(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0011860
(43) 공개일자 2018년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/64 (2006.01) *A61K 38/48* (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/6448 (2013.01)
A61K 38/486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7002034(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년12월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7020627
원출원일자(국제) 2008년12월04일
심사청구일자 2016년08월23일
(85) 번역문제출일자 2018년01월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/085559
(87) 국제공개번호 WO 2009/079220
국제공개일자 2009년06월25일
(30) 우선권주장
60/992,319 2007년12월04일 미국(US)
12/327,809 2008년12월03일 미국(US)

(71) 출원인
프로테온 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 메사추세츠주 02451 월섬 웨스트 스트리트 200
(72) 발명자
프라나노 에프 니콜라스
미국 64113 미주리주 캔사스 시티 웨스트 69번 테라스 1010
블랜드 킴벌리
미국 64113 미주리주 캔사스 시티 맥기 스트리트 6032
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

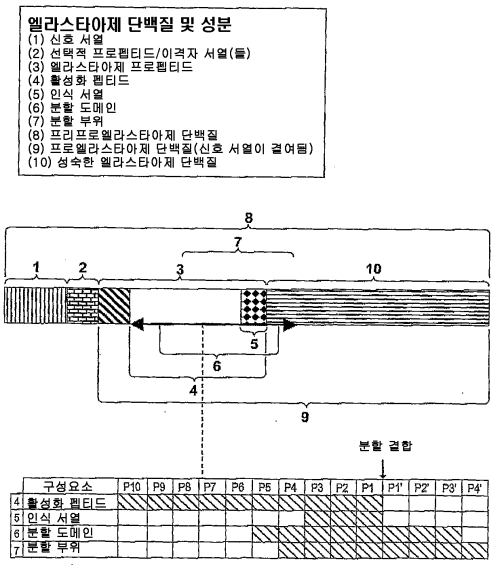
전체 청구항 수 : 총 424 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 엘라스타아제 단백질, 및 이의 제조 방법 및 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생물학적으로 활성인 재조합 엘라스타아제 단백질의 제조, 정제, 제형화 방법 및 용도에 관한 것이다. 치료학적으로 유용한 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 재조합 방법, 및 이러한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물이 기재되어 있다. 신규 재조합 엘라스타아제 단백질 및 단백질 제조물이 또한 개시되어 있다. 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 함유하는 약학 조성물을 사용하여 생물학적 전달관의 질환을 치료하고 예방하기 위한 방법이 기재되어 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07K 1/14 (2013.01)
C12N 15/815 (2013.01)
C12N 9/50 (2013.01)
C12P 21/02 (2013.01)
C12Y 304/21036 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)
(72) 발명자
웅 마르코 디
미국 66224 캔사스주 오버랜드 파크 하우어 스트리트 15501
딩 비 씨
미국 66224 캔사스주 오버랜드 파크 하우어 스트리트 15501

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 성숙한 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 엘라스타아제 활성화 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 11을 포함하는 것인 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 12를 포함하는 것인 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 13을 포함하는 것인 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 93을 포함하는 것인 단백질.

청구항 6

제1항, 제2항 또는 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 18, 서열 번호 20 또는 서열 번호 21중 임의의 하나를 포함하는 것인 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 80을 포함하는 것인 단백질.

청구항 8

제1항 또는 제7항에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 23, 서열 번호 72, 또는 서열 번호 73을 포함하는 것인 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 서열 번호 74를 포함하는 분할 도메인(cleavage domain)을 포함하는 것인 단백질.

청구항 10

제1항 또는 제9항에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 것인 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제5항 또는 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 64를 포함하는 것인 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제5항 또는 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 69를 포함하는 것인 단백질.

청구항 13

서열 번호 74의 분할 도메인 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 또는 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 서열이 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 17

제13항 또는 제14항에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 98% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 18

제13항 또는 제14항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열과 비교하여 10개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 19

제13항 또는 제14항에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열과 비교하여 7개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 20

제13항 또는 제14항에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열과 비교하여 5개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 21

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_1"로 표시된 아미노산 잔기가 글루타메이트 또는 히스티딘인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 22

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_4"로 표시된 아미노산 잔기가 프롤린인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 23

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_5"로 표시된 아미노산 잔기가 알라닌인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 24

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_1"로 표시된 아미노산 잔기가 히스티딘이고, 서열 번호 74에서 "Xaa_4"로 표시된 아미노산 잔기가 프롤린이며, 서열 번호 74에서 "Xaa_5"로 표시된 아미노산 잔기가 알라닌인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 25

제13항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 26

제25항에 있어서, 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 27

제25항에 있어서, 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 것인 단백질.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 30

(i) 신호 서열; (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 엘라스타아제 활성화 서열; 및 (iii) 성숙한 엘라스타아제의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, 신호 서열이 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 작동가능한 것인 단백질.

청구항 32

제30항에 있어서, 신호 서열이 효모 α-인자 신호 펩티드인 단백질.

청구항 33

제32항에 있어서, 효모 α-인자 신호 펩티드가 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 34

제30항에 있어서, 신호 서열이 포유동물 분비 신호 서열인 단백질.

청구항 35

제34항에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 돼지 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 단백질.

청구항 36

제34항에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 단백질.

청구항 37

제1항 또는 제30항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 인식 서열인 단백질.

청구항 38

제1항 또는 제30항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 인간 제I형 엘라스타아제인 단백질.

청구항 39

제1항 또는 제30항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 돼지 제I형 엘라스타아제인 단백질.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 41

(i) 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 42

제41항에 있어서, 단백질이 상기 활성화 서열에 작동적으로 연결된 신호 서열을 추가로 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 신호 서열이 피치아 파스토리스에서 작동가능한 것인 핵산 분자.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 제I형 엘라스타아제 인식 서열인 핵산.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 인식 서열인 핵산.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 11을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 47

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 12를 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 48

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 13을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 49

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 93을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 50

제41항 내지 제46항 또는 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 18, 서열 번호 20 또는 서열 번호 21 중 임의의 하나를 포함하는 핵산.

청구항 51

제41항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 80을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 52

제41항 내지 제45항 또는 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 23, 서열 번호 72, 또는 서열 번호 73을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 53

제41항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 서열 번호 74를 포함하는 분할 도메인을 포함하는 것인

핵산 분자.

청구항 54

제41항 내지 제46항 또는 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 55

제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제가 인간의 성숙한 제I형 엘라스타아제인 핵산.

청구항 56

제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제가 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제인 핵산.

청구항 57

제41항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 엘라스타아제가 서열 번호 5, 서열 번호 84, 서열 번호 87, 및 서열 번호 39중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산.

청구항 58

제57항에 있어서, 엘라스타아제가 서열 번호 1 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산.

청구항 59

제42항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 서열이 효모 α-인자 신호 펩티드인 핵산 분자.

청구항 60

제59항에 있어서, 단백질이 서열 번호 34, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 96 및 서열 번호 97중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 61

제42항, 제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 서열이 포유동물 분비 신호 서열인 핵산 분자.

청구항 62

제61항에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 돼지 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 핵산 분자.

청구항 63

제61항에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 핵산 분자.

청구항 64

제41항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 서열 번호 88~91 및 98~103중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 65

제64항에 있어서, 단백질이 서열 번호 6~9 및 64~69중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 66

제64항에 있어서, 단백질이 표 2에 제시된 엘라스타아제 다형태의 임의의 조합을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 67

제64항에 있어서, 단백질이 표 3에 제시된 엘라스타아제 다형태의 임의의 조합을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 68

제41항 내지 제67항 중 어느 한 항의 핵산 분자에 의해 코딩되는 단백질.

청구항 69

제68항에 있어서, 단리된 것인 단백질.

청구항 70

제41항 내지 제67항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된, 유전자 발현을 제어하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 벡터.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 다량체화되는 것인 벡터.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 벡터의 하나 이상의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것인 숙주 세포.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 벡터의 하나의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것인 숙주 세포.

청구항 76

제74항에 있어서, 상기 벡터의 2~5개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것인 숙주 세포.

청구항 77

제74항 또는 제76항에 있어서, 상기 벡터의 2개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것인 숙주 세포.

청구항 78

제74항 또는 제76항에 있어서, 상기 벡터의 3개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것인 숙주 세포.

청구항 79

게놈에 통합된, 제41항 내지 제67항 중 어느 한 항의 핵산 분자의 하나 이상의 복사물을 포함하는 숙주 세포.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 핵산 분자의 하나의 복사물이 게놈내로 통합된 것인 숙주 세포.

청구항 81

제79항에 있어서, 상기 핵산 분자의 2~5개의 복사물이 게놈내로 통합된 것인 숙주 세포.

청구항 82

제79항에 있어서, 상기 핵산 분자의 2개의 복사물이 게놈내로 통합된 것인 숙주 세포.

청구항 83

제79항에 있어서, 상기 핵산 분자의 3개의 복사물이 게놈내로 통합된 것인 숙주 세포.

청구항 84

제41항 내지 제67항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 발현하도록 유전자 조작된 세포.

청구항 85

제84항에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 것인 세포.

청구항 86

제41항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 뉴클레오티드 서열을 발현하도록 유전자 조작된 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포.

청구항 87

제87항에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 것인 피치아 파스토리스 세포.

청구항 88

제1항 내지 제27항 또는 제68항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는 세포 배양 상청액.

청구항 89

단백질이 생산되는 조건하에서 제84항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질의 생산 방법.

청구항 90

단백질이 생산되는 조건하에서 제85항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질의 생산 방법.

청구항 91

단백질이 생산되는 조건하에서 제86항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질의 생산 방법.

청구항 92

단백질이 생산되는 조건하에서 제87항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질의 생산 방법.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서, 상기 조건이 pH 2~6에서의 성장 또는 유도 기간을 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제91항 또는 제92항에 있어서, 상기 조건이 22℃~28℃ 온도에서의 성장 또는 유도 기간을 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제89항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 97

제89항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 것인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 99

제97항 또는 제98항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 100

제97항 또는 제98항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 여기서 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

청구항 101

제89항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제95항에 있어서, 상청액을 회수함으로써 단백질을 회수하는 것인 방법.

청구항 103

제95항에 있어서, 단백질을 상청액으로부터 회수하는 것인 방법.

청구항 104

제95항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질은 신호 서열이 결여된 것인 방법.

청구항 105

제95항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질은 신호 서열 및 활성화 서열 둘 모두가 결여된 것인 방법.

청구항 106

제89항 내지 제92항 및 제93항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 함유하는 용액의 pH를 pH 6～12로 상승시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 107

제89항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법 .

청구항 108

제89항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계, 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계, 또는 이들 두 단계 모두를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 단백질을 자가활성화 조건에 두는 것인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 자가활성화 조건에 두는 경우 단백질은 상청액중에 존재하는 것인 방법.

청구항 111

엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법으로서,

(a) 제1 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포 배양액으로부터 회수하는 단계; 및

(c) 선택적으로, 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 활성화 조건에 노출시켜 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하여 엘라스타아제 단백질을 생산하는 것인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 활성화 조건에 노출시켜 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 재조합 프로엘라스타아제 단백질은 상기 활성화 조건에 노출하는 단계 전에 정제되는 것인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 정제하여, 상기 정제된 프로엘라스타아제 단백질 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물을 포함하는 용액이 생산되도록 하는 것인 방법.

청구항 115

제111항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 상기 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 117

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 동일한 것인 방법.

청구항 118

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상이한 것인 방법.

청구항 119

제114항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 120

제114항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 배양액 중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

청구항 121

제111항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 용액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 122

제111항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 용액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

청구항 123

제111항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 125

제111항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포의 상청액으로부터 회수하는 것인 방법.

청구항 126

제111항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화 조건이 트립신에 노출시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 127

제111항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화 조건이 자가활성화 조건인 방법.

청구항 128

제111항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 129

제111항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 131

제129항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 132

성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법으로서,

(a) 프로엘라스타아제 단백질을 동결건조하는 단계;

(b) 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 저장하는 단계;

(c) 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 재구성하는 단계; 및

(d) 재구성된 프로엘라스타아제 단백질을 활성화시키는 단계를 포함하여 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 것인 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질이 재조합체인 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질은, (i) 프로엘라스타아제 단백질이 발현되는 조건하에서 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 프로엘라스타아제 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 과정에 의해 제조하거나 또는 수득할 수 있는 것인 방법.

청구항 135

제134항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 137

제132항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 것인 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 139

제137항 또는 제138항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 140

제137항 또는 제138항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

청구항 141

제132항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포의 상청액으로부터 회수하는 것인 방법.

청구항 142

제132항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 동결건조 단계 전에 정제하는 것인 방법.

청구항 143

제132항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 1일 이상, 1주 이상, 1개월 이상 또는 3개월 이상의 기간 동안 저장하는 것인 방법.

청구항 144

제132항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 -80℃~+4℃의 온도에서 저장하는 것인 방법.

청구항 145

제132항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화 단계가 트립신 활성화를 포함하는 것인 방법.

청구항 146

제132항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화 단계가 자가활성화를 포함하는 것인 방법.

청구항 147

제132항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 148

제132항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 149

제148항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 150

제148항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 151

성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법으로서, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계, 또는 이들 두 단계 모두를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 것인 방법.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질은

(a) 단백질이 발현되는 조건하에서 제84항 또는 제86항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 발현된 단백질을 회수하는 단계

를 포함하여 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 생산하는 과정에 의해 수득되거나 또는 수득가능한 것인 방법.

청구항 153

제152항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 154

제153항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 155

제152항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 것인 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 157

제155항 또는 제156항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50

mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 158

제155항 또는 제156항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

청구항 159

제152항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 발현된 단백질을 회수하는 단계는 상청액 회수를 포함하는 것인 방법.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 자가활성화 단계를 상청액중에서 수행하는 것인 방법.

청구항 161

제152항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 발현된 단백질을 상청액으로부터 회수하는 것인 방법.

청구항 162

제161항에 있어서, 상기 자가활성화 단계를 상청액중에서 수행하는 것인 방법.

청구항 163

제161항에 있어서, 발현된 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 164

제151항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계는, 회수된 단백질을 함유하는 용액의 pH를 상승시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 165

제164항에 있어서, 용액의 pH를 염기성 pH로 상승시키는 것인 방법.

청구항 166

제165항에 있어서, 염기성 pH가 7～9의 범위인 방법.

청구항 167

제166항에 있어서, 염기성 pH가 8인 방법.

청구항 168

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 10 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 169

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 170

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 2 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 171

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 1 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 172

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 173

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.25 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 174

제165항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.1 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 175

제165항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.2 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 176

제165항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질을 0.5~8 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 177

제174항에 있어서, 회수된 단백질을 2~7 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 178

제177항에 있어서, 회수된 단백질을 6 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 179

제165항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기성 pH에 노출을 22℃~28℃의 온도에서 수행하는 것인 방법.

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 염기성 pH에 상기 노출을 26℃의 온도에서 수행하는 것인 방법.

청구항 181

제152항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질을 자가활성화전에 저장하는 것인 방법.

청구항 182

제181항에 있어서, 회수된 단백질을 저장 전에 동결건조하는 것인 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 회수된 단백질을 동결건조 전에 정제하는 것인 방법.

청구항 184

제181항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질을 1일 이상, 1주 이상, 1개월 이상 또는 3개월

이상의 기간 동안 저장하는 것인 방법.

청구항 185

제184항에 있어서, 회수된 단백질을 80℃～+4℃의 온도에서 저장하는 방법.

청구항 186

제160항 또는 제162항에 종속되지 않는 한 제150항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제를 자가활성화 조건에 두기 전에 정제하는 것인 방법.

청구항 187

제150항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 188

제150항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 189

제150항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 190

성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법으로서,

a) 단백질이 발현되는 조건하에서 제84항 또는 제86항의 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 발현된 단백질을 회수하는 단계;

(c) 회수된 단백질을 정제하는 단계;

(d) 단백질을 함유하는 용액의 pH를 상승시키거나, 또는 회수된 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시켜 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 192

제191항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 193

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 것인 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 195

제193항 또는 제194항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 196

제193항 또는 제194항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

청구항 197

제190항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, (e) 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 198

제190항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 199

제190항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 200

성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법으로서,

(a) 단백질이 발현되는 조건하에서 제84항 또는 제86항의 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 발현된 단백질을 회수하는 단계;

(c) 회수된 단백질을 성숙한 단백질이 생산될 때까지 염기성 pH에 노출시키는 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 것인 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

청구항 203

제200항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 것인 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산나트륨, 석신산나트륨 또는 아세트산나트륨인 방법.

청구항 205

제203항 또는 제204항에 있어서, 1종의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 206

제203항 또는 제204항에 있어서, 1종 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

청구항 207

제200항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH가 7~9인 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, 염기성 pH가 8인 방법.

청구항 209

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 10 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 210

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 211

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 2 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 212

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 1 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 213

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 0.5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 214

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 0.25 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 215

제209항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 0.1 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 216

제209항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 염기성 pH에 노출되는 경우 회수된 단백질이 0.2 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 217

제200항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 회수된 단백질을 0.5~8 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 218

제217항에 있어서, 회수된 단백질을 2~7 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 219

제218항에 있어서, 회수된 단백질을 6 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 것인 방법.

청구항 220

제220항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기성 pH에 노출을 22℃~28℃의 온도에서 수행하는 것인 방법.

청구항 221

제220항에 있어서, 상기 염기성 pH에 노출을 26℃의 온도에서 수행하는 것인 방법.

청구항 222

제200항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, (d) 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 223

제150항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제인 방법.

청구항 224

제150항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 인간의 성숙한 제I형 엘라스타아제인 방법.

청구항 225

성숙한 엘라스타아제 단백질의 제형을 생산하는 방법으로서,

(a) 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두어 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계; 및

(b) 성숙한 엘라스타아제 단백질을 제형화하는 단계

를 포함하여 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제형을 생산하는 것인 방법.

청구항 226

제225항에 있어서, 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질이 재조합체인 방법.

청구항 227

제226항에 있어서, (a) 단계 이전에, 프로엘라스타아제 단백질이 발현되는 조건하에서 성장한, 상기 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포의 배양액으로부터 프로엘라스타아제 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 228

제225항 또는 제226항에 있어서, (b) 단계 이전에, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 229

제225항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형화 단계가 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 동결건조 이전에 성숙한 엘라스타아제 단백질을 완충액 또는 완충액 구성성분과 혼합하지 않는 것인 방법.

청구항 231

제230항에 있어서, 동결건조 후에 성숙한 엘라스타아제 단백질을 하나 이상의 완충액 구성성분과 혼합하는 것인 방법.

청구항 232

제229항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조 이전에 완충액 또는 하나 이상의 완충액 구성성분과 혼합하는 것인 방법.

청구항 233

제231항 또는 제232항에 있어서, 완충액이 포스페이트 완충된 염수("PBS") 완충액이거나 또는 완충액 구성성분이 PBS 완충액 구성성분인 방법.

청구항 234

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 덱스트란을 포함하거나 또는 완충액 구성성분이 덱스트란을 포함하는 것인 방법.

청구항 235

제234항에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 방법.

청구항 236

제230항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 237

제229항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형화 단계가 동결건조된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 액체로 재구성하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 238

제237항에 있어서, 액체가 물인 방법.

청구항 239

제237항에 있어서, 액체가 완충액인 방법.

청구항 240

제239항에 있어서, 완충액이 완전 강도 완충액, 완전 강도 초과 완충액, 또는 완전 강도 미만 완충액인 방법.

청구항 241

제237항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 재구성시 완전 강도 완충액, 완전 강도 초과 완충액, 또는 완전 강도 미만 완충액중의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 용액을 생산하는 것인 방법.

청구항 242

제241항에 있어서, 완충액 구성성분이 동결건조물에 존재하거나, 재구성시 첨가되거나, 또는 이들 둘 모두인 방법.

청구항 243

제240항 내지 제242항 중 어느 한 항에 있어서, 완전 강도 완충액이 1X PBS를 포함하는 것인 방법.

청구항 244

제240항 또는 제241항에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.1X PBS~0.5X PBS를 포함하는 것인 방법.

청구항 245

제244항에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.1X PBS를 포함하는 것인 방법.

청구항 246

제244항에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.5X PBS를 포함하는 것인 방법.

청구항 247

제240항 또는 제241항에 있어서, 완전 강도 초과 완충액이 1.1X PBS~3X PBS를 포함하는 방법.

청구항 248

제247항에 있어서, 완전 강도 초과 완충액이 1.5X PBS~2X PBS를 포함하는 방법.

청구항 249

제241항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 덱스트란을 포함하는 것인 방법.

청구항 250

제249항에 있어서, 덱스트란이 덱스트란 18인 방법.

청구항 251

제241항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 252

제241항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 pH 7~8로 존재하는 것인 방법.

청구항 253

제252항에 있어서, 완충액이 pH 7.4로 존재하는 것인 방법.

청구항 254

제237항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 0.001 ㎎/㎖~50 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 것인 방법.

청구항 255

제254항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 0.1 ㎎/㎖~40 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 것인 방법.

청구항 256

제255항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 5 ㎎/㎖~30 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 것인 방법.

청구항 257

제256항에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 10 ㎎/㎖~20 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 것인 방법.

청구항 258

제225항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형이 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물인 방법.

청구항 259

제225항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 260

제225항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스

타아제 단백질인 방법.

청구항 261

동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 방법으로서,

(a) 제151항 내지 제181항 중 어느 한 항의 방법에 따라 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계;

(b) 성숙한 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계; 및

(c) 상기 단리된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 동결건조하는 단계를 포함하여 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 것인 방법.

청구항 262

제261항에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 95%~100% 순수한 것인 방법.

청구항 263

제261항 또는 제262항에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 95% 이상 순수한 것인 방법.

청구항 264

제261항 또는 제262항에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 98% 이상 순수한 것인 방법.

청구항 265

제261항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 균질하게 정제되는 것인 방법.

청구항 266

제261항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 267

제261항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 268

제130항, 제149항, 제188항, 제198항, 제223항, 제259항, 또는 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 것인 방법.

청구항 269

제268항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 것인 방법.

청구항 270

제131항, 제150항, 제189항, 제199항, 제224항, 제260항, 또는 제268항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 39로 구성되는 것인 방법.

청구항 271

제111항 내지 제128항, 제132항 내지 제148항, 제151항 내지 제197항 또는 제225항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질이 제13항 내지 제27항 중 어느 한 항의 단백질인 방법.

청구항 272

제200항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 발현된 단백질이 제13항 내지 제27항 중 어느 한 항의 단백질인 방법.

청구항 273

제149항, 제188항, 제198항, 및 제223항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

청구항 274

제273항에 있어서, 1~40 U/㎎-단백질의 비활성도를 갖는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

청구항 275

제150항, 제189항, 제199항, 및 제224항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제.

청구항 276

제275항에 있어서, 10~100 U/㎎-단백질의 비활성도를 갖는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

청구항 277

치료 유효량의 (a) 제273항 또는 제274항의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제259항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 약학 조성물.

청구항 278

제277항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 279

제278항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 280

치료 유효량의 (a) 제275항 또는 제276항의 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제260항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 약학 조성물.

청구항 281

제280항에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 39로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 282

(i) 치료 유효량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 약학 조성물:

(a) 조성물이 트립신을 함유하지 않는 특성;

(b) 조성물이 트립신이 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(c) 조성물이 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70 및/또는 71로 구성된 임의의 단백질을 함유하지 않는 특성;

(d) 조성물에 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70 및/또는 71로 구성된 임의의 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(e) 조성물이 박테리아 단백질을 함유하지 않는 특성;

(f) 조성물이 박테리아 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(g) 조성물이 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 함유하지 않는 특성;

(h) 조성물이 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성.

청구항 283

(i) 치료 유효량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 약학 조성물:

(a) 조성물이 트립신을 함유하지 않는 특성;

(b) 조성물이 트립신을 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(c) 조성물이 서열 번호 70 및 71로 구성된 임의의 단백질을 함유하지 않는 특성;

(d) 조성물이 서열 번호 2 및 3으로 구성된 임의의 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(e) 조성물이 박테리아 단백질을 함유하지 않는 특성;

(f) 조성물이 박테리아 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성;

(g) 조성물이 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 함유하지 않는 특성;

(h) 조성물에 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 특성.

청구항 284

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 2개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 285

제284항에 있어서, 상기 2개 이상의 특성이 (a) 및 (c)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 286

제284항에 있어서, 상기 2개 이상의 특성이 (b) 및 (d)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 287

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 3개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 288

제284항에 있어서, 상기 3개 이상의 특성이 (a), (c) 및 (e)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 289

제284항에 있어서, 상기 3개 이상의 특성이 (b), (d) 및 (f)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 290

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 4개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 291

제284항에 있어서, 상기 4개 이상의 특성이 (a), (c), (e) 및 (g)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 292

제284항에 있어서, 상기 4개 이상의 특성이 (b), (d), (f) 및 (h)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 293

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 5개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 294

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 6개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 295

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)중 7개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 296

제282항 또는 제283항에 있어서, (a)~(h)의 모든 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 297

제282항 내지 제296항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 85, 86, 94 및 95로 구성된 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

청구항 298

제282항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 85 및 서열 번호 86으로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

청구항 299

제282항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 94 및 서열 번호 95로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

청구항 300

제282항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 106, 107 및 108로 구성된 1개, 2개, 또는 3개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

청구항 301

제282항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용되는 수준의 내독소를 함유하는 약학 조성물.

청구항 302

제301항에 있어서, 상기 약학 조성물이 액체 조성물이고, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 8 EU/㎖ 또는 그 미만인 약학 조성물.

청구항 303

제302항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 5 EU/㎖ 또는 그 미만인 약학 조성물.

청구항 304

제301항에 있어서, 상기 약학 조성물이 고체 조성물이고, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 1그램 당 10 EU 또는 그 미만인 약학 조성물.

청구항 305

제304항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 1그램 당 5 EU 또는 그 미만인 약학 조성물.

청구항 306

제282항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 1~40 U/㎎-단백질의 비활성도를 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 307

제306항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 25~35 U/㎎-단백질의 비활성도를 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 308

제306항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 10 U/㎎-단백질을 넘는 비활성도를 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 309

제306항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 20 U/㎎-단백질을 넘는 비활성도를 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 310

제282항 내지 제309항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 실질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 311

제310항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 실질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 312

제282항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 트립신 활성이 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 4 ng 미만에 상응하는 것인 약학 조성물.

청구항 313

제312항에 있어서, 트립신 활성이 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 2 ng 미만에 상응하는 것인 약학 조성물.

청구항 314

1 ㎎/㎖의 단백질 농도로 재구성되는 경우, 트립신 활성이 2 ng/㎖ 트립신 미만에 상응하는 것인, 실질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성된 단백질의 동결건조된 제형.

청구항 315

제314항에 있어서, 수분 함량이 5% 미만인 동결건조된 제형.

청구항 316

제315항에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 및 클로라이드 이온을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 317

제315항에 있어서, 폴리소르베이트-80을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 318

제315항에 있어서, 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 319

제318항에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

청구항 320

제311항에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 폴리소르베이트-80을 포함하

는 동결건조된 제형.

청구항 321

제314항에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 322

제321항에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

청구항 323

제314항에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온, 폴리소르베이트-80, 및 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 324

제323항에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

청구항 325

실질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성된 단백질의 0.1 ㎎/㎖ 이상의 용액을 포함하고, 여기서 트립신 활성이 2 ng/㎖ 트립신 미만에 상응하는 것인 액체 제형.

청구항 326

제325항에 있어서, 용액이 완충된 용액인 액체 제형.

청구항 327

제326항에 있어서, 용액이 pH 7~8로 완충된 액체 제형.

청구항 328

제326항에 있어서, 용액이 PBS인 액체 제형.

청구항 329

제328항에 있어서, 용액이 137 mM 염화나트륨, 2.7 mM 인산칼륨, 및 10 mM 인산나트륨을 포함하는 액체 제형.

청구항 330

제325항 내지 제329항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 부형제를 추가로 포함하는 액체 제형.

청구항 331

제330항에 있어서, 상기 하나 이상의 부형제가 덱스트란-18을 포함하는 것인 액체 제형.

청구항 332

제331항에 있어서, 덱스트란-18이 상기 용액의 8% 중량/부피의 양으로 존재하는 것인 액체 제형.

청구항 333

제330항에 있어서, 상기 하나 이상의 부형제가 폴리소르베이트-80을 포함하는 것인 액체 제형.

청구항 334

제333항에 있어서, 폴리소르베이트-80이 상기 용액의 0.01% 중량/부피의 양으로 존재하는 것인 액체 제형.

청구항 335

제325항 내지 제334항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액중 상기 단백질의 농도가 0.001 ㎎/㎖~40 ㎎/㎖의 범

위인 액체 제형.

청구항 336

제335항에 있어서, 상기 용액중 상기 단백질의 농도가 0.1 ㎎/㎖～20 ㎎/㎖ 범위인 액체 제형.

청구항 337

제325항 내지 제336항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 보존제, 가용화제 및 착색제를 추가로 포함하는 액체 제형.

청구항 338

제325항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 5, 84 또는 87의 상기 단백질 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 액체 제형.

청구항 339

제325항 내지 제338항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 액체 제형.

청구항 340

제225항 내지 제258항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되거나 수득가능한 제형.

청구항 341

제340항에 있어서, 액체 제형인 제형.

청구항 342

제340항 또는 제341항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 제형.

청구항 343

제342항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 것인 제형.

청구항 344

제342항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 것인 제형.

청구항 345

제340항 또는 제341항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제1형 엘라스타아제 단백질인 제형.

청구항 346

제345항에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 39로 구성되는 것인 제형.

청구항 347

정확하게 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 제거하는 방법으로서,

(a) 정확하게 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물을 포함하는 조성물을 정확하게 프로세싱된 성숙한 효소가 활성있는 pH 조건에 두는 단계;

(b) 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 분해될 때까지 이러한 pH를 유지시키는 단계

를 포함하여 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정확하게 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 제거하는 것인 방법.

청구항 348

제347항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질과 비교하여 1 이상의 추가되거나 또는 더 적은 아미노산을 N-말단에 함유하는 것인 방법.

청구항 349

제347항 또는 제348항에 있어서, 상기 pH가 5~12인 방법.

청구항 350

제347항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~100% 분해하는 것인 방법.

청구항 351

제348항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~99% 분해하는 것인 방법.

청구항 352

제348항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~98% 분해하는 것인 방법.

청구항 353

제348항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~95% 분해하는 것인 방법.

청구항 354

제348항에 있어서, 상기 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~90% 분해하는 것인 방법.

청구항 355

제350항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 1 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 356

제355항에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 50% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 357

제350항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 75% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 358

제357항에 있어서, 1 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 75% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 359

제357항에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 75% 이상 분해하는 것

인 방법.

청구항 360

제350항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 1 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 90% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 361

제360항에 있어서, 1 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 90% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 362

제360항에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 90% 이상 분해하는 것인 방법.

청구항 363

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 10 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 364

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 365

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 2 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 366

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 1 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 367

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 0.5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 368

제347항 내지 제362항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 0.25 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 369

제363항 내지 제368항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 0.1 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 370

제363항 내지 제368항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 총 엘라스타아제 단백질이 0.2 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

청구항 371

제347항 내지 제370항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물중 트립신 활성이 총 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 4 ㎚/㎖ 트립신 미만인 방법.

청구항 372

제347항 내지 제370항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물중 트립신 활성이 총 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 2 ng/㎖ 트립신 미만인 방법.

청구항 373

제347항 내지 제372항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 서열 번호 104로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고/않거나, 서열 번호 105로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 것인 방법.

청구항 374

성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 방법으로서, (i) 제261항 내지 제265항 중 어느 한 항의 방법에 의해 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계; 및 (ii) 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 물 또는 약학적으로 허용되는 담체에 재구성하는 단계를 포함하여 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 것인 방법.

청구항 375

성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 방법으로서, 제314항 내지 제324항 중 어느 한 항의 동결건조된 제형을 물 또는 약학적으로 허용되는 담체에 재구성하는 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 것인 방법.

청구항 376

제374항 또는 제375항에 있어서, 약학 조성물이 포스페이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 377

제374항 내지 제376항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제인 방법.

청구항 378

제377항에 있어서, 1~40 U/㎎-단백질의 비활성도를 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 379

제377항에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 25~35 U/㎎-단백질의 비활성도를 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 380

제377항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 비활성을 60%~100% 유지하는 것인 방법.

청구항 381

제377항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 비활성을 60%~98% 유지하는 것인 방법.

청구항 382

제377항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 비활성을 60%~95% 유지하는 것인 방법.

청구항 383

제377항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 비활성을 60%~90% 유지하는 것인 방법.

청구항 384

제377항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 비활성을 60%~80% 유지하는 것인 방법.

청구항 385

제377항 내지 제384항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 저장한 후 비활성을 70% 이상 유지하는 것인 방법.

청구항 386

제374항 내지 제385항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 약학 조성물.

청구항 387

동맥 또는 정맥의 직경을 치료적으로 증가시키는 것이 요구되는 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 직경을 치료적으로 증가시키는 방법으로서, 동맥 또는 정맥의 직경을 증가시키기에 충분한 용량으로 (a) 제277항 내지 제313항, 또는 제386항 중 어느 한 항의 약학 조성물, (b) 제325항 내지 제339항 중 어느 한 항의 액체 제형, 또는 (c) 제341항의 제형을 인간 피험체의 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 388

제387항에 있어서, 혈관의 직경, 혈관의 내강 직경, 또는 둘 모두를 증가시키는 것인 방법.

청구항 389

동맥 또는 정맥의 혈관 경련을 예방하거나 치료하는 것이 요구되는 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 혈관 경련을 예방 또는 치료하는 방법으로서, 동맥 또는 정맥의 혈관 경련을 예방 또는 치료하기에 충분한 용량으로 (a) 제277항 내지 제313항 및 제386항 중 어느 한 항의 약학 조성물, (b) 제325항 내지 제339항 중 어느 한 항의 액체 제형, 또는 (c) 제341항의 제형을 인간 피험체의 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 390

폐색된 동맥 또는 정맥의 치료가 요구되는 인간 피험체에서 폐색된 동맥 또는 정맥을 치료하는 방법으로서, (a) 제277항 내지 제313항 및 제386항 중 어느 한 항의 약학 조성물, (b) 제325항 내지 제339항 중 어느 한 항의 액체 제형, 또는 (c) 제341항의 제형을 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 투여는 동맥 또는 정맥 벽 내 엘라스틴의 가수분해를 일으켜서 동맥 또는 정맥의 직경이 확장되도록하는 것인 방법.

청구항 391

동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관에 연결된 동맥 또는 정맥을 치료하는 것이 요구되는 인간 피험체에서 동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관에 연결된 동맥 또는 정맥을 치료하는 방법으로서, (a) 제277항 내지 제313항 및 제386항 중 어느 한 항의 약학 조성물, (b) 제325항 내지 제339항 중 어느 한 항의 액체 제형, 또는 (c) 제341항의 제형을 인간 피험체의 동맥 또는 정맥 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 투여는 여기서 상기 투여는 동맥 또는 정맥 벽 내 엘라스틴의 가수분해를 일으켜서 동맥 또는 정맥의 직경이 확장되도록하는 것인 방법.

청구항 392

혈액투석에 사용하기 위해 인간 피험체의 정맥을 치료하는 방법으로서, (a) 제277항 내지 제313항 및 제386항 중 어느 한 항의 약학 조성물, (b) 제325항 내지 제339항 중 어느 한 항의 액체 제형, 또는 (c) 제341항의 제형을 인간 피험체의 정맥 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 투여는 동맥 또는 정맥 벽 내 엘라스틴의 가수분해를 일으켜서 동맥 또는 정맥의 직경이 확장되도록하는 것인 방법.

청구항 393

제387항 내지 제392항 중 어느 한 항에 있어서, 전달 장치의 일부를 동맥 또는 정맥 벽내로 삽입하여 엘라스타아제를 동맥 또는 정맥 벽에 전달하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 394

제387항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 카테터에 의해 투여하는 것인 방법.

청구항 395

제387항 내지 제394항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 동맥 또는 정맥 벽에 직접 투여하는 것인 방법.

청구항 396

제387항 내지 제395항 중 어느 한 항에 있어서, 동맥 또는 정맥이 폐색된 것인 방법.

청구항 397

제396항에 있어서, 동맥 또는 정맥이 협착에 의해 폐색된 것인 방법.

청구항 398

제397항에 있어서, 폐색은 치료 이전에 불충분한 부피의 혈액 통과를 허용하는 것인 방법.

청구항 399

제398항에 있어서, 폐색이 협착인 방법.

청구항 400

제399항에 있어서, 동맥 또는 정맥이 내막 비후(intimal hyperplasia)에 의해 폐색되는 것인 방법.

청구항 401

제387항 내지 제400항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 폐색된 관상 동맥 또는 말초 동맥에 투여하는 것인 방법.

청구항 402

제387항 내지 제395항 중 어느 한 항에 있어서, 동맥 또는 정맥이 내막 비후에 의한 폐색에 민감한 것인 방법.

청구항 403

제387항 내지 제400항 또는 제402항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 정맥 벽에 투여하는 것인 방법.

청구항 404

제403항에 있어서, 정맥이 동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관에 연결된 것인 방법.

청구항 405

제404항에 있어서, 정맥을 혈액투석에 사용하기 위한 것인 방법.

청구항 406

제405항에 있어서, 정맥을 동맥에 직접 연결하거나 또는 이식편을 경유하여 정맥을 동맥에 연결하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 407

제387항 내지 제394항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 외과적으로 노출된 동맥 또는 정맥의 외막 표면에 투여하는 것인 방법.

청구항 408

제387항 내지 제407항 중 어느 한 항에 있어서, 각각 상기 약학 조성물, 액체 제형 또는 제형중의 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 인간 제1형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 409

제408항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 것인 방법.

청구항 410

제408항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 것인 방법.

청구항 411

제387항 내지 제407항 중 어느 한 항에 있어서, 각각 상기 약학 조성물, 액체 제형 또는 제형중 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

청구항 412

제411항에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 39로 구성되는 것인 방법.

청구항 413

0.0033 ㎎~200 ㎎의 (a) 제273항 또는 제274항의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제259항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 단위 투여제(unit dosage).

청구항 414

제413항에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 것인 단위 투여제.

청구항 415

0.0033 ㎎~200 ㎎의 (a) 제275항 또는 제276항의 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제260항의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 것인 단위 투여제.

청구항 416

제415항에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 실질적으로 서열 번호 39로 구성되는 것인 단위 투여제.

청구항 417

제413항 내지 제416항 중 어느 한 항에 있어서, 0.5 ㎎~50 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

청구항 418

제417항에 있어서, 1 ㎎~20 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

청구항 419

제418항에 있어서, 5 ㎎~10 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

청구항 420

제413항 내지 제419항 중 어느 한 항에 있어서, 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터 내에 존재하는 단위 투여제.

청구항 421

제1항 내지 제39항, 제68항 또는 제69항 중 어느 한 항에 따르거나, 또는 제89항 내지 제224항, 제261항 내지 제276항, 및 제347항 내지 제373항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 엘라스타아제 단백질, 제40항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 핵산, 제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 따른 벡터, 제73항 내지 제87항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제88항에 따른 세포 배양 상청액, 제314항 내지 제346항 중 어느 한 항에 따르거나, 또는 제261항 내지 제276항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 엘라스타아제 제형, 제277항 내지 제313항 및 제386항 중 어느 한 항의 방법에 따르거나, 또는 제374항 내지 제385항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 약학 조성물, 또는 제415항 내지 제420항 중 어느 한 항에 따른 단위 투여제를 포함하는 키트.

청구항 422

제421항에 있어서, 치료학적 키트인 키트.

청구항 423

제422항에 있어서, 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터를 포함하는 키트.

청구항 424

제423항에 있어서, 제작 키트인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 2007년 12월 4일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/992,319호(이의 내용은 본원에 참고로 이의 전체가 인용되어 있음)의 우선권을 청구한다.

[0002] 1. **발명의 분야**

[0003] 본 발명은 생물학적 전달관(biological conduit)의 질병을 치료 및 예방하는데 사용하기 위한 엘라스타아제 단백질을 제조하고 제형화하는 재조합 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 신규한 재조합 엘라스타아제 단백질 및 이러한 단백질을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또한 추가로, 본 발명은 생물학적 전달관의 질병을 치료 및 예방하기 위한 재조합 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 2. **발명의 배경**

[0005] 엘라스틴은 신장된 후 자발적으로 리코일링(recoiling)할 수 있는 단백질이다. 가교결합된 엘라스틴은 조직 탄성을 부여하는 탄성 섬유의 주요 구조적 성분이다. 프로테이나아제(proteinase)가 성숙한 가교결합된 엘라스틴을 가용화시키는 능력을 가진다면 이는 엘라스타아제로 지칭될 수 있다(Bieth, JG "Elastases: catalytic and biological properties," at pp. 217-320(Mecham Edition, Regulation of Matrix Accumulation, New York, Academic Press, 1986)). 몇몇 공개된 특허 출원(WO 제2001/21574호; WO 제2004/073504호; 및 WO 제2006/036804호)에 따르면, 엘라스타아제는, 단독으로 및 다른 제제와 조합하여, 혈관폐색 및 혈관경련을 겪거나 겪기 쉬운 생물학적 전달관을 비롯한 생물학적 전달관의 질병의 치료에 있어서 유리하다. 인간 피험체에 대한 엘라스타아제 요법을 위하여, 비인간 엘라스타아제에 대한 면역 반응의 위험을 감소시키기 위해 인간 엘라스타아제의 사용이 요망된다.

[0006] 그러나 이제까지, 생물학적 활성 엘라스타아제를 임상적으로 적용하기 위해 충분히 순수한 형태로 및 충분한 양으로 생산하는 상업적으로 실행가능한 수단이 알려지지 않았다. 엘라스타아제는 엘라스틴 이외의 다수의 단백질을 가수분해할 수 있는 강력한 프로테아제(protease)이므로, 엘라스타아제의 단백질 가수분해 활성은 이의 재조합 생산에 대해 상당한 지장을 초래한다. 예를 들면, 성숙한 엘라스타아제의 활성은 이를 발현하는 숙주 세포를 손상시키거나, 그 자체를 분해하거나, 엘라스타아제의 생산 또는 특징화에 도움을 주기 위해 사용되는 제제를 분해할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 엘라스타아제는 단일 펩티드, 활성화 펩티드 및 성숙한 활성 부분을 함유하는 프리프로단백질(preproprotein)로서 종종 발현된다. 분비시 신호 서열의 분할은 효소적 활성이 거의 없거나 전혀 없을 수 있는 프로단백질(proprotein)을 산출하고, 그의 아미노산 서열은 활성화 펩티드 및 성숙한 단백질의 아미노산 서열을 함유한다. 일반적으로, 재조합체 발현을 위해, 불활성 전구체는 성숙한 활성 효소 대신 발현되어 이를 발현하는 세포에 대한 손상을 회피한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,212,068호에는 인간 췌장 엘라스타아제 cDNA의 클로닝이 기재되어 있다(여기에서는 엘라스타아제 "IIA," "IIB," "IIIA" 및 "IIIB"로 지칭됨). 다양한 엘라스타아제는, 포유동물 COS-1 세포에서 고유의 신호 서열을 포함하여, 전장(full-length) cDNA로서 발현되었다. 또한, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 신호 서열 및 β-갈락토시다아제(galactosidase) 신호 서열을 함유하는 엘라스타아제의 조작된 형태는, 또한 비. 서브틸리스 및 이. 콜라이(*E. coli*)에서 각각 발현되었다. 미국 특허 제5,212,068호에는 또한 에스. 세레비지아(*S. cerevisiae*)에서 엘라스타아제를 발현함이 제안되어 있다. 일반적으로, 미국 특허 제5,212,068호에서 엘라스타아제 발현의 실시예는 회수된 엘라스타아제의 낮은 활성을 제시하거나, 활성 엘라스타아제를 생성하기 위해 트립신에 의한 처리를 포함하는 활성화 단계를 필요로 한다. 또한, 엘라스타아제는 이. 콜라이에서 발현될 경우 대부분 봉입체(inclusion body)내에 존재하였고, 발현된 엘라스타아제의 단지 적은 부분만이 가용성이고 활성이었다. 미국 특허 제5,212,068호에 기재된 엘라스타아제 제조물중 어느 것도 약학 등급으로 정제되지 않았다.

[0008] 따라서, 생물학적으로 활성인 약학 등급의 엘라스타아제의 치료량을 생성할 수 있고, 바람직하게는 대규모 제조를 위해 고가이고 최종 생성물의 트립신 오염을 일으킬 수 있는 트립신 활성화 단계를 방지할 수 있는 재조합체 제조 방법이 당 분야에 필요하다. 환자에게 트립신이 함유된 엘라스타아제를 투여하면 프로테아제 활성화된 수용체 1 및 2의 활성화를 일으킬 수 있고, 이는 엘라스타아제 치료의 몇몇 유리한 효과를 감소시킬 수 있다.

[0009] 섹션(section) 2 또는 본원의 임의의 다른 섹션에서 임의의 참고문헌의 인용이나 확인은, 이러한 참고문헌이 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용가능함을 인정하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

과제의 해결 수단

[0010] **3. 발명의 요약**

[0011] 본 발명은 재조합 엘라스타아제 단백질을 제조하는 신규하고 유용한 방법 및 생물학적 전달관의 질병을 치료하고 예방하기 위한 조성물, 예를 들어 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제에서의 재조합 단백질의 용도를 제공한다.

[0012] 본 발명은 자가 활성화된(auto-activated) 프로엘라스타아제 단백질, 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포, 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 제조하는 방법, 및 성숙한 생물학적 활성 엘라스타아제 단백질의 제작에 있어서, 예를 들면 약학 제형에서 사용하기 위한 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 용도에 관한 것이다. 용어 "자가 활성화된"(또는 "자가활성화된(autoactivated)")은 본원에서 용어 "자가 활성화", "자기 활성화(self-activating)", 및 "자기 활성화된(self-activated)"과 상호교환적으로 사용되고, 활성화 단계가 발생하였음을 내포하는 것으로 의도되지 않는다. 용어 "활성화"는 본원에서 용어 "전환"과 상호교환적으로 사용되고, "활성화"로부터 야기되는 단백질이 필수적으로 효소 활성을 소유함을 내포하는 것으로 의도되지 않는다.

[0013] 이후 본원에서 사용될 경우, 달리 지시되지 않는 한, 용어 "엘라스타아제"는 일반적으로 엘라스타아제 활성을 갖는 성숙한 엘라스타아제 단백질, 뿐만 아니라 미숙한 프로엘라스타아제 단백질(또한 본원에 엘라스타아제 프로단백질로 지칭됨) 및 미숙한 프리프로엘라스타아제 단백질(또한 본원에 엘라스타아제 프리프로단백질로 지칭

됨)을 비롯한 미숙한 엘라스타아제 단백질을 지칭한다.

[0014] 본 발명의 바람직한 엘라스타아제는 제I형 췌장 엘라스타아제, 예를 들어, 인간 제I형 췌장 엘라스타아제 및 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제이다. 제I형 췌장 엘라스타아제는 때때로 "엘라스타아제-1", "엘라스타아제 I", "엘라스타아제 제1형", "제1형 엘라스타아제" 또는 "ELA-1"로 지칭된다. 인간 제I형 췌장 엘라스타아제는 또한 본원에 hELA-1 또는 인간 ELA-1로 지칭되고, 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제는 또한 본원에 pELA-1 또는 돼지 ELA-1로 지칭된다.

[0015] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질은 전형적으로 자연적으로 발생된 엘라스타아제 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 이러한 서열의 변형체를 갖는다. 아미노산 치환을 함유하는 변형체를 비롯한 바람직한 서열 변형체가 본원에 기재되어 있다. 프로엘라스타아제 단백질은 성숙한 엘라스타아제 단백질의 대부분의 불활성인 전구체이고, 프리프로엘라스타아제 단백질은 단백질 분비를 위한 신호 서열을 추가로 함유한다. 본 발명의 엘라스타아제 단백질의 프리(pre) 서열 및 프로(pro) 서열은 전형적으로 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 엘라스타아제 유전자에 대해 고유적이지 않다. 따라서, 어떤 의미로는, 본 발명의 미숙한 엘라스타아제 단백질은 "키메라성(chimeric)" 단백질인데, 이의 성숙한 부분은 자연적으로 발생된 엘라스타아제 유전자에 의해 코딩되고 이의 미숙한 부분은 비-엘라스타아제 유전자 서열에 의해 코딩된다.

[0016] 참고하기 편하도록, 본 발명의 엘라스타아제 단백질 및 이의 핵심 서열 성분은 도 2에 도시되어 있다. 도 2에 제시된 바와 같이, 분할 결합(즉 성숙한 엘라스타아제 단백질을 산출하도록 분할되는 결합)에 N-말단인 프로엘라스타아제 서열내의 아미노산 잔기는 본원에 PX,...P5, P4, P3, P2, 및 P1로 명시되고, 여기서 P1은 분할 결합에 바로 N-말단인 반면, 성숙한 엘라스타아제 단백질의 분할 결합(및 N-말단)에 C-말단으로 위치된 아미노산 잔기는 P1', P2', P3',...PX'로 명시되고, 여기서 P1'은 분할 결합에 바로 C-말단이고 성숙한 단백질의 N-말단 아미노산 잔기를 나타낸다. 도 2는 하기 성분을 도시한다:

[0017] (1) 신호 서열: 세포로부터 분비되는 발현된 분자의 비율을 증가시키는 서열. 한 예시적 서열은 서열 번호 50 또는 51의 아미노산 1~22이다.

[0018] (2) 프로펩티드+이격자: 하나 이상의 이격자 서열을 선택적으로 추가로 포함할 수 있는 선택적인, 바람직하게는 비-엘라스타아제, 프로펩티드 서열(예컨대, 효모 α-인자 프로펩티드)(효모 α-인자 프로펩티드 서열 및 Kex2 및 STE13 이격자 서열은 도 1B에 도시되어 있다). 구체적인 실시양태에서, 프로펩티드 서열은 이격자를 포함하지 않는다.

[0019] (3) 엘라스타아제 프로펩티드: 엘라스타아제의 N-말단 단부에 존재하는 펩티드는 상응하는 성숙한 엘라스타아제 단백질에 비하여 분자를 불활성으로 또는 덜 활성으로 만든다. 엘라스타아제 프로펩티드는 활성화 펩티드와 연속되거나 활성화 펩티드에 비해 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예시적인 엘라스타아제 프로펩티드 서열은 서열 번호 64 및 69의 아미노산 서열 1~10이다.

[0020] (4) 활성화 펩티드: 본원에서 "활성화 서열"과 상호교환적으로 사용되므로, 활성화 펩티드는 엘라스타아제 프로펩티드의 한 성분이고 이와 연속될 수 있다. 도 2에서 도시된 바와 같이, 활성화 펩티드는 아미노산 잔기 P10~P1을 함유한다. 한 예시적인 활성화 펩티드 컨센서스(consensus) 서열은 서열 번호 80이고; 활성화 펩티드 서열의 다른 예는 서열 번호 23, 72 및 73이다.

[0021] (5) 인식 서열: 인식 서열은 엘라스타아제 프로펩티드의 성분이다. 도 2에 제시된 바와 같이, 인식 서열은 아미노산 잔기 P3~P1을 함유한다. 예시적인 인식 서열 컨센서스 서열은 서열 번호 11~13 및 93이고, 한 예시적인 인식 서열은 서열 번호 20이다.

[0022] (6) 분할 도메인: 분할 결합을 포괄(span)하는 프로엘라스타아제 단백질에서의 영역. 도 2에 제시된 바와 같이, 분할 도메인은 아미노산 잔기 P5~P3'을 함유한다. 예시적인 분할 도메인 서열은 서열 번호 42, 43, 48, 49, 53, 53, 54 및 55이다.

[0023] (7) 분할 부위: 분할 결합을 포괄하는 프로엘라스타아제 단백질에서의 또 다른 영역. 도 2에 제시된 바와 같이, 분할 부위는 아미노산 잔기 P4~P4'을 함유한다. 예시적인 분할 부위 서열은 서열 번호 27이다.

[0024] (8) 프리프로엘라스타아제 단백질: 모든 성분 부분을 포함할 수 있는 단백질. 한 예시적인 프리프로엘라스타아제 단백질은 서열 번호 50, 51, 96, 또는 97의 펩티드를 포함할 수 있고, 서열 번호 64 또는 서열 번호 69의 작동적으로 연결된 단백질이 뒤따른다.

[0025] (9) 프로엘라스타아제 단백질: 성숙한 엘라스타아제 단백질, 엘라스타아제 프로펩티드, 및 선택적 프로펩티드

및 이격자 서열을 포함하는 단백질. 예시적인 프로엘라스타아제 서열은 서열 번호 64 및 69이다.

[0026] (10) 성숙한 엘라스타아제 단백질: 적절히 처리된 경우 엘라스타아제 활성을 나타내는 단백질. 예시적인 성숙한 서열은 서열 번호 1(인간) 및 서열 번호 39(돼지)이다.

[0027] 엘라스타아제 단백질 성분은 엘라스타아제 단백질, 프로엘라스타아제 단백질 및 프리프로엘라스타아제 단백질의 분자의 분자 조립 요소로 고려될 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 엘라스타아제 프로펩티드의 서열을 포함하는 프로엘라스타아제 단백질 및 성숙한 엘라스타아제 단백질을 제공한다. 엘라스타아제 프로펩티드는 활성화 펩티드를 함유할 수 있다. 엘라스타아제 프로펩티드는 또한 엘라스타아제 인식 서열을 함유할 수 있다. 본 발명은 또한 엘라스타아제 프로펩티드와 성숙한 엘라스타아제 단백질 사이의 연결점을 포괄하는 영역에서 분할 도메인 또는 분할 부위를 포함하는 프로엘라스타아제 단백질을 제공한다. 프로엘라스타아제 단백질은 추가로 분비를 위한 신호 서열을 포함한다. 이러한 단백질은 프리프로엘라스타아제 단백질로 고려된다. 프리프로엘라스타아제 단백질은 추가로 효모 알파 인자 프로펩티드 및 선택적으로 이격자 서열을 신호 서열과 엘라스타아제 프로펩티드 사이에 포함한다. 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 또한 도 2에 예시된 코어 분자 성분에 더하여 성분들을 함유할 수 있다. 예를 들면, 엘라스타아제 단백질은 에피토프(epitope) 태그 또는 히스티딘 태그를 정제를 위해 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 도 2에 도시된 모든 성분을 함유할 필요가 없지만, 일반적으로 도 2에 도시된 하나 이상의 성분(제한되지 않지만 예로서 성숙한 엘라스타아제 또는 프로엘라스타아제 서열이 포함됨)을 함유함을 또한 주지해야 한다. 본 발명의 예시적인 엘라스타아제 단백질은 하기 섹션 8에서 실시양태 13~27에 제시된 예시적인 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 비롯하여, 하기 섹션 8에서 실시양태 1~12, 28~39 및 68~69에 제시되어 있다.

[0028] 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산, 단백질을 생산하고 정제하는 방법, 재조합 세포 및 세포 배양 상청액, 엘라스타아제 단백질을 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물, 단위 투여제, 제형), 치료학적 목적을 위한 단백질의 용도, 및 단백질, 제형, 약학 조성물 및 단위 투여제를 포함하는 키트는 본원에 내포된다. 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산은 벡터(예를 들어, 실시양태 70~72 참조)를 비롯하여 하기 섹션 8에서 실시양태 40~67에 예시되어 있다. 재조합 세포(예를 들어, 실시양태 73~84 참조), 엘라스타아제 단백질(예를 들어, 실시양태 88 참조)를 함유하는 세포 상청액이 또한 섹션 8에서 예시되어 있다. 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 방법이 섹션 8에서 실시양태 89~224, 261~276 및 347~373에 예시되어 있다. 엘라스타아제 제형을 생산하기 위한 방법은 섹션 8에서 실시양태 225~260에 예시되어 있다. 약학 조성물을 생산하는 방법은 섹션 8에서 실시양태 374~385에 예시되어 있다. 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물은 섹션 8에서 실시양태 277~313 및 386에 예시되어 있다. 엘라스타아제 단백질의 제형은 섹션 8에서 실시양태 324~346에 예시되어 있다. 치료학적 목적을 위한 엘라스타아제 단백질의 용도는 섹션 8에서 실시양태 387~414에 예시되어 있다. 단백질을 포함하는 키트는 실시양태 421~424에 의해 섹션 8에 예시되어 있다.

[0029] 약학 조성물, 및/또는 서열 번호 64 및 69를 갖는 프로엘라스타아제 단백질에 대한 본 발명의 다양한 양태는 하기 섹션 8에서 실시양태 425~472로서 예시되어 있지만; 그러나, 이러한 실시양태는 본원에 개시된 다른 엘라스타아제 단백질 서열 및 조성물에 적용가능하다.

[0030] 본원에 개시된 생산 방법은 종종 활성화 단계를 포함하고, 이 단계에 의해 활성화 펩티드는 프로엘라스타아제 서열로부터 제거되고/성숙한 엘라스타아제 서열로부터 분리되고, 이로써 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생성한다. 본원에 기재된 활성화 단계는 자가 활성화 단계일 수 있거나, 즉 엘라스타아제 활성에 의해 수행되거나, 또는 비자가 활성화 단계일 수 있다, 즉 비-엘라스타아제 중재되고, 예를 들어 트립신에 의해 수행된다.

[0031] 특정 양태에서, 본 발명은 (i) 엘라스타아제 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 펩티드 서열을 포함하는 엘라스타아제 프로펩티드를 포함하는 엘라스타아제 단백질(제한되지 않지만, 서열 번호 6~9, 64~69, 88~91, 또는 98~103중 임의의 하나의 단백질을 포함함)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 단백질은 선택적으로 추가로 신호 서열, 예컨대 효모 α-인자 신호 펩티드를 포함하고 상기 엘라스타아제 프로펩티드에 작동적으로 연결된 서열 번호 34의 아미노산 서열에 의해 예시된다. α-인자는 때때로 본원에 "알파-인자" 또는 "알파 메이팅(mating) 인자" 또는 "α-메이팅 인자"로 지칭된다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 단백질은 비-엘라스타아제 프로펩티드, 예컨대 효모 α-인자 프로펩티드를 포함한다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 단백질은 하나 이상의 이격자 서열을 포함할 수 있다. 이격자 서열로는, 제한되지 않지만, Kex2 및 STE13 프로테아제 분할 부위가 포함될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, Kex2 이격자가 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, Kex2 이격자는 도 1B에 제시된 바와 같이 STE13 이격자에 작동적으로 연결될 수 있다. 신호 펩티드 서열 및 비-엘라스타아제 프로펩티

드 서열은 서열 번호 51 또는 97의 아미노산 서열에 의해 예시된다. 신호 펩티드 서열, 비-엘라스타아제 프로펩티드 서열, 및 이격자 서열을 함유하는 펩티드는 서열 번호 50 또는 96의 아미노산 서열에 의해 예시된다.

[0032] 다른 구체적인 실시양태에서, 신호 서열은 포유동물 분비 신호 서열, 예컨대 돼지 또는 인간 제I형 엘라스타아제(제I형 췌장 엘라스타아제와 상호교환적으로 사용됨) 신호 서열이다.

[0033] 바람직하게는, 엘라스타아제 인식 서열은 제I형 췌장 엘라스타아제 인식 서열이다.

[0034] 구체적인 실시양태에서, 제I형 엘라스타아제 활성을 갖는 단백질은 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제, 예를 들면 서열 번호 1, 4, 5, 84 또는 87의 아미노산 서열의 단백질이다.

[0035] 본 발명은 또한 (i) 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결되는 (ii) 프로테아제 인식 서열(제한되지 않지만 서열 번호 11~23 및 93중 임의의 아미노산 서열을 포함함)을 포함하는 활성화 서열(제한되지 않지만 서열 번호 23, 72, 73, 또는 80의 아미노산 서열을 포함함)에 작동적으로 연결되는 (iii) 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 작동가능한 신호 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 한 바람직한 실시양태에서, 프로테아제 인식 서열은 인간 제I형 엘라스타아제 인식 서열, 가장 바람직하게는 서열 번호 20의 엘라스타아제 인식 서열이다

[0036] 본 발명의 핵산에 의해 코딩되는 프로엘라스타아제 단백질(선택적으로 신호 서열을 포함하고, 이에 따라 프리프로엘라스타아제 단백질을 나타냄) 및 성숙한 엘라스타아제 단백질은 또한 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물, 제형 및 단위 투여제)과 마찬가지로 제공된다.

[0037] 한 바람직한 실시양태에서, 프로엘라스타아제 단백질 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질은 N-말단 메티오닌 잔기를 갖지 않는다. 그러나, 또 다른 실시양태에서, 프로엘라스타아제 단백질 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질은 N-말단 메티오닌 잔기를 갖는다.

[0038] 하기 표 1은 본 명세서에서 사용된 서열 식별자를 요약한다. 본 발명의 바람직한 단백질은 하기 표 1에 열거된 1~32, 34, 37~73, 77, 78, 82~92, 및 98~105중 임의의 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 33 및 서열 번호 81의 뉴클레오티드 서열에 의해 부분적으로 또는 전체적으로 코딩된다.

[0039] [표 1a]

[0040] 아미노산 및 뉴클레오티드 서열 번호의 요약

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
제 1 "발린"을 포함하는 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	1
제 1 "발린"이 제외된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	2
처음 2 개의 "발린"이 제외된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	3
제 1 "발린"이 "알라닌"으로 치환된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	4
제 1 "발린"을 포함하는 성숙한 인간 엘라스타아제 I(이소타입 2)	아미노산	5
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 1(pPBOT42 변형체), 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	6
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 2, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	7
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 3, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	8
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 4, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	9
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 5(pPBOT24 트립신 활성화된 서열), 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	10
컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 1(위치 Xaa_3=P3, Xaa_2=P2, Xaa_1=P1)	아미노산	11

[0041]

[0042] [표 1b]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 2(위치 P3-P2-P1)	아미노산	12
컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 3(위치 P3-P2-P1)	아미노산	13
엘라스타아제 인식 서열 1(위치 P3-P2-P1)	아미노산	14
엘라스타아제 인식 서열 2(위치 P3-P2-P1)	아미노산	15
엘라스타아제 인식 서열 3(위치 P3-P2-P1)	아미노산	16
야생형 트립신 인식 서열(pPROT24)(위치 P3-P2-P1)	아미노산	17
엘라스타아제 인식 서열 5(위치 P3-P2-P1)	아미노산	18
엘라스타아제 인식 서열 6(위치 P3-P2-P1)	아미노산	19
엘라스타아제 인식 서열 7(변형체 48 및 55 의 위치 P3-P2-P1)	아미노산	20
엘라스타아제 인식 서열 8	아미노산	21
인간 엘라스타아제 활성화 서열 1	아미노산	22
인간 엘라스타아제 활성화 서열 2	아미노산	23
프로-PROT-201 분할 부위	아미노산	24
pPROT40 분할 부위	아미노산	25
pPROT41 분할 부위	아미노산	26
pPROT42 분할 부위	아미노산	27
pPROT43 분할 부위	아미노산	28
pPROT44 분할 부위	아미노산	29
pPROT45 분할 부위	아미노산	30
pPROT46 분할 부위	아미노산	31
pPROT47 분할 부위	아미노산	32
인간 엘라스타아제-1 의 코딩 영역(즉, 인간 제 I 형 췌장 엘라스타아제)(NCBI 수탁 번호 NM_001971)	뉴클레오티드	33
효모 알파 인자 신호 펩티드	아미노산	34

[0043] .

[0044] [표 1c]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
20F 프라이머	뉴클레오티드	35
24R 프라이머	뉴클레오티드	36
pPROT42 P3 분할 부위 변형 엘라스타아제, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	37
pPROT42 P2 분할 부위 변형 엘라스타아제, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	38
성숙한 돼지 췌장 엘라스타아제 I(유전자은행으로부터 수탁 번호 P00772.1)	아미노산	39
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 40	아미노산	40
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 41	아미노산	41
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 42	아미노산	42
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 43	아미노산	43
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 44	아미노산	44
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 45	아미노산	45
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 46	아미노산	46
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 47	아미노산	47
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 48	아미노산	48
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 49	아미노산	49
효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드, 프로펩티드, 및 이격자서열 1	아미노산	50
효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드 및 프로펩티드 서열 2	아미노산	51
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 52	아미노산	52
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 53	아미노산	53
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 54	아미노산	54
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 55	아미노산	55

[0045]

[0046] [표 1d]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 56	아미노산	56
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 57	아미노산	57
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 58	아미노산	58
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 59	아미노산	59
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 60	아미노산	60
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 61	아미노산	61
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 62	아미노산	62
엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 63	아미노산	63
변형 분할 도메인 48 을 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	64
변형 분할 도메인 49 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	65
변형 분할 도메인 52 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	66
변형 분할 도메인 53 을 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	67
변형 분할 도메인 54 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	68
변형 분할 도메인 55 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	69
야생형 엘라스타아제 +AlaArg 분할 변형체, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	70

[0047]

[0048] [표 1e]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
야생형 엘라스타아제 +Arg 분할 변형체, 위치 220(V 또는 L)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	71
변형체 48 인간 엘라스타아제 활성화 펩티드	아미노산	72
변형체 55 인간 엘라스타아제 활성화 펩티드	아미노산	73
인간 엘라스타아제 분할 도메인 컨센서스 서열; 엘라스타아제 분할 도메인의 잔기 P5, P4, P3, P2, P1, P′ 1, P′ 2, 및 P′ 3에 상응함	아미노산	74
pPROT3 작성을 위한 PCR 돌연변이생성 프라이머	핵산	75
pPROT3 작성을 위한 PCR 돌연변이생성 프라이머	핵산	76
성숙한 ELA1 C-말단 변형체[Talas *et al.*, 2000, Invest Dermatol. 114(1):165-70]	아미노산	77
성숙한 ELA-1 변형체, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	78
활성화 펩티드 변형체(야생형 트립신 분할가능함), 위치 10(Q 또는 H)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	79
활성화 펩티드 "컨센서스" 서열	아미노산	80
ELA-1.2A 의 코딩 영역	아미노산	81
ELA-1.2A 의 번역 생성물 (트립신 활성화된 pPROT24 서열)	아미노산	82
ELA-1.2A 의 번역 생성물 (트립신 활성화된 pPROT24 서열), 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	83
제 1 "발린"을 포함하는 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	84

[0049]

[0050] [표 1f]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
제 1 "발린"이 제외된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	85
처음 2 개의 "발린"이 제외된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	86
제 1 "발린"이 "알라닌"으로 치환된 성숙한 인간 엘라스타아제 I, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	87
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 1(pPBOT42 변형체), 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	88
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 2, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	89
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 3, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	90
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 4, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	91
조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 5(pPBOT24 트립신 활성화된 서열), 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	92
컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 4(위치 P3-P2-P1)	아미노산	93

[0051]

[0052] [표 1g]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
pPROT42 P3 분할 부위 변형 엘라스타아제, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	94
pPROT42 P2 분할 부위 변형 엘라스타아제, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	95
효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드, 프로펩티드, 및 이격자 서열 1	아미노산	96
효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드 및 프로펩티드 서열 2	아미노산	97
서열 번호 64 로 통칭된 변형 분할 도메인 48 을 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	98
변형 분할 도메인 49 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	99
변형 분할 도메인 52 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	100
변형 분할 도메인 53 을 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	101
변형 분할 도메인 54 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	102

[0053]

[0054] [표 1h]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
변형 분할 도메인 55 를 갖는 엘라스타아제 선구효소, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	103
야생형 엘라스타아제 +AlaArg 분할 변형체, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	104
야생형 엘라스타아제 +Arg 분할 변형체, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	105
처음 4 개의 아미노산이 결여된 성숙한 인간 엘라스타아제 I 분할 변형체, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	106
처음 6 개의 아미노산이 결여된 성숙한 인간 엘라스타아제 I 분할 변형체, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	107
처음 9 개의 아미노산이 결여된 성숙한 인간 엘라스타아제 I 분할 변형체, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 가능한 다형형태를 가짐(번호는 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)	아미노산	108
도 1A의 핵산 서열	핵산	109
도 1A의 아미노산 서열	아미노산	110
도 1B의 핵산 서열	핵산	111
도 1B의 아미노산 서열	아미노산	112
도 13의 핵산 서열	핵산	113
도 14의 아미노산 서열	아미노산	114

[0055]

[0056] [표 1i]

분자	뉴클레오티드 또는 아미노산	서열 번호
트립신 활성화된 pPROT101-24-V 의 분할 도메인 서열	아미노산	115
자가 활성화된 pPROT101-42-V의 분할 도메인 서열	아미노산	116
자가 활성화된 pPROT101-49-V의 분할 도메인 서열	아미노산	117
자가 활성화된 pPROT101-55L-V의 분할 도메인 서열	아미노산	118

[0057]

[0058] 인간 제I형 엘라스타아제 단백질에서, 위치 10(Q 또는 H); 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)에서 5개 이상의 확인된 다형형태(polymorphism)가 존재한다. 전장 (프리프로엘라스타아제) 단백질은 258개 아미노산의 길이이다. 처음 8개 아미노산은 불활성 프로단백질을 생산하기 위해 분할되어 지는 신호 또는 "프리" 펩티드 서열에 상응하고, 추가로 "프로" 펩티드 서열(활성화 펩티드에 상응하는 10개의 아미노산을 포함하거나 이로 구성됨)은 분할되어 활성의 성숙한 단백질을 생성한다. 이와 같이, 위치 10에서의 다형형태는 프로단백질에 존재하지만, 성숙한 단백질에는 존재하지 않는다.

[0059] 따라서, 하기 표 2에는 인간 제I형 엘라스타아제의 5개의 다형형태의 모든 가능한 조합이 제시되어 있다. 본 발명은 프리프로엘라스타아제 및 프로엘라스타아제 단백질(제한되지 않지만 본원에 기재된 변형 프리프로엘라스타아제 및 프로엘라스타아제 단백질이 포함됨), 예컨대 하기 표 2에 제시된 다형형태 세트의 임의의 조합을 포함하여, 섹션 8에서 실시양태 1~39 및 68~69에 예시된 단백질, 또는 실시양태 89~224, 261~276, 및 347~373 중 임의의 하나의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 단백질을 제공한다.

[0060] [표 2]

[0061] 인간 제I형 미숙한 엘라스타아제(프리프로) 및 프로엘라스타아제 단백질의 변형체(위치 번호는 고유의 인간 제I형 엘라스타아제의 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)

위치	10	44	59	220	243
실시양태	Q 또는 H	W 또는 R	M 또는 V	V 또는 L	Q 또는 R
1.	Q	W	M	V	Q
2.	Q	W	M	V	R
3.	Q	W	M	L	Q
4.	Q	W	V	V	Q
5.	Q	R	M	V	Q
6.	Q	W	M	L	R
7.	Q	W	V	L	Q
8.	Q	R	V	V	Q
9.	Q	W	V	V	R
10.	Q	R	M	L	Q
11.	Q	R	M	V	R
12.	Q	R	V	L	Q
13.	Q	R	V	V	R
14.	Q	R	M	L	R
15.	Q	W	V	L	R
16.	Q	R	V	L	R
17.	H	W	M	V	Q
18.	H	W	M	V	R
19.	H	W	M	L	Q
20.	H	W	V	V	Q
21.	H	R	M	V	Q
22.	H	W	M	L	R
23.	H	W	V	L	Q
24.	H	R	V	V	Q
25.	H	W	V	V	R
26.	H	R	M	L	Q
27.	H	R	M	V	R
28.	H	R	V	L	Q
29.	H	R	V	V	R
30.	H	R	M	L	R
31.	H	W	V	L	R
32.	H	R	V	L	R

[0062]

[0063] 게다가, 하기 표 3에는 성숙한 엘라스타아제 단백질에 존재할 수 있는 인간 제I형 엘라스타아제의 4개의 다형형태의 모든 가능한 조합이 제시되어 있다. 본 발명은 성숙한 엘라스타아제 단백질(제한되지 않지만 본원에 기재된 성숙한 변형 엘라스타아제 단백질이 포함됨), 예컨대 하기 표 3에 제시된 다형형태 집합의 임의의 조합을 포함하여, 섹션 8에서 실시양태 89~224, 261~276, 및 347~373중 임의의 하나의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 성숙한 엘라스타아제 단백질을 제공한다.

[0064] [표 3]

[0065] 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질의 변형체(위치 번호는 고유의 인간 제I형 엘라스타아제의 프리프로단백질에 관한 위치를 지칭함)

위치 실시양태	44 W 또는 R	59 M 또는 V	220 V 또는 L	243 Q 또는 R
1.	W	M	V	Q
2.	W	M	V	R
3.	W	M	L	Q
4.	W	V	V	Q
5.	R	M	V	Q
6.	W	M	L	R
7.	W	V	L	Q
8.	R	V	V	Q
9.	W	V	V	R
10.	R	M	L	Q
11.	R	M	V	R
12.	R	V	L	Q
13.	R	V	V	R
14.	R	M	L	R
15.	W	V	L	R
16.	R	V	L	R

[0066]

[0067] 본 발명의 성숙한 제I형 엘라스타아제는, 예를 들면 약학 조성물에서 사용하기 위하여 정제될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 엘라스타아제는 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상 순수하다.

[0068] 본 발명의 성숙한 제I형 엘라스타아제는, 엘라스타아제의 첨가에 의해 촉매화되는 작은 펩티드 기질 N-석시닐-Ala-Ala-Ala-p니트로아닐리드(SLAP: N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNitroanilide)의 가수분해 속도를 측정하여 결정할 경우, 바람직하게는 1 초과, 5 초과, 10 초과, 20 초과, 25 초과, 또는 30 U/mg 단백질 초과의 비활성(specific activity)을 갖는다. 활성의 1 유닛(unit)은 30℃에서 분당 1 마이크로몰의 기질의 가수분해를 촉매화하는 엘라스타아제의 양으로서 정의되고, 비활성은 엘라스타아제 단백질 mg당 활성(U/mg)으로 정의된다. 바람직하게는, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는 하한치가 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 또는 20 U/mg 단백질이고 상한치가 독립적으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 50 U/mg 단백질인 범위내에서 비활성을 갖는다. 예시적인 실시양태에서, 비활성은 1~40 U/mg 단백질, 1~5 U/mg 단백질, 2~10 U/mg 단백질, 4~15 U/mg 단백질, 5~30 U/mg 단백질, 10~20 U/mg 단백질, 20~40 U/mg 단백질의 범위, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는 임의의 범위내이다. 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제는 바람직하게는 하한치가 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 또는 75 U/mg 단백질이고, 상한치가 독립적으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 90, 95 또는 100 U/mg 단백질인 범위 내에서 비활성을 갖는다. 예시적인 실시양태에서, 돼지 엘라스타아제의 비활성은 10~50 U/mg 단백질, 20~60 U/mg 단백질, 30~75 U/mg 단백질, 30~40 U/mg 단백질, 20~35 U/mg 단백질, 50~95 U/mg 단백질, 25~100 U/mg 단백질, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는 임의의 범위내이다.

[0069] 따라서, 본 발명의 특정 양태는 조성물, 예컨대 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 및 단위 투여제, 예컨대 하기 섹션 8에서 실시양태 277~314, 346, 386, 및 415~420에 예시된 것들, 또는 실시양태 261~276 및 374~385중 임의의 하나의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 것들에 관한 것이다.

[0070] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 트립신 활성화된 엘라스타아제 단백질, 예를 들어, 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 제조된 트립신 활성화된 단백질을 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 자가활성화된 엘라스타아제 단백질, 예를 들어, 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 제조된 자가활성화된 엘라스타아제 단백질을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 하기 특성들중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 7개 이상을 특징으로 한다: (a) 조성물에 트립신이 존재하지 않고; (b) 조성물에 트립신이 실질적으로 존재하지 않고; (c) 조성물에 서열 번호 70 및 71로 구성된 임의의 단백질이 존재하지 않고; (d) 조성물에 서열 번호 2 및 3으로 구성된 임의의 단백질이 실질적으로 존재하지 않고; (e) 조성물에 박테리아 단백질이 존재하지 않고; (f) 조성물에 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고; (g) 조성물에 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질 이외의 포유동물 단백질이 존재하지 않고; (h) 조성물에 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않고; (i) 조성물에 서열 번호 85, 86, 94 및 95로 구성된 1종, 2종, 3종 또는 4종 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고; (j) 조성물에 서열 번호 106, 107 및 108로 구성된 1종, 2종 또는 3종 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고; (k) 조성물은 약학적으로 허용되는 수준의 내독소를 함유하고(예를 들어, 10 EU/mg 엘라스타아제 또는 그 미만, 또는 5

EU/㎎ 엘라스타아제 또는 그 미만); (l) 조성물중 성숙한 엘라스타아제 단백질은 1~40 U/㎎ 단백질의 비활성 또는 본원에 개시된 비활성의 임의의 다른 범위를 특징으로 하고; (m) 상기 조성물중 트립신 활성은 성숙한 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 4 ng 미만, 또는 본원에 개시된 트립신 활성의 임의의 다른 범위에 상응하고; (n) 조성물은 폴리소르베이트-80을 포함하고; (o) 조성물은 덱스트란을 포함하고; (p) 조성물은 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 폴리소르베이트-80을 포함하고; (q) 조성물은 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 덱스트란을 포함하고; (r) 조성물은 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온, 폴리소르베이트-80, 및 덱스트란을 포함하고; (s) 상기 조성물중 성숙한 엘라스타아제 단백질은 본원에 개시된 안정성의 양을 나타내고, 예를 들어, 4℃에서 1주 이상 저장한 후, 4℃에서 1개월 이상 저장한 후, 4℃에서 2개월 이상 저장한 후, 4℃에서 3개월 이상 저장한 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장한 후, 그의 비활성의 60%~100%를 유지하고; (t) 조성물은 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질의 0.0033 ㎎~200 ㎎의 단위 투여량, 또는 본원에 개시된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 임의의 다른 단위 투여량을 포함한다.

[0071] 특정 양태에서, 조성물은 하기 그룹 (i)~(v)로부터 독립적으로 선택된 3개 이상의 특징, 4개 이상의 특징, 또는 5개의 특징을 특징으로 한다:

[0072] (i) (a), (b) 또는 (m)

[0073] (ii) (e) 또는 (f)

[0074] (iii) (g) 또는 (h)

[0075] (iv) (k)

[0076] (v) (l)

[0077] 구체적인 실시양태에서, 상기 3개 이상 또는 4개 이상의 특징중 2개는 그룹 (i) 및 (iv) 또는 (v)로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 상기 4개 이상의 특징중 3개는 그룹 (i), (iv) 및 (v)로부터 선택된다.

[0078] 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 조성물, 제한되지 않지만 (i) 트립신이 존재하지 않는 치료 효과량의 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제를 제공한다, 다르게는, 본 발명은 (i) 트립신이 실질적으로 존재하지 않는 치료 효과량의 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 인간 제I형 엘라스타아제 및/또는 조성물은 5 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 4 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 3 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 2 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 또는 1.56 ng/㎖ 미만의 트립신 활성을 포함한다. 이전의 예에서, ng/㎖ 트립신 활성은 1 ㎎/㎖ 인간 제I형 엘라스타아제 단백질을 함유하는 액체 인간 제I형 엘라스타아제 조성물 또는 제조물에서 검정될 수 있다. 이와 같이, 트립신 활성은 또한 엘라스타아제 단백질의 밀리그램으로, 예를 들면, 3 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질, 1.56 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질, 등으로 기재될 수 있다. 본 발명은 추가로 (i) 치료 효과량의 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 조성물은 엘라스타아제 ㎎당 5 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 4 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 3 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 2 ng 미만의 트립신 활성, 또는 엘라스타아제 ㎎ 당 1.56 ng 미만의 트립신 활성을 포함한다.

[0079] 본 발명은 성숙한 엘라스타아제 단백질을 매크로-프렙 하이 에스 수지 칼럼(Macro-Prep High S Resin column) 상에서 정제하는 단계를 포함하는, 트립신 활성화 방법(예를 들어, 하기 섹션 8에서 실시양태 145의 방법)에 의해 생산된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 품질을 개선시키는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명자들에 의해, 매크로-프렙 하이 에스 수지 칼럼 상에서 정제된 성숙한 엘라스타아제 단백질은, 포로스(Poros)(폴리(스티렌-디비닐벤젠)) 칼럼 상에서 정제되어 대략 1000 ng 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질에 상응하는 트립신 활성 수준을 갖는 엘라스타아제 조성물을 제공하는 경우와 비교하여, 20~25 ng 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질에 상응하는 트립신 활성 수준을 갖는 엘라스타아제 조성물을 산출하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명은 매크로-프렙 하이 에스 수지 칼럼 상에서 트립신 활성화된 엘라스타아제 단백질을 정제함으로써 생산된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 엘라스타아제 조성물을 추가로 제공한다. 매크로-프렙 하이 에스 수지는 바이오래드(Biorad)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재)로부터 입수가능하고, 이에 따르면 견고한 메타크릴레이트의 칼럼이 거의 수축되거나 팽윤되지 않고 지지한다. 동일한 부류 및/또는 동일한 비이드(bead) 크기(약 50 ㎛)의 다른 유사한 양이온 교환 칼럼이 사용될 수 있고, 예컨대 다른 메타크릴레이트 칼럼이 적절하게 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 다른 양태는, 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제를 포함하는 조성물, 제한되지 않지만 예컨대 약학 조성

물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제에 관한 것이다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 (i) 트립신이 존재하지 않는 치료 효과량의 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 다르게는, 본 발명은 (i) 트립신이 실질적으로 존재하지 않는 치료 효과량의 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 및/또는 조성물은 100 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 75 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 50 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 25 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 15 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 10 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 5 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 4 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 3 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 2 ng/㎖ 미만의 트립신 활성, 또는 1.56 ng/㎖ 미만의 트립신 활성을 포함한다. 전술된 예에서, ng/㎖ 트립신 활성은 1 ㎎/㎖의 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제를 함유하는 액체 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 조성물 또는 제조물에서 검정될 수 있다. 이와 같이, 트립신 활성은 엘라스타아제 단백질의 밀리그램으로, 예를 들면, 25 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질, 5 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질 등으로 기재될 수도 있다. 본 발명은 (i) 치료 효과량의 돼지 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 조성물은 엘라스타아제 ㎎당 100 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 75 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 50 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 25 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 15 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 10 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 5 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 4 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 3 ng 미만의 트립신 활성, 엘라스타아제 ㎎당 2 ng 미만의 트립신 활성, 또는 엘라스타아제 ㎎당 1.56 ng 미만의 트립신 활성을 포함한다.

[0081] 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호 70, 71, 104, 105중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두에 상응하는 N-말단 변형체가 존재하지 않는 엘라스타아제 단백질, 예컨대 성숙한 엘라스타아제 단백질의 조성물, 제한되지 않지만, 예컨대 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 서열 번호 70, 71, 104, 105를 갖는 임의의 단백질이 존재하지 않는 약학 조성물을 제공한다.

[0082] 다른 실시양태에서, 본 발명은 (i) 성숙한 엘라스타아제 단백질의 N-말단 상의 특이적인 추가의 아미노산(서열 번호 37, 38, 70, 71, 94, 95, 104, 105)을 함유하는 변형 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 치료 효과량의 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물, 제한되지 않지만, 예컨대 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 (i) 성숙한 엘라스타아제 단백질의 N-말단 아미노산(서열 번호 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 108)이 결여된 변형 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 치료 효과량의 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 인간 제I형 엘라스타아제 및/또는 조성물은 25% 미만의 N-말단 변형체, 20% 미만의 N-말단 변형체, 15% 미만의 N-말단 변형체, 10% 미만의 N-말단 변형체, 5% 미만의 N-말단 변형체, 4% 미만의 N-말단 변형체, 3% 미만의 N-말단 변형체, 2% 미만의 N-말단 변형체, 1% 미만의 N-말단 변형체, 0.5% 미만의 N-말단 변형체, 0%의 N-말단 변형체를 포함하거나, N-말단 변형체를 전술된 백분율의 임의의 두 값 사이의 범위의 양으로 포함한다(예를 들어, 2%～25% N-말단 변형체, 0.5%～10% N-말단 변형체, 5%～15% N-말단 변형체, 0%～2% N-말단 변형체, 등). 본원에 사용될 경우, 용어 "X% 미만의 N-말단 변형체"는 총 엘라스타아제 단백질의 백분율로서의 N-말단 변형체의 양을 지칭한다.

[0083] 다른 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고/않거나 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 조성물, 제한되지 않지만, 예컨대 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제를 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 인간 제I형 엘라스타아제 및/또는 조성물은 25% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 20% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 15% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 10% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 5% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 4% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 3% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 2% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 1% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 0.5% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물

단백질, 0%의 박테리아 단백질 및/또는 포유동물 단백질 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 포함하거나, 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질을 전술된 백분율중 임의의 두 값 사이의 범위의 양으로 포함한다(예를 들어, 2%~25% 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 0.5%~10% 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 5%~15% 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질, 0%~2% 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질 등). 본원에 사용될 경우, 용어 "X% 미만의 박테리아 단백질 및/또는 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질"은 엘라스타아제 제조물 또는 상기 조성물중 총 단백질의 백분율로서 이러한 단백질의 양을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 엘라스타아제는 이러한 조성물 또는 제조물중 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상 또는 99.8% 이상의 총 단백질을 나타낸다.

[0084] 정제된 본 발명의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 또는 단위 투여제)을 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 생물학적 전달관의 질병을 치료 및 예방하기 위한 방법이 또한 제공된다.

[0085] 추가로, 본 발명의 임의의 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산(본 발명의 "핵산")을 포함하는 벡터, 및 본 발명의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포가 제공된다. 구체적인 실시양태에서, 벡터는 추가로 엘라스타아제 단백질의 발현을 조절하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 메탄올-유도성 프로모터(promoter)에 작동적으로 연결될 수 있다. 다른 적합한 프로모터는 하기 섹션 5.3에 예시되어 있다.

[0086] 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 개방 판독 프레임(open reading frame)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공하고, 개방 판독 프레임은 인간 제I형 엘라스타아제 프로단백질 서열에 작동적으로 연결된 제I형 엘라스타아제 신호 펩티드(예를 들어, 돼지 엘라스타아제 신호 펩티드) 또는 효모 α-인자 신호 펩티드를 포함한다. 선택적으로, 벡터는 추가로 개방 판독 프레임에 작동적으로 연결된 메탄올-유도성 프로모터를 포함한다.

[0087] 본 발명의 핵산 및 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 벡터 또는 핵산은 숙주 세포 게놈내로 통합되고; 다른 실시양태에서, 벡터 또는 핵산은 염색체외이다. 바람직한 숙주 세포는 피치아 파스토리스 세포이다. 다른 적합한 숙주 세포는 하기 섹션 5.3에 예시되어 있다.

[0088] 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 인간 제I형 엘라스타아제 선구효소 서열에 작동적으로 연결된 돼지 엘라스타아제 신호 펩티드 또는 효모 α-인자 신호 펩티드를 포함하는 개방 판독 프레임을 코딩하도록 유전자 조작된 피치아 파스토리스 숙주 세포를 제공한다. 경우에 따라, 개방 판독 프레임은 메탄올-유도성 프로모터의 제어하에 존재한다.

[0089] 본 발명은 프로엘라스타아제 단백질이 생산되는 조건하에 본 발명의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 본 발명의 미숙한 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 또한 생산된다.

[0090] 특별히 숙주 세포 피치아 파스토리스의 경우, 본 발명의 프로엘라스타아제 및 성숙한 단백질을 생산하기 위한 바람직한 배양 조건은 낮은 pH에서의 성장 기간을 포함한다. 전형적으로, 낮은 pH는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 또는 전술된 값의 임의의 쌍 사이의 임의의 범위이다. 구체적인 실시양태에서, 낮은 pH는 2.0~6.0, 2.0~5.0, 3.0~6.0, 3.0~5.0, 4.0~6.0, 또는 3.0~4.0 범위의 pH이다. 배양 기간이 끝났을 때, 배양액의 pH는, 바람직하게는 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0의 pH로, 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질로부터 활성화 서열을 분리하거나 제거하기 위해 임의의 2개의 전술된 값 사이 범위의 pH로 상승될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 배양액의 pH는 7.5~10.0 또는 8.0~9.0 범위의 pH로, 가장 바람직하게는 8.0의 pH로 상승된다.

[0091] 본 발명의 프로엘라스타아제 단백질의 발현이 메탄올-유도성 프로모터의 제어하에 있는 경우, 본 발명의 미숙한 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 조건은 메탄올 유도의 기간을 포함할 수 도 있다.

[0092] 본 발명의 엘라스타아제 생산 방법은 숙주 세포에 의해 발현되는 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특정 경우에, 회수된 단백질은 활성화 서열을 포함하는 프로엘라스타아제이다. 다른 경우에, 회수된 단백질은 활성화 서열이 결핍된 성숙한 엘라스타아제이다. 특정 조건하에, 프로엘라스타아제 및 성숙한 엘라스타아제 단백질 둘다 회수된다.

[0093] 바람직하게는, 특별히 자가 활성화된 프로엘라스타아제의 자가 활성화를 회피하도록 요망되는 경우, 프로엘라스타아제 발현을 위한 배양 조건은 낮은 pH에서의 성장 및 유도 기간을 포함할 수 있다. 전형적으로, 낮은 pH는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 또는 6.0, 또는 전술된 값의 임의의 쌍 사이의 임의의 범위일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 낮은 pH는 2.0~3.0, 4.0~5.0, 5.0~6.0, 또는 6.0~7.0 범위의 pH이다. 특별한 실시양태에서, pH 범위는 4.0~6.0이고, 가장 바람직하게는 5.5의 pH이다.

[0094] 바람직하게는, 특별히 자가 활성화된 프로엘라스타아제의 자가 활성화를 회피하도록 요망되는 경우, 프로엘라스타아제 발현을 위한 배양 조건은 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨내에서의 성장 및 유도 기간을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~15 mM, 50~200 mM, 75~175 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값(예를 들어, 50~75 mM, 75~100 mM, 등)으로부터 선택되는 임의의 범위의 농도가 사용된다. 한 바람직한 실시양태에서, 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨 농도는 90~110 mM이고, 가장 바람직하게는 100 mM이다.

[0095] 부가적으로, 특별히 자가 활성화된 프로엘라스타아제의 자가 활성화 또는 성숙한 엘라스타아제에 의한 자가 분해를 회피하도록 요망되는 경우, 미숙한 엘라스타아제 단백질의 발현을 위한 배양 조건은 문제의 숙주 세포에 적합한 온도 범위의 하한치에서의 성장 및 유도 기간을 포함할 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포가 피치아 파스토리스 숙주 세포인 경우, 바람직한 범위는 약 22~28℃이다. 구체적인 실시양태에서, 피치아 파스토리스 숙주 세포는 28℃에서 배양된다.

[0096] 부가적으로, 특별히 숙주 세포 프로테아제에 의한 단백질 분해를 회피하도록 요망되는 경우, 미숙한 엘라스타아제 단백질의 발현을 위한 배양 조건은 문제의 숙주 세포에 적합한 온도 범위의 하한치에서의 성장 및 유도 기간을 포함할 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포가 피치아 파스토리스 숙주 세포인 경우, 바람직한 범위는 약 22~28℃이다. 구체적인 실시양태에서, 피치아 파스토리스 숙주 세포는 28℃에서 배양된다.

[0097] 본 발명의 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 활성화는 외인성 엘라스타아제를 소량(촉매량)으로 첨가함으로써 개시될 수 있다. 특정 실시양태에서, 촉매량의 외인성 엘라스타아제는, 촉매적 엘라스타아제가 첨가되는 샘플중 엘라스타아제의 몰량 또는 분자량을 기준으로, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만 또는 0.1% 미만을 나타낸다.

[0098] 다르게는 또는 동시적으로, 자가 활성화된 프로엘라스타아제는 pH 7~11(가장 바람직하게는 pH 8)에 놓이고, 이때 자가 활성화된 프로엘라스타아제 활성화 펩티드는 트립신을 필요로하지 않고 제거되어 성숙한, 활성 엘라스타아제을 생성한다. 구체적인 실시양태에서, 트리스(Tris) 염기는 50~200 mM, 75~175 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값으로부터 선택되는 임의의 범위(예를 들어, 50~75 mM, 75~100 mM 등)의 농도로 활성화 단계 동안 첨가된다. 한 바람직한 실시양태에서, 트리스 염기는 농도 90~110 mM, 가장 바람직하게는 100 mM로 첨가된다. 트리스 염기의 pH는 바람직하게는 7~11이고; 구체적인 실시양태에서, 트리스 염기는 7.0~11.0, 7~9, 7.5~9.5, 7.5~10, 8~10, 8~9, 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값으로부터 선택되는 임의의 범위의 pH로 존재한다. 한 바람직한 실시양태에서, 트리스 염기는 7.5~8.5, 가장 바람직하게는 8.0의 pH로 존재한다.

[0099] 미숙한 엘라스타아제 서열의 발현은 몇몇 경우에 프로엘라스타아제 단백질 및 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물, 뿐만 아니라 N-말단 변형 엘라스타아제 단백질을 산출할 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 (1) 프로엘라스타아제 단백질, (2) 성숙한 엘라스타아제 단백질, 및 (3) N-말단 변형 엘라스타아제 단백질중 2종 이상을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0100] 일단 성숙한 엘라스타아제가 생산되면, 이는 예를 들면 약학 제형을 위해 동결건조될 수 있다. 한 예시적인 실시양태에서, 본 발명은:

[0101] (a) 프리프로엘라스타아제 개방 판독 프레임을 코딩하는 핵산 분자를 발현하도록 조작된 숙주 세포, 예컨대 피치아 파스토리스 숙주 세포를, 개방 판독 프레임이 발현되는 조건하에 배양하는 단계(여기서, 구체적인 실시양태에서, 상기 개방 판독 프레임은 5'에서 3' 방향으로 (i) 신호 펩티드, 예를 들어, 피치아 파스토리스에서 작동가능한 신호 펩티드; (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열; 및 (iii) 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질의 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 프로엘라스타아제 단백질을 생산함);

[0102] (b) 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두어 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계(여기서, 자가활성화 조건으로는 하기 (i)~(v)중 하나 또는 이의 조합을 포함한다: (i) 프로엘라스타아제 단백질을 함유하는 용액(이는 세포 배양 상청액을 수 있음)의 pH를, 예를 들어, pH 6.5~11, 바람직하게는 8~9로

변화시키고; (ii) 프로엘라스타아제 단백질을, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고, 용액을 연장하여 전환시켜 N-말단 변형체를 제거함으로써, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 생산하고; (iii) 프로엘라스타아제 단백질을 농축시키고(예를 들어, 2배, 3배, 5배, 8배, 10배, 12배, 또는 상한치 및 하한치가 농도의 전술된 수준으로부터 독립적으로 선택되는 범위); (iv) 프로엘라스타아제 단백질을 증가된 온도(예를 들어, 29℃, 30℃, 32℃, 35℃, 40℃, 45℃, 또는 40℃, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 온도로부터 선택되는 범위)에 두고; (v) 프로엘라스타아제 단백질 세포 배양 상청액으로부터 정제하고(예를 들어, 매크로-프렙 하이 에스 수지를 사용하여), 정제된 프로엘라스타아제 단백질을 포함하는 용액을 주변 온도(예를 들어, 22℃~26℃)에서 1일 이상의 기간 동안(예를 들어, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값으로부터 독립적으로 선택되는 범위)(이는 용액에서의 시트레이트/아세테이트의 존재, 농도, 온도 및 pH에 의해 영향받고 당 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있음) 배양처리한다);

[0103] (c) 선택적으로, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 정제하는 단계, 예를 들어, 폴리쉬(polish) 크로마토그래피를 위한 이온 교환 크로마토그래피 단계; 및

[0104] (d) 성숙한 제I형 엘라스타아제를 동결건조하여, 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계를 포함하는, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 단리하는 방법을 제공한다. 성숙한 제I형 엘라스타아제는 바람직하게는 인간 제I형 엘라스타아제이다. 특정 양태에서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제는 바람직하게는 95% 보다 더 순수하고; 구체적인 실시양태에서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제는 98% 보다 더 또는 99% 보다 더 순수하다.

[0105] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질은 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 같이, 예시적인 실시양태에서, 본 발명은 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생성하는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 (i) 상기 기재된 방법에 따라 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계; 및 (ii) 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 약학적으로 허용되는 담체내에서 재구성하는 단계를 포함한다. 본 발명의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는, 엘라스타아제의 첨가에 의해 촉매화되는 작은 펩티드 기질 N-석시닐-Ala-Ala-Ala-p니트로아닐리드(SLAP)의 가수분해 속도를 측정하여 결정할 경우, 바람직하게는 1 초과, 5 초과, 10 초과, 20 초과, 25 초과, 또는 30 U/mg 단백질 초과의 비활성을 갖는다. 활성의 1 유닛은 30℃에서 분당 1 마이크로몰의 기질의 가수분해를 촉매화하는 엘라스타아제의 양으로서 정의되고, 비활성은 엘라스타아제 단백질 mg당 활성(U/mg)으로 정의된다. 바람직하게는, 본 발명의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는 하한치가 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 또는 20 U/mg 단백질이고 상한치가 독립적으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 50 U/mg 단백질 범위인 비활성을 갖는다. 예시적인 실시양태에서, 비활성은 1~40 U/mg 단백질, 1~5 U/mg 단백질, 2~10 U/mg 단백질, 4~15 U/mg 단백질, 5~30 U/mg 단백질, 10~20 U/mg 단백질, 20~40 U/mg 단백질의 범위, 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값으로부터 선택되는 임의의 범위내이다(예를 들어, 1~10 U/mg, 5~40 U/mg 등).

[0106] 본 발명의 약학 조성물은 바람직하게는 안정하다. 구체적인 실시양태에서, 약학 조성물(예를 들면 상기 기재된 바와 같은 동결건조 및 재구성에 의해 제조된 약학 조성물)은 4℃에서 1주간 저장한 후 50% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 가장 바람직하게는 70% 이상의 비활성을 유지한다. 구체적인 실시양태에서, 약학 조성물은 재구성하고 4℃에서 1주간 저장한 후 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 95% 이상의 그의 비활성을 유지한다.

[0107] 본 발명은 또한 엘라스타아제 분할 도메인 서열을 함유하는 제I형 엘라스타아제 프로단백질 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 분할 도메인은 컨센서스(concensus) 분할 도메인 서열(서열 번호 74) $Xaa_1Xaa_2Xaa_3Xaa_4Xaa_5Xaa_6Xaa_7Xaa_8$에 의해 기재된 임의의 서열이고, 여기서 Xaa_1=P5, Xaa_2=P4, Xaa_3=P3, Xaa_4=P2, Xaa_5=P1, Xaa_6=P'1, Xaa_6=P'1, Xaa_7=P'2, 및 Xaa_8=P'3이고, 이때:

[0108] -Xaa_1은 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린, 글리신, 아스파라긴, 라이신, 또는 알라닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0109] -Xaa_2는 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 히스티딘, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0110] -Xaa_3은 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신 또는 프롤린이 아니고;

[0111] -Xaa_4는 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이

고;

[0112] -Xaa_5는 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 글리신, 티로신, 페닐알라닌, 프롤린, 아르기닌, 글루타메이트, 또는 라이신이 아니고;

[0113] -Xaa_6은 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0114] -Xaa_7은 글리신, 알라닌, 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0115] -Xaa_8은 발린, 트레오닌, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이다.

[0116] 본 발명은 또한 (a) (i) 숙주 세포의 배양 조건하에 엘라스타아제 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 트립신 인식 서열을 포함하는 활성화 서열을 포함하는 프로단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포를 상기 배양 조건하에 배양하는 단계(여기서 상기 배양 조건은 pH 2~6에서의 성장 또는 유도 기간을 포함함) ; (b) 발현된 프로단백질을 회수하는 단계; (c) 회수된 단백질을 촉매량의 트립신과 트립신이 활성인 pH 조건하에 접촉시키는 단계; 및 (d) 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계를 포함하는, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 방법을 제공한다. 이러한 방법에서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는 본질적으로 서열 번호 1, 4, 5, 84, 또는 87로 구성된다. 특정 실시양태에서, 조건은 (a) pH 4~6에서의 성장 또는 유도 기간; (b) 22℃~28℃에서의 성장 또는 유도 기간; 또는 (c) 상기 숙주 세포의 배양 배지에서 약 50 mM~약 200 mM의 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨 농도 또는 90 mM~약 110 mM의 시트르산 나트륨 농도를 포함한다.

[0117] 본원에서 부정 관사 "하나(a 및 an)" 및 정관사 "그(the)"는, 특허 출원에서 공통적으로, 달리 명확히 지시되지 않는 한 하나 이상을 의미하는 것으로 사용됨을 주지해야 한다. 추가로, 본원에서 용어 "또는"은, 특허 출원에서 공통적인 것처럼, 이접적 접속사 "또는" 또는 접속사 "및"을 의미하는 것으로 사용됨을 주지해야 한다.

[0118] 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌은 본원에 참고로 인용된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 조항, 자료, 장치, 기사 등에 대한 임의의 논의는 본 발명을 위한 배경을 제공할 목적만을 위해서이다. 임의의 또는 모든 이들 사항이, 본원의 우선일 이전에 존재하였으므로, 선행 기술 기초의 일부를 형성하거나 본 발명과 관련된 분야에서 통상적인 일반적 지식이었음을 인정하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

[0119] 본 발명의 특징 및 이점은 이의 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 추가로 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0120] **4. 도면의 간단한 설명**

도 1A-1B: 도 1A는 합성적(즉, 재조합) 인간 ELA-1.2A 서열을 보여준다. 재조합 인간 엘라스타아제-1(즉, 인간 제I형 췌장 엘라스타아제) 서열은 750-염기 쌍 코딩 영역을 함유한다. 선택된 제한 효소 부위는 밑줄쳐져 있다. 염기 치환은 이중으로 밑줄쳐져 있고, 볼드체이며, 이를 함유하는 코돈은 이중으로 밑줄쳐져 있다. 정지 코돈은 박스로 표시된다. 프로펩티드 서열은 이탤릭체이다. 코딩 영역은 250-아미노산 단백질을 생성한다. 10-아미노산 프로펩티드의 분할 이후, 생성된 성숙한 효소는 240개 아미노산이다. 도 1B는 pPROT24 번역 융합 영역을 보여준다. 벡터와 ELA-1 코딩 영역 사이의 번역 융합이 도시되어 있다. ELA-1 서열의 PCR 증폭은 Kex2 및 STE13 신호 분할 도메인의 혼입을 제공하여 활성화 서열(이탤릭체)의 제1 아미노산(볼드체)의 예상되는 N-말단을 갖는 분비된 생성물을 산출한다.

도 2: 본 발명의 엘라스타아제 단백질의 (중첩) 코어 성분의 N-말단에서 C-말단으로의 개략도로서, 번호매겨진 성분은 다음을 나타낸다: (1) 신호 서열(세로 줄무늬); (2) 선택적 프로펩티드/이격자 서열(벽돌 무늬); (3) 엘라스타아제 프로펩티드(사선 줄무늬, 음영이 없는 부분, 다이아몬드 패턴이 조합됨); (4) 활성화 펩티드(음영이 없는 부분, 다이아몬드 패턴이 조합됨); (5) 인식 서열(다이아몬드 패턴); (6) 분할 도메인(음영이 없는 부분, 다이아몬드 패턴, 나머지 부분은 가로 줄무늬); (7) 분할 부위(음영이 없는 부분, 다이아몬드 패턴, 나머지 부분은 가로 줄무늬); (8) 프리프로엘라스타아제 단백질(전체 개략도); (9) 프로엘라스타아제 단백질(사선 줄무늬, 음영이 없는 부분, 다이아몬드 패턴 및 가로 줄무늬가 조합됨); 및 (10) 성숙한 엘라스타아제 단백질(가로 줄무늬). 표는 화살표로 포괄된 개략도중의 영역의 아미노산을 지정하여 보여준다. 비례적으로 도시되지 않았다. 명명법은 단지 참고할 목적이고, 특별한 기능, 활성 또는 기작을 의미하려는 것은 아니다.

도 3. pPROT24-V 벡터의 다이어그램. "α-인자 분비"는 효모 α-인자 신호 펩티드 및 프로펩티드를 함유하고,

Kex2 부위 및 STE13 반복부가 후속되는 카세트(cassette)를 지칭한다.

도 4: 트립신 활성화된 프로-PRT-201을 함유하는 201-24-266-VU 배양액의 포획 크로마토그래피로부터의 분별물의 SDS-PAGE. 레인(lane) 번호는 분별물 번호에 상응한다. 분별물 6~18은 주로 글리코실화된 선구효소(상위 밴드) 및 비글리코실화된 선구효소(하위 밴드)로 구성된다. 분별물 19~35는 주로 비글리코실화된 선구효소로 구성된다. M=분자량 마커(marker). FT=칼럼 유동.

도 5A-5F: 도 5A는 자가 활성화된 프로단백질 데이터 표이다. 프로펩티드 서열은 제1 세로단에 열거되어 있다. 유도 1, 2 및 3일 후 상청액의 SDS-PAGE(각각 레인 1, 2 및 3)는 제2 세로단에 제시되어 있다. SDS-PAGE에 기초한 상대적인 프로단백질 수율은 제3 세로단에 열거되어 있다. SDS-PAGE에 기초하여 유도한지 3일이 지난 프로단백질의 상대 안정성은 제4 세로단에 열거되어 있다. 42개 및 48개 프로펩티드 서열을 갖는 프로단백질은 유도 동안에 성숙한 단백질의 존재로 인해 낮은 안정성을 갖는 것으로 등급이 매겨진다(42개의 변형체에 대해 1, 2 및 3일 후, 48개의 변형체에 대해 2 및 3일 후에 관찰된다). 최대 SLAP 반응 속도를 달성하기 위해 시간에 의해 결정될 경우의 프로단백질의 상대 전환율은 제5 세로단에 열거되어 있다. 성숙한 엘라스타아제 단백질의 N-말단 변형체를 포함하는 전환된 단백질의 추정된 백분율은 제6 세로단에 열거되어 있다. 도 5B-5F는 프로펩티드 서열 24, 42, 48, 49 및 55, 각각에 대한 전환율 데이터를 보여준다.

도 6. pPROT55M3-V 클로닝 개략도. pPROT55M3-V는 총 3개의 탠덤(tandem) 발현 카세트를 제공하는 4.3 kb pPROT55-V 벡터 주쇄에 2개의 추가의 발현 카세트의 시험관내 결찰에 의해 조작되었다. 2.3 kb 발현 카세트 단편은 pPROT55-V로부터 BglII 및 BamHI 제한 분해에 의해 방출되고 정제된 후, 발현 카세트의 2개의 복사물을 BamHI에 의해 선형화된 pPROT55-V에 결찰시킨다.

도 7: 클론 201-55M3-006-VU의 진탕 플라스크 최적화. 표준 유도 배지, BKME를 제조하고 시트르산 나트륨으로 보충하여 0, 12.5, 25 및 50mM 시트르산 나트륨의 최종 농도를 달성하였다(pH 5.5). 10 ㎖의 유도 배지에 대해 1 g의 습윤 세포 중량의 비율로 배지를 사용하여 성장 상 세포 펠릿을 재현탁하였다. 각각 25㎖의 세포 현탁액을 250 ㎖ 들이 비-배플(non-baffled) 플라스크에 넣고, 22℃ 또는 25℃에서 3일 동안 275 rpm하에 진탕시키면서 배양처리하였다. 메탄올을 1일 2회 0.5부피%의 최종 농도로 첨가하였다. 상청액의 분취량을 3일의 기간 동안 채취하여 SDS-PAGE 및 쿠마시(Coomassie) 염색에 의해 단백질 발현에 대해 분석하였다. 패널(panel) A는 22℃에서 유도된 샘플을 나타내고 패널 B는 25℃에서 유도된 샘플을 나타낸다. 양쪽 패널에서, 레인 1~3은 각각 유도한지 1, 2 및 3일 후의 상청액으로서, 0% 시트르산 나트륨을 함유하고; 레인 4~6은 12.5%의 시트르산 나트륨을 함유함을 제외하고 유사하고; 레인 7~9는 25%의 시트르산 나트륨을 함유함을 제외하고 유사하고; 레인 10~12는 50 mM의 시트르산 나트륨을 함유함을 제외하고 유사하다.

도 8. 201-55-001-VU 및 201-55M3-003-VU 발효 상청액의 SDS-PAGE 분석. 레인 1, 2: 201-55-001-VU 상청액; 레인 3, 4: 201-55M3-003-VU 상청액; 레인 5: 비었음: 레인 6: 분자량 마커.

도 9. pPROT55M3-V 프로단백질 포획 크로마토그래피로부터의 분별물의 SDS-PAGE 분석. 각각의 용출 분별물로부터의 총 30 ㎕를 베타-머캅토에탄올이 보충된 10 마이크로리터의 4X 라엠리(Laemmli) 샘플 적재 완충액과 혼합하였다. 단백질을 8~16% 선형 구배 겔 상에서 전기이동한 후, 쿠마시 염색을 수행하였다. PRT-201의 2종의 우세한 형태가 관찰되었다: 프로단백질(분별물 15~43) 및 자발적으로 전환된 성숙한 PRT-201(분별물 15~44). 레인 번호는 분별물 번호에 상응한다. M, 분자량 마커. BC, 칼럼전(예비-적재) 샘플.

도 10: 정제된 프로단백질 전환의 HIC-HPLC 분석. 정제된 프로-PRT-201-55M3-003-VU를 26℃에서 전환시켰다. 그래프는 전환 동안 생성된 성숙한(전장) PRT-201 및 N-말단 변형체의 상대량을 보여준다.

도 11: 접선방향 유동 여과(tangential flow filtration)에 의해 수행된 발효 상청액에서 프로단백질 전환에 대한 HIC-HPLC 분석. 투명화된 201-55M3-003-VU 발효 상청액을, 재생된 셀룰로즈 막으로 주위 온도에서 일정 부피의 투석여과(diafiltration)를 사용하여 100 mM 트리스(pH 8.0)로 접선방향 유동 여과하였다. 그래프는 전환 동안에 다양한 시점에서 존재하는 프로단백질, 성숙한(전장) PRT-201 및 N-말단 변형체의 상대량을 보여준다.

도 12: pPROT55M3-V 전환 포획 크로마토그래피로부터의 분별물의 SDS-PAGE 분석. 각각의 용출 분별물로부터의 총 30 마이크로리터를 베타-머캅토에탄올이 보충된 10 마이크로리터의 4X 라엠리 샘플 적재 완충액과 혼합하였다. 단백질을 8~16% 선형 구배 겔 상에서 전기이동한 후, 쿠마시 염색을 수행하였다. PRT-201의 2종의 우세한 형태가 관찰되었다: 글리코실화된 성숙한 형태(분별물 35~70), 및 비글리코실화된 성숙한 형태(분별물 75~160). 레인 번호는 분별물 번호에 상응한다. M, 분자량 마커. BC, 칼럼전(예비-적재) 샘플.

도 13: 프로 전환의 농도 의존성. 201-55M3-003-VU 클론(프로-PRT-201-55M3-003-VU)으로부터의 정제된 프로-

PRT-201을 0.2, 1.0, 1.6, 및 1.8 mg/mℓ의 농도에서 전환시켰다. 전환 반응을 프로단백질이 총 단백질의 ≤1%이 될때까지 실시간으로 HIC-HPLC에 의해 모니터링하였다. 그래프는 전환 동안 생산된 성숙한(전장) PRT-201(음영이 없는 막대) 및 N-말단 변형체(사선으로 채워진 막대)의 상대량을 보여준다.

도 14. 합성(즉, 재조합) 돼지 췌장 엘라스타아제 제1형의 DNA 서열. 재조합 서열은 750개 염기쌍 코딩 영역을 함유한다. 밑줄쳐진 SacII 및 XbaI 제한 부위가 혼입되어 클로닝을 촉진시켰다. 정지 코돈은 박스로 표시된다. 프로펩티드 서열은 볼드체이다.

도 15. 합성(즉, 재조합) 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제의 아미노산 서열. 프로펩티드 영역은 볼드체인 반면, 트립신 분할 5 부위는 박스로 표시된다. 10개 아미노산 프로펩티드의 분할 이후, 생성된 성숙한 효소는 240개 아미노산이다.

도 16. 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제의 PV-1 벡터로의 클로닝 개략도. 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 프로단백질 코딩 영역의 합성 이후, 이는 블루 헤론 (Blue Heron) pUC 벡터에 클로닝되었다. 10종의 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제의 코딩 서열을 증폭시키는데 더하여, PCR을 사용하여 클로닝을 위한 XhoI 및 SacII 제한 부위를 PV-I 벡터내로 혼입하였다. PCR 생성물을 분해하고, 겔 정제하고, XhoI 및 SacII로 분해된 PV-1 벡터와 결찰시켜, 트립신 활성화된 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제 프로단백질을 코딩하는 pPROT101-24-V 발현 벡터를 생성하였다.

도 17. 메탄올 유도 동안 자가 활성화된 pPROT101-42-V 및 트립신-활성화된 pPROT101-24-V 클론의 SDS-PAGE에 의한 발현 분석. 유도한지 1일 후 진탕 플라스크 상청액을 쿠마시 염색이 수반되는 8～16% 구배 겔 상에서 분석하였다. 레인 1～10은 pPROT101-42-V로 형질전환된 10개의 상이한 클론으로부터의 상청액을 함유한다. 레인 11～12는 pPROT101-24-V로 형질전환된 2개의 상이한 클론으로부터의 상청액을 함유한다. M, 분자량 마커.

도 18. 메탄올 유도 동안의 자가 활성화된 pPROT101-49-V 및 pPROT101-55L-V 클론의 SDS-PAGE에 의한 발현 분석. 유도한지 1 및 2일 후 진탕 플라스크 상청액을 쿠마시 염색이 수반되는 8～16% 구배 겔 상에서 분석하였다. 레인 1～2는 각각 유도한지 1 및 2일 후의 pPROT101-49-V 클론으로부터의 상청액을 함유한다. 레인 3～4는 각각 유도한지 1 및 2일 후의 pPROT101-55L-V 클론으로부터의 상청액을 함유한다. M, 분자량 마커.

도 19. SLAP 엘라스타아제 활성에 의해 결정될 경우 소규모 전환 검정에 의한 pPROT101-49-V 및 pPROT101-55L-V 단백질의 시간 경과 활성화. 오차 막대는 평균의 ±SD(n=4)를 나타낸다.

도 20. 소규모 전환 검정 전후의 pPROT101-49-V 및 pPROT101-55L-V 상청액의 SDS-PAGE 분석. 전기이동 이전에, 샘플을 시트르산, 환원제 TCEP, 및 LDS 샘플 완충액(인비트로겐(Invitrogen), 캘리포니아주)과 혼합하였다. 샘플을 70℃에서 10분 동안 가열하였다. 레인 1～2: 각각 pPROT101-49-V 전환 전 및 후 검정 상청액; 레인 3～4: 각각 pPROT101-55L-V 전환 전 및 후 검정 상청액. M, 분자량 마커.

도 21. 트립지언(TrypZean) 표준 곡선.

도 22. 섹션 5.9에 기재된 의학 장치의 한 실시양태의 부분적으로 절개된 측면도.

도 23. 의학 장치의 작동기(actuator)의 움직임을 나타내는 도 22와 유사한 도면.

도 24. 도 22에서 선 2-2의 평면에서의 단부 절개도.

도 25. 도 23에서 선 3-3의 평면에서의 단부 절개도.

도 26. 루어 허브(Luer hub)로부터 체액 전달관을 통해 저장기관으로, 이어 조직 침투자로 연장되는, 도 22의 의학 장치의 유동로의 다이어그램.

도 27. 작동기를 이의 구속된 배치형태에서 보여주는 본 발명의 의학 장치의 제2 실시양태의 부분적으로 절개된 측면도.

도 28. 도 27과 유사하지만, 작동기를 이의 비구속된 배치형태에서 보여주는 도면.

도 29. 도 27의 선 3'-3'을 따른 조립부의 단부 투시도.

도 30. 도 29의 선 4'-4'을 따른 조립부의 단부 투시도.

도 31. 도 27 및 28에서 오른쪽으로 보여지는, 장치의 근위 단부의 세부 측면도.

도 32. 도 22의 의학 장치의 외부를 그의 비구속된 위치에서 보여주는 부분도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] **5. 발명의 상세한 설명**

[0122] 본 발명은 성숙한, 생물학적 활성 엘라스타아제 단백질의 재조합 발현 및 생산을 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 프로엘라스타아제 단백질 및 프리프로엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포, 예컨대 바람직한 숙주 세포인 피치아 파스토리스를 배양함으로써 재조합 엘라스타아제 단백질을 제조하는 신규하고 효과적인 방법을 제공한다. 생물학적 전달관(동맥 또는 정맥)의 질병의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물을 제조하기 위한 재조합 단백질의 용도가 또한 제공된다.

[0123] 특정 양태에서, 본 발명은 재조합 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질 및 관련된 핵산, 숙주 세포, 및 제조 방법에 관한 것이다. 이러한 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질은 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제1 잔기의 바로 N-말단에 엘라스타아제 인식 부위를 함유하도록 조작된다. 특정화된 배양 조건하에, 예컨대 하기 섹션 6에 기재된 조건하에, 활성화가 요구될 때까지 자가 활성화를 감소시키는 것이 가능하다. 또한 프로엘라스타아제가 세포 배양물로부터 제거될 때까지 자가 활성화를 감소시키는 것이 가능하다.

[0124] 본 발명은 약학 등급의 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 효과적인 발현 및 정제 과정을 제공한다. 본 발명은 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 사용하여 생물학적 전달관의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0125] 본원에서 섹션 5에서의 기재내용은 섹션 8의 실시양태에 적용될 수 있다. 이와 같이, 예를 들면, 본 발명의 엘라스타아제 단백질에 대한 참조는, 제한되지 않지만, 실시양태 1~39 및 68~69중 임의의 하나에 따른 엘라스타아제 단백질, 또는 실시양태 89~224, 261~276, 및 347~373중 임의의 하나의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 엘라스타아에 단백질에 대한 참조를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명의 핵산에 대한 참조는, 무엇보다도, 실시양태 40~67중 임의의 하나에 따른 핵산을 지칭하고; 벡터에 대한 참조는, 무엇보다도, 실시양태 70~72중 임의의 하나에 따른 벡터를 지칭하고; 세포에 대한 참조는, 무엇보다도, 실시양태 73~87중 임의의 하나에 따른 세포를 지칭하고; 세포 배양 상청액에 대한 참조는, 무엇보다도, 실시양태 88에 따른 세포 배양 상청액을 지칭하고; 조성물, 예컨대 약학 조성물, 엘라스타아제 제형 및 단위 투여제에 대한 참조는, 예를 들면, 실시양태 277~314, 346, 386, 및 415~420에 예시된 것들, 또는 실시양태 261~276 및 374~385중 임의의 하나의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 것들을 포함하고; 치료 방법에 대한 참조는 또한 실시양태 387~414중 임의의 하나에 따른 치료 방법에 대한 참조를 포함하고, 키트에 대한 참조는, 무엇보다도, 섹션 8의 실시양태 421~425의 키트에 대한 참조를 포함한다.

[0126] **5.1 엘라스타아제 단백질**

[0127] 본 발명은, 무엇보다도, 성숙한, 생물학적 활성 엘라스타아제 단백질의 재조합 발현 및 생산을 위한 방법에 관한 것이다. 엘라스타아제 단백질은, 다른 서열 중에서도 신호 펩티드, 활성화 펩티드, 및 생물적 활성을 갖는 성숙한 부분을 함유하는 프리프로단백질로서 일반적으로 발현된다. 적합한 성숙한 엘라스타아제 단백질 서열은 하기 섹션 5.1.1에 기재되어 있다. 적합한 활성화 펩티드 서열은 하기 섹션 5.1.2에 기재되어 있다. 적합한 신호 서열은 하기 섹션 5.1.3에 기재되어 있다.

[0128] 따라서, 특정 양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 프리프로엘라스타아제 단백질이다. 분비시 프리프로 단백질로부터 신호 서열을 제거하면 활성화 펩티드 및 성숙한 단백질을 함유하는 불활성 프로단백질을 산출한다. 문구 "활성화 서열" 및 "활성화 펩티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이와 같이, 다른 양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 성숙한 엘라스타아제 단백질에 작동적으로 연결되는 활성화 펩티드를 포함하는 프로엘라스타아제 단백질이다. 한 예시적인 실시양태에서, 야생형 인간 제I형 췌장 엘라스타아제의 활성화 펩티드 또는 서열은 인간 제I형 엘라스타아제 프로단백질의 처음 10개 N-말단 아미노산(서열 번호 22)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 활성화 펩티드는 서열 번호 80의 펩티드이다. 본 발명의 실행에 유용한 활성화 펩티드 또는 서열은, 제한되지 않지만, 서열 번호 23, 72 및 73을 포함한다. 본 발명의 실행에 유용한 다른 활성화 서열은 서열 번호 64~69 및 98~103의 N-말단 잔기 1~10으로부터 수득될 수 있다.

[0129] 프로엘라스타아제 서열로부터의 활성화 펩티드의 제거는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생성한다. 활성화 펩티드가 프로엘라스타아제 서열로부터 제거되고/성숙한 엘라스타아제 서열로부터 분리되어 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생성하는 단계는 본원에서 활성화 단계로 지칭된다. 이와 같이, 다른 양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 성숙한 엘라스타아제 단백질이다.

[0130] 활성화 펩티드의 C-말단(즉, 카복시 말단) 및 성숙한 단백질의 N-말단(즉, 아미노 말단)을 포함하는 아미노산 잔기(분할 결합을 둘러쌈)는 도 2에 도시되어 있고, 또한 본원에서 다음과 같이 동정된다. 우선, 활성화 펩티드의 C-말단에 위치한 잔기는 PX,...P5, P4, P3, P2, 및 P1로 명시되고, 여기서 P1은 활성화 펩티드의 C-말단 잔기이다. 성숙한 단백질의 N-말단에 위치한 잔기는 P1', P2', P3',...PX'로 명시되고, 여기서 P1'는 성숙한 단백질의 N-말단 아미노산 잔기이다. 단백질 가수분해로 분할되는 자르기 쉬운 결합(도 2에서 "분할 결합"으로 지칭됨)은 활성화 펩티드의 P1 잔기와 성숙한 단백질의 P1' 잔기 사이의 펩티드 결합이다.

[0131] 활성화 펩티드의 C-말단의 4개 아미노산(잔기 P4~P1)으로부터 성숙한 단백질의 N-말단의 처음 4개의 아미노산(잔기 P1'~P4')까지를 포괄하는 영역은 본원에서 "분할 부위"로 지칭된다.

[0132] 활성화 펩티드의 C-말단의 대략 5개의 아미노산(즉, 잔기 P5~P1)으로부터 성숙한 단백질의 N-말단의 처음 3개의 아미노산(즉, 잔기 P1'~P3')까지를 포괄하는 영역은 본원에서 "분할 도메인"으로 지칭된다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 분할 도메인의 예로는, 제한되지 않지만, 서열 번호 42, 43, 48, 49, 52, 53, 54 또는 55가 포함된다. 본 발명에 사용될 수 있는 다른 분할 도메인은 컨센서스 분할 도메인 서열 $Xaa_1Xaa_2Xaa_3Xaa_4Xaa_5Xaa_6Xaa_7Xaa_8$에 의해 기재된 임의의 서열이고, 여기서 Xaa_1=P5, Xaa_2=P4, Xaa_3=P3, Xaa_4=P2, Xaa_5=P1, Xaa_6=P'1, Xaa_7=P'2, 및 Xaa_8=P'3이고, 이때:

[0133] -Xaa_1은 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린, 글리신, 아스파라긴, 라이신, 또는 알라닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0134] -Xaa_2는 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 히스티딘, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0135] -Xaa_3은 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신 또는 프롤린이 아니고;

[0136] -Xaa_4는 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0137] -Xaa_5는 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 글리신, 티로신, 페닐알라닌, 프롤린, 아르기닌, 글루타메이트, 또는 라이신이 아니고;

[0138] -Xaa_6은 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0139] -Xaa_7은 글리신, 알라닌, 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0140] -Xaa_8은 발린, 트레오닌, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이다.

[0141] 활성화 펩티드의 잔기 P3, P2, 및 P1을 포괄하는 3개의 아미노산 영역은 본원에서 "엘라스타아제 인식 부위"로 지칭된다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 인식 부위로는, 제한되지 않지만, 서열 번호 14~16, 및 18~21이 포함된다. 본 발명에 의해 고려되는 다른 인식 부위로는 서열 번호 11, 12, 13, 또는 93의 컨센서스 인식 부위에 의해 기재되는 임의의 인식 부위가 포함된다. 서열 번호 11 컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 1은 펩티드 서열 $Xaa_1Xaa_2Xaa_3$으로 표시되고, 여기서 Xaa_1=P3, Xaa_2=P2, Xaa_3=P1이고, 이때:

[0142] -Xaa_1은 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신 또는 프롤린이 아니고;

[0143] -Xaa_2는 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0144] -Xaa_3은 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신, 티로신, 페닐알라닌, 프롤린, 아르기닌, 글루타메이트, 또는 라이신이 아니다.

[0145] 서열 번호 12 컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 2는 서열 $Xaa_1ProXaa_2$로 표시되고, 여기서:

[0146] -Xaa_1은 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바

람직하게는 글리신 또는 프롤린이 아니고;

[0147] -Pro는 프롤린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0148] -Xaa_2는 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신, 티로신, 페닐알라닌, 프롤린, 아르기닌, 글루타메이트, 또는 라이신이 아니다.

[0149] 서열 번호 13 컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 3은 펩티드 서열 $Xaa_1Xaa_2Xaa_3$으로 표시되고, 여기서 Xaa_1=P3, Xaa_1=P2, Xaa_3=P1이고, 이때

[0150] -Xaa_1은 아스파라긴 또는 알라닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0151] -Xaa_2는 프롤린 또는 알라닌, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고,

[0152] -Xaa_3은 알라닌, 로이신, 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이다.

[0153] 서열 번호 93 컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 4는 서열 $Xaa_1ProXaa_2$로 표시되고, 이때:

[0154] -Xaa_1은 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신 또는 프롤린이 아니고;

[0155] -Pro는 프롤린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이고;

[0156] -Xaa_2는 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린, 또는, 선택적으로, 이의 유사체이지만, 바람직하게는 글리신, 티로신, 페닐알라닌, 프롤린, 아르기닌, 글루타메이트, 또는 라이신이 아니다.

[0157] "분할 서열", "분할 도메인", "활성화 서열", "엘라스타아제 인식 서열" 등으로서의 서열에 대한 언급은 단지 언급의 용이성을 위한 것이고, 서열이 인식되거나 처리되는 기작 또는 서열의 임의의 기능을 내포하려는 것은 아니다.

[0158] 본 발명의 단백질은 일반적으로 아미노산으로 구성되고, 추가로 하나 이상의(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 또는 15개 까지의) 아미노산 유사체를 포함할 수 있다. 일반적으로, 본원에 사용될 경우, 아미노산은 자연적으로 발생된 L-입체이성체를 지칭한다. 아미노산 유사체는 D-입체이성체, 화학적으로 변형된 아미노산, 또는 다른 비천연 아미노산을 지칭한다. 예를 들면, 비천연 아미노산으로는, 제한되지 않지만 아제티딘카복실산, 2-아미노아디프산, 3-아미노아디프산, β-알라닌, 아미노프로피온산, 2-아미노부티르산, 4-아미노부티르산, 6-아미노카프로산, 2-아미노헵타노산, 2-아미노이소부티르산, 3-아미노이소부티르산, 2-아미노피멜산, 3급-부틸글리신, 2,4-디아미노이소부티르산, 데스모신(desmosine), 2,2'-디아미노피멜산, 2,3-디아미노프로피온산, N-에틸글리신, N-에틸아스파라긴, 호모프롤린, 하이드록시라이신, 알로-하이드록시라이신, 3-하이드록시프롤린, 4-하이드록시프롤린, 이소데스모신, 알로-이소로이신, N-메틸알라닌, N-메틸글리신, N-메틸이소로이신, N-메틸펜틸글리신, N-메틸발린, 나프트알라닌, 노르발린, 노르로이신, 오르니틴, 펜틸글리신, 피페콜산 및 티오프롤린이 포함된다. 화학적으로 변형된 아미노산으로는 하나 이상의 그의 측부 기, α-탄소 원자, 말단 아미노 기, 또는 말단 카복실산 기에서 가역적으로 또는 비가역적으로 화학적으로 블로킹된 아미노산을 포함한다. 화학적 변형으로는 화학 잔기의 부가, 새로운 결합의 생성, 및 화학 잔기의 제거가 포함된다. 화학적으로 변형된 아미노산의 예로는, 예를 들면, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 설폰, S-(카복시메틸)-시스테인, S-(카복시메틸)-시스테인 설폭사이드 및 S-(카복시메틸)-시스테인 설폰이 포함된다. 아미노산 측부 기에서의 변형으로는 라이신 ε-아미노 기의 아실화, 아르기닌, 히스딘, 또는 라이신의 N-알킬화, 글루탐산 또는 아스파탐산의 카복실산 기의 알킬화, 및 글루타민 또는 아스파라긴의 탈아민화가 포함된다. 말단 아미노의 변형으로는 데스-아미노, N-저급 알킬, N-디-저급 알킬, 및 N-아실 변형이 포함된다. 말단 카복시 기의 변형으로는 아미드, 저급 알킬 아미드, 디알킬 아미드, 및 저급 알킬 에스터 변형이 포함된다. 저급 알킬은 C_1-C_4 알킬이다. 더욱이, 하나 이상의 측부 기, 또는 말단 기는 통상의 숙련된 단백질 화학자에게 공지된 보호기에 의해 보호될 수 있다. 아미노산의 α-탄소는 모노- 또는 디-메틸화될 수 있다.

[0159] 본 발명의 단백질은 변형되거나 유도체화될 수 있고, 예컨대 포스포릴화 또는 글리코실화에 의해 변형될 수 있거나, 컨쥬게이션(conjugation)에 의해, 예를 들면 지질 또는 또 다른 단백질(예를 들어, 타깃화 또는 안정화를 위해) 등으로 유도체화될 수 있다.

[0160] 본 발명은 종종 "단리된" 또는 "정제된" 엘라스타아제 단백질에 관한 것이다. 단리된 엘라스타아제 단백질은 그의 세포 환경으로부터 제거된 것이다. 정제된 엘라스타아제 단백질에는 세포 물질, 또는 엘라스타아제 단백질이 유도되는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 다른 오염 단백질이 실질적으로 존재하지 않거나, 또는 화학적으로 합성될 경우 다른 화학 전구체 또는 다른 화학물질이 존재하지 않는 다. 용어 "세포 물질이 실질적으로 존재하지 않는"이란, 엘라스타아제 단백질이 재조합적으로 생산되는 세포의 세포 성분으로부터 분리된 엘라스타아제 단백질의 제조물을 포함한다. 이와 같이, 세포 물질이 실질적으로 존재하지 않는 엘라스타아제 단백질은 약 30%, 20%, 10%, 또는 5%(건조 중량 기준) 미만의 이종성 단백질(본원에서 "오염 단백질"로 지칭됨)을 갖는 엘라스타아제 단백질의 제조물을 포함한다. 엘라스타아제 단백질은 이것이 배양 배지내로 분비되는 과정에 의해 생산되고, 이는 또한 바람직하게는 배양 배지가 실질적으로 존재하지 않고, 즉, 배양 배지는 엘라스타아제 단백질 제조물의 약 20%, 10%, 또는 5% 미만의 부피를 나타낸다.

[0161] 특정 실시양태에서, 단리된 또는 정제된 엘라스타아제에는 부가적으로 세포 DNA가 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 숙주 세포 게놈성 DNA는 단리된 또는 정제된 엘라스타아제 단백질의 제조물에서, 또는 단리된 또는 정제된 엘라스타아제 단백질을 포함하는 조성물에서 엘라스타아제 단백질 밀리그램당 10 피코그램 미만, 5 피코그램 미만, 3 피코그램 미만, 2 피코그램 미만, 또는 1 피코그램 미만의 DNA의 양으로 존재한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포 DNA는 피치아 파스토리스 DNA이다.

[0162] 유용한 엘라스타아제 단백질 서열은 표 1에 제공되어 있다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 (i) 제I형 엘라스타아제 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열을 포함하는 프로엘라스타아제 단백질(제한되지 않지만 서열 번호 6~9, 64~69, 88~91 및 98~103 중 임의의 하나의 단백질이 포함됨)을 제공한다. 인간 제I형 엘라스타아제의 수개의 다형형태가 공지되어 있다. 다형형태의 임의의 조합은 본 발명의 프로엘라스타아제 단백질 서열에서 고려되고, 제한되지 않지만 표 2에 제시된 다형형태의 조합이 포함된다. 단백질은 상기 활성화 서열에 작동적으로 연결된 신호 서열을 선택적으로 추가로 포함한다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 신호 서열, 예컨대 서열 번호 34의 아미노산 서열에 의해 예시되는 효모 α-인자 신호 펩티드는 피치아 파스토리스에서 작동가능하다. 대안의 신호 펩티드 함유 서열은 서열 번호 50 및 96(신호 펩티드, 비-엘라스타아제 프로펩티드 및 이격자 서열을 함유함) 및 서열 번호 51 및 97(신호 펩티드 및 비-엘라스타아제 프로펩티드를 함유함)에 예시되어 있다. 다른 구체적인 실시양태에서, 신호 서열은 포유동물 분비 신호 서열, 예컨대 돼지 엘라스타아제 신호 서열이다. 바람직하게는, 엘라스타아제 인식 서열은 제I형 엘라스타아제 인식 서열, 가장 바람직하게는 인간 제I형 엘라스타아제 인식 서열이다.

[0163] 본 발명은 추가로 본 발명의 엘라스타아제 단백질의 변형체를 내포한다. 변형체는 하나 이상의 예측된 비필수 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 변형체는 자연적으로 발생된 성숙한 엘라스타아제에 비교하여 15개 이하, 12개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개 이하의 보존적 아미노산 치환을 포함하고/하거나, 자연적으로 발생된 성숙한 엘라스타아제에 비교하여 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개 이하의 비보존적 아미노산 치환을 포함한다.

[0164] 한 구체적인 실시양태에서, 변형체는 본 발명의 성숙한 엘라스타아제, 프로엘라스타아제 또는 프리프로엘라스타아제에 비교하여, 예컨대 서열 번호 1 또는 서열 번호 84의 성숙한 엘라스타아제 또는 서열 번호 6~9, 64~69, 88~91, 및 98~103의 프로엘라스타아제 단백질에 대하여 10개 이하, 바람직하게는 5개 이하의 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 서열 번호 1 및 84의 아미노산 서열은 성숙한 엘라스타아제 서열중에서, 위치 44(W 또는 R); 59(M 또는 V); 220(V 또는 L); 및 243(Q 또는 R)(위치는 프리프로단백질을 지칭함)에서 잠재적인 다형형태에 상응하는 하나 이상의 위치를 함유한다. 본 발명은 이에 따라 서열 번호 84에서 확인된 4종의 다형형태의 임의의 조합을 갖는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 내포한다. 이러한 조합 각각은 상기 표 3에 개략되어 있다. 서열 번호 88~91 및 98~103의 서열은 추가로 프로펩티드 서열중에서, 위치 10(Q 또는 H)에서 잠재적 다형형태를 함유한다. 본 발명은 이에 따라 서열 번호 88~91 및 98~103에서 확인된 5종의 다형형태의 임의의 조합을 함유하는 프리프로엘라스타아제 및 프로엘라스타아제 서열을 내포한다. 이러한 조합은 각각 상기 표 2에 개략되어 있다.

[0165] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 당 분야에 정의되어 있다. 이들 계열은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 로이신, 이소로이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소로이신) 및 방향족

측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판)을 포함한다.

[0166] 본 발명의 변형 엘라스타아제 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 아미노산 유사체 뿐만 아니라 아미노산에 의한 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0167] 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 단백질은 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 변형체, 예를 들어 표 1에 열거된 엘라스타아제 프로단백질 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질, 제한되지 않지만, 예컨대 서열 번호 6~9, 64~69, 88~91, 및 98~103의 엘라스타아제 프로단백질에 약 75%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 변형체를 포함하거나 이로 본질적으로 구성되고, 발현될 경우 엘라스타아제 활성을 보유하여 서열 번호 1, 4, 5, 84 또는 87의 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산한다.

[0168] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에 갭이 도입될 수 있다). 이어서 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수에 대한 함수이다(% 동일성=(동일한 위치의 수/중첩 위치의 총 수)x100). 한 실시양태에서, 두 서열은 동일한 길이이다. 다른 실시양태에서, 두 서열은 두 서열중 보다 긴 길이의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10% 이하로 길이가 상이하다.

[0169] 두 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 두 서열의 비교를 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 바람직한 비제한적 예는 문헌[Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877]에서와 같이 변형된, 문헌[Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘이 문헌[Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램으로 혼입된다. BLAST 뉴클레오티드 조사는 NBLAST 프로그램(스코어=100, 단어길이=12)으로 수행되어 본 발명의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득한다. BLAST 단백질 조사는 XBLAST 프로그램(스코어=50, 단어길이=3)으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 수득한다. 비교 목적으로 갭을 갖는 정렬을 수득하기 위해, 갭드(Gapped) BLAST가 문헌[Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 다르게는, PSI-Blast가 사용되어 분자 사이의 거리 관계(Id.)를 검출하는 반복된 조사를 수행할 수 있다. BLAST, 갭드 BLAST, 및 PSI-Blast 프로그램을 이용할 경우, 개개 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 매개변수가 사용될 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.를 참조한다

[0170] 서열을 비교하기 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 또 다른 바람직한 비제한적 예는 문헌[Myers and Miller, CABIOS (1989)]에 기재된 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 CGC 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)내로 혼입된다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 이용할 경우, PAM 120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티(penalty) 및 4의 갭 페널티가 사용될 수 있다. 서열 분석을 위한 추가의 알고리즘은 당 분야에 공지되어 있고, 문헌[Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5]에 기재된 바와 같은 ADVANCE 및 ADAM; 및 문헌[Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55:2444-8]에 기재된 FASTA가 포함된다. FASTA에서, ktup은 조사의 감도 및 속도를 설정하는 제어 선택사항이다. ktup=2인 경우, 비교되는 두 서열중의 유사한 영역은 정렬된 잔기의 쌍을 조사함으로써 발견되고; ktup=1인 경우, 단일 정렬된 아미노산이 검사되고, ktup는 단백질 서열을 위해 2 또는 1로 설정되거나 DNA 서열을 위해 1~6으로 설정될 수 있다. ktup가 구체화되지 않은 경우 디폴트는 단백질의 경우 2이고 DNA의 경우 6이다. FASTA 매개변수에 대한 추가의 설명을 위해, http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/fasta.1.html#sect2를 참조하고, 이의 내용은 본원에 참고로 인용되어 있다.

[0171] 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 갭을 허용하거나 허용하지 않으면서 상기 기재된 기법과 유사한 기법을 사용하여 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성을 계산하는데 있어서, 전형적으로 정확한 매치가 계수된다.

[0172] 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 번역후 변형을 나타낼 수 있고, 제한되지 않지만 글리코실화(예를 들어, N-연결된 또는 O-연결된 글리코실화), 미리스틸화, 팔미틸화, 아세틸화 및 포스포릴화(예를 들어, 세린/트레오닌 또는 티로신)가 포함된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 내생성으로 발현된 엘라스타아제 단백질에 비하여 O-연결된 글리코실화된 및/또는 N-연결된 글리코실화의 감소된 수준을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 O-연결된 글리코실화된 또는 N-연결된 글리코실화를 나타내지 않는다.

[0173] 5.1.1. 성숙한 엘라스타아제 서열

[0174] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 서열은 바람직하게는 포유동물 엘라스타아제 서열, 가장 바람직하게는 인간 엘라스타아제 서열이다. 다른 실시양태에서, 성숙한 포유동물 엘라스타아제 서열은 다른 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 돼지, 소 또는 말로부터이다.

[0175] 본 발명의 방법 및 조성물에서, 사용되는 성숙한 엘라스타아제 서열은 바람직하게는 작은 소수성 잔기, 예컨대 알라닌의 카복시 측상에서 선호되는, 소수성 단백질 서열을 우선적으로 분할하는 제I형 췌장 엘라스타아제의 서열이다. 제I형 췌장 엘라스타아제의 예로는 피부에서 발현되는 인간 엘라스타아제 I 효소(NCBI 수탁 번호 NP_001962) 및 췌장에서 발현되는 돼지 췌장 엘라스타아제 I 효소(NCBI 수탁 번호 CAA27670)가 포함된다. 서열 번호 1 및 서열 번호 84는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 서열의 예이다.

[0176] 다르게는, 소수성 단백질 서열을, 바람직하게는 중간 내지 큰 소수성 아미노산 잔기의 카복시 측상에서 분할시킬 수 있는 제II형 엘라스타아제가 사용될 수 있다. 제II형 엘라스타아제의 예로는 인간 엘라스타아제 IIA 효소(NCBI 수탁 번호 NP254275) 및 돼지 엘라스타아제 II 효소(NCBI 수탁 번호 A26823)가 포함되고, 둘다 췌장에서 발현된다.

[0177] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 변형체가 또한 내포된다. 변형체는 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 아미노산 서열과 충분히 동일하거나 이로부터 유도되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함하고, 엘라스타아제 생물 활성을 나타낸다. 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 생물학적 활성 부분은 단백질일 수 있고, 이는 예를 들면, 150, 160, 175, 180, 185, 190, 200, 210, 220, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 또는 239개 이상의 아미노산 길이다. 게다가, 단백질의 다른 영역이 결실된 다른 생물학적 활성 부분은 재조합 기법에 의해 제조될 수 있고, 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 고유의 형태의 하나 이상의 기능적 활성에 대해 평가될 수 있다.

[0178] 또한, 4개의 인간 제I형 엘라스타아제 다형형태의 임의의 조합을 포함하는 성숙한 엘라스타아제 단백질은 서열 번호 84에 의해 표시된다. 가능한 조합은 상기 표 3에 제시된다.

[0179] 5.1.2. 프로엘라스타아제 활성화 서열

[0180] 엘라스타아제 활성화 서열은 프로엘라스타아제 단백질로부터의 제거가 생물학적으로 활성인 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생성하는 임의의 서열이다.

[0181] 활성화 서열은 일반적으로 프로단백질이 분할되어 성숙한 생물학적 활성 단백질을 생산하는 곳에 인접한 프로테아제 인식 부위를 함유한다. 활성화 서열은 프로테아제 또는 엘라스타아제 인식 부위를 첨가하도록 조작될 수 있거나, 또는 존재하는 프로테아제 인식 부위를 또 다른 프로테아제 인식 부위로 대체하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 실행에 유용한 활성화 펩티드 또는 서열은, 제한되지 않지만, 서열 번호 23, 72 및 73이다. 상기 발명의 실행에 유용한 다른 활성화 서열은 서열 번호 64~68의 N-말단 잔기 1~10으로부터 수득될 수 있다. 바람직한 양태에서, 프로엘라스타아제 활성화 서열은 제I형 또는 제II형 엘라스타아제에 대한 인식 서열을 함유하도록 조작된다. 가장 바람직하게는, 엘라스타아제 인식 서열은 이것이 작동적으로 연결되는 성숙한 엘라스타아제에 의해 인식된다. 이와 같이, 제II형 엘라스타아제에 대한 실시양태에서, 인식 서열은 가장 바람직하게는 제II형 엘라스타아제 인식 서열이다. 역으로, 제I형 엘라스타아제에 대한 실시양태에서, 인식 서열은 가장 바람직하게는 제I형 엘라스타아제 인식 서열이다. 한 바람직한 실시양태에서, 인식 서열은 인간 제I형 엘라스타아제 인식 서열이다. 예시적인 제I형 인식 서열로는 서열 번호 14~16, 및 18~21의 아미노산 서열이 포함된다. 본 발명에 의해 고려되는 다른 인식 부위로는 서열 번호 11, 12, 또는 13의 컨센서스 인식 부위로 기재되는 임의의 인식 부위가 포함된다.

[0182] 5.1.3. 신호 서열

[0183] 본 발명의 프로엘라스타아제 단백질은 추가로 프로엘라스타아제 단백질이 이것이 발현되는 숙주 세포의 배양 배지로 분비되는 것을 증가시키는 신호 서열을 함유한다.

[0184] 엘라스타아제 단백질의 고유의 신호 서열이, 특히 포유동물 숙주 세포에서의 발현을 위해 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 엘라스타아제 단백질의 고유의 신호 서열은 제거되고, 또 다른 단백질로부터의 신호 서열, 예컨대 돼지 제I형 엘라스타아제 신호 서열, 인간 제I형 엘라스타아제 신호 서열, 또는 효모 α-인자 신호 서열로 대체될 수 있다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 효모 α-인자 신호 펩티드는 추가로 (1) 효모 α-인자 프로펩티드 또는 (2) 효모 α-인자 프로펩티드 및 이격자 서열을 포함할 수 있고, 각각 개별적으로 서열 번

호 50 및 96 또는 서열 번호 51 및 97의 아미노산 서열에 의해 예시된다. 다르게는, 바큘로바이러스(baculovirus) 외피 단백질의 gp67 분비 서열은 이종성 신호 서열로서 사용될 수 있다(Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992)). 진핵생물 이종성 신호 서열의 다른 예로는 멜리틴(melittin) 및 인간 태반 알칼리성 포스파타아제의 분비 서열(스트라타진(Stratagene); 캘리포니아주 라호야 소재)이 포함된다. 또 다른 실시예에서, 유용한 원핵생물 이종성 신호 서열로는 phoA 분비 신호(Sambrook et al., supra) 및 단백질 A 분비 신호(파마시아 비오테크(Pharmacia Biotech); 뉴저지주 피스카타웨이)가 포함된다.

[0185] **5.2 엘라스타아제 핵산**

[0186] 본 발명의 한 양태는 본 발명의 재조합 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 재조합 핵산 분자에 속한다. 본원에 사용될 경우, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자(예를 들어, cDNA 또는 게놈성 DNA) 및 RNA 분자(예를 들어, mRNA), 및 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 생산되는 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하고자 한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.

[0187] 본 발명은 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 이와 같이, 특정 실시양태에서, 본 발명은 (i) 제I형 엘라스타아제 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열을 포함하는 프로엘라스타아제 단백질(제한되지 않지만 서열 번호 6~9, 64~69, 88~91, 또는 98~103중 임의의 하나의 단백질이 포함됨)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 또한 (i) 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결되는 (ii) 프로테아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열(제한되지 않지만 서열 번호 23, 72, 또는 73의 아미노산 서열이 포함됨)에 작동적으로 연결되는 (iii) 피치아 파스토리스에서 작동가능한 신호 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0188] 본 발명의 핵산은 정제될 수 있다. "정제된" 핵산 분자, 예컨대 cDNA 분자에는 다른 세포 물질, 또는 재조합 기법에 의해 생산될 경우 배양 배지가 실질적으로 존재하지 않거나, 화학적으로 합성될 경우 화학 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다.

[0189] 핵산 분자가 cDNA 또는 RNA, 예를 들어, mRNA 분자인 경우에, 이러한 분자는 폴리 A "테일(tail)"을 포함하거나, 다르게는, 이러한 3' 테일이 결여될 수 있다.

[0190] 본 발명의 핵산 분자는 cDNA, mRNA 또는 게놈성 DNA를 주형 및 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머로서 사용하여 표준 PCR 증폭 기법에 따라 증폭될 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산은 적절한 벡터내로 클로닝되고, DNA 서열 분석에 의해 특징지워질 수 있다. 더욱이, 본 발명의 핵산 분자의 전부 또는 일부에 상응하는 올리고뉴클레오티드는 표준 합성 기법에 의해, 예를 들어, 자동화된 DNA 합성기를 사용하여 제조될 수 있다.

[0191] **5.3 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포**

[0192] 임의의 본 발명의 핵산 또는 본 발명의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 포함하는 벡터가 추가로 제공된다. 구체적인 실시양태에서, 벡터는 본 발명의 핵산에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 조절하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0193] 본 발명의 핵산 및 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 벡터 또는 핵산은 숙주 세포 게놈내로 통합되고; 다른 실시양태에서, 벡터 또는 핵산은 염색체외이다. 바람직한 숙주 세포는 피치아 파스토리스 세포이다.

[0194] 본원에 사용될 경우, 용어 "벡터"는 이것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드(plasmid)"이고, 이는 추가의 DNA 분절이 결찰될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루우프(loop)를 지칭한다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스성 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 분절은 바이러스성 게놈내로 결찰될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자발적으로 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포내로 도입시 숙주 세포의 게놈내로 통합되고, 이에 따라 숙주 게놈과 함께 복제된다. 게다가, 특정 벡터, 발현 벡터는 이들이 작동적으로 연결되는 코딩 서열의 발현을 유도할 수 있다. 대체적으로, 재조합 DNA 기법에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드(벡터)의 형태이다.

[0195] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 발현하기에 적합한 형태인 본 발명의 성숙한 엘라스타아제, 프로

엘라스타아제 또는 프리프로엘라스타아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이는 재조합 발현 벡터가, 발현에 사용되는 숙주 세포에 기초하여 선택되고 발현된 핵산 서열에 작동적으로 연결되는 하나 이상의 조절 서열을 포함함을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동적으로 연결된"은 관심있는 뉴클레오티드 서열이 조절 서열(들)에 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 방식으로(예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포내로 도입될 경우 숙주 세포에서) 연결됨을 의미하고자 한다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인헨서(enhancer) 및 다른 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하고자 한다. 이러한 조절 서열은, 예를 들면, 문헌[Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990)]에 기재되어 있다. 조절 서열로는 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 유도하는 서열, 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하는 서열(예를 들어, 조직 특이적 조절 서열)이 포함된다. 발현 벡터의 고안이 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 원하는 엘라스타아제 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 좌우될 수 있음은 당 분야의 숙련가에 의해 인식될 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 숙주 세포내로 도입되어 본원에 기재된 바와 같이 핵산에 의해 코딩된 엘라스타아제 단백질을 생산할 수 있다.

[0196] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 원핵생물(예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*)) 또는 진핵생물 세포(예를 들어, 곤충 세포(바큘로바이러스 발현 벡터를 사용함), 효모 세포 또는 포유동물 세포)에서 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 발현하기 위해 고안될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 문헌[Goeddel, supra]에 추가로 논의되어 있다. 다르게는, 재조합 발현 벡터는 생체내에서, 예를 들면 T7 프로모터 조절 서열 및 T7 폴리머라아제를 사용하여 전사되고 번역될 수 있다.

[0197] 원핵생물에서 단백질의 발현은 융합 또는 비융합 단백질의 발현을 유도하는 구성적 또는 유도가능한 프로모터를 함유하는 벡터를 갖는 이. 콜라이에서 가장 종종 실행된다. 융합 벡터는 이에 코딩되는 단백질로, 통상적으로는 재조합 단백질의 아미노 말단으로 다수의 아미노산을 첨가한다. 이러한 융합 벡터는 전형적으로 다음의 3가지 목적으로 작용한다: 1) 재조합 엘라스타아제 단백질의 발현을 증가시키고; 2) 재조합 엘라스타아제 단백질의 용해도를 증가시키고; 3) 친화도 정제에서 리간드로서 작용함으로써 재조합 엘라스타아제 단백질의 정제에 도움을 준다. 종종, 융합 발현 벡터에서, 단백질 가수분해 분할 도메인은, 융합 잔기로부터의 재조합 단백질을 분리한 다음 융합 단백질의 정제를 가능하게 하도록 융합 잔기와 재조합 단백질의 연결점에 도입된다. 이와 같이, 융합 잔기 및 단백질 가수분해 분할 도메인은 함께 활성화 서열로서 작용할 수 있고, 프로테아제 인식 부위를 엘라스타아제 단백질의 재조합 발현을 위해 포함한다. 이러한 융합 단백질을 활성화시킬 수 있는 효소 및 이들의 동족(cognate) 인식 서열로는 인자 Xa, 트롬빈(thrombin) 및 엔테로키나아제(enterokinase)가 포함된다. 전형적인 융합 발현 벡터로는 pGEX(파마시아 바이오텍 인코포레이티드(Pharmacia Biotech Inc.); Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40), pMAL(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 매사추세츠주 비벌리 소재) 및 pRIT5(파마시아, 뉴저지주 피스카타웨이 소재)가 포함되고, 이는 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST: Glutathione S-transferase), 말토즈 E 결합 단백질, 또는 단백질 A를 각각 타겟 재조합 단백질에 융합시킨다.

[0198] 적합한 유도가능한 비융합 이. 콜라이 발현 벡터의 예로는 pTrc(Amann et al., 1988, Gene 69:301-315) 및 pET-11d(Studier et al., 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 185:60-89)가 포함된다. pTrc 벡터로부터의 타깃 유전자 발현은 하이브리드 trp-lac 융합 프로모터로부터의 숙주 RNA 폴리머라아제 전사에 의존한다. pET-11d 벡터로부터의 타깃 유전자 발현은 공동발현된 바이러스성 RNA 폴리머라아제(T7gn1)에 의해 중재된 T7gn10-lac 융합 프로모터로부터의 전사에 의존한다. 바이러스성 폴리머라아제는 숙주 균주 BL21(DE3) 또는 HMS174(DE3)에 의해 T7gn1 유전자가 함유된 거주 λ 프로파아지(prophage)로부터 lacUV 5 프로모터의 전사 제어하에 공급된다.

[0199] 이. 콜라이에서 재조합 엘라스타아제 단백질 발현을 최대화하기 위한 한 전략은 단백질 가수분해적으로 재조합 단백질을 분할하는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 단백질을 발현하는 것이다(Gottesman, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 185: 119-129). 또 다른 전략은 핵산의 핵산 서열을 발현 벡터내로 삽입되도록 변경시켜 각각의 아미노산에 대한 개별 코돈이 이. 콜라이에서 우선적으로 이용되는 코돈이도록 하는 것이다(Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). 본 발명의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기법에 의해 실행될 수 있다.

[0200] 또 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 에스. 세레비지아 또는 피. 파스토리스에서 발현하기 위한 벡터의 예로는 pYepSec1(Baldari et al., 1987, *EMBO J.* 6:229-234), pMFa(Kurjan and Herskowitz, 1982, *Cell* 30:933-943), pJRY88(Schultz et al., 1987, *Gene* 54: 113-123), pYES2 (인비트로겐 코포레이션(Invitrogen Corporation), 캘리포니아주 샌디에고 소재), 및 pPicZ(인비트로겐 코포레이션, 캘리포니아주 샌디

에고 소재)가 포함된다. 효모에서의 발현을 위해, 바람직하게는 메탄올-유도성 프로모터가 사용된다. 각각의 아미노산에 대한 개별 코돈이 피. 파스토리스에서 우선적으로 이용되는 코돈이도록 발현 벡터내로 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경하는 것은 또한 본원에서 고려된다. 보다 구체적으로, 서열 번호 33 또는 서열 번호 81의 코돈은 피. 파스토리스에서 우선적으로 이용되는 코돈을 위해 치환될 수 있다.

[0201] 다르게는, 발현 벡터 바큘로바이러스 발현 벡터이다. 배양된 곤충 세포(예를 들어, Sf9 세포)에서 단백질의 발현에 이용가능한 바큘로바이러스 벡터는 pAc 시리즈(Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈(Lucklow and Summers, 1989, Virology 170:31-39)를 포함한다. 또 다른 전략은 각각의 아미노산에 대한 개별 코돈이 곤충 세포에서 우선적으로 이용되는 코돈이도록 발현 벡터내로 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경하는 것이다.

[0202] 또 다른 실시양태에서, 엘라스타아제 단백질은 포유동물 세포에서 포유동물 발현 벡터를 사용하여 발현된다. 포유동물 발현 벡터의 예로는 pCDM8(Seed, 1987, *Nature* 329(6142):840-2) 및 pMT2PC(Kaufman et al , 1987, *EMBO J*. 6: 187-195)가 포함된다. 포유동물 세포에서 사용될 경우, 발현 벡터의 제어 기능은 종종 바이러스성 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들면, 흔히 사용되는 프로모터는 폴리오마(polyoma), 아데노바이러스(Adenovirus) 2, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 및 시미안 바이러스(Simian Virus 40)로부터 유도된다. 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘다에 적합한 다른 발현 시스템을 위해, 문헌[Sambrook et al., supra]의 16장 및 17장을 참조한다.

[0203] 또 다른 실시양태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 특별한 세포 유형에서 우선적으로 핵산의 발현을 유도할 수 있다(예를 들어, 조직 특이적 조절 요소가 핵산을 발현하기 위해 사용됨). 조직 특이적 조절 요소는 당 분야에 공지되어 있다. 적합한 조직 특이적 프로모터의 비제한적 예로는 알부민 프로모터(간 특이적; Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1 :268-277), 림프 특이적 프로모터(Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43:235-275), 특별히 T 세포 수용체의 프로모터(Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8:729-733) 및 면역글로불린(Banerji et al., 1983, Cell 33:729-740; Queen and Baltimore, 1983, Cell 33:741-748), 뉴런 특이적 프로모터(예를 들어, 신경섬유 프로모터; Byrne and Ruddle, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477), 췌장 특이적 프로모터(Edlund et al., 1985, Science 230:912-916), 및 유선 특이적 프로모터(예를 들어, 유장(milk whey) 프로모터; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 특허출원 공개공보 제EP264166호)가 포함된다. 점진적으로 조절되는 프로모터가 또한 내포되고, 예를 들면 마우스 hox 프로모터(Kessel and Grass, 1990, Science 249:374-379) 및 베타-페토단백질(beta-fetoprotein) 프로모터(Campes and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3:537-546)이다.

[0204] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 단백질의 발현은 상응하는 유전자의 투여량을 증가시킴으로써, 예를 들면 고 복사 발현 벡터 또는 유전자 증폭을 사용함으로써 증가될 수 있다. 유전자 증폭은 디하이드로폴레이트 환원효소("*dhfr*": dihydro folate reductase") 결핍 CHO 세포에서, *dhfr* 유전자에 의한 관심있는 유전자의 공동형질감염 및 메토트렉세이트(methotrexate) 농도의 계단식 증가에 의해 선택 배지에 노출시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology Unit 16.14, (John Wiley & Sons, New York, 1996)]을 참조한다. 유전자 복사 수를 증가시키기 위한 다른 방법은 벡터를 숙주 세포내로 도입하기 이전에 벡터에서 관심있는 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 발현 카세트(예를 들어, 코딩 서열을 갖는 프로모터)를 다량체화하는 것이다. 발현 카세트 다량체화를 달성하기 위한 방법 및 벡터는 효모 및 포유동물 숙주 세포 시스템에서 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Monaco, Methods in Biotechnology 8:Animal Cell Biotechnology, at pp. 39-348 (Humana press, 1999); Vassileva et al., 2001, Protein Expression and Purification 21:71-80; Mansur et al., 2005, Biotechnology Letter 27(5):339-45] 참조). 또한, 다중 복사 유전자 발현을 위한 키트가 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 다중 복사 피치아 발현 키트가 인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드 소재)으로부터 수득가능하다. 발현 카세트의 다량체화는 이후 실시예 6에 예시되어 있다.

[0205] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입되어진 숙주 세포에 관한 것이다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 상호교환적으로 본원에서 사용된다. 이러한 용어는 특정한 피험체 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 지칭함을 알아야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 기인하여 다음 세대들에서 특정 변형이 발생될 수 있으므로, 이러한 자손은 사실 모세포와 동일하지 않지만, 본원에 사용될 경우 이 용어의 범주에 여전히 포함된다.

[0206] 숙주 세포는 원핵생물(예를 들어, 이. 콜라이) 또는 진핵생물 세포(예를 들어, 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포)일 수 있다.

[0207] 벡터 DNA는 원핵생물 또는 진핵생물 세포내로 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기법을 통해 도입될 수 있다. 본원에 사용될 경우, 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 외래 핵산의 숙주 세포내로의 도입을 위한 당 분야에 인식된 다양한 기법을 지칭하고, 인산 칼슘 또는 염화 칼슘 공침전, DEAE-덱스트란-중재된 형질감염, 리포펙션(lipofection), 또는 전기천공법이 포함된다. 적합한 숙주 세포를 형질전환시키거나 형질감염시키기 위한 적합한 방법은 문헌[Sambrook et al. (supra)], 및 다른 실험실 매뉴얼(manual)에서 찾아볼 수 있다.

[0208] 포유동물 세포의 안정한 형질감염을 위하여, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기법에 의존하여, 세포의 단지 작은 부분만이 외래 DNA를 그의 게놈내로 통합함이 공지되어 있다. 이들 통합부(integrant)를 동정하고 선택하기 위해, 선태가능한 마커에 대한 코딩 서열(예를 들어, 항생물질 내성에 대해)이 일반적으로 관심있는 개방 판독 프레임과 함께 숙주 세포내로 도입된다. 바람직한 선택가능한 마커로는 약물에 내성을 부여하는 마커, 예컨대 G418, 하이그로마이신(hygromycin), 제오신(zeocin) 및 메토트렉세이트가 포함된다. 도입된 핵산에 의해 안전하게 형질감염된 세포는 약물 선택에 의해 동정될 수 있다(예를 들어, 선택가능한 마커 코딩 서열을 혼입한 세포는 생존할 것이지만, 나머지 세포는 사멸함).

[0209] 또 다른 실시양태에서, 세포, 세포주 또는 미생물내에서 내생성 엘라스타아제 코딩 서열의 발현 특징은 엘라스타아제 코딩 서열에 이종성인 DNA 조절 요소를 세포, 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물의 게놈내로 삽입하여 삽입된 조절 요소가 내생성 유전자와 작동가능하게 연결되도록 함으로써 변형될 수 있다.

[0210] 조절 요소를 함유하는 이종성 서열은, 기법, 예를 들어, 당 분야의 숙련가에게 공지되고 미국 특허 제5,272,071호(Chappel); PCT 공개공보 제WO 91/06667호(1991년 5월 16일자로 공개됨)에 기재된 타겟화된 상동성 재조합을 사용하여, 내생성 엘라스타아제 유전자에 작동적으로 연결되어 이의 발현을 활성화시키도록, 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물내로 삽입될 수 있다. 이종성 서열은 추가로 본 발명의 신호 펩티드, 분할 서열 및/또는 활성화 서열을 포함할 수 있다.

[0211] **5.4 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제조 방법**

[0212] 배양액중 본 발명의 숙주 세포, 예컨대 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포는 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명의 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 본 발명의 숙주 세포(여기에 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 코딩하는 재조합 발현 벡터가 도입됨)를 적합한 배지에서 배양하여 엘라스타아제 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 추가로 배지 또는 숙주 세포로부터 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 포함한다.

[0213] 추가로 본 발명은 본 발명의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 프로엘라스타아제 단백질이 생산되는 조건하에 배양하는 단계를 포함하는 본 발명의 미숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 프리프로엘라스타아제 단백질이 또한 생산된다. 본 발명은 추가로 본 발명의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 프로엘라스타아제 단백질이 생산되는 조건하에 배양하는 단계, 및 프로엘라스타아제 단백질을 활성화 조건에 두어 성숙한 엘라스타아제 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법을 추가로 제공한다.

[0214] 본 발명의 미숙한 단백질 및 성숙한 단백질을 생산하는 바람직한 배양 조건, 특별히 숙주 세포 피치아 파스토리스를 위한 배양 조건은 낮은 pH에서의 성장 기간을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 낮은 pH는 pH 2~6, pH 2~5, pH 3~6, pH 3~5, pH 4~6, pH 3~4 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값으로부터 선택되는 임의의 범위이다. 배양 기간의 종결시, 배양액의 pH는, 바람직하게는 pH 7~11, 가장 바람직하게는 pH 8로 상승될 수 있다.

[0215] 본 발명의 프로엘라스타아제 단백질의 발현이 메탄올-유도성 프로모터의 제어하에 있는 경우, 본 발명의 미숙한 또는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하기 위한 조건은 메탄올 유도 기간을 포함할 수도 있다.

[0216] 본 발명의 엘라스타아제 생산 방법은 추가로 숙주 세포에 의해 발현되는 단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 특정한 경우에, 회수된 단백질은 활성화 서열을 함유하는 프로엘라스타아제이다. 다른 경우에, 회수된 단백질은 활성화 서열이 결여된 성숙한 엘라스타아제이다. 특정한 조건하에, 프로엘라스타아제 및 성숙한 엘라스타아제 단백질 둘다가 생산된다. 다른 경우에, 프리프로엘라스타아제가 생산된다.

[0217] 바람직하게는, 특별히 자가-활성화된 프로엘라스타아제의 자가-활성화를 회피하는 것이 요망되는 경우, 프로엘라스타아제 발현을 위한 배양 조건은 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨, 또는 아세트산 나트륨에서의 성장 기간

을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 약 5~50 mM, 7.5~100 Mm, 10~150 mM, 50~200 mM, 75~175 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는 임의의 범위의 농도가 사용된다. 한 바람직한 실시양태에서, 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨, 또는 아세트산 나트륨 농도는 90~110 mM, 가장 바람직하게는 100 mM이다.

[0218] 부가적으로, 특별히 단백질 분해를 회피하도록 요망되는 경우, 프로엘라스타아제 발현을 위한 배양 조건은 문제의 숙주 세포에 적합한 온도 범위의 하한치에서의 성장 및 유도 기간을 포함한다. 예를 들면, 숙주 세포가 피치아 파스토리스 숙주 세포인 경우, 바람직한 범위는 약 22~28℃이다. 구체적인 실시양태에서, 피치아 파스토리스 숙주 세포는 약 28℃의 온도에서 배양된다. 성장 및 유도는 동일한 온도에서 수행될 필요가 없고; 예를 들면, 피치아 파스토리스가 숙주 세포로 이용되는 실시양태에서, 성장은 28℃에서 수행되는 반면 유도는 22℃에서 수행된다.

[0219] 본 발명의 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 활성화는 외인성 엘라스타아제를 소량(촉매량)으로 첨가함으로써 개시될 수 있다. 다르게는 또는 동시적으로, 본 발명의 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 활성화는 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 함유하는 용액의 pH를 증가시킴으로써 개시될 수 있다. pH는 바람직하게는 7~11이고; 구체적인 실시양태에서, 용액은 pH 7~10, 7~9, 8~10, 8~9, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는임의의 범위에 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 용액의 pH는 7~9이고, 가장 바람직하게는 8이다.

[0220] 구체적인 실시양태에서, 자가 활성화된 프로엘라스타아제는 활성화 단계 동안 트리스 염기로 처리될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 트리스 염기는 5~50 mM, 7.5~100 Mm, 10~150 mM, 50~200 mM, 75~175 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는 임의의 범위의 농도로 첨가된다. 한 바람직한 실시양태에서, 트리스 염기는 90~110 mM, 가장 바람직하게는 100 mM의 농도로 첨가된다. 트리스 염기의 pH는 바람직하게는 7~11이고; 구체적인 실시양태에서, 트리스 염기는 pH 7~10, 7~9, 8~10, 8~9, 또는 상한치 및 하한치가 전술된 값중 임의의 값으로부터 선택되는 임의의 범위로 존재한다. 한 바람직한 실시양태에서, 트리스 염기는 pH 7~9, 가장 바람직하게는 8로 존재한다.

[0221] 본 발명의 특정 양태에서, 엘라스타아제 자가활성화를 위한 온도는 주위 온도, 예를 들어, 22℃~26℃의 온도이다. 특정 실시양태에서, 엘라스타아제 활성화 단계는 바람직하게는 프로엘라스타아제에 의해 낮은 초기 농도에서, 예를 들어, 0.1-0.3 mg/mℓ에서, 분할 반응의 최적 정확성 및 N-말단 변형체의 최소 형성을 위하여 수행된다.

[0222] 본 발명의 특정 실시양태에서, 촉매량의 엘라스타아제의 첨가는 자가 활성화된 프로엘라스타아제를 성숙한 엘라스타아제로 전환시키기 위해 필요하지 않은데, 프로엘라스타아제는 자가단백질 가수분해를 겪을 수 있기 때문이다. 특정 실시양태에서, 자가단백질 가수분해의 속도는 농도와 무관하다. 이론으로 제한하려는 것은 아니지만, 특정 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 농도 독립적 자가단백질 가수분해는 분자내 과정을 경유하여 중재되고, 여기서 프로엘라스타아제 분자는 분자내 반응을 경유하여 그 자체로 분할되는 것으로 믿겨진다. 그러나, 다른 실시양태에서, 자가 활성화된 프로엘라스타아제의 활성화는 농도 의존적이다. 이론으로 제한하려는 것은 아니지만, 특정 자가 활성화된 프로엘라스타아제 단백질의 농도 의존적 자가단백질 가수분해는 분자간 반응을 경유하여 중재되고, 여기서 프로엘라스타아제는 또 다른 프로엘라스타아제 및/또는 성숙한 엘라스타아제에 의해 분할된다. 또한 다른 실시양태에서, 특정 자가 활성화된 엘라스타아제 프로단백질은 농도 의존적 및 농도 독립적 활성화의 조합을 나타낸다. 자가 활성화가 농도 의존적인 경우에, 프로단백질은 원할 경우 활성화를 감소시키기 위해 보다 희석된 형태로 유지될 수 있다. 서열 번호 55의 엘라스타아제 프로펩티드 분할 도메인을 포함하는 엘라스타아제 프로단백질(제한되지 않지만 서열 번호 69의 프로단백질이 포함됨)의 활성화는 이러한 프로단백질을 희석된 형태로 유지시킴으로써 제어될 수 있다.

[0223] 또한 성숙한 엘라스타아제의 원치 않는 특정 N-말단 서열 변형체가 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 도중에 축적될 수 있음이 인식된다. 보다 구체적으로, 서열 번호 6의 프로단백질을 비롯하여, 서열 번호 42 엘라스타아제 프로펩티드 분할 도메인을 함유하는 프로엘라스타아제 단백질은 위치 P3 또는 P2에서 임의의 잔기에 C-말단인 펩티드 결합에서 분할이 초래되는 N-말단 서열 변형체를 산출할 수 있다. 그러나, 이러한 원치 않는 N-말단 변형체의 출현은 활성화 서열중의 특정 위치에서 특정 아미노산을 대체함으로써 감소될 수 있다. 예를 들면, P2 위치에 프롤린이 존재할 경우, 1개 또는 2개의 추가의 N-말단 아미노산을 갖는 N-말단 변형체의 생산은 감소 또는 제거된다. 또한, 활성화를 위한 트립신에 대한 요구를 제거함으로써 9개의 N-말단 잔기가 결여된 변형체의 생산을 감소 또는 제거한다. 부가적으로, 원치 않는 N-말단 변형체의 출현은 특정 조건하에 활성

화 반응을 수행함으로써 감소 또는 제거될 수 있다.

[0224] 보다 구체적으로, 특정 실시양태에서 활성화 조건은 "연장된 전환" 단계를 포함하고, 이 동안 전환 반응의 초기 부분 동안 생산된 N-말단 변형체가 후속적으로 선택적으로 분해된다. "연장된 전환" 동안의 단백질 종의 상대량은 실시간으로 HIC-HPLC에 의해 모니터링된다. 원치 않는 N-말단 변형체의 선택적 분해는 전환 반응에서의 전장의 성숙한 PRT-201의 비율을 증가시키고 N-말단 변형체의 비율을 감소시킨다. 서열 번호 55 엘라스타아제 프로펩티드 분할 도메인을 함유하는 프로엘라스타아제 단백질의 경우, 연장된 전환 단계는 4~8시간 동안 수행되고, 바람직하게는 약 6시간 동안 수행된다. 다른 프로엘라스타아제 단백질의 경우, 연장된 전환 단계는, 모든 프로엘라스타아제가 전환된 직후 성숙한 (전장)엘라스타아제에 대한 N-말단 변형체의 비율에 의존하여 증가 또는 감소될 수 있다. 전환이 복합 배지, 예컨대 발효 브로쓰(broth)에서 초래되는 경우, 연장된 전환의 기간은 용액중 다른 단백질 및 펩티드에 의한 성숙한 엘라스타아제의 활성 부위에서의 경쟁에 기인하여 증가될 수 있다. 다르게는, 성숙한 엘라스타아제 및 N-말단 변형 엘라스타아제의 혼합물은 연장된 전환 단계 이전에 복합 배지로부터 회수되어, N-말단 변형 종을 제거하기 위해 필요한 시간 및 활성 부위 경쟁을 감소시킬 수 있다.

[0225] 상기 언급된 바와 같이, 프로-PRT-201-55M3-003-VU에 대한 전환 반응 동안, N-말단 변형체의 생산을 이끄는 부반응이 존재한다. 프로-PRT-201-55M3-003-VU의 구체적인 경우에, 이들 N-말단 변형체는 처음 2개의 발린이 누락되고, 엘라스타아제 활성을 거의 또는 전혀 갖지 않는다. 다른 돌연변이체 프로단백질의 경우, 생산된 부가적 N-말단 변형체가 존재하고, 일부는 첨가되고 나머지는 상이하게 결실된다. N-말단 제거 단계가 진행되는데, 이는 N-말단 변형체를 0~2%의 범위로 감소시킨다. 이러한 제거 단계의 진행은 다양한 실험 및 관찰로부터 발전되었다. 이전에 언급된 바와 같이, 프로-PRT-201-42에 의한 전환 조건 실험의 최적화 동안, 보다 긴 전환 반응이 N-말단 변형체의 매우 낮은 백분율을 종종 유도하는 것으로 관찰되었다. 후속적으로, 보다 긴 전환 반응은 성숙한 PRT-201이 선택적으로 N-말단 변형체를 분해시키는 것으로 결정되었다. 특정 조건하에서 선택적으로 N-말단 변형체를 분해하는 PRT-201의 능력의 발견은 보다 적은 N-말단 변형체를 갖는 보다 정제된 PRT-201 생성물을 생산하는 것을 도움으로써 막대한 이점을 갖게 되었다. 이러한 N-말단 변형체 제거 단계는 프로-PRT-201의 성숙한 PRT-201로의 전환을 허용하고, 이어서 PRT-201이 N-말단 변형체를 분해하는 것을 허용하는 조건을 확립함으로써 대규모 생산 공정으로 이행되었다.

[0226] 이러한 단계의 대표적인 예는 도 10에 도시되어 있고, 이는 실시간으로 HIC-HPLC에 의해 모니터링된다. 대략 50분에, 100%의 프로-PRT-201-55M3이 대략 86%의 성숙한 PRT-201 및 14%의 N-말단 변형체로 완전히 전환되었다. 전환 반응은 연장되었고, 이는 성숙한 PRT-201이 선택적으로 N-말단 변형체를 분해하는 것을 허용하여 변형체를 14%에서 2%로 감소시켰다. 보다 긴 배양처리에 의해, N-말단 변형체는 감지불가능한 수준으로 선택적으로 분해될 수 있다. N-말단 변형체 수준이 충분히 낮은 경우, PRT-201의 활성은 시트르산 나트륨 및 5.0으로의 반응 pH의 조정에 의해 억제된다.

[0227] 일단 정제된 성숙한 엘라스타아제가 수득되면, 활성 효소는 엘라스타아제 단백질이 비교적 불활성인 용액으로 옮겨지고, 추가의 칼럼 크로마토그래피, 예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 정제 단계를 위한 완충액으로 위치된다. 대체적으로, 엘라스타아제 단백질은 시트르산 나트륨에 약 5~25 mM의 농도 및 약 2~5의 pH로 위치된다. 구체적인 실시양태에서, 엘라스타아제는 20 mM의 시트르산 나트륨(pH 5)에 위치된다. 이어서 용출된 분별물은 선택적으로 하기 방법중 하나, 하나 보다 많은 또는 모든 방법에 의해 분석된다: (1) 농도를 결정하기 위한 A280에서의 분광광도법, (2) 순도를 평가하기 위한 SDS-PAGE, (3) 엘라스타아제 비활성을 평가하기 위한 활성 검정, 예를 들어, SLAP 검정, 및 (4) 성숙한 엘라스타아제 및 N-말단 변형체, 및 적합한 특징을 갖는 모아진 분별물(예를 들어, 허용가능한 비활성, 검출가능한 당단백형(glycoform)의 허용가능하게 낮은 수준(바람직하게는 부재), 및 검출가능한 N-말단 변형체의 허용가능하게 낮은 수준(바람직하게는 부재))을 검출하기 위한 HIC-HPLC.

[0228] 일단 정제된 성숙한 엘라스타아제가 수득되면, 활성 효소는 동결건조에 적합한 용액으로 옮겨질 수 있다. 대체적으로, 엘라스타아제 단백질은 동결 건조 이전에 1X 포스페이트 완충된 염수("PBS": phosphate buffered saline)(137 mM 염화 나트륨, 10 mM 인산 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, pH 7.4)의 완충액내로 위치될 수 있다. 특정 실시양태에서, 엘라스타아제 단백질은 동결 건조 이전에 0.1 X PBS(13.7 mM 염화 나트륨, 1.0 mM 인산 나트륨, 0.27 mM 인산 칼륨, pH 7.4)에 위치될 수 있다.

[0229] 프로엘라스타아제 서열의 발현은 일부 경우에 프로엘라스타아제 및 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물을 산출할 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 프로엘라스타아제 단백질 및 성숙한 엘라스타아제 단백질 둘다를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0230] 5.5 **약학 조성물**

[0231] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질은 투여에 적합한 약학 조성물내로 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 엘라스타아제 단백질 및 약학적으로 불활성인 구성성분, 예를 들면 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용될 경우 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 약학 투여와 화합성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅물, 항박테리아제 및 항곰팡이제, 등장성 흡수 지연제 등을 포함하고자 한다. 또한 통상의 부형제, 비히클, 충전제, 결합제, 붕해제, 용매, 가용화제 및 착색제가 약학적으로 불활성인 구성성분으로서 간주된다. 약학적으로 활성인 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 용도는 당 분야에 잘 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 성숙한 엘라스타아제 단백질과 비화합성임을 제외하고, 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물 또한 조성물내로 혼입될 수 있다.

[0232] 따라서, 본 발명의 특정 양태는 약학 조성물에 관한 것이다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 조성물에 사용될 수 있는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제로는, 제한되지 않지만 서열 번호 1, 4, 5, 84, 87의 단백질이 포함된다. 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는 상기 표 3에 제시된 다형형태의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0233] 다른 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 트립신, 또는 트립신의 단편이 존재하지 않는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 약학 조성물에는 트립신 또는 트립신의 단편이 실질적으로 존재하지 않는다. 본원에 사용될 경우, 문구 "트립신이 존재하지 않는"은 트립신이 생산 과정의 임의의 부분에서 사용되지 않는 조성물을 지칭한다. 본원에 사용될 경우, 문구 "트립신이 실질적으로 존재하지 않는"은 트립신이 약 0.0025% 이하, 또는 보다 바람직하게는, 약 0.001% 미만(중량/중량 기준)의 최종 퍼센트(즉, 트립신 중량/총 조성물 중량)로 존재하는 조성물을 지칭한다. 본원에 사용될 경우, 문구 트립신이 "존재하지 않는"이란 변형체가, 예를 들어 효소 검정 또는 ELISA에 의해 감지할 수 없는 조성물을 지칭한다.

[0234] 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 BENZ 검정으로 측정될 경우 3 ng/㎖ 트립신의 등가량 보다 낮은 트립신 활성, 바람직하게는 BENZ 검정으로 측정될 경우 2.5 ng/㎖ 트립신의 등가량 보다 낮은 트립신 활성, 보다 더 바람직하게는 BENZ 검정으로 측정될 경우 2 ng/㎖ 트립신의 등가량 보다 낮은 트립신 활성을 갖는다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 트립신 활성이 BENZ 검정으로 측정될 경우 1.6 ng/㎖ 트립신 미만의 등가량인 치료 효과량의 엘라스타아제 단백질를 포함하는 조성물을 제공한다. BENZ 검정으로 측정될 경우 1.6 ng/㎖ 트립신의 등가량 보다 적은 트립신 활성을 갖는 엘라스타아제 조성물의 예는 하기 실시예 8에 제공된다. 특정 실시양태에서, ng/㎖ 트립신 활성은 1 ㎎/㎖의 인간 제I형 엘라스타아제 단백질을 함유하는 액체 인간 제I형 엘라스타아제 조성물 또는 제조물에서 검정될 수 있다. 이와 같이, 트립신 활성은 또한 엘라스타아제 단백질의 밀리그램에 대하여 기재될 수 있고, 예를 들면, 3 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질, 1.56 ng 미만의 트립신 활성/㎎ 엘라스타아제 단백질 등이다.

[0235] 본 발명은 추가로 성숙한 엘라스타아제의 원치 않는 N-말단 변형체가 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물을 제공한다. 원치 않는 N-말단 변형체로는, 제한되지 않지만, P5, P4, P3, P2, P'1, P'2, P'3, P'4, P'6, 및/또는 P'9 위치에서 임의의 잔기에 C-말단인 펩티드 결합에서의 분할에 의해 생산된 변형체가 포함된다. 특정한 원치 않는 N-말단 변형체는 트립신 활성화에 의해 생산되고; 다른 변형체는 최적화된 활성화 서열을 함유하지 않은 프로엘라스타아제 서열의 자가활성화에 의해 생산된다.

[0236] 특정 실시양태에서, 약학 조성물에는, 제한되지 않지만 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 108을 포함하는 성숙한 엘라스타아제의 하나, 하나 보다 많은 또는 모든 N-말단 변형체가 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 또는 108을 갖는 임의의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 약학 조성물에는, 제한되지 않지만 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 또는 108을 포함하는 성숙한 엘라스타아제의 N-말단 변형체가 실질적으로 존재하지 않는다. 본원에 사용될 경우, 문구 "특정한 변형체가 존재하지 않는"은 변형체가 예를 들어, 양이온 교환 HPLC 검정, 소수성 상호작용 HPLC 검정, 또는 액체 크로마토그래피와 조합된 질량 분광계에 의해 검출될 수 없는 조성물을 지칭한다. 본원에 사용될 경우, 문구 "실질적으로 존재하지 않는"은 N-말단 변형체가 적어도 약 0.5% 미만의 최종 퍼센트(즉, N-말단 변형체 중량/총 조성물 중량)로 존재하는 조성물을 지칭한다.

특정한 바람직한 실시양태에서, N-말단 변형체가 실질적으로 존재하지 않는 조성물은 N-말단 변형체의 농도가 약 0.1% 미만 또는 약 0.01% 미만, 또는 보다 바람직하게는, 약 0.001% 미만(중량/중량 기준)인 조성물이다. 특정 양태에서, N-말단 변형체의 존재는 양이온 교환 HPLC 검정, 소수성 상호작용 HPLC 검정, 또는 액체 크로마토그래피가 조합된 질량 분광계에 의해 검출된다.

[0237] 특정한 구체적인 실시양태에서, 서열 번호 70, 71, 104 및 105의 N-말단 변형체가 존재하지 않는 약학 조성물은 P1 위치중의 아르기닌 및/또는 P2 위치중의 알라닌을 함유하지 않는 프로엘라스타아제의 활성화에 의해 생산된다.

[0238] 다른 실시양태에서, 본 발명은 (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고/않거나 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물을 제공한다. 본원에 사용될 경우, 문구 "포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는" 또는 "박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않는"은 이러한 단백질이 적어도 약 0.5% 미만의 최종 퍼센트(즉, 포유동물 단백질(엘라스타아제 이외의 단백질, 선택적으로, 운반 단백질, 예컨대 알부민) 또는 박테리아 단백질 중량/총 조성물 중량)로 존재하는 조성물을 지칭한다. 특정한 바람직한 실시양태에서, 이러한 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 조성물은 원치 않는 단백질의 농도가 약 0.1% 미만 또는 약 0.01% 미만, 또는 보다 바람직하게는, 약 0.001% 미만(중량/중량 기준)인 조성물이다.

[0239] 특정 양태에서, "포유동물 단백질(엘라스타아제 이외의 단백질)이 존재하지 않는" 약학 조성물은 포유동물 세포가 아닌 재조합 세포주로부터 생산된 엘라스타아제를 함유하고, 여기서 포유동물 서열 또는 실질적인 포유동물 서열을 갖는 단백질은 생산 과정중 어느 부분에도 존재하지 않는다. 특정 양태에서, "박테리아 단백질이 존재하지 않는" 약학 조성물은 박테리아 세포가 아닌 재조합 세포주로부터 생산된 엘라스타아제를 함유하고, 여기서 박테리아 서열 또는 실질적인 박테리아 서열을 갖는 단백질은 생산 과정중 어느 부분에도 존재하지 않는다.

[0240] 본 발명의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제(변형체 포함)는 가장 바람직하게는 약학 조성물에 사용하기 위해 정제된다. 구체적인 실시양태에서, 엘라스타아제는 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 순수하다. 다른 구체적인 실시양태에서, 엘라스타아제는 98%, 98.5%, 99%, 99.2%, 99.5% 또는 99.8% 까지 순수하다.

[0241] 약학 조성물로 제형화하기 위해, 본 발명의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는, 엘라스타아제의 첨가에 의해 촉매화되는 작은 펩티드 기질 N-석시닐-Ala-Ala-Ala-p니트로아닐리드(SLAP)의 가수분해 속도를 측정하여 결정할 경우, 바람직하게는 1 초과, 5 초과, 10 초과, 20 초과, 25 초과, 또는 30 U/mg 단백질 초과의 비활성을 갖는다. 활성의 1 유닛은 30℃에서 분당 1 마이크로몰의 기질의 가수분해를 촉매화하는 엘라스타아제의 양으로서 정의되고, 비활성은 엘라스타아제 단백질 mg당 활성(U/mg)으로 정의된다. 바람직하게는, 약학 조성물은 하한치가 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 또는 20 U/mg 단백질이고 상한치가 독립적으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 50 U/mg 단백질 범위인 비활성을 갖는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 비활성은 1~40 U/mg 단백질, 1~5 U/mg 단백질, 2~10 U/mg 단백질, 4~15 U/mg 단백질, 5~30 U/mg 단백질, 10~20 U/mg 단백질, 20~40 U/mg 단백질의 범위, 또는 상한치 및 하한치가 임의의 전술된 값으로부터 선택되는 임의의 범위내이다.

[0242] 본 발명의 약학 조성물은 바람직하게는 안정하다. 구체적인 실시양태에서, 약학 조성물(예를 들면 상기 동결건조에 의해 제조된 약학 조성물)은 4℃에서 1주, 보다 바람직하게는 1개월, 보다 더 바람직하게는 3개월, 가장 바람직하게는 6개월간 저장한 후 그의 비활성의 50% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 가장 바람직하게는 70% 이상을 유지한다. 구체적인 실시양태에서, 약학 조성물은 4℃에서 1주, 보다 바람직하게는 1개월, 보다 더 바람직하게는 3개월, 가장 바람직하게는 6개월간 저장한 후 그의 비활성의 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 95% 이상을 유지한다.

[0243] 본 발명의 약학 조성물은 의도된 그의 투여 경로와 화합성이도록 제형화된다. 생물학적 전달관의 질병을 치료 또는 예방하기 위해 엘라스타아제를 투여하는 방법은 국제 특허출원 공개공보 제WO 2001/21574호; 제WO 2004/073504호; 및 제WO 2006/036804호에 기재되어 있다. 가장 바람직한 투여 경로는 비경구적이고, 예를 들면 혈관 벽으로의 직접적인 투여로서, 예컨대 외과적으로 노출된 혈관의 외막 표면으로의 국소 투여, 및 약물 전달 카테터(catheter)를 사용하는 혈관 벽으로의 국소 투여가 포함된다. 비경구 투여를 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석액, 예컨대 주사용수, 염수 용액, 포스페이트 완충된 염수 용액, 당, 예컨대 수크로즈 또는 덱스트란, 고정화유(fixed oil), 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트-80(트윈(tween)-80으로도 공지됨), 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코브산 또는 산성아황산나트륨; 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트

산; 완충제, 예컨대 포스페이트, 및 강장 조정용 제제, 예컨대 염화 나트륨 또는 덱스트로즈. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플(ampule), 일회용 주사기, 또는 단일 또는 다중 투약량 바이알에 동봉될 수 있다. 비경구 제제는 또한 약물 전달 카테터에 동봉될 수 있다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 한다.

[0244] 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 하기 하나 이상의 하기 부형제를 포함하는 액체 제형이다: 덱스트로즈(예를 들어, 2~10% w/v); 락토즈(예를 들어, 2~10% w/v); 만니톨(예를 들어, 2~10% w/v); 수크로즈(예를 들어, 2~10% w/v); 트레할로즈(예를 들어, 2~10% w/v); 아스코브산(예를 들어, 2~10 mM); 염화 칼슘(예를 들어, 4~20 mM); 덱스트란-70(예를 들어, 2~10% w/v); 폴록사머(poloxamer) 188(예를 들어, 0.2~1% w/v); 폴리소르베이트-80(예를 들어, 0.001~5% w/v, 보다 바람직하게는 0.1~5%); 글리세린(예를 들어, 0.2~5% w/v); 아르기닌(예를 들어, 2~10% w/v); 글리신(예를 들어, 2~10% w/v); 덱스트란-44(예를 들어, 2~10% w/v); 및 덱스트란-18(예를 들어, 2~10% w/v). 특정 실시양태에서, 덱스트로즈, 락토즈, 만니톨, 수크로즈, 트레할로즈, 덱스트란-70, 글리세린, 아르기닌, 글리신, 덱스트란-44 또는 덱스트란-18의 단일체로 또는 응집체로서의 농도는 하한치가 2.5, 4, 5, 또는 7% w/v이고 상한치가 독립적으로 4, 5, 6, 8, 또는 10% w/v인 범위내이다.

[0245] 액체 제형은 성숙한 엘라스타아제 단백질, 하나 이상의 완충 시약 및/또는 하나 이상의 부형제를 함유하는 건조 제형에 물을 첨가하여 제조될 수 있다. 건조 제형은 성숙한 엘라스타아제 단백질, 하나 이상의 완충 시약, 및/또는 하나 이상의 부형제를 포함하는 용액을 동결건조함으로써 제조될 수 있다.

[0246] 액체 제형은, 예를 들면, 본 발명의 동결건조된 엘라스타아제 단백질을 멸균수 또는 완충 용액으로 재구성함으로써 제조될 수 있다. 완충 용액의 예로는 염수 또는 포스페이트 완충된 염수의 멸균 용액이 포함된다. 구체적인 실시양태에서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 건조 제형을 원하는 단백질 농도로 재구성한 후, 용액은 대략 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨(포스페이트 완충된 염수 농도는 1X로 고려됨)을 함유하고, 용액의 pH는 대략 7.4이다. 특정 양태에서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 건조 제형은 또한 단지 물만이 재구성을 위해 필요한 양으로 나트륨, 클로라이드, 및 포스페이트 이온을 함유한다.

[0247] 액체 제형은, 예를 들면, 동결건조된 엘라스타아제 단백질을 하나 이상의 부형제가 함유된 완충 용액으로 재구성함으로써 제조될 수 있다. 부형제의 예로는 폴리소르베이트-80 및 덱스트란이 포함된다. 구체적인 실시양태에서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 건조 제형을 원하는 단백질 농도로 재구성한 후, 생성된 용액은 대략 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨, 및 0.01% 폴리소르베이트-80을 함유하고, 용액의 pH는 대략 7.4이다. 하나 이상의 부형제는 동결 건조 전 또는 동결 건조 후이나 재구성 이전에 성숙한 엘라스타아제 단백질과 혼합될 수 있다. 이와 같이, 특정 양태에서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 건조 제형은 또한 부형제, 예컨대 폴리소르베이트-80 또는 덱스트란을 함유한다.

[0248] 특정 양태에서, 본 발명은: 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨의 용액중 0.001~50 mg/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질, 및 덱스트로즈, 락토즈, 만니톨, 수크로즈, 트레할로즈, 덱스트란-70, 글리세린, 아르기닌, 글리신, 덱스트란-44 또는 덱스트란-18로부터 선택된 5~10%, 보다 바람직하게는 6~9%의 부형제를 포함하는 액체 제형을 제공한다.

[0249] 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨의 용액중 0.001~50 mg/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 액체 제형(pH 7.4)을 제공한다.

[0250] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨의 용액중 0.001~50 mg/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질, 및 0.01%의 폴리소르베이트-80을 포함하는 액체 제형(pH 7.4)을 제공한다.

[0251] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨의 용액중 0.001~50 mg/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질, 및 0.01%의 폴리소르베이트-80 및 8%의 덱스트란-18을 포함하는 액체 제형(pH 7.4)을 제공한다.

[0252] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 10 mM 인산 나트륨의 용액중 0.001~50 mg/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질, 및 8%의 덱스트란-18을 포함하는 액체 제형(pH 7.4)을 제공한다.

[0253] 본 발명의 액체 제형은 바람직하게는 하한치가 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 또는 20 mg/㎖이고 상한치가 독립적으로, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 또는 1500 mg/㎖인 범위내로 성숙한 엘라스타아제

단백질의 최종 농도를 함유한다.

[0254] 특정 양태에서, 본 발명은 덱스트로즈, 락토즈, 만니톨, 수크로즈, 트레할로즈, 덱스트란-70, 글리세린, 아르기닌, 글리신, 덱스트란-44 또는 덱스트란-18로부터 선택된 5~10%(보다 바람직하게는 6~9%)의 부형제를 포함하고 pH가 6.5~8.5인 0.5X PBS~1.5X PBS(보다 바람직하게는 1X PBS)의 용액중 0.0001~500 ㎎/㎖(보다 바람직하게는 1~100 ㎎/㎖, 보다 더 바람직하게는 0.5~20 ㎎/㎖)의 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 액체 제형을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 액체 제형은 1X PBS(pH 7.4)중 0.5 ㎎/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 8%의 덱스트란-18을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 액체 제형은 1X PBS(pH 7.4)중 5 ㎎/㎖의 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 8%의 덱스트란-18을 포함한다.

[0255] 본 발명의 제형은 바람직하게는 하한치가 100, 125, 150, 175, 200, 250 또는 275 mOsm/kg이고 상한치가, 독립적으로, 500, 450, 400, 350, 325, 300, 275 또는 250 mOsm/kg인 범위내의 삼투질농도(osmolality)를 갖는다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 액체 제형의 삼투질농도는, 예를 들면 동결점 강하 방법에 의해 측정될 경우, 바람직하게는 대략 125~500 mOsm/kg, 보다 바람직하게는 대략 275~325 mOsm/kg이다.

[0256] 비경구 조성물, 예컨대 본 발명의 액체 제형으로 만들어질 수 있는 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위형으로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 투여 단위형은, 본원에 사용될 경우, 치료되는 피험체를 위해 단일화된 투여제로서 적합한 물리적으로 별개인 단위를 지칭하고; 각각의 단위는 필요한 약학 담체와 함께 원하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 예정된 양을 함유한다.

[0257] 본원에서 정의된 바와 같이, 성숙한 엘라스타아제 단백질의 치료 효과량(즉, 효과적 투여량)은 약 0.0033 ㎎~200 ㎎이다. 직경이 보다 작거나 보다 얇은 벽을 갖는 혈관, 예컨대 두부 동정맥루(radiocephalic arteriovenous fistula)의 혈관의 경우, 보다 작은 투약량(예컨대 0.0033 ㎎~2.0 ㎎)이 바람직하다. 직경이 보다 크거나 보다 두꺼운 벽을 갖는 혈관, 예컨대 대퇴부 동맥의 경우, 보다 많은 투약량(예컨대 2.05~100 ㎎)이 바람직하다.

[0258] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 용기, 팩(pack), 다스펜서(dispenser), 또는 카테터에 포함될 수 있다. 또한 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 용기, 팩, 디스펜서 또는 카테터에 투여를 위한 지침서와 함께 포함될 수 있다. 투여를 위한 지침서는 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터내에 또는 그 위에 인쇄된 형태로 포함될 수 있다. 다르게는, 투여를 위한 지침서는 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터내에 또는 그 위에, 지침을 제공하는 또 다른 인쇄되거나 인터넷 접속가능한 문서에 대한 참고 형태로 포함될 수 있다.

[0259] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다. 또한 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 용기, 팩, 또는 디스펜서에 투여를 위한 지침서와 함께 포함될 수 있다. 투여를 위한 지침서는 용기, 팩, 또는 디스펜서내에 또는 그 위에 인쇄된 형태로 포함될 수 있다. 다르게는, 투여를 위한 지침서는 용기, 팩, 또는 디스펜서내에 또는 그 위에, 지침을 제공하는 또 다른 인쇄되거나 인터넷 접속가능한 문서에 대한 참고 형태로 포함될 수 있다.

[0260] 본 발명은 약학 조성물을 제조하기 위한 방법을 포함한다. 일단 성숙한 엘라스타아제가 본 발명에 따라 생산되면, 이는 투여에 적합한 약학 제형으로 재구성될 때까지 동결건조되고 저장될 수 있다. 한 예시적인 실시양태에서, 본 발명은: (a) 프리프로엘라스타아제 개방 판독 프레임을 코딩하는 핵산 분자를 발현하도록 조작된 숙주 세포, 예컨대 피치아 파스토리스 숙주 세포를, 개방 판독 프레임이 발현되는 조건하에 배양하는 단계(여기서, 상기 개방 판독 프레임은 5'에서 3' 방향으로 (i) 신호 펩티드, 예를 들어, 피치아 파스토리스에서 작동가능한 신호 펩티드; (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열; 및 (iii) 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질의 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 프로엘라스타아제 단백질을 생산함); (b) 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두어 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계(여기서, 자가활성화 조건으로는 (i) 프로엘라스타아제 단백질을 함유하는 용액(이는 세포 배양 상청액을 수 있음)의 pH를, 예를 들어, pH 6.5~11, 바람직하게는 8~9로 변화시키고; (ii) 프로엘라스타아제 단백질을, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고, 용액을 연장하여 전환시켜 N-말단 변형체를 제거함으로써, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 생산함을 포함한다); (c) 선택적으로, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 정제하는 단계, 예를 들어, 폴리쉬 크로마토그래피를 위한 이온 교환 크로마토그래피 단계; 및 (d) 성숙한 제I형 엘라스타아제를 동결건조하여, 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계를 포함하는, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 단리하는 방법을 제공한다. 성숙한 제I형 엘라스타아제는 바람직하게는 인간 제I형 엘라스타아제이다. 특정 양태에서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제는 바람직하게는 95% 보다 더 순수하고; 구체적인 실시양태에서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제는 98% 보다 더 또는 99% 보다 더 순수하다.

[0261] 본 발명의 성숙한 엘라스타아제 단백질은 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 같이, 예시적인 실시양태에서, 본 발명은 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생성하는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 (i) 상기 기재된 방법에 따라(예를 들면 섹션 5.4에서) 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계; 및 (ii) 동결건조된 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 약학적으로 허용되는 담체에서 재구성하는 단계를 포함한다.

[0262] **5.6 효과적 투약량**

[0263] 본 발명은 일반적으로 생물학적 전달관에서의 질병을 치료 또는 예방하기 위해, 재조합 엘라스타아제 단백질을 단독으로 또는 다른 제제와 조합하여 비경구, 바람직하게는 국소 투여하는 이점을 제공한다.

[0264] 특정 실시양태에서, 비경구 투여의 대안으로서, 생물학적 전달관에서의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 제제의 경구 투여가 사용될 수 있다.

[0265] 본 발명의 방법의 실행시 이용되는 엘라스타아제 단백질의 독성 및 치료학적 효능은, 예를 들어, LD50(모집단의 50%를 치사시키는 투약량) 및 ED50(모집단의 50%에서 치료학적으로 효과적인 투약량)을 결정하기 위해 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 약학 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 투약량 비율은 치료학적 지수이고, 이는 비율 LD50/ED50으로 표시될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 투약량을 보다 정확히 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0266] **5.7 투여 방법**

[0267] 본 발명은 신규 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물, 및 생물학적 전달관에서의 질병을 예방 또는 치료하기 위한 이의 사용 방법에 관한 것이다. 이러한 약학 조성물은 상기 섹션 5.5에 기재된 통상의 방식으로 제형화될 수 있다.

[0268] 본 발명의 엘라스타아제 조성물은, 동맥 또는 정맥의 벽에 용액을 전달하기 위해 허용가능한 것으로 당 분야의 숙련가에게 공지된 장치, 예를 들어, 주사기, 약물 전달 카테터, 약물 전달 바늘, 이식된 약물 전달 중합체, 예컨대 시이트(sheet) 또는 미소구체 제조물, 이식가능한 카테터, 또는 중합체 코팅된 혈관 스텐트(stent), 바람직하게는 자가 팽창 스텐트에 의해 치료될 생물학적 전달관의 원하는 분절에 투여될 수 있다.

[0269] 특정 실시양태에서, 원하는 분절로의 투여는 직접적 시각화, 초음파, CT, 형광투시 유도(fluoroscopic guidance), MRI 또는 내시경 안내에 의해 안내될 될 수 있다.

[0270] 본 발명의 특정 양태에서, 엘라스타아제의 생물학적 전달관으로의 투여는 엘라스타아제의 액체 제형을 외과적으로 노출된 동맥 또는 정맥의 외막 표면에 직접 적용함을 포함한다. 본 발명의 구체적인 양태에서, 투여는 주사기에 의해 수행된다.

[0271] 본 발명의 특정 양태에서, 엘라스타아제의 생물학적 전달관으로의 투여는 치료될 생물학적 전달관의 분절과 매우 가까이에 전달 장치를 위치시킴을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 전달 장치에 의한 엘라스타아제 단백질의 전달 동안, 전달 장치의 일부는 생물학적 전달관의 벽내로 삽입될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 전달관의 내강은, 엘라스타아제 단백질이 생물학적 전달관의 가압된 분절로 전달되는 동안 가압될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 전달관의 내강은 기계적 작용에 의해 가압된다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 전달관의 내강은 벌룬(balloon) 카테터에 의해 가압된다. 몇몇 실시양태에서, 압력은 카테터 또는 장치의 일부인 지가-팽창 부재에 의해 생물학적 전달관의 내벽에 가해진다. 몇몇 실시양태에서, 엘라스타아제 단백질은 동일한 장치에 의해 투여되고 압력이 가해진다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 전달관은 외과적으로 노출되고, 엘라스타아제 단백질은 내강에 전달되거나 생체내에서 생물학적 전달관의 외부 표면에 적용된다. 내강 전달과 관여된 실시양태에서, 혈관을 통한 혈류는 클램프(clamp)에 의해 중단되거나 엘라스타아제가 혈관 벽과 보다 긴 시간 동안 접촉하여 혈청에 의한 엘라스타아제의 저해를 방지한다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 전달관은 외과적으로 제거되고, 엘라스타아제는 내강 표면 및/또는 시험관내에서 전달관의 외부 표면에 전달된다. 이어서 처리된 전달관은, 특정 실시양태에서, 신체로 복귀된다..

[0272] 본 발명의 다른 양태에서, 엘라스타아제의 생물학적 전달관으로의 투여는 치료될 혈관내의 스텐트, 생물학적 전달관의 외부 표면에 적용되는 클램프 또는 스트립(strip), 또는 치료될 혈관 위 또는 주변의 랩(wrap), 또는 치료될 혈관 내, 주변 또는 부근의 다른 장치로서 위치되는 중합체 제형의 사용을 수반한다.

[0273] 본 발명의 다른 양태에서, 엘라스타아제는 조직 영역내로 그 영역내의 동맥 및/또는 정맥, 예컨대 부수적 동맥을 팽창시키기 위해 조직 영역내로 피부를 통해 주사된다. 다른 양태에서, 엘라스타아제는 혈관의 특정 분절을

팽창시키기 위해 동맥 또는 정맥의 벽내로 또는 주변 조직내로 직접 피부를 통해 주사된다. 심장 혈관을 치료하고자 하는 실시양태에서, 엘라스타아제 단백질은 심장주변 공간으로 피부를 통해 전달되거나, 또는 외과적으로 노출된 관상 동맥에 적접 적용될 수 있다.

[0274] 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 혈관으로 투여하기 위해 사용될 수 있는 의학 장치는 하기 섹션 5.9에 기재되어 있다.

[0275] 5.8 키트

[0276] 본 발명은 본 발명의 방법을 실행하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 "치료학적" 키트는, 하나 이상의 용기에, 생물학적 전달관에서의 질병을 치료 또는 예방하는데 유용한 본원에 기재된 하나 이상의 제제를, 선택적으로 이들의 전달을 촉진하는 임의의 제제와 함께 포함한다. 본 발명의 대안의 키트인 "제작" 키트는, 하나 이상의 용기에, 재조합 엘라스타아제 단백질을 제조하기 위해 유용한 것으로 본원에 기재된 하나 이상의 제제를 포함한다.

[0277] 본 발명의 치료학적 키트는 선택적으로 본 발명의 방법을 수행하기 위해 유용한 추가의 성분을 포함할 수 있다. 예로서, 치료학적 키트는 본 발명의 제제를 제형화하기 위해 유용한 약학 담체를 포함할 수 있다. 치료학적 키트는 또한 본 발명의 치료학적 방법을 수행하기 위한 장치 또는 장치의 구성요소, 예를 들면 주사기 또는 바늘을 포함할 수 있다. 치료학적 키트중의 장치의 포함물, 예컨대 교내(intramural) 또는 혈관주변 주사 카테터 또는 내강내 주사 카테터가 또한 고려된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 단위 투여형으로 제공될 수 있다. 추가로 또는 대안으로, 본 발명의 키트는 본 발명의 하나 이상의 방법의 수행을 설명하는 지침 자료, 또는 약제 또는 생물학적 산물의 제작, 이용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 처방된 형태의 공고문(이는 인간 투여를 위한 제작, 이용 또는 판매 기관에 의한 승인을 반영함)을 제공할 수 있다. 지침 자료는 키트의 하나 이상의 용기내에 또는 그 위에 인쇄된 형태로 포함될 수 있다. 다르게는, 지침 자료는 키트의 하나 이상의 용기내에 또는 그 위에 지침 자료를 제공하는 또 다른 인쇄되거나 인터넷 접속가능한 문서에 대한 참고 형태로 포함될 수 있다.

[0278] 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 키트는 하기 섹션 5.9에 기재된 의학 장치를 포함한다.

[0279] 본 발명의 제작 키트는 선택적으로 본 발명의 방법을 수행하기 위해 유용한 부가적 구성요소를 포함한다.

[0280] 5.9 엘라스타아제 단백질의 투여에 유용한 의학 장치

[0281] 본 발명의 엘라스타아제 단백질을 생물학적 전달관, 예컨대 동맥 또는 정맥에 투여하기 위해 사용될 수 있는 의학 장치가 본원에 제공된다. 이러한 장치는 이후 기재되고, 가출원 제61/025,084호(2008년 1월 31일자로 출원됨), 가출원 제61/025,463호(2008년 2월 1일자로 출원됨), 및 가출원 제61/075,710호(2008년 6월 25일자로 출원됨)(이들 각각은 본원에 참고로 그의 전체가 인용됨)에 기재되어 있다. 본 발명의 엘라스타아제 단백질은 통상의 카테터를 경유하여 생물학적 전달관에 투여될 수도 있다.

[0282] 한 실시양태에서, 엘라스타아제 단백질의 투여에 유용한 의학 장치는 중심 종방향 축을 갖고, 하나 이상의 작동기를 포함하며, 여기서 하나 이상의 작동기는 상기 하나 이상의 작동기가 상기 의학 장치의 종방향 축에 실질적으로 평행하게 배향되는 구속된 배치형태, 및 상기 하나 이상의 작동기의 길이의 적어도 일부가 장치의 중심 종방향 축에 실질적으로 비평행한 비구속된 배치형태로 존재할 수 있다. 장치가 생물학적 전달관의 벽에 인접한 타깃 부위에 위치된 후, 하나 이상의 작동기(원할 경우, 모든 작동기)는 구속된 배치형태로부터 해방되어 비구속된 배치형태를 취하도록 허용됨으로써, 생물학적 전달관의 벽과 접촉한다. 하나 이상의 작동기는 임의의 형상일 수 있고, 바람직한 실시양태에서, 구속된 배치형태로부터 비구속된 배치형태로의 하나 이상의 작동기의 이동은 장치 조작기에 의한 구속력에서 해방되나 조작기에 의한 장치 또는 타깃 조직으로의 임의의 변형력의 입력이 없는 경우에 초래된다.

[0283] 도 22에 제시된 제1의 구체적인 실시양태에서, 장치는 한쌍의 신장 스플라인(elongate spline)(12 및 14)으로서 형성된 하나 이상의 작동기를 포함하는 유체 전달 카테터(10)이고, 스플라인의 중간 영역은 카테터 조립부의 중심 종방향 축(15)에 실질적으로 평행하게 배향된 구속된 배치형태와 스플라인의 쌍의 적어도 일부가 상기 중심 종방향 축에 실질적으로 비평행하게 배향된 비구속된 배치형태 사이에서 이동가능하다(도 23에서 스플라인 길이의 왼쪽(L) 및 오른쪽(R) 부분을 참조함). 하나 이상의 스플라인(12 및 14)은 각각 반대편 근위 말단 및 원위 말단을 갖는 신장 밴드 또는 와이어로서 구성될 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 스플라인은 편평한 대향 내부 표면(24 및 26), 및 편평한 대향 외부 표면(28 및 30)을 갖는다. 이러한 실시양태에서, 스플라인(12 및 14)은, 도 22 및 23에서 각각 제시된 바와 같이, 구속된 위치와 비구속된 위치 사이에서 전환될 수 있다. 한 실

시양태에서, 스플라인 쌍은 도 22에 제시된 바와 같은 이의 구속된 배치형태로 배면(back-to-back)하여 위치된다.

[0284] 카테터(10)는 추가로 하나 이상의 스플라인(12 및 14)의 하나 이상의 표면에 고정된 하나 이상의 조직 침투기(16 및 18), 신장 길이를 갖는 중심 카테터 구성요소(20), 및 생물학적 전달관내에서 카테터의 이동 동안 조직 침투기 또는 침투기들을 차폐할 수 있는 외부 카테터 구성요소(22)를 포함한다.

[0285] 조직 침투기(16 및 18)는 임의의 적합한 물질로 구성될 수 있다. 이러한 물질의 바람직한 예로는, 제한되지 않지만, 니켈, 알루미늄, 강 및 이의 합금이 포함된다. 구체적인 실시양태에서, 조직 침투기는 니티놀(nitinol)로 구성된다.

[0286] 중심 카테터 구성요소(20) 및 외부 카테터 구성요소(22)는 카테터를 만들 때 전형적으로 사용되는 물질로 구성될 수 있다. 이러한 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 실리콘, 폴리우레탄, 나일론, 다크론(Dacron), 및 PEBAX(등록상표)가 포함된다.

[0287] 작동기는 바람직하게는 가요성 탄력성 물질로 구성된다. 한 바람직한 실시양태에서, 가요성 탄력성 물질은 구속력의 적용시, 예를 들어, 작동기가 구속된 배치형태로 있는 경우 구속될 수 있고, 구속력이 제거될 경우, 예를 들어, 작동기가 비구속된 배치형태로 존재하는 경우 그의 본래의 비구속된 형상을 취한다. 임의의 이러한 가요성 탄력성 물질, 제한되지 않지만, 예컨대 수술용 강, 알루미늄, 폴리프로필렌, 올레핀계 물질, 폴리우레탄 및 기타 합성 고무 또는 플라스틱 물질이 사용될 수 있다. 하나 이상의 작동기는 가장 바람직하게는 형상 기억 물질로 구성된다. 이러한 형상 기억 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 구리-아연-알루미늄-니켈 합금, 구리-알루미늄-니켈 합금, 및 니켈-티탄(NiTi) 합금이 포함된다. 한 바람직한 실시양태에서, 형상 기억 물질은 니티놀이다. 한 바람직한 실시양태에서, 스플라인 쌍이 비구속된 배치형태를 취할 경우, 각각의 스플라인을 형성하는 물질의 형상 기억 특성은, 임의의 외부 변형력을 적용하지 않고도, 도 23에 제시된 바와 같이, 스플라인이 단일 평면에서 서로에 방사형으로 구부러질 수 있도록 한다.

[0288] 하나 이상의 스플라인(및 바람직하게는 각각의 스플라인)은, 도 24에 제시된 바와 같이, 스플라인의 길이를 따라, 또는 스플라인 내에서 연장되는 가요성 유체 전달 도관(32 및 34)을 갖는다. 스플라인(12 및 14)이 이들의 곧은 구속된 배치형태로부터 이들의 구부러진 비구속된 배치형태로 이동되므로, 유체 전달 도관(32 및 34)은 또한 곧은 배치형태에서 구부러진 배치형태로 이동된다. 한 실시양태에서, 유체 전달 도관(32 및 34)은 스플라인(12 및 14) 쌍의 길이에 따라 고정되는 별도의 튜브형 도관이다. 또 다른 실시양태에서, 유체 전달 도관은 스플라인의 물질내로 또는 이내에 형성되는 도관이다.

[0289] 하나 이상의 스플라인(및 바람직하게는 각각의 스플라인(12 및 14))은 또한 스플라인의 길이를 따라 연장된 지퍼 레일(36 및 38)을 갖도록 형성된다(도 24). 지퍼 레일(36 및 38)은 스플라인(12 및 14)과 동일한 물질, 또는 스플라인(12 및 14)과 함께 구부러지는 물질로 형성된다.

[0290] 하나 이상의 조직 침투기(16 및 18)는 스플라인(12 및 14) 쌍의 외부 표면(28 및 30)에 고정된다(도 24). 조직 침투기(16 및 18)는 스플라인(12 및 14)의 길이에 따라 연장된 유체 전달 도관(32 및 34)에 연결되고 소통된다. 조직 침투기(16 및 18)는 스플라인(12 및 14)의 외부 표면(28 및 30)으로부터 실질적으로 수직으로 돌출되도록 위치된다. 조직 침투기(16 및 18)는 스플라인의 유체 전달 도관(32 및 34)과 소통되는 빈 내부 관강(bore; 管腔)을 갖는다. 조직 침투기의 원위 말단은 조직 침투기의 내부 관강과 소통되는 유체 전달 포트를 갖는다.

[0291] 장치는 생물학적 전달관의 벽, 예를 들면 혈관 벽의 하나 이상의 별개의 층내로 또는 층을 통해 유체를 전달할 수 있다. 혈관 벽은 다수의 구조물 및 층, 예컨대 내피층 및 기부 막 층(집합적으로 내막 층), 내부 탄성 박막, 중간 층, 및 외막 층을 포함한다. 이들 층은, 미국 특허 출원 공개공보 제2006/0189941A1호에 기재된 바와 같이, 내피가 혈관 내강에 노출되고, 기저 막, 내부 탄성 박막, 중간 층 및 외막이 각각 연속적으로 내피 위에 적층되도록 배열된다. 본 발명의 의학 장치에 의해, 조직 침투기(16 및 18)가 침투될 수 있는 깊이는 각각의 조직 침투기(16 및 18)의 길이에 의해 결정된다. 예를 들면, 타깃 층이 외막 층인 경우, 장치의 개발시 외막 층의 깊이로 침투하기에 충분한 규정된 길이를 갖는 조직 침투기(16 및 18)가 사용된다. 마찬가지로, 타깃 층이 중간 층인 경우, 장치의 개발시 중간 층의 깊이로 침투하기에 충분한 규정된 길이를 갖는 조직 침투기(16 및 18)가 사용된다.

[0292] 구체적인 실시양태에서, 조직 침투기(16 및 18)의 길이는 혈관 적용을 위해 약 0.3 ㎜~약 5 ㎜, 또는 다른 생물학적 공간 또는 전달관과 관여된 적용을 위해, 예를 들면 결장에 적용시, 약 20 ㎜ 또는 더욱 30 ㎜까지이다. 조직 침투기(16 및 18)는 바람직하게는 약 0.2 ㎜(33 게이지)~약 3.4 ㎜ (10 게이지), 보다 바람직하게는 0.2

mm~1.3 mm(약 33~21 게이지)의 직경을 갖는다. 조직 침투기의 원위 팁(tip)은 표준 사면(bevel), 짧은 사면, 또는 매우 짧은 사면을 가질 수 있다. 대안의 실시양태에서, 임의의 하나의 스플라인에 부착된 조직 침투기는 동일한 길이가 아니지만, 의학 장치가 비구속된 위치에 있는 경우, 예를 들어 사용 동안, 이들의 원위 말단이 생물학적 전달관의 벽으로부터 동일한 거리로 정렬되도록 배치될 수 있다.

[0293] 중심 카테터 구성요소(20)는 도 22에서 각각 왼쪽 및 오른쪽으로 보여진, 반대쪽 근위 말단 및 원위 말단을 갖는 신장 길이를 갖는다. 한 실시양태에서, 중심 카테터 구성요소(20)는 그의 신장 길이를 따라 연장된 원통형 외부 표면을 갖는다. 스플라인(12 및 14)의 근위 말단은 중심 카테터 구성요소(20)의 원위 말단에 부착되고, 예를 들어 용접되거나 풀칠되는 한편, 스플라인(12 및 14)의 원위 말단은 카테터 안내 팁(40)에 부착되고, 예를 들어 용접되거나 풀칠된다. 팁(40)은 생물학적 전달관에서 쉽게 이동하도록 고안된 평활한 외부 표면을 갖는다. 안내 와이어 관강(48)은 중심 카테터(20) 및 팁(40)의 길이를 통해 연장된다. 안내 와이어 관강은 관강을 통한 슬라이딩식 맞물림(sliding engagement)으로 안내 와이어를 수용하도록 치수화된다.

[0294] 한 쌍의 유체 전달 내강(44 및 46)은 카테터 구성요소의 전체 길이에 대해 중심 카테터 구성요소(20)의 내부를 통해 연장된다(도 25). 중심 카테터 구성요소(20)의 원위 말단에서, 유체 전달 내강(44 및 46)의 쌍은 스플라인(12 및 14) 길이를 따라 조직 침투기(16 및 18)로 연장된 유체 전달 도관(32 및 34) 쌍과 소통된다. 안내 와이어 관강(48)은 또한 중심 카테터 구성요소의 근위 말단으로부터 원위 말단까지 중심 카테터 구성요소(20)의 내부를 통해 연장된다(도 25). 중심 카테터 구성요소(20)의 근위 말단에 한 쌍의 루어 허브(50 및 52)가 제공된다(도 22). 한 실시양태에서, 각각의 루어 허브(50 및 52)는 중심 카테터의 길이를 통해 연장된 유체 전달 내강(44 및 46)중 하나와 소통된다. 각각의 루어 허브(50 및 52)는 유체 전달 공급원과 연결되어 유체를 각각의 루어 허브(50 및 52)를 통해 소통시킨 다음, 중심 카테터 구성요소(20)를 통해 연장된 각각의 유체 전달 내강(44 및 46)을 통해 소통시키고, 이어서 스플라인(12 및 14) 쌍의 길이를 따라 연장된 각각의 유체 전달 도관(32 및 34)을 통해 소통시킨 다음, 스플라인 쌍 각각에 고정된 조직 침투기(16 및 18)를 통해 소통시키도록 고안된다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 루어 허브(50 및 52)는 독립적으로 중심 카테터 구성요소의 길이를 통해 연장된 유체 전달 내강(44 및 46) 둘다와 소통된다. 이러한 배치형태에서, 제1 유체는 제1 루어 허브를 통해 조직 침투기(16 및 18) 둘다에 전달될 수 있고, 제2 유체는 제2 루어 허브를 통해 조직 침투기(16 및 18) 둘다에 전달될 수 있다. 각각의 루어 허브로부터의 조직 침투기 둘다로의 유체의 전달은, 도 32에 제시된 바와 같이, 각각의 루어 허브로부터 원위 공통 저장소(61)로 연장되는 독립적인 도관에 의해 달성될 수 있다. 이러한 저장소는 조직 침투기(16 및 18) 둘다와 소통된다. 다르게는, 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 의학 장치는, 중심 카테터를 통해 연장된 단일 유체 전달 내강에 연결되고, 이어서 원위 공통 저장소에 부착되어 조직 침투기(16 및 18) 둘다에 단일 유체의 전달을 허용하는 단일 루어 허브만을 포함한다.

[0295] 외부 카테터 구성요소(22)는 스플라인(12 및 14) 쌍 및 대부분의 중심 카테터(20)를 둘러싸는 관형 배치형태를 갖는다(도 22). 카테터 구성요소(22)는 도 22에서 각각 왼쪽 및 오른쪽으로 도시된 카테터 구성요소의 반대쪽 근위 말단과 원위 말단 사이에 연장된 신장 길이를 갖는다. 카테터 구성요소 원위 말단은 안내 팁(40)과 고정식 맞물림으로 맞물리도록 치수화되고, 여기서 팁(40)의 외부 표면은, 카테터 구성요소 원위 말단이 팁과 맞물릴 경우 카테터 구성요소(22)의 외부 표면과 합쳐진다. 카테터 구성요소(22)의 관형 배치형태는 카테터 구성요소(22)의 내부 표면이 스플라인 쌍의 구속된 위치에서 스플라인(12 및 14) 쌍 위의 복수 개의 조직 침투기(16 및 18)의 바깥쪽으로 이격되도록 치수화된다. 중심 카테터(20)의 근위 말단은 카테터 구성요소 원위 말단이 카테터 안내 팁(40)과 맞물릴 경우 카테터 구성요소(22)의 근위 말단을 지나 연장된다.

[0296] 기계적 연결부(54)가 외부 카테터 구성요소(22) 근위 말단과 중심 카테터 구성요소(20) 근위 말단 사이에 제공되어, 외부 카테터 구성요소가 스플라인(12 및 14) 쌍 및 중심 카테터 구성요소(20)의 길이를 따라 뒤로 이동하도록 하여, 외부 카테터 구성요소(22) 원위 말단이 안내 팁(40)으로부터 분리되고, 스플라인(12 및 14) 쌍을 지나서, 전방으로 중심 카테터 구성요소(20)의 길이 및 스플라인(12 및 14) 쌍의 길이를 지나 외부 카테터 구성요소(22) 원위 말단을 팁(40)과 맞물리도록 할 수 있다(도 22). 기계적 연결부(54)에는 외부 카테터 구성요소(22)를 중심 카테터 구성요소(20) 너머로 수동으로 슬라이딩시키는 핸들 또는 버튼이 제공될 수 있다. 연결부(54)에는 또한 썸휠(thumbwheel) 또는 트리거(trigger) 기계장치가 제공될 수 있다. 또한, 연결부(54)에는 중심 카테터 구성요소(20)에 비한 외부 카테터 구성요소(22)의 증가된 움직임에 대한 가청식(audible) 또는 촉각 지시자(예컨대 클릭킹(clicking))가 제공될 수 있다.

[0297] 한 실시양태에서, 외부 카테터 구성요소(22)에는 외부 카테터 구성요소의 내부 표면 상에서 외부 카테터 구성요소(22)의 한 측면의 전체 길이를 따라 연장된 단일 지퍼 트랙(56)이 제공된다(도 24). 외부 카테터 구성요소(22)의 내부에서 지퍼 트랙(56)은 각각의 스플라인(12 및 14)의 한 측면에서 지퍼 래일(36 및 38)과 슬라이딩식

맞물림으로 맞물린다. 카테터 조립부의 안내 팁(4)을 향해 중심 카테터 구성요소(20) 및 스플라인(12 및 14)의 쌍을 따라 전방으로 외부 카테터 구성요소(22)를 전진시키면 외부 카테터 구성요소의 지퍼 트랙(56)이 스플라인(12 및 14) 쌍의 레일(36 및 38)에 따라 슬라이딩 된다. 이는 스플라인(12 및 14) 쌍을 도 23에 제시된 이의 구부러진 비구속된 배치형태로부터 도 22에 제시된 이들의 배면식의 구속된 배치형태로 이동시킨다. 외부 카테터 구성요소(22)의 지퍼 트랙(56)에서 스플라인 레일(36 및 38)의 맞물림은 스플라인(12 및 14) 쌍을 도 22에 제시된 배면식의 상대 위치로 유지시킨다. 외부 카테터 구성요소(22)가 중심 카테터 구성요소(20) 및 스플라인(12 및 14) 쌍을 지나 외부 카테터 구성요소(22)의 원위 말단이 안내 팁(40)과 맞물리는 곳으로 전방으로 밀어냄으로써, 조직 침투기(16 및 18)는 덮히고 본 발명의 카테터 조립부는 생물학적 전달관에서 안전하게 전방 또는 후방으로 이동될 수 있다. 외부 카테터 구성요소(22)는 스플라인(12 및 14) 쌍으로부터 돌출된 조직 침투기(16 및 18)를 덮고, 외부 카테터 구성요소(22)와 원위 안내 팁(40)의 맞물림은 카테터 조립부에 평활한 외부 표면을 제공하여 카테터 조립부가 생물학적 전달관, 예컨대 혈관 내로 또는 이를 통해 삽입되는 것을 조장한다. 또 다른 실시양태에서, 외부 카테터 구성요소(22)에는 내부 표면 상에서 외부 카테터 구성요소(22)의 전체 길이에 따라 연장된 2개의 지퍼 트랙이 서로로부터 180도로 제공되고, 스플라인은 양쪽 측부 상에 레일을 갖는다.

[0298] 안내 와이어(58)가 카테터 조립부와 함께 사용된다(도 22). 안내 와이어(58)는 중심 카테터 구성요소 안내 와이어 관강(48)을 통해, 스플라인(12 및 14)을 따라서, 및 안내 팁 출구(42)를 통해 연장된다. 특정 실시양태에서, 안내 와이어(58)는 고체 코어, 예를 들어, 스테인레스 스틸 또는 초탄성 니티놀을 갖는다. 안내 와이어는 그의 전체에서 또는 그의 원위 부분(예를 들어, 가장 원위의 1 ㎜~25 ㎜ 또는 가장 원위의 3 ㎜~10 ㎜)에서 방사선불투과성 물질로 구성될 수 있다. 안내 와이어(58)는 선택적으로 의학적으로 불활성인 코팅물, 예컨대 TEFLON(등록상표)으로 코팅된다.

[0299] 이러한 장치의 사용시, 안내 와이어(58)는 당 분야에 공지된 방법에 의해 생물학적 전달관에 위치된다. 안내 와이어(58)는 생물학적 전달관으로부터 조립부의 팁(40)중의 안내 와이어 출구(42)를 통한 뒤, 외부 차폐 카테터(22)를 통해 조직 침투기(16 및 18)를 지나고, 중심 카테터(20)의 안내 와이어 관강(48)을 통해 연장된다. 다른 실시양태에서, 카테터 조립부는 급속 교환 카테터 조립부이고, 여기서 안내 와이어 내강은 카테터의 안내 팁(40)의 원위 말단에 존재하지만, 의학 장치의 전체 길이를 걸쳐 연장되지 않는다.

[0300] 안내 와이어의 위치선정 후, 장치는 이전에 위치된 안내 와이어(58)를 따라 생물학적 전달관내로 전진된다. 하나 이상의 방사선불투과성 마커가 생물학적 전달관중의 장치의 위치를 모니터링하기 위해 장치 상에 선택적으로 제공될 수 있다. 전자기 방사선의 통과를 방지하는 임의의 물질이 방사선불투과성으로 고려되고, 사용될 수 있다. 바람직한 방사선불투과성 물질로는, 제한되지 않지만, 백금, 금, 또는 은이 포함된다. 방사선불투과성 물질은 팁(40)의 전체 또는 일부의 표면 위에, 스플라인(12 및 14) 또는 다른 작동기의 전체 또는 일부 위에, 안내 와이어(58) 위에, 또는 전술된 구조물의 몇몇 조합 위에 코팅될 수 있다. 다르게는, 방사선불투과성 물질의 고리가 팁(40)에 부착될 수 있다. 장치에는 탑재된 영상화기(imaging), 예컨대 혈관내 초음파 또는 광학 간섭 단층촬영기(optical coherence tomography)가 선택적으로 제공된다. 장치의 팁에는 장치의 위치 또는 주변 생물학적 전달관의 특징을 결정하기 위해 사용되는 광학기가 선택적으로 제공된다.

[0301] 장치가 그의 원하는 위치에서 생물학적 전달관내에 존재하는 경우, 조작기는 기계적 연결부(54)를 사용하여 외부 카테터 구성요소(22)를 안내 팁(40)으로부터 후방으로 후퇴시킨다. 한 바람직한 실시양태에서, 외부 카테터 구성요소(22)가 조직 침투기(16 및 18)를 지나 철수되는 경우, 외부 카테터 구성요소(22)의 지퍼 트랙(56)은 스플라인(12 및 14) 쌍의 레일(36 및 38) 너머로 철수된다. 이러한 이동은 스플라인(12 및 14) 쌍을 도 22에 제시된 이들의 구속된 배면식 배치형태로부터 해방시키고, 스플라인(12 및 14)의 형상 기억 물질이 도 23에 제시된 이들의 비구속된 구부러진 배치형태를 취할 수 있도록 한다. 스플라인(12 및 14)이 이들의 비구속된 구부러진 배치형태로 이동되면, 스플라인은 생물학적 전달관의 벽(들)의 내부 표면과 접촉되고, 스플라인(12 및 14)의 외부 표면(28 및 30) 상의 조직 침투기(16 및 18)는 장치의 위치에 있는 생물학적 전달관의 내부 표면으로 가압된다.

[0302] 조직 침투기(16 및 18)가 생물학적 전달관 벽의 원하는 층으로 진입된 후, 유체는 중심 카테터 구성요소(20)중의 유체 전달 내강(44 및 46)을 통해, 스플라인(12 및 14) 쌍의 유체 전달 도관(32 및 34)을 통해, 및 조직 침투기(16 및 18)를 통해 전달될 수 있다. 유체의 전달이 완료될 경우, 조작기는 기계적 연결부(54)를 사용하여 외부 카테터 구성요소(22)(이는 또한 차폐 구성요소로 지칭될 수 있음)를 전방으로 중심 카테터 구성요소(20) 및 스플라인(12 및 14) 쌍을 지나 안내 팁(40)으로 이동시킨다. 외부 카테터 구성요소(22)가 스플라인(12 및 14) 쌍을 지나 전방으로 이동되면, 외부 카테터 구성요소(22)의 내부 상의 지퍼 트랙(56)은 스플라인(12 및 14) 쌍 위의 레일(36 및 38)을 지나 통과하여, 스플라인(12 및 14)이 이들의 비구속된, 구부러진 배치형태로부터 이

들의 구속된 배치형태로 다시 이동되도록 한다. 외부 카테터 구성요소(22)는 전체적으로 스플라인(12 및 14) 쌍을 지나 전진되어 다시 안내 팁(40)과 맞물리고, 외부 카테터 구성요소(22)중의 지퍼 트랙(56)은 스플라인(12 및 14)을 이들의 구속된 배치형태로 유지시킨다. 이어서 장치는 생물학적 전달관 또는 또 다른 생물학적 전달관 중의 또 다른 위치에서 방출되기 위해 제위치되거나 신체로부터 철수될 수 있다.

[0303] 스플라인(12 및 14)의 형상 및 길이는 장치의 다양한 실시양태가 다양한 크기 또는 직경의 생물학적 공간 또는 도관에 사용될 수 있도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 스플라인은 편평하거나 둥글수 있다. 편평한 스플라인은 바람직하게는 특별한 용도에 따라서 약 0.2 ㎜~약 20 ㎜ 범위의 폭, 약 0.2 ㎜~약 5 ㎜ 범위의 높이, 및 약 10 ㎜~약 200 ㎜ 범위의 길이를 갖는다. 둥근 스플라인은 바람직하게는 특별한 용도에 따라서 약 0.2 ㎜~약 20 ㎜ 범위의 직경 및 약 10 ㎜~약 200 ㎜의 길이를 갖는다. 구체적인 실시양태에서, 편평한 스플라인은 3.5 ㎜~5 ㎜, 5 ㎜~10 ㎜, 10 ㎜~15 ㎜, 15 ㎜~20 ㎜의 폭, 또는 이내의 임의의 범위(예를 들어, 3.5 ㎜~10 ㎜); 3.5 ㎜~5 ㎜, 5 ㎜~10 ㎜. 10 ㎜~15 ㎜, 15 ㎜~20 ㎜의 높이, 또는 이내의 임의의 범위(예를 들어, 3.5 ㎜~10 ㎜); 및 10 ㎜~20 ㎜, 20 ㎜~40 ㎜, 40 ㎜~80 ㎜, 80 ㎜~120 ㎜, 120 ㎜~150 ㎜ 또는 150~200 ㎜의 길이, 또는 이내의 임의의 범위(예를 들어, 10 ㎜~40 ㎜), 또는 전술된 값의 임의의 순열(예를 들어, 5 ㎜~10 ㎜의 폭, 3.5~5 ㎜의 높이, 및 20~40 ㎜의 길이)을 갖는다. 다른 실시양태에서, 둥근 스플라인은 3.5 ㎜~5 ㎜, 5 ㎜~10 ㎜, 10 ㎜~15 ㎜, 15 ㎜~20 ㎜의 직경, 또는 이내의 임의의 범위(예를 들어, 3.5 ㎜~10 ㎜) 및 10 ㎜~20 ㎜, 20 ㎜~40 ㎜, 40 ㎜~80 ㎜, 80 ㎜~120 ㎜, 120 ㎜~150 ㎜ 또는 150~200 ㎜의 길이, 또는 이내의 임의의 범위(예를 들어, 10 ㎜~40 ㎜), 또는 전술된 값의 임의의 순열(예를 들어, 5 ㎜~10 ㎜의 직경 및 20~40 ㎜의 길이)를 갖는다.

[0304] 도 27에 도시된 제2의 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 장치는 종방향 축(113)이 있는 신장 길이를 갖는 중심 카테터 구성요소(112), 하나 이상의(및 바람직하게는 2개의) 가요성 탄력성 작동기(이는 이러한 구체적인 실시양태에서, 중심 카테터 구성요소(112)의 원위 부분으로부터 연장되는 조직 침투기 제공 관(114 및 116)으로서 형성된다)를 포함하는 유체 전달 카테터(110)이다. 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 적어도 일부는 카테터 조립부의 중심 종방향 축(113)에 실질적으로 평행하게 배향된 구속된 배치형태와 카테터의 중심 종방향 축(113)에 실질적으로 비평행하게 배향된 비구속된 배치형태 사이에서 이동가능하다.

[0305] 카테터는 추가로 하나 이상의(및 바람직하게는 2개의) 가요성 신장 조직 침투기(118 및 120)(이는 조직 침투기 제공 관(114 및 116)을 통해 연장됨), 및 외부 전개 관(122)(이는 중심 카테터 구성요소(112)의 길이 부분을 지나 연장됨), 조직 침투기 제공 관(114 및 116), 및 중앙 레일(132)을 포함한다.

[0306] 중심 카테터 구성요소(112) 및 외부 전개 관(122)은 카테터를 구성하는 임의의 적합한 물질로 구성될 수 있다. 이러한 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 실리콘, 폴리우레탄, 나일론, 다크론, 및 PEBAX(등록상표)가 포함된다.

[0307] 조직 침투기(118 및 120)는 각각의 개별적 허브(166 및 168)(도 31)에 연결된다. 조직 침투기(118 및 120) 쌍중 하나 이상은 바람직하게는 약 0.2 ㎜(33 게이지)~약 3.4 ㎜(10 게이지), 보다 바람직하게는 0.8 ㎜~1.3 ㎜(약 18~21 게이지)의 직경을 갖는다. 조직 침투기 쌍의 하나 이상은 표준 사면, 짧은 사면, 또는 매우 짧은 사면을 가질 수 있다. 조직 침투기(118 및 120) 쌍은 바람직하게는 이들의 길이를 따라 조직 침투기가 구부러질 수 있도록 허용하는 물질로 구성된다. 이러한 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 니켈, 알루미늄, 강 및 이의 합금이 포함된다. 구체적인 실시양태에서, 조직 침투기는 니티놀로 구성된다. 조직 침투기(118 및 120)의 전체 길이는 단일 물질로 구성되거나, 조직 침투기(118 및 120)의 팁(156 및 158)을 비롯한 원위 말단(예를 들어, 원위 1 ㎜~원위 20 ㎜)은 한가지 물질로 구성되고 상이한 물질, 예를 들어, 플라스틱으로 구성된 관을 통해 개개의 허브(166 및 168)에 연결된다.

[0308] 하나 이상의 조직 침투기 제공 관(114 및 116) 쌍은 바람직하게는 가요성 탄력성 물질로 구성된다. 이러한 가요성 탄력성 물질은, 예를 들어, 조직 침투기 제공 관(114 및 116)이 도 27의 직선의 구속된 배치형태로 있는 경우 변형될 수 있지만, 변형력이 제거될 경우, 예를 들어, 조직 침투기 제공 관(114 및 116)이 도 28에 제시된 만곡한 비구속된 배치형태로 있는 경우 그의 원래의 형상으로 되돌아온다. 이러한 임의의 가요성 탄력성 물이 사용될 수 있고, 제한되지 않지만 수술용 강, 알루미늄, 폴리프로필렌, 올레핀계 물질, 폴리우레탄 및 기타 합성 고무 또는 플라스틱 물질이 포함된다. 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 쌍은 가장 바람직하게는 형상 기억 물질로 구성된다. 이러한 형상 기억 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 구리-아연-알루미늄-니켈 합금, 구리-알루미늄-니켈 합금, 및 니켈-티탄(NiTi) 합금이 포함된다. 한 바람직한 실시양태에서, 형상 기억 물질은 니티놀이다.

[0309] 중심 카테터 구성요소(112)는 반대쪽 근위 말단(124) 및 원위 말단(126)을 갖는 가요성 신장 길이를 갖는다(도 27). 중심 카테터 구성요소의 원위 말단(126)은 생물학적 전달관을 통해 원위 말단(126)을 안내할 외부 형상 배치형태를 갖는 안내 팁으로서 형성된다. 중앙 레일(132)내의 안내 와이어 관강(128)은 중심 카테터(112)의 중심을 통해 근위 말단(124)으로부터 원위 말단(126)까지 연장된다. 안내 와이어 관강(128)은 와이어 너머로 관강(128)이 슬라이딩식으로 이동하기 위한 가요성 신장 안내 와이어(130)를 수용한다(도 29). 안내 와이어(130)는 카테터 조립부를 생물학적 전달관을 통해 안내하기 위해 사용된다. 특정 실시양태에서, 안내 와이어(130)는 고체 코어, 예를 들어, 스테인레스 스틸 또는 초탄성 니티놀을 갖는다. 안내 와이어는 선택적으로 그의 전체에서 또는 그의 원위 부분에서 방사선불투과성 물질로 구성될 수 있다(예를 들어, 가장 원위의 1 ㎜~25 ㎜ 또는 가장 원위의 1 ㎜~3 ㎜). 안내 와이어(130)는 선택적으로 의학적으로 불활성인 코팅물, 예컨대 TEFLON(등록상표)으로 코팅된다. 다른 실시양태에서, 카테터 조립부는 급속 교환 카테터 조립부이고, 여기서 안내 와이어는 안내 팁(126)의 원위 말단 상에 위치하고 이로부터 연장된다.

[0310] 안내 와이어 관강(128)을 둘러싸는 좁은 중앙 레일(132)은 카테터 근위 말단(124)을 향한 카테터 원위 말단(126)의 안내 팁으로부터 연장된다. 중앙 레일(132)은 안내 팁(126)을 중심 카테터 구성요소의 기저 부분(138)에 연결시킨다.

[0311] 중심 카테터 구성요소 기저 부분(138)은 기저 부분의 전체 길이를 따라 연장된 원통형 외부 표면을 갖는다. 기저 부분(138)은 중심 카테터 구성요소(112)의 전체 길이의 대부분을 따라 연장된다. 도 29에 제시된 바와 같이, 안내 와이어 관강(128)은 중심 카테터 구성요소 기저 부분(138)의 중심을 통해 연장된다. 또한, 한쌍의 조직 침투기 내강(140 및 142)은 또한 안내 와이어 관강(128)과 나란히 중심 카테터 구성요소 기저 부분(138)의 길이를 통해 연장된다. 중심 카테터 구성요소의 근위 말단(124)에서, 한 쌍의 포트(144 및 146)는 내강(140 및 142) 쌍을 중심 카테터 구성요소(112)의 외부와 소통시킨다(도 27).

[0312] 대안의 실시양태에서, 도 27의 의학 장치는 또한 단일한 가요성 탄력성 작동기(이는 조직 침투기 제공 관으로서 형성됨), 단일한 가요성 신장 조직 침투기(이는 조직 침투기 제공 관을 통해 연장되고 허브에 연결됨), 및 외부 전개 관(이는 중심 카테터 구성요소의 길이의 일부를 지나 연장된다), 조직 침투기 제공 관, 및 중앙 레일을 포함한다.

[0313] 제1 및 제2 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 쌍은 카테터 중심 구성요소 기저 부분(138)으로부터 카테터 원위 말단(126)을 향해 돌출된다. 각각의 조직 침투기 제공 관은 중심 카테터 구성요소 기저 부분(138)에 고정된 근위 말단, 및 반대쪽 원위 말단(148및 150)을 갖는 좁은 신장 관으로서 형성된다. 각각의 제1 및 제2 조직 침투기 제공 관(114 및 116)은 내부 관강(152 및 154)을 갖고, 이는 각각의 제1 조직 침투기 내강(140) 및 제2 조직 침투기 내강(142)과 중심 카테터 구성요소 기저 부분(138)에서 소통된다.

[0314] 도 29 및 30에 제시된 바와 같이, 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 외부 배치형태는 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 길이가 중앙 레일(132)의 반대편 상에 나란히 위치될 수 있도록 중앙 레일(132)에 부합된다. 조직 침투기 관 원위 말단(148 및 150)은 혈관 시스템을 통해 카테터의 통과를 또한 조장하는 안내 팁 표면으로서 형성될 수 있다. 조직 침투기 관 원위 말단(148 및 150)은 바람직하게는 조직 침투기 제공 관(114 및 116)에 비해 직경이 더 크다. 구체적인 실시양태에서, 조직 침투기 관 원위 팁(148 및 150)은 둥근 구근모양의(bulbous) 팁이다. 이러한 팁은 비외상적(atraumatic)이고 관은 생물학적 전달관의 벽을 의도치않게 천공시키지 않을 것이다. 팁(148 및 150)은 노출되고 안내 팁(126)의 직경을 지나 바깥쪽으로 연장되지 않는다.

[0315] 각각의 조직 침투기 관(114 및 116)은 바람직하게는 형상 기억 물질, 예컨대 니티놀로 구성된다. 관(114 및 116)은 도 28에 제시된 만곡한 비구속된 배치형태로 형성된다. 관(114 및 116)은, 관에 대해 구속력이 가해지지 않는 경우 만곡한 비구속된 배치형태로 이동한다. 침투 관(114 및 116)이 중앙 레일(132)을 따라 직선의 구속된 배치형태로 놓이기 위해, 도 27에 제시된 이들의 직선의 구속된 위치로 이들을 유지시키도록 구속력이 관에 적용되어야 한다. 각각의 관(114 및 116)이 도 28에 제시된 그의 직선의 구속된 배치형태로부터 도 28에 제시된 그의 만곡한 비구속된 배치형태로 이동할 경우, 관을 통해 연장된 조직 침투기 관강(152 및 154)은 또한 직선 배치형태에서 만곡한 배치형태로 이동한다.

[0316] 원위 팁으로부터 허브(166 및 168)까지의 조직 침투기(118 및 120) 쌍은, 중심 카테터 기저 부분(138)을 통해 연장된 조직 침투기 내강(140 및 142)의 길이 및 조직 침투기 제공 관(114 및 116)을 통해 연장된 조직 침투기 관강(152 및 154)의 길이의 합에 비해 약간 더 긴 길이를 갖는다. 조직 침투기(118 및 120)의 팁(156 및 158)은 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 원위 말단(148, 150)에 인접하여 위치하고, 도 27의 구속된 배치형태에서의 관의 관강(152 및 154) 내부에 위치한다. 조직 침투기(118 및 120)의 반대쪽 근위 말단은 중심 카테터(112)의

측면 포트(144 및 146)를 통해 바깥으로 돌출된다. 조직 침투기(118 및 120) 쌍은 중심 카테터 구성요소(112)의 조직 침투기 내강(140 및 142) 및 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 조직 침투기 관강(152 및 154)을 통해 쉽게 슬라이딩되도록 치수화된다. 중심 카테터 구성요소(112)의 측면 포트(144 및 146)는 바람직하게는 중심 카테터 근위 말단(124)에 20° ~90° 각도로, 가장 바람직하게는 중심 카테터 근위 말단(124)에 30° ~60° 각도로 존재한다.

[0317] 선형 이동 제어기(162 및 164)로의 한쌍의 수동 조작기 이동은 조직 침투기(118 및 120)의 근위 말단에 연결되고, 중심 카테터 포트(144 및 146)에 고정될 수 있다(도 31). 제어기(162 및 164)는 중심 카테터 조직 침투기 내강(140 및 142)을 통해서 및 조직 침투기 제공 관 관강(152 및 154)을 통해서 조직 침투기(118 및 120)의 제어된 선형 이동으로 작동기 이동을 전환시키도록 구성될 수 있다. 한 실시양태에서, 조직 침투기 원위 말단에서의 조직 침투기 주사 팁(156 및 158)이 조직 침투기 원위 말단(148 및 150)에서 조직 침투기 관 관강(152 및 154)으로부터 원하는 길이를 연장하기 위해 조절가능하게 위치될 수 있도록, 한 방향으로 수동으로 이동될 수 있는 회전 제어기(162 및 164)가 존재한다. 반대 방향으로 제어기를 회전시킴으로써, 조직 침투기(118 및 120)는 조직 침투기 관 관강(152 및 154)내로 뒤로 후퇴될 수 있다. 조작기 이동에서 선형 이동으로의 제어기(162 및 164) 각각에는 조직 침투기(118 및 120)를 통해 연장된 내부 관강과 소통되는 허브(166 및 168)가 제공될 수 있고, 진단제 또는 치료제의 용액을 함유하는 주사기 또는 관을 연결하기 위해 사용될 수 있다.

[0318] 외부 전개 관(122)은 중심 카테터(112), 조직 침투기 제공 관(114 및 116), 및 중앙 레일(132)을 둘러싸는 관형 길이를 갖는다. 전개 관(122)은, 전개 관(122)의 전방 위치로의 슬라이딩식 이동(여기서, 전개 관의 개방 원위 말단(172)은 도 27에 제시된 바와 같이 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 원위 말단(148 및 150)에 인접하여 위치함), 및 전개 관(122)의 후방 위치로의 슬라이딩식 이동(여기서 관 원위 말단(172)은 도 28에 제시된 바와 같이 조직 침투기 제공 관(114 및 116)과 중심 카테터 구성요소(112)의 연결부에 인접하여 위치함)을 위하여, 중심 카테터 구성요소(112), 및 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 쌍 위에 장착된다. 전개 관(122)의 반대쪽 근위 말단(174)에는 중심 카테터(112)로의 기계적 연결부(176)가 제공될 수 있다. 기계적 연결부(176)는 전개 관(122)이 중심 카테터(112)와 조직 침투기 제공 관(114 및 116)에 대해 그의 전방 및 후방 위치 사이에서 이동되도록 할 수 있다(도 27 및 28). 이러한 연결부는 수동으로 작동하여 전개 관(122)이 중심 카테터(112) 및 제공 관(114 및 116)에 대해 이동할 수 있도록 하는 썸휠, 슬라이딩식 연결부, 트리거 또는 푸쉬 버튼(push button) 또는 몇몇 다른 연결부에 의해 제공될 수 있다. 전개 관(122)이 도 27에 제시된 그의 전방 위치로 이동될 경우, 관 원위 말단(172)은 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 길이를 지나 통과하고 제공 관을 중심 카테터 중앙 레일(132)의 반대 측부를 따라 연장된 이들의 구속된 위치로 이동시킨다. 전개 관(122)이 도 28에 제시된 그의 후방 위치로 이동되는 경우, 전개 관의 원위 말단(172)은 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 길이를 지나 후퇴되고 점진적으로 제공 관(114 및 116)이 이들의 구속된 에너지를 방출하도록 허용하여 도 28에 제시된 이들의 만곡한 비구속된 배치형태로 이동하도록 한다.

[0319] 카테터(110)의 사용시, 전개 관(122)은 도 27에 제시된 바와 같이 전방 위치로 존재한다. 안내 와이어(130)는 공지된 방식으로 생물학적 전달관(예컨대 동맥 또는 정맥) 내에 위치된다. 이어서, 카테터는 안내 와이어를 지나 생물학적 전달관내로 전진된다. 안내 와이어(130)는 생물학적 전달관으로부터 연장되고, 중심 카테터 구성요소 원위 말단(126)내로 안내 와이어 내강(128)을 통해 진입한다. 와이어(130)는 중심 카테터(112)의 길이를 통해 통과하고 카테터 포트(144 및 146)에 인접한 중심 카테터 구성요소의 근위 말단에서 나타나고, 여기서 안내 와이어(130)는 수동으로 조작될 수 있다.

[0320] 카테터(110)는 생물학적 전달관을 통해 전진되고, 안내 와이어(130)에 의해 안내될 수 있다. 방사선불투과성 마커는 선택적으로 조립부 상에 제공되어 생물학적 전달관에서 조립부의 위치를 모니터링할 수 있다. 전자기 방사선의 통과를 방지하는 임의의 물질은 방사선불투과성으로 고려되고, 이는 사용될 수 있다. 유용한 방사선불투과성 물질로는, 제한되지 않지만, 백금, 금, 또는 은이 포함된다. 방사선불투과성 물질은 팁(126)의 전체 또는 일부의 표면 위에 제공되고, 관(114 및 116)의 전체 또는 일부 위에, 조직 침투기(118 및 120)의 전체 또는 일부 위에, 안내 와이어(130) 위에, 또는 전술된 구조물의 몇몇 조합 위에 코팅될 수 있다. 다르게는, 방사선불투과성 물질의 고리는 팁(126)에 부착될 수 있다. 조립부에는 탑재된 영상화기, 예컨대 혈관내 초음파 또는 광학 간섭 단층촬영기가 선택적으로 제공된다. 조립부의 팁에는 조립부의 위치 또는 주변 생물학적 전달관의 특징을 결정하기에 유용한 광학기가 선택적으로 제공된다. 조립부가 원하는 위치에 있는 경우, 외부 전개 관(122)은 기계적 연결부(176)의 수동 조작에 의해 도 27에 제시된 그의 전방 위치로부터 도 28에 제시된 그의 후방 위치로 이동될 수 있다.

[0321] 전개 관(122)이 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 쌍을 지나 철수되면, 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의

구속 에너지가 방출되고 관은 도 28에 제시된 이들의 비구속된 만곡한 배치형태로 이동된다. 이러한 이동은 조직 침투기 관강(152 및 154)을 조립부(110)가 삽입되어져 있는 생물학적 전달관의 내부 표면에 대하여 조직 침투기 관 원위 말단(148 및 150)에 위치시킨다.

[0322] 이어서, 조작기 이동에서 선형 이동으로의 제어기(162 및 164)는 수동으로 조작되어 조직 침투기 제공 관 원위 말단(148 및 150)에서 조직 침투기 원위 말단(156 및 158)을 조직 침투기 관강(152 및 154)으로부터 연장시킨다. 게이지는 각각의 조작기 이동에서 선형 이동으로의 제어기(162 및 164)에 제공되어, 제어기(162 및 164)가 회전될 동안 조직 침투기 관 말단(148 및 150)으로부터 조직 침투기 팁(156 및 158)의 돌출 정도를 시각적으로 지시한다. 제어기는 또한 청각적 소리 또는 촉각적 감각, 예컨대 클릭킹을 제공하여 조직 침투기 이동의 증분 거리 단계를 나타낸다. 이는 조직 침투기 팁(156 및 158)이 생물학적 전달관의 벽내로 원하는 거리만큼 전개시킨다.

[0323] 제3의 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 의학 장치는 가요성 탄력성 물질로 구성된 하나 이상의 조직 침투기를 포함하는 유체 전달 카테터이다. 특정 양태에서, 본 발명의 의학 장치는 중심 종방향 축을 갖고, 하나 이상의 조직 침투기를 포함하고, 여기서 하나 이상의 조직 침투기는 상기 하나 이상의 조직 침투기의 길이가 상기 의학 장치의 종방향 축에 실질적으로 평행하게 배향되는 구속된 배치형태 및 기 하나 이상의 조직 침투기의 길이의 적어도 일부가 상기 의학 장치의 중심 종방향 축에 실질적으로 비평행하게 배향되는 비구속된 배치형태로 존재할 수 있다. 장치가 생물학적 전달관의 벽에 인접한 타깃 부위에 위치된 후, 하나 이상의 조직 침투기(및 원할 경우 모든 조직 침투기)는 구속된 배치형태로부터 해방되어 비구속된 배치형태를 채택하도록 허용됨으로써, 생물학적 전달관의 벽과 접촉한다. 하나 이상의 조직 침투기는 임의의 형상일 수 있고, 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 조직 침투기의 구속된 배치형태에서 비구속된 배치형태로의 이동은 장치 조작기에 의한 구속력이 제거되지만, 조작기에 의한 장치 또는 타깃 조직으로의 임의의 변형력의 입력이 없는 경우에 초래된다.

[0324] 한 바람직한 실시양태에서, 조직 침투기는 구속력의 적용시, 예를 들어, 조직 침투기가 구속된 배치형태에 있는 경우 구속될 수 있고, 구속력이 제거되는 경우, 예를 들어, 조직 침투기가 비구속된 배치형태에 있는 경우 그의 원래의 비구속된 형상을 채택하는 가요성 탄력성 물질로 구성된다. 임의의 이러한 가요성 탄력성 물질이 사용될 수 있고, 제한되지 않지만 수술용 강, 알루미늄, 폴리프로필렌, 올레핀계 물질, 폴리우레탄 및 기타 합성 고무 또는 플라스틱 물질이 포함된다. 하나 이상의 조직 침투기는 가장 바람직하게는 형상 기억 물질로 구성된다. 이러한 형상 기억 물질의 예로는, 제한되지 않지만, 구리-아연-알루미늄-니켈 합금, 구리-알루미늄-니켈 합금, 및 니켈-티탄(NiTi) 합금이 포함된다. 한 바람직한 실시양태에서, 형상 기억 물질은 니티놀이다. 한 바람직한 실시양태에서, 조직 침투기가 비구속된 배치형태를 취할 때, 각각의 조직 침투기를 형성하는 물질의 형상 기억 특성은, 임의의 외부 변형력의 적용 없이, 조직 침투기가 의학 장치의 종방향 축에 실질적으로 평행한 위치에서 의학 장치의 종방향 축에 실질적으로 수직인 위치로 이동되도록 한다.

[0325] 한 바람직한 실시양태에서, 조직 침투기는 조직 침투기를 둘러싸는 관형 배치형태를 갖는 외부 카테터 구성요소에 의해 구속된 배치형태로 유지된다. 기계적 연결부가 외부 카테터 구성요소와 중심 카테터 구성요소(이에 조직 침투기가 부착됨) 사이에 제공된다. 기계적 연결부는 외부 카테터 구성요소가 중심 카테터 구성요소의 길이에 따라 후방으로 이동되도록 함으로써, 구속된 하나 이상의 조직 침투기를 드러내고 하나 이상의 조직 침투기가 비구속된 배치형태를 취하도록 허용하고, 여기서 이들은 타깃 전달 부위와 접촉한다. 당 분야의 숙련가라면 이러한 구체적인 실시양태가 쉽게 채택되어 장치의 위치선정을 촉진하는 방사선불투과성 마커 또는 장치의 사용을 촉진하는 급속 교환 특징부를 혼입함을 인식할 것이다.

[0326] 본 발명의 의학 장치는, 그의 다양한 실시양태에서, 혈관 벽의 개별적 층으로 유체의 전달을 허용한다. 혈관 벽은 다수의 구조물 및 층, 예컨대 내피 층 및 기저막 층(집합적으로 내막 층), 내부 탄성 박막, 중간 층 및 외막 층으로 구성된다. 이들 층은 내피가 혈관의 내강에 노출되고, 기저막, 내막, 내부 탄성 박막, 중간 층 및 외막이 각각 연속적으로 내피 상으로 적층되도록, 미국 특허 출원 제2006/0189941 A1호에 기재된 바와 같이 배열된다. 본 발명의 의학 장치에 의해, 조직 침투기 팁(156 및 158)이 티깃 조직내로 침투될 수 있는 깊이는 제어기(162 및 164)를 회전시킴으로써 제어될 수 있다. 예를 들면, 타깃 층이 외막 층이라면, 관(114 및 116)의 구속 에너지가 방출되고, 관은 도 28에 제시된 이들의 비구속된, 만곡한 배치형태를 채택하고, 조직 침투기 팁(156 및 158)은 외막 층의 깊이로 침투하기에 충분한 길이로 제어기에 의해 전진된다. 마찬가지로, 타깃 층이 중간 층이라면, 관(114 및 116)의 구속 에너지가 방출되고, 관은 도 28에 제시된 이들의 비구속된, 만곡한 배치형태를 채택하고, 조직 침투기 팁(156 및 158)은 중간 층의 깊이로 침투하기에 충분한 길이로 제어기에 의해 전진된다.

[0327] 생물학적 전달관의 벽의 원하는 층에 함침된 조직 침투기에 의해, 유체는 이어서 조직 침투기(118 및 120)를 통해 전달될 수 있다. 유체의 전달이 완료될 경우, 제어기(162 및 164)는 조직 침투기 팁(156 및 158)을 조직 침투기 제공 관(114 및 116)의 내부 관강(152 및 154)내로 뒤로 철수하도록 조작될 수 있다. 이어서 전개 관(122)은 그의 전방 위치로 이동될 수 있고, 여기서 전개 관 원위 말단(172)은 조직 침투기 제공 관(114 및 116)을 도 27에 제시된 이들의 구속된 위치로 다시 이동시킨다. 전개 관(122)이 도 27에 제시된 그의 완전한 전방 위치로 이동될 경우, 조립부는 신체로부터 제위치되거나 철수될 수 있다.

[0328] 본 발명의 의학 장치는 또한 생물학적 전달관의 벽 내부 상에 또는 생물학적 전달관의 벽 내에 플라크 침착물로의 유체의 전달을 허용한다.

[0329] 본 발명의 의학 장치는 또한 생물학적 전달관의 외부 벽의 바깥쪽에 위치된 세포외 공간 또는 조직으로(예를 들어, 혈관의 외부 표면으로, 또는 혈관의 외부 표면에 대해 위치된 근육, 예컨대 심근으로) 유체의 전달을 허용한다.

[0330] 본 발명의 장치의 한 유리한 특징은, 작동기가, 그의 고안에 의해, 그들의 전개를 따라 생물학적 전달관의 내부 벽의 완전한 둘레와 덜 접촉하도록 만드는 것이다. 바람직한 실시양태에서, 작동기는 이들이 전개되는 생물학적 전달관의 내부 벽의 100% 미만의 둘레와 접촉된다. 보다 바람직하게는, 작동기는 이들이 전개되는 생물학적 전달관의 내부 벽의 75%, 50% 또는 25% 미만의 둘레와 접촉된다. 가장 바람직하게는, 작동기는 이들이 전개되는 생물학적 전달관의 내부 벽의 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만의 둘레와 접촉된다.

[0331] 장치는 생물학적 전달관의 벽에 다양한 치료학적 및/또는 진단학적 제제를 포함하는 유체를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 치료학적 제제로는, 제한되지 않지만 단백질, 화학물질, 소분자, 세포 및 핵산이 포함된다. 장치에 의해 전달되는 치료학적 제제는 미립자 또는 나노입자를 포함하거나, 미립자 또는 나노입자와 착화되거나, 또는 미립자 또는 나노입자에 결합된다. 단백질 제제로는 엘라스타아제, 증식억제제, 및 혈관경련을 저해하는 제제가 포함된다. 엘라스타아제의 전달을 위한 장치의 용도는 구체적으로 고려되어 있다. 몇몇 공개된 국제 특허 출원 공개공보(제WO 2001/21574호; 제WO 2004/073504호; 및 제WO 2006/036804호)에는, 엘라스타아제가, 단독으로 및 다른 제제와 조합하여, 생물학적 전달관의 폐색 및 혈관경련을 비롯한 생물학적 전달관의 질병의 치료에 유리한 것으로 교시되어 있다. 진단학적 제제로는, 제한되지 않지만, 콘트라스트(contrast), 미립자, 나노입자, 또는 영상화제가 포함된다.

[0332] 다양한 별개의 유체 전달 방법이 장치에 의해 실행될 수 있다. 특정 적용분야에서, 별개의 유체는 장치의 각각의 조직 침투기를 통해 동시에 또는 순차적으로 전달된다. 다른 적용분야에서, 동일한 유체는 조직 침투기 둘다를 통해 동시에 또는 순차적으로 전달될 수 있다. 제1 유체가 조직 침투기 둘다를 통해 전달된 후 제2 유체가 조직 침투기 둘다를 통해 전달되는 실시양태 및/또는 방법 또한 고려된다.

[0333] 생물학적 전달관내로 또는 전달관의 벽을 통해 유체를 전달하는 장치를 사용하는 방법 또한 특별히 고려된다. 이들 방법은 장치를 생물학적 전달관내로 도입하는 단계, 전달관내에서 타깃 부위로 장치를 전진시키는 단계, 작동기를 이들의 구속된 위치에서 해방시키는 단계, 선택적으로 조직 침투기를 작동기중의 내강을 통해 전진시켜 생물학적 전달관의 벽내로 원하는 깊이까지 침투시키는 단계, 적어도 하나의 유체를 벽 내로 또는 이를 통해 전달하는 단계, 선택적으로 조직 침투기를 작동기의 내강내로 다시 복귀시키는 단계, 작동기를 이들의 구속된 위치로 후퇴시키는 단계, 원할 경우 추가의 유체의 전달을 위해 동일하거나 상이한 전달관에 장치를 재위치시키는 단계, 및 전달관으로부터 장치를 제거하는 단계를 포함한다.

[0334] ## 6. 실시예

[0335] 본 섹션은 임상적 용도를 위한, 예를 들면 혈관, 이에 따라 혈관의 내강의 직경을 확작시키는 제제로서의 재조합 제I형 엘라스타아제의 생산 방법을 기재한다. 인간 제I형 췌장 엘라스타아제는 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제의 전체 길이를 가로질러 89%의 아미노산 동일성을 나타내고, "촉매적 3원(triad)" 및 잔기를 결정하는 기질 특이성이 완전히 보존된다. 돼지 제I형 엘라스타아제는 초기에 트립신에 의해 활성화되는 효소적 불활성 선구효소로서 초기에 합성되어 4개의 내부 디설파이드 결합을 함유하고 글리코실화가 없는 성숙한 효소를 산출한다(문헌[Shotton, 1970, Methods Enzymol 19: 113-140, Elastase; and Hartley and Shotton, 1971, Biochem. J. 124(2): 289-299, Pancreatic Elastase. The Enzymes 3:323-373] 및 본원의 참조문헌).

[0336] 하기 실시예는 유효하고 측량가능한 재조합 돼지 및 인간 제I형 엘라스타아제 발현의 개발, 및 비임상적 및 임상적 연구를 위한 이들 효소의 cGMP 제작에 적합한 정제 개요 및 상업적 약학 용도를 설명한다. 성숙한 돼지 엘라스타아제는 PRT-102란 명칭으로 제공되었다. 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제는 PRT-201이란 명칭으로 제공되

었다.

[0337] 6.1 용어 및 약어

[0338] 본원에 사용될 경우, 용어 PRT-101, PRT-102, PRT-201 및 프로-PRT-201은 다음의 의미이다:

[0339] PRT-101: 돼지 췌장 엘라스타아제. 별도로 지시되지 않는 한, 실시예에 사용된 돼지 췌장 엘라스타아제는 엘라스틴 프로덕츠 캄파니 인코포레이티드(몬테나주 오웬스빌 소재)로부터 카탈로그 # EC 134로서 구입된 고도로 정제된 돼지 췌장 엘라스타아제이다.

[0340] PRT-102: 성숙한 재조합 제I형 돼지 췌장 엘라스타아제. 호칭 "pPROT101-XXX"를 갖는 벡터가 PRT-102를 코딩함을 주지해야 한다.

[0341] PRT-201: 성숙한 재조합 제I형 인간 췌장 엘라스타아제.

[0342] 프로-PRT-201: 프로펩티드 서열을 함유하는 재조합 인간 제I형 췌장 엘라스타아제의 선구효소 형태.

[0343] 하기 약어는 본원의 섹션 6에서 사용된다:

[0344] BKGY: 완충된 글리세롤 착체 배지

[0345] BKME: 완충된 메탄올-착체 배지

[0346] CHO: 중국 햄스터 난소

[0347] 이. 콜라이: 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)

[0348] ELA-1 : 제I형 췌장 엘라스타아제

[0349] HEK: 인간 배아 신장

[0350] hELA-1: 인간 ELA-1

[0351] HIC: 소수성 상호작용 크로마토그래피

[0352] MBP : 말토즈 결합 단백질

[0353] pELA-1: 돼지 ELA-1

[0354] 피. 파스토리스: 피치아 파스토리스

[0355] PCR: 폴리머라아제 연쇄 반응

[0356] PMSF : 페닐메틸설포닐 플루오라이드

[0357] RP: 역전된 상

[0358] 에스. 세레비지아: 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*)

[0359] SDS-PAGE: 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기이동

[0360] SEC: 크기 배재 크로마토그래피

[0361] USP: 미국 약전(United States Pharmacopeia)

[0362] YPDS: 효모 추출물 펩톤 덱스트로즈 솔비톨 배지

[0363] 6.2 실시예 1: 엘라스타아제 DNA 합성

[0364] 인간 엘라스타아제-1 코딩 서열을 미국 특허 제5,162,205호(Takiguichi et al., 1992)로부터 수득하였다. 몇몇 서열 변화를 일으켜 발현 벡터내로의 클로닝을 촉진시켰다(도 1A). 염기 변화는 유전자 코드의 변화에 속하므로 아미노산 잔기는 변화되지 않았다. 제2 정지 코돈을 고유의 정지 코돈 바로 뒤에 첨가하여 잠재적인 리보솜 판독을 최소화하였다.

[0365] 변형된 코딩 서열을, 블루 헤론 바이오테크놀로지(Blue Heron Biotechnology)(워싱턴주 보셀 소재)에 의해 암겐(Amgen)(캘리포니아주 싸우전드 오크스 소재)으로부터의 인허하에 비-PCR "긴 올리고(long oligo)" 기법을 사용하여 합성하였다. ELA-1.2A(서열 번호 81)란 명칭의 재조합 DNA를 벡터 블루 헤론 pUC, pUC119의 유도체내로 클로닝하고, 생성된 플라스미드를 pPROT1로 칭하였다. pPROT1을 양쪽 가닥에서 서열화하여 정확한 서열을 확인하

였다. 양쪽 가닥 상에 광범위한 중첩부를 갖는 고품질 서열화 데이터는, 전체 서열을 가로질러 정확한 염기 할당을 허용하는데, 이는 각각의 가닥에 대한 하나 이상의 반응을 갖는 최소한의 4개의 서열화 반응에 의해 커버된다.

[0366] 6.3 실시예 2: 이. 콜라이에서 PRT-201의 발현

[0367] 가용성이고 효소적으로 활성인 인간 엘라스타아제를 이. 콜라이에서 수득하기 위한 노력으로 다양한 발현 전략을 시도하였다.

[0368] 이. 콜라이 발현 벡터의 한 세트를 인간 제I형 췌장 엘라스타아제(ELA-1)의 말토즈 결합 단백질(MBP: Maltose Binding Proten)(이는 N-말단 분비 펩티드에 융합됨)의 카복시 말단으로의 골격구조 융합물내에 포함시켰다. 성숙한 인간 ELA-1 및 선구효소 코딩 서열 둘다를 플라스미드 pMAL-p2G(뉴 잉글랜드 바이오랩스 인코포레이티드(New England Biolabs, Inc.), 매사추세츠주 비벌리 소재)의 MBP 코딩 서열로 골격구조내 C-말단 융합물로서 클로닝하여 pPROT3(성숙한 ELA-1) 또는 pPROT5(ELA-1 선구효소)를 산출하였다. pPROT3의 작성을, 우선 PCR 돌연변이생성에 의해 성숙한 인간 ELA-1의 N-말단 발린 코돈에서의 SnaBI 부위 및 성숙한 ELA-1 종결 코돈으로 3'에 위치한 HindIII 부위를 갖는 6.6 kb의 성숙한 인간 ELA-1 코딩 단편을 수득함으로써 수행하였다. 이러한 PCR 돌연변이생성은 ELA-1.2A 코딩 서열(서열 번호 81) 및 2개의 올리고뉴클레오티드 프라이머(5' ATC TAC GTA GTC GGA GGG ACT GAG GCC, 서열 번호 75; 및 5' gtc gac aag ctt ate agt tgg agg cga t, 서열 번호 76)를 포함하는 pPROT1 주형을 사용하였다. 생성된 6.6 kb PCR 단편을 단리하고, SnaBI 및 HindIII으로 분해하고, 후속적으로 XmaI/HindIII 분해된 pMAL-p2G 벡터내로 클로닝하여 pPROT3을 산출하였다. pPROT5의 작성을, ScaI/HindIII 단편을 pPROT1로부터 클로닝하고 SnaBI 및 HindIII에 의해 분해된 pMAL p2G 벡터내로 결찰시킴으로써 수행하였다. 생성된 융합물은 인간 ELA-1 선구효소 코딩 영역의 N-말단을 pPROT5에서 pMAL-p2G의 MBP의 C-말단으로 작동적으로 연결시킨다. 인간 ELA-1 프로단백질의 트립신 분할 도메인은 pPROT5에서 보존된다.

[0369] 이. 콜라이 균주 TB1은 pPROT3 및 pPROT5로 형질전환되었고, 후속적으로 융합 단백질 또는 효소적으로 활성인 인간 ELA-1이 생산될 수 있는지를 결정하기 위해 IPTG로 유도되었다. pPROT3의 경우, 생산된 모든 MBP-ELA-1 융합 단백질은 불용성이었다. 유도된 pPROT3-함유 이. 콜라이의 삼투 충격에 의해 수득된 주변세포질 물질에서 가용성 또는 효소적으로 활성인 MBP-ELA-1 융합 단백질은 검출되지 않았다. pPROT5의 경우, 낮은 수준의 가용성 재조합 MBP-프로ELA-1 단백질은, SDS-PAGE 및 쿠마시 염색의 사용을 통해 유도된 pPROT5-함유 이. 콜라이의 삼투 충격에 의해, 또는 항-MBP 항체의 웨스턴 블롯(Western blot)(뉴 잉글랜드 바이오랩스 인코포레이트드, 매사추세츠주 비벌리 소재) 상에서의 사용에 의해 수득된 주변세포질 물질에서 검출될 수 있다. 가용성 재조합 MBP-프로ELA-1 단백질을 트립신으로 분해하여 MBP 및 성숙한 인간 ELA-1 둘다를 산출하였다. pPROT5의 유도로부터 수득된 성숙한 인간 ELA-1을 후속적으로 SLAP 펩티드 기질에 의해 엘라스타아제 활성에 대해 검정하였다. 엘라스타아제 활성을 pPROT5 주변 세포질 추출물에서 관찰하였다. 이러한 엘라스타아제 효소 활성은 트립신 활성화에 좌우된다(즉, 트립신의 부재시 활성이 관찰되지 않았고, 활성의 양은 트립신 활성화의 기간을 증가시킴으로써 증가된다). 게다가, 엘라스타아제 활성은 pPROT5에 의존적인데, 트립신으로 동시에 처리된 pMAL-p2G 벡터 제어 추출물에서 활성이 관찰되지 않았기 때문이다. 최종적으로, pPROT5 엘라스타아제 활성을 PMSF(공지된 세린 프로테아제 저해제)로 저해하였다.

[0370] 재조합 MBP-프로ELA-1 융합 단백질을 후속적으로 정제하고, 트립신으로 분할하여 효소적으로 활성인 pPROT5-유도체화된 성숙한 인간 ELA-1을 수득하였다. 융합 단백질을 우선 아밀로즈 친화도 크로마토그래피 상에서 정제한 후, 말토즈로 용출시켰다. 이어서 정제된 MBP-프로ELA-1을 고정화된 트립신으로 처리하였다. 트립신 활성화 단계를 수행한 다음, 분할된 MBP-프로ELA-1을 양이온 SP 세파로즈 크로마토그래피로 정제하였다. 그러나, 친화도 정제된 pPROT5-유도된 성숙한 인간 ELA-1에 의한 후속적인 실험은, 단지 매우 제한된 양의 가용성이고 효소적으로 활성인 엘라스타아제가 pPROT5를 함유한 이. 콜라이로부터 수득될 수 있음을 나타내었다. 게다가, 친화도 정제된, pPROT5-유도된 성숙한 인간 ELA-1의 비활성은 매우 낮았고, 0.27~0.38 U/㎎(U=분당 가수분해된 SLAP 기질의 마이크로몰)의 범위였다.

[0371] 이. 콜라이중 가용성이고 효소적으로 활성인 ELA-1을 수득하는 대안의 전략을 또한 진행하였다. 간단히, 이. 콜라이 lacZ 알파 서브유닛의 처음 8개 아미노산 잔기+폴리 연결기 코딩된 잔기의 5개 아미노산을 포함하는 단백질 융합물을 코딩하고, 인간 ELA-1 N-말단 선구효소가 수반되는 pPROT8 벡터를 작성하였다. 이러한 벡터는, pPROT1로부터의 인간 ELA-1 코딩 서열을 함유하는 BamHI/NcoI 단편(즉, ELA-1.2A 서열 함유 벡터; 서열 번호 81)을 BamHI/NcoI으로 분해된 pBlueHeron pUC(블루 헤론 바이오테크놀로지, 미국 워싱턴주 보쎌 소재)내로 결찰시킴으로써 작성되었다.

[0372] 이. 콜라이 균주 EC100(에피센트레 바이오테크놀로지스(EPICENTRE Biotechnologies), 위스콘신주 매디슨 소재)을 pPROT8로 형질전환시키고, 후속적으로 IPTG로 유도하여 융합 단백질 또는 효소적으로 활성인 인간 ELA-1이 생산될 수 있는지의 여부를 결정하였다. EC100 형질전환된 세포의 경우에, 생산된 모든 pPROT8 유도된 LacZ-프로ELA-1 융합 단백질은 불용성이었다(즉, 봉입체에서 발견됨). *trxB* 및 *gor* 유전자에서 돌연변이를 함유한 이. 콜라이 균주(더 오리가미(the Origami)(등록상표) 균주, 타카라 미루스 바이오 인코포레이티드(Takara Mirus Bio, Inc.), 위스콘신주 매디슨 소재)를 후속적으로 pPROT8로 형질전환시켰는데, 이들 코딩 서열에서 돌연변이를 갖는 이. 콜라이가 가용성이고 효소적으로 활성인 재조합 단백질의 회수를 조장하는 것으로 공지되어 있기 때문이다. *trxB/gor* 이. 콜라이 균주에서 몇몇 가용성 pPROT8 유도된 LacZ-프로ELA-1 융합 단백질이 IPTG에 의한 유도시 회수될지라도, 트립신에 의해 효소적으로 활성인 인간 ELA-1으로 전환될 수 없다.

[0373] 6.4 **실시예 3: 포유동물 세포주에서 PRT-201의 발현**

[0374] 가용성이고 효소적으로 활성인 인간 제I형 췌장 엘라스타아제(ELA-1)를 포유동물 세포주에서 수득하기 위해 몇몇 발현 전략을 시도하였다. CMV 프로모터를 함유한 고 복사 포유동물 발현 벡터 pcDNA3.1(인비트로겐)을 2종의 인간 ELA-1 엘라스타아제 발현 벡터, pPROT30 및 pPROT31에 대한 주쇄로서 사용하였다. pPROT30을 작성하기 위해, 인간 ELA-1 선구효소 서열을 PCR로 증폭시키고, 정방향 PCR 프라이머내로 혼입된 돼지 췌장 엘라스타아제 신호 서열에 융합시켰다. PCR 프라이머내로 혼입된 제한 부위를 사용하여, PCR 생성물을 분해하고 pcDNA3.1 벡터에서 상응하는 제한 부위를 사용하여 결찰시켰다. 성숙한 효소의 직접적인 발현을 위하여 성숙한 인간 ELA-1 코딩 서열을 선구효소 코딩 서열 대신에 사용함을 제외하고, pPROT31을 유사 방식으로 작성하였다. 이. 콜라이를 결찰 반응으로 형질전환시키고, 클론을 미니프렙(miniprep) 스크리닝에 대해 선택하였다. 각각의 발현 벡터를 위한 하나의 클론을 정확한 삽입을 위해 예상된 제한 분해 패턴에 기초하여 선택하였다. 플라스미드 DNA를 각각의 클론에 대해 제조하고, 발현 벡터 코딩 서열을 DNA 서열화에 의해 확인하였다.

[0375] 포유동물 세포주 CHO, COS, HEK293 및 HEK293T를 일시적으로 pPROT30 및 pPROT31로 별도로 형질감염시켰다. 수일 후, 세포 배양 상청액을 수거하고, 인간 ELA-1 프로단백질(pPROT30) 또는 성숙한 단백질(pPROT31) 발현에 대해 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 항-돼지 췌장 엘라스타아제 다중클론 항체는 pPROT30 상청액중 인간 ELA-1 프로단백질 및 pPROT31 상청액중 성숙한 인간 ELA-1 단백질에 대한 예상된 분자량의 밴드와 교차 반응하였다.

[0376] pPROT30 및 pPROT31 상청액을 엘라스타아제 활성에 대해 SLAP 검정에 의해 분석하였다. pPROT30의 경우, 상청액을 우선 트립신으로 처리하여 선구효소를 성숙한 PRT-201로 전환시켰다. 어떠한 엘라스타아제 활성도 SLAP 검정을 사용하여 벡터에 대해 임의의 상청액에서 검출되지 않았다.

[0377] 6.5 **실시예 4: 피. 파스토리스에서 트립신 활성화된 PRT-201의 발현**

[0378] 피. 파스토리스 분비된 발현을 위한 벡터, PV-1을 블루 헤론에 의해 합성하고 사용하여 우선 야생형 인간 ELA-1 코딩 서열을 클로닝하였다. 재조합 단백질의 단일 클로닝, 선택 및 고수준 발현을 위해 PV-1 벡터를 고안하였다. 벡터는 다중 복사 통합부의 직접적 선택을 위하여 제오신(등록상표)을 함유한다. 엘라스타아제 프로펩티드의 N-말단의 효모 분비 신호, 프로펩티드 및 이격자 서열을 포함하는 효모 α-메이팅 유형 서열로의 융합물(도 1B에 도시됨)은 배양 배지에서 발현된 단백질의 분비를 허용한다. 분비된 엘라스타아제 프로단백질은 정제로의 실질적인 제1 단계인 세포 펠릿으로부터 쉽게 분리될 수 있다. 부가적으로, 트립신 분할 부위를 함유하는 인간 ELA-1의 선구효소 형태를, 재조합 효소를 발현하는 세포에 대한 독성 또는 단백질 미스폴딩을 유도할 수 있는 성숙한 활성화된 효소를 직접 발현하는 것을 방지하도록 발현을 위해 선택하였다.

[0379] ELA-1 선구효소의 발현을 유도하는 발현 구성물 pPROT24-V의 클로닝을 다음과 같이 달성하였다. 인간 ELA-1 코딩 영역(서열 번호 81)을 블루 헤론 pUC ELA-1로부터 PCR(익스팬드 하이 피델러티 피시알 시스템(Expand High Fidelity PCR System), 인디애나주 인디애나폴리스 로쉐 소재)에 의해 증폭시켰다. 2OF 정방향 프라이머는 XhoI 부위(5'-ggctcgagaaaagagaggctgaagctactcaggaccttccggaaaccaatgcccgg-3; 서열 번호 35)를 혼입하였다. 24R 프라이머는 SacII 부위(5'-gggccgcggcttatcagttggaggcgatgacat-3'; 서열 번호 36)를 혼입하였다. 생성된 PCR 생성물을 겔-정제하고, pCR2.1-TOPO(인비트로겐)내로 클로닝하였다. ELA-1 코딩 서열을 XhoI 및 SacII에 의해 단리하고, 겔 정제하고, 이들 부위에서 PV-1 벡터내로 클로닝하여 pPROT24-V를 산출하였다(도 3).

[0380] pPROT24-V 결찰된 생성물을 이. 콜라이 균주 TOP10에서 증폭시켰다. 세포 혼합물을 25 마이크로그램/㎖의 제오신으로 보충된 저염 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. DNA 플라스미드를 제조하고(퀴아겐(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아 소재) 인간 ELA-1 삽입부를 제한 분해에 의해 확인하였다. 정제된 맥시프렙(maxiprep) DNA의 두 가닥을 다중 중첩 반응에 의해 서열화함으로써 pPROT24 코딩 서열을 증명하였다. 고 품질 서열화 데이터는 정확한

염기 할당을 가능하게 하고 정확한 코딩 서열을 확인하였다. pPROT24-V/TOP10의 글리세롤 스톡(stock)을 제조하고 -80℃에서 저장하였다.

[0381] 미국농무부(USDA: United States Department of Agriculture)(미국 일리노이주 페오리아 소재)로부터 수득된 야생형 NRRL Y-11430 피. 파스토리스 균주를 형질전환에 사용하였다. pPROT24-V로부터의 플라스미드 DNA를 SacI로 선형화시키고, 아가로즈 겔 상에서 반응물의 소 분취량을 이동시킴으로써 완전한 분해를 확인하였다. 전기천공을 사용하여 피. 파스토리스를 pPROT24-V 플라스미드 DNA로 형질전환시켰다. 세포 혼합물을 100 마이크로그램/㎖의 제오신이 함유된 YPDS 플레이트 상으로 플레이팅하였다. 3일 후, 콜로니가 형성하기 시작하였고, 신선한 플레이트 상에서 다시 스트리킹(streaking)하기 위해 수일 이상에 걸쳐 선택하였다.

[0382] 대체적으로, 내약물성 형질전환체를 1 ℓ 들이 배플 플라스크에서 발현에 대해 스크리닝하였다. 200 ㎖의 BKGY 배지에 접종하기 위해 단일 콜로니를 사용하였다. BKGY 용액의 조성은 다음과 같다: 0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 5.0)중 10 g/ℓ의 글리세롤, 황산암모늄이 존재하고 아미노산이 부재하는 13.4 g/ℓ의 효모 질소 베이스(인비트로겐), 20 g/ℓ의 대두 펩톤, 10 g/ℓ의 효모 추출물, 0.4 mg/ℓ의 비오틴. 배양액을 2일 동안 28℃에서 275 rpm하에 진탕시키면서 성장시켰다. 배양액을 10분 동안 실온에서 650xg하에 원심분리하여 펠릿화하였다. 세포 펠릿을 BKME 유도 배지(pH 5.0)에 의해, 1 g 습윤 세포 대 5 ㎖ 유도 배지의 비율로 펠릿을 재현탁하였다. 50 ㎖의 세포 현탁액을 500 ㎖ 들이 비-배플 플라스크에 넣고, 1:10 비율의 세포 현탁액 대 플라스크 부피를 수득하였다. 세포를 22℃에서 1~3일 동안 275 rpm 하에 진탕시키면서 배양처리하였다. 유도 배지중의 메탄올을 유도 기간에 걸쳐 매일 2회 0.5%의 최종 농도로 보충하였다.

[0383] 발현을 스크리닝하기 위해, 1 ㎖의 분취량을 취하고, 1.5 ㎖의 마이크로퓨즈(microfuge) 관으로 옮기고, 마이크로원심분리기에서 20,000 x g하에 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 신선한 관으로 옮기고 -80℃에서 저장하였다. SDS-PAGE 분석을 위해, 상청액 분취량을 해동하고, 환원제 베타-머캅토에탄올로 5% 부피로 보충된 4X 라엠리 완충액과 혼합하였다. 샘플을 5분 동안 비등시키고, 온화하게 원심분리하고, 표준 전기이동 시스템(Criterion electrophoresis system)(바이오-래드: Bio-Rad)에서 8~16% 구배의 트리스-HCl 예비-캐스트(pre-cast) 겔 상으로 적재하였다. 전기이동 이후, 겔을 쿠마시로 염색하고 인간 ELA-1 선구효소 발현에 대해 분석하였다. 클론 201-24-266-VU를 추가의 평가를 위한 고 수율 클론으로서 선택하였다. 201-24-266-VU 글리세롤 스톡으로 구성된 전개 세포 은행(cell bank)을 제조하고 -80℃에서 저장하였다.

[0384] 클론 201-24-266-VU를 사용하여 인간 ELA-1 선구효소를 규모를 증가시켜 생산하기 위해, 일반적으로 하기 기재된 방법을 따르는 다중 생산 운행을 수행하였다. 적용가능한 경우, 이 방법에서 운행 대 운행 편차가 주지된다.

[0385] 세포 배양을 위해, 500 ㎖의 BKGY 성장 배지가 함유된 일련의 2 ℓ 들이 배플 진탕 플라스크(전형적으로 20~40개 플라스크)에 250 마이크로리터의 해동된 201-24-266-VU 글리세롤 스톡을 접종하였다. 배양물을 28℃에서 2일 동안 진탕 배양기에서 250~300 rpm 하에 성장시켰다. 2일 후, 세포를 원심분리에 의해 펠릿화하고, 상청액을 폐기하였다. 세포를 BKME 유도 배지(pH 5.0)에 1 g 중량 세포 대 5 ㎖ 배지의 비율로 재현탁하였다. 200~400 ㎖ 부피의 세포 현탁액을 2 ℓ 들이 비-배플 플라스크에 넣고, 3일 동안 진탕 배양기(250~300 rpm)에서 22℃에서 배양하였다. 배지중 메탄올을 유도 기간에 걸쳐 매일 2회 0.5% 부피로 보충하였다. 유도의 종료시, 진탕 플라스크 배양액을 원심분리하여 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 제거하고 즉시 실온에서 0.22 um 폴리에테르설폰 막을 통해 1 ℓ 진공 여과 단위를 사용하여 여과하여 임의의 잔여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 여액을 2~8℃에서 1.5 개월 이하 동안 저장하였다. HIC-HPLC 분석에 기초하여, 투명해진 상청액에서 클론 프로-PRT-201-24-266-VU로부터의 인간 ELA-1 선구효소의 수율은 전형적으로 200~250 mg/ℓ였다.

[0386] 상청액으로부터 프로-PRT-201-24-266-VU의 포획을 다음과 같이 실행하였다. 우선, 진탕 플라스크 배양액의 다수회의 라운드(전형적으로 4~10 라운드)로부터의 상청액을 합하고(전형적으로 총 8~25 ℓ), 물로 8배 희석하고, 1 M HCl에 의해 pH 5.0으로 조정하였다. 이어서 희석된 상청액을 평형화된 2 ℓ 층 부피의 매크로-프렙 하이 에스 이온 교환 포획 칼럼상으로 2~8℃에서 100 ㎖/분(선형 유동 속도 76 ㎝/시간)의 속도로 적재하였다. 크로마토그래피 프로그램은 하기의 단계로 구성되었다: 1. 칼럼을 10 ℓ(5 칼럼 부피[CV])의 완충액 A(20 mM 시트르산 나트륨, pH 5.0)에 의해 100 ㎖/분(76 ㎝/시간)으로 세척한다; 2. 칼럼을 4 ℓ(2 CV)의, 90% 완충액 A 및 10% 완충액 B(500 mM 염화 나트륨; 20 mM 시트르산 나트륨, pH 5.0)의 혼합물에 의해 50 mM 염화 나트륨; 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)의 최종 완충액 조성을 위해 100 ㎖/분(76 ㎝/시간)으로 세척한다; 3. 칼럼을 6 ℓ(3 CV)의, 80% 완충액 A 및 20% 완충액 B의 혼합물에 의해 100 mM 염화 나트륨; 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)의 최종 완충액 조성을 위해 100 ㎖/분(76 ㎝/시간)으로 세척한다; 4. 칼럼을 75% 완충액 A 및 25% 완충액 B에서 출발하여 68% 완충액 A 및 32% 완충액 B가 되도록 6 ℓ(3 CV)의 선형 구배에 의해 100 ㎖/분(153 ㎝/시간)으로

세척한다; 5. 68% 완충액 A 및 32% 완충액 B에서 출발하여 0% 완충액 A 및 100% 완충액 B가 되도록 30 ℓ(15 CV)의 선형 구배에 의해 100 mℓ/분(76 ㎝/시간)으로 용출한다. 용출물을 각각 500~1000 mℓ의 분별물로 수거한다.

[0387] 전형적으로, 2개의 우세한 단백질 종을 쿠마시 염색이 수반되는 SDS-PAGE로 관찰하였다: 약 320 mM의 염화 나트륨으로 전형적으로 용출되는 후속적인 LC/MS 분석에 의해 결정될 경우, 글리코실화된 인간 ELA-1 선구효소 및 비글리코실화된 인간 ELA-1 선구효소(도 4에 도시됨). 몇몇 생산 운행시, 인간 ELA-1 선구효소에 비해 약간 작은 단백질이 소수의 종으로서 관찰되었다. 이들 분별물을 후속적으로 LC/MS 분석한 결과, 대부분의 단백질은 전장 선구효소가 아니었지만, 그 대신 N-말단에서 수 개의 아미노산이 결여되었다. 이들 N-말단 변형체를 정제하고, 엘라스타아제 활성 분석을 수행하여서, 이들이 전장 PRT-201에 비해 낮은 엘라스타아제 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. N-말단 변형체는 세포 배양 및 포획 크로마토그래피 조작 동안, 및 분자내 반응을 통한 그 자체의 분할 또는 분자간 반응을 통한 또 다른 인간 ELA-1 선구효소 분자의 분할 동안 낮은 수준의 엘라스타아제 활성을 나타내는 인간 ELA-1 선구효소로부터 야기될 수 있었다. 이러한 조작 동안 차선의 분할 조건은 높은 수준으로 선구효소의 비정확한 분할(때때로 자발적 또는 비제어된 전환으로 지칭됨)을 이끌어 내어, 본래의 전장 PRT-201에 비해 대부분 N-말단 변형체를 생성한다.

[0388] SDS-PAGE 결과의 조사 이후, 분별물의 하위집합을 모아서 추가의 처리를 위해 정제된 비글리코실화된 프로-PRT-201을 수득하였다. 글리코실화된 선구효소 또는 전장 PRT-201 및/또는 N-말단 변형체(이는 SDS-PAGE 상에서 공동 이동됨)를 함유하는 분별물을 전형적으로 모음(pooling)에서 배제하였다. 모아진 프로-PRT-201을, 선구효소로부터 성숙한 효소로 전환되기 이전에, 전형적으로 5 ℓ 들이 플라스틱 비이커에서 2~8℃하에 수시간~하룻밤 저장하였다.

[0389] 프로-PRT-201의 성숙한 PRT-201로의 고정화된 트립신에 의한 전환은 다음과 같이 실행되었다. 모아진 프로-PRT-201 분별물을 20 mM 인산 나트륨(pH 5.0)에서 하룻밤 2~8℃ 하에 투석하였다. 이 단계는 시트레이트를 제거하여, 트립신을 저해한다. 투석 후, 프로-PRT-201을 20 mM 인산 나트륨(pH 5.0)으로 예비평형화된 아가로즈 비이드에 고정화된 재조합 트립신(트립지언)의 칼럼 상으로 통과시켰다. 전형적으로, 프로-PRT-201과 고정화된 트립지언 사이의 접촉 시간은 3.5~5분이다. 생성된 전환후 물질을 SDS-PAGE로 분석하여 전환을 확인하고 후속적으로 매크로-프렙 하이 에스 폴리쉬 칼럼 상으로 적재하였다. 칼럼을 5 CV의 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0); 2 CV의 20 mM 시트르산 나트륨, 50 mM 염화 나트륨(pH 5.0); 및 3 CV의 20 mM 시트르산 나트륨, 100 mM 염화 나트륨(pH 5.0)으로 순차적으로 세척하였다. 추가로 칼럼을 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)중 125 mM 염화 나트륨으로부터 160 mM 염화 나트륨으로의 선형 구배에 의해 세척하였다. PRT-201을 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)중 165 mM~500 mM 염화 나트륨의 선형 구배로 용출하고 분별물을 수거하였다. 분별물을 단백질에 대해 쿠마시 염색이 수반되는 SDS-PAGE로 분석하고, 엘라스타아제 활성에 대해 SLAP 검정으로 분석하였다. 전형적으로, 최고의 비활성을 갖는 분별물의 비활성의 90% 이상의 비활성을 갖는 분별물을 모았다. 후속적인 LC/MS 분석에서, 보다 낮은 비활성을 갖는 늦게 용출된 분별물이 PRT-201 N-말단 변형체가 풍부한 것으로 밝혀졌다.

[0390] 높은 비활성을 갖는 모아진 분별물을 0.1X PBS(13.7 mM 염화 나트륨, 1 mM 인산 나트륨, 0.27 mM 인산 칼륨)로 구성된 제형 완충액으로 pH 5.0에서 투석여과하였다. PRT-201을 1 mg/mℓ로 농축한 후, pH를 7.4로 조정하였다. 이어서 용액을 엘라스토머 마개가 있는 유리 혈청 바이알내로 분취량으로 넣고, 동결건조하였다. 동결건조를 전형적으로 -30~-50℃의 1차 건조 사이클로, 및 -15℃에서의 2차 건조 사이클로 수행하였다. 동결건조 후, 바이알을 진공하에 막고, 알루미늄 씨일(seal)로 권축(crimp)시켰다. 이어서 바이알을 전형적으로 2~8℃ 또는 -80℃에서 저장하였다.

[0391] 바이알중의 동결건조된 PRT-201의 안정성을 평가하기 위해, 멸균 GMP 약물 제품으로 제작된 2개의 로트(lot)를 안정성 프로그램 상에 두었다. 안정성 프로그램은 -15℃에서 약물 제품의 안정성, 및 하기 안정성 지시 분석 방법에 의한 시험을 위한 바이알의 하위집합의 주기적인 제거로 구성된다(세부사항은 괄호안에 있다): 동결건조된 물질의 외관(백색~회백색 분말), 재구성 후의 외관(입자가 없는 투명한 무색 용액), SLAP 검정에 의한 비활성(25~45 U/mg), RP-HPLC에 의한 순도(총 순도: 93% 이상; 개별 불순물: 2% 이하), 환원된 SDS-PAGE에 의한 순도(93% 이상), 비-환원된 SDS-PAGE에 의한 순도(93% 이상), 미립자 물질 주사(USP에 따름), SEC-HPLC에 의한 응집(3% 이하), 바이알당 함량(4.5~5.5 mg), pH(6.5~8.5), 습도(5%를 초과하지 않음) 및 멸균성(USP에 따름). 이제까지, 로트 둘다는 시험된 모든 시점에서 지시된 세부사항을 충족하였다(로트 C0807117은 12개월 동안, 로트 C1007132는 9개월 동안). 이러한 결과로부터, PRT-201이 -15℃에서 바이알중에 동결건조되어 저장될 경우 12개월 이상 동안 안정함을 알 수 있다.

[0392] 프로-PRT-201의 포획 크로마토그래피 및 전환된 PRT-201의 폴리쉬 크로마토그래피 동안 시트르산 나트륨(pH 5.0)의 사용은, 시트르산 나트륨이 정제된 PRT-201의 엘라스타아제 활성을 저해하고, 이에 따라 또한 처리 조작 동안 프로-PRT-201 및 PRT-201의 엘라스타아제 활성을 저해할 수도 있을 것임을 보여주는 데이터에 근거하였다. 이러한 저해는 프로-PRT-201의 N-말단 변형체로의 자발적 전환을 최소화할 수 있고, PRT-201의 자가 분해를 최소화할 수 있다. SLAP 검정 완충액이 115 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)을 함유하는 한 실험에서, PRT-201의 비활성은 91% 저해되었다.

[0393] 때때로, 프로-PRT-201 포획 칼럼으로부터 용출된 물질은 상기 기재된 바와 같이 트립신에 의해 전환되지 않았지만, 그 대신 다양한 단백질 종이 풍부한 제조물을 수득하기 위해 사용되었다. 예를 들면, 일차적으로 글리코실화된 프로-PRT-201, 비글리코실화된 프로-PRT-201 또는 자발적 전환으로부터 야기된 단백질을 함유하는 분별물의 모음은 포획 칼럼 용출물로부터 제조되었다. 전형적으로, 이들 분별물 모음을 10 mM 인산 나트륨(pH 5.0)으로 투석여과하고, 동결건조하고, -80℃에서 저장하였다.

[0394] pH 및 온도가 시간에 따른 정제된 프로-PRT-201의 안정성에 미치는 영향을 결정하기 위해 연구를 수행하였다. 동결건조된 프로-PRT-201을 10 mM 인산 나트륨에 3.0~8.4 범위의 pH에서 재구성하고, 4℃ 또는 25℃에서 7일 동안 배양처리하였다. 7일 후, pH 4.0~8.0 및 25℃의 조건하에서의 프로-PRT-201 샘플은 성숙한 PRT-201가 풍부하였고, 이는 SDS-PAGE 및 쿠마시 염색에 의해 알 수 있듯이 pH의 증가에 따라 증가하였다. pH 8.4 및 25℃의 조건하에, 프로-PRT-201의 성숙한 PRT-201로의 완전한 전환이 관찰되었다. 4℃에서의 샘플(pH 4.0으로부터 8.4까지)은 거의 전환되지 않았다. pH 3.0에서는, 4℃ 및 25℃에서 전환이 관찰되지 않았다. 문헌[Hartley and Shotton, 1971, Pancreatic Elastase. Enzymes 3:323-373]에, 돼지 췌장 엘라스타아제가 3.0 미만의 pH에서 오랫동안 저장된 후에 비가역적으로 실활된다고 보고되어 있다. 따라서, 이러한 연구의 결과에 근거하여 PRT-201을 비가역적으로 실활시키는 것을 방지하기 위해, 정제된 프로-PRT-201의 전환을 최소화하는 유용한 조건은 4℃ 및 pH 3.0~4.0에서의 저장이다.

[0395] **6.6 실시예 5: 피. 파스토리스에서 자가 활성화된 PRT-201의 발현**

[0396] 자가 활성화할 수 있어서, 트립신 활성화가 필요없는 변형 선구효소를 수득하기 위해, 다양한 엘라스타아제 분할 도메인 변형 벡터를 작성하고, 소규모 배양 및 전환 실험에서 분석하였다. pPROT24-V 벡터 및 후속적인 유도체 벡터의 부위-유도된 PCR 돌연변이생성에 의해 변형 벡터를 생성하였다. Pfu 터보 DNA 폴리머라아제(스트라타진)를 사용하여 부위-유도된 돌연변이생성을 수행하였다. 이. 콜라이 XL10-Gold 균주를 생성된 플라스미드로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포 혼합물을 25 마이크로그램/㎖의 제오신으로 보충된 저염 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 내약물성 클론을 따고, 플라스미드 DNA를 제조하였다(퀴아겐, 캘리포니아주 발렌시아 소재). 다수의 중첩 반응을 갖는 프로펩티드 영역중의 플라스미드 DNA의 양쪽 가닥을 서열화함으로써 예상되는 코돈 변화에 대해 클론을 확인하였다. 피. 파스토리스를 변형 벡터로 형질전환시키고, 클론을 선행 실시예에 기재된 바와 같이 선택하였다.

[0397] 생성된 엘라스타아제 분할 도메인 변형체가 하기 표 4에 요약되어 있다.

[0398] [표 4]

[0399] 엘라스타아제 분할 도메인 변형체

					분할된 결합			
프로펩티드 서열 명칭	P5	P4	P3	P2	P1	P' 1	P' 2	P' 3
24	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Val	Val	Gly
40	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Gly
41	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
42	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Val	Gly
43	Glu	Thr	Asn	Ala	Pro	Val	Val	Gly
44	Glu	Thr	Gly	Ala	Gly	Ile	Val	Gly
45	Glu	Thr	Val	Pro	Gly	Val	Val	Gly
46	Glu	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	Val	Gly
47	Glu	Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Val	Gly
48	Glu	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
49	Glu	Thr	Asn	His	Ala	Val	Val	Gly
52	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	Val	Val	Gly
53	Glu	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
54	Glu	His	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
55	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
56	Pro	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
57	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
58	His	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
59	Glu	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
60	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
61	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
62	His	Thr	Gly	Pro	Ala	Val	Val	Gly
63	His	Thr	Lys	Pro	Ala	Val	Val	Gly

[0400]

[0401] 상기 표 4의 경우, "프로펩티드 서열 명칭"의 제1 세로단 목록은 지시된 엘라스타아제 분할 도메인의 서열 번호에 상응한다. 이와 같이, 24는 서열 번호 24의 야생형 트립신 분할 도메인에 상응한다. 숫자 40~49 및 52~63은 각각 서열 번호 40~49, 및 52~63의 변형 엘라스타아제 분할 도메인에 상응한다.

[0402] 변형 클론을 배양하기 위해, 선행 실시예에 기재된 트립신 활성화된 201-24-266-VU 클론을 개발하기 위한 진탕 플라스크 배양 조건은 일반적으로 다음과 같다. 진탕 플라스크 상청액내로 분비되는 변형 프로단백질을 성숙한 PRT-201로 전환시키는 몇몇 방법을 시험하였다. 제1 전환 전략은, 변형 선구효소를 크로마토그래피로 정제한 다음 특정 전환 완충액에서 제어된 분할을 수행함으로 구성되었다. 변형 프로단백질에서의 아미노산 변형이 야생형 선구효소에 비해 이론적 등전점에서 단지 약간의 변화를 일으키므로, 선행 실시예에 기재된 바와 같이 양이온 교환 크로마토그래피를 일반적으로 수행하였다. 변형 클론 배양액으로부터의 상청액을, 일반적으로 전술된 실시예에 기재된 바와 같이 물로 희석하거나 농축함으로써 크로마토그래피를 위해 제조하고, 이후 칼럼 적재 완충액으로 접선방향 유동 여과를 사용하여 상청액을 투석여과하였다. 크로마토그래피 정제 후, 용출된 분별물을 쿠마시 염색이 수반되는 SDS-PAGE로 분석하였다. 겔 분석은 출발 상청액에 비하여 분별물중 프로단백질로 더 많은 양의 성숙한 단백질이 전환되었음을 입증하였고, 이는 상당량의 자발적 프로단백질 전환이 초래되었음을 지시한다. 후속적인 정제시, 자발적으로 전환된 단백질을 LC/MS로 결정한 결과 주로 N-말단 변형체로 구성되었고, 이는 SLAP 검정시 엘라스타아제 활성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 나타났다.

[0403] 제2 전환 전략은 배양 상청액으로부터 정제하기 이전에 변형 프로단백질을 전환시키고, 이어서 성숙한 효소를 크로마토그래피로 정제함으로 구성된다. 이러한 전환 전략은 우선 소규모 검정에서 시험하고, 후속적으로 보다 큰 전환 부피를 수용하도록 규모를 증가시킨다. 소규모 전환을 위해, 변형 클론 배양액으로부터의 투명한 상청액을 원심분리에 의해 2~8℃에서 초원심분리 여과 장치에서 전형적으로 5배 농축하였다. 농축 후, 투석유물(retentate)을 전형적으로 8.0~9.0의 pH에서 100 mM의 트리스-HCl의 최종 농도로 트리스 완충액에 의해 5배 희석하였다. 샘플을 실온에서 락킹 플랫폼(rocking platform) 상에서 배양처리하였다. 엘라스타아제 활성을 SLAP 검정으로, 전형적으로 활성 반응 속도가 고평부(plateau)에 이를때까지 모니터링하였다. 몇몇 경우에, 반응 속도는 매우 느리게 증가하여 SLAP 모니터링이 고평부에 도달되기 이전에 중단되었다. 전환된 샘플을 단백질 종(예를 들어, 프로단백질 및 PRT-201/N-말단 변형체)에 대해 SDS-PAGE로 분석하였다. 이러한 전환 전략의 규모를 증가시키기 위해, 변형 프로단백질 함유 상청액을 접선방향 유동 여과 후 100 mM 트리스-HCl(pH 6.0~9.0)으로 투석여과하여 10배 농축하였다. 전환 반응의 진행을 시간에 걸쳐 HIC-HPLC 분석으로 모니터링하였고, 여기서 프로단백질, PRT-201, 및 N-말단 변형체 종을 정량화하였다. 투석여과 완충액의 pH가 8.0~9.0인 경우, 일반적으로 전환율이 보다 높다.

[0404] 표 5에 열거된 엘라스타아제 프로단백질은 기재된 바와 같이 피. 파스토리스에서 발현되었고, 상기 제2 전환 전략에서 기재된 바와 같이 소규모 전환 검정에서 자가 전환을 일으키는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 이러한 조사의 결과는 하기 표 5에 요약되어 있다:

[0405] [표 5]

[0406] 피. 파스토리스에서의 엘라스타아제 프로단백질의 발현 결과

프로콥티드서열 명칭	진탕 플라스크 수율	진탕 플라스크 안정성	전환율	% N-말단 변형체	처리에 사용된 트립신
24	높음	높음	빠름	20%	사용
40	없음	적용 불가	적용 불가	적용 불가	비사용
41	중간	높음	느림	시험되지 않음	비사용
42	낮음	낮음	중간	25%	비사용
43	중간	높음	느림	시험되지 않음	비사용
44	중간-높음	높음	전환이 검출되지 않음	적용 불가	비사용
45	중간	높음	전환이 검출되지 않음	적용 불가	비사용
46	중간	높음	전환이 검출되지 않음	적용 불가	비사용
47	중간	높음	전환이 검출되지 않음	적용 불가	비사용
48	중간	낮음	빠름	15%	비사용
49	높음	높음	느림	35%	비사용
52	중간	낮음	빠름	시험되지 않음	비사용
53	중간	중간	빠름	25%	비사용
54	중간	낮음	빠름	시험되지 않음	비사용
55	중간-높음	중간	빠름	15%	비사용
56	낮음	낮음	시험되지 않음	시험되지 않음	비사용
57	낮음	낮음	시험되지 않음	시험되지 않음	비사용
58	중간-높음	중간	느림	시험되지 않음	비사용
59	중간-높음	중간	느림	시험되지 않음	비사용
60	중간-높음	높음	느림	시험되지 않음	비사용
61	없음	적용 불가	적용 불가	적용 불가	비사용
62	높음	높음	전환이 검출되지 않음	적용 불가	비사용
63	없음	적용 불가	적용 불가	적용 불가	비사용

[0407]

[0408] 상기 표 5에서, "프로콥티드 서열 명칭"의 제1 세로단 목록은 지시된 엘라스타아제 분할 도메인에 대한 서열 번호에 상응한다. 이와 같이, 24는 서열 번호 24의 야생형 트립신 활성화된 엘라스타아제 분할 도메인에 상응한다. 숫자 40~49, 및 52~63은 각각 서열 번호 40~49, 및 52~63의 변형 엘라스타아제 분할 도메인에 상응한다. "진탕 플라스크 수율"로 표지된 세로단은 SDS-PAGE 분석에 의해 결정될 경우 3일의 유도 기간에 걸쳐 배양 상청액중의 상응하는 프로단백질의 양에 상응한다. "진탕 플라스크 안정성"으로 표지된 세로단은, SDS-PAGE 분석에서 보여지는 PRT-201/N-말단 변형체의 양으로 결정될 경우, 3일의 유도 기간에 걸쳐 진탕 플라스크 배양 배지의 상청액중의 상응하는 프로단백질의 안정성에 상응한다. "전환율"로 표지된 세로단은, 최대 SLAP 반응 속도를 달성하기 위한 시간으로 지시될 경우, 프로단백질의 PRT-201로의 상대 전환율에 상응한다(빠름: 60분 미만; 중간: 60~120분; 및 느림: 120분 초과). 변형 프로단백질의 전환 시간 경과를 상기 기재된 소규모 전환 검정을 사용하여 결정하고, 고정화된 트립신을 사용하여 활성화함으로써 결정된 24개 프로단백질의 전환 시간 과정과 비교하였다. "% N-말단 변형체" 표지된 세로단은 성숙한 엘라스타아제 단백질의 N-말단 변형체(즉, P1 이외의 임의의 부위로의 C-말단 결합에서의 분할을 포함하는 변형체)를 포함하는 전환된 단백질의 백분율을 지칭한다. 표 5에 사용된 상대 등급 시스템을 예시하기 위해, 자가 활성화된 변형체의 하위집합에 대한 SDS-PAGE, 전환율 및 N-말단 변형체 분석의 예가 도 5에 제시되어 있다.

[0409] 다양한 변형체에 대한 분석 결과, 서열 번호 48 또는 서열 번호 55 변형 엘라스타아제 분할 도메인을 포함하는 엘라스타아제 프로단백질이 전환시 중간~고 진탕 플라스크 수율 및 변형체의 낮은 백분율을 비롯하여 탁월한 품질을 갖는 자가 활성화된 엘라스타아제를 제공하는 것으로 나타났다. 서열 번호 48 및 서열 번호 55 변형 엘라스타아제 분할 도메인을 포함하는 엘라스타아제 프로단백질에 대한 추가의 분석 결과, 상응하는 프로단백질(즉, 각각 서열 번호 64 및 서열 번호 69의 엘라스타아제 선구효소)의 자가 활성화는 P'2 잔기로의 C-말단 펩티

드 결합에서의 분할을 갖는 단지 1부류의 N-말단 변형체를 생산하는 것으로 나타났다. 엘라스타아제 프로단백질의 추가의 분석 결과, 서열 번호 55 변형 엘라스타아제 분할 도메인을 포함하는 프로단백질이 서열 번호 48 변형 엘라스타아제 분할 도메인을 포함하는 프로단백질에 비해 더 안정한 것으로 나타났다.

[0410] 정제된 프로-PRT-201의 제어된 분할을 위한 조건을 최적화하기 위한 초기 실험을 42개의 프로펩티드 서열(서열 번호 6)을 갖는 프로단백질을 사용하여 수행하였다. 상기 정제된 프로단백질을 pH(7.7~8.9), 완충액 조성(0.4~10 mM 시트르산 나트륨), 단백질 농도(0.14~0.23 ㎎/㎖), 및 반응 시간(5~24 시간)을 비롯한 조건의 기반하에 전환시켰다. 전환 기간의 종료시, 포름산의 첨가에 의해 pH를 3.0으로 감소시킴으로써 반응을 중지시켰다. 각각의 반응에서 단백질 종의 상대량을 질량 분광계로 결정하였다. 이들 결과에 기초하여, N-말단 변형체의 최저 백분율을 일으키는 전환 조건은 8.3의 pH, 100 mM 트리스 및 1 mM 미만의 시트르산 나트륨의 완충액 조성, 0.2 ㎎/㎖의 단백질 농도, 5~24시간의 반응 시간을 포함한다. 이러한 연구에서, 단지 반응 종료점을 분석하였다. 전환 품질에 대한 실시간 데이터는 수득되지 않았고, 최종 결과는 N-말단 변형체의 초기 생산 및 분해된 이들 변형체에 대한 실질적인 시간 양 둘다를 반영하였다. 후속적으로, HIC-HPLC 검정을 진행하여 전환 반응의 실시간 모니터링을 가능하게 하였다. 추가의 전환 최적화 연구, 예컨대 실시간 HIC-HPLC 모니터링을 이용한 연구가 실시예 6에 기재되어 있다.

[0411] 6.7 **실시예 6: 다중 복사 변형 벡터를 사용하는 피. 파스토리스에서의 자가** 활성화된 PRT-201의 발현

[0412] 피. 파스토리스에서 재조합 유전자의 다중 복사 통합을 이용하여 원하는 단백질의 발현을 증가시켰다(예를 들어, 문헌[Sreekrishna et al., 1989, Biochemistry 28:4117-4125; Clare et al., 1991, Bio/Technology 9:455-460; Romanos et al., 1991, Vaccine 9:901-906]을 참조한다). 그러나, 특정한 경우에, 단일 복사 벡터 통합부로부터 수득된 발현 수준은 효과적이었고, 다중 복사 벡터 통합부에 의해 개선되지 않았다(Cregg et al., 1987, Bio/Technology 5:479-485). 자발적 다중 복사 플라스미드 통합은 생체내에서 낮은 빈도로 피. 파스토리스에서 발생된다. 유전자의 다중 복사물의 게놈성 통합을 수득하고 단백질 발현을 가능하게 증가시키기 위해, 시험관내 결찰 방법을 사용하여 발현 벡터에서 유전자의 탠덤(tandem) 삽입부를 생산하고, 피. 파스토리스 형질전환을 수행할 수 있다.

[0413] pPROT55-V 변형체의 다중 복사 통합부를 수득하기 위해, 시험관내 결찰 방법을 사용하여 후속적으로 피. 파스토리스 형질전환을 위해 사용되는 pPROT55-V의 다중 복사물을 함유하는 벡터를 작성하였다. 다중 복사 벡터를 제조하기 위해, pPROT55-V 벡터를 BgIII 및 BamHI으로 분해하여 프로-PRT-201 유전자를 코딩하는 2.3 kb의 발현 카세트, *AOX1* 프로모터, 및 *AOX1* 전사 종결 서열을 방출하였다. 이어서 발현 카세트를, BamHI로 선형화시키고 송아지 소장 알칼리성 포스파타아제(뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 소재)로 처리된 pPROT55-V 벡터의 제조물과 결찰시켜 자가 결찰을 방지하였다. 결찰 혼합물을 하룻밤 16℃에서 배양처리하였다. 이. 콜라이 TOP10 균주(인비트로겐, 미국 캘리포니아주 소재)를 결찰 반응물로 형질전환시켰다. 형질전환 혼합물을 저염 LB 상에서 25 마이크로그램/㎖의 제오신의 존재하에 플레이팅하였다. 내약물성 형질전환체를 따고, 플라스미드 DNA를 제조하였다.

[0414] 생성된 클론에서 발현 카세트의 수를 결정하기 위해, 플라스미드 DNA를 BglII 및 BamHI으로 소화시키고 DNA 크기 표준 마커와 함께 아가로즈 겔 전기이동으로 분석하였다. 3개의 2.3 kb의 발현 카세트와 일치하는 크기를 갖는 규정된 단일 삽입 밴드를 함유하는 클론을 동정하고, pPROT55M3-V로 칭하였다. 제한 효소 매핑을 사용하여 pPROT55M3-V 벡터에 대한 선형의 헤드 투 테일(head-to-tail) 다량체 형성의 배향을 확인하였다. 도 6은 pPROT55M3-V 클로닝 개략도를 도시한다.

[0415] 야생형 피. 파스토리스 균주 NRRL Y-11430을 형질전환을 위해 사용하였고, pPROT55M3-V 벡터를 SacI 대신에 Bg1II로 선형화시킴을 제외하고 실시예 4에 기재된 바와 같이 이를 수행하였다. 실시예 4에 기재된 바와 같이 내약물성 형질전환체를 배양하고 pPROT55M3 프로단백질의 발현에 대해 스크리닝하였다.

[0416] 진탕 플라스크 배양 조건의 최적화를 수행하여 유도 동안 자발적 분할을 최소화하였다. 진탕 플라스크 최적화는 2개의 변수, 즉 유도 온도 및 유도 배지 조성에 집중된다. 우선, 22℃에서 유도를 수행한 결과 25℃에 비해 시험된 모든 배지 조성에 대해 배양 상청액중 성숙한 효소에 대한 선구효소의 비율이 보다 높은 것으로 밝혀졌다. 두번째로, 유도 배지의 완충 강도를 증가시키기 위해 시트르산 나트륨을 첨가한 결과 시험된 모든 시트르산 나트륨 농도(12.5~50 mM)에 걸쳐 배양 상청액중 자발적으로 전환된 성숙한 효소가 존재하지 않았다. 진탕 플라스크 상청액에서 프로단백질 발현 수율 및 안정성에 미치는 이들 매개변수의 효과는 도 7에 나타나 있다.

[0417] 고발현 3중 복사 클론 201-55M3-003-VU를, 하기와 같은 201-55-001-VU 클론을 위해 확립된 발효 절차에 의해 발

효 분석 규모를 증가시키도록 선택하였다. 하나의 세포 뱅크 바이알을 해동하고 이를 사용하여 500 ㎖의 BKGY 성장 배지(pH 5.7)가 함유된 진탕 플라스크에 접종함으로써 201-55-001-VU 클론의 발효를 수행하였다. 종자 배양액을 24시간 동안 28℃에서 진탕하에 습윤 세포 중량이 대략 40 g/ℓ이 될 때까지 성장시켰다. BKGY 성장 배지(pH 5.7)를 함유하는 발효기를 오토클레이브(autoclave)에서 멸균시켰다. 배지를 28℃로 냉각시킨 후, 효모 질소 베이스 및 비오틴을 포함하는 보충물을 첨가하였다. 발효기에 BKGY 성장 배지에 대한 씨드 배양물을 1:33 비율로 접종하였다.

[0418] 발효 절차를 글리세롤 및 글리세롤 공급물(pH 5.7)의 공급식-배치로 28℃에서 시작하였다. pH를 10% 인산 및 30% 황산 암모늄 용액으로 제어하였다. 배양물을 300~1000 rpm으로 통기하에 교반하여 용해된 산소를 40%로 제어하였다. 초기 글리세롤 배치가 고갈되고 용해된 산소가 스파이크되어 시스템으로부터의 글리세롤의 고갈을 나타낸 후, 습윤 세포 중량이 바람직하게는 200 g/ℓ~300 g/ℓ 사이에 존재할 때까지 추가의 50% 글리세롤을 131 g/시간으로 공급하였다. 습윤 세포 중량이 200 g/ℓ~300 g/ℓ에 도달된 후, 유도를 0.025 ㎖/g의 습윤 생물량의 메탄올 거환으로 즉시 개시하였다. 메탄올 거환이 고갈되고 용해된 산소가 발생된 후, 0.0034 g 메탄올/g 습윤 세포 중량/시간의 일정한 공급 속도로 메탄올의 제한된 양을 첨가함으로써 유도를 지속하였다. 일정한 메탄올 공급을 시작할 때, 발효 브로쓰의 pH는 5.7에서 5.5로 바뀌었고, 온도는 28℃에서 22℃로 바뀌었다. 유도한지 70시간 이후 발효물을 수확하였다.

[0419] 단일 복사 및 3중 복사 클론의 상대 수율을 결정하기 위해, 단일 복사 pPROT55-V 벡터의 하나의 게놈 통합부를 함유하는 클론 201-55-001-VU를, 3중 복사 pPROT55M3-V 벡터의 하나의 게놈 통합부를 함유하는 클론 201-55M3-003-VU와 동시에 발효시켰다. 배양액의 pH가 유도 전체에 걸쳐 5.7로 유지됨을 제외하고 상기 기재된 바와 같이 발효를 수행하였다. 201-55-001-VU 및 201-55M3-003-VU 발효물로부터의 수확된 상청액을 콜로이드성 블루 염색(Colloidal Blue staining)이 수반되는 구배 SDS-PAGE로 분석하였고(도 8), 이는 보다 높은 프로단백질 발현이 단일 복사 201-55-001-VU 클론에 비해 다중 복사 201-55M3-003-VU 클론으로부터 수득되었음을 나타낸다. SDS-PAGE 결과를 발효 상청액중 프로단백질 농도의 HIC-HPLC 분석에 의해 확인하였고, 이는 201-55M3-003-VU 클론이 대략 600 mg/ℓ의 분비된 프로단백질을 생산하는 반면, 201-55-001-VU 클론이 대략 400 mg/ℓ을 생산함을 입증하였다. 이와 같이, 3개의 발현 카세트를 함유하는 다중 복사 201-55M3-003-VU 클론은 단일한 발현 카세트를 함유하는 단일 복사 201-55-001-VU 클론에 비해 대략 50% 더 많은 프로단백질을 생산하였다.

[0420] 2가지 전환 전략을 발효로부터 생산된 201-55M3-003-VU 상청액을 사용하여 시험하였다. 이들 전략은 일반적으로 이들이 보다 큰 규모로 수행됨을 제외하고 실시예 5에서 다른 프로단백질 변형체에 대해 기재된 전략을 따른다. 제1 전략에서, 프로단백질을 상청액으로부터 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 포획한 다음, 성숙한 단백질로 전환시키고 폴리쉬 크로마토그래피를 수행하였다. 제2 전략에서, 프로단백질을 정제 전에 성숙한 단백질로 전환시킨 다음, 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 포획하고, 연장된 전환을 수행하여 N-말단 변형체를 제거하고, 추가로 폴리쉬 크로마토그래피를 수행하였다. 전략 둘다는 또한 전환 후 완충액(pH 8.0)에서 연장된 배양처리 단계를 포함하여 N-말단 변형체의 선택적 분해를 수행하였다.

[0421] 제1전략을 사용하여, 전환이 수반된 프로단백질의 포획 및 PRT-201 폴리쉬 정제를 다음과 같이 수행하였다. 201-55M3-003-VU 상청액을 발효 배양액으로부터 수확하고 -80℃에서 동결시켰다. 대략 7 ℓ의 동결된 투명한 상청액(상기 기재된 201-55M3-003-VU 발효로부터 3.5 ℓ, 및 실시예 4 및 5에 기재된 바와 같이 일반적으로 제조된 201-55M3-003-VU 진탕 플라스크 배양액으로부터 3.5 ℓ)을 해동시키고 탈이온수 및 1 M 시트르산 나트륨(pH 4.3)으로 2~8℃에서 8배 희석하여 25 mM 시트르산 나트륨의 최종 농도를 수득하였다. 용액의 pH를 4.7로 조정하였다. 용액을 2.3 ℓ 층 매크로프랩 하이 에스 양이온 교환 칼럼 상으로 76 ㎝/시간으로 2~8℃에서 적재하였다. 칼럼을 5 CV의 25 mM 시트르산 나트륨(pH 4.7)으로, 이어서 5 CV의 160 mM 염화 나트륨, 25 mM 시트르산 나트륨(pH 4.7)으로 세척하였다. 프로단백질을 25 mM 시트르산 나트륨(pH 4.7)중 160 mM 염화 나트륨에서 출발하여 500 mM 염화 나트륨으로의 15 CV의 선형 구배로 87 ㎖/분(67 ㎝/시간)으로 용출하였다. 용출물을 분별물에서 수거하였다. 분별물을 SDS-PAGE로 단백질 함량에 대하여 분석하였다(도 9). 소량의 자발적으로 전환된 단백질을 SDS-PAGE에 의해 관찰하였다. 프로단백질을 함유하는 분별물을 추가의 가공처리를 위해 모았다. 모아진 물질을 HIC-HPLC로 분석하였고, 이는 92%의 프로단백질 및 8%의 성숙한 PRT-201로 구성됨을 보여주었다.

[0422] 전환을 개시하기 위해, 모아진 물질을 접선방향 유동 여과를 사용하여 100 mM 염화 나트륨, 20 mM 트리스(pH 4.0)로, 일정한 부피의 투석여과에 의해 10~12℃에서완충액 교환하였다. 접선방향 유동 여과를 재생된 셀룰로즈 막, 15 psi의 막간 압력, 20 ℓ/분의 교차 유속 및 800 ㎖/분의 플럭스(flux)를 사용하여 수행하였다. 2~8℃에서 완충액의 3회의 투석부피(diavolume)를 플럭스와 동일한 속도로 첨가하였다. 후속적으로, 주위 온도에서의 3회의 추가의 부피의 완충액을 플럭스와 동일한 속도로 첨가하여 전환 용액의 온도를 26℃의 목표로 상승시

켰다. 15 psi의 막간 압력, 1.2 ℓ/분의 교차유동 속도, 및 76 mℓ/분의 플럭스의 조건을 사용하여, 전환 용액을 1.5 mg/mℓ의 목표로 농축시키기 위해 접선방향 유동 여과를 사용하였다. 그러나, 농축 절차의 출발 대략 2분 후, 예상치못한 침전이 관찰되었고, 농축 과정을 중단하였다. 전환 용액의 단백질 농도는 UV 흡광도(280 nm)에 의해 570 mℓ의 부피중에서 1.1 mg/mℓ인 것으로 결정되었다. 추가의 침전을 최소화하기 위해, 전환 용액을 1 mg/mℓ으로 100 mM 염화 나트륨, 20 mM 트리스(pH 4.0)에 의해 희석하고, 0.22 미크론 막을 통해 여과하였다. 16 mℓ의 3 M 트리스(pH 9.0)를 전환 용액에 첨가하였다. 전환 용액을 수욕(26℃)에 넣었다. 전환 반응을 HIC-HPLC 분석으로 모니터링하였다. 30분 이후, HIC-HPLC는 대부분의 프로단백질이 PRT-201 및 몇몇 N-말단 변형체로 전환됨을 보여주었다(도 10). 1시간 후, 전환 반응물은 0% 프로단백질, 86% 전장 PRT-201 및 14% N-말단 변형체로 구성되었다. 전환 물질을 추가로 4시간 더 배양처리하였고, 이때 HIC-HPLC 분석은 전환 물질이 98%의 전장 PRT-201 및 2%의 N-말단 변형체로 구성됨을 보여주었다.

[0423] 전환 물질을 탈이온수 및 1 M 시트르산 나트륨(pH 4.3)에 의해 25 mM 시트르산 나트륨의 최종 농도가 되도록 4배 희석하였다. 용액의 pH는 폴리쉬 칼럼 상으로 적재하기 위해 제조물중 5.0으로 조정하였다. 용액을 600 mℓ층 매크로프렙 하이 에스 양이온 교환 칼럼 상으로 27 mℓ/분(83 cm/시간)으로 적재하였다. 칼럼을 5 CV의 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)으로 세척하고, 이어서 5 CV의 160 mM 염화 나트륨, 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)으로 세척하였다. PRT-201을 25 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)중 160 mM에서 출발하여 500 mM 염화 나트륨이 되도록 15 CV의 선형 구배로 87 mℓ/분(67 cm/시간)으로 용출하였다. 용출물을 분별물에서 수거하였다. 분별물을 SDS-PAGE에 의해 단백질 함량에 대해 분석하고, SLAP 검정에 의해 비활성에 대해 분석하였다. 비활성이 ≥30 U/mg인 PRT-201을 함유한 분별물을 모았다. 모아진 PRT-201 분별물을 제형 완충액(0.1X PBS, pH 5.0)내로 접선방향 유동 여과에 의해 투석여과하였다. 투석여과된 PRT-201의 pH를 pH 7.4로 조정하고, 단백질 농도를 접선방향 유동 여과에 의해 1 mg/mℓ로 조정하였다. 실시예 4에서 201-24-266-VU 클론으로부터 생산된 PRT-201에 대해 기재된 바와 같이, 바이알을 충전시키고 동결건조하였다.

[0424] 제2 전략을 사용하여, PRT-201의 정제가 수반되는 프로단백질 전환을 다음과 같이 수행하였다. 상기 기재된 201-55M3-003-VU 발효로부터의 대략 7 ℓ의 동결된 투명 상청액을 해동하고, 100 mM 트리스(pH 8.0)가 함유된 전환 완충액에 의한 접선방향 유동 여과에 의해, 재생된 셀룰로즈 막에 의한 주위 온도에서의 일정한 부피의 투석여과를 사용하여 전환 반응을 개시하였다. 100 mM 트리스-HCl(pH 8.0)의 2회의 투석부피는 투석유물의 pH를 pH 5.0에서 8.0으로 바꾸고 전환을 수행하기에 충분하였다. 또한, 트리스 염기를 100 mM의 최종 농도로 첨가하고 pH를 1 N 수산화나트륨으로 8.0으로 조정함에 의해, 투명한 상청액의 pH를 8.0으로 직접 조정함으로써 실험을 수행하였다. 이는 침전물 및 혼탁한 상청액의 형성을 초래하였는데, 이는 아마도 브로쓰 성분의 침전에 기인한 것으로, 바람직하지 않다. 접선방향 유동 여과를 사용하는 전환의 바람직한 방법은 침전을 초래하지 않았다.

[0425] 전환 반응을 실시간 HIC-HPLC 분석으로 모니터링하였다. 전환의 개시 후, 프로-PRT-201은 처음 2시간에 걸쳐 천천히 성숙한 PRT-201로 전환되었고, 이후 전환이 가속화되었다(도 11). 4.5시간째, 전환 반응물은 대략 4%의 프로-PRT-201, 75%의 성숙한 PRT-201 및 21%의 N-말단 변형체로 구성되었다. 6.5시간째, 전환 반응물은 대략 1%의 프로-PRT-201, 83%의 성숙한 PRT-201 및 16%의 N-말단 변형체로 구성되었다. 21%에서 16%로(4.5시간에서 6.5시간으로)의 N-말단 변형체의 감소는 전장 활성 PRT-201에 의한 N-말단 변형체의 분해에 기인하지만, 이는 완전하지 않고, 정제된 프로-PRT 201의 전환 동안 보여지는 N-말단 변형체에서의 감소만큼 신속하지 않다. 이러한 제2 전략에서, 전환 반응의 연장은 전체적으로 N-말단 변형체를 제거하지 않았고, 이는 엘라스타아제의 활성 부위에 대해 경쟁하는 상청액중의 경쟁 단백질에 기인하는 것이다. 전환 반응을 개선하기 위해, 전환후 물질을 포획하고 후속적으로 적절한 완충액내로 투석여과하여 연장된 전환을 전환 pH 8.0에서 하기 기재된 바와 같이 N-말단 변형체의 선택적 분해를 위해 개시하였다.

[0426] 전환 물질로부터의 PRT-201의 포획을 다음과 같이 수행하였다. 전환 물질을 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)으로 완충액 교환하고, 매크로-프렙 하이 에스 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼 상으로 적재하였다. 칼럼을 5 CV의 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)으로 세척한 다음, 5 CV의 20 mM 시트르산 나트륨, 160 mM 염화 나트륨(pH 5.0)으로 세척하였다. PRT-201을 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)중 160 mM로부터 500 mM 염화 나트륨으로의 선형 구배에 의해 용출하였다. 분별물을 SDS-PAGE에 의해 단백질 함량에 대해 분석하고, HIC-HPLC에 의해 N-말단 변형체에 대해 분석하고, UV 흡광도(280 nm)에 의해 단백질 농도에 대해 분석하고, SLAP 검정에 의해 엘라스타아제 활성에 대해 분석하였다. 2종의 우세한 단백질 밴드를 SDS-PAGE에 의해 검출하였고, 이는 도 12에 제시된 바와 같이 PRT-201 및 PRT-201 당단백형에 상응하였다. SDS-PAGE에 의해 결정된 PRT-201 당단백형 및 HIC-HPLC에 의해 결정된 N-말단 변형체를 함유한 분별물을 모음에서 배제하였다. SLAP 검정에 의해 결정될 경우 비교적 낮은 비활성 (30 U/mg 미만)을 나타내는 분별물 또한 모음에서 배제하였다. PRT-201을 함유하는 남은 분별물을 추

가의 가공처리를 위해 모았다. 모아진 분별물의 HIC-HPLC 분석 결과, 이 물질은 대략 98%의 전장 PRT-201 및 1~2%의 N-말단 변형체로 구성된 것으로 밝혀졌다. 모아진 물질을 2~8℃에서 12~16시간 동안 저장하였다.

[0427] N-말단 변형체가 상기 기재된 바와 같은 연장된 전환 기간에 걸쳐 감소하는 것으로 나타나는 이전 관찰이 제공되므로, 모아진 PRT-201 물질을 pH 8.0에서 연장된 배양처리 단계로 두었다. 연장된 배양처리를, 투석여과 및 접선방향 유동 여과에 의해 100 mM 트리스, 300 mM 염화 나트륨(pH 8.0)을 사용하여 2.5시간 동안 주변 온도에서 수행하였다. 2.5시간 후, 전환 물질은 HIC-HPLC 분석에 의해 제시될 경우 100%의 성숙한 PRT-201로 구성되었다. 전환 물질을 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)내로 투석여과하고 접선방향 유동 여과하여 엘라스타아제 활성을 억제하고 칼럼 크로마토그래피를 위해 제조하였다. 투석여과된 PRT-201 물질을 대략 64시간 동안 2~8℃에서 저장하였다.

[0428] PRT-201의 폴리쉬 크로마토그래피 정제를 다음과 같이 수행하였다. 투석여과된 PRT-201 물질을 매크로-프렙 S 양이온 교환 칼럼 상으로 적재하고, 5 CV의 완충액 C(20 mM 시트르산 나트륨, pH 5.0)로, 이어서 5 CV의 160 mM 염화 나트륨, 20 mM 시트르산 나트륨(pH 5.0)으로 세척하였다. PRT-201의 용출을 68% 완충액 C 및 32% 완충액 D(160 mM 염화 나트륨, 25 mM 시트르산 나트륨, pH 5.0)로부터 출발하여 0% 완충액 C 및 100% 완충액 D(500 mM 염화 나트륨, 25 mM 시트르산 나트륨, pH 5.0)로의 15 CV의 선형 구배로 50 ㎖/분(153 ㎝/시간)으로 수행하였다. 용출액을 분별물에서 수거하였다. PRT-201을 대칭 피이크로서 37 mS/㎝(330 mM 염화 나트륨)으로 용출하였다. 분별물을 SDS-PAGE 분석에 의해 단백질 함량에 대해 분석하고, UV 흡광도(280 ㎚)에 의해 단백질 농도에 대해 분석하고, SLAP 검정에 의해 비활성에 대해 분석하였다. 30.1-38.8 U/㎎의 비활성을 갖는 PRT-201을 함유하는 분별물을 모았다. 모아진 PRT-201 분별물을 제형 완충액(0.1X PBS, pH 5.0)내로 접선방향 유동 여과에 의해 투석여과하였다. 투석여과된 PRT-201의 pH를 pH 7.4로 조정하고, 단백질 농도를 1 ㎎/㎖으로 접선방향 유동 여과에 의해 조정하였다. 실시예 4에서 201-24-266-VU 클론으로부터 생산된 PRT-201에 대해 기재된 바와 같이, 바이알을 충전하고 동결건조하였다.

[0429] 상기 기재된 전환 절차를 위한 조건을, 단백질 농도, 온도, 완충액 조성, 투석부피 및 pH 변수를 검사하는 전환 최적화 연구에 기초하여 선택하였다. 제1 연구에서, 전환 동안 N-말단 변형체의 생산에 미치는 프로단백질 농도의 영향을 분석하였다. 20 mM 인산 나트륨(pH 5.0)중 0.2 ㎎/㎖의 출발 농도에서 201-55M3-003-VU 클론(프로-PRT-201-55M3-003-VU)으로부터의 정제된 프로-PRT-201을 분취하고, 원심 농축 장치를 사용하여 1.0, 1.6, 및 1.8 ㎎/㎖(280 ㎚에서의 UV 흡광도에 의해 결정됨)로 농축하였다. 100 mM의 각각의 4개 농도 샘플에 트리스 및 염화 나트륨을 첨가하고, pH를 5.0에서 8.0으로 조정하고, 주위 온도에서 샘플을 배양처리함으로써 프로단백질의 전환을 수행하였다. 프로단백질이 총 단백질의 ≤1%이 될때까지 전환 반응을 HIC-HPLC에 의해 실시간으로 모니터링하였다(도 13). 이러한 최종점에서, 0.2 ㎎/㎖의 샘플은 대략 8%의 N-말단 변형체로 구성된 반면, 1.0 ㎎/㎖, 1.6 및 2.0 ㎎/㎖의 샘플은 대략 각각 14%, 19% 및 29%의 N-말단 변형체로 구성되었다. 각각의 샘플중 단백질의 나머지는 전장 PRT-201로 구성되었다. 이들 결과로부터, 전환 동안 프로-PRT-201-55-003-VU의 농도의 증가가 보다 많은 N-말단 변형체 및 보다 적은 전장 PRT-201의 형성을 초래함이 입증되었다. 다른 연구에 따라, 프로-PRT-201-55M3-003-VU 전환이 분자내 및 분자간 반응 둘다를 통해 초래됨이 제안되었다. 이와 같이, 이러한 변형 프로단백질의 경우, 보다 희석된 프로단백질 용액에서 선호되는 분자내 반응이 보다 정확한 전환을 일으키는 반면, 보다 농축된 프로단백질 용액에서 선호되는 분자간 반응이 덜 정확한 전환, 즉 전장 PRT-201에 비해 보다 높은 백분율의 N-말단 변형체의 형성을 일으키기 쉽다.

[0430] 제2 연구에서, 전환 동안 N-말단 변형체의 생산에 미치는 온도의 영향을 분석하였다. 201-55M3-VU 클론(프로-PRT-201-55M3-003-VU로 지칭됨)으로부터 정제된 프로-PRT-201을 1.6 ㎎/㎖의 농도로 생산하고, 상기 기재된 바와 같이 15℃ 또는 26℃에서 전환시켰다. 전환 반응을 실시간으로 HIC-HPLC에 의해 모니터링하고, 프로단백질이 총 단백질의 <1%를 구성할 때까지 진행하였다. 프로단백질에서 이러한 감소를 달성하기에 필요한 시간은 26℃에서 대략 30분이고, 15℃에서 대략 90분이었다. 이러한 시간에, 두 온도에 대하여 N-말단 변형체의 유사한 백분율(총 단백질의 20%)이 관찰되었다. 이와 같이, 26℃의 보다 높은 온도는 15℃의 보다 낮은 온도에 비하여 보다 신속한 전환 반응을 초래하였으나, 본질적으로 동일한 반응 생산물 프로필을 나타내었다.

[0431] 제3 연구에서는 전환 반응 동안에 프로단백질 용해도에 미치는 완충액 조성의 효과를 검사하였다. 1.0 ㎎/㎖의 농도로 정제된 프로-PRT-201(프로-PRT-201-55M3-003-VU)을 표 6에 열거된 조건하에 전환시켰다. 전환 반응을 2~8℃에서 수행되는 한 반응(20 mM 트리스-HCl, 100 mM 염화 나트륨(pH 4.0)의 완충액 조성)을 제외하고 주위 온도에서 수행하였다. 전환 반응을 침전물에 대해 시각적으로 조사하였다. 표 6에 주지된 바와 같이, 침전을 일으키지 않은 완충액 조성으로는 100 mM 트리스-HCl, pH 8.0; 100 mM 트리스-HCl, 100 mM 염화 나트륨, pH 5.0; 및 100 mM 트리스-HCl, 300 mM 염화 나트륨, pH 8.0이 포함되었다. 보다 낮은 pH(즉, pH 5.0)에서 염화 나트륨

이 없거나 트리스의 농도가 보다 낮은 완충액 조성은 침전을 나타내었다.

[0432] [표 6]

[0433] 전환 동안 침전에 미치는 완충액 조성의 영향

완충액 조성	온도	침전이 관찰됨	가용성(침전이 관찰되지 않음)
1 mM 트리스-HCl, pH 5.0	주변 온도	+	
25 mM 트리스-HCl, pH 5.0	주변 온도	+	
100 mM 트리스-HCl, pH 5.0	주변 온도	+	
100 mM 트리스-HCl, pH 8.0	주변 온도		+
20 mM 트리스-HCl, 100 mM 염화 나트륨, pH 4.0	2-8°C	+	
100 mM 트리스-HCl, 100 mM 염화 나트륨, pH 5.0	주변 온도		+
100 mM 트리스-HCl, 300 mM 염화 나트륨, pH 8.0	주변 온도		+

[0434]

[0435] 제4 연구에서, 프로단백질(프로-PRT-201-55M3-003-VU) 함유 상청액의 전환 동안 침전에 미치는 접선방향 유동 여과 투석부피 수의 영향을 분석하였다. 완충액 교환에 사용되는 용액은 100 mM 트리스-HCl, 100 mM 염화 나트륨(pH 8.0)이었다. 부가적으로, 접선방향 유동 여과 없이 pH 5.0에서 8.0으로의 상청액의 직접적인 pH 조정을 시험하였다. 표 7에 주지된 바와 같이, 상청액의 직접적인 pH 조정은 다량의 침전을 일으켰다. 교환의 1회 투석부피에 의해, 일부 침전이 관찰되었다. 2~5회 투석부피를 사용한 경우, 침전이 관찰되지 않았다.

[0436] [표 7]

[0437] 완충액 교환 동안 침전에 미치는 투석부피 수의 영향

투석 부피	침전이 관찰됨
0	대부분 침전
1	소량 침전
2	침전되지 않음
3	침전되지 않음
5	침전되지 않음

[0438]

[0439] 제5 연구에서, 성숙한 PRT-201의 엘라스타아제 활성에 미치는 pH의 영향을 분석하였다. 이 연구는 성숙한 PRT-201 전환 생성물의 엘라스타아제 활성을 비가역적으로 손실시키지 않는 전환을 위한 유용한 pH 범위를 확인하기 위해 고안되었다. 20 mM 트리스-HCl, 20 mM 인산 칼륨중 1 mg/mℓ PRT-201의 용액을 pH 1~14로 제조하였다. 용액을 주위 온도에서 0.5, 2, 24 및 48시간 동안 유지시켰다. 지시된 시점에, 용액을 엘라스타아제 활성에 대해 SLAP 검정으로 시험하였다. 엘라스타아제 활성은 모든 시점에서 pH 3~8에서 매우 안정하였다. 3 미만 및 8 초과의 pH에서, 엘라스타아제 활성은 모든 시점에서 감소하였고, 보다 긴 시점과 보다 낮은 엘라스타아제 활성 사이에 상관관계가 있었다. 이들 결과는 3~8의 pH 범위 밖에서 수행되는 전환 반응이 PRT-201 전환 생성물의 엘라스타아제 활성에 부정적으로 영향을 미칠 수 있음을 나타내었다.

[0440] **6.8 실시예 7: 자가 활성화된 재조합 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제의 생산**

[0441] 자가 활성화된 돼지 ELA-1 선구효소를 코딩하는 벡터를 피. 파스토리스에서 발현하였다. 생성된 자가 활성화된 돼지 ELA-1을 트립신 활성화된 야생형 프로단백질로서 발현된 돼지 ELA-1 단백질과 비교하였다.

[0442] 트립신 활성화된 돼지 ELA-1 벡터를 작성하기 위해, 돼지 ELA-1 코딩 영역을 블루 헤론 바이오테크놀로지(워싱턴주 보셀 소재)에 의해 암겐(캘리포니아주 싸우전드 오크스 소재)으로부터의 인허하에 비-PCR "긴 올리고" 기

법을 사용하여 합성하였다. 재조합 유전자를 블루 헤론 pUC 벡터, 즉 pUC119의 유도체내로 클로닝하였다. 돼지 ELA-1 유전자를 양쪽 가닥 상에서 서열화하여 정확한 서열을 확인하였다. 도 14에 제시된 바와 같이 돼지 ELA-1 유전자를 플랭킹(flanking)하는 잠재적 클로닝 부위로서 SacII 및 Xbal 제한 부위를 혼입하였다. 제2 정지 코돈을 또한 고유 정지 코돈 바로 뒤에 첨가하여 잠재적인 리보솜 판독을 최소화하였다. 도 15는 돼지 ELA-1 선구효소의 천연의 동일한 아미노산 서열을 보여주고, 이는 트립신-활성화된 부위를 함유한다.

[0443] 돼지 ELA-1의 코딩 영역을, XhoI 및 SacII 제한 부위를 함유하는 한 쌍의 올리고뉴클로오티드를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켜 클로닝을 촉진하였다. PCR 생성물을 XhoI 및 SacII로 분해하고, 아가로즈 겔 전기이동으로 정제하였다. 돼지 ELA-1 단편을 PV-1 벡터내로 XhoI 및 SacII 제한 부위에서 클로닝하였다. 이. 콜라이 TOP10 균주를 결찰 혼합물로 형질전환시켰다. 세포 혼합물을 25 mg/mℓ의 제오신이 보충된 저염 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 내약물성 클론을 따고, 플라스미드 DNA를 제조하였다(퀴아겐, 캘리포니아주 소재). 제한 분석에 기초하여, 돼지 ELA-1 유전자 삽입부를 함유하는 클론을 동정하고, 벡터를 pPROT101-24-V로 칭하였다. 이러한 벡터의 코딩 서열을 DNA 서열화로 확인하였다. pPROT101-24-V에 대한 클로닝 개략도는 도 16에 도시되어 있다.

[0444] 트립신 활성화된 pPROT101-24-V 벡터를 사용하여, 3개의 상이한 자가 활성화된 클론을, 돼지 ELA-1의 프로펩티드 영역중의 트립신 분할 부위를 엘라스타아제 분할 부위로 전환시킴으로써 조작하였다. 부위-유도된 돌연변이 생성을 일반적으로 표 8에 기재된 원하는 돌연변이를 함유하는 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 실시예 4에 기재된 바와 같이 실시하였다. 프로펩티드 영역중의 모든 돌연변이는 이중 가닥 DNA 서열화로 확인하였다.

[0445] [표 8]

[0446] 트립신 활성화되고 자가 활성화된 돼지 ELA-1 벡터의 분할 도메인 서열(돌연변이된 코돈은 음영처리되어 있다. 분할된 결합은 P1과 P'1 사이이다).

구조물 명칭	프로펩티드 서열							성숙한 서열			서열 번호
	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P' 1	P' 2	P' 3	
트립신 활성화된 pPROT101-24-V	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Val	Val	Gly	115
자가 활성화된 pPROT101-42-V	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Val	Gly	116
자가 활성화된 pPROT101-49-V	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	His	Ala	Val	Val	Gly	117
자가 활성화된 pPROT101-55L-V	Leu	Pro	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly	118

[0447]

[0448] 야생형 NRRL Y-11430 피. 파스토리스 균주를 형질전환시키고, 내약물성 형질전환체를 배양하고, 실시예 3에 기재된 바와 같이 돼지 ELA-1 프로단백질의 발현에 대해 스크리닝하였다. SDS-PAGE 및 쿠마시 염색에 기초하여(도 17 및 도 18 참조), 야생형 트립신 활성화된 pPROT101-24-V 클론은 자가 활성화된 클론에 비해 가장 높은 수준의 발현을 나타내었다. 자가 활성화된 클론중, pPROT101-49-V 클론이 가장 높은 수준의 발현을 나타내었고, 그 다음이 pPROT101-55L-V 클론이고, 그 다음이 pPROT101-49-V 클론이었다. 자가 활성화된 pPROT101-42-V 및 pPROT101-55L-V 프로단백질은 유도 동안에 실질적인 자발적 전환을 나타낸 반면, 트립신 활성화된 pPROT101-24-V 및 자가 활성화된 pPROT101-49-V 프로단백질은 유도 배지에서 보다 큰 안정성을 보였다.

[0449] pPROT101-24-V로부터 발현된 프로엘라스타아제 단백질의 트립신 활성화에 의해 생산되는 PRT-102의 엘라스타아제 활성에 대한 연구는 하기 표 9에 제시된 바와 같이 PRT-201에 비해 보다 높은 비활성을 나타내었다:

[0450] [표 9]

[0451] 성숙한 인간 제I형 췌장 엘라스타아제에 비교되는, 3종의 상이한 샘플의 성숙한 돼지 제I형 췌장 엘라스타아제(트립신 활성화됨)의 엘라스타아제 활성.

샘플 명칭	PRT-201	PRT-102	PRT-102	PRT-102
SLAP에 의해 측정된 활성 (U/mg 단백질)(반복실험)	34.6	91.8	99.4	100.7
	32.9	88.3	91.3	88.6
반복실험 평균	33.6	88.5	93.5	92.9
표준 편차	0.9	3.2	5.2	6.7

[0452]

[0453] 소규모 전환 실험을 사용하여 pPROT101-55L-V 및 pPROT101-49-V 프로단백질이 엘라스타아제 활성을 나타내는 성숙한 효소로 전환될 수 있는지의 여부를 결정하였다. pPROT101-55L-V 및 pPROT101-49-V 진탕 플라스크 상청액을 원심 여과 유닛으로 10배 농축하고, 100 mM 트리스-HCl(pH 9.0)로 5배 희석하였다. 실온에서 전환이 진행되도록 허용하고, 엘라스타아제 활성을 시간에 대해 SLAP 검정으로 모니터링하였다. 분당 흡광도의 평균 변화를 각각의 시점에 결정하고, 비정규화된 반응 속도로 기록하였다(도 19). pPROT101-49-V 및 pPROT101-55L-V 상청액 둘다의 전환은 엘라스타아제 활성을 증가시켰다. 각각의 클론으로부터의 최종 시점의 샘플을 SDS-PAGE로 분석하고, 쿠마시 염색을 수행하고, 예비 전환 샘플과 비교하였다(도 20). SDS-PAGE 결과로부터, 거의 모든 pPROT101-49-V 프로단백질이 전환 검정의 종결시 성숙한 단백질로 전환되었음이 확인되었다. SDS-PAGE 결과는 또한 거의 모든 pPROT101-55L-V가 전환 검정 이전에 성숙한 단백질로 자발적으로 전환되었음을 보여주었다.

[0454] pPROT 101-24-V, pPROT101-49-V 프로단백질 및 성숙한 효소의 정제된 제조물을 본래의 분자량 분석을 위해 단포트 플랜트 사이언스 센터(Danforth Plant Science Center)(몬테나주 소재)에 제출하였다. 프로단백질을 양이온 교환 크로마토그래피(매크로프렙 하이 에스, 바이오-래드)로 정제하였다. 성숙한 효소 분석을 위해, 두 클론으로부터의 프로단백질을 우선 처리하여 성숙한 효소를 생산하고, 이어서 양이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트립신 활성화된 프로단백질을 트립신으로 처리하는 반면, 자가 활성화된 프로단백질을 100 mM 트리스-HCl(pH 9.0)의 존재하에 전환시키고, 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 질량 분광계 분석으로부터 수득된 주요 피이크가 표 10에 열거되어 있다.

[0455] [표 10]

[0456] 돼지 ELA-1 단백질에 대한 예상된 분자량 및 관찰된 분자량

단백질	예상된 MW	관찰된 MW
트립신 활성화된 pPROT101-24-V 프로단백질	27068	27064
트립신 활성화된 pPROT101-24-V 성숙한 효소	25908	25898
자가 활성화된 pPROT101-49-V 프로단백질	27049	27047
자가 활성화된 pPROT101-49-V 성숙한 효소	25908	25910

[0457]

[0458] SDS-PAGE, 엘라스타아제 활성 및 질량 분광계 결과는, 제I형 돼지 췌장 엘라스타아제의 자가 활성화된 형태가 프로펩티드 서열을 조작하여 트립신 분할 부위를 엘라스타아제 분할 부위로 대체함으로써 생산될 수 있음을 입증하였다. 제I형 돼지 췌장 엘라스타아제의 이러한 자가 활성화된 형태의 발현 수준은 야생형 트립신 활성화된 형태에 비해 낮았다. 시험된 자가활성화된 클론중, pPROT101-49-V 프로펩티드 서열을 갖는 클론은 가장 높은 발현 수준 및 가장 낮은 자발적 전환을 나타내었다. pPROT101-49-V 및 pPROT101-55L-V 클론의 전환은 상당한 엘라스타아제 활성을 갖는 성숙한 단백질을 생산하였다. 질량 분광계 분석으로부터, pPROT101-49-V 프로단백질 및 성숙한 돼지 제I형의 분자량이 예상된 질량과 상응함을 알 수 있었다.

[0459] 6.9 **실시예 8: BENZ 비색계 펩타이드 기질 검정에 의한 성숙한 재조합 인간** 엘라스타아제-1의 트립신 활성 분석

[0460] 작은 펩티드 기질 N-벤질-Phe-Val-Arg-p니트로아닐리드(BENZ: N-benzoyl-Phe-Val-Arg-pNitroanilide)를 사용하는 비색계 가수분해 검정을 수행하여, 자가 활성화된 클론 201-55M3-003-VU에 의해 생산된 정제된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 트립신 활성을 소유하는지의 여부에 대해 결정하였다. 클론 201-55M3-003-VU로부터 정제된 동결건조된 PRT-201의 3개의 바이알을 -80℃ 저장에서 꺼내고, 물로 재구성하여 0.1X PBS(pH 7.4)중 1 mg/mℓ의 PRT-201을 수득하였다. 단백질 농도를 UV 흡광도(280 nm)의 측정으로 확인하였다. 트립지언 스톡 용액(10

mg/mℓ)을 사용하여 트립신 활성에 대한 표준 곡선을 생성하였다. 이전에 시험된 트립신 활성화된 PRT-201 샘플을 양성 대조표준으로서 포함하였다. 또한, 몇몇 실험 및 대조 샘플을 트립지언으로 스파이킹하여 PRT-201의 존재하에 트립신 활성 회수를 결정하였다. 스파이킹된 샘플과 스파이킹되지 않은 샘플의 하위집합을 대두 트립신 저해제(SBTI: soybean trypsin inhibitor)로 처리하여 임의의 본래의 또는 스파이킹된 트립신 활성을 저해하는 SBTI의 능력을 결정하였다. 트립지언 표준물을 또한 SBTI로 처리하여 저해제의 효능에 대해 확인하였다. 본 연구에 포함된 샘플을 요약하기 위해 하기 표 11을 참조한다.

[0461] [표 11]

[0462] 표준 곡선을 위한 트립지언 희석물이 검정 완충액(0.1 M 트리스, pH 8.3)을 사용하여 제조되었다(트립지언 용액을 위한 표준 곡선은 도 21에 제시됨)

설명	첨가하지 않음	+ 트립지언 스파이크 (100 ng/mL 이하)	+ SBTI (10 ug/mL 이하)	+ 트립지언 스파이크 및 SBTI
클론 55M3 바이알 #1 로부터의 PRT-201	√	√	√	√
클론 55M3 바이알 #2 로부터의 PRT-201	√	√	√	√
클론 55M3 바이알 #3으로부터의 PRT-201	√	√	√	√
트립신 활성화된 클론으로부터의 PRT-201	√	√	√	√
완충액 단독(0.1 M 트리스, pH 8.3)	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 1.56 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 3.13 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 6.25 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 12.5 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 25 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 50 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음
트립지언 표준물, 100 ng/mL	√	실행되지 않음	√	실행되지 않음

[0463]

[0464] 기질 용액을 제조하고(0.1 M 트리스(pH 8.3)중 0.4 mg/mℓ의 N-벤조일-Phe-Val-Arg-p니트로아닐리드 로트 7733), 수욕에서 30℃로 예비가온하였다. 3중으로, 100 마이크로리터의 각각의 샘플을 96-웰 마이크로플레이트(microplate)로 피펫팅하였다. 다중채널 피펫장치를 사용하여, 200 마이크로리터의 기질 용액을 각각의 웰로 피펫팅하고, 마이크로플레이트를 30℃로 예열된 마이크로플레이트 판독기에 즉시 넣었다. 마이크로플레이트 판독기는 각각의 웰에 대해 분당 1회씩 60분 동안 405 nm에서 흡광도를 기록하였다.

[0465] PRT-201 샘플을 또한 엘라스타아제 활성에 대해 SLAP 검정에서 시험하였다. SLAP 기질 용액을 제조하고(0.1 M 트리스(pH 8.3)중 4.5 mg/mℓ의 SLAP), 수욕에서 30℃로 예비가온하였다. 1 mg/mℓ의 PRT-201 샘플을 물에 의해 0.05 mg/mℓ로 20배 희석하였다. 3중으로, 10 마이크로리터의 각각의 샘플 희석액을 96-웰 마이크로플레이트로 피펫팅하였다. 다중채널 피펫장치를 사용하여, 300 마이크로리터의 SLAP 기질 용액을 각각의 웰로 피펫팅하고, 마이크로플레이트를 30℃로 예열된 마이크로플레이트 판독기에 즉시 넣었다. 마이크로플레이트 판독기는 각각의 웰에 대해 분당 1회씩 5분 동안 405 nm에서 흡광도를 기록하였다.

[0466] BENZ 및 SLAP 활성 검정의 결과는 각각 하기 표 12 및 13에 제시되어 있다.

[0467] [표 12]

[0468] 트립지언 농도 대응값(ng/mℓ)으로서 기록된 평균 트립신 활성([a] 회귀 계수 < 0.8)

설명	첨가하지 않음	+ 트립지언 스파이크 (100 ng/mL 이하)	+ SBTI (10 ug/mL 이하)	+ 트립지언 스파이크 및 SBTI
클론 55M3 바이알 #1 로부터의 PRT-201	<1.56 [a]	118.7	<1.56 [a]	<1.56 [a]
클론 55M3 바이알 #2 로부터의 PRT-201	<1.56 [a]	122.4	<1.56 [a]	<1.56 [a]
클론 55M3 바이알 #3으로부터의 PRT-201	<1.56 [a]	122.8	<1.56 [a]	<1.56 [a]
트립신 활성화된 클론으로부터의 PRT-201	8.7	130.0	<1.56 [a]	<1.56 [a]
완충액 단독(0.1 M 트리스, pH 8.3)	1.3	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 1.56 ng/mL	2.7	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 3.13 ng/mL	3.7	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 6.25 ng/mL	6.5	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 12.5 ng/mL	11.2	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 25 ng/mL	23.5	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 50 ng/mL	49.4	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음
트립지언 표준물, 100 ng/mL	102.4	실행되지 않음	<1.56 [a]	실행되지 않음

[0469]

[0470] [표 13]

[0471] 평균 SLAP 활성(U/mg로서 기록됨)

설명	첨가하지 않음
클론 55M3 바이알 #1 로부터의 PRT-201	34.9
클론 55M3 바이알 #2 로부터의 PRT-201	36.6
클론 55M3 바이알 #3으로부터의 PRT-201	35.7
트립신 활성화된 클론으로부터의 PRT-201	32.1

[0472]

[0473] 클론 201-55M3-003-VU로부터의 PRT-201의 트립신 활성 수준은 트립신 활성 검정에서 표준 곡선의 범위 아래이다(<1.56 ng/mℓ). 부가적으로, 3중 가수분해 반응에 대한 회귀 계수는 불량하였고(<0.8), 추가로 이러한 자가 활성화된 성숙한 엘라스타아제 단백질에 트립신 활성이 없음을 지지한다. 반대로 대조 트립신-활성화 샘플의 트립신 활성 수준은 8.7 ng/mℓ인 것으로 측정되었다.

[0474] 7. 서열 목록

서열 번호	설명	서열 유형	서열
1	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제 1 "발린"을 포함함	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
2	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제 1 "발린"이 제외됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	VGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLI RQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
3	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 처음 2 개의 "발린"이 제외됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	GGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIR QNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTE QYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVT LNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNG QLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMV CAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVT SFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
4	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제 1 "발린"이 "알라닌"으로 치환됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	AVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
5	성숙한 인간 엘라스타아제 I(이소타입 2), 제 1 "발린"을 포함함	아미노산, 단일 글자 형식	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGSSLWMPG

[0475]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
6	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 1(pPROT42 변형체)	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNAAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
7	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 2	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNAAAVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
8	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 3	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETAAAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
9	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 4	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNNAPVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
10	야생형 엘라스타아제 프로단백질 번호 5(pPROT24 트립신 활성화된 서열로부터 생산됨)	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN

[0476]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
11	컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 1(위치 Xaa_1=P3, Xaa_2=P2, Xaa_3=P1)	아미노산, 3 글자 형식	Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_1= 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린 Xaa_2 = 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌 Xaa_3 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린
12	컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 2(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Xaa_1 Pro Xaa_2 Xaa_1 = 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 또는 발린 Xaa_2 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린
13	컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 3(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_1= 아스파라긴 또는 알라닌 Xaa_2 = 프롤린 또는 알라닌 Xaa_3 = 알라닌 또는 로이신 또는 발린
14	엘라스타아제 인식 서열 1(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Ala Ala Ala
15	엘라스타아제 인식 서열 2(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Asn Ala Ala
16	엘라스타아제 인식 서열 3(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Asn Ala Pro
17	아쟁형 트립신 인식 서열(pPROT24)(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Asn Ala Arg

[0477]

[0478]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
18	엘라스타아제 인식 서열 5(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Ala Pro Ala
19	엘라스타아제 인식 서열 6(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Ala Ala Pro
20	엘라스타아제 인식 서열 7(변형체 48 및 55 의 위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Asn Pro Ala
21	엘라스타아제 인식 서열 8	아미노산, 3 글자 형식	Leu Pro Ala
22	인간 엘라스타아제 활성화 서열 1 (야생형)	아미노산, 3 글자 형식	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg
23	인간 엘라스타아제 활성화 서열 2	아미노산, 3 글자 형식	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Ala
24	프로-PROT-201 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly
25	pPROT40 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Ala Ala Ala Val Val Gly Gly
26	pPROT41 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly Gly
27	pPROT42 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Asn Ala Ala Val Val Gly Gly
28	pPROT43 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Asn Ala Pro Val Val Gly Gly

서열 번호	설명	서열 유형	서열
29	pPROT44 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly Gly
30	pPROT45 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Val Pro Gly Val Val Gly Gly
31	pPROT46 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Ala Pro Gly Val Val Gly Gly
32	pPROT47 분할 부위	아미노산, 3 글자 형식	Thr Asn Pro Gly Val Val Gly Gly
33	인간 엘라스타아제-1의 코딩 영역 (NCBI 수탁 번호 NM_001971)	뉴클레오티드	ACCCAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGCGTA GTCGGAGGGACTGAGGCCGGGAGGAATTCCTG GCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGGTCTGG AGGTTCCCGGTATCACACCTGTGGAGGGACCCT TATCAGACAGAACTGGGTGATGACAGCTGCTCA CTGCGTGGATTACCAGAAGACTTTCCGCGTGGT GGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGAATGATGG CACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGAAGATCGT GGTGCATCCATACTGGAACAGCGATAACGTGGC TGCCGGCTATGACATCGCCCTGCTGCGCCTGGC CCAGAGCGTTACCCTCAATAGCTATGTCCAGCTG GGTGTTCTGCCCCAGGAGGGAGCCATCCTGGCT AACAACAGTCCCTGCTACATCACAGGCTGGGGC AAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGGCCCAGACC CTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTGTGGACTAC GCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTGGGGCTCC ACTGTGAAGAACACCATGGTGTGTGCTGGTGGA GATGGAGTTCGCTCTGGATGCCAGGGTGACTCT GGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAATGGCAAG TATTCTGTCCATGGAGTGACCAGCTTTGTGTCCA GCCGGGGCTGTAATGTCTCCAGGAAGCCTACAG TCTTCACCCAGGTCTCTGCTTACATCTCCTGGAT AAATAATGTCATCGCCTCCAACTGA
34	효모 알파 인자 신호 펩티드	아미노산, 3 글자 형식	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-
35	20F 프라이머	뉴클레오티드	ggctcgagaaaagaggaggctgaagctactcaggaccttccggaaaccaatgcccgg
36	24R 프라이머	뉴클레오티드	gggccgcggcttatcagttggaggcgatgacat

[0479]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
37	pPROT42 P3 분할 부위 변형 엘라스타아제	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	AAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCG GTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLA QSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIA SN
38	pPROT42 P2 분할 부위 변형 엘라스타아제	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	AVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGT LIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDG TEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQS VTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT NGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNT MVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
39	성숙한 돼지 췌장 엘라스타아제 I(유전자은행으로부터 수탁 번호 P00772.1)	아미노산, 단일 글자 형식	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDRELTFRVVVGEHNLNQNDGT EQYVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTN GQLAQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGQYAVHGV TSFVSRLGCNVTRKPTVFTRVSAYISWINNVIASN
40	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 40	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Ala Ala Ala Val Val Gly
41	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 41	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly
42	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 42	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly
43	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 43	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn Ala Pro Val Val Gly

[0480]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
44	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 44	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly
45	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 45	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Val Pro Gly Val Val Gly
46	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 46	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Ala Pro Gly Val Val Gly
47	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 47	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn Pro Gly Val Val Gly
48	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 48	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
49	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 49	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly
50	효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드, 프로펩티드, 및 이격자 서열 1	아미노산, 3 글자 형식	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Leu-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala

[0481]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
51	효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드 및 프로펩티드 서열 2	아미노산, 3 글자 형식	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Leu-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Asp-
52	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 52	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Lys Pro Ala Val Val Gly
53	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 53	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr His Pro Ala Val Val Gly
54	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 54	아미노산, 3 글자 형식	Glu His Asn Pro Ala Val Val Gly
55	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 55	아미노산, 3 글자 형식	His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
56	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 56	아미노산, 3 글자 형식	Pro Thr His Pro Ala Val Val Gly
57	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 57	아미노산, 3 글자 형식	Pro Thr Asn Pro Ala Val Val Gly

[0482]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
58	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 58	아미노산, 3 글자 형식	His Thr His Pro Ala Val Val Gly
59	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 59	아미노산, 3 글자 형식	Glu Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
60	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 60	아미노산, 3 글자 형식	His Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
61	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 61	아미노산, 3 글자 형식	Gly Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
62	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 62	아미노산, 3 글자 형식	His Thr Gly Pro Ala Val Val Gly
63	엘라스타아제 변형 프로펩티드 분할 도메인 63	아미노산, 3 글자 형식	His Thr Lys Pro Ala Val Val Gly
64	변형 분할 도메인 48 을 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN

[0483]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
65	변형 분할 도메인 49 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETNHAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
66	변형 분할 도메인 52 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETKPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
67	변형 분할 도메인 53 을 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPETHPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
68	변형 분할 도메인 54 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPEHNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
69	변형 분할 도메인 55 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	TQDLPHTNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN

[0484]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
70	야생형 엘라스타아제 +AlaArg 분할 변형체	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	ARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCG GTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLA QSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIA SN
71	야생형 엘라스타아제 +Arg 분할 변형체	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: X = V 또는 L	RVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGG TLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQND GTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQ SVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTK TNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNT MVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
72	변형체 48 인간 엘라스타아제 활성화 펩티드	아미노산, 3 글자 형식	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Pro Ala
73	변형체 55 인간 엘라스타아제 활성화 펩티드	아미노산, 3 글자 형식	Thr Gln Asp Leu Pro His Thr Asn Pro Ala
74	인간 엘라스타아제 분할 도메인 컨센서스 서열; 엘라스타아제 분할 도메인의 잔기 P5, P4, P3, P2, P1, P'1, P'2, 및 P'3 에 상응함	아미노산, 3 글자 형식	Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_7 Xaa_8 Xaa_1 = 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린, 글리신, 아스파라긴, 라이신, 또는 알라닌 Xaa_2 = 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 히스티딘 Xaa_3 = 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린 Xaa_4 = 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌 Xaa_5 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린 Xaa_6 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신 또는 세린 Xaa_7 = 글리신, 알라닌, 또는 발린 Xaa_8 = 발린, 트레오닌, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판

[0485]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
75	PCR 돌연변이생성 프라이머	핵산	ATC TAC GTA GTC GGA GGG ACT GAG GCC
76	PCR 돌연변이생성 프라이머	핵산	gtc gac aag ctt atc agt tgg agg cga t
77	성숙한 ELA1 C-말단 변형체[Talas *et al.*]	단백질, 단일 글자 형식	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPPPLLGEWQVFSPW SDQLCVQPGL
78	성숙한 ELA-1 변형체	단백질, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTL IRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
79	활성화 펩티드 변형체(아쟁형 트립신 분할가능함)	단백질, 단일 글자 형식, 여기서 U = Q 또는 H	TUDLPETNAR
80	활성화 펩티드 변형체 컨센서스	단백질, 3 글자 형식	Thr Xaa_1 Asp Leu Pro Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Xaa_1 = 글루타민 또는 히스티딘 Xaa_2 = 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린, 글리신, 아스파라긴, 라이신, 또는 알라닌 Xaa_3 = 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 히스티딘 Xaa_4 = 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린 Xaa_5= 프롤린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 글리신, 발린, 또는 트레오닌 Xaa_6 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린

[0486]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
81	ELA-1.2A의 코딩 영역	뉴클레오티드	ACTCAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGGGTA GTCGGAGGGACTGAGGCCGGGAGGAACTCCTG GCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGGTCTGG AGGTTCCTGGTATCACACCTGTGGAGGGACCCT TATCAGACAGAACTGGGTGATGACAGCTGCACA CTGCGTGGATTACCAGAAGACTTTCCGCGTGGT GGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGAATGATGG CACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGAAGATCGT GGTGCATCCATACTGGAACAGCGATAACGTGGC TGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGCGCCTGGC CCAGAGCGTTACCCTCAATAGCTATGTCCAGCTG GGTGTTCTGCCCCAGGAGGGAGCCATCCTGGCT AACAACAGTCCCTGCTACATCACAGGCTGGGGC AAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGGCCCAGACC TTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTGTGGACTAT GCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTGGGGCTCC ACTGTGAAGAACACTATGGTGTGTGCTGGTGGA GATGGAGTTCGCTCTGGATGTCAGGGTGACTCT GGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAATGGCAAG TATTCTCTTCATGGAGTGACCAGCTTTGTGTCCA GCCGGGGCTGTAATGTCTCTAGAAAGCCTACAG TCTTCACACGGGTCTCTGCTTACATCTCCTGGAT AAATAATGTCATCGCCTCCAACTGATAA
82	ELA-1.2A의 번역 생성물 (트립신 활성화된 pPROT24 서열)	단백질, 단일 글자 형식	TQDLPETNARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SWYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSLHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTRVSAYIS WINNVIASN
83	ELA-1.2A의 번역 생성물의 변형체 (트립신 활성화된 pPROT24 서열)	단백질, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN

[0487]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
84	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제1 "발린"을 포함함	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTL IRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
85	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제1 "발린"이 제외됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	VGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLI RQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTE QYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVT LNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNG QLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMV CAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVT SFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
86	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 처음 2개의 "발린"이 제외됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	GGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIR QNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTE QYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVT LNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNG QLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMV CAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVT SFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
87	성숙한 인간 엘라스타아제 I, 제1 "발린"이 "알라닌"으로 치환됨	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	AVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTL IRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN

[0488]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
88	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 1(pPROT42 변형체)	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNAAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
89	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 2	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNAAAVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
90	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 3	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETAAAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
91	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 4	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNNAPVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN

[0489]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
92	조작된 엘라스타아제 프로단백질 번호 5(pPROT24 트립신 활성화된 서열)	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
93	컨센서스 엘라스타아제 인식 서열 2(위치 P3-P2-P1)	아미노산, 3 글자 형식	Xaa_1 Pro Xaa_2 Xaa_1 = 알라닌, 로이신, 이소로이신, 메티오닌, 라이신, 아스파라긴 또는 발린 Xaa_2 = 알라닌, 로이신, 발린, 이소로이신, 또는 세린
94	pPROT42 P3 분할 부위 변형 엘라스타아제	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	AAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCG GTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLA QSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIA SN
95	pPROT42 P2 분할 부위 변형 엘라스타아제	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	AVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGT LIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDG TEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQS VTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT NGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNT MVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
96	효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드, 프로펩티드, 및 이격자 서열	아미노산, 3 글자 형식	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Ser-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Glu-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala

[0490]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
97	효모 알파-메이팅 인자 신호 펩티드 및 프로펩티드 서열	아미노산, 3 글자 형식	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Ser-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Glu-
98	변형 분할 도메인 48 을 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
99	변형 분할 도메인 49 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETNHAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
100	변형 분할 도메인 52 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETKPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN

[0491]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
101	변형 분할 도메인 53 을 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPETHPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
102	변형 분할 도메인 54 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPEHNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
103	변형 분할 도메인 55 를 갖는 엘라스타아제 선구효소	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: U = Q 또는 H B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TUDLPHTNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
104	야생형 엘라스타아제 +AlaArg 분할 변형체	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	ARVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCG GTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLA QSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIA SN

[0492]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
105	야생형 엘라스타아제 +Arg 분할 변형체	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	RVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
106	성숙한 인간 엘라스타아제 I, N 말단 "VVGG" 서열 제외	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	TEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
107	성숙한 인간 엘라스타아제 I, N 말단 "VVGGTE" 서열 제외	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	AGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
108	성숙한 인간 엘라스타아제 I, N 말단 "VVGGTEAGR" 서열 제외	아미노산, 단일 글자 형식, 여기서: B = W 또는 R J = M 또는 V X = V 또는 L Z = Q 또는 R	NSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSRKPTVFTZVSAYISWINNVIASN

[0493]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
109	도 1A 서열	핵산	GAATTCAGTACTCAGGACCTTCCGGAAACCAATG CCCGGGTAGTCGGAGGGACTGAGGCCGGGAGG AACTCCTGGCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACC GGTCTGGAGGTTCCTGGTATCACACCTGTGGAG GGACCCTTATCAGACAGAACTGGGTGATGACAG CTGCACACTGCGTGGATTACCAGAAGACTTTCC GCGTGGTGGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGA ATGATGGCACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGA AGATCGTGGTGCATCCATACTGGAACAGCGATA ACGTGGCTGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGC GCCTGGCCCAGAGCGTTACCCTCAATAGCTATG TCCAGCTGGGTGTTCTGCCCCAGGAGGGAGCCA TCCTGGCTAACAACAGTCCCTGCTACATCACAGG CTGGGGCAAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGG CCCAGACCTTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTG TGGACTATGCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTG GGGCTCCACTGTGAAGAACACTATGGTGTGTGC TGGTGGAGATGGAGTTCGCTCTGGATGTCAGGG TGACTCTGGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAA TGGCAAGTATTCTCTTCATGGAGTGACCAGCTTT GTGTCCAGCCGGGGCTGTAATGTCTCTAGAAAG CCTACAGTCTTCACACGGGTCTCTGCTTACATCT CCTGGATAAATAATGTCATCGCCTCCAACTGATA AGCTTGGATCCGTCGAC
110	도 1A 서열	아미노산, 단일 글자 형식	MKRILAIHQAMEGAPRVTLTSRANSISTSTHHSVLH SGAPVGGAGADGIVHRGQVSLLQGLGQLPIGLGLA PACDVAGTVVSQDGSLLGQNTQLDIAIEGNALGQA QQGDVIACSHVIAVPVWMHHDLLHTHVLLSAIILAQ VMVSSHHAESLLVIHAVCSCHHPVLSDKGPSTGVI PGTSRPVLEGNLRGPGVPPGLSPSDYPGIGFRKVL S
111	도 1B 서열	핵산	ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGG GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTACT CAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGGGTAGTC GGGGGG
112	도 1B 서열	아미노산, 3 글자 형식	THR ILE ALA SER ILE ALA ALA LYS GLU GLU GLY VAL SER LEU GLU LYS ARG GLU ALA GLU ALA THR GLN ASP LEU PRO GLU THR ASN ALA ARG VAL VAL GLY GLY

[0494]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
113	도 13 서열	핵산	CCGCGGACCCAGGACTTTCCAGAAACCAACGCC CGGGTAGTTGGAGGGACCGAGGCTCAGAGGAA TTCTTGGCCATCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGG TCTGGAAGTTCGTGGGCTCACACCTGTGGAGGG ACCCTCATCAGGCAGAACTGGGTGATGACAGCC GCTCACTGCGTGGACAGAGAGTTGACCTTCCGT GTGGTGGTTGGAGAGCACAACCTGAACCAGAAC GATGGCACCGAGCAGTACGTGGGGGTGCAGAA GATCGTGGTGCATCCCTACTGGAACACCGACGA CGTGGCTGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGCG CCTGGCCCAGAGTGTAACCCTCAACAGCTACGT CCAGCTGGGTGTTCTGCCAAGGGCTGGGACCAT CCTGGCTAACAACAGTCCCTGCTACATCACAGG GTGGGGCCTGACCAGGACCAATGGGCAGCTGG CCCAGACCCTGCAGCAGGCTTACCTGCCCACCG TGGACTACGCCATCTGCTCCAGCTCCTCGTACT GGGGCTCCACCGTGAAGAACAGCATGGTGTGCG CCGGAGGGGACGGAGTTCGCTCTGGATGTCAG GGTGATTCTGGGGGCCCCCTTCATTGCTTGGTG AATGGTCAGTATGCTGTCCACGGTGTAACCAGCT TCGTGTCCCGCCTGGGCTGTAATGTCACCAGGA AGCCCACAGTCTTCACCAGGGTCTCTGCTTACAT CTCTTGGATAAATAACGTCATTGCCAGCAACTGA TAATCTAGA
114	도 14 서열	아미노산, 단일 글자 형식	TQDFPETNARVVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGS SWAHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDRELTFRVVVG EHNLNQNDGTEQYVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYI TGWGLTRTNGQLAQTLQQAYLPTVDYAICSSSSY WGSTVKNSMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLHCLV NGQYAVHGVTSFVSRLGCNVTRKPTVFTRVSAYIS WINNVIASN
115	트립신 활성화된 pPROT101-24-V의 분할 도메인 서열	아미노산, 3 글자 형식	Phe Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly
116	자가 활성화된 pPROT101-42-V의 분할 도메인 서열	아미노산	Phe Pro Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly

[0495]

서열 번호	설명	서열 유형	서열
117	자가 활성화된 pPROT101-49-V의 분할 도메인 서열	아미노산	Leu Pro His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
118	자가 활성화된 pPROT101-55L-V의 분할 도메인 서열	아미노산	Phe Pro Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly

[0496]

[0498] 8. 구체적 실시양태, 참고문헌 인용

[0499] 본 발명은 하기 특정 실시양태에 의해 예시된다.

[0500] 1. (i) 성숙한 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 엘라스타아제 활성화 서열을 포함하는 단백질.

[0501] 2. 제1실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 11을 포함하는 단백질.

[0502] 3. 제1실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 12를 포함하는 단백질.

[0503] 4. 제1실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 13을 포함하는 단백질.

[0504] 5. 제1실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 93을 포함하는 단백질.

[0505] 6. 제1실시양태, 제2실시양태 또는 제4실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 18, 서열 번호 20 또는 서열 번호 21중 임의의 하나를 포함하는 단백질.

[0506] 7. 제1실시양태에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 80을 포함하는 단백질.

[0507] 8. 제1실시양태 또는 제7실시양태에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 23, 서열 번호 72, 또는 서열 번호 73을 포함하는 단백질.

[0508] 9. 제1실시양태에 있어서, 서열 번호 74를 포함하는 분할 도메인을 포함하는 단백질.

[0509] 10. 제1실시양태 또는 제9실시양태에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 단백질.

[0510] 11. 제1실시양태 내지 제5실시양태 및 제7실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 64를 포함하는 단백질.

[0511] 12. 제1실시양태 내지 제5실시양태 및 제7실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 69를 포함하는 단백질.

[0512] 13. 서열 번호 74의 분할 도메인 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0513] 14. 제13실시양태에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 또는 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0514] 15. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 서열이 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6(예를 들어, 본원에서 엘라스타아제 아미노산 표시에 따른 P5' 잔기에 C-말단임)으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0515] 16. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6(예를 들어, 본원에서 엘라스타아제 아미노산 표시에 따른 P5' 잔기에 C-말단임)으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0516] 17. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 98% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0517] 18. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 비교하여 10개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0518] 19. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 말단까지의 위치 6으로부터 아미노산 서열에 비교하여 7개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0519] 20. 제13실시양태 또는 제14실시양태에 있어서, 서열 번호 84 또는 서열 번호 1의 위치 6으로부터 말단까지의 아미노산 서열에 비교하여 5개 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0520] 21. 제13실시양태 내지 제20실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_1"로 표시된 아미노산 잔기가 글루타메이트 또는 히스티딘인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0521] 22. 제13실시양태 내지 제21실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_4"로 표시된 아미노산 잔기가 프롤린인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0522] 23. 제13실시양태 내지 제22실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_5"로 표시된 아미노산 잔기가 알라닌인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0523] 24. 제13실시양태 내지 제23실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 74에서 "Xaa_1"로 표시된 아미노산 잔기가 히스티딘이고, 서열 번호 74에서 "Xaa_4"로 표시된 아미노산 잔기가 프롤린이며, 서열 번호 74에서 "Xaa_5"로 표시된 아미노산 잔기가 알라닌인 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0524] 25. 제13실시양태 내지 제24실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0525] 26. 제25실시양태에 있어서, 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0526] 27. 제25실시양태에 있어서, 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 제I형 프로엘라스타아제 단백질.

[0527] 28. 제1실시양태 내지 제27실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단리된 단백질.

[0528] 29. 제1실시양태 내지 제27실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 신호 서열을 포함하는 단백질.

[0529] 30. (i) 신호 서열; (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 엘라스타아제 활성화 서열; 및 (iii) 성숙한 엘라스타아제의 아미노산 서열을 포함하는 단백질.

[0530] 31. 제30실시양태에 있어서, 신호 서열이 피치아 파스토리스에서 작동가능한 단백질.

[0531] 32. 제30실시양태에 있어서, 신호 서열이 효모 α-인자 신호 펩티드인 단백질.

[0532] 33. 제32실시양태에 있어서, 효모 α-인자 신호 펩티드가 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 단백질.

[0533] 34. 제30실시양태에 있어서, 신호 서열이 포유동물 분비 신호 서열인 단백질.

[0534] 35. 제34실시양태에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 돼지 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 단백질.

[0535] 36. 제34실시양태에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 단백질.

[0536] 37. 제1실시양태 또는 제30실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 제I형 인간 엘라스타아제 인식 서열인 단백질.

[0537] 38. 제1실시양태 또는 제30실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 인간 제I형 엘라스타아제인 단백질.

[0538] 39. 제1실시양태 또는 제30실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제가 돼지 제I형 엘라스타아제인 단백질.

[0539] 40. 제1실시양태 내지 제39실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 단백질을 코딩하는 핵산.

[0540] 41. (i) 엘라스타아제의 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 (ii) 엘라스타아제 인식 서열을 포함하는 활성화 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0541] 42. 제41실시양태에 있어서, 단백질이 상기 활성화 서열에 작동적으로 연결된 신호 서열을 추가로 포함하는 핵산 분자.

[0542] 43. 제41실시양태 또는 제42실시양태에 있어서, 신호 서열이 피치아 파스토리스에서 작동가능한 핵산 분자.

[0543] 44. 제41실시양태 내지 제43실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 제I형 엘라스타아제 인식 서열인 핵산.

[0544] 45. 제41실시양태 내지 제44실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 제I형 인간 엘라스타아제 인식 서열인 핵산.

[0545] 46. 제41실시양태 내지 제45실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 11을 포함하는 핵산 분자.

[0546] 47. 제41실시양태 내지 제45실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 12를

포함하는 핵산 분자.

[0547] 48. 제41실시양태 내지 제45실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 13을 포함하는 핵산 분자.

[0548] 49. 제41실시양태 내지 제45실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 93을 포함하는 핵산 분자.

[0549] 50. 제41실시양태 내지 제46실시양태 및 제48실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제 인식 서열이 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 18, 서열 번호 20 또는 서열 번호21중 임의의 하나를 포함하는 핵산.

[0550] 51. 제41실시양태 내지 제50실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 80을 포함하는 핵산 분자.

[0551] 52. 제41실시양태 내지 제45실시양태 및 제51실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 활성화 서열이 서열 번호 23, 서열 번호 72, 또는 서열 번호 73을 포함하는 핵산 분자.

[0552] 53. 제41실시양태 내지 제46실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질이 서열 번호 74를 포함하는 분할 도메인을 포함하는 핵산 분자.

[0553] 54. 제41실시양태 내지 제46실시양태 및 제53실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 분할 도메인이 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55중 임의의 하나를 포함하는 핵산 분자.

[0554] 55. 제41실시양태 내지 제54실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제인 핵산.

[0555] 56. 제41실시양태 내지 제54실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제가 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제인 핵산.

[0556] 57. 제41실시양태 내지 제54실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 엘라스타아제가 서열 번호 5, 서열 번호 84, 서열 번호 87, 및 서열 번호 39중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 핵산.

[0557] 58. 제57실시양태에 있어서, 엘라스타아제가 서열 번호 1 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 핵산.

[0558] 59. 제42실시양태 내지 제58실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 신호 서열이 효모 α-인자 신호 펩티드인 핵산 분자.

[0559] 60. 제59실시양태에 있어서, 단백질이 서열 번호 34, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 96 및 서열 번호 97중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0560] 61. 제42실시양태 및 제44실시양태 내지 제58실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 신호 서열이 포유동물 분비 신호 서열인 핵산 분자.

[0561] 62. 제61실시양태에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 돼지 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 핵산 분자.

[0562] 63. 제61실시양태에 있어서, 포유동물 분비 신호 서열이 인간 제I형 엘라스타아제 신호 서열인 핵산 분자.

[0563] 64. 제41실시양태 내지 제63실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질이 서열 번호 88~91 및 98~103중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0564] 65. 제64실시양태에 있어서, 단백질이 서열 번호 6~9 및 64~69중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0565] 66. 제64실시양태에 있어서, 단백질이 표 2에 제시된 엘라스타아제 다형형태의 임의의 조합을 포함하는 핵산 분자.

[0566] 67. 제64실시양태에 있어서, 단백질이 표 3에 제시된 엘라스타아제 다형형태의 임의의 조합을 포함하는 핵산 분자.

[0567] 68. 제41실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자에 의해 코딩되는 단백질.

[0568] 69. 제68실시양태에 있어서, 단리된 단백질.

[0569] 70. 제41실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

[0570] 71. 제70실시양태에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된, 유전자 발현을 제어하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 벡터.

[0571] 72. 제70실시양태 또는 제71실시양태에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 다량체화되는 벡터.

[0572] 73. 제70실시양태 내지 제72실시양태중 어느 한 실시양태의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0573] 74. 제73실시양태에 있어서, 상기 벡터의 하나 이상의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0574] 75. 제74실시양태에 있어서, 상기 벡터의 하나의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0575] 76. 제74실시양태에 있어서, 상기 벡터의 2~5개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0576] 77. 제74실시양태 또는 제76실시양태에 있어서, 상기 벡터의 2개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0577] 78. 제74실시양태 또는 제76실시양태에 있어서, 상기 벡터의 3개의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0578] 79. 제41실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자의 하나 이상의 복사물을 자신의 게놈에 통합하여 포함하는 숙주 세포.

[0579] 80. 제79실시양태에 있어서, 상기 핵산 분자의 하나의 복사물이 자신의 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0580] 81. 제79실시양태에 있어서, 상기 핵산 분자의 2~5개의 복사물이 자신의 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0581] 82. 제79실시양태에 있어서, 상기 핵산 분자의 2개의 복사물이 자신의 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0582] 83. 제79실시양태에 있어서, 상기 핵산 분자의 3개의 복사물이 자신의 게놈내로 통합되는 숙주 세포.

[0583] 84. 제41실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자를 발현하도록 유전자 조작된 세포.

[0584] 85. 제84실시양태에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 세포.

[0585] 86. 제41실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 뉴클레오티드 서열을 발현하도록 유전자 조작된 피치아 파스토리스 세포.

[0586] 87. 제87실시양태에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 피치아 파스토리스 세포.

[0587] 88. 제1실시양태 내지 제27실시양태 및 제68실시양태중 어느 한 실시양태의 단백질을 포함하는 세포 배양 상청액.

[0588] 89. 단백질이 생산되는 조건하에 제84실시양태의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0589] 90. 단백질이 생산되는 조건하에 제85실시양태의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0590] 91. 단백질이 생산되는 조건하에 제86실시양태의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0591] 92. 단백질이 생산되는 조건하에 제87실시양태의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0592] 93. 제91실시양태 또는 제92실시양태에 있어서, 상기 조건이 pH 2~6에서의 성장 또는 유도 기간을 포함하는 방법.

[0593] 94. 제91실시양태 또는 제92실시양태에 있어서, 상기 조건이 22℃~28℃의 온도에서의 성장 또는 유도 기간을 포함하는 방법.

[0594] 95. 제89실시양태 내지 제92실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0595] 96. 제95실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0596] 97. 제89실시양태 내지 제96실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 방법.

[0597] 98. 제97실시양태에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0598] 99. 제97실시양태 또는 제98실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0599] 100. 제97실시양태 또는 제98실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 여기서 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

[0600] 101. 제89실시양태 내지 제100실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0601] 102. 제95실시양태에 있어서, 상청액을 회수함으로써 단백질을 회수하는 방법.

[0602] 103. 제95실시양태에 있어서, 단백질을 상청액으로부터 회수하는 방법.

[0603] 104. 제95실시양태 내지 제104실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질에 신호 서열이 결여된 방법.

[0604] 105. 제95실시양태 내지 제104실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질에 신호 서열 및 활성화 서열 둘다가 결여된 방법.

[0605] 106. 제89실시양태 내지 제92실시양태 및 제93실시양태 내지 제105실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질을 함유한 용액의 pH를 pH 6~12로 상승시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0606] 107. 제89실시양태 내지 제92실시양태 및 제93실시양태 내지 제106실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0607] 108. 제89실시양태 내지 제92실시양태 및 제93실시양태 내지 제106실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계, 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계, 또는 이들 두 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0608] 109. 제108실시양태에 있어서, 단백질을 자가활성화 조건에 두는 방법.

[0609] 110. 제109실시양태에 있어서, 자가활성화 조건에 둘 경우 단백질이 상청액중에 존재하는 방법.

[0610] 111. (a) 제1 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포를 배양하는 단계;

[0611] (b) 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포 배양액으로부터 회수하는 단계; 및

[0612] (c) 선택적으로, 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 활성화 조건에 노출시켜 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하여 엘라스타아제 단백질을 생산하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0613] 112. 제111실시양태에 있어서, 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 활성화 조건에 노출시켜 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 방법.

[0614] 113. 제112실시양태에 있어서, 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 상기 활성화 조건에 노출하기 이전에 정제하는 방법.

[0615] 114. 제113실시양태에 있어서, 상기 재조합 프로엘라스타아제 단백질을 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 정제하여, 상기 정제된 프로엘라스타아제 단백질 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물을 포함하는 용액이 생산되도록 하는 방법.

[0616] 115. 제111실시양태 내지 제114실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제1 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0617] 116. 제114실시양태 또는 제115실시양태에 있어서, 상기 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0618] 117. 제114실시양태 내지 제116실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제1 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 동일한 방법.

[0619] 118. 제114실시양태 내지 제116실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제1 및 제2 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상이한 방법.

[0620] 119. 제114실시양태 내지 제118실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0621] 120. 제114실시양태 내지 제118실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양물에 존재하고, 상기 배양물중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

[0622] 121. 제111실시양태 내지 제120실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 용액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0623] 122. 제111실시양태 내지 제120실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 용액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

[0624] 123. 제111실시양태 내지 제122실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0625] 124. 제123실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0626] 125. 제111실시양태 내지 제124실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포의 상청액으로부터 회수하는 방법.

[0627] 126. 제111실시양태 내지 제125실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 활성화 조건이 트립신으로의 노출을 포함하는 방법.

[0628] 127. 제111실시양태 내지 제125실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 활성화 조건이 자가활성화 조건인 방법.

[0629] 128. 제111실시양태 내지 제127실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0630] 129. 제111실시양태 내지 제128실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0631] 130. 제129실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0632] 131. 제129실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0633] 132. (a) 프로엘라스타아제 단백질을 동결건조하는 단계;

[0634] (b) 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 저장하는 단계;

[0635] (c) 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 재구성하는 단계; 및

[0636] (d) 재구성된 프로엘라스타아제 단백질을 활성화시키는 단계를 포함하여 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0637] 133. 제132실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질이 재조합체인 방법.

[0638] 134. 제133실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을, (i) 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포를 프로엘라스타아제 단백질이 발현되는 조건하에 배양하는 단계; 및 (ii) 프로엘라스타아제 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 과정에 의해 제조하거나 수득할 수 있는 방법.

[0639] 135. 제134실시양태에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0640] 136. 제135실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0641] 137. 제132실시양태 내지 제136실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 방법.

[0642] 138. 제137실시양태에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0643] 139. 제137실시양태 또는 제138실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0644] 140. 제137실시양태 또는 제138실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

[0645] 141. 제132실시양태 내지 제140실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 상기 숙주 세포의 상청액으로부터 회수하는 방법.

[0646] 142. 제132실시양태 내지 제141실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 동결건조 이전에 정제하는 방법.

[0647] 143. 제132실시양태 내지 제142실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 1일 이상, 1주 이상, 1개월 이상 또는 3개월 이상의 기간 동안 저장하는 방법.

[0648] 144. 제132실시양태 내지 제143실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질을 -80℃~+4℃의 온도에서 저장하는 방법.

[0649] 145. 제132실시양태 내지 제144실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 활성화 단계가 트립신 활성화를 포함하는 방법.

[0650] 146. 제132실시양태 내지 제144실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 활성화 단계가 자가활성화를 포함하는 방법.

[0651] 147. 제132실시양태 내지 제146실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0652] 148. 제132실시양태 내지 제147실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0653] 149. 제148실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0654] 150. 제148실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0655] 151. 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시키는 단계, 또는 이들 두 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0656] 152. 제151실시양태에 있어서, 상기 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을,

[0657] (a) 제84실시양태 또는 제86실시양태의 숙주 세포를 단백질이 발현되는 조건하에 배양하는 단계; 및

[0658] (b) 발현된 단백질을 회수하는 단계를 포함하여 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 생산하

는 과정에 의해 수득하거나 수득가능한 방법.

[0659] 153. 제152항에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0660] 154. 제153실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0661] 155. 제152실시양태 내지 제154실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 방법.

[0662] 156. 제155실시양태에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0663] 157. 제155실시양태 또는 제156실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0664] 158. 제155실시양태 또는 제156실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM인 방법.

[0665] 159. 제152실시양태 내지 제158실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 발현된 단백질을 회수하는 단계가 상청액을 회수함을 포함하는 방법.

[0666] 160. 제159실시양태에 있어서, 상기 자가활성화 단계를 상청액중에서 수행하는 방법.

[0667] 161. 제152실시양태 내지 제154실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 발현된 단백질을 상청액으로부터 회수하는 방법.

[0668] 162. 제161실시양태에 있어서, 상기 자가활성화 단계를 상청액중에서 수행하는 방법.

[0669] 163. 제161실시양태에 있어서, 발현된 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0670] 164. 제151실시양태 내지 제163실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두는 단계가, 회수된 단백질이 함유된 용액의 pH를 상승시킴을 포함하는 방법.

[0671] 165. 제164실시양태에 있어서, 용액의 pH를 염기성 pH로 상승시키는 방법.

[0672] 166. 제165실시양태에 있어서, 염기성 pH가 7~9의 범위인 방법.

[0673] 167. 제166실시양태에 있어서, 염기성 pH가 8인 방법.

[0674] 168. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 10 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0675] 169. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 5 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0676] 170. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 2 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0677] 171. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 1 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0678] 172. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.5 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0679] 173. 제164실시양태 내지 제167실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.25 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0680] 174. 제165실시양태 내지 제173실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.1 mg/㎖ 이상의 농도로 존재하는 방법.

[0681] 175. 제165실시양태 내지 제173실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질이 상기 용액중에 0.2 mg/

㎖ 이상의 농도로 존재하는 방법.

[0682] 176. 제165실시양태 내지 제175실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 0.5~8 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0683] 177. 제174실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 2~7 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0684] 178. 제177실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 6 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0685] 179. 제165실시양태 내지 제178실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH로의 상기 노출을 22℃~28℃의 온도에서 수행하는 방법.

[0686] 180. 제179실시양태에 있어서, 염기성 pH로의 상기 노출을 26℃의 온도에서 수행하는 방법.

[0687] 181. 제152실시양태 내지 제180실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 자가활성화하기 전에 저장하는 방법.

[0688] 182. 제181실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 저장하기 전에 동결건조하는 방법.

[0689] 183. 제182실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 동결건조하기 전에 정제하는 방법.

[0690] 184. 제181실시양태 내지 제183실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 1일 이상, 1주 이상, 1개월 이상 또는 3개월 이상의 기간 동안 저장하는 방법.

[0691] 185. 제184실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 80℃~+4℃의 온도에서 저장하는 방법.

[0692] 186. 제160실시양태 또는 제162실시양태에 종속되지 않는 한 제150실시양태 내지 제185실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 자가활성화된 제I형 프로엘라스타아제를 자가활성화 조건에 두기 이전에 정제하는 방법.

[0693] 187. 제150실시양태 내지 제186실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0694] 188. 제150실시양태 내지 제187실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0695] 189. 제150실시양태 내지 제187실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0696] 190. (a) 제84실시양태 또는 제86실시양태의 숙주 세포를 단백질이 발현되는 조건하에 배양하는 단계;

[0697] (b) 발현된 단백질을 회수하는 단계;

[0698] (c) 회수된 단백질을 정제하는 단계;

[0699] (d) 단백질을 함유한 용액의 pH를 상승시키거나, 회수된 단백질을 촉매량의 엘라스타아제와 접촉시켜 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0700] 191. 제190실시양태에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0701] 192. 제191실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0702] 193. 제190실시양태 내지 제192실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 방법.

[0703] 194. 제193실시양태에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0704] 195. 제193실시양태 또는 제194실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5~50 mM, 7.5~100 mM, 10~150 mM, 50~200 mM, 100~150 mM, 75~125 mM, 또는 90~110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0705] 196. 제193실시양태 또는 제194실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5~

50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

[0706] 197. 제190실시양태 내지 제196실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, (e) 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0707] 198. 제190실시양태 내지 제197실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0708] 199. 제190실시양태 내지 제197실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0709] 200. (a) 제84실시양태 또는 제86실시양태의 숙주 세포를 단백질이 발현되는 조건하에 배양하는 단계;

[0710] (b) 발현된 단백질을 회수하는 단계;

[0711] (c) 회수된 단백질을 성숙한 단백질이 생산될 때까지 염기성 pH에 노출시키는 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0712] 201. 제200실시양태에 있어서, 숙주 세포를 복합 배지에서 배양하는 방법.

[0713] 202. 제201실시양태에 있어서, 복합 배지가 완충된 메탄올-복합 배지 또는 완충된 글리세롤-복합 배지인 방법.

[0714] 203. 제200실시양태 내지 제202실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 숙주 세포를 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 배양하는 방법.

[0715] 204. 제203실시양태에 있어서, 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 각각 시트르산 나트륨, 석신산 나트륨 또는 아세트산 나트륨인 방법.

[0716] 205. 제203실시양태 또는 제204실시양태에 있어서, 하나의 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM의 농도로 존재하는 방법.

[0717] 206. 제203실시양태 또는 제204실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물이 상기 배양액에 존재하고, 상기 용액중 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 총 농도가 5～50 mM, 7.5～100 mM, 10～150 mM, 50～200 mM, 100～150 mM, 75～125 mM, 또는 90～110 mM인 방법.

[0718] 207. 제200실시양태 내지 제206실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH가 7～9인 방법.

[0719] 208. 제207실시양태에 있어서, 염기성 pH가 8인 방법.

[0720] 209. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 10 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0721] 210. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0722] 211. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 2 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0723] 212. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 1 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0724] 213. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 0.5 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0725] 214. 제200실시양태 내지 제208실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 0.25 ㎎/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 방법.

[0726] 215. 제209실시양태 내지 제214실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 0.1 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 방법.

[0727] 216. 제209실시양태 내지 제214실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH에 노출될 경우 회수된 단백질이 0.2 ㎎/㎖ 이상의 농도로 존재하는 방법.

[0728] 217. 제200실시양태 내지 제214실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 0.5~8 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0729] 218. 제217실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 2~7 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0730] 219. 제218실시양태에 있어서, 회수된 단백질을 6 시간의 기간 동안 염기성 pH에 노출시키는 방법.

[0731] 220. 제220실시양태 내지 제219실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 염기성 pH로의 상기 노출을 22℃~28℃의 온도에서 수행하는 방법.

[0732] 221. 제220실시양태에 있어서, 염기성 pH로의 상기 노출을 26℃의 온도에서 수행하는 방법.

[0733] 222. 제200실시양태 내지 제221실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, (d) 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0734] 223. 제150실시양태 내지 제222실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제인 방법.

[0735] 224. 제150실시양태 내지 제222실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제인 방법.

[0736] 225. (a) 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 자가활성화 조건에 두어 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계; 및

[0737] (b) 성숙한 엘라스타아제 단백질을 제형화하는 단계를 포함하여 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제형을 생산하는, 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제형을 생산하는 방법.

[0738] 226. 제225실시양태에 있어서, 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질이 재조합체인 방법.

[0739] 227. 제226실시양태에 있어서, (a) 단계 이전에, 프로엘라스타아제 단백질이 발현되는 조건하에 성장한, 상기 자가활성화된 프로엘라스타아제 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포의 배양액으로부터 프로엘라스타아제 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0740] 228. 제225실시양태 또는 제226실시양태에 있어서, (b) 단계 이전에, 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0741] 229. 제225실시양태 내지 제228실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제형화 단계가 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조함을 포함하는 방법.

[0742] 230. 제229실시양태에 있어서, 동결건조 이전에 성숙한 엘라스타아제 단백질을 완충액 또는 완충액 구성성분과 혼합하지 않는 방법.

[0743] 231. 제230실시양태에 있어서, 동결건조한 후 성숙한 엘라스타아제 단백질을 하나 이상의 완충액 구성성분과 혼합하는 방법.

[0744] 232. 제229실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조 이전에 완충액 또는 하나 이상의 완충액 구성성분과 혼합하는 방법.

[0745] 233. 제231실시양태 또는 제232실시양태에 있어서, 완충액이 포스페이트 완충된 염수("PBS") 완충액이거나 완충액 구성성분이 PBS 완충액 구성성분인 방법.

[0746] 234. 제231실시양태 내지 제233실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완충액이 덱스트란을 포함하거나 완충액 구성성분이 덱스트란을 포함하는 방법.

[0747] 235. 제234실시양태에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 방법.

[0748] 236. 제230실시양태 내지 제235실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완충액이 폴리소르베이트 80을 포함하는 방법.

[0749] 237. 제229실시양태 내지 제236실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제형화 단계가 동결건조된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 액체로 재구성함을 추가로 포함하는 방법.

[0750] 238. 제237실시양태에 있어서, 액체가 물인 방법.

[0751] 239. 제237실시양태에 있어서, 액체가 완충액인 방법.

[0752] 240. 제239실시양태에 있어서, 완충액이 완전 강도 완충액, 완전 강도 초과 완충액, 또는 완전 강도 미만 완충액인 방법.

[0753] 241. 제237실시양태 내지 제240실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 재구성시 완전 강도 완충액, 완전 강도 초과 완충액, 또는 완전 강도 미만 완충액중의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 용액을 생산하는 방법.

[0754] 242. 제241실시양태에 있어서, 완충액 구성성분이 동결건물에 존재하거나, 재구성시 첨가되거나, 또는 이들 둘 다인 방법.

[0755] 243. 제240실시양태 내지 제242실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완전 강도 완충액이 1X PBS를 포함하는 방법.

[0756] 244. 제240실시양태 또는 제241실시양태에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.1X PBS~0.5X PBS를 포함하는 방법.

[0757] 245. 제244실시양태에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.1X PBS를 포함하는 방법.

[0758] 246. 제244실시양태에 있어서, 완전 강도 미만 완충액이 0.5X PBS를 포함하는 방법.

[0759] 247. 제240실시양태 또는 제241실시양태에 있어서, 완전 강도 초과 완충액이 1.1X PBS~3X PBS를 포함하는 방법.

[0760] 248. 제247실시양태에 있어서, 완전 강도 초과 완충액이 1.5X PBS~2X PBS를 포함하는 방법.

[0761] 249. 제241실시양태 내지 제248실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완충액이 덱스트란을 포함하는 방법.

[0762] 250. 제249실시양태에 있어서, 덱스트란이 덱스트란 18인 방법.

[0763] 251. 제241실시양태 내지 제250실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완충액이 폴리소르베이트 80을 포함하는 방법.

[0764] 252. 제241실시양태 내지 제251실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 완충액이 7~8의 pH로 존재하는 방법.

[0765] 253. 제252실시양태에 있어서, 완충액이 7.4의 pH로 존재하는 방법.

[0766] 254. 제237실시양태 내지 제253실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 0.001 ㎎/㎖~50 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 방법.

[0767] 255. 제254실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 0.1 ㎎/㎖~40 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 방법.

[0768] 256. 제255실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 5 ㎎/㎖~30 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 방법.

[0769] 257. 제256실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 10 ㎎/㎖~20 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 방법.

[0770] 258. 제225실시양태 내지 제257실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제형이 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물인 방법.

[0771] 259. 제225실시양태 내지 제258실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0772] 260. 제225실시양태 내지 제258실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0773] 261. (a) 제151실시양태 내지 제181실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 따라 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계;

[0774] (b) 성숙한 제I형 엘라스타아제를 단리하는 단계; 및

[0775] (c) 상기 단리된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 동결건조하는 단계를 포함하여 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 방법.

[0776] 262. 제261실시양태에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 95%~100% 순수한 방법.

[0777] 263. 제261실시양태 또는 제262실시양태에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 95% 이상 순수한 방법.

[0778] 264. 제261실시양태 또는 제262실시양태에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 98% 이상 순수한 방법.

[0779] 265. 제261실시양태 내지 제264실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제가 균질하게 정제되는 방법.

[0780] 266. 제261실시양태 내지 제265실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0781] 267. 제261실시양태 내지 제265실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0782] 268. 제130실시양태, 제149실시양태, 제188실시양태, 제198실시양태, 제223실시양태, 제259실시양태, 및 제267실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 방법.

[0783] 269. 제268실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 방법.

[0784] 270. 제131실시양태, 제150실시양태, 제189실시양태, 제199실시양태, 제224실시양태, 제260실시양태, 및 제268실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 39로 구성되는 방법.

[0785] 271. 제111실시양태 내지 제128실시양태, 제132실시양태 내지 제148실시양태, 제151실시양태 내지 제197실시양태 및 제225실시양태 내지 제257실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 프로엘라스타아제 단백질이 제13실시양태 내지 제27실시양태중 어느 한 실시양태의 단백질인 방법.

[0786] 272. 제200실시양태 내지 제222실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 발현된 단백질이 제13실시양태 내지 제27실시양태중 어느 한 실시양태의 단백질인 방법.

[0787] 273. 제149실시양태, 제188실시양태, 제198실시양태, 및 제223실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

[0788] 274. 제273실시양태에 있어서, 1~40 U/mg 단백질의 비활성을 갖는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

[0789] 275. 제150실시양태, 제189실시양태, 제199실시양태, 및 제224실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제.

[0790] 276. 제275실시양태에 있어서, 10~100 U/mg 단백질의 비활성을 갖는 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제.

[0791] 277. 치료 효과량의 (a) 제273실시양태 또는 제274실시양태의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제259실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 약학 조성물.

[0792] 278. 제277실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 약학 조성물.

[0793] 279. 제278실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 약학 조성물.

[0794] 280. 치료 효과량의 (a) 제275실시양태 또는 제276실시양태의 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제260실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 약학 조성물.

[0795] 281. 제280실시양태에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 39로 구성되는 약학 조성물.

[0796] 282. (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 하기

특성중 하나 이상을 특징으로 하는 약학 조성물:

[0797] (a) 조성물에 트립신이 존재하지 않고;

[0798] (b) 조성물에 트립신이 실질적으로 존재하지 않고;

[0799] (c) 조성물에 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70 및/또는 71로 구성된 임의의 단백질이 존재하지 않고;

[0800] (d) 조성물에 서열 번호 2, 3, 37, 38, 70 및/또는 71로 구성된 임의의 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0801] (e) 조성물에 박테리아 단백질이 존재하지 않고;

[0802] (f) 조성물에 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0803] (g) 조성물에 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 존재하지 않고;

[0804] (h) 조성물에 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는다.

[0805] 283. (i) 치료 효과량의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 하기 특성중 하나 이상을 특징으로 하는 약학 조성물:

[0806] (a) 조성물에 트립신이 존재하지 않고;

[0807] (b) 조성물에 트립신이 실질적으로 존재하지 않고;

[0808] (c) 조성물에 서열 번호 70 및 71로 구성된 임의의 단백질이 존재하지 않고;

[0809] (d) 조성물에 서열 번호 2 및 3으로 구성된 임의의 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0810] (e) 조성물에 박테리아 단백질이 존재하지 않고;

[0811] (f) 조성물에 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0812] (g) 조성물에 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 존재하지 않고;

[0813] (h) 조성물에 상기 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는다.

[0814] 284. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 2개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0815] 285. 제284실시양태에 있어서, 상기 2개 이상의 특성이 (a) 및 (c)를 포함하는 약학 조성물.

[0816] 286. 제284실시양태에 있어서, 상기 2개 이상의 특성이 (b) 및 (d)를 포함하는 약학 조성물.

[0817] 287. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 3개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0818] 288. 제284실시양태에 있어서, 상기 3개 이상의 특성이 (a), (c) 및 (e)를 포함하는 약학 조성물.

[0819] 289. 제284실시양태에 있어서, 상기 3개 이상의 특성이 (b), (d) 및 (f)를 포함하는 약학 조성물.

[0820] 290. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 4개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0821] 291. 제284실시양태에 있어서, 상기 4개 이상의 특성이 (a), (c), (e) 및 (g)를 포함하는 약학 조성물.

[0822] 292. 제284실시양태에 있어서, 상기 4개 이상의 특성이 (b), (d), (f) 및 (h)를 포함하는 약학 조성물.

[0823] 293. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 5개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0824] 294. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 6개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0825] 295. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 특성 (a)~(h)중 7개 이상의 특성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0826] 296. 제282실시양태 또는 제283실시양태에 있어서, 모든 특성 (a)~(h)를 특징으로 하는 약학 조성물.

[0827] 297. 제282실시양태 내지 제296실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 85, 86, 94 및 95로 구성된 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

[0828] 298. 제282실시양태 내지 제297실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 85 및 서열 번호 86으로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

[0829] 299. 제282실시양태 내지 제297실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 94 및 서열 번호 95로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

[0830] 300. 제282실시양태 내지 제297실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 106, 107 및 108로 구성된 1개, 2개, 또는 3개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 약학 조성물.

[0831] 301. 제282실시양태 내지 제300실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 약학적으로 허용되는 수준의 내독소를 함유하는 약학 조성물.

[0832] 302. 제301실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물이 액체 조성물이고, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 8 EU/㎖ 또는 그 미만인 약학 조성물.

[0833] 303. 제302실시양태에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 5 EU/㎖ 또는 그 미만인 약학 조성물.

[0834] 304. 제301실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물이 고체 조성물이고, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 그램 당 10 EU 또는 그 미만인 약학 조성물.

[0835] 305. 제304실시양태에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 수준의 내독소가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 그램 당 5 EU 또는 그 미만인 약학 조성물.

[0836] 306. 제282실시양태 내지 제305실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 1~40 U/㎎ 단백질의 비활성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0837] 307. 제306실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 25~35 U/㎎ 단백질의 비활성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0838] 308. 제306실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 10 U/㎎ 단백질 초과의 비활성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0839] 309. 제306실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 20 U/㎎ 단백질 초과의 비활성을 특징으로 하는 약학 조성물.

[0840] 310. 제282실시양태 내지 제309실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 본질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성되는 약학 조성물.

[0841] 311. 제310실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 본질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 약학 조성물.

[0842] 312. 제282실시양태 내지 제311실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 트립신 활성이 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 4 ng 미만에 상응하는 약학 조성물.

[0843] 313. 제312실시양태에 있어서, 트립신 활성이 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 2 ng 미만에 상응하는 약학 조성물.

[0844] 314. 1 ㎎/㎖의 단백질 농도로 재구성될 경우, 트립신 활성이 2 ng/㎖ 트립신 미만에 상응하는, 본질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성된 단백질의 동결건조된 제형.

[0845] 315. 제314실시양태에 있어서, 수분 함량이 5% 미만인 동결건조된 제형.

[0846] 316. 제315실시양태에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 및 클로라이드 이온을 포함하는 동결건조된 제형.

[0847] 317. 제315실시양태에 있어서, 폴리소르베이트-80을 포함하는 동결건조된 제형.

[0848] 318. 제315실시양태에 있어서, 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

[0849] 319. 제318실시양태에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

[0850] 320. 제311실시양태에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 폴리소르베이트-80을 포함하는 동결건조된 제형.

[0851] 321. 제314실시양태에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

[0852] 322. 제321실시양태에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

[0853] 323. 제314실시양태에 있어서, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온, 폴리소르베이트-80, 및 덱스트란을 포함하는 동결건조된 제형.

[0854] 324. 제323실시양태에 있어서, 덱스트란이 덱스트란-18인 동결건조된 제형.

[0855] 325. 본질적으로 서열 번호 5, 84, 또는 87로 구성된 단백질의 0.1 ㎎/㎖ 이상의 용액을 포함하고, 여기서 트립신 활성이 2 ng/㎖ 트립신 미만에 상응하는 액체 제형.

[0856] 326. 제325실시양태에 있어서, 용액이 완충된 용액인 액체 제형.

[0857] 327. 제326실시양태에 있어서, 용액이 pH 7~8로 완충된 액체 제형.

[0858] 328. 제326실시양태에 있어서, 용액이 PBS인 액체 제형.

[0859] 329. 제328실시양태에 있어서, 용액이 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 인산 칼륨, 및 10 mM 인산 나트륨을 포함하는 액체 제형.

[0860] 330. 제325실시양태 내지 제329실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 부형제를 추가로 포함하는 액체 제형.

[0861] 331. 제330실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부형제가 덱스트란-18을 포함하는 액체 제형.

[0862] 332. 제331실시양태에 있어서, 덱스트란-18이 상기 용액의 8% 중량/부피의 양으로 존재하는 액체 제형.

[0863] 333. 제330실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부형제가 폴리소르베이트-80을 포함하는 액체 제형.

[0864] 334. 제333실시양태에 있어서, 폴리소르베이트-80이 상기 용액의 0.01% 중량/부피의 양으로 존재하는 액체 제형.

[0865] 335. 제325실시양태 내지 제334실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 용액중 상기 단백질의 농도가 0.001 ㎎/㎖~40 ㎎/㎖의 범위인 액체 제형.

[0866] 336. 제335실시양태에 있어서, 상기 용액중 상기 단백질의 농도가 0.1 ㎎/㎖~20 ㎎/㎖ 범위인 액체 제형.

[0867] 337. 제325실시양태 내지 제336실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 보존제, 가용화제 및 착색제를 추가로 포함하는 액체 제형.

[0868] 338. 제325실시양태 내지 제337실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 5, 84 또는 87의 상기 단백질 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 액체 제형.

[0869] 339. 제325실시양태 내지 제338실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않는 액체 제형.

[0870] 340. 제225실시양태 내지 제258실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 제조되거나 수득가능한 제형.

[0871] 341. 제340실시양태에 있어서, 액체 제형인 제형.

[0872] 342. 제340실시양태 또는 제341실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 제형.

[0873] 343. 제342실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 제형.

[0874] 344. 제342실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 제형.

[0875] 345. 제340실시양태 또는 제341실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 돼지 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 제형.

[0876] 346. 제345실시양태에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 39로 구성되는 제형.

[0877] 347. (a) 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물을 포함하는 조성물을 정확하게 프로세싱된 성숙한 효소가 활성인 pH에 두는 단계;

[0878] (b) 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 분해될 때까지 이러한 pH를 유지시키는 단계를 포함하여 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 제거하는, 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 제거하는 방법.

[0879] 348. 제347실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질에 비교하여 하나 이상의 추가의 또는 소수의 아미노산을 N-말단에 함유하는 방법.

[0880] 349. 제347실시양태 또는 제348실시양태에 있어서, 상기 pH가 5~12인 방법.

[0881] 350. 제347실시양태 내지 제349실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~100% 분해하는 방법.

[0882] 351. 제348실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~99% 분해하는 방법.

[0883] 352. 제348실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~98% 분해하는 방법.

[0884] 353. 제348실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~95% 분해하는 방법.

[0885] 354. 제348실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~90% 분해하는 방법.

[0886] 355. 제350실시양태 내지 제354실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50% 이상 분해하는 방법.

[0887] 356. 제355실시양태에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 50% 이상 분해하는 방법.

[0888] 357. 제350실시양태 내지 제354실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 75% 이상 분해하는 방법.

[0889] 358. 제357실시양태에 있어서, 하나 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 75% 이상 분해하는 방법.

[0890] 359. 제357실시양태에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 75% 이상 분해하는 방법.

[0891] 360. 제350실시양태 내지 제354실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 90% 이상 분해하는 방법.

[0892] 361. 제360항에 있어서, 하나 보다 많은 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 90% 이상 분해하는 방법.

[0893] 362. 제360항에 있어서, 혼합물중 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 모두를 90% 이상 분해하는 방법.

[0894] 363. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 10

mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0895] 364. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 5 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0896] 365. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 2 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0897] 366. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 1 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0898] 367. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 0.5 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0899] 368. 제347실시양태 내지 제362실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 0.25 mg/㎖ 또는 그 미만의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0900] 369. 제363실시양태 내지 제368실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 0.1 mg/㎖ 이상의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0901] 370. 제363실시양태 내지 제368실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물이, 총 엘라스타아제 단백질이 0.2 mg/㎖ 이상의 농도로 존재하는 액체 조성물인 방법.

[0902] 371. 제347실시양태 내지 제370실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조성물중 트립신 활성이 총 엘라스타아제 단백질의 mg 당 4 ng/㎖ 트립신 미만인 방법.

[0903] 372. 제347실시양태 내지 제370실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조성물중 트립신 활성이 총 엘라스타아제 단백질의 mg 당 2 ng/㎖ 트립신 미만인 방법.

[0904] 373. 제347실시양태 내지 제372실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물에 서열 번호 104로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고/않거나, 서열 번호 105로 구성된 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는 방법.

[0905] 374. (i) 제261실시양태 내지 제265실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 생산하는 단계; 및 (ii) 동결건조된 성숙한 제I형 엘라스타아제를 물 또는 약학적으로 허용되는 담체에서 재구성하는 단계를 포함하여 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 방법.

[0906] 375. 제314실시양태 내지 제324실시양태중 어느 한 실시양태의 동결건조된 제형을 물 또는 약학적으로 허용되는 담체에서 재구성하는 단계를 포함하여 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는, 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 약학 조성물을 생산하는 방법.

[0907] 376. 제374실시양태 또는 제375실시양태에 있어서, 약학 조성물이 포스페이트를 포함하는 방법.

[0908] 377. 제374실시양태 내지 제376실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제인 방법.

[0909] 378. 제377실시양태에 있어서, 1~40 U/mg 단백질의 비활성을 특징으로 하는 방법.

[0910] 379. 제377실시양태에 있어서, 성숙한 제I형 엘라스타아제가 25~35 U/mg 단백질의 비활성을 특징으로 하는 방법.

[0911] 380. 제377실시양태 내지 제379실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~100%를 유지하는 방법.

[0912] 381. 제377실시양태 내지 제379실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~98%를 유지하는 방법.

[0913] 382. 제377실시양태 내지 제379실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4

℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~95%를 유지하는 방법.

[0914] 383. 제377실시양태 내지 제379실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~90%를 유지하는 방법.

[0915] 384. 제377실시양태 내지 제379실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~80%를 유지하는 방법.

[0916] 385. 제377실시양태 내지 제384실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물중 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제가 4℃에서 1주 저장한 후 그의 비활성의 70% 이상을 유지하는 방법.

[0917] 386. 제374실시양태 내지 제385실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 약학 조성물.

[0918] 387. (a) 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물, (b) 제325실시양태 내지 제339실시양태중 어느 한 실시양태의 액체 제형, 또는 (c) 제341실시양태의 제형을, 동맥 또는 정맥의 직경을 증가시키기에 충분한 투약량으로 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 직경을 치료학적으로 증가시키기 위한 방법.

[0919] 388. 제387실시양태에 있어서, 혈관의 직경, 혈관의 내강 직경, 또는 둘다를 증가시키는 방법.

[0920] 389. (a) 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물, (b) 제325실시양태 내지 제339실시양태중 어느 한 실시양태의 액체 제형, 또는 (c) 제341실시양태의 제형을, 동맥 또는 정맥의 혈관경련을 예방하거나 치료하기에 충분한 투약량으로 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 혈관경련을 예방하거나 치료하기 위한 방법.

[0921] 390. (a) 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물, (b) 제325실시양태 내지 제339실시양태중 어느 한 실시양태의 액체 제형, 또는 (c) 제341실시양태의 제형을 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 동맥 또는 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 동맥 또는 정맥의 직경을 확장시키는, 치료가 필요한 인간 피험체에서 폐색된 동맥 또는 정맥을 치료하기 위한 방법.

[0922] 391. (a) 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물, (b) 제325실시양태 내지 제339실시양태중 어느 한 실시양태의 액체 제형, 또는 (c) 제341실시양태의 제형을 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 동맥 또는 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 동맥 또는 정맥의 직경을 확장시키는, 치료가 필요한 인간 피험체에서 동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관에 연결된 동맥 또는 정맥을 치료하기 위한 방법.

[0923] 392. (a) 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물, (b) 제325실시양태 내지 제339실시양태중 어느 한 실시양태의 액체 제형, 또는 (c) 제341실시양태의 제형을 인간 피험체에서 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 정맥의 직경을 확장시키는, 혈액투석에 사용하기 위한 인간 피험체에서의 정맥을 치료하기 위한 방법.

[0924] 393. 제387실시양태 내지 제392실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 전달 장치의 일부를 동맥 또는 정맥의 벽내로 삽입하여 엘라스타아제를 동맥 또는 정맥의 벽에 전달하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0925] 394. 제387실시양태 내지 제393실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 카테터에 의해 투여하는 방법.

[0926] 395. 제387실시양태 내지 제394실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 동맥 또는 정맥의 벽내로 직접 투여하는 방법.

[0927] 396. 제387실시양태 내지 제395실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 동맥 또는 정맥이 폐색된 방법.

[0928] 397. 제396실시양태에 있어서, 동맥 또는 정맥이 협착에 의해 폐색된 방법.

[0929] 398. 제397실시양태에 있어서, 폐색이 치료 이전에 불충분한 부피의 혈액 통과를 허용하는 방법.

[0930] 399. 제398실시양태에 있어서, 폐색이 협착인 방법.

[0931] 400. 제399실시양태에 있어서, 동맥 또는 정맥이 내막 비후(intimal hyperplasia)에 의해 폐색되는 방법.

[0932] 401. 제387실시양태 내지 제400실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 약학 조성물 또는 액체 제형을 폐색된 관상 동맥 또는 말초 동맥에 투여하는 방법.

[0933] 402. 제387실시양태 내지 제395실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 동맥 또는 정맥이 내막 비후에 의해 폐색되기 쉬운 방법.

[0934] 403. 제387실시양태 내지 제400실시양태 및 제402실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물을 정맥의 벽에 투여하는 방법.

[0935] 404. 제403실시양태에 있어서, 정맥이 동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관에 연결된 방법.

[0936] 405. 제404실시양태에 있어서, 정맥을 혈액투석에 사용하기 위한 방법.

[0937] 406. 제405실시양태에 있어서, 정맥을 동맥에 직접 연결하거나 정맥을 이식편을 경유하여 동맥에 연결하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0938] 407. 제387실시양태 내지 제394실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 조성물을 외과적으로 노출된 동맥 또는 정맥의 외막 표면에 투여하는 방법.

[0939] 408. 제387실시양태 내지 제407실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물, 액체 제형 또는 제형중의 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 각각 인간 제I형 성숙한 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0940] 409. 제408실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 방법.

[0941] 410. 제408실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 구성되는 방법.

[0942] 411. 제387실시양태 내지 제407실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 약학 조성물, 액체 제형 또는 제형중 성숙한 제I형 엘라스타아제 단백질이 각각 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질인 방법.

[0943] 412. 제411실시양태에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 39로 구성되는 방법.

[0944] 413. 0.0033 ㎎~200 ㎎의 (a) 제273실시양태 또는 제274실시양태의 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제259실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 단위 투여제(unit dosage).

[0945] 414. 제413실시양태에 있어서, 성숙한 인간 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 5, 서열 번호 84, 또는 서열 번호 87로 구성되는 단위 투여제.

[0946] 415. 0.0033 ㎎~200 ㎎의 (a) 제275실시양태 또는 제276실시양태의 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 또는 (b) 제260실시양태의 방법에 의해 생산되거나 수득가능한 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제의 제형을 포함하는 단위 투여제.

[0947] 416. 제415실시양태에 있어서, 성숙한 돼지 제I형 엘라스타아제 단백질이 본질적으로 서열 번호 39로 구성되는 단위 투여제.

[0948] 417. 제413실시양태 내지 제416실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 0.5 ㎎~50 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

[0949] 418. 제417실시양태에 있어서, 1 ㎎~20 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

[0950] 419. 제418실시양태에 있어서, 5 ㎎~10 ㎎의 상기 성숙한 제I형 엘라스타아제를 포함하는 단위 투여제.

[0951] 420. 제413실시양태 내지 제419실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터 내에 존재하는 단위 투여제.

[0952] 421. 제1실시양태 내지 제39실시양태, 제68실시양태 및 제69실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 엘라스타아제

단백질 또는 제89실시양태 내지 제224실시양태, 제261실시양태 내지 제276실시양태, 및 제347실시양태 내지 제373실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 엘라스타아제 단백질, 제40실시양태 내지 제67실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 핵산, 제70실시양태 내지 제72실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 벡터, 제73실시양태 내지 제87실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 세포, 제88실시양태에 따른 세포 배양 상청액, 제314실시양태 내지 제346실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 엘라스타아제 제형 또는 제261실시양태 내지 제276실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 엘라스타아제 제형, 제277실시양태 내지 제313실시양태 및 제386실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 따른 약학 조성물, 또는 제374실시양태 내지 제385실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 약학 조성물, 또는 제415실시양태 내지 제420실시양태중 어느 한 실시양태에 따른 단위 투여제를 포함하는 키트.

[0953] 422. 제421실시양태에 있어서, 치료학적 키트인 키트.

[0954] 423. 제422실시양태에 있어서, 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터를 포함하는 키트.

[0955] 424. 제423실시양태에 있어서, 제작 키트인 키트.

[0956] 본 발명은, 제한되지 않지만, 서열 번호 64 및 서열 번호 69의 프로엘라스타아제 단백질에 초점을 맞춘 하기 구체적인 실시양태에 의해 추가로 예시된다:

[0957] 425. 서열 번호 64 또는 서열 번호 69의 아미노산을 포함하는 단백질.

[0958] 426. 제425실시양태에 있어서, 단리된 단백질.

[0959] 427. 제425실시양태의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0960] 428. 제427실시양태에 있어서, 단백질이 서열 번호 64 또는 서열 번호 69의 상기 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 신호 서열을 포함하는 핵산 분자.

[0961] 429. 제428실시양태에 있어서, 신호 서열이 피치아 파스토리스에서 작동가능한 핵산 분자.

[0962] 430. 제429실시양태에 있어서, 신호 서열이 효모 α-인자 신호 펩티드인 핵산 분자.

[0963] 431. 제427실시양태 내지 제430실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

[0964] 432. 제431실시양태에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 다량체화된 벡터.

[0965] 433. 제431실시양태의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0966] 434. 제433실시양태에 있어서, 하나 이상의 상기 벡터의 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합된 숙주 세포.

[0967] 435. 제434실시양태에 있어서, 상기 벡터의 2~5개 복사물이 숙주 세포 게놈내로 통합된 숙주 세포.

[0968] 436. 제433실시양태에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 다량체화된 숙주 세포.

[0969] 437. 제436실시양태에 있어서, 벡터가 상기 뉴클레오티드 서열의 2~5개 복사물을 포함하는 숙주 세포.

[0970] 438. 제427실시양태 내지 제430실시양태중 어느 한 실시양태의 핵산 분자를 발현하도록 유전자 조작된 세포.

[0971] 439. 제438실시양태에 있어서, 피치아 파스토리스 세포인 세포.

[0972] 440. 제439실시양태에 있어서, 뉴클레오티드 서열이 메탄올-유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 세포.

[0973] 441. 제425실시양태의 단백질을 포함하는 세포 배양 상청액.

[0974] 442. 제429실시양태의 세포를 서열 번호 64 또는 서열 번호 69의 단백질이 발현되는 조건하에 배양시키는 단계를 포함하는, 엘라스타아제 단백질을 생산하는 방법.

[0975] 443. 제442실시양태에 있어서, 상기 조건이 (i) pH 2~6에서의 성장 또는 유도 기간; (ii) 22℃~28℃의 온도에서의 성장 또는 유도 기간; (iii) 복합 배지에서의 배양; 또는 (iv) 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에서의 배양중 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두를 포함하는 방법.

[0976] 444. 제442실시양태 또는 제43실시양태에 있어서, 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0977] 445. 제442실시양태 내지 제444실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 서열 번호 64 또는 서열 번호 69의 상기 단백질을 활성화 조건에 노출시켜 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0978] 446. 제445실시양태에 있어서, 상기 단백질을 상기 활성화 조건으로의 노출 이전에 정제하는 방법.

[0979] 447. 제446실시양태에 있어서, 상기 단백질을 시트레이트, 석시네이트 또는 아세테이트 화합물의 존재하에 정제하는 방법.

[0980] 448. 제445실시양태 내지 제447실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0981] 449. 제448실시양태에 있어서, 정제된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0982] 450. 제441실시양태에 따른 세포 배양 상청액을 자가활성화 조건에 두어 성숙한 엘라스타아제 단백질을 생산하는 단계를 포함하는, 성숙한 엘라스타아제 단백질의 제조 방법.

[0983] 451. 제450실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0984] 452. 제451실시양태에 있어서, 정제된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 동결건조하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0985] 453. 제449실시양태 또는 제452실시양태의 방법에 의해 생산된 동결건조된 프로엘라스타아제 단백질을 포함하는 동결건조물을 재구성하는 단계를 포함하는 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물의 제조 방법.

[0986] 454. 제453실시양태에 있어서, 동결건조물이 (a) 하나 이상의 완충액 구성성분을 포함하거나, (b) 완충액 구성성분을 포함하지 않는 방법.

[0987] 455. 제454실시양태에 있어서, 동결건조물을 물 또는 완충액으로 재구성하는 방법.

[0988] 456. 제455실시양태에 있어서, 재구성시 완전 강도 완충액, 완전 강도 초과 완충액, 또는 완전 강도 미만 완충액중의 성숙한 엘라스타아제 단백질의 용액을 생산하는 방법.

[0989] 457. 제456실시양태에 있어서, 완충액이 포스페이트 완충된 염수인 방법.

[0990] 458. 제453실시양태 내지 제457실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 0.001 ㎎/㎖~50 ㎎/㎖의 농도로 재구성하는 방법.

[0991] 459. 제453실시양태 내지 제458실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 성숙한 엘라스타아제 단백질이 1~40 U/㎎ 단백질의 비활성을 갖는 방법.

[0992] 460. 하기 특성들중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 또는 7개 이상을 특징으로 하는, 성숙한 엘라스타아제 단백질을 포함하는 약학 조성물:

[0993] (a) 조성물에 트립신이 존재하지 않고;

[0994] (b) 조성물에 트립신이 실질적으로 존재하지 않고;

[0995] (c) 조성물에 서열 번호 70 및 71로 구성된 임의의 단백질이 존재하지 않고;

[0996] (d) 조성물에 서열 번호 2 및 3으로 구성된 임의의 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0997] (e) 조성물에 박테리아 단백질이 존재하지 않고;

[0998] (f) 조성물에 박테리아 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[0999] (g) 조성물에 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질 이외의 포유동물 단백질이 존재하지 않고;

[1000] (h) 조성물에 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질 이외의 포유동물 단백질이 실질적으로 존재하지 않고;

[1001] (i) 조성물에 서열 번호 85, 86, 94 및 95로 구성된 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고;

[1002] (j) 조성물에 서열 번호 106, 107 및 108로 구성된 1개, 2개 또는 3개 모두의 단백질이 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않고;

[1003] (k) 조성물이 약학적으로 허용되는 수준의 내독소를 함유하고;

[1004] (l) 조성물중 성숙한 엘라스타아제 단백질이 1~40 U/㎎ 단백질의 비활성을 특징으로 하고;

[1005] (m) 상기 조성물중 트립신 활성이 성숙한 엘라스타아제 단백질 1 ㎎ 당 4 ng 미만에 상응하고;

[1006] (n) 조성물이 폴리소르베이트-80을 포함하고;

[1007] (o) 조성물이 덱스트란을 포함하고;

[1008] (p) 조성물이 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 폴리소르베이트-80을 포함하고;

[1009] (q) 조성물이 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온 및 덱스트란을 포함하고;

[1010] (r) 조성물이 나트륨 이온, 칼륨 이온, 포스페이트 이온, 클로라이드 이온, 폴리소르베이트-80, 및 덱스트란을 포함하고;

[1011] (s) 상기 조성물중 성숙한 엘라스타아제 단백질이 4℃에서 1주 이상 저장된 후, 4℃에서 1개월 이상 저장된 후, 4℃에서 2개월 이상 저장된 후, 4℃에서 3개월 이상 저장된 후, 또는 4℃에서 6개월 이상 저장된 후 그의 비활성의 60%~100%를 유지하고;

[1012] (t) 조성물이 0.0033 ㎎~200 ㎎의 상기 성숙한 엘라스타아제 단백질의 단위 투여량을 포함한다.

[1013] 461. 제460실시양태에 있어서, 하기 그룹 (i)~(v)로부터 독립적으로 선택된 3개 이상의 특징, 4개 이상의 특징 또는 5개의 특징을 특징으로 하는 약학 조성물:

[1014] (i) (a), (b) 또는 (m)

[1015] (ii) (e) 또는 (f)

[1016] (iii) (g) 또는 (h)

[1017] (iv) (k)

[1018] (v) (l)

[1019] 462. 제461실시양태에 있어서, 상기 3개 이상 또는 상기 4개 이상의 특징중 2개의 특징이 그룹 (i) 및 (iv) 또는 (v)로부터 선택되는 약학 조성물.

[1020] 463. 제462실시양태에 있어서, 상기 4개 이상의 특징중 3개의 특징이 그룹 (i), (iv) 및 (v)로부터 선택되는 약학 조성물.

[1021] 464. 제460실시양태 내지 제463실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 제453실시양태 내지 제459실시양태중 어느 한 실시양태의 방법에 의해 생산되는 약학 조성물.

[1022] 465. (a) 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물을 포함하는 조성물을 정확하게 프로세싱된 성숙한 효소가 활성인 pH에 두는 단계;

[1023] (b) 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 분해될 때까지 이러한 pH를 유지시키는 단계를 포함하여, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 제거하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질 및 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질의 혼합물로부터 제거하는 방법

[1024] 466. 제465실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질이 정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질에 비교하여 하나 이상의 추가의 또는 소수의 아미노산을 N-말단에 함유하는 방법.

[1025] 467. 제465실시양태 또는 제466실시양태에 있어서, 상기 pH가 5~12 사이인 방법.

[1026] 468. 제465실시양태 내지 제467실시양태중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 하나 이상의 부정확하게 프로세싱된 성숙한 엘라스타아제 단백질을 50%~100% 분해하는 방법.

[1027] 469. 제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을, 동맥 또는 정맥의 직경을 증가시키기에 충분한 투약량으로 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 직경을 치료학적으로 증가시키기 위한 방법.

[1028] 470. 제469실시양태에 있어서, 혈관의 직경, 혈관의 내강 직경, 또는 둘다를 증가시키는 방법.

[1029] 471.제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을, 동맥 또는 정맥의 혈관경련을 예방하거나 치료하기에 충분한 투약량으로 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 혈관경련을 예방하거나 치료하기 위한 방법.

[1030] 472. 제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 동맥 또는 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 동맥 또는 정맥의 직경을 확장시키는, 치료가 필요한 인간 피험체에서 폐색된 동맥 또는 정맥을 치료하기 위한 방법.

[1031] 473. 제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을 인간 피험체에서 동맥 또는 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 동맥 또는 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 동맥 또는 정맥의 직경을 확장시키는, 치료가 필요한 인간 피험체에서 동정맥 혈액투석 이식편 또는 동정맥 누관과 연결된 동맥 또는 정맥을 치료하기 위한 방법.

[1032] 474. 제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을 인간 피험체에서 정맥의 벽에 국소 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 이러한 투여에 의해 정맥의 벽중의 엘라스틴이 단백질 가수분해되어 정맥의 직경을 확장시키는, 혈액투석에 사용하기 위한 인간 피험체에서의 정맥을 치료하기 위한 방법.

[1033] 475. 제460실시양태 내지 제464실시양태중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을 포함하는 키트.

[1034] 476. 제475실시양태에 있어서, 약학 조성물이 용기, 팩, 디스펜서, 또는 카테터 내에 존재하는 키트.

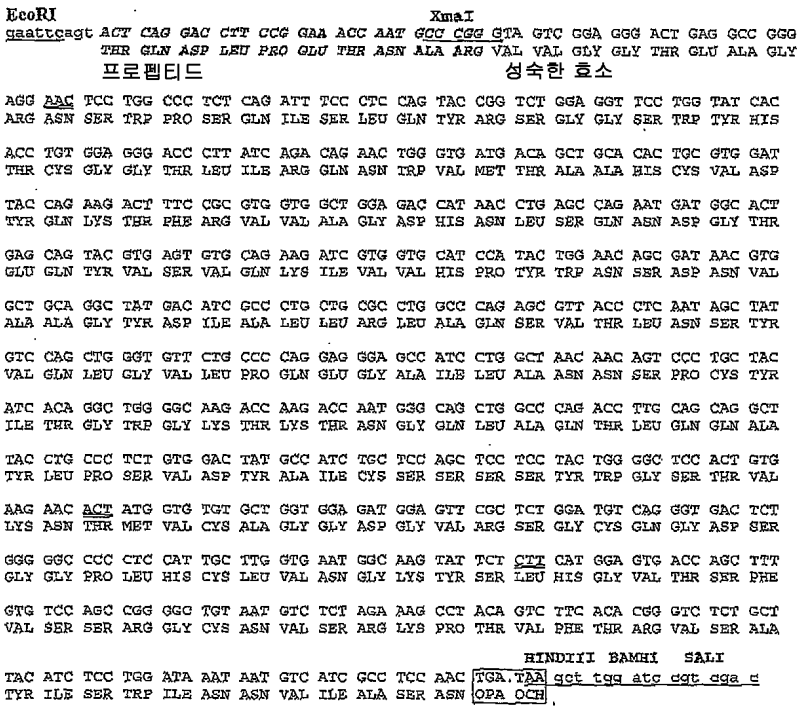
[1035] 2007년 12월 4일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/992,319호의 특허청구범위는 참고로 본원에 이의 전체가 인용되어 있고, 이러한 특허청구범위에 제시된 각각의 실시양태는 본원에 참고로 구체적인 실시양태로서 인용되어 있다.

[1036] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태에 의해 범주가 제한되지 않아야 한다. 실제로, 본원에 기재된 실시양태에 더하여 본 발명의 다양한 변형은 상기 기재내용 및 수반된 도면으로부터 당 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위의 범주내에 속하는 것으로 의도된다.

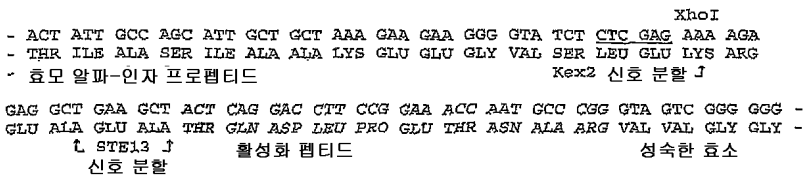
[1037] 특허 출원, 특허 및 과학 출판물을 비롯한 다양한 참고문헌이 본원에 인용되어 있고; 이러한 참고문헌 각각의 개시내용은 본원에 참고로 전체가 인용되어 있다.

도면

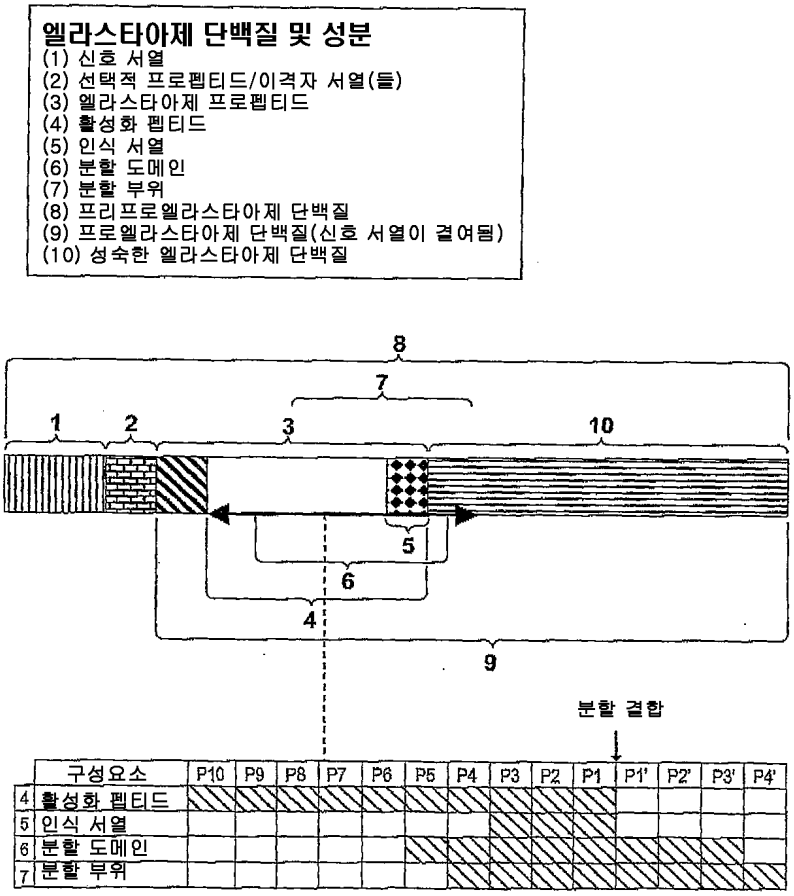
도면1a


EcoRI
XmaI
프로펩티드
성숙한 효소
HINDIII BAMHI SALI

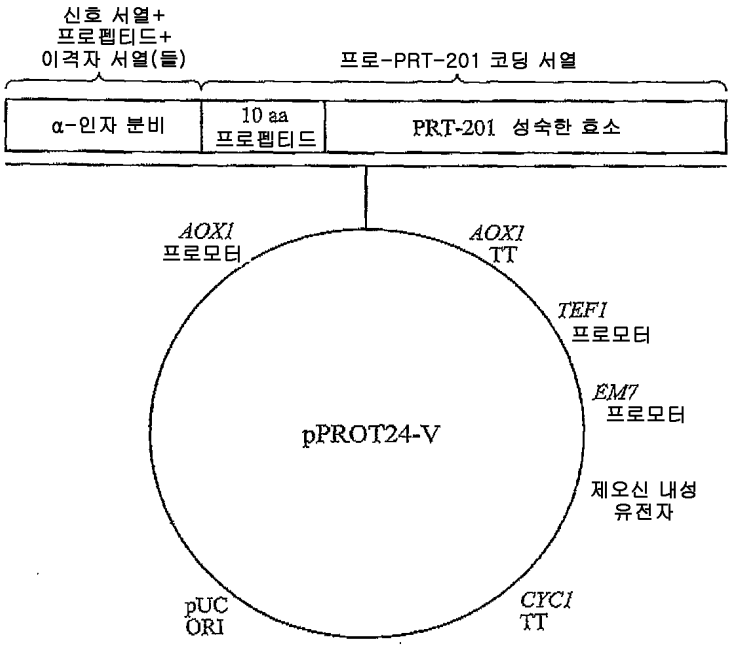
도면1b


XhoI
Kex2 신호 분할
STE13
신호 분할
활성화 펩티드
성숙한 효소

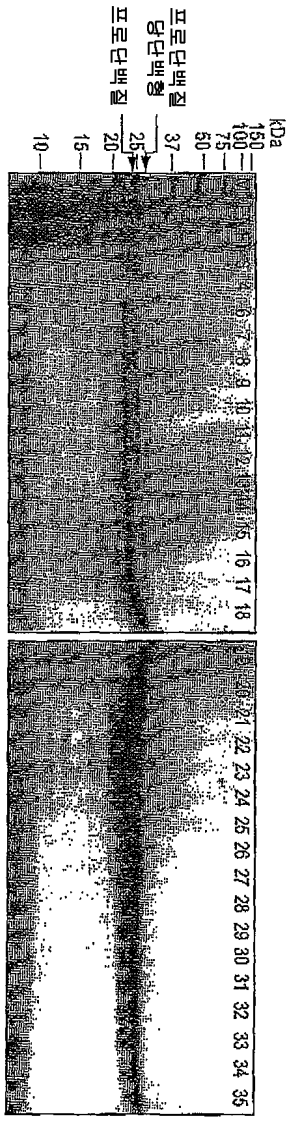
도면2


엘라스타아제 단백질 및 성분
(1) 신호 서열
(2) 선택적 프로펩티드/이격자 서열(들)
(3) 엘라스타아제 프로펩티드
(4) 활성화 펩티드
(5) 인식 서열
(6) 분할 도메인
(7) 분할 부위
(8) 프리프로엘라스타아제 단백질
(9) 프로엘라스타아제 단백질(신호 서열이 결여됨)
(10) 성숙한 엘라스타아제 단백질
8
7
1
2
3
10
5
6
4
9
분할 결합
구성요소
P10
P9
P8
P7
P6
P5
P4
P3
P2
P1
P1'
P2'
P3'
P4'
4 활성화 펩티드
5 인식 서열
6 분할 도메인
7 분할 부위

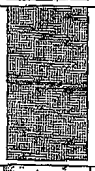
도면3


신호 서열+
프로펩티드+
이격자 서열(들)
프로-PRT-201 코딩 서열
α-인자 분비
10 aa
프로펩티드
PRT-201 성숙한 효소
AOX1
프로모터
AOX1
TT
TEF1
프로모터
EM7
프로모터
제오신 내성
유전자
CYC1
TT
pUC
ORI
pPROT24-V

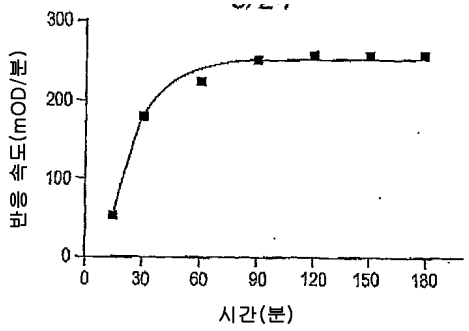
도면4


kDa
150
100
75
50
37
25
20
15
10
프로단백질
당단백형
프로단백질
1 2 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 35

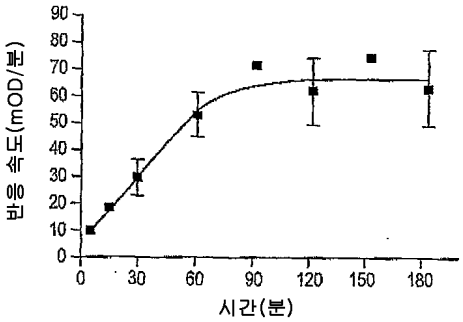
도면5a

프로펩티드 서열	SDS-PAGE 분석	진탕 플라스크 수율	진탕 플라스크 안정성	전환률	%N-말단 변형체
24		높음	높음	빠름 도 5b	20%
42		낮음	낮음	중간 도 5c	25%
48		중간	낮음	빠름 도 5d	15%
49		높음	높음	느림 도 5e	35%
55		중간 -빠름	중간	중간 도 5f	15%

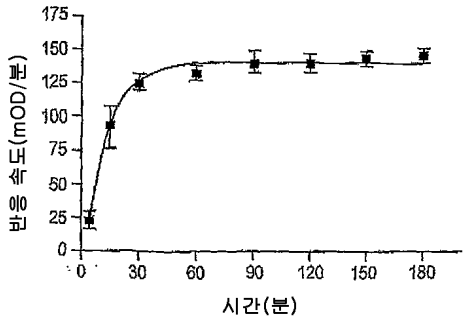
도면5b



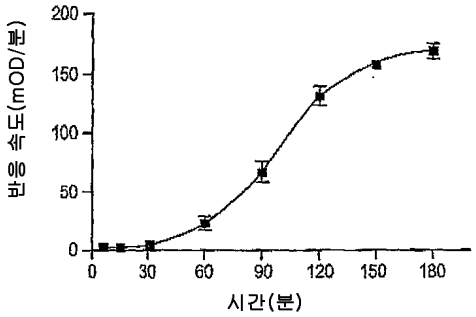
도면5c



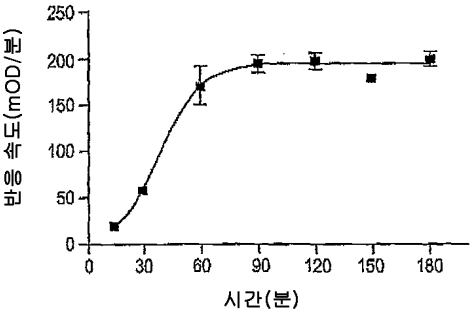
도면5d



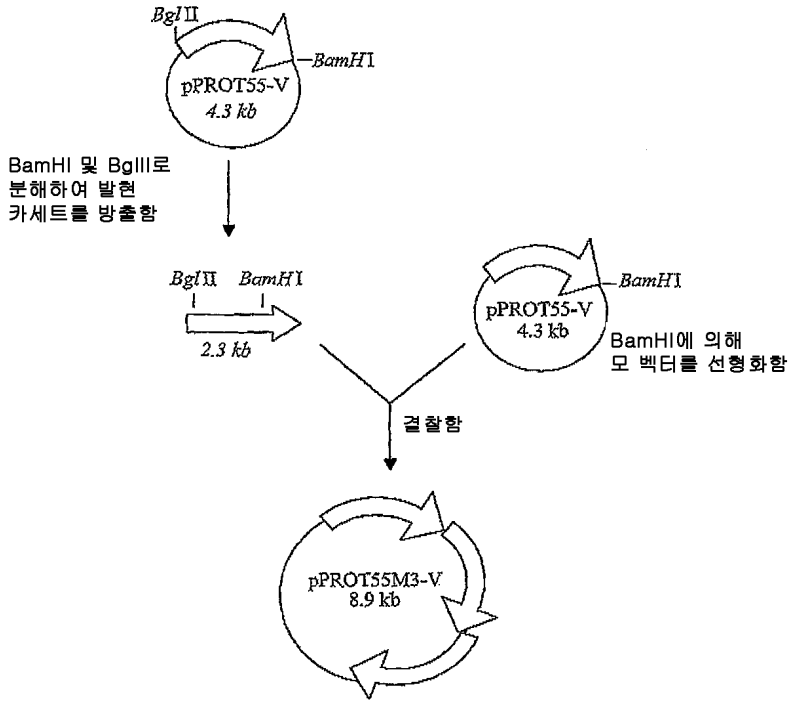
도면5e



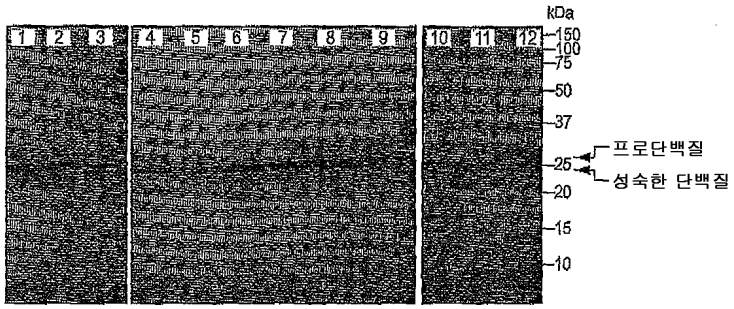
도면5f



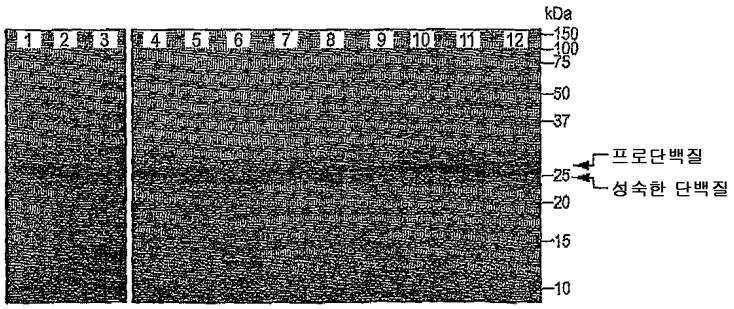
도면6



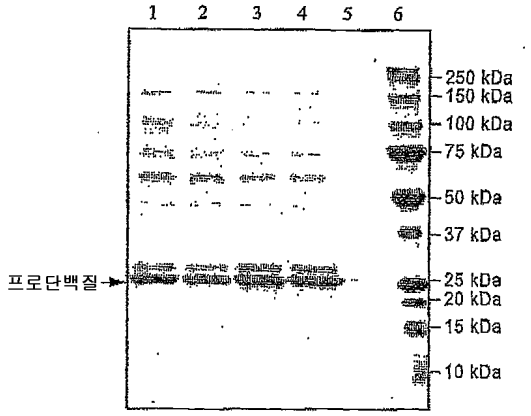
도면7a



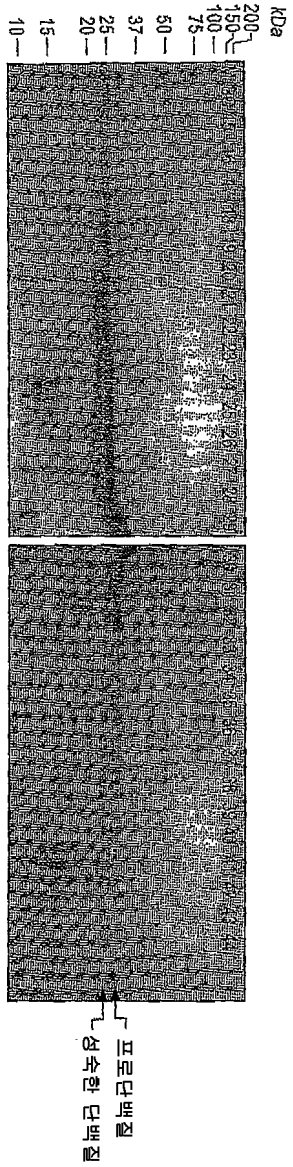
도면7b



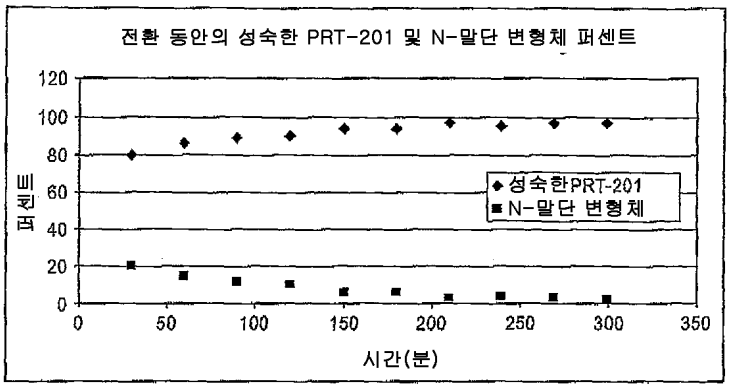
도면8


1
2
3
4
5
6
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa
프로단백질

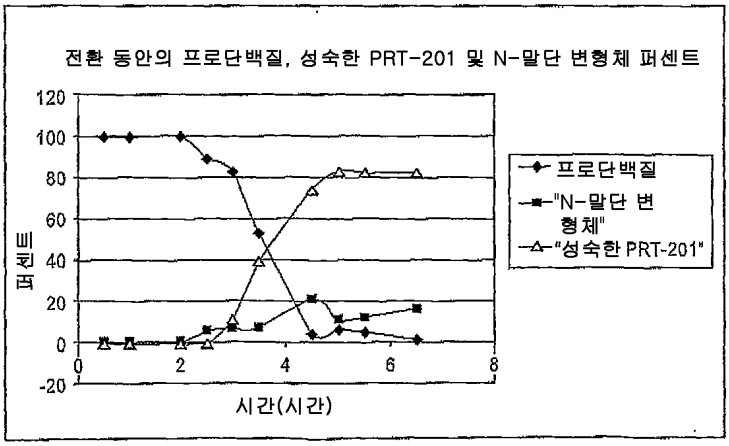
도면9


kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
성숙한 단백질
프로단백질

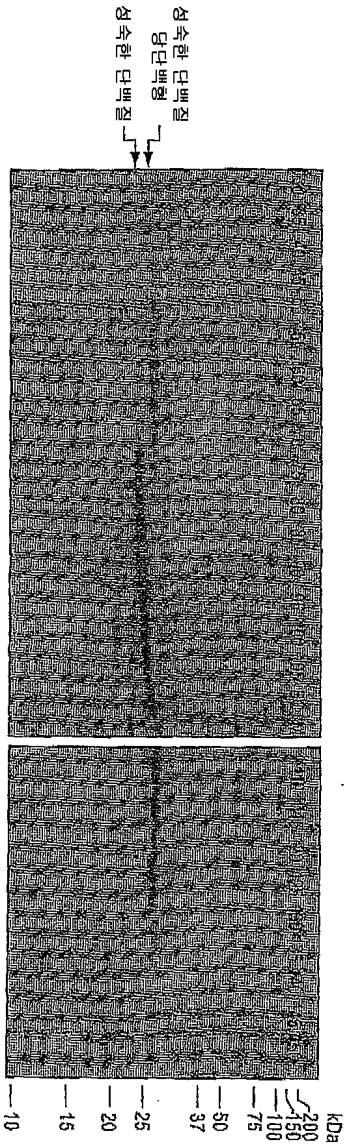
도면10


전환 동안의 성숙한 PRT-201 및 N-말단 변형체 퍼센트
120
100
80
60
40
20
0
퍼센트
0
50
100
150
200
250
300
350
시간(분)
성숙한PRT-201
N-말단 변형체

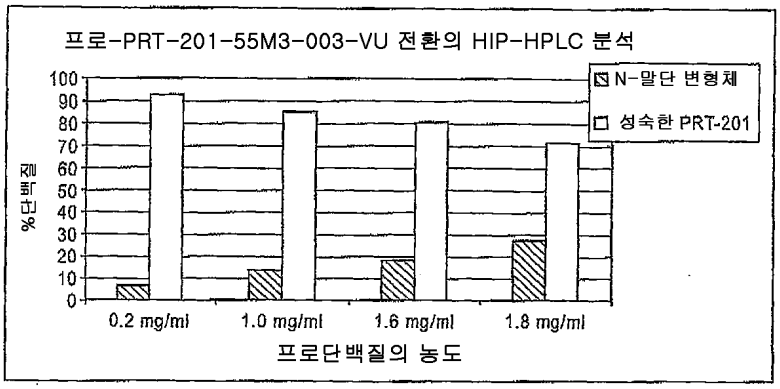
도면11


전환 동안의 프로단백질, 성숙한 PRT-201 및 N-말단 변형체 퍼센트
120
100
80
60
40
20
0
-20
퍼센트
0
2
4
6
8
시간(시간)
프로단백질
"N-말단 변형체"
"성숙한 PRT-201"

도면12


성숙한 단백질
성숙한 단백질
10
15
20
25
37
50
75
100
150
200
kDa

도면13


프로-PRT-201-55M3-003-VU 전환의 HIP-HPLC 분석
N-말단 변형체
성숙한 PRT-201
% 단백질
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.2 mg/ml
1.0 mg/ml
1.6 mg/ml
1.8 mg/ml
프로단백질의 농도

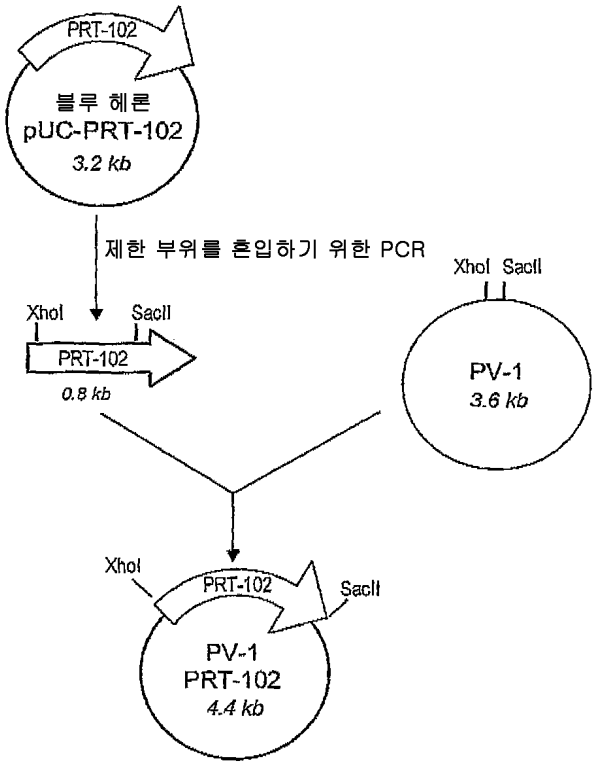
도면14

```
SacII
cccgcggacccaggactttccagaaaccaacgcccgggtagttggagggaccgaggctcagaggaattctt
ggccatctcagatttcctccagtaccggtctggaagttcgtgggctcacacctgtggagggaccctcat
caggcagaactgggtgatgacagccgctcactgcgtggacagagagttgaccttccgtgtggtggttgga
gagcacaacctgaaccagaacgatggcaccgagcagtacgtgggggtgcagaagatcgtggtgcatccct
actggaacaccgacgacgtggctgcaggctatgacatcgccctgctgcgcctggcccagagtgtaaccct
caacagctacgtccagctgggtgttctgccaagggctgggaccatcctggctaacaacagtccctgctac
atcacagggtggggcctgaccaggaccaatgggcagctggcccagaccctgcagcaggcttacctgccca
ccgtggactacgccatctgctccagctcctcgtactggggctccaccgtgaagaacagcatggtgtgcgc
cggaggggacggagttcgctctggatgtcagggtgattctgggggccccttcattgcttggtgaatggt
cagtatgctgtccacggtgtaaccagcttcgtgtcccgcctgggctgtaatgtcaccaggaagcccacag
tcttcaccagggtctctgcttacatctcttggataaataacgtcattgccagcaactgataatctaga
                                                    Stop Stop XbaI
```

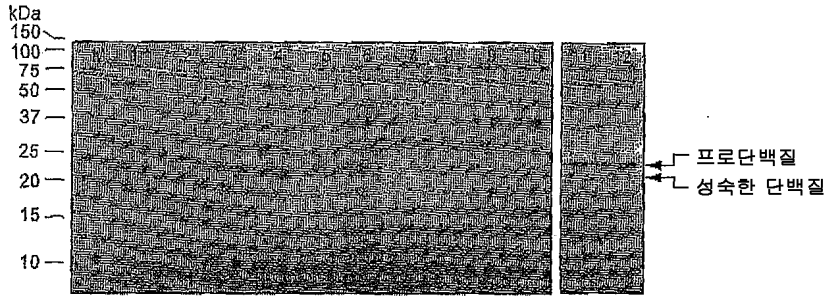
도면15

```
TQDFFETNAR VVGGTEAQRN SWPSQISLQY RSGSSWAHTC GGTLIRQNWV
MTAAHCVDRE LTFRVVVGEH NLNQNDGTEQ YVGVQKIVVH PYWNTDDVAA
GYDIALLRLA QSVTLNSYVQ LGVLPRAGTI LANNSPCYIT GWGLTRTNGQ
LAQTLQQAYL PTVDYAICSS SSYWGSTVKN SMVCAGGDGV RSGCQGDSGG
PLHCLVNGQY AVHGVTSFVS RLGCNVTRKP TVFTRVSAYI SWINNVIASN
```

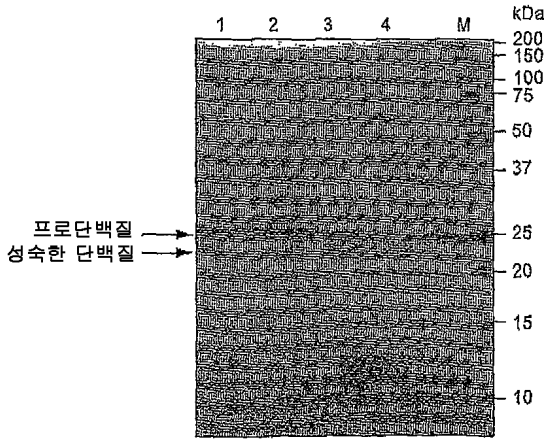
도면16



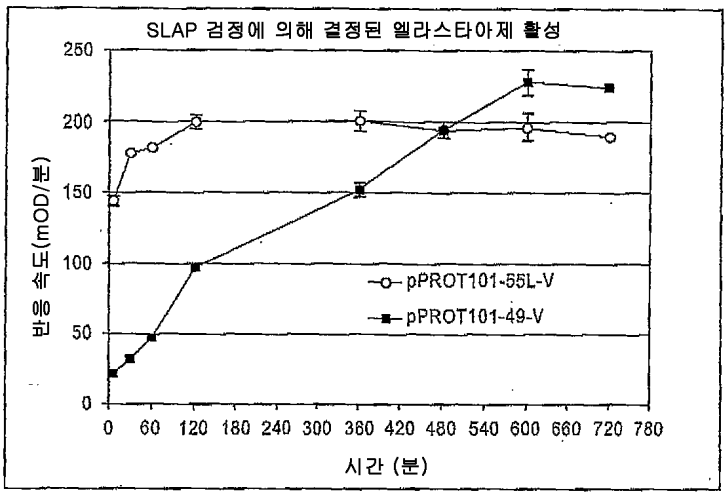
도면17



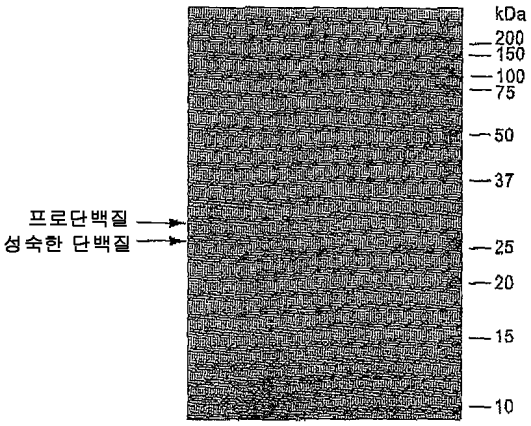
도면18



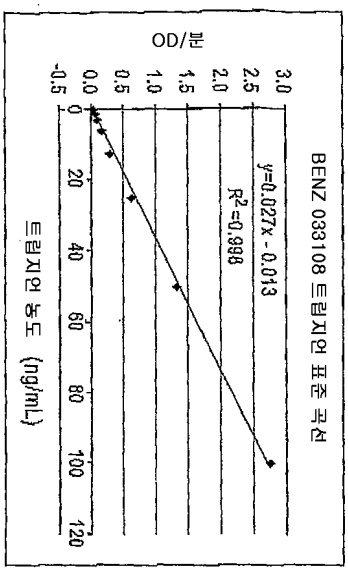
도면19



도면20

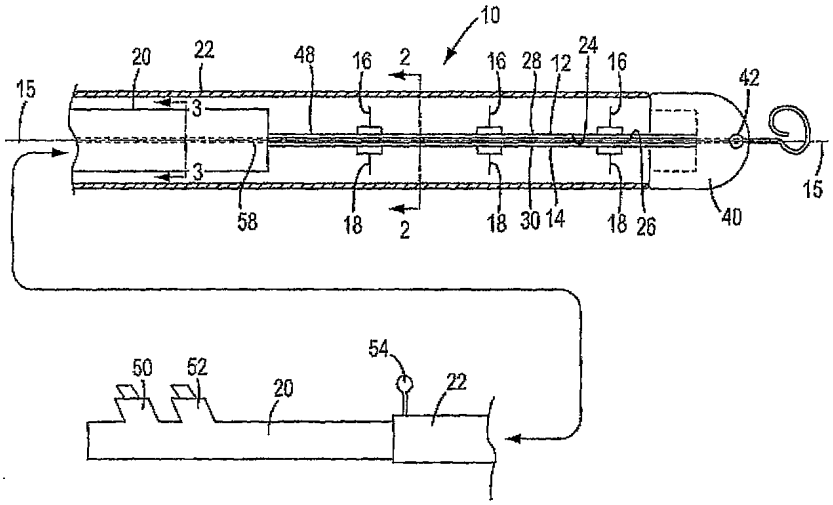


도면21

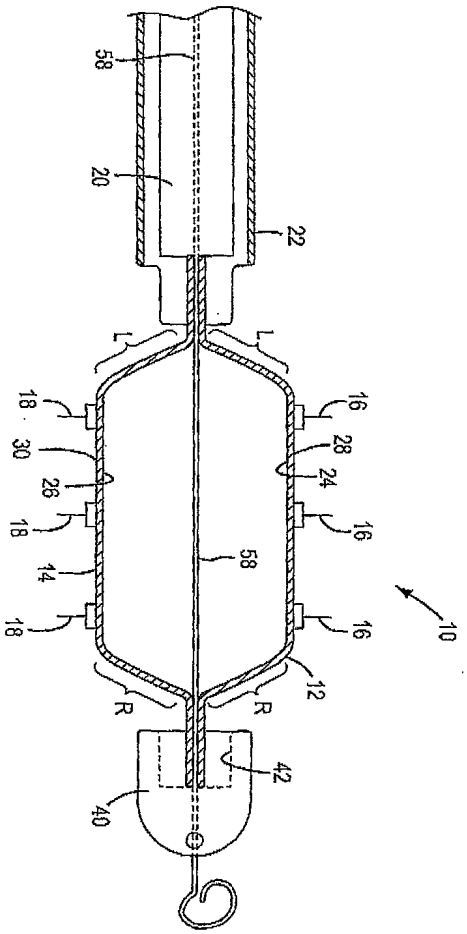


트립지언 표준물 ng/mL	OD/분	회귀 계수	계산된 트립지언 ng/mL	예상치 %
0	0.0216	0.75	1.3	
1.56	0.0606	0.94	2.7	175
3.13	0.0871	0.98	3.7	118
6.25	0.1624	0.99	6.5	104
12.5	0.2891	1.00	11.2	90
25	0.6211	1.00	23.5	94
50	1.3219	1.00	49.4	99
100	2.7521	1.00	102.4	102

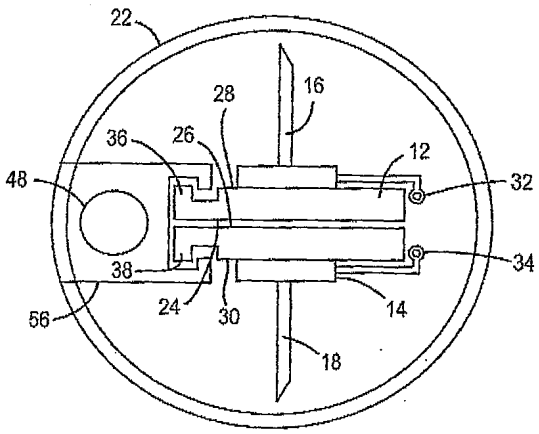
도면22


10
20
22
48
16
2
16
28
12
24
16
42
15
3
3
58
18
2
18
30
14
18
26
40
15
50
52
20
54
22

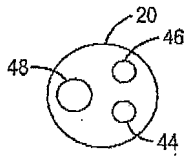
도면23


58
20
22
L
L
18
16
30
28
26
24
18
16
58
14
18
16
10
12
R
R
42
40

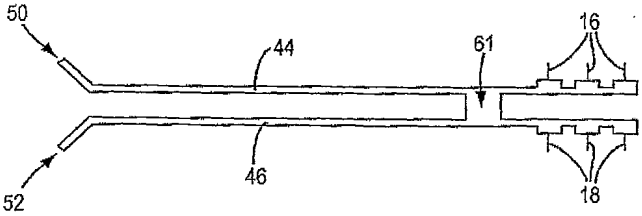
도면24



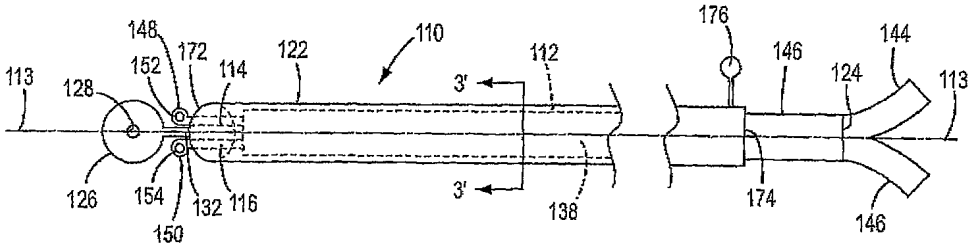
도면25



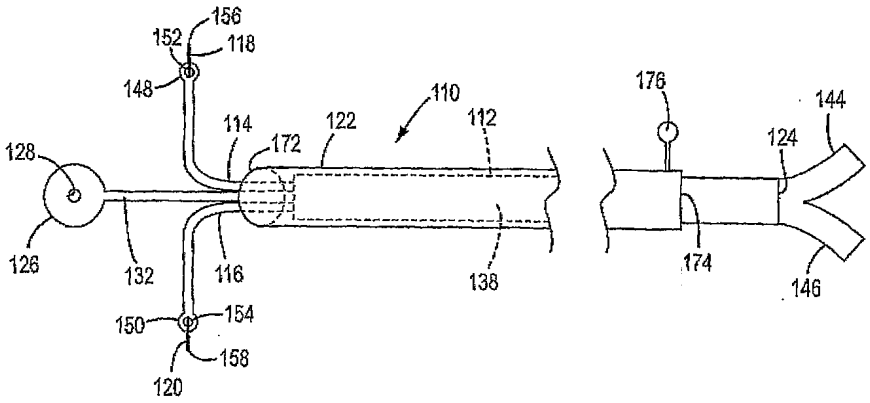
도면26



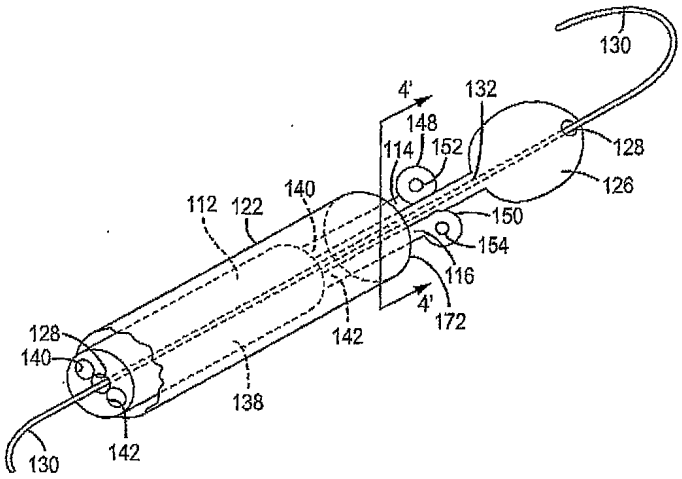
도면27



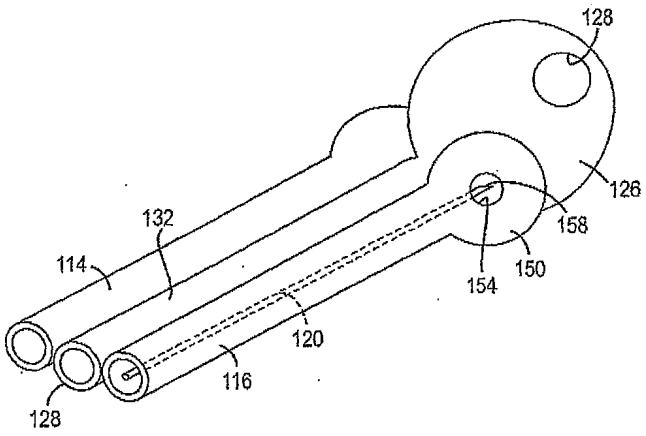
도면28



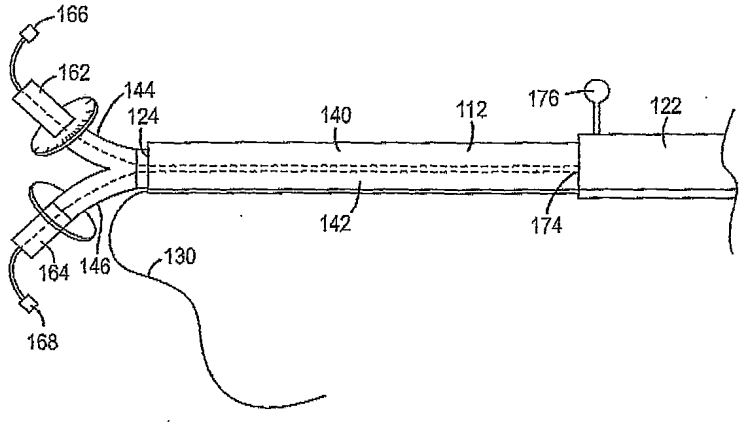
도면29



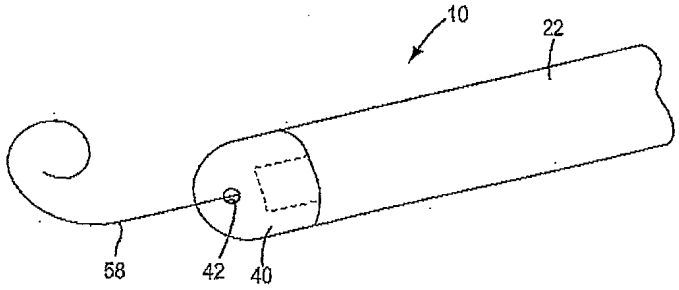
도면30



도면31



도면32



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PROTEON THERAPEUTICS, INC.

FRANANO, F. NICHOLAS

BLAND, KIMBERLY S.

WANG, MARCO D.

DING, BEE C.

<120> RECOMBINANT ELASTASE PROTEINS AND METHODS OF MANUFACTURING AND USE THEREOF

<130> 379893-001WO

<140><141><150> 60/992,319

<151> 2007-12-04

<160> 118

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222> (202)..(202)

<223> /replace= "Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (202)..(202)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 1

Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly
20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp
35 40 45

Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln
50 55 60

Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His
65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu
85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly
100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr
115 120 125

Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr
130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser
145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly
165 170 175

Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
180 185 190
His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe
195 200 205
Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr
210 215 220
Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235 240

<210> 2
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (201)..(201)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (201)..(201)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 2
Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser

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

Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro

65 70 75 80

Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu

85 90 95

Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val

100 105 110

Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile

115 120 125

Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu

130 135 140

Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser

145 150 155 160

Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly

165 170 175

Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln

210 215 220

Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235

<210> 3

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (200)..(200)

<223> /replace= "Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (200)..(200)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 3

Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu
1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln

35 40 45

Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp
50 55 60

Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr
65 70 75 80

Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu

100 105 110

Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr
115 120 125

Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp

165 170 175

Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys
180 185 190

Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser

195 200 205

Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val

210 215 220

Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (202)..(202)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (202)..(202)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 4

Ala Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile

1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly

20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu

85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly

100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr

115 120 125

Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr

130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser

145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly

165 170 175

Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr

210 215 220

Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235 240

<210> 5

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile

1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly

20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His
65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu
85 90 95
Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly
100 105 110
Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr
115 120 125
Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr
130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser
145 150 155 160
Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly
165 170 175
Gly Asp Gly Ser Ser Leu Trp Met Pro Gly
180 185

<210> 6
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 6
Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly Gly Thr Glu

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 7

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 7

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

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

115 120 125

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

180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205
Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 8
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 8
Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Ala Ala Ala Val Val Gly Gly Thr Glu

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30
Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45
Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60
Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95
Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110
Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125
Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175
Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 9

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Asn Ala Pro Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 10

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 10

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30
Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45
Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

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

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

180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205
Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Leu" or "Isoleucine" or "Met" or "Lys" or
"Asp" or "Val"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Ala" or "Leu" or "Isoleucine" or "Gly" or
"Val" or "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Leu" or "Val" or "Isoleucine" or "Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 11

Ala Pro Ala

1

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Leu" or "Isoleucine" or "Met" or "Lys" or "Val"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Leu" or "Val" or "Isoleucine" or "Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 12

Ala Pro Ala

1

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Leu" or "Val"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 13

Asp Pro Ala

1

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Ala Ala Ala

1

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 15

Asn Ala Ala

1

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Asn Ala Pro

1

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Asn Ala Arg

1

<210> 18

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Ala Pro Ala

1

<210> 19

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Ala Ala Pro

1

<210> 20

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 20

Asn Pro Ala

1

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 21

Leu Pro Ala

1

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 22

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

Thr Ala Ala Ala Val Val Gly Gly

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly Gly

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Thr Asn Ala Ala Val Val Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

Thr Asn Ala Pro Val Val Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

Thr Val Pro Gly Val Val Gly Gly

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 31

Thr Ala Pro Gly Val Val Gly Gly

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Thr Asn Pro Gly Val Val Gly Gly

1 5

<210> 33

<211> 753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

acccaggacc ttccggaaac caatgcccgc gtagtcggag ggactgaggc cgggaggaat 60

tcctggccct ctcagatttc cctccagtac cggtctggag gttcccggta tcacacctgt 120

ggagggaccc ttatcagaca gaactgggtg atgacagctg ctcactgcgt ggattaccag 180

aagactttcc gcgtggtggc tggagaccat aacctgagcc agaatgatgg cactgagcag 240

tacgtgagtg tgcagaagat cgtggtgcat ccatactgga acagcgataa cgtggctgcc 300

ggctatgaca tcgccctgct gcgcctggcc cagagcgtta ccctcaatag ctatgtccag 360

ctgggtgttc tgccccagga gggagccatc ctggctaaca acagtccctg ctacatcaca 420

ggctggggca agaccaagac caatgggcag ctggcccaga ccctgcagca ggcttacctg 480

ccctctgtgg actacgccat ctgctccagc tcctcctact ggggctccac tgtgaagaac 540

accatggtgt gtgctggtgg agatggagtt cgctctggat gccagggtga ctctgggggc 600

cccctccatt gcttggtgaa tggcaagtat tctgtccatg gagtgaccag ctttgtgtcc 660

agccggggct gtaatgtctc caggaagcct acagtcttca cccaggtctc tgcttacatc 720

tcctggataa ataatgtcat cgcctccaac tga 753

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Unknown

<220><222> source

<223> /note="Description of Unknown: Yeast Sequence"

<400

> 34

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

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr

20

<210> 35

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 35

ggctcgagaa aagagaggct gaagctactc aggaccttcc ggaaaccaat gcccgg 56

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><222

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 36

gggccgcggc ttatcagttg gaggcgatga cat 33

<210> 37

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (204)..(204)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (204)..(204)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 37

Ala Ala Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser

1 5 10 15

Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys

20 25 30

Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile

85 90 95

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

100 105 110

Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro

115 120 125

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala

130 135 140

Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys

145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys

165 170 175

Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly

180 185 190

Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr

195 200 205

Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val

210 215 220

Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala

225 230 235 240

Ser Asn

<210> 38

<211> 241

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (203)..(203)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (203)..(203)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 38

Ala Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly
20 25 30

Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val
35 40 45

Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser
50 55 60

Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val
65 70 75 80

His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala
85 90 95

Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu
100 105 110

Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys
115 120 125

Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln
130 135 140

Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala
165 170 175

Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
180 185 190

Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser
195 200 205

Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe
210 215 220
Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser
225 230 235 240
Asn

<210> 39
<211> 240
<212> PRT
<213> Unknown
<220><222> source
<223> /note="Description of Unknown: Porcine Sequence"
<400> 39
Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gln Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Ser Ser Trp Ala His Thr Cys Gly Gly
20 25 30
Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp
35 40 45
Arg Glu Leu Thr Phe Arg Val Val Val Gly Glu His Asn Leu Asn Gln
50 55 60
Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Gly Val Gln Lys Ile Val Val His
65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Thr Asp Asp Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu
85 90 95
Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly
100 105 110
Val Leu Pro Arg Ala Gly Thr Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr
115 120 125
Ile Thr Gly Trp Gly Leu Thr Arg Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr

130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Thr Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser
145 150 155 160
Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Ser Met Val Cys Ala Gly
165 170 175
Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
180 185 190
His Cys Leu Val Asn Gly Gln Tyr Ala Val His Gly Val Thr Ser Phe
195 200 205

Val Ser Arg Leu Gly Cys Asn Val Thr Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr
210 215 220
Arg Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230 235 240

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 40
Glu Thr Ala Ala Ala Val Val Gly
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 41
Glu Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222 > source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Glu Thr Asn Ala Pro Val Val Gly

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Glu Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 45

Glu Thr Val Pro Gly Val Val Gly

1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 46

Glu Thr Ala Pro Gly Val Val Gly

1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 47

Glu Thr Asn Pro Gly Val Val Gly

1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 48

Glu Thr Asn Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly

1 5

<210> 50

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe

35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Asn Gly Leu

50 55 60

Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly

65 70 75 80

Val Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala

85 90

<210> 51

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 51

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Asn Gly Leu
50 55 60

Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly
65 70 75 80

Val Ser Leu Asp

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Glu Thr Lys Pro Ala Val Val Gly
1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 53

Glu Thr His Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 54

Glu His Asn Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 55

His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 56

Pro Thr His Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 57

Pro Thr Asn Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 58

His Thr His Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 59

Glu Thr Phe Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 60

His Thr Phe Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 61

Gly Thr Phe Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 62

His Thr Gly Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 63

His Thr Lys Pro Ala Val Val Gly

1 5

<210> 64

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 64

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

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

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

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175
Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205
Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 65
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 65

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 66
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 66
Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Lys Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30
Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45
Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60
Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95
Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110
Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125
Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175
Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 67
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 67

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr His Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 68
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 68
Thr Gln Asp Leu Pro Glu His Asn Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15
Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30
Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45
Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60
Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 69

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 69

Thr Gln Asp Leu Pro His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 70
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT
<222> (204)..(204)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (204)..(204)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 70
Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser
1 5 10 15
Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys
20 25 30

Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys
35 40 45
Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu
50 55 60
Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val
65 70 75 80
Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile

85 90 95

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

Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys
165 170 175
Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190
Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr
195 200 205
Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val
210 215 220

Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala
225 230 235 240
Ser Asn

<210> 71
<211> 241
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (203)..(203)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (203)..(203)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 71

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

Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val
65 70 75 80
His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala
85 90 95
Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu
100 105 110
Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys
115 120 125

Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln
130 135 140
Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser
145 150 155 160
Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala
165 170 175
Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
180 185 190

Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser
195 200 205
Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe
210 215 220

Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser

225 230 235 240

Asn

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 72

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 73

Thr Gln Asp Leu Pro His Thr Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="His" or "Pro" or "Gly" or "Asp" or "Lys" or

"Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Ala" or "Pro" or "His"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Leu" or "Isoleucine" or "Met" or "Lys" or "Asp"

or "Val"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Ala" or "Leu" or "Isoleucine" or "Gly" or "Val"

or "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(6)

<223> /replace="Leu" or "Val" or "Isoleucine" or "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ala" or "Val"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Thr" or "Phenylalanine" or "Tyr" or "Trp"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(8)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 74

Glu Thr Ala Pro Ala Ala Gly Val

1 5

<210> 75

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 75

atctacgtag tcggagggac tgaggcc 27

<210> 76

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 76

gtcgacaagc ttatcagttg gaggcgat 28

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile

1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Arg Tyr His Thr Cys Gly Gly

20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu

85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly

100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr
115 120 125
Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr

130 135 140
Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser
145 150 155 160
Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly
165 170 175
Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Pro
180 185 190
Pro Leu Leu Gly Glu Trp Gln Val Phe Ser Pro Trp Ser Asp Gln Leu

195 200 205
Cys Val Gln Pro Gly Leu
210

<210> 78
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (41)..(41)
<223> /replace= "Val"

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (202)..(202)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (202)..(202)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (225)..(225)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (225)..(225)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 78

Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly
20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp
35 40 45

Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln
50 55 60

Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His
65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu
85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly

100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr

115 120 125

Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr

130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser

145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly

165 170 175

Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr

210 215 220

Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235 240

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 79

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg

1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="His" or "Pro" or "Gly" or "Asp" or "Lys" or "Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ala" or "Pro" or "His"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Leu" or "Isoleucine" or "Met" or "Lys" or "Asp" or "Val"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "Leu" or "Isoleucine" or "Gly" or "Val" or "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Leu" or "Val" or "Isoleucine" or "Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(10)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 80

Thr Glu Asp Leu Pro Glu Thr Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 81

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 81

actcaggacc ttccggaaac caatgcccgg gtagtcggag ggactgaggc cgggaggaac 60

tcctggccct ctcagatttc cctccagtac cggtctggag gttcctggta tcacacctgt 120

ggagggaccc ttatcagaca gaactgggtg atgacagctg cacactgcgt ggattaccag 180

aagactttcc gcgtggtggc tggagaccat aacctgagcc agaatgatgg cactgagcag 240

tacgtgagtg tgcagaagat cgtggtgcat ccatactgga acagcgataa cgtggctgca 300

ggctatgaca tcgccctgct gcgcctggcc cagagcgtta ccctcaatag ctatgtccag 360

ctgggtgttc tgccccagga gggagccatc ctggctaaca acagtccctg ctacatcaca 420

ggctggggca agaccaagac caatgggcag ctggcccaga ccttgcagca ggcttacctg 480

ccctctgtgg actatgccat ctgctccagc tcctcctact ggggctccac tgtgaagaac 540

actatggtgt gtgctggtgg agatggagtt cgctctggat gtcagggtga ctctgggggc 600

cccctccatt gcttggtgaa tggcaagtat tctcttcatg gagtgaccag ctttgtgtcc 660

agccggggct gtaatgtctc tagaaagcct acagtcttca cacgggtctc tgcttacatc 720

tcctggataa ataatgtcat cgcctccaac tgataa 756

<210> 82

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 82

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Leu His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Arg Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 83

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222

> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 83

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 84

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(26)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (41)..(41)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (202)..(202)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (202)..(202)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (225)..(225)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (225)..(225)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 84

Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly
20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp
35 40 45

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

50 55 60

Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His
65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu
85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly
100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr
115 120 125

Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr
130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser
145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly
165 170 175

Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
180 185 190

His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe
195 200 205

Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr
210 215 220

Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230 235 240

<210> 85
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (25)..(25)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (40)..(40)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (201)..(201)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (201)..(201)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (224)..(224)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (224)..(224)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 85

Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser

1 5 10 15

Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr
20 25 30
Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr
35 40 45
Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn

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

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

180 185 190
Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val
195 200 205
Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln
210 215 220
Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230 235
<210> 86
<211> 238
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (39)..(39)
<223> /replace="Val"
<220><221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (200)..(200)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (200)..(200)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (223)..(223)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (223)..(223)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 86

Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu
1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln
35 40 45

Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp
50 55 60

Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr
65 70 75 80

Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu
100 105 110

Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr
115 120 125

Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln
130 135 140

Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp
165 170 175

Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys
180 185 190

Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser
195 200 205

Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val

210 215 220

Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230 235

<210> 87

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(26)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (41)..(41)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (202)..(202)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (202)..(202)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (225)..(225)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (225)..(225)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 87

Ala Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile

1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly

20 25 30

Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu

85 90 95

Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly

100 105 110

Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr

115 120 125

Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr

130 135 140

Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser

145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly

165 170 175

Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
180 185 190
His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe

195 200 205
Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr
210 215 220
Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230 235 240

<210> 88
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)
<223> /replace="His"
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (235)..(235)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 88

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

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
    50                  55                  60
Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
```

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 89

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<

222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<

223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 89

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

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 90

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for said positions"

<220

><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 90

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Ala Ala Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 91

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 91

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

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 92

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220

><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (235)..(235)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 92

Thr	Gln	Asp	Leu	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Thr	Glu
1				5				10					15		
Ala	Gly	Arg	Asn	Ser	Trp	Pro	Ser	Gln	Ile	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	Ser
			20					25				30			
Gly	Gly	Ser	Trp	Tyr	His	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Arg	Gln	Asn

		35				40				45				
Trp	Val	Met	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Asp	Tyr	Gln	Lys	Thr	Phe	Arg
	50					55				60					
Val	Val	Ala	Gly	Asp	His	Asn	Leu	Ser	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Glu	Gln
65					70					75					80
Tyr	Val	Ser	Val	Gln	Lys	Ile	Val	Val	His	Pro	Tyr	Trp	Asn	Ser	Asp
				85					90					95	

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 93

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Leu" or "Isoleucine" or "Met" or "Lys" or "Asp" or "Val"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Leu" or "Val" or "Isoleucine" or "Ser

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 93

Ala Pro Ala

1

<210> 94

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (28)..(28)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (43)..(43)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221
> VARIANT

<222> (204)..(204)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (204)..(204)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (227)..(227)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (227)..(227)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 94

Ala Ala Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser

1 5 10 15

Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys
20 25 30

Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys
35 40 45

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

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

65 70 75 80

Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile
85 90 95

Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln
100 105 110

Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro

115 120 125

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala

130 135 140

Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys

145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys

165 170 175

Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly

180 185 190

Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr

195 200 205

Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val

210 215 220

Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala

225 230 235 240

Ser Asn

<210> 95

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><

221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (42)..(42)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (42)..(42)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (203)..(203)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (203)..(203)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (226)..(226)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (226)..(226)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 95

Ala Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly

20 25 30

Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala

85 90 95

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

100 105 110

Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys

115 120 125

Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln

130 135 140

Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser

145 150 155 160

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala

165 170 175

Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

180 185 190

Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser

195 200 205

Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe

210 215 220

Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser

225 230 235 240

Asn

<210> 96

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
85

<210> 97
<211> 83
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 97
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu

<210> 98
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 98

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 99

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220

><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (235)..(235)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (235)..(235)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 99

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

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

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

            180                 185                 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
        195                 200                 205
Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
    210                 215                 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225                 230                 235                 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
                245                 250
```

<210> 100

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<

223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 100

Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Lys Pro Ala Val Val Gly Gly Thr Glu

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys

130 135 140

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser

165 170 175

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

245 250

<210> 101

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="His"
<220
><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (51)..(51)
<223> /replace="Val"
<220><221> misc_feature
<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (212)..(212)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (212)..(212)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (235)..(235)
<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 101

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

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

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

            180                 185                 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
        195                 200                 205
```

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 102
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="His"
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<
223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (51)..(51)
<223> /replace="Val"
<220><221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 102

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

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
130 135 140
Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu

145 150 155 160
Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175
Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190
Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205
Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 103
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="His"
<220
><221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (36)..(36)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (212)..(212)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (212)..(212)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (235)..(235)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (235)..(235)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 103

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

1 5 10 15

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser

20 25 30

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn

35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg

50 55 60

Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
85 90 95
Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110
Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly

115 120 125

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

180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

195 200 205

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys
210 215 220
Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
245 250

<210> 104
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (28)..(28)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (43)..(43)
<223> /replace="Val"
<220><221> misc_feature
<222> (43)..(43)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (204)..(204)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (204)..(204)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (227)..(227)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (227)..(227)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 104
Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser
1 5 10 15

Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys
20 25 30
Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys
35 40 45
Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala Gly Asp His Asn Leu

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

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

180 185 190
Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr
195 200 205
Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val
210 215 220
Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala
225 230 235 240
Ser Asn
<210> 105
<211> 241
<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (42)..(42)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (42)..(42)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (203)..(203)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (203)..(203)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (226)..(226)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (226)..(226)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 105

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

Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val
65 70 75 80
His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala
85 90 95
Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu
100 105 110
Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys
115 120 125

Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln
130 135 140
Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser
145 150 155 160
Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala
165 170 175
Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
180 185 190

Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser
195 200 205
Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe
210 215 220
Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser
225 230 235 240
Asn

<210> 106

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (22)..(22)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (37)..(37)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (198)..(198)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (198)..(198)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (221)..(221)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (221)..(221)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 106

Thr Glu Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr

1 5 10 15

Arg Ser Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg

20 25 30

Gln Asn Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr

35 40 45

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

50 55 60

Glu Gln Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn

65 70 75 80

Ser Asp Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala

85 90 95

Gln Ser Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln

100 105 110

Glu Gly Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp

115 120 125

Gly Lys Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala

130 135 140

Tyr Leu Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp

145 150 155 160

Gly Ser Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val

165 170 175

Arg Ser Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val

180 185 190

Asn Gly Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg

195 200 205

Gly Cys Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala
210 215 220

Tyr Ile Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230 235

<210> 107

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (20)..(20)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (35)..(35)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (196)..(196)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (196)..(196)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (219)..(219)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (219)..(219)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 107

Ala Gly Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
1 5 10 15

Gly Gly Ser Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
20 25 30

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg
35 40 45

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

Tyr Val Ser Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp
65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
85 90 95

Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly
100 105 110

Ala Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys
115 120 125

Thr Lys Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
130 135 140

Pro Ser Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
145 150 155 160

Thr Val Lys Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
165 170 175

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly

180 185 190

Lys Tyr Ser Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys

195 200 205

Asn Val Ser Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile

210 215 220

Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn

225 230

<210> 108

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (32)..(32)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (193)..(193)

<223> /replace="Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (193)..(193)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (216)..(216)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (216)..(216)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 108

Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15

Trp Tyr His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn Trp Val Met
20 25 30

Thr Ala Ala His Cys Val Asp Tyr Gln Lys Thr Phe Arg Val Val Ala
35 40 45

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

Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Ser Asp Asn Val Ala
65 70 75 80

Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser Val Thr Leu
85 90 95

Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Gln Glu Gly Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Lys Thr Lys Thr
115 120 125

Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Val
130 135 140

Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser Thr Val Lys

145 150 155 160

Asn Thr Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser Gly Cys Gln
165 170 175
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly Lys Tyr Ser
180 185 190
Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Ser Arg Gly Cys Asn Val Ser
195 200 205
Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Gln Val Ser Ala Tyr Ile Ser Trp Ile
210 215 220

Asn Asn Val Ile Ala Ser Asn
225 230

<210> 109
<211> 781
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"
<400> 109

gaattcagta ctcaggacct tccggaaacc aatgcccggg tagtcggagg gactgaggcc 60
gggaggaact cctggccctc tcagatttcc ctccagtacc ggtctggagg ttcctggtat 120
cacacctgtg gagggaccct tatcagacag aactgggtga tgacagctgc acactgcgtg 180
gattaccaga agactttccg cgtggtggct ggagaccata acctgagcca gaatgatggc 240

actgagcagt acgtgagtgt gcagaagatc gtggtgcatc catactggaa cagcgataac 300
gtggctgcag gctatgacat cgccctgctg cgcctggccc agagcgttac cctcaatagc 360
tatgtccagc tgggtgttct gccccaggag ggagccatcc tggctaacaa cagtccctgc 420
tacatcacag gctggggcaa gaccaagacc aatgggcagc tggcccagac cttgcagcag 480
gcttacctgc cctctgtgga ctatgccatc tgctccagct cctcctactg gggctccact 540
gtgaagaaca ctatggtgtg tgctggtgga gatggagttc gctctggatg tcagggtgac 600
tctgggggcc ccctccattg cttggtgaat ggcaagtatt ctcttcatgg agtgaccagc 660

tttgtgtcca gccggggctg taatgtctct agaaagccta cagtcttcac acgggtctct 720

gcttacatct cctggataaa taatgtcatc gcctccaact gataagcttg gatccgtcga 780

c 781

<210> 110

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 110

Met Lys Arg Ile Leu Ala Ile His Gln Ala Met Glu Gly Ala Pro Arg
1 5 10 15

Val Thr Leu Thr Ser Arg Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ser Thr His His
20 25 30

Ser Val Leu His Ser Gly Ala Pro Val Gly Gly Ala Gly Ala Asp Gly
35 40 45

Ile Val His Arg Gly Gln Val Ser Leu Leu Gln Gly Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Pro Ile Gly Leu Gly Leu Ala Pro Ala Cys Asp Val Ala Gly Thr Val
65 70 75 80

Val Ser Gln Asp Gly Ser Leu Leu Gly Gln Asn Thr Gln Leu Asp Ile
85 90 95

Ala Ile Glu Gly Asn Ala Leu Gly Gln Ala Gln Gln Gly Asp Val Ile
100 105 110

Ala Cys Ser His Val Ile Ala Val Pro Val Trp Met His His Asp Leu
115 120 125

Leu His Thr His Val Leu Leu Ser Ala Ile Ile Leu Ala Gln Val Met
130 135 140

Val Ser Ser His His Ala Glu Ser Leu Leu Val Ile His Ala Val Cys
145 150 155 160

Ser Cys His His Pro Val Leu Ser Asp Lys Gly Pro Ser Thr Gly Val
165 170 175

Ile Pro Gly Thr Ser Arg Pro Val Leu Glu Gly Asn Leu Arg Gly Pro
180 185 190
Gly Val Pro Pro Gly Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Pro Gly Ile Gly Phe
195 200 205

Arg Lys Val Leu Ser
210
<210> 111
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 111
actattgcca gcattgctgc taaagaagaa ggggtatctc tcgagaaaag agaggctgaa 60
gctactcagg accttccgga aaccaatgcc cgggtagtcg ggggg 105
<210> 112
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><222> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 112
Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys
1 5 10 15
Arg Glu Ala Glu Ala Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val
20 25 30
Val Gly Gly
35
<210> 113
<211> 768
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 113

ccgcggaccc aggactttcc agaaaccaac gcccgggtag ttggagggac cgaggctcag 60

aggaattctt ggccatctca gatttccctc cagtaccggt ctggaagttc gtgggctcac 120

acctgtggag ggaccctcat caggcagaac tgggtgatga cagccgctca ctgcgtggac 180

agagagttga ccttccgtgt ggtggttgga gagcacaacc tgaaccagaa cgatggcacc 240

gagcagtacg tgggggtgca gaagatcgtg gtgcatccct actggaacac cgacgacgtg 300

gctgcaggct atgacatcgc cctgctgcgc ctggcccaga gtgtaaccct caacagctac 360

gtccagctgg gtgttctgcc aagggctggg accatcctgg ctaacaacag tccctgctac 420

atcacagggt ggggcctgac caggaccaat gggcagctgg cccagaccct gcagcaggct 480

tacctgccca ccgtggacta cgccatctgc tccagctcct cgtactgggg ctccaccgtg 540

aagaacagca tggtgtgcgc cggaggggac ggagttcgct ctggatgtca gggtgattct 600

gggggccccc ttcattgctt ggtgaatggt cagtatgctg tccacggtgt aaccagcttc 660

gtgtcccgcc tgggctgtaa tgtcaccagg aagcccacag tcttcaccag ggtctctgct 720

tacatctctt ggataaataa cgtcattgcc agcaactgat aatctaga 768

<210> 114

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 114

Thr Gln Asp Phe Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ala Gln Arg Asn Ser Trp Pro Ser Gln Ile Ser Leu Gln Tyr Arg Ser
20 25 30

Gly Ser Ser Trp Ala His Thr Cys Gly Gly Thr Leu Ile Arg Gln Asn
35 40 45

Trp Val Met Thr Ala Ala His Cys Val Asp Arg Glu Leu Thr Phe Arg
50 55 60

Val Val Val Gly Glu His Asn Leu Asn Gln Asn Asp Gly Thr Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Val Gly Val Gln Lys Ile Val Val His Pro Tyr Trp Asn Thr Asp
85 90 95
Asp Val Ala Ala Gly Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Ser
100 105 110
Val Thr Leu Asn Ser Tyr Val Gln Leu Gly Val Leu Pro Arg Ala Gly
115 120 125

Thr Ile Leu Ala Asn Asn Ser Pro Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Leu
130 135 140
Thr Arg Thr Asn Gly Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Pro Thr Val Asp Tyr Ala Ile Cys Ser Ser Ser Ser Tyr Trp Gly Ser
165 170 175
Thr Val Lys Asn Ser Met Val Cys Ala Gly Gly Asp Gly Val Arg Ser
180 185 190

Gly Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His Cys Leu Val Asn Gly
195 200 205
Gln Tyr Ala Val His Gly Val Thr Ser Phe Val Ser Arg Leu Gly Cys
210 215 220
Asn Val Thr Arg Lys Pro Thr Val Phe Thr Arg Val Ser Ala Tyr Ile
225 230 235 240
Ser Trp Ile Asn Asn Val Ile Asn
245

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 115

Phe Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly
1 5 10

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 116

Phe Pro Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly
1 5 10

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 117

Leu Pro His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
1 5 10

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><222> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 118

Phe Pro Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly

1 5 10