질의 결장 중량-대-길이 비율에 대한 효과에 대해 분석하였다. 실시예 16A (**도 26A**) 및 실시예 16B (**도 26B**) DSS 모델 처리 요법들에서 결장 중량 대 길이 비율은 SG-11 (서열 번호:9) 과 SG-11V5 (서열 번호:19) 간에 유사하였다. 실시예 16A 처리에서, 모든 처리 및 용량들은 결장 중량 대 길이 비율을 유의하게 개선시켰다 ($p < 0.05$). 실시예 16B 처리 요법에서, SG-11 (서열 번호:9) 및 SG-11V5 (서열 번호:19)는 모두 결장 중량 대 길이 비율을 유의하게 개선시킨 반면 ($p < 0.01$), 양성 대조 Gly2-GLP2는 그러하지 않았다. DSS + 비히클과 비교한 일원 ANOVA와 Fisher's LSD 다중 비교 테스트를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 그래프화하며, 각 도면은 하나의 실험으로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

[0413] 명확한 이해를 위해 예시 및 예로서 발명을 어느 정도 상세히 설명하였으나, 본 발명의 사상 또는 범위에서 벗어나지 않고 다양한 변하 및 변형들이 이루어질 수 있음이 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 명백할 것이다. 그러므로, 상기 설명은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0414] 표 11은 본 발명의 서열 번호를 상세한 정보와 함께 나타낸다.

표 11

서열 번호	유형	설명	명칭
1	PRT	신호 서열이 있는 전장 단백질	SG-11
2	DNA	서열 번호:1 에 대한 코딩 서열 (cds)	
3	PRT	신호 서열 없고 "출발 메티오닌" 없는 서열 번호:1	SG-11
4	DNA	서열 번호:3 에 대한 cds	
5	PRT	pGEX6 벡터에서 발현되고 선절단 프로테아제에 의해 절단된 서열 번호:3	SG-11
6	DNA	서열 번호:5 에 대한 cds	
7	PRT	"출발 메티오닌"이 있는 서열 번호:3	SG-11
8	DNA	서열 번호:7 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
9	PRT	N-말단 FLAG 태그가 있는 서열 번호:3	SG-11
10	DNA	서열 번호:9 에 대한 cds (코돈 최적화되지 않음)	
11	PRT	서열 번호:7 의 인공 변이체 (C147V, C151S)	SG-11V1
12	DNA	서열 번호:11 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
13	PRT	서열 번호:7 의 인공 변이체 (G84D, C147V, C151S)	SG-11V2

[0415]

14	DNA	서열 번호:13 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
15	PRT	서열 번호:7 의 인공 변이체 (N83S, C147V, C151S)	SG-11V3
16	DNA	서열 번호:15 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
17	PRT	서열 번호:7 (N53S, G84D, C147V, C151S)의 인공 변이체	SG-11V4
18	DNA	서열 번호:17 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
19	PRT	서열 번호:7 (N53S, N83S, C147V, C151S)의 인공 변이체	SG-11V5
20	DNA	서열 번호:19 에 대한 cds (코돈 최적화됨)	
21	PRT	*R. 인테스티날리스* 추정 단백질 (GenBank WP_006857001.1)	
22	PRT	*로세부리아 속 831b* 추정 단백질 (GenBank WP_075679733 .1)	
23	PRT	*R. 이눌리니보란스* 추정 단백질 (GenBank WP_055301040.1)	
24	PRT	표 6 및 8 의 서열 번호:7 의 단편	
25	PRT	표 6 의 SG-11 의 단편	
26	PRT	표 6 의 SG-11 의 단편	

27	PRT	표 6의 SG-11의 단편	
28	PRT	표 6의 SG-11의 단편	
29	PRT	표 8의 SG-11의 단편	
30	PRT	표 6 및 8의 SG-11의 단편	
31	PRT	표 8의 SG-11의 단편	
32	PRT	FLAG 태그	FLAG
33	PRT	위치 53, 83, 84, 147 및 151에 X를 가지는 변이체 단백질	
34	PRT	위치 53, 83, 84, 147 및 151에 X를 가지는 변이체 단백질	

[0416] **본 발명의 구체예**

[0417] 첨부된 청구범위가 존재하나, 본 발명은 다음과 같은 번호의 구체예들을 제시한다:

[0418] **치료 방법**

[0419] 1.다음 단계를 포함하는 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애의 치료 방법:

[0420] a. 필요로 하는 환자에게 다음을 포함하는 제약학적 조성물을 투여하는 단계:

[0421] i. 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및

[0422] ii. 제약학적으로 허용가능한 담체.

[0423] 2.청구항 1에 있어서, 상기 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 위장관 벽 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

[0424] 3.청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 위장관 점막 상피 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

[0425] 4.청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 장 상피 완전성 감소와 관련된 질환인, 방법.

[0426] 5.청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 최소한 하나인, 방법: 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 낭염, 과민성 장 증후군, 장 감염, *클로스트리디움 디피실레* 감염, 대사 질환, 비만, 유형 2 당뇨병, 비-알콜성 지방간염, 비-알콜성 지방간 질환, 간 장애, 알콜성 지방간염, 복강 질환, 괴사 소장대장염, 위장 장애, 단장 증후군, GI 점막염, 화학요법 유도된 점막염, 방사선 유도된 점막염, 구강 점막염, 간질성 방광염, 신경계 장애, 인지 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 자폐증, 화학요법 관련 지방간염 (CASH), 및 전술한 질환들의 소아 버전.

[0427] 6.청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 염증성 장 질환인 방법.

[0428] 7.청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 크론병인 방법.

[0429] 8.청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애는 궤양성 대장염인 방법.

[0430] 9. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0431] 10. 청구항 1-9 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0432] 11. 청구항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0433] 12. 청구항 1-11 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0434] 13. 청구항 1-12 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0435] 14. 청구항 1-13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 방법: 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

[0436] 15. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0437] 16. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0438] 17. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0439] 18. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0440] 19. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0441] 20. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0442] 21. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0443] 22. 청구항 1-21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 직장, 비경구, 정맥내, 국소, 경구, 피부, 경피, 또는 피하 투여를 포함하는, 방법.

[0444] 23. 청구항 1-22 중 어느 한 항에 있어서, 환자의 입, 위장관 내강, 및/또는 장으로 투여되는 방법.

[0445] 24. 청구항 1-23 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애와 관련된 최소한 하나의 증상의 감소를 경험하는, 방법.

[0446] 25. 청구항 1-24 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애와 관련된 최소한 하나의 증상의 감소를 경험하는, 방법: 복부 통증, 대변의 혈액, 대변의 고름, 열, 체중 감소, 빈번한 설사, 피로, 식욕 감소, 후중감, 및 직장 출혈.

[0447] 26. 청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 환자의 위장관 염증을 감소시키는, 방법.

[0448] 27. 청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 환자의 장 점막 염증을 감소시키는, 방법.

[0449] 28. 청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 환자의 장 조직에서 뮤신의 생성을 증가시키는, 방법.

[0450] 29. 청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 환자의 장 상피 상처 치유를 증가시키는, 방법.

[0451] **30.**청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 환자의 장 상피 세포 증식을 증가시키는, 방법.

[0452] **31.**청구항 1-30 중 어느 한 항에 있어서, 최소한 하나의 제 2 치료제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0453] 청구항 1-31 중 어느 한 항에 있어서, 최소한 하나의 제 2 치료제를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 제 2 치료제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택되는 방법: 지사제, 5-아미노살리실릭 애시드 화합물, 항염제, 항생제, 항체, 항-사이토카인제, 항-염증성 사이토카인제, 스테로이드, 코르티코스테로이드, 및 면역억제제.

[0454] **제약학적 조성물**

[0455] **1.**다음을 포함하는, 제약학적 조성물:

[0456] a. 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및

[0457] b. 제약학적으로 허용가능한 담체.

[0458] **2.**청구항 1에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0459] **3.**청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0460] **4.**청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0461] **5.**청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0462] **6.**청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0463] **7.**청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물: 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

[0464] **8.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0465] **9.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0466] **10.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0467] **11.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0468] **12.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0469] **13.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 제약학적 조성물.

[0470] **14.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 제약

학적 조성물.

[0471] 15. 청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 직장, 비경구, 정맥내, 국소, 경구, 피부, 경피, 또는 피하 투여를 위해 제형화된, 제약학적 조성물.

[0472] 16. 청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서, 치료 단백질이 환자의 위장관 내강 및/또는 장에서 활성을 가지도록 제형화된, 제약학적 조성물.

[0473] **발현 벡터**

[0474] 1. 다음을 포함하는 발현 벡터: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드하는 폴리뉴클레오티드.

[0475] 2. 청구항 1에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0476] 3. 청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0477] 4. 청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0478] 5. 청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0479] 6. 청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0480] 7. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

[0481] 8. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0482] 9. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0483] 10. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0484] 11. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0485] 12. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0486] 13. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0487] 14. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0488] 15. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0489] 16.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 발현 벡터.

[0490] **숙주 세포**

[0491] 1.다음을 포함하는 숙주 세포: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 인코드하는 외인성 폴리뉴클레오티드.

[0492] 2.청구항 1에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0493] 3.청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0494] 4.청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0495] 5.청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0496] 6.청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0497] 7.청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

[0498] 8.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0499] 9.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0500] 10.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0501] 11.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0502] 12.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0503] 13.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0504] 14.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0505] 15.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0506] 16.청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인코드되는 단백질은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포.

[0507] 17.청구항 1-16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 특이적 신호 서열을 추가

로 인코드하는, 숙주 세포.

[0508] **18.**청구항 1-17 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 핵산 서열과 최소한 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하는, 숙주 세포: 서열 번호: 4, 서열 번호: 6, 서열 번호: 8, 서열 번호: 10, 서열 번호: 12, 서열 번호: 14, 서열 번호: 16, 서열 번호: 18, 및 서열 번호: 20.

[0509] **19.**청구항 1-18 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포는 원핵생물 세포인, 숙주 세포.

[0510] **20.**청구항 1-19 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포는 *대장균* 세포인, 숙주 세포.

[0511] **21.**청구항 1-18 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포는 진핵생물 세포인, 숙주 세포.

[0512] **22.**청구항 1-18 및 21 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 세포인, 숙주 세포.

[0513] **23.**다음 단계를 포함하는, 단백질 제조 방법: 청구항 1-22 중 어느 한 항의 숙주 세포를, 인코드되는 단백질의 발현에 충분한 조건하에서 배양하는 단계.

[0514] **단리된 단백질**

[0515] **1.**다음을 포함하는, 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0516] **2.**청구항 1에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0517] **3.**청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0518] **4.**청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0519] **5.**청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0520] **6.**청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0521] **7.**청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 서열: 서열 번호: 3, 서열 번호: 5, 서열 번호: 7, 서열 번호: 9, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및 서열 번호: 19.

[0522] **8.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 3의 아미노산 서열.

[0523] **9.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 5의 아미노산 서열.

[0524] **10.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 7의 아미노산 서열.

[0525] **11.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 9의 아미노산 서열.

[0526] **12.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 11의 아미노산 서열.

[0527] **13.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 13의 아미노산 서열.

[0528] **14.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 15의 아미노산 서열.

[0529] **15.**청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 17의 아미노산 서열.

[0530] 16. 청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단리된 치료 단백질: 서열 번호: 19의 아미노산 서열.

[0531] 17. 청구항 1-16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

[0532] 18. 청구항 1-17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 단백질 부재시에 수행된 분석과 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 최소한 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 만큼 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

[0533] 19. 청구항 1-18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 키나제 억제제 대조와 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

[0534] 20. 청구항 1-19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 스타우로스포린 또는 미오신 경쇄 키나제 대조와 비교하여, *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가시키는, 단리된 치료 단백질.

[0535] **합성 치료 단백질**

[0536] 1. 다음을 포함하는, 합성 치료 단백질: 서열 번호: 19와 최소한 약 90% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0537] 2. 청구항 1에 있어서, 다음을 포함하는 단백질: 서열 번호: 19와 최소한 약 95% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0538] 3. 청구항 1-2 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단백질: 서열 번호: 19와 최소한 약 97% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0539] 4. 청구항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단백질: 서열 번호: 19와 최소한 약 98% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0540] 5. 청구항 1-4 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단백질: 서열 번호: 19와 최소한 약 99% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열.

[0541] 6. 청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 단백질: 서열 번호: 19의 아미노산 서열.

[0542] 7. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 147의 아미노산은 발린인, 단백질.

[0543] 8. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0544] 9. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 147의 아미노산은 발린이고, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0545] 10. 청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 위치 84의 아미노산은 아스파르트산인, 단백질.

[0546] 11. 청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 위치 84의 아미노산은 아스파르트산이고, 위치 147의 아미노산은 발린이고, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0547] 12. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 83의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0548] 13. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 83의 아미노산은 세린이고, 위치 147의 아미노산은 발린이고, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0549] 14. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 53의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0550] 15. 청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 위치 53의 아미노산은 세린이고, 위치 84의 아미노산은 아스파르트산이고, 위치 147의 아미노산은 발린이고, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0551] 16. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 53의 아미노산은 세린이고, 위치 83의 아미노산은 세린이고, 위치 147의 아미노산은 발린이고, 위치 151의 아미노산은 세린인, 단백질.

[0552] 17. 청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 위치 147의 아미노산은 시스테인이 아니고, 위치 151의 아미노산은 시스테인이 아니고, 위치 83의 아미노산은 아스파라긴이 아니고, 및/또는 위치 53의 아미노산은 아스파라긴이 아닌, 단백질.

[0553] 18. 청구항 1-17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 *시험관내* 경상피 전기 저항 분석에서 전기 저항을 증가

시키는, 단백질.

[0554] 19. 다음을 포함하는, 제약학적 조성물: 청구항 1-17 중 어느 한 항의 단백질 및 제약학적으로 허용가능한 담체.

[0555] 20. 다음 단계를 포함하는 위장관 상피 세포 장벽 기능 장애의 치료 방법:

[0556] a. 필요로 하는 환자에게 다음을 포함하는 제약학적 조성물을 투여하는 단계:

[0557] i. 서열 번호: 3, 서열 번호: 7, 서열 번호: 11, 서열 번호: 13, 서열 번호: 15, 서열 번호: 17, 및/또는 서열 번호: 19와 최소한 약 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 치료 단백질; 및

[0558] ii. 제약학적으로 허용가능한 담체.

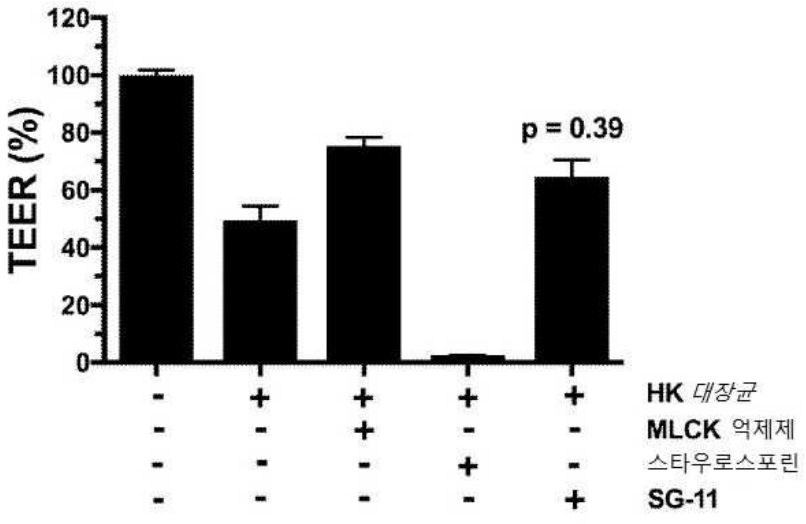
[0559] **참고문헌으로 포함**

[0560] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원의 참고자료로 포함된다.

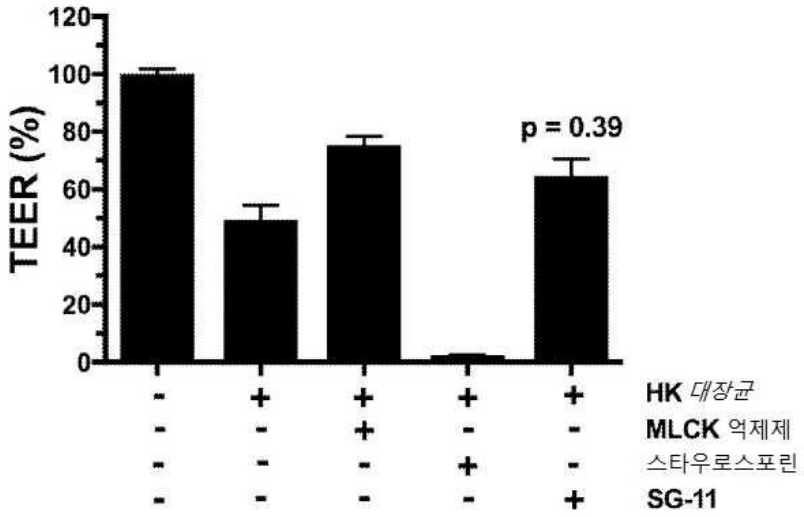
[0561] 그러나, 본 명세서에서 인용된 모든 참고 문헌, 논문, 간행물, 특허, 공개특허 출원 및 특허출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계 어느 나라에서나 일반적인 통상의 지식의 일부를 구성한다는 인정 또는 어떠한 형태의 제안도 아니다.

도면

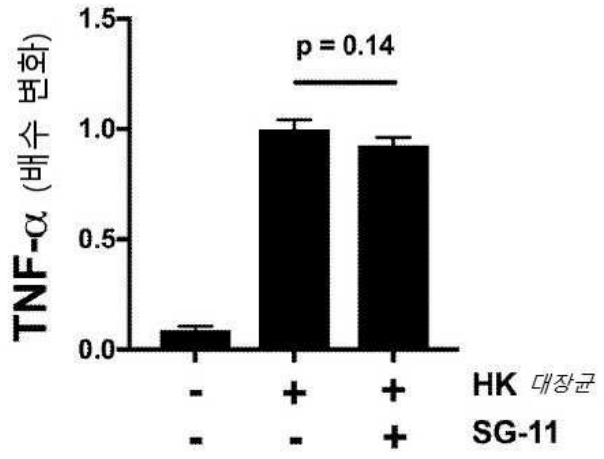
도면1a



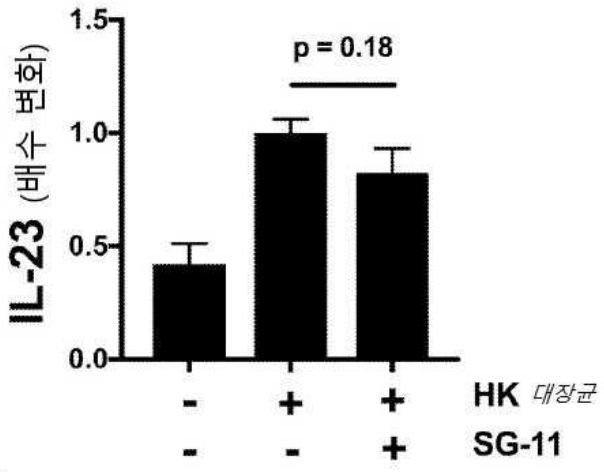
도면1b



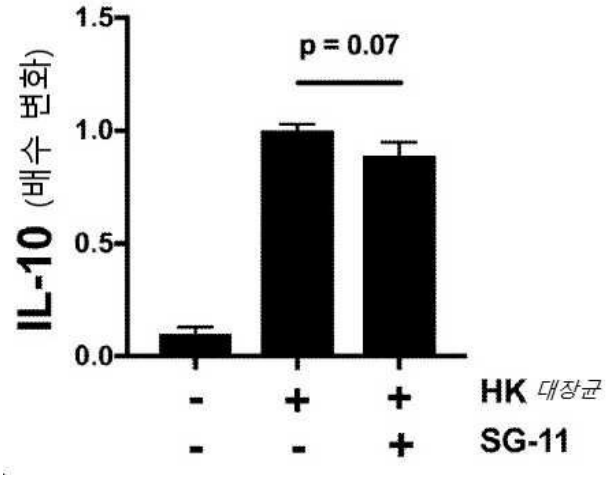
도면2a



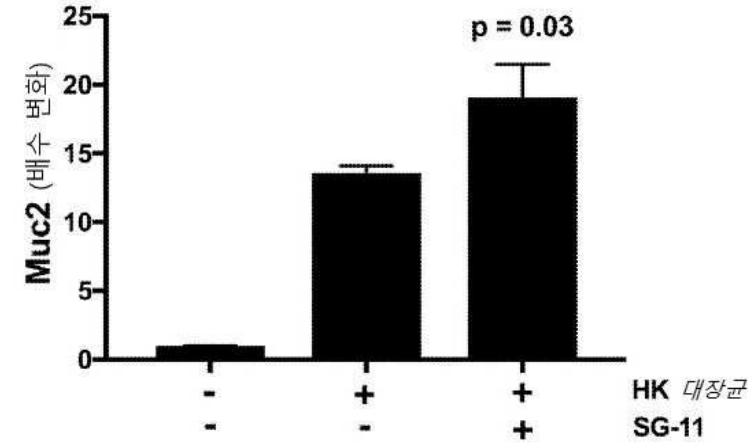
도면2b



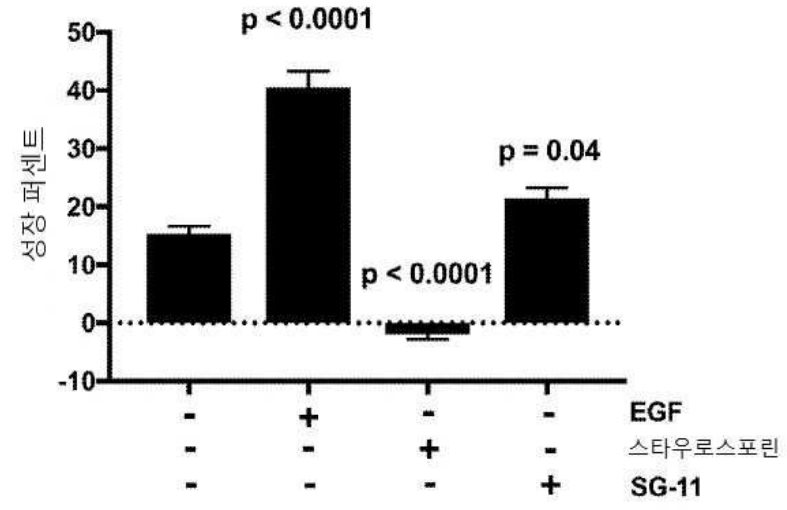
도면3


IL-10 (배수 변화)
1.5
1.0
0.5
0.0
p = 0.07
-
+
+
HK 대장균
-
-
+
SG-11

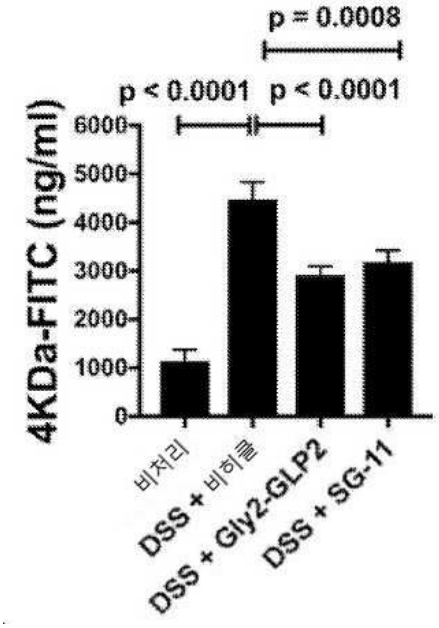
도면4


Muc2 (배수 변화)
25
20
15
10
5
0
p = 0.03
-
+
+
HK 대장균
-
-
+
SG-11

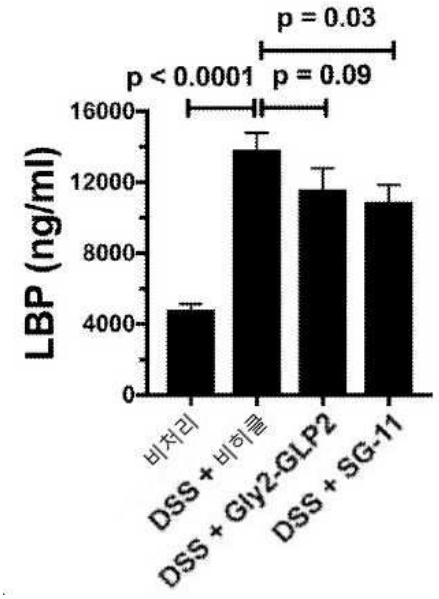
도면5


성장 퍼센트
50
40
30
20
10
0
-10
p < 0.0001
p < 0.0001
p = 0.04
-
+
-
-
EGF
-
-
+
-
스타우로스포린
-
-
-
+
SG-11

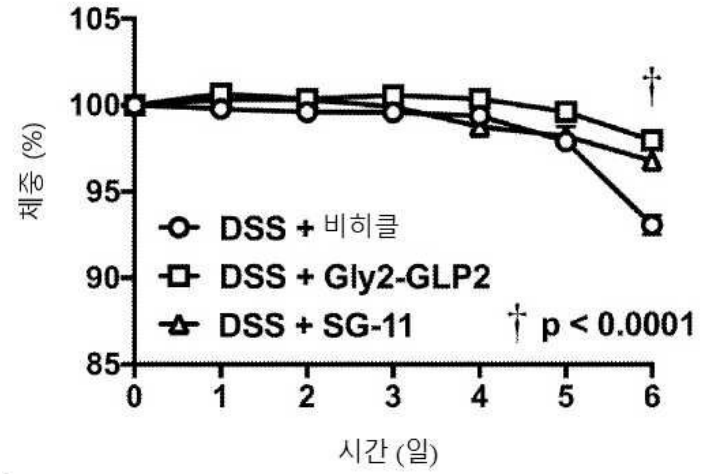
도면6


p = 0.0008
p < 0.0001
p < 0.0001
4KDa-FITC (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

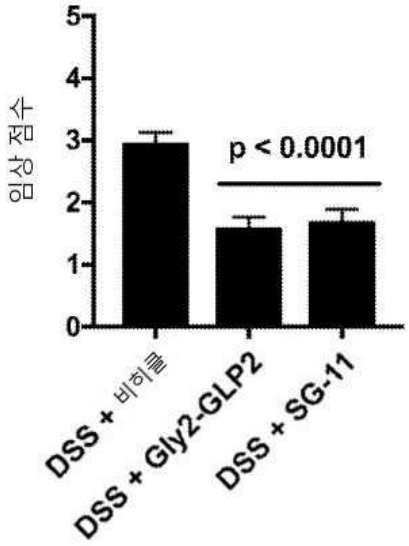
도면7


p = 0.03
p < 0.0001
p = 0.09
LBP (ng/ml)
16000
12000
8000
4000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

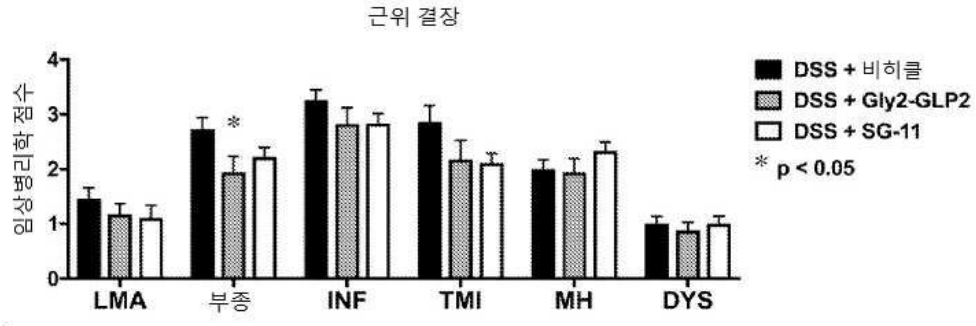
도면8



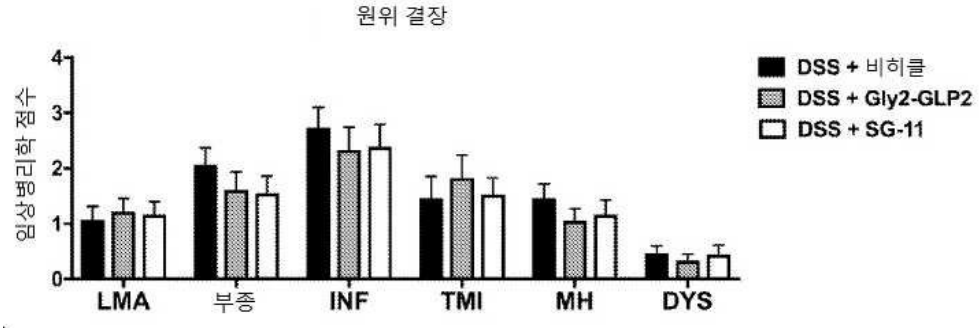
도면9



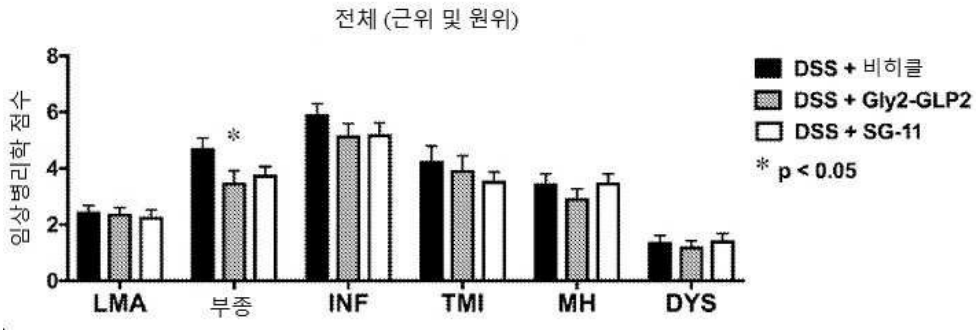
도면10a



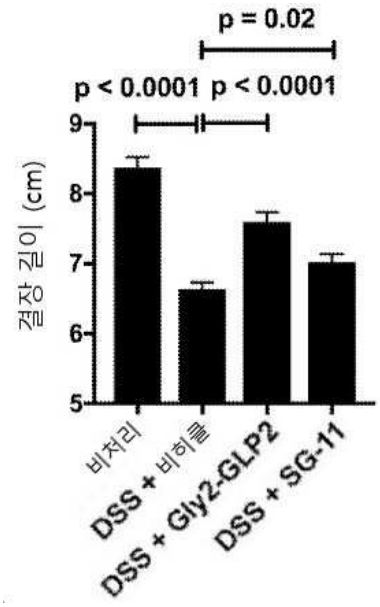
도면10b



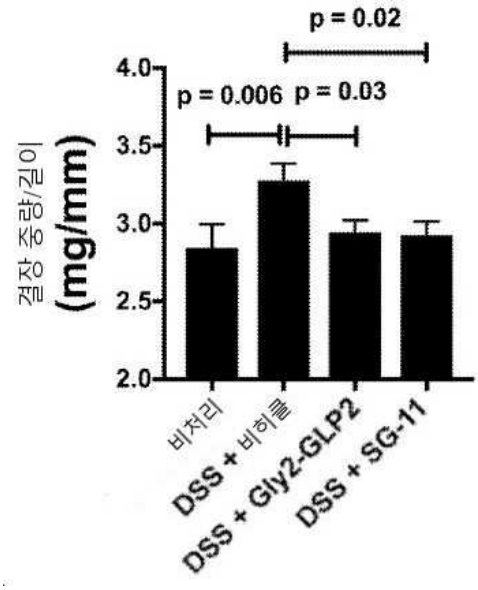
도면10c



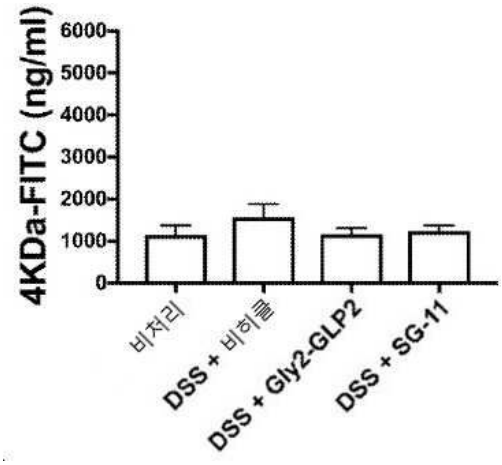
도면11a



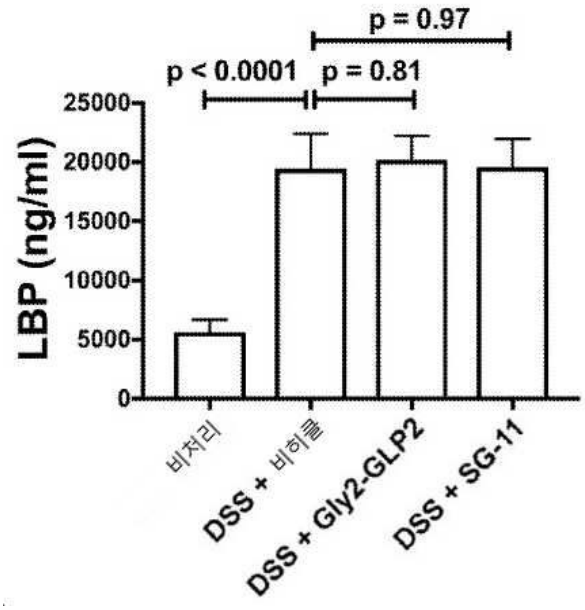
도면11b


p = 0.02
p = 0.006
p = 0.03
결장 중량/길이
(mg/mm)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

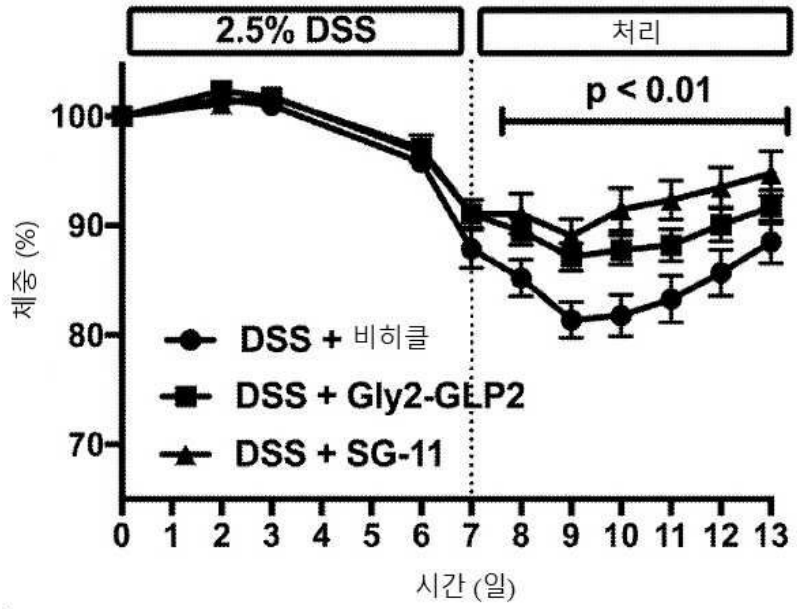
도면12


4KDa-FITC (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

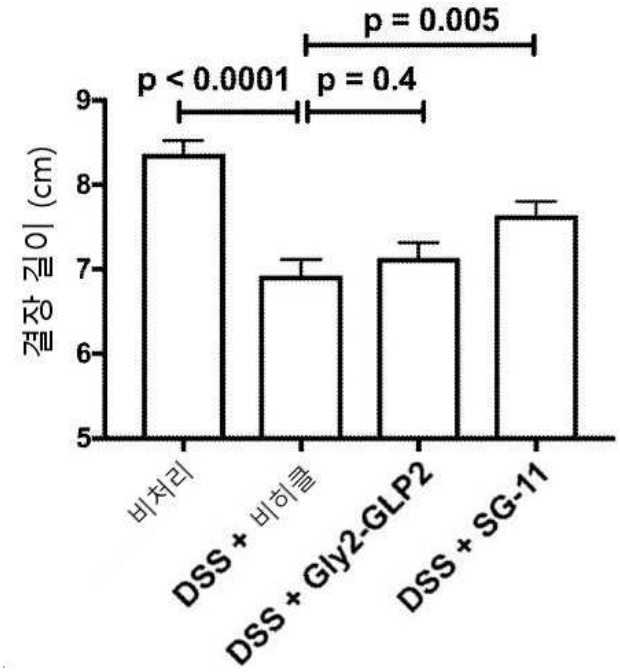
도면13


p = 0.97
p < 0.0001
p = 0.81
LBP (ng/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

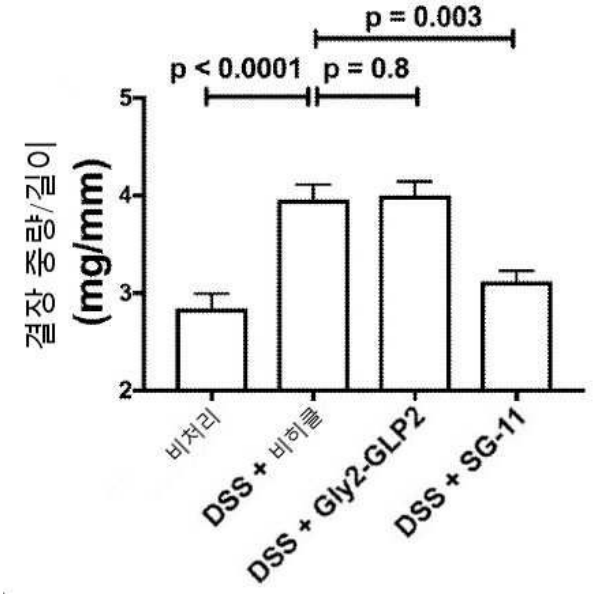
도면14


2.5% DSS
처리
p < 0.01
체중 (%)
100
90
80
70
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
시간 (일)

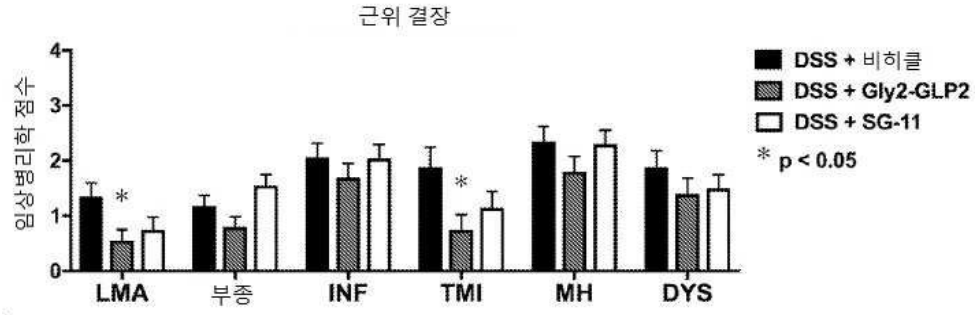
도면15a



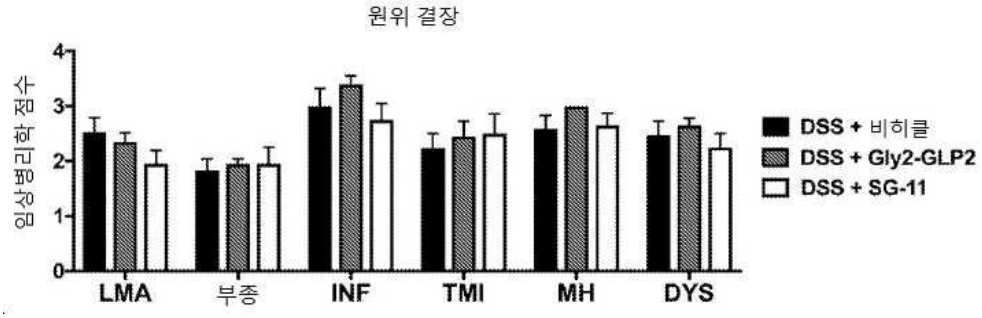
도면15b



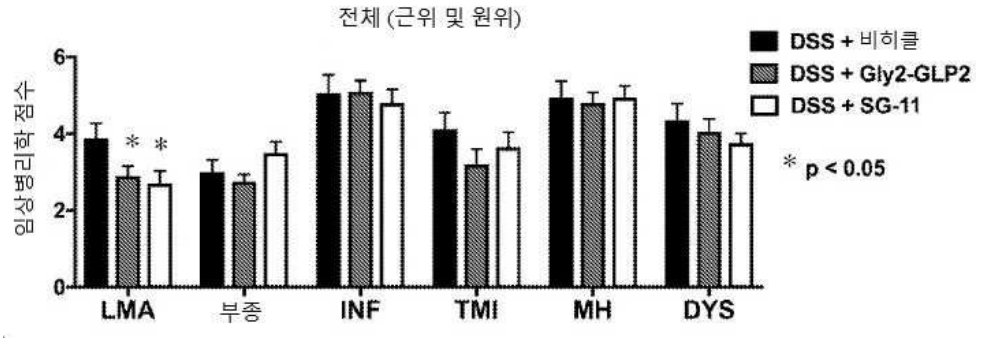
도면16a



도면16b


원위 결장
임상병리학 점수
0
1
2
3
4
LMA
부종
INF
TMI
MH
DYS
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11

도면16c

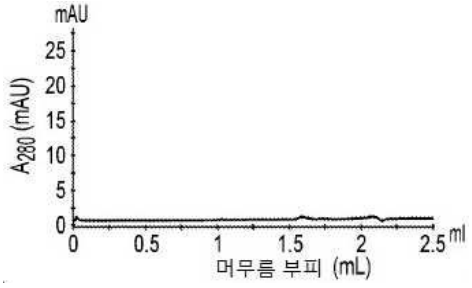

전체 (근위 및 원위)
임상병리학 점수
0
2
4
6
* *
LMA
부종
INF
TMI
MH
DYS
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
* p < 0.05

도면17

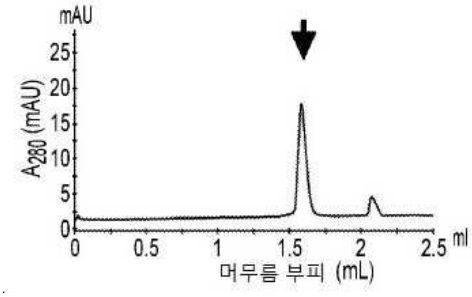
```
SG-11          1  MLEGEESVVY VGKKGVIASL DVETLDQSYY DETELKSYVD AEVEDYTAEH
WP_006857001_1 1  MLDADTDTVY VQKNGTVLSV DVETLDKDYY DETELKDYVT DAVSTYTGEH
WP_075679733_1 1  MLDVEESTVY VQKNGSVIST DIEDFSADYY DEDELKDYIG DEISSYTSEN
WP_055301040_1 1  MLEADTNTVY VSKHGKVVSM DVEQLDQSYY DETELKEFVD SAVDEYNTEN

                  51                                                100
SG-11             GKNAVKVESL KVEDGVAKLK MKYKTPEDYT AFNGIELYQG KVVASLAAGY
WP_006857001      GKSAVKLENL SVKDGTATLK MKYKTPEDYT GFNGIELYEG KVVKALAAGY
WP_075679733      GKKSVSLESV SVKDSVAKLT MKYKTAEDYT NFNGVELYTG TIVKAMAAGY
WP_055301040      GKNSVKVDDL TVEDGTAKLR MDYETVDDYT AFNGVELYEG KIVQALAAGY

                  101                                               150
SG-11             VYDGEFARVE EGKVVGAATK QDIYSEDDLK VAIIRANTDV KVDGEICYVS
WP_006857001      DFKTDFVSVE DGKVTGTATK EEIYSGEDLK VVIIKANRDV KVDGTICYVS
WP_075679733      DFGVDFVSVK DGAVTGTATK DEIVDHDDYK VAVIKANTDV KVDGTIVYVS
WP_055301040      DFDTDFAGVD KDGCVTGVTR GDILAQEDLK VVIIKANTDV KIDGKILYVS

                  151                                               200
SG-11             CQNVKLTGKD SVSIRDGYYL ETGSVTASVD VTGQESVGTE QLSGTEQMEM
WP_006857001      SENVKLTGTD SVSIRDGYSL NSGSTADESD SDENIADGTE SIGGSTEV..
WP_075679733      SQNVKVTGKN TVSIREGYLA ADTTNVVGS. ........TE TVAET.....
WP_055301040      CDNVTVTGKD SVSIKEGTGI EKTWITEAEE VPST.....E AVLETESTED

                  201                                       241
SG-11             TGEPVN.... ....ADDTEQ TEAAAGDGSF ETDVYTFIVY K
WP_006857001      ....SD.... ....TDVNDD TTYVKDDGAF ETDVYTYIIY K
WP_075679733      ....EA.... ....EEANQT EAVLEDEFAS ESDVYTYVIF K
WP_055301040      AGDVIEGEVI IGTEEASGND VVTNLSGGSS GTDVYTYIIY K
```

SG-11: 서열 번호: 7
WP_006857001: 서열 번호:21
WP_075679733: 서열 번호:22
WP_055301040: 서열 번호:23

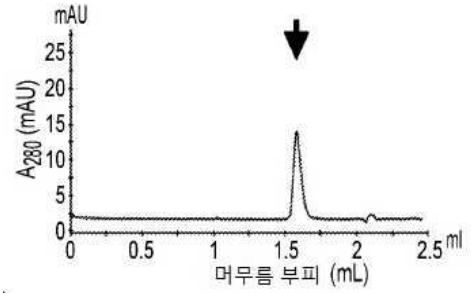
도면18a



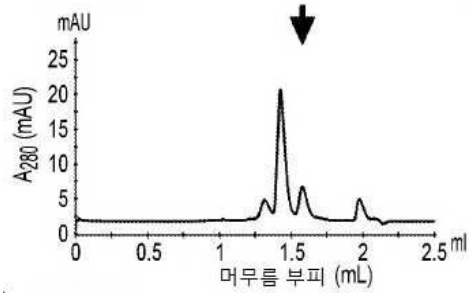
도면18b



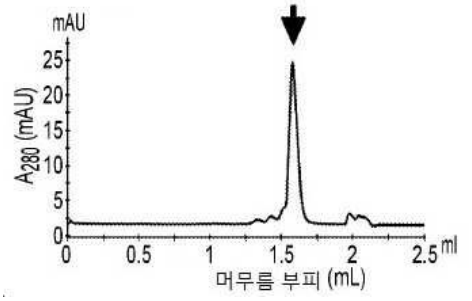
도면18c



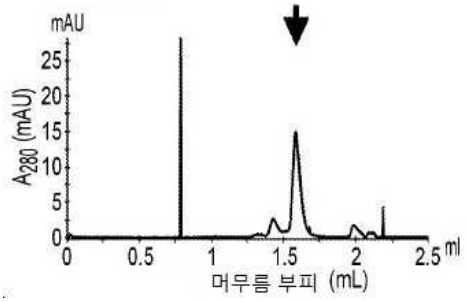
도면18d



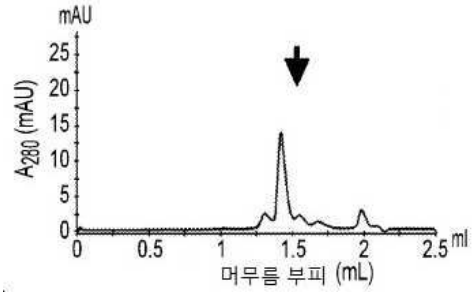
도면18e



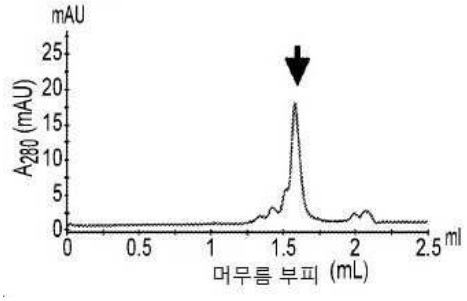
도면18f



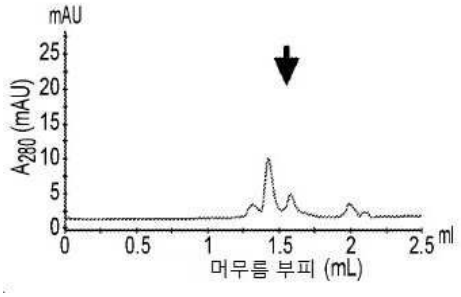
도면18g



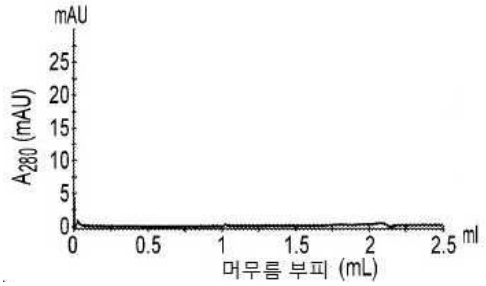
도면18h



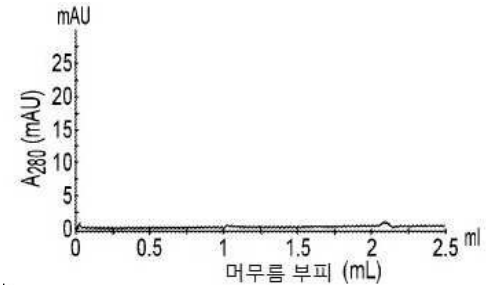
도면18i



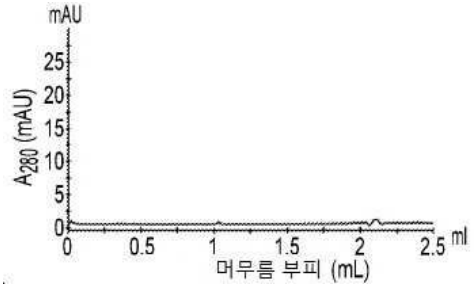
도면19a



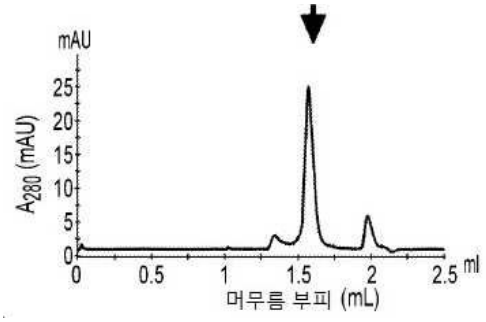
도면19b



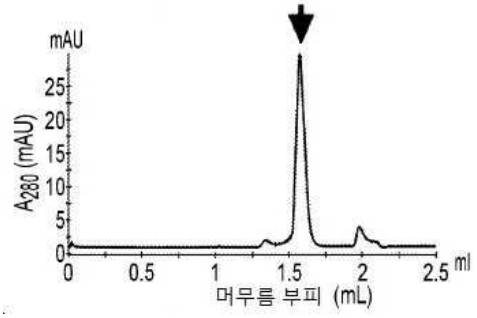
도면19c



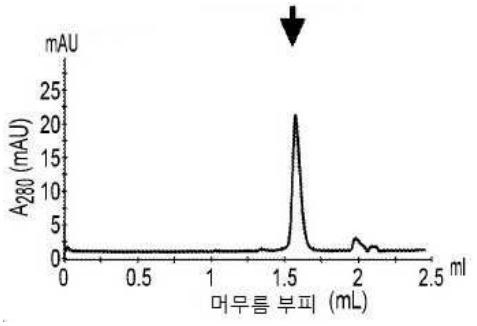
도면19d



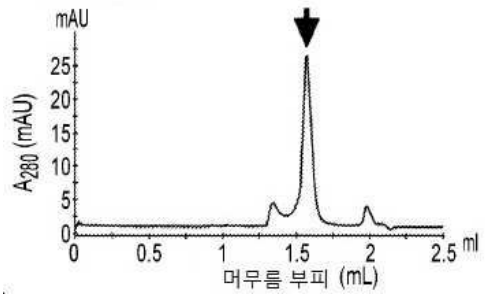
도면19e



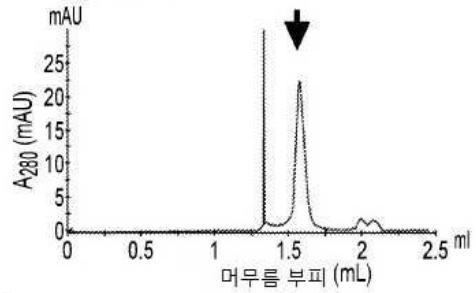
도면19f



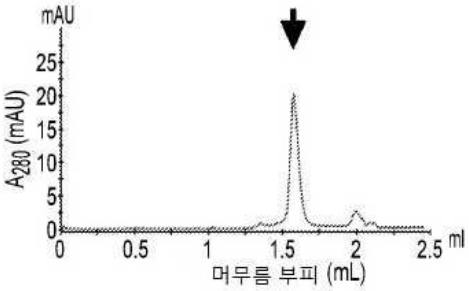
도면19g



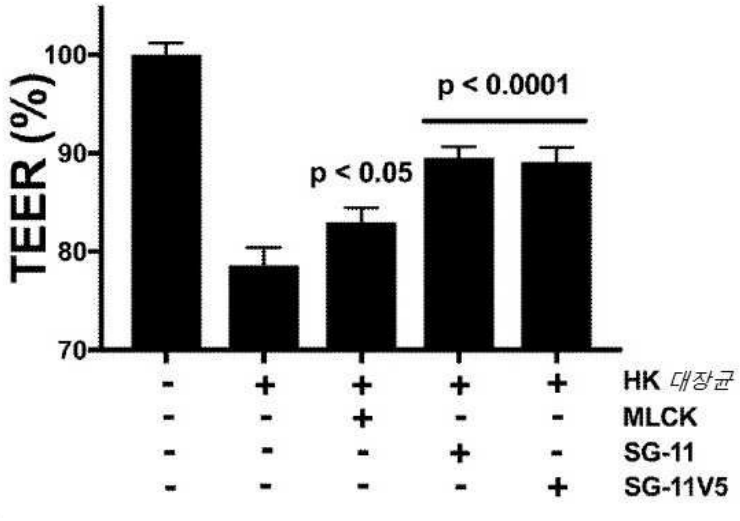
도면19h



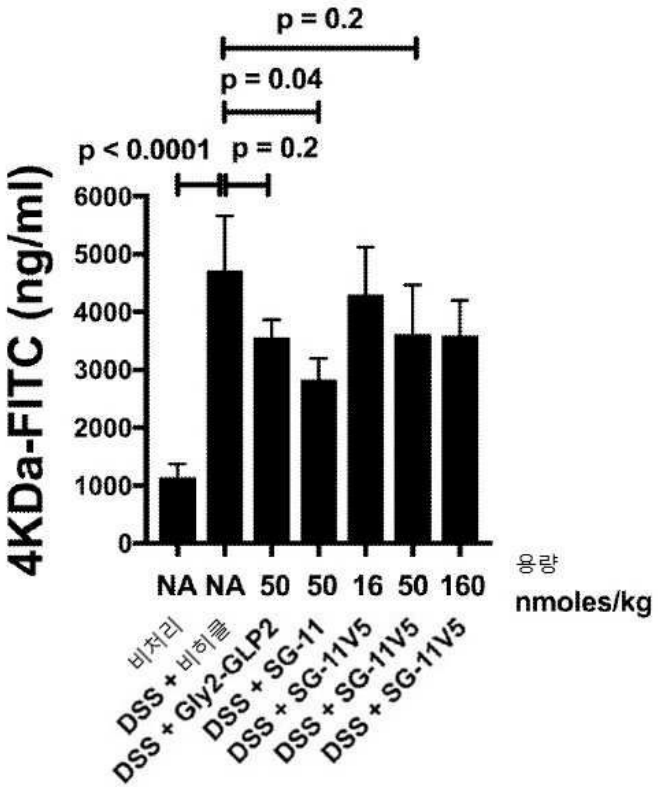
도면19i


mAU
25
20
15
10
5
0
A280 (mAU)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
ml
머무름 부피 (mL)

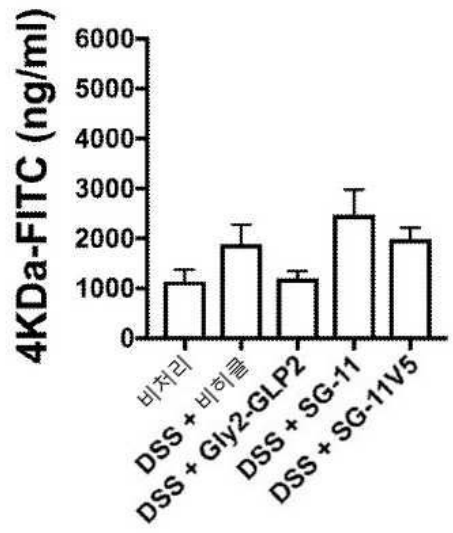
도면20


TEER (%)
100
90
80
70
p < 0.0001
p < 0.05
HK 대장균
MLCK
SG-11
SG-11V5

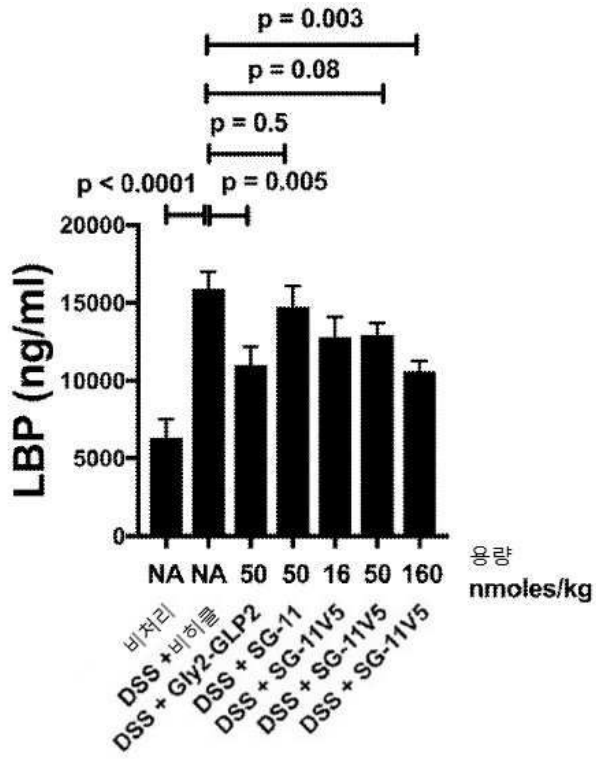
도면21a


p = 0.2
p = 0.04
p < 0.0001
p = 0.2
4KDa-FITC (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
NA NA 50 50 16 50 160
용량
nmoles/kg
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5

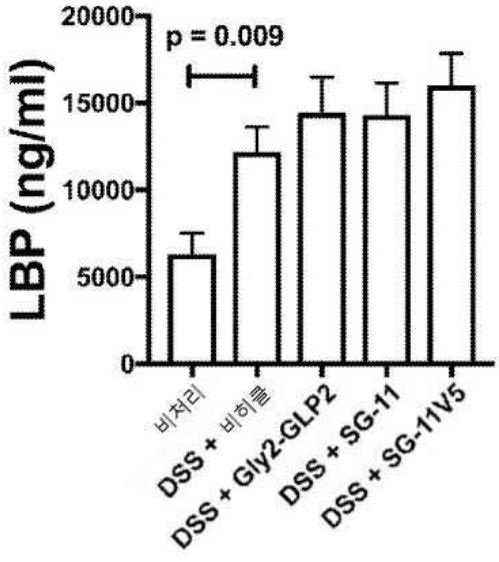
도면21b


4KDa-FITC (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5

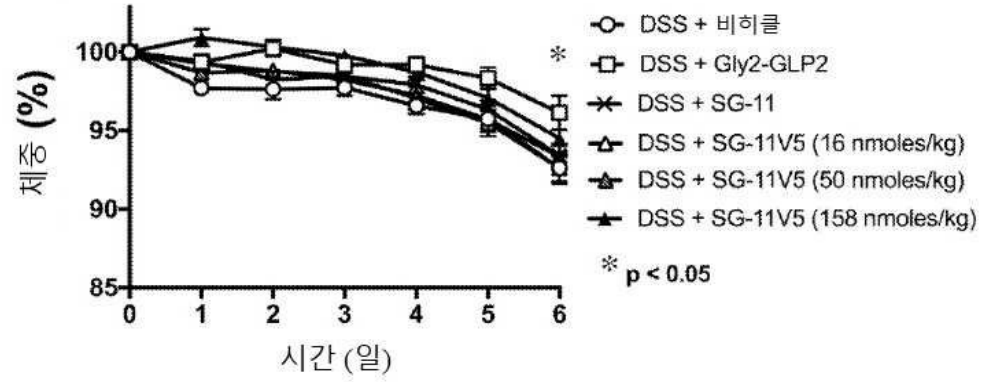
도면22a


p = 0.003
p = 0.08
p = 0.5
p < 0.0001
p = 0.005
LBP (ng/ml)
20000
15000
10000
5000
0
NA NA 50 50 16 50 160
용량
nmoles/kg
비처리
DSS +비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5

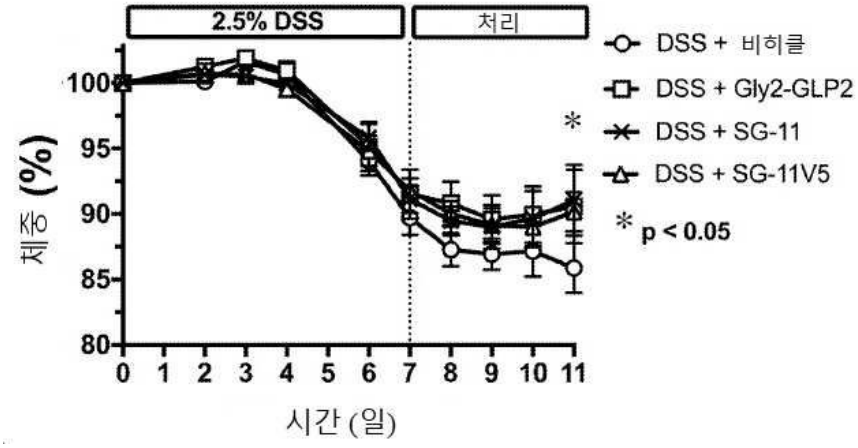
도면22b


p = 0.009
LBP (ng/ml)
20000
15000
10000
5000
0
비처리
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5

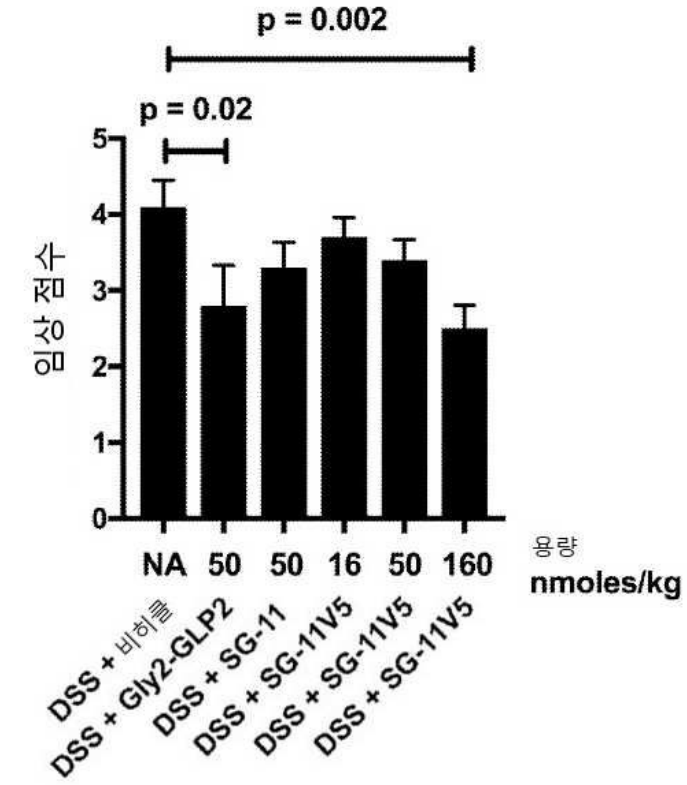
도면23a


체중 (%)
100
95
90
85
0 1 2 3 4 5 6
시간 (일)
*
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5 (16 nmoles/kg)
DSS + SG-11V5 (50 nmoles/kg)
DSS + SG-11V5 (158 nmoles/kg)
* p < 0.05

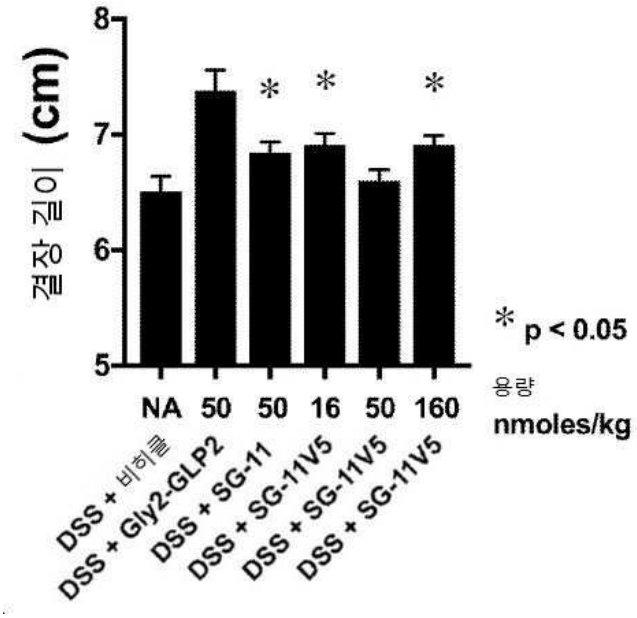
도면23b


2.5% DSS
처리
체중 (%)
100
95
90
85
80
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
시간 (일)
*
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
* p < 0.05

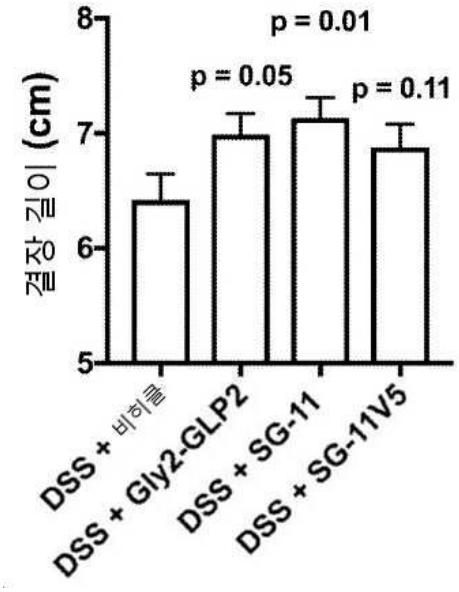
도면24


p = 0.002
p = 0.02
임상 점수
5
4
3
2
1
0
NA
50
50
16
50
160
용량
nmoles/kg
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5

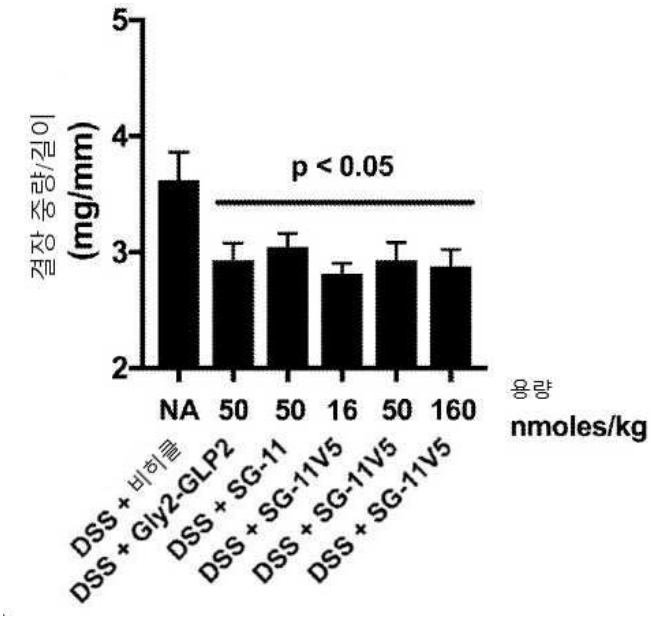
도면25a


결장 길이 (cm)
8
7
6
5
*
*
*
* p < 0.05
NA
50
50
16
50
160
용량
nmoles/kg
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5

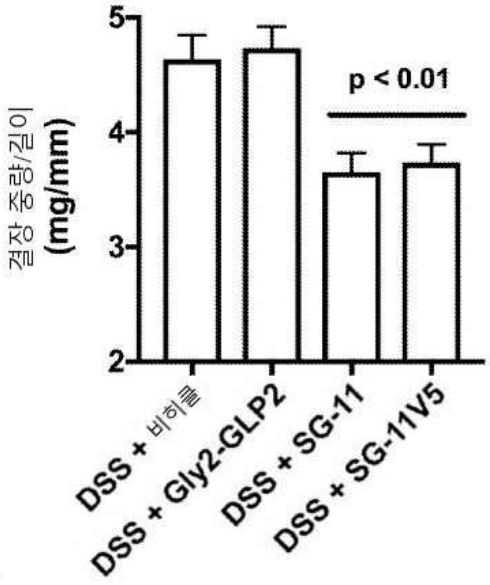
도면25b


p = 0.01
p = 0.05
p = 0.11
결장 길이 (cm)
8
7
6
5
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5

도면26a


결장 중량/길이 (mg/mm)
5
4
3
2
p < 0.05
NA 50 50 16 50 160
용량
nmoles/kg
DSS + 비히클
DSS + Gly2-GLP2
DSS + SG-11
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5
DSS + SG-11V5

도면26b



도면27a

```
서열 번호:7     MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL   60
서열 번호:11    MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL   60
서열 번호:13    MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL   60
서열 번호:15    MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKNAVKVESL   60
서열 번호:17    MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKSAVKVESL   60
서열 번호:19    MLEGEESVVYVGKKGVIASLDVETLDQSYYDETELKSYVDAEVEDYTAEHGKSAVKVESL   60
                ************************************************.*******

서열 번호:7     KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
서열 번호:11    KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
서열 번호:13    KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
서열 번호:15    KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFSGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
서열 번호:17    KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFNGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
서열 번호:19    KVEDGVAKLKMKYKTPEDYTAFSGIELYQGKVVASLAAGYVYDGEFARVEEGKVVGAATK   120
                ************************..*************************************

서열 번호:7     QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEICYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
서열 번호:11    QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIGYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
서열 번호:13    QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIGYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
서열 번호:15    QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIGYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
서열 번호:17    QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIGYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
서열 번호:19    QDIYSEDDLKVAIIRANTDVKVDGEIGYVSCQNVKLTGKDSVSIRDGYYLETGSVIASVD   180
                *************************** ***.*****************************

서열 번호:7     VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
서열 번호:11    VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
서열 번호:13    VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
서열 번호:15    VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
서열 번호:17    VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
서열 번호:19    VTGQESVGTEQLSGTEQMEMTGEPVNADDTEQTEAAAGDGSPETDVYTFIVYK   233
                ********************************************************
```

도면27b

	서열 번호:7	서열 번호:11	서열 번호:13	서열 번호:15	서열 번호:17	서열 번호:19
1: 서열 번호_7	100.00	99.14	98.71	98.71	98.28	98.28
2: 서열 번호_11	99.14	100.00	99.57	99.57	99.14	99.14
3: 서열 번호_13	98.71	99.57	100.00	99.14	99.57	98.71
4: 서열 번호_15	98.71	99.57	99.14	100.00	98.71	99.57
5: 서열 번호_17	98.28	99.14	99.57	98.71	100.00	99.14
6: 서열 번호_19	98.28	99.14	98.71	99.57	99.14	100.00

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Second Genome, Inc.

Han, Andrew Wonhee

Goodyear, Andrew Whitman

Gujral, Tarunmeet

DeSantis, Todd Zachary

Dabbagh, Karim

Takeuchi, Toshihiko

Jin, Ye

Willcoxon, Michi Izumi

Banas, Stefanie

<120> PROTEINS FOR THE TREATMENT OF EPITHELIAL BARRIER FUNCTION DISORDERS

<130> SEGE-001/03WO 321077-2031

<150> US 62/611,334

<151> 2017-12-28

<150> US 62/607,706

<

151> 2017-12-19

<150> US 62/482,963

<151> 2017-04-07

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 1

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

Leu Leu Ser Gly Cys Gly Thr Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val
20 25 30

Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu
35 40 45

Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala
50 55 60

Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr
85 90 95

Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln
100 105 110

Gly Lys Val Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu
115 120 125

Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln
130 135 140

Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn
145 150 155 160

Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn
165 170 175

Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr
180 185 190

Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu
195 200 205

Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr
210 215 220

Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala

225 230 235 240

Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys

245 250 255

<210> 2

<211> 768

<212> DNA

<213> Roseburia hominis

<400> 2

atgaagagat tagtgtgcac ggtctgcagt gtactgttgt gtgcgggact tctctccgga 60

tgcggtacct cgctggaggg agaggaaagt gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata 120

gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag tcctactacg atgagacgga actgaagtcc 180

tatgtggatg cagaggtgga agattacacc gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaaggtg 240

gagagcctta aggtggaaga cggtgtggcg aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag 300

gattataccg catttaatgg aattgaactc tatcagggga aagtcgttgc ttccctggcg 360

gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc cgcgtggagg aaggcaaggt tgtgggagct 420

gccacaaaac aggatattta ctctgaggat gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat 480

acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc 540

ggaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga tattatcttg agacgggaag cgtgacggca 600

tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag 660

atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg gatgataccg agcagacaga ggcggcggcc 720

ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat actttcattg tctacaaa 768

<210> 3

<211> 232

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 3

Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala Glu

35 40 45

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

100 105 110
Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu
115 120 125
Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu
130 135 140
Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser
145 150 155 160
Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala

165 170 175
Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser
180 185 190
Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp
195 200 205
Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp
210 215 220
Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 4
<211> 696
<212> DNA
<213> Roseburia hominis
<400> 4
ctggagggag aggaaagtgt cgtgtacgtg ggaaagaaag gcgtgatagc gtcgctggat 60
gtggagacgc tcgatcagtc ctactacgat gagacggaac tgaagtccta tgtggatgca 120
gaggtggaag attacaccgc ggagcatggt aaaaatgcag tcaaggtgga gagccttaag 180

gtggaagacg gtgtggcgaa gcttaagatg aagtacaaga caccggagga ttataccgca 240

tttaatggaa ttgaactcta tcaggggaaa gtcgttgctt ccctggcggc aggatacgtc 300

tacgacgggg agttcgcccg cgtggaggaa ggcaaggttg tgggagctgc cacaaaacag 360

gatatttact ctgaggatga tttgaaagtt gccatcatcc gtgccaatac ggatgtgaag 420

gtggacggtg agatctgcta tgtctcctgt cagaatgtga agctgaccgg aaaagacagt 480

gtgtcgatcc gtgacggata ttatcttgag acgggaagcg tgacggcatc cgtggatgtg 540

accggacagg agagcgtcgg gaccgagcag ctttcgggaa ccgaacagat ggagatgacc 600

ggggagccgg tgaatgcgga tgataccgag cagacagagg cggcggccgg tgacggttcg 660

ttcgagacag acgtatatac tttcattgtc tacaaa 696

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG11 expressed in pGEX6 vector and cleaved by Precision protease

<400> 5

Gly Pro Leu Gly Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Asp Glu Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu
35 40 45

Asp Tyr Thr Ala Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu
50 55 60

Lys Val Glu Asp Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro
65 70 75 80

Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val
85 90 95

Val Ala Ser Leu Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg
100 105 110

Val Glu Glu Gly Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr
115 120 125

Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val
130 135 140
Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu
145 150 155 160
Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr
165 170 175
Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly

180 185 190
Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro
195 200 205
Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly
210 215 220
Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys Ala Ala Ala
225 230 235 240
Ser

<210> 6
<211> 723
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> SG11 expressed in pGEX6 vector and cleaved by Precision protease
<400> 6
gggcccctgg gatccctgga gggagaggaa agtgtcgtgt acgtgggaaa gaaaggcgtg 60
atagcgtcgc tggatgtgga gacgctcgat cagtcctact acgatgagac ggaactgaag 120
tcctatgtgg atgcagaggt ggaagattac accgcggagc atggtaaaaa tgcagtcaag 180
gtggagagcc ttaaggtgga agacggtgtg gcgaagctta agatgaagta caagacaccg 240
gaggattata ccgcatttaa tggaattgaa ctctatcagg ggaaagtcgt tgcttccctg 300
gcggcaggat acgtctacga cggggagttc gcccgcgtgg aggaaggcaa ggttgtggga 360

gctgccacaa aacaggatat ttactctgag gatgatttga aagttgccat catccgtgcc 420
aatacggatg tgaaggtgga cggtgagatc tgctatgtct cctgtcagaa tgtgaagctg 480
accggaaaag acagtgtgtc gatccgtgac ggatattatc ttgagacggg aagcgtgacg 540
gcatccgtgg atgtgaccgg acaggagagc gtcgggaccg agcagctttc gggaaccgaa 600

cagatggaga tgaccgggga gccggtgaat gcggatgata ccgagcagac agaggcggcg 660

gccggtgacg gttcgttcga gacagacgta tatactttca ttgtctacaa agcggccgca 720

tcg 723

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG11 with start methionine

<400> 7

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 8

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG11 with start methionine

<400> 8

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagatttg ctacgttagc tgtcaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 9

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG11 with N-terminal FLAG tag

<400> 9

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

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

        115                 120                 125
Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp Leu Lys Val
    130                 135                 140
Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly Glu Ile Cys
145                 150                 155                 160
Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp Ser Val Ser
                165                 170                 175
Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val

            180                 185                 190
Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr
        195                 200                 205
Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu
    210                 215                 220
Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Phe Ile Val Tyr Lys
```

245

<210> 10

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG11 with N-terminal FLAG tag (not codon optimized)

<400> 10

atggactaca aagacgatga cgacaagggc agcagccata tgctggaggg agaggaaagt 60

gtcgtgtacg tgggaaagaa aggcgtgata gcgtcgctgg atgtggagac gctcgatcag 120

tcctactacg atgagacgga actgaagtcc tatgtggatg cagaggtgga agattacacc 180

gcggagcatg gtaaaaatgc agtcaaggtg gagagcctta aggtggaaga cggtgtggcg 240

aagcttaaga tgaagtacaa gacaccggag gattataccg catttaatgg aattgaactc 300

tatcagggga aagtcgttgc ttccctggcg gcaggatacg tctacgacgg ggagttcgcc 360

cgcgtggagg aaggcaaggt tgtgggagct gccacaaaac aggatattta ctctgaggat 420

gatttgaaag ttgccatcat ccgtgccaat acggatgtga aggtggacgg tgagatctgc 480

tatgtctcct gtcagaatgt gaagctgacc ggaaaagaca gtgtgtcgat ccgtgacgga 540

tattatcttg agacgggaag cgtgacggca tccgtggatg tgaccggaca ggagagcgtc 600

gggaccgagc agctttcggg aaccgaacag atggagatga ccggggagcc ggtgaatgcg 660

gatgataccg agcagacaga ggcggcggcc ggtgacggtt cgttcgagac agacgtatat 720

actttcattg tctacaaa 738

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (C147V, C151S)

<400> 11

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala

35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu

85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly

100 105 110

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

115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly

130 135 140

Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp

145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr

165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu

180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp

195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr

210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys

225 230

<210> 12

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (C147V, C151S) (codon optimized)

<400> 12

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcaatg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (G84D, C147V, C151S)

<400> 13

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Asn Asp Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125
Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140
Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190
Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205
Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220
Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 14
<211> 699
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial variant of SG11 (G84D, C147V, C151S) (codon optimized)
<400> 14

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60
gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120
gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180
aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240
gcgttcaatg acatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360
caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420
aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480
agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N83S, C147V, C151S)

<400> 15

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Asn Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp
50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 16

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N83S, C147V, C151S) (codon optimized)

<400> 16

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaaaatg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcagcg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N53S, G84D, C147V, C151S)

<400> 17

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

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

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125
Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140
Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190
Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205
Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220
Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 18

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N53S, G84D, C147V, C151S) (codon optimized)

<400> 18

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaatccg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcaatg acatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 19

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N53S, N83S, C147V, C151S)

<400> 19

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

Lys Val Val Gly Ala Ala Thr Lys Gln Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140

Glu Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr
165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu
180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp
195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr
210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys
225 230

<210> 20

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11 (N53S, N83S, C147V, C151S) (codon optimized)

<400> 20

atgttggagg gtgaagagtc tgttgtctat gtgggtaaga aaggtgtgat cgcgtccctg 60

gacgtcgaga ctctggacca gtcttactat gatgaaaccg agctgaagtc gtatgtggac 120

gccgaagttg aggattacac ggccgagcac ggcaaatccg ccgtcaaagt tgagagcttg 180

aaagttgagg acggcgtggc aaagctgaag atgaaataca agaccccaga ggactacacg 240

gcgttcagcg gtatcgagct gtatcagggc aaagtcgtcg catccctggc agcgggctat 300

gtgtacgacg gtgagtttgc gcgcgtcgaa gaaggcaaag ttgtgggtgc ggctacgaaa 360

caagatatct acagcgaaga tgacctgaaa gtcgcgatta ttcgtgctaa caccgatgtt 420

aaagttgatg gcgagattgt gtacgttagc agccaaaacg taaagctgac gggtaaagat 480

agcgtgagca ttcgtgatgg ctattatctg gaaaccggta gcgttacggc gagcgtcgat 540

gttaccggtc aagagagcgt gggtaccgaa cagctgagcg gcaccgaaca gatggaaatg 600

accggtgaac cggttaacgc agacgacacg gaacaaaccg aagccgcggc aggcgacggt 660

agcttcgaga ctgacgtgta cacctttatc gtgtacaag 699

<210> 21

<211> 227

<212> PRT

<213> Roseburia intestinalis

<400> 21

Met Leu Asp Ala Asp Thr Asp Thr Val Tyr Val Gln Lys Asn Gly Thr
1 5 10 15

Val Leu Ser Val Asp Val Glu Thr Leu Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Asp Tyr Val Thr Asp Ala Val Ser Thr Tyr Thr Gly
35 40 45

Glu His Gly Lys Ser Ala Val Lys Leu Glu Asn Leu Ser Val Lys Asp
50 55 60

Gly Thr Ala Thr Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Gly Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Glu Gly Lys Val Val Lys Ala Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Asp Phe Lys Thr Asp Phe Val Ser Val Glu Asp Gly
100 105 110

Lys Val Thr Gly Thr Ala Thr Lys Glu Glu Ile Tyr Ser Gly Glu Asp
115 120 125

Leu Lys Val Val Ile Ile Lys Ala Asn Arg Asp Val Lys Val Asp Gly
130 135 140
Thr Ile Cys Tyr Val Ser Ser Glu Asn Val Lys Leu Thr Gly Thr Asp
145 150 155 160
Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Asn Ser Gly Ser Thr Ala
165 170 175
Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Asn Ile Ala Asp Gly Thr Glu Ser Ile

180 185 190
Gly Gly Ser Thr Glu Val Ser Asp Thr Asp Val Asn Asp Asp Thr Thr
195 200 205
Tyr Val Lys Asp Asp Gly Ala Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Tyr Ile
210 215 220
Ile Tyr Lys
225

<210> 22
<211> 215
<212> PRT
<213> Roseburia sp. 831b
<400> 22
Met Leu Asp Val Glu Glu Ser Thr Val Tyr Val Gln Lys Asn Gly Ser
1 5 10 15

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

Asn Phe Asn Gly Val Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Ile Val Lys Ala Met
85 90 95
Ala Ala Gly Tyr Asp Phe Gly Val Asp Phe Val Ser Val Lys Asp Gly

100 105 110

Ala Val Thr Gly Thr Ala Thr Lys Asp Glu Ile Val Asp His Asp Asp

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ile Val Tyr Val Ser Ser Gln Asn Val Lys Val Thr Gly Lys Asn

145 150 155 160

Thr Val Ser Ile Arg Glu Gly Tyr Leu Ala Ala Asp Thr Thr Asn Val

165 170 175

Val Gly Ser Thr Glu Thr Val Ala Glu Thr Glu Ala Glu Glu Ala Asn

180 185 190

Gln Thr Glu Ala Val Leu Glu Asp Glu Phe Ala Ser Glu Ser Asp Val

195 200 205

Tyr Thr Tyr Val Ile Phe Lys

210 215

<210> 23

<211> 236

<212> PRT

<213> Roseburia inulinivorans

<400> 23

Met Leu Glu Ala Asp Thr Asn Thr Val Tyr Val Ser Lys His Gly Lys

1 5 10 15

Val Val Ser Met Asp Val Glu Gln Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Glu Phe Val Asp Ser Ala Val Asp Glu Tyr Asn Thr

35 40 45

Glu Asn Gly Lys Asn Ser Val Lys Val Asp Asp Leu Thr Val Glu Asp

50 55 60

Gly Thr Ala Lys Leu Arg Met Asp Tyr Glu Thr Val Asp Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Phe Asn Gly Val Glu Leu Tyr Glu Gly Lys Ile Val Gln Ala Leu

85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Asp Phe Asp Thr Asp Phe Ala Gly Val Asp Lys Asp
100 105 110

Gly Cys Val Thr Gly Val Thr Arg Gly Asp Ile Leu Ala Gln Glu Asp
115 120 125
Leu Lys Val Val Ile Ile Lys Ala Asn Thr Asp Val Lys Ile Asp Gly
130 135 140
Lys Ile Leu Tyr Val Ser Cys Asp Asn Val Thr Val Thr Gly Lys Asp
145 150 155 160
Ser Val Ser Ile Lys Glu Gly Thr Gly Ile Glu Lys Thr Trp Ile Thr
165 170 175

Glu Ala Glu Glu Val Pro Ser Thr Glu Ala Val Leu Glu Thr Glu Ser
180 185 190
Thr Glu Asp Ala Gly Asp Val Ile Glu Gly Glu Val Ile Ile Gly Thr
195 200 205
Glu Glu Ala Ser Gly Asn Asp Val Val Thr Asn Leu Ser Gly Gly Ser
210 215 220
Ser Gly Thr Asp Val Tyr Thr Tyr Ile Ile Tyr Lys
225 230 235

<210> 24

<

211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fragment of SG11 with start methionine

<400> 24

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys
1 5 10

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 25

Gly Val Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr

1 5 10 15

Asp Glu Thr Glu Leu Lys

20

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 26

Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Lys

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 27

Ala Asn Thr Asp Val Lys

1 5

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 28

Val Asp Gly Glu Ile Cys Tyr Val Ser Cys Gln Asn Val Lys

1 5 10

<210> 29

<211> 67

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 29

Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr Ala Ser Val Asp Val Thr

1 5 10 15

Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu Ser Gly Thr Glu Gln Met

20 25 30

Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp Asp Thr Glu Gln Thr Glu

35 40 45

Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr Asp Val Tyr Thr Phe Ile

50 55 60

Val Tyr Lys

65

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 30

Asn Ala Val Lys

1

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Roseburia hominis

<400> 31

Thr Pro Glu Asp Tyr Thr Ala Phe Ser Gly Ile Glu Leu Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Lys

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 32

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 33

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (83)..(84)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (151)..(151)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 33

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val
1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu
20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala
35 40 45

Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly
100 105 110

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

115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly

130 135 140

Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp

145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr

165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu

180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp

195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr

210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys

225 230

<210> 34

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial variant of SG11

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Xaa is any amino acid other than Asn

<220><221> misc_feature

<222> (83)..(83)

<223> Xaa is any amino acid other than Asn

<220><221> misc_feature

<222> (84)..(84)

<223> Xaa is any amino acid other than Gly

<220><221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> Xaa is any amino acid other than Cys

<220><221> misc_feature

<222> (151)..(151)

<223> Xaa is any amino acid other than Cys

<400> 34

Met Leu Glu Gly Glu Glu Ser Val Val Tyr Val Gly Lys Lys Gly Val

1 5 10 15

Ile Ala Ser Leu Asp Val Glu Thr Leu Asp Gln Ser Tyr Tyr Asp Glu

20 25 30

Thr Glu Leu Lys Ser Tyr Val Asp Ala Glu Val Glu Asp Tyr Thr Ala

35 40 45

Glu His Gly Lys Xaa Ala Val Lys Val Glu Ser Leu Lys Val Glu Asp

50 55 60

Gly Val Ala Lys Leu Lys Met Lys Tyr Lys Thr Pro Glu Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Phe Xaa Xaa Ile Glu Leu Tyr Gln Gly Lys Val Val Ala Ser Leu

85 90 95

Ala Ala Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Arg Val Glu Glu Gly

100 105 110

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

115 120 125

Leu Lys Val Ala Ile Ile Arg Ala Asn Thr Asp Val Lys Val Asp Gly

130 135 140

Glu Ile Xaa Tyr Val Ser Xaa Gln Asn Val Lys Leu Thr Gly Lys Asp

145 150 155 160

Ser Val Ser Ile Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Glu Thr Gly Ser Val Thr

165 170 175

Ala Ser Val Asp Val Thr Gly Gln Glu Ser Val Gly Thr Glu Gln Leu

180 185 190

Ser Gly Thr Glu Gln Met Glu Met Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Asp

195 200 205

Asp Thr Glu Gln Thr Glu Ala Ala Ala Gly Asp Gly Ser Phe Glu Thr

210 215 220

Asp Val Tyr Thr Phe Ile Val Tyr Lys

225 230