(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 1 월 30 일 (30.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/022791 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/26 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/009215

(22) 국제출원일: 2019 년 7 월 25 일 (25.07.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0086308 2018 년 7 월 25 일 (25.07.2018) KR
10-2019-0029758 2019 년 3 월 15 일 (15.03.2019) KR

(71) 출원인: (주)알테오젠 (**ALTEOGEN, INC**) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR).

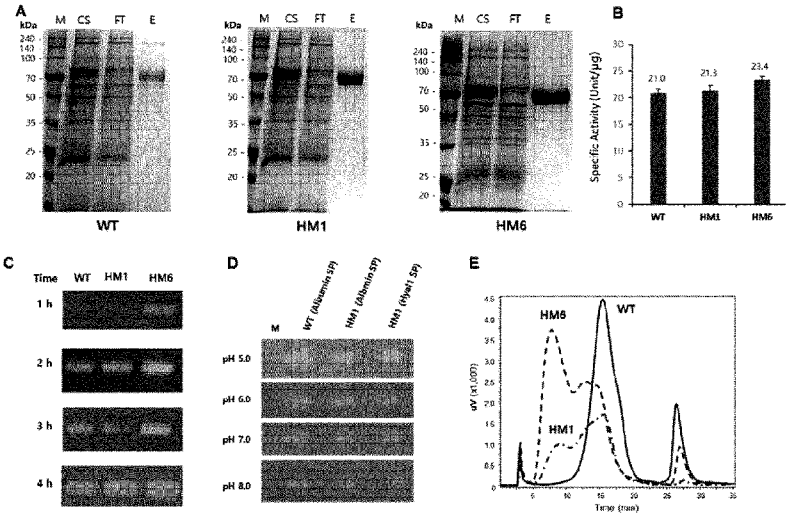
(72) 발명자: 박순재 (**PARK, Soon Jae**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR). 정혜신 (**CHUNG, Hye-Shin**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR). 이승주 (**LEE, Seung Joo**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR). 유선아 (**YOU, Sun-Ah**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR). 송형남 (**SONG, Hyung-Nam**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR). 이창우 (**LEE, Chang Woo**); 34054 대전시 유성구 유성대로1628번길 62, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (**LEE, Cheo Young** et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** NOVEL HYALURONIC ACID-HYDROLYZING ENZYME MUTANT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) **발명의 명칭:** 신규 히알루론산 가수분해 효소 변이체 및 이를 포함하는 약제학적 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a technical field of protein engineering for increasing the enzyme activity and thermal stability of human hyaluronidase, which is a hyaluronic acid-hydrolyzing enzyme, and relates to a hyaluronidase PH20 mutant or a fragment thereof, comprising: the substitution of at least one amino acid residue, among the amino acid sequence of the wild-type PH20 having SEQ ID NO: 1, at an alpha helix site and/or a site corresponding to a connection site thereof; and selectively, the additional deletion of an N-terminal amino acid residue and/or a C-terminal amino acid residue. Specifically, the present invention relates to a PH20 mutant and a fragment thereof, the wild-type PH20, having a sequence of SEQ ID NO: 1, comprising: the substitution of at least one residue selected from the group consisting of T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E and I361T; additionally, the substitution of an amino acid positioned at alpha helix site 8 and/or the connection site of alpha helix site 7 and alpha helix site 8; and the deletion of some amino acids of an N-terminal site and a C-terminal site.

WO 2020/022791 A1

HALOZYME - EXHIBIT 1013

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 히알루론산 가수분해 효소인 인간 히알루로니다제의 효소 활성과 열 안정성을 높이는 단백질 공학 기술분야에 관한 것으로, 서열번호 1 의 야생형 PH20 의 아미노산 서열 중에서 알파나선 부위 및/ 또는 그 연결 부위에 해당하는 부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환과, 선택적으로 추가적인 N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산 잔기가 결실된, 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편에 대한 것이다. 구체적으로는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 PH20에 있어, T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E 및 I361T로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 잔기의 치환을 포함하고, 추가적으로 알파나선 8 부위 및/또는 알파나선 7 및 알파나선 8의 연결 부위에 위치한 아미노산의 치환을 포함하며, N-말단 및 C-말단 부위의 일부 아미노산이 결실된 PH20의 변이체 및 이의 절편에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 신규 히알루론산 가수분해 효소 변이체 및 이를 포함하는 약제학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 히알루론산 가수분해 효소인 인간 히알루로니다제의 효소 활성과 열안정성을 향상시킨 신규 인간 히알루로니다제 변이체에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 야생형 PH20, 바람직하게는 L36~S490의 아미노산 서열로 이루어진 성숙된 야생형 PH20의 알파나선 부위 및/또는 그 연결 부위에 해당하는 부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고, 선택적으로 N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산 잔기 일부가 결실된 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 인간의 피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구성되어 있으며, 피부에는 6 종류의 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)이 존재한다. 글리코사미노글리칸에는 히알루론산(hyaluronic acid), 콘드로이틴 황산염(chondroitin sulfate), 더마탄 황산염(dermatan sulfate), 헤파란 황산염(heparan sulfate), 헤파린(heparin), 케라탄 황산염(keratin sulfate)이 속한다.

[4] 글리코사미노글리칸은 이당류 형태의 당이 반복적으로 연결된 구조를 이룬다. 당의 길이는 글리코사미노글리칸 마다 다르지만 수백 개에서 수천 개에 해당한다. 글리코사미노글리칸 중에서 히알루론산은 체내 존재량의 절반 이상이 피부에 존재한다. 히알루론산은 세포막에 존재하는 히알루론산 합성효소(hyaluronan synthase)에 의해 합성되며 프로테오글리칸 (proteoglycan)과 결합하지 않고 단독으로 존재하며, 황산기가 없는 유일한 글리코사미노글리칸이다. 다른 글리코사미노글리칸들은 프로테오글리칸과 결합하며 황산기를 가지고 있다. 히알루론산은 글루크론산(glucuronic acid)과 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 β-1,3 결합에 의해 연결되어 있고, 이러한 이당류가 대략 5,000번 반복된다. N-아세틸글루코사민과 글루크론산 사이는 β-1,4 결합에 의해 연결되어 있다. 인간의 몸에서 대략 1/3 정도(5 g)의 히알루론산은 매일 분해되는 것으로 알려져 있다.

[5] 히알루로니다제는 세포외기질(extracellular matrix)에 위치한 히알루론산을 분해하는 효소이다. 인간에는 6 종류의 히알루로니다제가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, HyalPS1 그리고 PH20/SPAM1). 인간에서 Hyal1과 Hyal2은 대부분의 조직에서 발현되며, PH20/SPAM1 (이하 PH20)은 정자의 세포막과 첨체(acrosome) 막에 발현된다. 그렇지만 HyalPS1은

pseudogene으로 발현되지 않는다. 히알루로니다제는 히알루론산을 절단하는 방식에 따라 3 종류로 나누어진다. H_2O를 사용하여 N-아세틸글루코사민과 글루크론산 사이의 β-1,4 결합을 절단하는 효소(EC 3.2.1.35)와 β-1,3 결합을 절단하는 효소(EC 3.2.1.36), 그리고 H_2O를 사용하지 않고 β-1,4 결합을 절단하는 세균의 히알루로니다제(EC 4.2.99.1)로 나누어진다.

[6] Hyal1의 촉매 아미노산 잔기는 D129와 E131이며, substrate-assisted catalysis 방법으로 히알루론산을 가수분해한다. Hyal1은 산성인 pH 3~4에서 최적 활성을 나타내며, pH 4.5 이상에서는 효소 활성이 없다. PH20은 Hyal1과 달리 pH 3~8의 넓은 pH 구간에서 효소 활성을 나타낸다.

[7] Arming 등은 PH20의 촉매 아미노산이 D111과 E113임을 밝혔다 (Arming et al., 1997). Arming 등은 신호 서열이 제거된 PH20의 첫 번째 아미노산인 Leu를 1번으로 명명하였으므로, 신호 서열에 포함되어 있는 PH20에서는 촉매 아미노산 잔기는 각각 D146과 E148에 해당한다.

[8] 히알루로니다제는 히알루론산을 가수분해하여 세포외기질의 히알루론산의 점성(viscosity)을 감소시켜 조직(피부)으로의 투과성(permeability)를 증가시킨다. 피부의 피하 (subcutaneous) 부위는 pH가 대략 7.0 ~ 7.5인 중성이므로, 여러 종류의 히알루로니다제 중에서 PH20이 임상에서 많이 사용되고 있다 (Bookbinder et al., 2006). PH20이 임상에서 사용되는 예로는 안과 수술에서 안구이완제 및 마취 주사 첨가제로 이용되고 있고, 항체치료제를 피하 주사할 때도 PH20을 병용 투여한다 (Bookbinder et al., 2006). 또한 종양세포에 히알루론산이 과발현 되는 특성을 이용하여 PH20으로 종양세포 세포외기질의 히알루론산을 가수분해하여 항암치료제의 종양세포 접근성을 높이는데 사용된다. 또한 조직 내에 과다하게 존재하는 체액 및 혈액의 재흡수를 촉진하는데도 사용된다.

[9] PH20은 Lathrop 등에 의해 기니피그(guinea pig)의 정자에서 처음으로 동정되었고, 다른 많은 종의 정자에도 발현됨이 알려져 있다. 인간의 PH20 유전자는 Lin 등 및 Gmachl 등에 의해 클로닝 되었다. 인간 PH20는 서열번호 1에 따른 서열을 가지는 509개의 아미노산 잔기로 구성되어 있고, 기니피그의 PH20과는 60% 아미노산 서열이 일치한다. 인간의 PH20 효소는 SPAM1 (sperm adhesion molecule-1) 유전자로부터 코딩 되며 정자의 세포막 표면과 첨체의 막 안쪽에 PH20의 Ser490이 glycosylphosphatidylinositol (GPI)과 결합한 형태로 존재한다. 정자는 히알루론산이 많은 난자의 cumulus layer를 통과하여 난자 안으로 침투할 때 PH20을 이용하여 히알루론산을 가수분해한다. PH20은 정자 내 단백질 양의 1% 이내로 존재하며, 6개의 N-당화 자리를 가진다 (N82, N166, N235, N254, N368, N393).

[10] 현재 상업적으로 많이 이용되는 PH20은 소나 양의 고환에서 추출한 형태이다. 예로는 암파다제(Amphadase®) (소 히알루로니다제)와 비트라제(Vitrase®) (양 히알루로니다제) 등이 있다.

[11] Bovine testicular hyaluronidase (BTH)는 소의 야생형 PH20에서 신호 펩티드(signal peptide)와 C-말단 56개의 아미노산을 단백질번역후변형(post-translational modification) 과정에서 제거한 형태이다. BTH 또한 당 단백질이며 아미노산을 포함한 전체 성분 중 만노오스(mannose)가 5%, 글루코사민(glucosamine)이 2.2%를 차지한다. 동물 유래 히알루로니다제를 인체에 고 용량으로 반복 투여할 경우 중화항체 (neutralizing antibody)가 생성될 수 있다. 동물에서 유래한 히알루로니다제에는 PH20 이외에도 다른 생체물질이 포함되어 있어서, 인체에 투여 시 알러지 반응을 일으키는 원인이 될 수 있다 (Bookbinder et al., 2006). 특히 소에서 추출한 PH20의 경우에는 광우병에 대한 우려로 생산과 이용에 제한이 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 인간 PH20의 재조합 단백질에 대한 연구가 진행되었다.

[12] 인간 PH20의 재조합 단백질은 효모(*P. pastoris*), DS-2 곤충세포, 동물세포 등에서 발현된 것이 보고되었다. 곤충세포와 효모에서 생산된 재조합 PH20 단백질은 단백질번역후변형 과정에서 N-당화의 양상이 인간 PH20과 다르다.

[13] 히알루로니다제 중에서 단백질 구조가 밝혀진 것은 Hyal1 (PDB ID: 2PE4) (Chao et al., 2007)과 Bee venom hyaluronidase (PDB ID: 1FCQ, 1FCU, 1FCV)가 있다. Hyal1은 촉매 도메인과 EGF-유사 도메인의 2개 도메인으로 구성되어 있으며, 촉매 도메인은 단백질의 2차구조를 특징하는 알파나선과 베타-스트랜드가 각각 8번씩 반복되는 $(\beta/\alpha)_8$ 형태를 이룬다 (Chao et al., 2007). EGF-유사도메인은 Hyal1의 C-말단이 다르게 스플라이싱 된 변이체에서 모두 보존되어 있다. Hyal1과 PH20의 아미노산 서열은 35.1% 일치하며, 아직 PH20의 단백질 구조는 밝혀지지 않았다.

[14] 인간 PH20의 재조합 단백질은 Halozyme Therapeutic사에 의해 개발되어 Hylenex 상품명으로 판매되고 있다 (Bookbinder et al., 2006; Frost, 2007).

[15] PH20의 촉매 아미노산인 D146과 E148을 각각 아스파라진(D146N)과 글루타민(E148Q)으로 돌연변이시켰을 때 효소 활성이 없었다 (Arming et al., 1997). 또한 PH20의 R246을 글리신으로 치환하면 효소 활성의 90%가 감소하였고, E319를 글루타민, R322을 트레오닌으로 치환하면 효소 활성이 없어졌다. PH20의 C-말단 부위 아미노산 36개가 제거된(474-509 아미노산 절단) 변이체는 야생형 PH20보다 효소 활성이 75% 감소하였다. 이 돌연변이는 세포 밖으로 분비되지 않고, HeLa 세포 내에 잔존하였다. PH20에서 C-말단 134개 아미노산이 제거되면, PH20의 효소 활성이 없었으며, 세포 밖으로 분비되지 않았다. Frost 등에 의하면 PH20의 C-말단 477-483 부위는 수용성(soluble) 발현에 필수적이다 (Frost, 2007). Full-length PH20 (1~509) 또는 C-말단이 467에서 절단된 PH20 변이체의 활성은 C-말단이 477~483 중 한 곳에서 절단된 PH20 변이체의 10%에 불과하였다 (Frost, 2007).

[16] 한편, 재조합 PH20은 여전히 열 안정성이나 발현율이 충분치 못하여, 보다 향상된 특성을 가지는 히알루로니다제에 대한 수요가 큰 상황이다.

[17]

[18] **발명의 요약**

[19] 본 발명의 목적은 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20에 비해 안정성, 효소 활성 및 발현율이 향상된 신규 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 다른 목적은 상기 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편을 포함하는 암 치료용 조성물 및 이를 이용한 치료방법을 제공하는 것이다.

[21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 아미노산 서열에 있어, 알파나선 부위 및/또는 그 연결 부위에 해당하는 부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고, 선택적으로 N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산 잔기의 일부가 결실된 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한 상기 본 발명에 따른 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편을 포함하는 암 치료용 조성물 및 이를 이용한 치료방법을 제공한다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 PH20의 단백질 3차구조 모델이다. 단백질 결정구조가 밝혀진 Hyal1 (PDB ID: 2PE4)을 주형으로 (Chao et al., 2007) Swiss-Model server (https://swissmodel.expasy.org/)에서 PH20의 단백질 3차구조를 모델링 하였다.

[25] 도 1A에는 PH20의 단백질 3차구조 모델과 촉매 아미노산인 D146과 E148가 표시되어 있다. PH20의 단백질 3차구조는 베타-스트랜드와 알파나선이 8번 반복되어 구성되어 있다.

[26] 도 1B는 PH20의 알파나선 8과 알파나선 8의 N-말단 방향 연결부위를 이루는 G340~I344 잔기가 위치한 에타(n) 8 루프를 나타낸다. G340, T341, L342, S343, I344 잔기가 각각 표시되어 있다.

[27] 도 1C에는 PH20의 알파나선 8에 위치한 아미노산 중 이웃한 2차구조와 상호작용을 이루는 아미노산 잔기(C351, Y357, N363)가 표시되어 있다. C351은 알파나선 1에 위치한 C60과 이황화결합을 이루고, Y357은 베타-스트랜드 7과 알파나선 7 사이에 위치한 F315와 소수성 상호작용을 이루고, N363은 알파나선 1에 위치한 D69 잔기와 수소결합을 이루고 있다.

[28]

[29] 도 2는 야생형(wild type : WT) PH20 및 본 발명에서 제작한 변이체들의 단백질 발현량을 비교한 것이다. WT 및 변이체들은 ExpiCHO 세포에서 transient transfection 방법으로 발현되었다. WT는 발현량이 16.1 mg/L이다. 변이체 HM1과 HM6에 기반한 변이체들은 단백질 발현량이 WT보다 많았으며, HM4와 HM7의 단백질 발현량이 가장 많았다. 변이체 HM6에서 추가적인 아미노산 치환(Y365F 및 I367L)을 도입한 HM11은 단백질 발현이 6.4 mg/mL로 감소하였다.

[30]

[31] 도 3은 변이체 HM1과 HM6에 대한 실험결과이다.

[32] 도 3A는 WT와 변이체 HM1, HM6의 정제 후 SDS-PAGE 결과이다. 정제는 HisTrap 컬럼과 Q Sepharose 컬럼을 사용하였다. WT와 변이체 HM1, HM6의 분자량은 ~70 kDa이다 (그림 설명: M, 분자량 마커; CS, 상등액; FT, flow-through, Elution, 용출 분획).

[33] 도 3B는 pH 7.0에서 turbidimetric assay로 측정한 WT와 변이체 HM1, HM6의 효소 활성 값이다. 본 발명에서 turbidimetric assay로 측정한 효소 활성은 비활성도(specific activity)로 나타내었다.

[34] 도 3C는 substrate-gel assay 방법으로 WT와 변이체 HM1, HM6의 효소 활성을 나타낸 것이다. 2.5% Triton X-100 (w/v)으로 4℃에서 SDS를 제거한 후 37℃에서 1~4 시간 동안 효소 반응을 진행하였다. 변이체 HM6는 WT와 변이체 HM1보다 빨리 renaturation되어 polyacrylamide gel에서 히알루론산을 가수분해하였다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[35] 도 3D는 substrate-gel assay 방법으로 WT와 변이체 HM1의 효소 활성을 pH 5~8에서 각각 나타낸 것이다. WT와 변이체 HM1은 pH 5~8 구간에서 활성을 나타내며, pH 5.0에서 가장 효소 활성이 높다. 변이체 HM1은 인간 혈청 알부민 또는 인간 Hyal1의 신호 펩티드를 가지고 있다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[36] 도 3E는 Phenyl 컬럼을 이용하여 WT와 변이체 HM1, HM6를 분리한 결과이다. 변이체 HM1과 HM6가 WT보다 더 빨리 Phenyl 컬럼에서 용출된다.

[37]

[38] 도 4는 Amide-80 컬럼을 이용하여 10분 및 1시간 후의 WT와 변이체 HM6가 분해한 히알루론산의 최종생성물을 분석한 결과이다.

[39]

[40] 도 5는 PH20의 G340~I344 구간 아미노산 돌연변이에 대한 실험결과이다.

[41] 도 5A는 변이체 HM7, HM8, HM9, HM10, HM21에 대한 HisTrap 컬럼 정제 후 SDS-PAGE 결과이다.

[42] 도 5B는 pH 7.0에서 turbidimetric assay 방법으로 WT와 변이체 HM6, HM8, HM9, HM10, HM21, HM7에 대한 효소 활성을 측정한 결과이다.

[43] 도 5C는 substrate-gel assay를 이용하여 WT와 변이체 HM6, HM8, HM9, HM10, HM21, HM7에 대한 효소 활성을 측정한 것이다. 도 5C의 아래의 막대그래프는 Alcian blue로 gel을 염색 후 밴드를 정량하여 효소 활성 정도를 나타낸 것이다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[44] 도 5D는 Phenyl 컬럼을 이용하여 WT와 변이체 HM8, HM9, HM10, HM21, HM7을 분석한 결과이다.

[45] 도 5E는 IEF gel을 이용하여 pH 3~7 구간에서 WT와 변이체 HM6, HM8, HM9, HM10, HM21, HM7을 등전점 값에 따라 분리한 결과이다.

[46]

[47] 도 6은 변이체 HM11에 대한 실험결과이다.

[48] 도 6A는 변이체 HM11에 대한 HisTrap 컬럼을 이용한 단백질 정제결과이다.

[49] 도 6B는 pH 7.0에서 turbidimetric assay를 이용하여 WT와 변이체 HM11의 효소 활성을 측정한 결과이다.

[50]

[51] 도 7은 N-말단이 절단된 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42 및 HM25에 대한 실험결과이다.

[52] 도 7A는 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42 및 HM25에 대한 HisTrap 컬럼을 이용한 단백질 정제결과이다.

[53] 도 7B는 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42, HM25, HP61 및 HP62에 대한 ExpiCHO 세포에서의 발현량을 나타낸 것이다.

[54] 도 7C는 pH 7.0에서 turbidimetric assay로 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42, HM25, HP61 및 HP62의 효소 활성을 비활성도로 나타낸 것이다.

[55] 도 7D는 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42의 효소 활성을 substrate-gel assay로 나타낸 것이다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[56] 도 7E는 Phenyl 컬럼을 이용하여 WT와 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42를 분석한 결과이다.

[57] 도 7F는 PH20 변이체 HM40, HM13, HM41, HM42에 대해 온도 증가에 따른 입자 크기의 변화를 나타낸 것이다.

[58]

[59] 도 8은 HM6를 주형으로 제작된 C-말단 절단 변이체인 HM14, HM15, HM16에 대한 실험결과이다.

[60] 도 8A는 변이체 HM14, HM15, HM16에 대한 HisTrap 정제 후 SDS-PAGE 결과이다. 대조군으로 WT와 변이체 HM6를 포함하였다.

[61] 도 8B는 pH 7.0에서 turbidimetric assay 방법으로 WT와 변이체 HM6, HM14, HM15, HM16의 효소 활성을 측정한 결과이다.

[62] 도 8C는 substrate-gel assay 방법으로 1, 2, 4시간 동안 WT와 변이체 HM6, HM14, HM15, HM16에 대한 효소 활성을 측정한 결과이다. 도 8C의 오른쪽 그래프는 효소 반응 1시간 후 Alcian-blue로 염색한 후 효소 활성을 막대 그래프로 나타낸 것이다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[63] 도 8D는 Phenyl 컬럼을 이용하여 WT와 변이체 HM6, HM14, HM15, HM16을 분석한 결과이다.

[64] 도 8E는 IEF gel을 이용하여 pH 3~7 구간에서 변이체 HM14, HM15, HM16을 등전점 값에 따라 분리한 결과이다.

[65]

[66] 도 9는 HM10을 주형으로 제작한 PH20 변이체 HM19와 HM20에 대한 실험 결과이다.

[67] 도 9A는 PH20 변이체 HM19와 HM20에 대한 HisTrap 컬럼을 이용한 단백질 정제결과이다.

[68] 도 9B는 PH20 변이체 HM19와 HM20에 대한 효소 활성을 pH 7.0에서 turbidimetric assay로 비교한 것이다.

[69] 도 9C는 WT와 HM10, HM19, HM20에 대해 substrate-gel assay로 37°C에서 1시간 동안 효소반응 후 Alcian blue 염색약으로 SDS gel을 염색한 것이다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[70]

[71] 도 10은 동적광산란법(Dynamic Light Scattering, 이하 DLS라고 함) 장비를 이용하여 WT와 PH20 변이체들의 응집온도를 측정한 값이다. 측정은 3회 반복하였고 평균 ±S.E. 값으로 나타내었다.

[72]

[73] 도 11은 아크릴아마이드 (0~0.5 M) 첨가 시 WT와 PH20 변이체의 트립토판 잔기의 형광변화를 측정한 후 Stern-Volmer plot으로 나타낸 것이다. 아미노산 중 트립토판은 295 nm에서 여기(excitation)되어 340 nm에서 최대 형광 파장을 방출한다(emission). 아크릴아마이드는 작은 분자로 단백질의 구조 내부로 침투하여 트립토판의 형광 방출을 quenching할 수 있다. 단백질의 구조가 유연할수록 아크릴아마이드에 의한 형광 quenching은 더 크다. F0는 아크릴아마이드가 없을 때의 형광 값이고, F는 아크릴아마이드 (0~0.5 M) 첨가 시의 형광 값이다. 형광 측정 값의 변화를 F0/F의 비율로 나타내었다.

[74] 도 11A는 WT와 변이체 HM1, HM4, HM6, HM7에 대한 Stern-Volmer plot이다.

[75] 도 11B는 WT와 변이체 HM14, HM15, HM16에 대한 Stern-Volmer plot이다.

[76]

[77] 도 12는 HM10 기반 PH20 변이체의 ExpiCHO 세포에서의 발현량을 나타낸 것이다.

[78] 도 12A는 각 변이체의 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

[79] 도 12B는 각 변이체의 발현량을 표로 나타낸 것이다. WT와 PH20 변이체들은 C-말단에 6xHis-tag을 가지고 있으며, HisTrap 컬럼 정제 후의 단백질 발현량을 mg/L로 표시하였다. HM30~HM33 변이체들은 ExpiCHO 세포에서 발현되지 않았다.

[80]

[81] 도 13은 HM29, HM30, HM31, HM32 및 HM33의 세포배양액에 대한 Western blot 결과이다. HM10 기반의 변이체인 HM29, HM30, HM31, HM32, HM33은 C-말단이 A467, C464, D461, C358 및 C455의 다음에서 절단된다. C-말단이 A467에서 절단된 HM29는 ExpiCHO 세포에서 발현되었으나, C-말단이 C464에서 절단되거나 더 짧을 경우에는 ExpiCHO 세포에서 발현되지 않았다.

Primary antibody는 rabbit anti-PH20 polyclonal antibody (Abcam)이며 1:500으로 희석하였다. Secondary antibody는 Goat anti-rabbit IgG HRP이며 1:2,000으로 희석하였다.

[82]

[83] 도 14는 HM10을 주형으로 제작된 C-말단 절단 변이체들에 대해 실험결과이다.

[84] 도 14A는 HM10을 주형으로 제작된 C-말단 절단 변이체들에 대해 pH 7.0에서 turbidimetric assay로 효소 활성을 측정한 결과이다.

[85] 도 14B는 HM10을 주형으로 제작한 17개 PH20 변이체(HM43, HM44, HM45, HM20, HM19, HM35, HM36, HM37, HM38, HM39, HM47, HM48, HM49, HM50, HM51, HM52, HM10)들의 C-말단 절단 자리에 따른 효소 활성을 비교한 것이다.

[86] 도 14C는 HM10을 주형으로 제작한 PH20 변이체들 중에서 HM29, HM35, HM36, HM37, HM38, HM39, HM43, HM44 및 HM45에 대해 substrate-gel assay로 37°C에서 1시간 동안 효소반응 후 Alcian blue 염색약으로 SDS gel을 염색한 것이다. 흰색의 밴드는 WT 및 변이체 단백질에 의해 히알루론산이 분해된 것이다.

[87]

[88] 도 15는 ExpiCHO 세포에서 발현된 HP34 (도 15A)와 HP46 (도 15B)에 대한 단백질 정제 중 최종 컬럼을 거친 후의 SDS gel을 나타낸 것이다. HP34는 Q Sepharose, Butyl HP, Heparin, Blue Sepharose 컬럼의 4 단계 정제를 거쳤으며 SDS gel은 Blue Sepharose 컬럼 정제 후의 결과이다. HP46은 Q Sepharose, Butyl HP, Heparin 컬럼의 3 단계 정제를 거쳤으며, SDS gel은 Heparin 컬럼 정제 후의 결과이다.

[89]

[90] 도 16은 HM21을 주형으로 제작된 6xHis-tag이 없는 PH20 변이체인 HP34와 HP46의 효소 활성을 나타낸 것이다.

[91] 도 16A는 pH 7.0에서 turbidimetric assay 방법으로 WT와 변이체 HM21, HP34, HP46의 효소 활성을 측정한 결과이다.

[92] 도 16B는 pH 5.3에서 Morgan-Elson assay 방법으로 HW2와 변이체 HM21, HP34, HP46의 효소 활성을 측정한 결과이다. K_m: Michaelis-Menten 상수, k_{cat}: turnover number, k_{cat} / K_m: catalytic efficiency).

[93]

[94] 도 17은 HM21 기반의 변이체 특성 분석 결과를 나타낸 결과이다.

[95] 도 17A는 HM21을 주형으로 제작된 6xHis-tag이 없는 PH20 변이체인 HP34와 HP46에 대해 DLS로 응집온도를 측정한 것이다. 대조군으로 HW2와 HM21의 응집온도를 나타내었다.

[96] 도 17B는 HW2와 PH20 변이체 HP20, HP34, HP46에 대하여 substrate-gel assay로 1시간 동안 효소 활성을 측정한 결과이다.

[97] 도 17C는 pH 3.0과 pH 7.0에서 HW2와 HP46 시료를 14시간 동안 방치한 후,

substrate-gel assay를 수행하였다. SDS-PAGE 후 2.5% Triton X-100 (w/v)으로 SDS 제거하고 37℃에서 1시간 동안 효소반응을 진행한 결과이다.

[98] 도 17D는 PH20 변이체 HM21, HM53, HM54, HM55, HM56, HP59 및 HP60에 대한 ExpiCHO 세포에서의 발현량을 나타낸 것이다.

[99] 도 17E는 pH 5.3에서 turbidimetric assay로 PH20 변이체 HM21, HM53, HM54, HM55, HM56, HP59 및 HP60의 효소 활성을 비활성도로 나타낸 것이다.

[100]

[101] 도 18은 PH20과 PH20 변이체의 각각 1.5 ng/mL과 15 ng/mL 농도 처리에서의 CD4+ T cell의 stimulating index 측정 결과이다.

[102]

[103] 도 19는 PH20과 PH20 변이체의 각각 1.5 ng/mL과 15 ng/mL 농도 처리에서의 CD8+ T cell의 stimulating index 측정 결과이다.

[104]

[105] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[106] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[107]

[108] 본 발명은 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 아미노산 서열에 있어, 알파나선 부위 및/또는 그 연결 부위에 해당하는 부위, 바람직하게는 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는, 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위(A333~R346)에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고, 선택적으로 N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산 잔기 일부가 절단되어 결실된 히알루로니다제 PH20 변이체 또는 이의 절편을 제공한다.

[109]

[110] 본 발명에 있어, 각 변이체의 아미노산 잔기의 위치는 서열번호 1에 따른 야생형 PH20의 아미노산의 위치에 따른다.

[111] 또한, 본 발명에 있어, "성숙된 야생형 PH20"은 서열번호 1의 야생형 PH20의 아미노산 서열에서, 시그널 펩타이드인 M1 내지 T35와, PH20의 실질적인 기능과는 무관한 A491~L509가 결실된, 서열번호 1의 L36~S490의 아미노산 잔기로 이루어진 단백질을 의미한다.

[112]

[113] [표1]

야생형 PH20의 아미노산 서열 (서열번호 1)

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKF
DEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK
KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK
AKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL
SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVL
KFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCS
QVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYS
TLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISS
VASL

[114] 구체적으로, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편은 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 PH20에 있어, T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E 및 I361T로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 변이, 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 T341A, T341C, L354I 및 N356E로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[115] 본 발명에 있어, "PH20 변이체"는 야생형 PH20의 서열에서 일부 아미노산 잔기의 변이, 바람직하게는 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것 뿐 아니라, 그러한 아미노산 잔기의 치환과 함께, N-말단 또는 C-말단에서의 일부 아미노산 잔기의 결실이 일어난 것을 모두 포함하는 개념으로 사용되며, "PH20 변이체 또는 이의 절편"이라는 표현과 실질적으로 동일한 개념으로 사용된다.

[116]

[117] 본 발명에서는 단백질 3차구조가 알려진 인간 히알루로니다제인 Hyal1 (서열번호 2)을 바탕으로 인간 PH20의 단백질 구조 모델링을 통하여 활성부위 바깥에 위치한 PH20의 단백질 3차구조를 연구한 결과, PH20의 알파나선 8 부위에 위치한 아미노산을 선택하여 Hyal1의 알파나선 8의 아미노산 서열로 치환하여 효소의 촉매작용에는 영향을 주지 않으면서도 단백질 구조의 열 안정성 강화를 시도하였다. 특히 알파나선 8은 PH20의 단백질 3차구조에서 바깥쪽에 위치하고 있으며, 이웃한 알파나선 또는 베타-스트랜드와 상호작용이 다른 알파나선에 비해 적다. 본 발명에 따르면, 인간 PH20의 알파나선 8 부위와,

알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위의 아미노산 서열을 친수성이 큰 Hyal1의 알파나선 8 부위와, 알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위의 아미노산 서열로 일부 치환하면, 중성 pH에서의 효소 활성과 단백질 응집온도(aggregation temperature, Tagg.)가 증가한다는 실험결과를 바탕으로, 야생형 PH20보다 효소 활성과 열 안정성이 증가한 새로운 PH20 변이체 또는 이의 절편을 제공할 수 있음을 규명하였다.

[118]

[119] 이에 따라 본 발명에 따른 PH20 변이체는 야생형 PH20(서열번호 1의 아미노산 서열을 가짐), 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 아미노산 서열(서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 L36~S490로 이루어진 서열을 가짐)에 있어, T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E 및 I361T로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 바람직하게는 T341A, T341C, L354I 및 N356E로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하며,

[120] 알파나선 부위 및/또는 그 연결 부위에 해당하는 부위, 바람직하게는 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위(A333~R346), 더욱 바람직하게는 T341~N363, T341~I361, L342~I361, S343~I361, I344~I361, M345~I361 또는 M345~N363에 해당하는 아미노산 부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환된 것을 특징으로 한다.

[121]

[122] 특히 본 발명에 따른 PH20 변이체는 상기 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는, 알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위(A333~R346)가 서열번호 2의 서열을 가지는 Hyal1의 대응되는 부위(표 2 및 표 3 참조)의 아미노산 서열 중의 일부 아미노산 잔기로 치환될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[123]

[124] [표2]

야생형 Hyal1의 아미노산 서열 (서열번호 2)

MAAHLLPICALFLTLLDMAQGFRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVDVDVSVFDVVA
NPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFS
GLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAAR
AWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPDCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQ
SRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPL
DELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQAL
CSGHGRCVRRTSHPKALLLLNPASFSIQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPG
WQAPWCERKSMW

[125] [표3]

PH20과 Hyal1의 알파나선 및 아미노산 서열 비교

알파나선	PH20의 아미노산 서열	Hyal1의 아미노산 서열
알파나선 1	P56~D65	N39~G48
알파나선 3	S119~M135	S101~I117
알파나선 4'	K161~N176	K144~H159
알파나선 4	S180-R211	P163~R194
알파나선 5	F239~S256	P222~S239
알파나선 6	A274~D293	K257~G277
알파나선 7	S317~G332	P299~G314
알파나선 8	S347~C381	T329~C363

[126] 보다 구체적으로 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체 또는 이의 절편은 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 아미노산 서열에 있어, L354I 및/또는 N356E의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고,

[127] 추가적으로 T341 내지 N363 사이에서 선택된 하나 이상의 위치, 특히 T341, L342, S343, I344, M345, S347, M348, K349, L352, L353, D355, E359, I361 및 N363로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에서의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[128] 상기 T341, L342, S343, I344, M345, S347, M348, K349, L352, L353, D355, E359, I361 및 N363로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에서의 아미노산 잔기의 치환은 T341A, T341C, T341D, T341G, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, D355K, E359D, I361T 및 N363G로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것이 더욱 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[129]

[130] 바람직하게는 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체 또는 이의 절편은 M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하며,

[131] 추가적으로 T341A, T341C, T341D, T341G, T341S, L342W, S343E, I344N 및 N363G로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[132]

[133] 보다 바람직하게는 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체 또는 이의 절편은 다음으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[134]

[135] (a) T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q,

[136] L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[137] (b) L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A,

[138] L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[139] (c) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T 및 N363G;

[140] (d) T341G, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[141] (e) T341A, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[142] (f) T341C, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[143] (g) T341D, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q,

L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

[144] (h) I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T; 및

[145] (i) S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T

[146]

[147] 본 발명에 있어서, "S347"과 같이 1 글자(one letter)의 아미노산 잔기명과 숫자가 함께 기재된 표현은 서열번호 1에 따른 아미노산 서열에서의 각 위치에서의 아미노산 잔기를 의미한다.

[148] 예를 들어 "S347"은 서열번호 1의 아미노산 서열에서의 347번째 위치에서의 아미노산 잔기가 세린임을 의미한다.

[149] 또한, "S347T"는 서열번호 1의 347번째 세린이 트레오닌으로 치환된 것임을 의미한다.

[150]

[151] 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편은, 특정 아미노산 잔기 위치에서, 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 변이체 또는 이의 절편들도 포함하는 의미로 해석된다.

[152] 본 명세서에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 PH20 변이체의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 PH20 변이체의 변형을 의미한다.

[153] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.

[154] 본 발명의 PH20 변이체는 보존적 아미노산 치환을 갖더라도 여전히 활성을 보유할 수 있음이 예상된다.

[155]

[156] 또한, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편은, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편과 실질적으로 동일한 기능 및/또는 효과를 가지며, 80% 또는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 PH20 변이체 또는 이의 절편들도 포함하는 의미로 해석된다.

[157]

[158] 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편들은 성숙된 야생형 PH20보다 동물세포에서 발현이 증가하며, 단백질 접힘도 증가하여 열 안정성이 증가하는 효과를 나타내며, 나아가 열 안정성이 증가함에도 불구하고, 이들의 효소 활성은 성숙된 야생형 PH20보다 증가하거나 유사하였다.

[159]

[160] 한편, 성숙된 야생형 PH20의 C-말단 부위가 절단되면 효소 활성이 감소하는 것으로 알려져 있으나, 본 발명에 따른 PH20 변이체들은 단백질 접힘 증가와 열 안정성 증가로 인하여 C-말단이 절단됨에도 불구하고 성숙된 야생형 PH20보다 증가하거나 유사한 효소 활성을 유지하였으며, 또한 N-말단의 아미노산이 5개까지 절단되어도 효소 활성을 유지하여 N-말단의 P41 잔기부터가 단백질 발현과 효소 활성에 중요한 역할을 함을 보였다.

[161]

[162] 이에 따라 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편은, 야생형 PH20의 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는, 알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위(A333~R346)에서의 일부 아미노산 잔기의 치환과 함께, 추가적으로 C-말단 및/또는 N-말단에서의 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[163]

[164] 한 측면에서, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편은, 서열번호 1의 아미노산 서열 N-말단의 M1 내지 P42로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기의 앞, 바람직하게는 L36, N37, F38, R39, A40, P41 또는 P42의 아미노산 잔기 앞에서의 절단이 일어나 N-말단에서의 일부 아미노산 잔기가 결실되거나, 및/또는 C-말단의 V455 내지 L509로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 다음, 바람직하게는 V455 내지 S490로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 다음, 가장 바람직하게는 V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 또는 S490의 아미노산 잔기 다음에서의 절단이 일어나 C-말단에서의 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 할 수 있다.

[165]

[166] 상기 N-말단의 M1 내지 P42로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기의 앞에서의 절단이 일어났다는 표현은 N-말단의 M1 내지 P42에서 선택된 아미노산 잔기의 바로 앞 아미노산 잔기까지가 절단되어 결실되었다는 의미이다.

[167] 예를 들어, L36, N37, F38, R39, A40, P41 또는 P42의 아미노산 잔기 앞에서의 절단이 일어났다는 표현은, 각각 서열번호 1의 서열에서 M1부터 L36의 바로 앞 아미노산 잔기인 T35까지, M1부터 N37의 바로 앞 아미노산 잔기인 L36까지, M1부터 F38의 바로 앞 아미노산 잔기인 N37까지, M1부터 R39의 바로 앞

아미노산 잔기인 F38 까지, M1부터 A40의 바로 앞 아미노산 잔기인 R39까지, M1부터 P41의 바로 앞 아미노산 잔기인 A40까지, M1부터 P42의 바로 앞 아미노산 잔기인 P41까지가 절단되어 제거되었다는 것을 의미한다.

[168]

[169] 또한, C-말단의 V455 내지 L509로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 다음에서 절단이 일어났다는 표현은 C-말단의 V455 내지 L509에서 선택된 아미노산 잔기의 바로 다음 아미노산 잔기부터 절단되어 결실되었다는 의미이다.

[170]

[171] 예를 들어, C-말단의 V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 또는 S490의 아미노산 잔기 다음에서의 절단이 일어났다는 표현은 각각 서열번호 1의 서열에서 상기 V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 또는 S490 다음 아미노산 잔기부터 절단되어 제거되었음을 의미한다.

[172]

[173] 바람직하게는, 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체 또는 이의 절편은 서열번호 60 내지 서열번호 115의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[174] 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체 또는 이의 절편은 서열번호 99의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다. 상기 서열번호 99의 아미노산 서열을 갖는 신규 PH20 변이체는 T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 F468 잔기 다음에서 절단된 것을 특징으로 한다.

[175]

[176] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서 제작한 PH20 변이체에서 치환 또는 절단된 아미노산의 서열은 표 11에 기재된 바와 같다.

[177]

[178] 본 발명에서와 같이 단백질의 3차구조를 형성하는 2차구조인 알파나선과 그 연결부위의 아미노산 치환을 통해 PH20의 효소 활성과 열 안정성을 증가시키려는 연구는 보고된 바가 없다. 선행연구에서 야생형 PH20의 경우 C-말단에 위치한 아미노산 잔기의 절단 위치에 따라 효소 활성이 변하는 것으로 보고되었으나, 본 발명에서는 PH20의 2차구조를 이루는 특정 알파나선을 다른 인간 히알루로니다제의 알파 나선으로 치환하여 야생형 PH20보다 안정성이 높은 PH20 변이체를 제작하였고, 이 변이체들은 치환된 알파 나선 도메인이 PH20의 다른 2차 구조를 이루는 부분들과의 상호 작용이 야생형 PH20과 다른 양상을 나타냄으로써 C-말단 절단 위치에 상관없이 일정한 효소 활성을 지니는

변이체인 것을 특징으로 한다.

[179]

[180] 구체적인 실시예에서, 성숙된 야생형 PH20 대비 효소 활성과 열 안정성이 증가한, 본 발명에 따른 새로운 PH20 변이체 또는 이의 절편은 야생형 PH20, 바람직하게는 성숙된 야생형 PH20의 아미노산 서열에 있어, T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E 및 I361T로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하며, 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는, 알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위(A333~R346)에 위치한 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 한다.

[181] 구체적으로 알파나선 8과, 알파나선 7과 알파나선 8의 연결 부위 아미노산 치환은 T341~N363, T341~I361, L342~I361, S343~I361, I344~I361, M345~I361 또는 M345~N363 구간에서의 일부 아미노산을 치환을 포함한다.

[182] 알파나선 8과 알파나선 7 및 알파나선 8의 연결 부위를 치환한 PH20 변이체에서 C-말단 절단의 효과를 알아보기 위해 3개의 PH20 변이체 HM6, HM10 및 HM21을 주형으로 선정하였다.

[183]

[184] HM6는 M345~N363 구간의 아미노산을 Hyal1의 아미노산 서열로 치환한 변이체 (서열번호 1에서 M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T이 치환됨)로, 추가적인 C-말단 절단을 포함하지 않는(즉, 성숙된 야생형 PH20과 같이 C-말단 아미노산 잔기가 S490인 형태) 본 발명에 따른 PH20 변이체 중에서 알파나선 8 부위와, 알파나선 7 및 알파나선 8의 연결 부위의 치환이 가장 적은 변이체이고,

[185] HM10은 L342~I361 구간의 아미노산을 Hyal1의 아미노산 서열로 치환한 변이체 (서열번호 1에서 L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T이 치환됨)로, 역시 추가적인 C-말단 절단은 포함하지 않으며 본 발명에 따른 PH20 변이체 중에서 성숙된 야생형 PH20과 유사한 효소 활성을 가지면서 열 안정성이 가장 높은 변이체이고,

[186] HM21은 T341~I361 구간의 아미노산을 Hyal1의 아미노산 서열로 치환한 변이체(서열번호 1에서 T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T이 치환됨)로, 역시 추가적인 C-말단 절단은 포함하지 않으며, pH 7.0에서 야생형 PH20보다 효소 활성이 약 2배 높은 변이체이다.

[187] 본 발명에서 제작한 HM6 기반의 PH20 변이체는 N-말단은 L36에서 절단되고, C-말단이 표 4에서와 같이 I465, F468, 또는 P471 다음에서 절단되었다.

[188]

[189] [표4]

HM6를 주형으로 제작한 C-말단 절단 PH20 변이체

Variant	Total length	Substituted region	Number of substituted amino acids	Number of truncated amino acids
HM6	36~490	M345~I361	11	0
HM14	36~465		11	25
HM15	36~468		11	22
HM16	36~471		11	19

[190] HM10 기반의 PH20 변이체는 공통적으로 N-말단이 F38 잔기 앞에서 절단되고, C-말단은 표 5에서와 같이 V455, C4578, D46, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, 또는 T488 잔기 다음에서 절단되었다.

[191]

[192] [표5]

HM10을 주형으로 제작한 C-말단 절단 PH20 변이체

Variant	Total length	Substituted region	Number of substituted amino acids	Number of truncated amino acids
HM10	36~490		14	0
HM52	38~488		14	4
HM51	38~486		14	6
HM50	38~484		14	8
HM49	38~482	L342~I361	14	10
HM48	38~480		14	12
HM47	38~478		14	14
HM39	38~476		14	16
HM38	38~475		14	17

[193]

HM37	38~474	14	18
HM36	38~473	14	19
HM35	38~472	14	20
HM19	38~470	14	22
HM20	38~468	14	24
HM45	38~467	14	25
HM29	36~467	14	23
HM44	38~466	14	26
HM43	38~465	14	27
HM30	36~464	14	26
HM31	36~461	14	29
HM32	36~458	14	32
HM33	36~455	14	35
HP19	38~470	14	22
HP20	38~468	14	24

[194] HM10을 주형으로 알파나선 8 부위 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위 의 L342~I361 구간의 아미노산 치환을 포함하고, N-말단이 F38 잔기 앞에서 절단되고, C-말단이 I465, D466, A467, F468, K470, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486 또는 T488에서 절단된 변이체들의 예에서 보듯이 본 발명에 따른 PH20 변이체들은 C-말단의 절단 위치와 상관없이 성숙된 야생형 PH20과 유사한 효소 활성을 나타내었다.

[195]

[196] HM21 기반의 PH20 변이체 2개는 표 6에서와 같이 공통적으로 N-말단이 F38 잔기 앞에서 절단되고, 표 6에서와 같이 C-말단은 F468 또는 K470 잔기 다음에서

절단되었다.

[197]

[198] [표6]

HM21을 주형으로 제작한 C-말단 절단 PH20 변이체

Variant	Total length	Substituted region	Number of substituted amino acids	Number of truncated amino acids
HM21	38~490		15	2
HP34	38~470	T341~I361	15	22
HP46	38~468		15	24

[199] 놀랍게도, 성숙된 야생형 PH20보다 효소 활성이 약 2배 높은 HM21을 주형으로 알파나선 8 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위의 T341~I361 구간의 아미노산 치환을 포함하고, N-말단이 F38 잔기 앞에서 절단되고, C-말단이 F468 또는 K470 다음에서 절단된 변이체들은 C-말단 절단 위치와 상관없이 HM21의 높은 효소 활성을 유지하였다.

[200] Frost 등의 연구에서는 PH20의 C-말단이 477에 비해 앞에서 절단되어 더 짧을 때는 C-말단이 477 다음에서 절단된 변이체에 비해 효소 활성이 10%대로 감소하였으나 (Frost, 2007), 본 발명에서는 PH20의 알파나선 8과 그 연결 부위의 아미노산을 치환할 경우 단백질의 안정성 증가로 인하여 C-말단 절단위치와 상관없이 효소 활성이 유지되었다. 이 결과는 야생형 PH20의 C-말단 절단으로 인한 효소 활성의 감소 문제를 해결한 점에서 의의가 크다.

[201]

[202] 또한 본 발명에서는 기존 연구에서 알려지지 않았던 PH20의 N-말단 부위 아미노산의 영향을 연구하였다.

[203] 야생형 PH20의 알파나선 8 부위 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위(M345~I361)의 일부 아미노산 잔기를 Hyal1의 대응되는 알파나선 8 부위 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위의 아미노산 잔기로 치환한 HM6 변이체 (서열번호 1에서 M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 치환되고, 추가적인 C-말단 절단은 포함하지 않음)에서 N-말단 절단 아미노산의 효과를 알아보기 위해 HM6를 주형으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 L36 내지 V47의 아미노산 잔기들이 FRGPLLPNR로 치환되거나, L36 내지 A52의 아미노산 잔기들이 FRGPLLPNRPFTTV로 치환된

변이체를 제작하였다. 또한 HM6를 주형으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 N-말단이 N37, F38, R39, A40, P41, 또는 P42 잔기의 앞에서 절단된 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42 및 HM25를 제작하였다(표 7 참조).

[204]

[205] [표7]

HM6 기반의 N-말단 절단 변이체

Variant	Total length	Substituted region	Number of substituted amino acids	Number of truncated amino acids
HM6	36~490		11	0
HM40	37~490		11	1
HM13	38~490		11	2
HM41	39~490	M345~I361	11	3
HM24	40~490		11	4
HM42	41~490		11	5
HM25	42~490		11	6
HM17		L36~V47, M345~I361	23	
HM18		L36~A52, M345~I361	28	

[206] 그 결과, HM6의 N-말단이 N37, F38, R39, A40 또는 P41 잔기의 앞에서 절단될 경우에는 효소 활성에 큰 영향을 주지 않았으나, N-말단이 P42 잔기의 앞에서 절단될 경우에는 효소 활성이 현저히 감소하여 P41 이후의 PH20의 N-말단 부분이 단백질 발현과 효소 활성에 중요함을 보였다. 또한, HM6의 N-말단 L36~V47 또는 L36~A52 구간의 아미노산을 Hyal1의 아미노산으로 치환하였을 때는 ExpiCHO 세포에서 발현되지 않아 N-말단 부분이 단백질 발현에 중요함을

보였다.

[207]

[208] 또한, 본 발명에서는 PH20의 고유한 신호 펩티드가 아닌 동물세포에서 단백질 발현량이 많은 다른 단백질의 신호 펩티드를 이용하여 재조합 PH20 단백질의 발현을 향상시키고자 하였다.

[209] 이에 따라 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체는 M1 내지 T35의 야생형 PH20의 신호 펩티드를 대신하여, 추가적으로 N-말단에 표 8에 기재된 바와 같은 서열번호 3에 따른 MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA의 아미노산 서열을 갖는 인간 성장호르몬 유래의 신호 펩티드, 서열번호 4에 따른 MKWVTFISLLFLFSSAYS의 아미노산 서열을 갖는 인간 혈청 알부민 유래의 신호 펩티드, 또는 서열번호 5에 따른 MAAHLLPICALFLTLLDMAQG의 아미노산 서열을 갖는 인간 Hyal1 유래의 신호 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[210]

[211] 상기 "M1 내지 T35의 야생형 PH20의 신호 펩티드를 대신"한다는 의미는 야생형 PH20의 신호 펩티드의 일부 또는 전부가 결실되어 야생형 PH20의 신호 펩티드의 기능을 수행하지 못하는 경우를 의미하며, 추가적으로 N-말단의 일부가 더 결실된 경우, 예를 들어 N37, F38, R39, A40, P41 또는 P42 잔기 앞에서의 절단이 일어나 야생형 PH20의 신호 펩티드와 함께 추가적인 N-말단의 결실이 일어난 경우를 포함하는 의미로 사용된다.

[212]

[213] [표8]

인간 성장호르몬, 인간 혈청 알부민, 또는 인간 Hyal1의 신호 펩티드의 아미노산 서열

	아미노산 서열	서열번호
인간 성장호르몬	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA	3
인간 혈청 알부민	MKWVTFISLLFLFSSAYS	4
인간 Hyal1	MAAHLLPICALFLTLLDMAQG	5

[214] 본 발명은 다른 측면에서, 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체를 포함하는 암

치료용 조성물 및 이를 이용한 암 치료방법을 제공한다.

[215]

[216] 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체로 치료가능한 암 또는 암종은 특별히 제한되지 않으며, 고형암 및 혈액암을 모두 포함한다. 이러한 암의 예로는 흑색종 등의 피부암, 간암, 간세포암(hepatocellular carcinoma), 위암, 유방암, 폐암, 난소암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 식도암, 담도암, 고환암, 직장암, 두경부암, 경추암, 요관암, 골육종, 신경아세포종, 섬유육종, 횡문근육종, 성상세포종, 신경모세포종 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 본 발명의 조성물로 치료할 수 있는 암은 대장암, 유방암, 폐암 및 신장암으로 구성된 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[217]

[218] 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다. 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[219] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여 시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[220] 상기 약학적 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[221] 특히, 본 발명에 따른 암 치료용 조성물은 다른 항암제와의 병용 치료 용도로 사용되는 것을 특징으로 한다.

[222] 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체와 병용 치료 용도로 사용가능한 항암제는 화학항암제, 항체 형태의 항암제, RNAi, 세포 치료제 등이 바람직하지만 이에

한정되는 것은 아니다.

[223] 바람직하게는 본 발명에 따른 신규 PH20 변이체와 병용 치료 용도로 사용가능한 항암제는 면역항암제, 특히 바람직하게는 면역체크포인트 저해제(immune checkpoint inhibitor)이지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[224]

[225] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[226] 본 명세서에서 사용되는 핵산은 세포, 세포 용해물(lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기 영동 및 해당 기술분야에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[227] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편의 발현을 위하여, PH20 변이체를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예를 들어 PCR 증폭 또는 PH20 변이체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며, DNA가 전사 및 번역 제어 서열에 "작동되도록 결합"되어 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[228] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동되도록 결합"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 PH20 변이체 또는 이의 절편을 코딩하는 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 하도록 PH20 변이체 또는 이의 절편을 코딩하는 유전자가 벡터 내로 라이게이션된다는 것을 의미할 수 있다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현용 숙주세포와 적합하도록 선택된다. PH20 변이체를 코딩하는 유전자는 표준 방법(예를 들어 PH20 변이체 또는 이의 절편을 코딩하는 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 효소 부위의 라이게이션, 또는 제한 효소 부위가 전혀 존재하지 않을 경우 블런트(blunt) 말단 라이게이션)으로 발현 벡터 내로 삽입된다.

[229] 또한, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포에서 PH20 변이체를 코딩하는 유전자의 발현을 제어하는 조절서열을 지닌다. "조절서열"은 PH20 변이체 또는 이의 절편을 코딩하는 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어 폴리아데닐화 신호)를 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 형질전환시킬 숙주세포의 선택, 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 조절 서열을 달리 선택하여, 발현 벡터의 디자인이 달라질 수 있음을 인식할 수 있다.

[230]

[231] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포에

관한 것이다. 본 발명에 따른 숙주 세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[232] 구체적으로는 본 발명에 따른 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스 속 (Streptomyces sp.), 슈도모나스 속(Pseudomonas sp.), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스 속(Staphylococcus sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(Aspergillus sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 쉬조사카로마세스 속(Schizosaccharomyces sp.) 및 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다.

[233] 또한 식물이나 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용가능하지만 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포가 사용될 수 있다.

[234]

[235] 상기 핵산 또는 상기 벡터는 숙주세포에 형질주입 또는 트랜스펙션(transfection)된다. "형질주입" 또는 "트랜스펙션시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편을 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(Escherichia coli)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λgt10과 λgt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2℃ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

[236]

[237] 본 발명은 또 다른 관점에서, 숙주세포를 배양하여 본 발명에 따른 PH20

변이체 또는 이의 절편을 발현시키는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편의 제조방법에 관한 것이다.

[238] 상기 PH20 변이체 또는 이의 절편을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주세포 내로 도입될 경우, PH20 변이체 또는 이의 변이체는 숙주세포에서 발현되기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 PH20 변이체가 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다.

[239] 경우에 따라서, 발현된 PH20 변이체는 숙주세포로부터 분리하여 균일하도록 정제할 수 있다. 상기 PH20 변이체의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피에서 선택된 하나 이상의 조합일 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합되어 사용될 수 있다.

[240]

[241] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[242]

[243] 실시예

[244] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[245]

[246] 실시예 1. PH20 변이체 제작

[247] PH20 변이체 제작을 위해 야생형 PH20의 cDNA (clone ID: hMU002604)를 한국인간유전자은행에서 구입하였다. 야생형 PH20은 아미노산 L36부터 S490까지를 암호화한다. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR이라고 함)을 이용하여 PH20의 유전자를 증폭하고 pcDNA3.4-TOPO vector의 Xho I과 Not I 제한효소 자리에 삽입하였다. ExpiCHO 세포에서의 발현을 위해 PH20의 고유한 신호 펩티드 대신 인간 성장호르몬, 인간 혈청 알부민, 또는 인간 Hyal1의 신호 펩티드 중 하나를 신호 펩티드로 사용하였다. HisTrap 컬럼을 이용한 단백질 정제를 위해 PH20 cDNA의 3'-말단에 6xHis-tag의 DNA 서열이 위치하게 하였다. PH20 변이체의 아미노산 치환은 PCR 방법을 이용하였고, 아미노산의 치환 확인은 DNA sequencing을 이용하였다.

[248] PH20 변이체의 클로닝에 사용한 프라이머의 목록은 표 9에 정리되어 있고,

이의 구체적 서열은 표 10에 정리되어 있다.

[249]

[250] [표9]

PH20 변이체의 클로닝에 사용한 프라이머 목록

클론	프라이머		
	1	2	3
cB4202	ALB-SP-Xho	ALB-PH20-MR	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM1	ALB-SP-Xho	PH20_M345-364-F	SPAM1-6H-not
cB4203-HM2	ALB-SP-Xho	PH20_Y365-L380-F	SPAM1-7H-not
cB4203-HM3	ALB-SP-Xho	PH20_M345-L380-F	SPAM1-8H-not
cB4203-HM4	ALB-SP-Xho	B4203-HM4-F	SPAM1-9H-not
cB4203-HM5	ALB-SP-Xho	B4203-HM5-F	SPAM1-10H-not
cB4203-HM6	ALB-SP-Xho	PH20-G363N	SPAM1-6H-not
cB4203-HM7	ALB-SP-Xho	PH20-G363N	SPAM1-12H-not
cB4203-HM8	ALB-SP-Xho	cB4203-HM8-M	SPAM1-13H-not
cB4203-HM9	ALB-SP-Xho	cB4203-HM9-M	SPAM1-14H-not
cB4203-HM10	ALB-SP-Xho	cB4203-HM10-M	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM11	ALB-SP-Xho	4203-HM11	SPAM1-16H-not
cB4203-HM12	ALB-SP-Xho	4203-HM12	SPAM1-17H-not
cB4203-HM13	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	SPAM1-18H-not
cB4203-HM14	ALB-SP-Xho	-	I465-6H-not

[251]

cB4203-HM15	ALB-SP-Xho	-	F468-6H-not
cB4203-HM16	ALB-SP-Xho	-	P471-6H-not
cB4203-HM17	ALB-SP-Xho	PH20-HM17	SPAM1-22H-not
cB4203-HM18	ALB-SP-Xho	PH20-HM18	SPAM1-23H-not
cB4203-HM19	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	K470-6H-not
cB4003-HM19	ALB-SP-Xho	K470-not	
cB4203-HM20	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	F468-6H-not
cB4003-HP20	ALB-SP-Xho	F468-not	
cB4203-HM21	ALB-SP-Xho	M21-mega-F	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM24	ALB-SP-Xho	M24-R	SPAM1-6H-not
cB4203-HM25	ALB-SP-Xho	M25-R	SPAM1-6H-not
cB4203-HM26	ALB-SP-Xho	B4-HM26	SPAM1-6H-not
cB4203-HM27	ALB-SP-Xho	B4-HM27	SPAM1-6H-not
cB4203-HM28	ALB-SP-Xho	B4-HM28	SPAM1-6H-not
cB4203-HM29	ALB-SP-Xho	B4-HM29	
cB4203-HM30	ALB-SP-Xho	B4-HM30	
cB4203-HM31	ALB-SP-Xho	B4-HM31	
cB4203-HM32	ALB-SP-Xho	B4-HM32	
cB4203-HM33	ALB-SP-Xho	B4-m33	
cB4003-HP34	ALB-SP-Xho	M21-mega-F	K470-not
cB4203-HM35	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	P472-6H-not
cB4003-HP35	ALB-SP-Xho	P472-not	

[252]

cB4203-HM36	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	M473-6H-not
cB4003-HP36	ALB-SP-Xho	M473-not	
cB4203-HM37	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E474-6H-not
cB4003-HP37	ALB-SP-Xho	E474-not	
cB4203-HM38	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	T475-6H-not
cB4003-HP38	ALB-SP-Xho	T475-not	
cB4203-HM39	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E476-6H-not
cB4003-HP39	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E476-not
cB4203-HM40	ALB-SP-Xho	M40-mega	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM41	ALB-SP-Xho	M41-mega	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM42	ALB-SP-Xho	m42-mega	SPAM1-6H-not
cB4203-HM43	ALB-SP-Xho	I465-6H-not	
cB4203-HM44	ALB-SP-Xho	D466-6H-not	
cB4203-HM45	ALB-SP-Xho	B4-HM29	
cB4003-HP46	ALB-SP-Xho	F468-Not	
cB4203-HM47	ALB-SP-Xho	P478-H-Not	
cB4203-HM48	ALB-SP-Xho	I480-H-Not	
cB4203-HM49	ALB-SP-Xho	Y482-H-Not	
cB4203-HM50	ALB-SP-Xho	A484-H-not	
cB4203-HM51	ALB-SP-Xho	P486-H-not	
cB4203-HM52	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	T488-H-not

[253] [표10]

PH20 변이체의 클로닝에 사용한 프라이머 서열

프라이머	서열 번호	핵산서열 (5'-> 3')
ALB-SP-Xho	6	GAA TAT CTC GAG GCC ACC ATG AAG TGG GTT ACA
SPAM1-6H-Not	7	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG AAG AAA CCA ATT CTG C
ALB-PH20-MR	8	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAT TCA GAG AGT AAG CAG AGG AG
PH20_M345-P364-F	9	ATG GGG AAC CCT CAG TAT AAC AAG AAC CAA GGA ATC ATG TCA GGC CAT CAA GGA GTA TAT GGA CAC TAC ACT GGG GCC CTA CAT AAT CAA CGT CAC AC
PH20_Y365-L380-F	10	ATG GAG ACT ATA CTG AAT CCT TTC ATC CTG AAC GTG ACC AGT GGG GCC CTT CTC TGC AGT CAA GCC CTG TGC CAG GAG CAA GGA GTG TG
PH20_M345-L380-F*	11	ATG GAC ACT ACA CTG GGG CCC TTC ATC CTG AAC GTG ACC AGT GGG GCC CTT CTC TGC AGT CAA GCC CTG TGC CAG GAG CAA GGA GTG TG
B4203-HM4-F	12	ACT GTT GCT CTG GGT GCT TCT GGA ATT GTA ATA TGG GTA AGC TGG GAA AAT ACA AGA ACC AAG GAA TCA TGT CA
B4203-HM5-F	13	AGC AAG GAG TGT GTA TAA GGA AAA CCA GCC ACC CAA AAG ACT ATC TTC ACC TCA ACC CAG A

[254]

PH20-G363N	14	AGT ATA TGG ACA CTA CAC TGA ACC CCT ACA TAA TCA ACG TCA C
cB4203-HM8-M	15	ATT GTA ATA TGG GGA ACC CTC AGT AAT ACA AGA ACC AAG GAA TC
cB4203-HM9-M	16	ATT GTA ATA TGG GGA ACC CTC GAA AAT ACA AGA ACC AAG GAA TC
cB4203- HM10-M	17	ATT GTA ATA TGG GGA ACC TGG GAA AAT ACA AGA ACC AAG GAA TC
4203-HM11	18	ACA CTA CAC TGA ACC CCT TCA TAC TCA ACG TCA CCC TAG CAG CCA
4203-HM12	19	ACA CTA CAC TGA ACC CCT TCA TAC TCA ACG TCA CCC TAT CAG GCA AAA TGT GTA GCC AAG TGC
SASP-LN-del-R	20	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAG AGT AAG CAG AGG AG
I465-6H-not	21	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT ATA CAG ACA CCA TCA GC
F468-6H-not	22	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA AAA GCA TCT ATA CAG ACA CC
P471-6H-not	23	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
PH20-HM17	24	TCC AGG CCC AGA GGA AAG GCC GGT TGG GTA GCA AGG GGC CCC TAA AAG AGT AAG CAG AGG AG
PH20-HM18	25	TCA CTT GGG GCA TTC CAG ACG GTG GTG AAG GGC CGG TTG GGT AGC AAG GGG CCC CTA AAA GAG TAA GCA GAG GAG

[255]

K470-not	26	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
F468-not	27	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAA AAA GCA TCT ATA CAG ACA CC
M21-mega-F	28	AAT TGT AAT ATG GGG AAG CTG GGA AAA TAC AAG AA
M24-R	29	TGG AAT AAC AGG AGG TGC AGA GTA AGC AGA GGA GA
M25-R	30	TTT GGA ATA ACA GGA GAG TAA GCA GAG GAG A
B4-HM26	31	AGT TTT GAA ATT CCT TTC TCT GGA TGA GCT GGA GCA CAG CCT GGG GGA GAG TGC GGC CCA GGG TGC TTC TGG AAT TG
B4-HM27	32	ATG AGC TGG AGC ACA GCT TTG GGG AGA GTG CGG CCC AG
B4-HM28	33	ATT CCT TTC TCA AGA TGA ACT TGA GCA CAG CTT TGG CGA AAC TGT TGC
B4-HM29	34	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GCA TCT ATA CAG ACA CC
B4-HM30	35	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA CAG ACA CCA TCA GCA ATA C
B4-HM31	36	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA TCA GCA ATA CAC ACA TC
B4-HM32	37	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA CAC ACA TCA ACA GCA TC
B4- HM33	38	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA ACA GCA TCA GTG TCT TTT AC
P472-not	39	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG GGA GGT TTT AGA AAA GCA

[256]

		TC
M473-not	40	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
E474-not	41	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAC TCC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GC
T475-not	42	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAT GTC TCC ATG GGA GGT TTT AG
M40-mega	43	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAT TAG AGT AAG CAG AGG AG
M41-mega	44	TGG AAT AAC AGG AGG TGC TCT AGA GTA AGC AGA GGA G
M42-mega	45	TTT GGA ATA ACA GGA GGA GAG TAA GCA GAG GAG
D466-6H-not	46	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA TCT ATA CAG ACA CCA TCA GC
P478-H-Not	47	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GGT TCT TCT GTC TCC ATG GG
I480-H-Not	48	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA ATT TGA GGT TCT TCT GTC TCC
Y482-H-Not	49	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG TAG AAA ATT TGA GGT TCT TCT G
A484-H-not	50	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GCA TTG TAG AAA ATT TGA GGT TC
P486-H-not	51	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG GGT GAA GCA TTG TAG AAA ATT TGA GG
T488-H-not	52	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT GTG GAG GGT GAA GCA TTG TAG

[257]

K470-6H-not	53	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
P472-6H-not	54	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
M473-6H-not	55	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
E474-6H-not	56	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGC TCC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GC
T475-6H-not	57	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT GTC TCC ATG GGA GGT TTT AG
E476-6H-not	58	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TCT GTC TCC ATG GGA GG
E476-not	59	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAT TCT GTC TCC ATG GGA GG

[258] 효소 활성과 열 안정성이 증가한 PH20 변이체를 찾은 후, 6xHis-tag이 없는 형태로도 PH20 변이체의 cDNA를 제작하였다.

[259] ExpiCHO 세포의 세포수가 6x10^6/mL이 되었을 때 야생형 또는 변이체 PH20의 cDNA가 pcDNA3.4-TOPO 벡터에 삽입된 플라스미드로 ExpiFectamine CHO Reagent를 이용하여 ExpiCHO 세포를 형질주입 시켰다. 세포배양액은 ExpiCHO Expression Medium (100~500 mL)을 이용하였다. 형질주입 후 ExpiCHO 세포를 총 6일간 130 rpm에서 진탕 배양하였으며, 이 기간 동안 37 ℃에서 1일 배양하고, 온도를 32 ℃로 낮추어서 5일간 더 배양하였다. 배양 완료 시 10,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 세포 상등액을 회수하였다.

[260] ExpiCHO 세포에서 생산한 C-말단 6xHis이 붙은 야생형 및 변이체 PH20의 재조합단백질은 AKTA prime 장비를 이용하여 HisTrap 컬럼, Q Sepharose 컬럼, Phenyl 컬럼의 3 단계로 정제하였다.

[261] HisTrap 컬럼을 이용한 단백질 정제를 위해서 버퍼 A (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M NaCl)와 버퍼 B (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole)을 제조하였다. 단백질을 HisTrap 컬럼에 결합시키고, 비특이적(non-specific)하게 결합한 단백질을 제거하기 위해 버퍼 A를 5 column volume (CV) 흘려주고, conductivity가 일정하게 유지되는 것을 확인한 후 20%의 버퍼 B를 5 CV 흘려 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질을 Dialysis buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 50 mM NaCl)를 이용하여 투석하였다. Q Sepharose

컬럼을 이용한 단백질 정제를 위해서 버퍼 A (20 mM sodium phosphate, pH 7.5)와 버퍼 B (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M NaCl)를 제조하였다. 단백질을 Q Sepharose 컬럼에 결합시키고, 버퍼 A를 5 CV 흘려주어 비 특이적으로 결합한 단백질을 제거한 후, 0~100%의 농도 기울기로 버퍼 B를 5 CV 흘려주어 단백질을 용출하였다.

[262] Phenyl 컬럼을 이용한 단백질 정제를 위해 버퍼 A (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 1.5 M (NH4)2SO4)와 버퍼 B (20 mM sodium phosphate, pH 7.0)를 제조하였다. 단백질을 Phenyl 컬럼에 결합시키고, 버퍼 A를 5 CV 흘려주어 비 특이적으로 결합한 단백질을 제거한 후, 0~100%의 농도 기울기로 버퍼 B를 5 CV 흘려주어 단백질을 용출하였다.

[263] 야생형과 변이체 PH20의 효소 활성을 turbidimetric assay와 substrate-gel assay, Morgan-Elson assay를 이용하여 측정하였다.

[264] Turbidimetric assay는 히알루론산과 알부민(BSA) 혼합 시 생성되는 침전을 흡광도를 이용하여 측정하는 방법으로, PH20에 의해 히알루론산이 가수분해되면 알부민과 혼합 시 흡광도가 감소한다. 히알루로니다제 PH20 (Sigma)를 1, 2, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 50, 60 Unit/mL되게 희석하여 각 튜브에 준비한다. 정제된 단백질 샘플을 enzyme diluent buffer (20 mM Tris·HCl, pH 7.0, 77 mM NaCl, 0.01% (w/v) bovine serum albumin)에 용해하여 100X, 300X, 600X, 1200X, 2400X 되게 희석하여 각 튜브에 준비한다. 새로운 튜브에 3 mg/mL인 히알루로니다제 용액의 농도가 0.3 mg/mL 되게 10배 희석하여 각 튜브의 부피가 180 ㎕가 되게 한다. 희석한 히알루로니다제 용액에 효소를 60 ㎕ 넣고 혼합하여 37℃에서 45분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 96-well plate에 반응시킨 효소 50 ㎕와 acidic albumin solution 250 ㎕를 각 well에 넣고 10분간 진탕한 후 600 nm에서 분광 광도계로 흡광도를 측정한다.

[265] Substrate-gel assay는 단백질을 10% SDS gel (0.17 mg/mL 히알루론산 포함)에서 1시간 동안 전기영동을 하고, 2.5% Triton X-100 (w/v)을 이용해서 4 ℃에서 2시간 동안 SDS를 제거한다. 이후 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 150 mM NaCl 버퍼에서 PH20의 최적 온도인 37 ℃에서 1~4 시간 동안 효소 반응을 하고, 0.5% Alcian Blue 시약을 이용해서 단백질을 염색하였다. 히알루론산과 결합하지 않은 Alcian Blue 시약은 de-staining solution을 이용하여 제거하였다. Alcian Blue에 염색된 SDS gel의 사진을 찍은 후, 밴드를 정량 하였다.

[266] 단백질의 열 안정성을 dynamic light scattering(DLS) 를 이용한 응집온도 측정, Sypro-Orange dye를 이용하여 real-time PCR에서 측정한 melting temperature (T_m), 특정 온도에서 일정 시간 방치 후 효소 활성을 측정하는 방법 등으로 측정하였다. DLS를 이용한 응집온도 측정은 빛의 산란을 이용하여 분자의 응집 현상을 측정하기 때문에 민감도가 높으며 일반적으로 단백질의 녹는점(T_m)보다 온도가 낮다.

[267] 본 발명에서 제작한 PH20 변이체에서 치환 또는 절단한 아미노산의 서열은

아래의 표 11과 같다.

[268] 본 발명에 따른 변이체 중에서, C-말단에 6xHis-tag이 부착된 변이체는 HM으로 명명하였고, 6xHis-tag이 없는 변이체는 HP로 명명하였으며, C-말단에 6xHis-tag이 부착된 성숙된 야생형 PH20 (L36-S490)은 WT로 명명하였고, 6xHis-tag이 없으면서 C-말단이 Y482 다음에서 절단된 성숙된 야생형 PH20 (L36~Y482)은 HW2로 명명하였다.

[269]

[270] [표11]

본 발명에 따른 PH20 변이체의 아미노산 서열과 그 치환/절단 특성

명칭	서열 번호	치환	서열
HM1	60	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, N363G 로 12 개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIK EYMDTTLGPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIAD GVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM2	61	Y365F, I367L, L371S, A372G, K374L, M375L, V379A 로 7 개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN

[271]

			DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKE YMDTTLNPFILNVTSGALLCSQALCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM3	62	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, N363G, Y365F, I367L, L371S, A372G, K374L, M375L, V379A 로 19 개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIK EYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIAD GVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM4	63	G340V, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T,	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV

[272]

		S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, N363G 로 17 개 아미노산을 치환한다.	TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIW**VSWENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**L**G**PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIR KNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE DLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIA DGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM6	64	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T 로 11 개 아미노산 잔기를 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIK** **E**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLED

[273]

			LEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIAD GVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM7	65	G340V, T341S L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 16개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIW**VSWENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM8	66	I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 12개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR

[274]

			EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLS**NT**R**TKE**SC**QAIKE**Y M**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM9	67	S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 13개 아미노산을 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTL**ENT**R**TKE**SC**QAIKE**Y M**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM10	68	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A,	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM

[275]

		L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환한다.	AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI ADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM11	69	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, Y365F, I367L로 13개 아미노산 잔기를 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNP**F**I**L**NVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI

[276]

			DAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM12	70	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T, Y365F, I367L, L371S, A372G로 15개 아미노산 잔기를 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPFILNVTSGAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI DAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM13	71	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL

[277]

			VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEY MDTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM14	72	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환하고, I465의 카르복실기 다음을 절단한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI
HM15	73	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환하고,	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN

[278]

		F468의 카르복실기 다음을 전달한다.	HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI DAF
HM16	74	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환하고, P471의 카르복실기 다음을 절단한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI DAFLKP
HM17	75	L36~V47의 아미노산을	FRGPLLPNRPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLF

[279]

		FRGPLLPNR로 치환하고, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환한다.	SFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQL SLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLS WLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAI RVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYMDT TLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE KFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDA FLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS		
HM18	76	L36~A52의 아미노산을 FRGPLLPNRPFTTV로 치환하고, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환한다.	FRGPLLPNRPFTTVWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQL SLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLS WLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAI RVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYMDT TLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS

[280]

			DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE KFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDA FLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM19	77	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되고, C-말단의 K470 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLK
HM20	78	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD

[281]

		치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF
HM21	79	T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개 아미노산 잔기를 치환한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI ADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM24	80	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A,	APPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFS FIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVN

[282]

		L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 A40 잔기 앞에서 절단된다.	GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQ LSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVRE AIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELV YTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYM DTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLE QFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM25	81	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산을 치환하고, N-말단의 P42 잔기 앞에서 절단된다.	PVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIG SPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWE EWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSL TEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWG YYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSW LWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIR VSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYT FGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYMDT TLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSE

[283]

			KFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCID AFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM29	82	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 L36 잔기 앞에서 절단하고, C-말단의 A467 잔기 다음에서 절단한다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI ADGVCIDA
HM30	83	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR

[284]

		L36 잔기 앞에서 절단되고, C-말단의 C464 잔기 다음에서 절단된다.	VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTWENTRTKESCQA IKEYMDTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI ADGVC
HM31	84	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 L36 잔기 앞에서 절단되고, C-말단의 D461 잔기 다음에서 절단된다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTWENTRTKESCQA IKEYMDTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI AD
HM32	85	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A,	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM

[285]

		L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 L36 잔기 앞에서 절단되고, C-말단의 C458 잔기 다음에서 절단된다.	AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVC
HM33	86	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 L36 잔기 앞에서 절단되고, C-말단의 V455 잔기 다음에서 절단된다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAV
HP34	87	T341S, L342W, S343E,	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL

[286]

		I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 K470 잔기 다음에서 절단된다.	FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLK
HM35	88	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 P472 잔기 다음에서	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN

[287]

		절단된다.	WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPP
HM36	89	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 M473 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPM
HM37	90	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD

[288]

		치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 E474 잔기 다음에서 절단된다.	LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPME
HM38	91	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 T475 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMET
HM39	92	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K,	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV

[289]

		K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 E476 잔기 다음에서 절단된다.	NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WEN**TR**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETE
HM40	93	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 N37 잔기 앞에서 절단된다.	NFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMS LFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVT VNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQN VQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDE LVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**Y M**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL

[290]

			EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM41	94	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 R39 잔기 앞에서 절단된다.	RAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEY MDTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM42	95	M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 11개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 P41 잔기 앞에서	PPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFI GSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNG GIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDW EEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLS WLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA

[291]

		절단된다.	IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYMD TTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNS SDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFS EKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCID AFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM43	96	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 I465 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVIWGSWENTRTKESCQAIKEYM DTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI
HM44	97	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E,	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV

[292]

		E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 D466 잔기 다음에서 절단된다.	QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVIWGS**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI D
HM45	98	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 A467 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVIWGS**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI DA

[293]

HP46	99	T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVY TFGETVALGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNW NSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQ FSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCI DAF
HM47	100	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**

[294]

		P478 잔기 다음에서 절단된다.	YMDTTLNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEP
HM48	101	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 I480 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**RT**TKE**SC**QAIKE** YM**D**TT**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQI
HM49	102	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH

[295]

		아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 Y482 잔기 다음에서 절단된다.	LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFY
HM50	103	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 A484 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNA
HM51	104	L342W, S343E, I344N,	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL

[296]

		M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 P486 잔기 다음에서 절단된다.	FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**RT**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASP				
HM52	105	L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 14개 아미노산 잔기를 치환하고, N-말단의 F38 잔기 앞에서 절단되며, C-말단의 T488 잔기 다음에서	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**RT**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN

[297]

		절단된다.	WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPST
HM53	106	T341G, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 L36잔기 앞에서 절단되며, C말단의 S490 잔기 다음에서 절단된다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWG**GWENT**R**TKE**SC**Q** **AIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVC IADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM54	107	T341A, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN

[298]

		잔기를 치환하고, N말단의 L36잔기 앞에서 절단되며, C말단의 S490 잔기 다음에서 절단된다.	DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWG**AWENT**R**TKE**SC**Q** **AIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVC IADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM55	108	T341C, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 L36잔기 앞에서 절단되며, C말단의 S490 잔기 다음에서 절단된다.	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWG**CWENT**R**TKE**SC**QA** **IKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCI ADGVCIDAFLKPPMETEEPQ109IFYNASPSTLS
HM56	109	T341D, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T,	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGV

[299]

		M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 L36잔기 앞에서 절단되며, C말단의 S490 잔기 다음에서 절단된다.	TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNR VREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWG**DWENT**R**TKE**SC**Q** **AIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVC IADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HP57	110	I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 12개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 F38잔기 앞에서 절단되며, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLS**NT**R**TKE**SC**QAIKE**Y M**D**T**T**L**NPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL

[300]

			EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF
HP58	111	S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 13개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 F38잔기 앞에서 절단되며, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTL**ENT**R**TKE**SC**QAIKE**Y M**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF
HP59	112	T341A, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하고,	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR

[301]

		N말단의 F38잔기 앞에서 절단되며, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWG**AWENT**RT**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF
HP60	113	T341G, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 F38잔기 앞에서 절단되며, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWG**GWENT**RT**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF
HP61	114	A40G, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E,	FR**G**PPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI

[302]

		L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 16개의 아미노산 잔기를 치환하고, N말단의 F38잔기 앞에서 절단되며, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF

[303]

HP62	115	P42를 제거하고, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T로 15개의 아미노산 잔기를 치환하며, 말단의 F38잔기 앞에서 절단하고, C말단의 F468 잔기 다음에서 절단된다.	FRGP**P**VIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDD LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE** YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADG VCIDAF

[304] 실시예 2. PH20의 변이체 HM1과 HM6의 제작

[305] PH20의 아미노산 서열 M345~N363은 <도 1B>에 나타낸 것과 같이 단백질 3차구조 모델에서 알파나선 8 부위 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위에 해당한다. 알파나선 8의 아미노산 중 C351은 알파나선 1의 C60과 이황화결합을,

Y357은 알파나선 7의 F315와 소수성 상호작용을, N363은 알파나선 1의 D69와 수소결합을 형성하여 알파나선 8과 이웃한 2차구조를 안정화 시키고 있다(도 1C).

[306] PH20의 알파나선 8 부위 및 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위에 위치한 아미노산을 치환하여 WT보다 효소 활성과 열 안정성이 높은 변이체를 제작하기 위하여 M345~N363 구간에서 12개의 아미노산을 치환한 변이체 HM1과 Y365~V379 구간에서 7개의 아미노산을 치환한 HM2, M345~V379 구간의 아미노산 19개를 치환한 HM3를 각각 제작하였다. PH20의 알파나선 8에 위치한 아미노산 중 이황화 결합에 관여하는 C351과 소수성 상호작용에 관여하는 Y357은 치환하지 않았다. 변이체 HM1, HM2, HM3에서 치환한 아미노산의 서열은 표11에 표시되어 있다. 변이체 HM1, HM2, HM3의 유전자가 포함된 pcDNA3.4-TOPO 플라스미드로 ExpiCHO 세포에 형질주입 하였을 때, 변이체 HM1은 ExpiCHO 세포에서 발현되었고(도 3A), 변이체 HM2와 HM3는 발현되지 않았다. 단백질 발현 여부는 효소 활성 측정뿐만 아니라 인간 PH20에 대한 항체(Abcam, ab193009)를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)으로도 확인하였다. 항체의 epitope은 Q173~P222 구간이다. 이 실험결과는 알파나선 8의 아미노산 서열 중에서도 변이체 HM2, HM3 제작에 사용한 Y365~V379 구간의 아미노산 치환은 단백질 구조에 심각한 영향을 초래하여 변이체 HM2, HM3의 단백질 발현이 되지 않은 것으로 여겨진다. 변이체 HM1은 야생형 WT보다 발현량이 3.4배 높았다 (도 2). 변이체 HM1은 N363을 글리신으로 치환하여 알파나선 8의 N363과 알파나선 1의 D69 사이의 수소결합을 제거한 것이다 (도 1C). N363과 D69 사이의 수소결합을 복원하기 위해 HM1에서 G363을 아스파라진으로 치환한 변이체 HM6를 제작하였다. 변이체 HM6에서 치환한 아미노산은 표 11에 표시되어 있다.

[307] 변이체 HM6는 ExpiCHO 세포에서 발현되었으며 발현량은 변이체 HM1과 유사하였다 (WT보다 3.4배 발현량 많음) (도 2). Turbidimetric assay 방법으로 효소 활성을 측정하였을 때 변이체 HM6는 WT보다 효소 활성이 1.3배 증가하였다 (도 3B). Substrate-gel assay는 일반적으로 SDS-PAGE 후 2.5% Triton X-100 (w/v)을 이용해서 SDS를 제거하고 37 ℃에서 1~4 시간 동안 반응하면서 히알루로니다제가 히알루론산을 가수분해하는 정도를 Alcian blue 염색약을 이용해서 측정한다. Substrate gel에서 SDS가 제거되면 단백질의 접힘(refolding)이 바로 일어나며, substrate이 단백질 접힘에는 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다. WT와 변이체 HM1, HM6의 효소 활성을 substrate-gel assay 방법으로 37 ℃에서 1~4시간 동안 측정하였을 때 HM6는 WT 및 변이체 HM1보다 높은 효소 활성을 나타내었다 (도 3C). 이 결과는 변이체 HM1과 HM6의 단백질 접힘(refolding)과 이로 인한 renaturation이 WT보다 빠르며, 제작한 변이체들이 WT보다 높은 효소 활성을 나타낸다는 것을 제시한다. PH20 자체의 신호 펩티드를 이용했을 때는 ExpiCHO 세포에서 단백질 발현량이

낮았으며, 이를 해결하기 위해 인간 혈청 알부민 또는 인간 Hyal1의 신호 펩티드 서열을 사용하였다. 도 3C에서 나타낸 것과 같이 변이체 HM1의 신호 펩티드로 인간 혈청 알부민과 인간 Hyal1의 신호 펩티드를 사용했을 때 단백질 발현이 증가하였으며, 두 종류의 신호 펩티드 사이에 큰 차이는 없었다. Substrate-gel assay 방법으로 효소 활성을 측정하였을 때 인간 혈청 알부민 신호펩티드를 가진 WT와 인간 혈청 알부민 또는 Hyal1의 신호 펩티드를 가진 변이체 HM1은 pH 5~8 구간에서 효소 활성을 나타내었다 (도 3D). 본 발명에서 HM1 이후에 제작한 변이체의 신호 펩티드로 인간 혈청 알부민의 신호 펩티드를 사용하였다.

[308] WT와 변이체 HM1, HM6의 열 안정성을 응집온도로 비교하면 각각 46.5 ℃, 53.0 ℃, 50.5 ℃로 변이체 HM1과 HM6의 응집온도가 WT보다 각각 6.5 ℃와 4.0 ℃ 더 높다 (도 10). 응집온도 측정 결과는 substrate-gel assay에서 나타낸 단백질 refolding 결과와 일치한다. 이 결과들은 알파나선 8의 N363 잔기가 이루는 수소결합이 단백질 구조의 열 안정성과 효소 활성에 중요한 역할을 함을 처음으로 제시한다.

[309] 또한 Phenyl 컬럼을 이용하여 WT와 변이체 HM1, HM6의 친수성/소수성 특성을 비교하였을 때, HM1과 HM6는 모두 WT보다 더 앞쪽에서 용출되었으며 이는 변이체 HM1과 HM6가 아미노산의 치환으로 인해 WT보다 더 친수성 성질을 가짐을 제시한다. 그렇지만 Phenyl 컬럼에서 용출된 변이체 HM1과 HM6는 WT와는 달리 2개의 피크가 존재하며 PNGase F를 처리하였을때 동일한 분자량을 나타내었다. 이는 N-당화에 의한 차이로 사료된다 (도 3E).

[310]

[311] 실시예 3. PH20 변이체 HM4, HM7, HM8, HM9, HM 10, HM11, HM12의 제작

[312] 실시예 2에서 변이체 HM1과 HM6의 제작으로 M345~N363과 M345~I361 구간의 아미노산 치환이 PH20의 효소 활성과 열 안정성을 모두 증가시킨 것은 단백질 공학 관점에서 큰 진전을 이룬 것으로 여겨진다. 따라서 변이체 HM1과 HM6를 기반으로 N-말단과 C-말단 방향으로 더 확장하여 추가적으로 아미노산을 치환하였다.

[313] 먼저, 변이체 HM1과 HM6에서 치환한 아미노산을 포함하고 추가적으로 G340~I344 사이의 아미노산을 G340V, T341S, L342W, S343E, I344N으로 치환한 변이체 HM4, HM7을 각각 제작하였다. 변이체 HM4와 HM7에서 치환한 아미노산의 서열은 표11에 표시되어 있다. 변이체 HM4와 HM7은 ExpiCHO 세포에서 발현되었다. HM7에 대한 단백질 정제 결과는 도 5A에 나타나 있다. HM4, HM7은 단백질 발현이 WT보다 모두 6.3배 증가하였고, 응집온도는 각각 10 ℃와 11.5 ℃ 증가하였다. 그렇지만 turbidimetric assay 방법으로 측정한 HM4와 HM7의 효소 활성은 WT와 비교하여 대략 15%에 불과하였다 (도 5B). 일반적으로 효소 활성과 열 안정성은 교환(trade-off)의 관계가 성립하지만, 본 발명에서는 변이체 HM1과 HM6에서 도입한 치환에 의해서는 효소 활성은 유지되면서 열 안정성이 증가하였고, 변이체 HM4와 HM7에서는 과도한 열

안정성 증가로 인해 효소 활성이 감소한 것으로 여겨진다. 단백질 공학 관점에서 변이체 HM4, HM7에서 나타난 11.5 ℃의 응집온도 증가는 매우 의미 있는 결과이다. Stern-Volmer plot으로 단백질의 구조 유연성을 분석하였을 때 알파나선 8과 그 연결 부위를 치환한 HM1, HM6, HM4, HM7은 모두 WT보다 구조 유연성이 높았다(도 11A). 이 결과는 국소적 열 안정성의 증가가 단백질 구조 전체의 유연성을 증가 시켰음을 제시한다.

[314] 변이체 HM6와 HM7의 차이점은 G340~I344 사이의 아미노산이다. 변이체 HM7의 열 안정성 증가에 관여하는 아미노산을 알아보기 위해 변이체 HM6를 기반으로 I344N이 치환된 HM8, S343과 I344N이 치환된 HM9, L342W, S343E, I344N이 치환된 HM10, T341S, L342W, S343E 및 I344N이 치환된 HM21을 각각 제작하였다. 변이체 HM8, HM9, HM10, HM21에서 치환한 아미노산의 서열은 표11에 표시되어 있다. 변이체 HM8, HM9, HM10, HM21은 ExpiCHO 세포에서 발현되었다 (도 5A). 변이체 HM6를 기반으로 알파나선 8의 N-말단 방향으로 I344N, S343E, L342W 돌연변이를 도입할수록 변이체 HM8, HM9, HM10의 응집온도가 각각 52.5 ℃, 53 ℃, 55.5 ℃로 증가하였다 (도 10). 그렇지만 변이체 HM8, HM9, HM10에서는 WT와 유사한 효소 활성이 유지되었다 (도 5B). 이 결과는 변이체 HM8, HM9, HM10에서 도입된 아미노산 치환이 효소의 열 안정성에는 국소적인 영향을 주었지만, 효소 활성에는 큰 영향을 주지 않음을 제시한다. 그렇지만 HM21은 HM10보다 열 안정성이 감소하였지만, pH 7.0에서 WT보다 2배 높은 특성을 나타내었다. Substrate-gel assay에서 1 시간 동안 WT와 각 변이체를 기질과 반응시켰을 때 효소 활성은 HM21 > HM10 > HM9 > HM8 > HM6 > WT순으로 나타났다 (도 5C).

[315] Phenyl 컬럼을 이용하여 변이체 HM7, HM8, HM9, HM10, HM21을 물성을 조사하였을 때, 이들 PH20 변이체들은 WT보다 더 빨리 용출되어 모두 친수성 성질이 있음을 제시한다. 그렇지만 아미노산 치환 위치에 주 피크의 패턴이 다르게 나타나는 특성을 보였다 (도 5D).

[316] 변이체 HM7의 경우에도 변이체 HM1, HM6와 마찬가지로 Phenyl 컬럼에서 2개의 피크로 나타나 2종류의 형태가 존재함을 제시한다.

[317] 등전점에 따른 WT와 변이체의 이동 양상을 알아보기 위해 등전위점 초점화(Isoelectric focusing, 이하 IEF라고 함) 분석을 실시하였다 (도 5E). IEF gel에서 WT와 변이체 HM6, HM8은 비슷한 이동 양상을 보이고, S343E 돌연변이가 포함된 변이체 HM9, HM10, HM21, HM7은 더 산성(acidic)쪽으로 이동하였다. 이 결과는 G340~I344 사이의 아미노산 중 S344E 치환에 의한 글루탐산의 도입으로 인해 단백질의 등전점에 변화가 일어남을 보인다.

[318] 그리고 변이체 HM6를 기반으로 알파나선 8의 C-말단 방향으로 확장하여 아미노산을 치환하여 변이체 HM11, HM12를 제작하였다. 변이체 HM11과 HM12에서 치환한 아미노산의 서열은 표 11에 표시되어 있다. 변이체 HM11는 ExpiCHO 세포에서 발현되었으나 발현량이 야생형 WT보다 낮았으며 (도 2),

변이체 HM12는 ExpiCHO 세포에서 발현되지 않았다. 변이체 HM11은 WT와 비교하여 32%의 활성을 나타내었다 (도 6B).

[319]

[320] 실시예 4. N-말단이 절단된 HM6 기반의 변이체 제작

[321] PH20의 C-말단 부위는 PH20의 발현과 효소 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 이미 알려져 있지만, PH20의 N-말단 부위 아미노산의 역할은 잘 알려져 있지 않다. PH20의 N-말단 부위 아미노산의 절단이 효소 활성에 어떤 영향을 주는지를 알아보기 위해 변이체 HM6를 기반으로, N-말단이 N37, F38, R39, A40, P41, P42에서 절단된 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42 및 HM25을 제작하였다 (표 11). 그리고, 추가적으로 N-말단의 아미노산에 변형을 가한 HP61, HP62를 제작하였다.

[322] HM40, HM13, HM41, HM24, HM42, HP61, HP62는 ExpiCHO 세포에서 발현되었으나 HM25는 발현되지 않았다(도 7A 및 도 7B). N-말단이 절단된 PH20 변이체들은 N 말단 시작하는 위치에 따라 효소 활성의 차이를 나타내었다. 아미노산 1~3개가 절단된 변이체 HM40, HM13, HM41은 주형인 HM6와 비교하여 효소 활성이 유사하지만, 아미노산의 4~5개 절단된 HM24와 HM42는 활성이 HM6 보다 조금 감소하였다 (도 7C). 그렇지만 6개의 아미노산이 절단된 HM25는 ExpiCHO에서 발현이 거의 안되었을 뿐만 아니라 효소 활성도 3.5 U/μg으로 현저히 낮았다. N-말단의 아미노산에 변형을 가한 HP61과 HP62에서는 효소 활성의 변화가 크지 않은 것으로 보인다.

[323] Substrate-gel assay 방법(1시간 반응)으로 측정한 N-말단 절단 변이체의 효소 활성은 HM40, HM13, HM41의 경우 주형인 HM6의 효소 활성과 유사하였지만, HM24, HM42는 HM6의 효소 활성 보다 감소하였다 (도 7D). 6개의 아미노산이 절단된 HM25는 단백질량이 적어 분석하지 못하였다.

[324] Phenyl 컬럼을 이용하여 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42의 물성을 분석하였을 때, 이들 변이체들은 WT보다 먼저 컬럼에서 용출되어 친수성 성질을 나타내었다 (도 7E). 이 결과는 변이체 HM40, HM13, HM41, HM24, HM42이 변이체 HM6에 기반하여 제작되었고 L36~A40 잔기의 특성을 고려할 때, HM6의 친수성 특성을 따른 것으로 여겨진다.

[325] DLS로 측정한 N-말단 절단 변이체의 응집온도는 아미노산이 시작하는 위치에 따라 변이체 간의 차이가 나타났다 (도 7F). 변이체 HM40, HM13, HM41, HM42는 N-말단이 절단되었음에도 50℃ 이상의 응집온도를 나타내어 주형인 HM6의 특성이 그대로 유지되었다. 그 중에서도 HM40과 HM42는 HM6 보다 3~4℃ 높은 응집온도를 나타내어 열 안정성이 증가한 것으로 사료된다. 또한, PH20의 N-말단 부위에 위치한 아미노산을 치환하였을 때 단백질 발현과 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 PH20의 N-말단 아미노산 서열 36~47 (LNFRAPPVIPNV)를 FRGPLLPNR로 치환한 변이체 HM17과 PH20의 N-말단 아미노산 서열 36~52 (LNFRAPPVIPNVPFLWA)를 FRGPLLPNRPFTTV로

치환한 변이체 HM18을 제작하였다. 변이체 HM17와 HM18에서 치환한 아미노산의 서열은 표 11에 표시되어 있다. 변이체 HM17과 HM18은 ExpiCHO 세포에서 발현되지 않았다. N-말단에 위치한 5개 아미노산까지 절단되더라도 단백질 발현과 효소 활성을 보였으나 36~47 또는 36~52와 같이 더 많은 아미노산 서열의 치환은 단백질 접힘에 영향을 준다는 것을 제시한다.

[326]

[327] 실시예 5. PH20의 C-말단이 절단된 HM6 기반의 변이체 HM14, HM15, HM16 제작

[328] PH20의 C-말단은 단백질 발현과 효소 활성에 중요한 부위로 알려져 있다. 본 발명에서는 변이체 HM6를 기반으로 C-말단의 아미노산을 각각 I465, F468, K471에서 절단한 변이체 HM14, HM15, HM16을 제작하였다. 변이체 HM14, HM15, HM16에서 치환한 아미노산의 서열은 표11에 표시되어 있다. 변이체 HM14, HM15, HM16은 ExpiCHO 세포에서 발현되었으며 (도 8A), 단백질 발현량은 HM16 > HM15 > HM14 순서로 C-말단의 아미노산이 많이 절단될수록 단백질 발현량이 감소하였다 (도 8A). 그렇지만 변이체 HM14, HM15, HM16의 효소 활성은 HM16 > HM14 (≡WT) > HM15 순서이었다(도 8B). Frost 등에 의하면 PH20의 C-말단 477-483 부위는 soluble expression에 필요하고, C-말단이 C467에서 절단될 경우 효소 활성은 C-말단이 477-483에서 절단된 PH20 변이체에 비해 10%에 불과하고, C-말단이 467보다 앞에서 절단될 경우 효소 활성이 없었다. 그렇지만 본 발명에서 제작한 C-말단이 절단된 변이체(HM14, HM15, HM16)들은 변이체 HM6를 기반으로 제작하여 M345~I361 구간의 아미노산 치환으로 인해 단백질 접힘이 증가하고, 이로 인해 열 안정성이 증가하였기 때문에 C-말단의 I465, F468, P471 다음에서 절단되더라도 WT와 효소 활성이 유사하였고, 현저한 효소 활성의 감소는 없었다.

[329] WT와 변이체 HM14, HM15, HM16의 구조 유연성을 아크릴아마이드를 이용한 형광 quenching으로 조사하였다(도 11B). 변이체 HM14, HM15, HM16은 모두 WT보다 구조가 유연하였다. 이 결과는 변이체 HM6를 기반으로 제작한 C-말단 절단 변이체의 경우에도 구조 유연성을 유지함을 알 수 있다.

[330] Turbidimetric assay 방법으로 측정한 변이체 HM14, HM15, HM16의 효소 활성은 substrate-gel assay에서도 확인되었다(도 8C).

[331] Phenyl 컬럼을 이용하여 C-말단이 절단된 변이체의 물성을 분석하였을 때 변이체 HM14, HM15, HM16은 모두 WT보다 먼저 용출되어 친수성 성질을 나타내며 변이체들 사이의 친수성은 변이체 HM16 > HM14 > HM15 순이다(도 8D).

[332]

[333] 실시예 6. N-말단과 C-말단 아미노산 절단을 포함하는 HM10 기반의 변이체 HM19, HM20 제작.

[334] 본 발명에서 제작한 PH20 변이체들은 HM6를 기반으로 하고 G340~I344의

아미노산 추가 치환한 HM8, HM9, HM10이 WT보다 단백질 발현량, 효소 활성, 열 안정성 면에서 우수한 성능을 보였다. HM8, HM9, HM10 중에서 효소 활성과 열 안정성이 높은 HM10을 기반으로 N-말단이 F38에서 절단되고, C-말단이 K470 또는 F468에서 절단된 변이체 HM19와 HM20을 제작하였다. HM19와 HM20은 모두 ExpiCHO 세포에서 발현되었고, HisTrap 컬럼을 이용하여 정제되었다(도 9A). Turbidimetric assay 방법으로 효소 활성을 측정하였을 때, HM19와 HM20은 WT보다 10% 높은 효소 활성을 나타내었다(도 9B). Substrate-gel assay에서도 HM19와 HM20은 WT보다 높은 효소 활성을 나타내었다(도 9C).

[335]

[336] 실시예 7. HM10 기반의 PH20 변이체 특성 분석

[337] HM10 기반의 C-말단 절단 변이체들은 C-말단의 길이가 짧아질 수록 ExpiCHO 세포에서 발현량이 감소하는 경향을 보였으며, C-말단의 길이가 C464 이하인 경우 발현 되지 않았다 (도 12). C464는 C437과 이황화 결합을 형성하여 단백질 구조 유지에 중요하기 때문에 반드시 필요하다.

[338] C-말단이 464에서 절단되거나 또는 더 짧은 경우 ExpiCHO에서 발현이 되지 않는지를 확인하기 위해 Western blot 실험을 하였다. 도 13과 같이 HM30, HM31, HM32, HM33 변이체는 Western blot에서 탐지되지 않았다.

[339] Turbidimetric assay 방법으로 측정한 HM10 기반의 C-말단 절단 변이체의 효소 활성은 도 14A와 도 14B에 나타나 있다. C-말단 절단 변이체들은 WT과 비교하여 ±20%의 효소 활성을 나타내었다. C-말단이 I480 이후에서 절단될 경우 효소 활성은 전반적으로 증가하였다. 그리고 HM19와 HM20에서 6xHis-tag을 제거한 변이체인 HP19와 HP20은 6xHis-tag이 있을 때 보다 효소 활성이 각각 23%, 9.6% 감소하는 것으로 나타나 6His-tag이 효소 활성에 영향을 주는 것으로 사료된다.

[340] Substrate-gel assay 방법으로 HM10 기반의 C-말단 절단 변이체에 대한 효소 활성을 측정하였을 때 이들 변이체들은 WT 보다 높은 효소 활성을 나타내었으며, 주형인 HM10의 효소 활성과 유사하여 C-말단 길이에 따른 차이는 크지 않았다 (도 14C).

[341]

[342] 실시예 8. HM21 기반의 PH20 변이체 특성 분석

[343] 변이체 HP34는 4 단계의 컬럼을 거쳐 정제하였고 (도 15A), HP46은 3 단계의 컬럼을 거쳐 정제하였다 (도 15B). HP34와 HP46의 생산량은 각각 1.73 mg/L와 25.6 mg/L이었다. HP34와 HP46은 6xHis-tag이 없는 변이체로 6xHis-tag이 있는 변이체들과는 정제 과정이 달라 단백질의 발현량을 비교하는 것은 어렵다.

[344] Turbidimetric assay에서 HP34와 HP46의 활성은 각각 45.6 U/μg과 47.2 U/μg으로 WT 보다 약 2배 높은 활성을 보였으며, 주형인 HM21 보다도 대략 10% 정도 활성이 증가하였다 (도 16A).

[345] Morgan-Elson assay로 각 변이체의 kinetics를 측정하여 도 16B에 나타내었다. HP34와 HP46 촉매효율(k_{cat}/K_m)은 야생형 HW2 보다 1.7~2배 높아 specific

activity가 WT 보다 높은 결과와 상통한다. Michaelis 상수(K_m)는 이들 변이체가 HW2 보다 낮아 기질에 대한 친화도가 증가한 것으로 사료된다. 이 결과들로부터 HM21, HP34, HP46 변이체들은 기질과 강하게 결합할 뿐만 아니라 기질을 생성물로 바꾸는 효율 또한 높은 특성을 지닌 것으로 결론 내릴 수 있다. 이런 특성은 T341을 세린으로 치환한 효과이다. 341번에 위치한 트레오닌을 알라닌, 글리신, 아스파르트산 등의 아미노산으로 치환 할 경우 효소 활성에 영향을 미치는 것을 예측할 수 있다.

[346] DLS로 측정한 HP34와 HP46의 응집온도는 각각 51.5℃와 51.0℃으로 나타나 주형인 HM21과 유사하였으며, HW2 보다 대략 5℃ 높은 열 안정성을 나타내었다 (도 17A). Substrate-gel assay로 측정한 변이체 HP34의 활성은 HP20와 유사하게 나타난 반면, HP46은 HP20 보다 높은 효소 활성을 나타내어 주형으로 HM10 보다 HM21의 단백질 접힘이 더 뛰어난 것으로 여겨진다 (도 17B).

[347] 야생형 HW2와 변이체 HP46를 pH 7.0과 pH 3.0 조건에서 하룻밤 동안 방치한 후 substrate-gel assay로 효소 활성을 비교하였을 때 HP46는 pH 7.0 뿐만 아니라 pH 3.0에서도 높은 활성을 나타내어 뛰어난 안정성을 보여 주었다 (도 17C).

[348] HM53, HM54, HM55, HM56, HP59, HP60은 HM21 기반의 변이체 중 341번 위치의 아미노산에 대해 변이를 갖고 있는 변이체이다. 341번 위치의 아미노산이 변이됨에 따라 그 발현 정도와 활성에 다양한 영향을 미치는 것을 확인하였다 (도 17D, 도 17E).

[349]

[350] 실시예 9. PH20 변이체의 in vitro 면역 원성 분석

[351] 저분자 화학합성물질에 비해 큰 분자량을 갖는 바이오의약품은 인체내로 들어갔을 때 의도하지 않은 면역반응을 일으킬 위험성을 가지고 있다. 큰 분자량 바이오물질의 2차 구조나, 3차구조에서 접힘이나 인접 도메인과의 상호작용에 의해 만들어지는 외부와의 접촉면은 인체내의 면역작용계에 항원결정기(epitope)을 제공함으로써 바이오 물질에 대한 면역반응을 촉진시킬 수 있다. 이러한 면역반응은 약물에 대한 항체(anti-drug antibody: ADA)를 생성시킬 수 있으며, 이러한 반응에 의해 약물의 유효성을 저해시키거나, 약물에 대한 과민반응을 유발하거나, 약물의 인체내에서의 제거(clearance)를 촉진할 수 있다. 약물에 대한 면역반응은 따라서 임상 시험에서의 결과에 영향을 미칠 수 있으며, 장기간 사용시에 중대한 이상 반응을 유발할 수 있다. 이러한 면역 반응에는 여러 가지 요인들이 영향을 미칠 수 있는데, 약물 자체나 질병에 특이적 반응, 또는 투약 방법이나 개개인의 환자에 따른 요인에 의해 유발될 수 있다. 약물 자체에 의한 요인으로는 바이오 의약품의 인체내 펩타이드와의 유사/비유사성, posttranslational modification, 불순물, 응집체 형성, 제형의 특성 등이 있다. 환자 개개인에 따른 요인으로는 성별이나, 복용하고 있는 타 약물과의 반응성, HLA (human leukocyte antigen) type에 따른 유전적 요인 등이 있다.

[352] 이러한 면역원성 반응은 면역반응의 생성 원인에 관계없이 항원결정기를 인식하는 CD4+ T cell이나 CD8+ T cell에 의해 진행된다. 개개인에 있어서의 HLA class II 유전자 다양성 때문에, CD4+ T cell의 항원결정기는 개개인간에 차이가 있고, 따라서 건강한 기증자에 의해 제공된 각각의 혈액내 CD4+ T cell에서의 바이오 약물에 반응성은 임상과정에서 생겨날 수 있는 면역 반응성을 평가하는데 있어서 매우 중요한 판단기준이 될 수 있다. CD4+ T cell은 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)가 자신의 II형 MHC(major histocompatibility complex)를 통해 제시된 항원을 인식하여 활성화된다. 활성화된 CD4+ T cell은 사이토카인을 방출하여 대식세포, 세포독성 T 세포, B 세포를 활성화시켜, 결과적으로 항체가 많이 생산되도록 한다. 이와는 달리 CD8+ T cell은 직접적인 세포독성을 가지고 있으며 항원에 감염된 세포, 손상되거나 제 기능을 상실한 세포를 직접 제거한다. CD8+ T cell은 T 세포 수용체를 가지고 있어, 모든 세포의 표면에 위치한 I형 MHC 분자에 붙어있는 특정한 항원의 펩타이드를 인식할 수 있다. CD8+ T cell은 또한 항원제시세포에 의해서 제시된 항원을 인식하여 활성화될 수 있으며, 이러한 활성화는 CD4+ T cell의 사이토카인에 더욱 증진될 수 있다. 따라서 in vitro에서 신규 바이오물질의 CD4+ T cell과 CD8+ T cell의 활성화 정도를 측정함으로써 임상과정에서 유발될 수 있는 면역원성 반응을 예측할 수 있다. 본 실시예에서는 PBMC로부터 CD4+ T cell과 CD8+ T cell을 분리한 후, 대조물질인 PH20과 PH20변이체 (HP46)를 각각 1.5 ng/mL과 15 ng/mL로 처리한 후, 활성화된 CD4+ T cell과 CD8+ T cell의 분포를 측정함으로써 대조물질과 비교하여 PH20변이체의 면역원성을 예측하고자 하였다. 각 T cell의 활성화 정도는 Stimulating Index를 이용하여 측정하였으며, Stimulating Index (SI)는 아래와 같이 정의된다. SI 값이 2 이상인 경우에 유의적 수준에서 활성화되었다고 판단할 수 있다.

[353] Stimulating Index (SI) = (시험시료를 처리 후의 T cell 활성화도) /

[354] (vehicle 처리 후의 T cell 활성화도)

[355] 면역원성 반응은 HLA type에 따라 달라질 수 있으며, 따라서 보다 다양한 HLA type에서의 반응을 측정하기 위해 실험은 10명의 healthy donor로부터 받은 PBMC에서 분리한 T cell을 이용하여 수행하였다. 사용된 10개 PBMC의 HLA type은 아래의 표 12 와 같다.

[356]

[357] [표12]

테스트된 PBMC의 HLA type

No.	HLA A		HLA B		HLA C1		DRB1		DQB1		DPB1	
1	0206	3303	3501	5801	0302	0801	1405	1501	0303	0602	0201	0301
2	0201	0207	4601	5101	0102	1502	0803	1101	0301	0601	0201	0202
3	0206	3101	1501	3501	0304	0401	0803	0901	0303	0601	0201	0501
4	0101	3101	1501	1517	0303	0701	1302	1501	0602	0604	0401	0501
5	0201	3101	5101	6701	0702	1402	0401	0403	0301	0302	0201	0401
6	0201	1101	1501	3901	0401	0702	0102	0901	0402	0501	0101	1401
7	0201	0206	4002	5502	0102	0304	0802	1454	0302	0502	0402	0501
8	0201	0201	1501	4001	0303	0304	0802	1406	0301	0302	0501	1301
9	1101	2402	4006	5101	0801	1502	0701	0901	0202	0303	0201	1301
10	2602	3101	4002	5101	0304	1502	0405	1501	0401	0602	0201	0501

[358] PH20과 PH20변이체에서의 CD4+와 CD8+ T cell의 활성화도 측정 결과는 표 13에 정리된 것과 같다. CD4+과 CD8+ T cell의 활성화도 측정 결과를 보면, PH20과 PH20 변이체 모두, 활성화도가 비교적 낮은 수준으로 판단된다. PH20의 경우, 2개의 실험에서 CD4+ T cell의 활성화도가 2 이상으로 측정되었으며, PH20변이체의 경우는 CD4+ T cell의 활성화가 측정되지 않았다. CD8+ T cell의 경우는 PH20에서 1개의 실험에서 활성화가 측정되었으며, PH20변이체의 경우도 1개의 실험에서 활성화가 측정되었다. 그러나 PH20의 경우는 1.5 ng/mL과 15 ng/mL 모두에서 SI값이 2 이상으로 측정되었으나 PH20변이체의 경우는 1.5 ng/mL에서의 2 이하의 SI값이, 15 ng/mL에서는 2 이상의 SI 값이 측정되었다(도 18 및 도 19 참조).

[359] 따라서 낮은 농도에서는 CD8+ T cell의 활성화도가 PH20변이체에서는 낮은 것으로 관찰되며, PH20변이체에 비해 PH20에서의 CD8+ T cell의 활성화도가 높은 것으로 판단된다. 위와 같은 결과에서 도출되는 결론은,

[360] 1) PH20과 PH20변이체의 CD4+ T cell 및 CD8+ T cell의 활성화도가 비교적 낮으며

[361] 2) PH20보다 PH20변이체에서의 CD4+ T cell과 CD8+ T cell의 활성화 가능성이 낮은 것으로 판단된다.

[362] 이와 같은 결과에서 PH20변이체의 임상에서의 면역원성 반응을 유발할 가능성은 PH20보다 낮을 것으로 예상된다.

[363]

[364] [표13]

In vitro 면역원성 분석(immunogenicity assay)결과로부터 측정된 자극 인덱스(Stimulating Index (SI))

PBMC No.	CD4				CD8			
	PH20 (ng/mL)		PH20변이체 (ng/mL)		PH20 (ng/mL)		PH20변이체 (ng/mL)	
	1.5	15	1.5	15	1.5	15	1.5	15
1	1.03	0.859	0.728	1.176	1.38	1.42	1.22	1.60
2	1.05	0.09	0.596	0.922	1.20	1.11	1.00	1.07
3	1.90	1.44	1.56	1.12	1.43	1.31	1.59	1.35
4	**2.51**	**2.79**	0.788	1.82	1.28	1.90	0.579	0.974
5	1.27	1.47	1.09	1.14	0.987	0.932	0.972	1.02
6	0.825	0.834	0.998	0.946	0.904	1.13	1.09	0.986
7	**2.07**	**2.07**	1.43	1.90	**2.08**	**2.34**	1.30	**2.46**
8	0.898	1.079	0.967	0.822	0.926	1.06	0.896	0.813
9	0.882	0.957	0.895	0.941	0.853	0.993	0.950	1.09
10	0.983	0.970	1.12	1.13	1.15	1.08	1.15	1.24

[365]

산업상 이용가능성

[366] 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편들은 성숙된 야생형 PH20과 비교하여 ExpiCHO 세포에서 발현되었을 때 단백질 발현량이 증가하였으며, 단백질 응집온도는 4~11.5 ℃ 정도 증가하여, 높은 열 안정성을 가지면서 또한 효율적으로 생산될 수 있는 효과가 있다.

[367] 또한, 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편들은 히알루로니다제의 활성을 측정하는 실험 중의 하나인 substrate-gel assay의 결과에서 단백질의 접힘(refolding)이 향상되어 성숙된 야생형 PH20보다 빨리 renaturation이 되는

효과가 있으며, C-말단의 절단위치에 상관없이 원래의 효소 활성을 유지하는 효과가 있다.

[368] 나아가 본 발명에 따른 PH20 변이체 또는 이의 절편들은 낮은 면역원성을 가지고 있어, 인체에 반복 투여하는 것이 가능하다.

[369]

[370] 참고문헌

[371] Arming, S., Strobl, B., Wechselberger, C., and Kreil, G. (1997). In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm. Eur J Biochem *247*, 810-814.

[372] Bookbinder, L.H., Hofer, A., Haller, M.F., Zepeda, M.L., Keller, G.A., Lim, J.E., Edgington, T.S., Shepard, H.M., Patton, J.S., and Frost, G.I. (2006). A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Control Release *114*, 230-241.

[373] Chao, K.L., Muthukumar, L., and Herzberg, O. (2007). Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. Biochemistry *46*, 6911-6920.

[374] Frost, G.I. (2007). Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. Expert Opin Drug Deliv *4*, 427-440.

[375]

서열목록 Free Text

[376] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 PH20에 있어,
T341A, T341C, T341G, S343E, M345T, K349E, L353A, L354I, N356E 및 I361T로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 2] 제1항에 있어서, T341A, T341C, L354I 및 N356E로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 1의 야생형 PH20의 알파나선 부위 및/또는 그 연결부위에 해당하는 부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 알파나선 부위는 알파나선 8 부위(S347~C381)이고, 그 연결부위는 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위(A333~R346)인 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 알파나선 부위 및 그 연결부위에 해당하는 부위는 T341~N363, T341~I361, L342~I361, S343~I361, I344~I361, M345~I361 또는 M345~N363인 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 알파나선 8 부위(S347~C381) 및/또는, 알파나선 7과 알파나선 8 연결 부위(A333~R346)가 Hyal1의 대응되는 부위의 아미노산 서열의 일부 아미노산 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
L354I 및/또는 N356E의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고,
추가적으로 T341, L342, S343, I344, M345, S347, M348, K349, L352, L353, D355, E359, I361 및 N363로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에서의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
L354I 및/또는 N356E의 아미노산 잔기 치환을 포함하고,
추가적으로 T341A, T341C, T341D, T341G, T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, D355K, E359D, I361T 및 N363G로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 9] 제7항에 있어서, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 추가적으로 T341A, T341C, T341D, T341G, T341S,

L342W, S343E, I344N 및 N363G로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편:

(a) T341S, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(b) L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(c) M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D, I361T 및 N363G;

(d) T341G, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(e) T341A, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(f) T341C, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(g) T341D, L342W, S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T;

(h) I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T; 및

(i) S343E, I344N, M345T, S347T, M348K, K349E, L352Q, L353A, L354I, D355K, N356E, E359D 및 I361T

[청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 추가적으로 C-말단 및/또는 N-말단에서의 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 13] 제12항에 있어서, N-말단의 M1 내지 P42로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 앞에서 절단되어 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 14] 제13항에 있어서, N-말단의 L36, N37, F38, R39, A40, P41 또는 P42 잔기 앞에서 절단되어 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 15] 제12항에 있어서, C-말단의 V455 내지 L509로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 다음에서 절단되어 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 16] 제15항에 있어서, C-말단의 V455 내지 S490로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기 다음에서 절단되어 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 17] 제16항에 있어서, C-말단의 V455, C458, D461, C464, I465, D466, A467, F468, K470, P471, P472, M473, E474, T475, E476, P478, I480, Y482, A484, P486, T488 또는 S490 잔기 다음에서 절단되어 일부 아미노산 잔기가 결실된 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 18] 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, N-말단에 서열번호 3에 따른 MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA의 아미노산 서열을 갖는 인간 성장호르몬 유래의 신호 펩티드, 서열번호 4에 따른 MKWVTFISLLFLFSSAYS의 아미노산 서열을 갖는 인간 혈청 알부민 유래의 신호펩티드, 또는 서열번호 5에 따른 MAAHLLPICALFLTLLDMAQG의 아미노산 서열을 갖는 인간 Hyal1 유래의 신호 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 19] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 60 내지 서열번호 115의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 20] 제19항에 있어서, 서열번호 99의 서열을 갖는 PH20 변이체 또는 이의 절편.

[청구항 21] 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 PH20 변이체 또는 이의 절편을 포함하는 암 치료용 조성물.

[청구항 22] 제21항에 있어서, 다른 항암제와의 병용 치료 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

[청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 다른 항암제는 면역항암제인 것을 특징으로 하는 암치료용 조성물.

[청구항 24] 제22항에 있어서, 상기 면역항암제는 면역체크포인트 저해제(immune checkpoint inhibitor)인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

[청구항 25] 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 PH20 변이체 또는 이의 절편을 코딩하는 핵산.

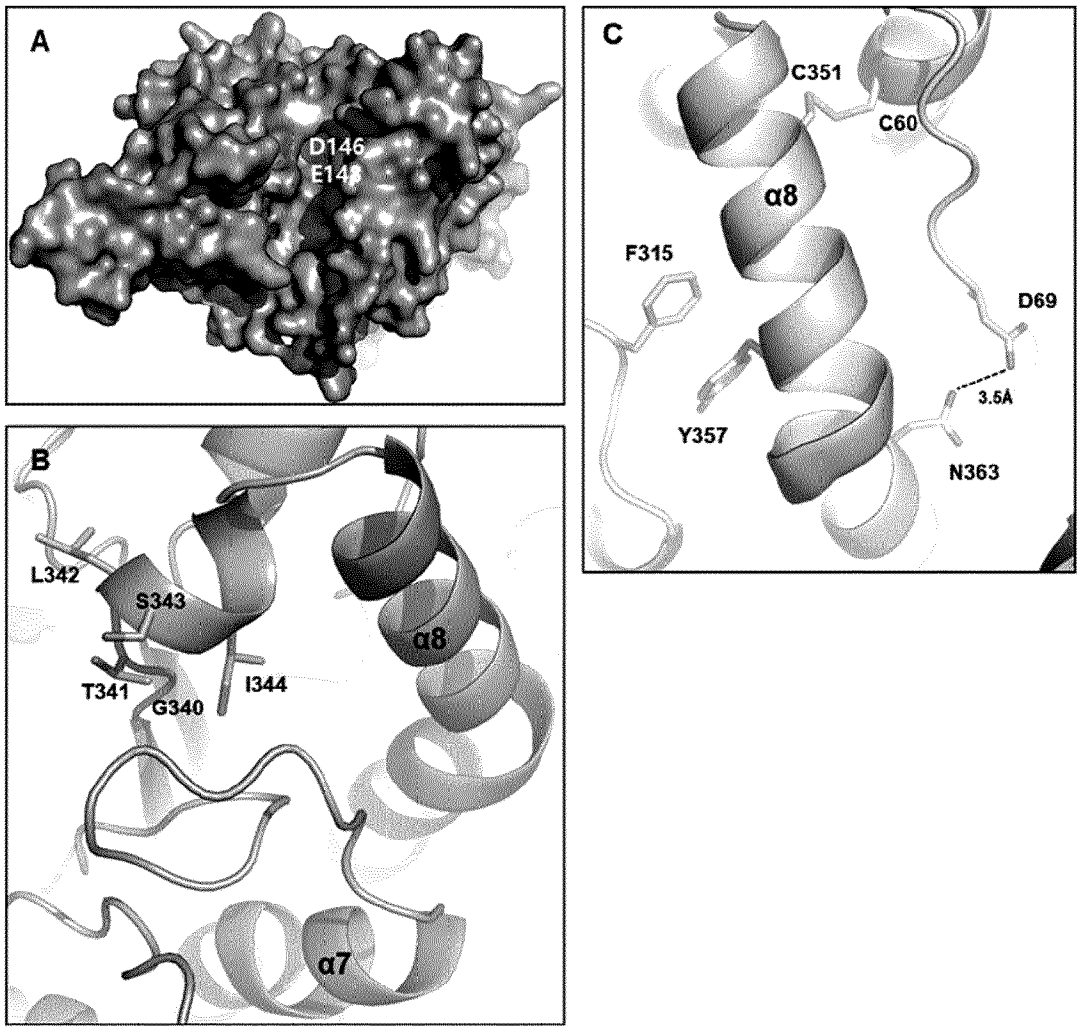
[청구항 26] 제25항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

[청구항 27] 제26항에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.

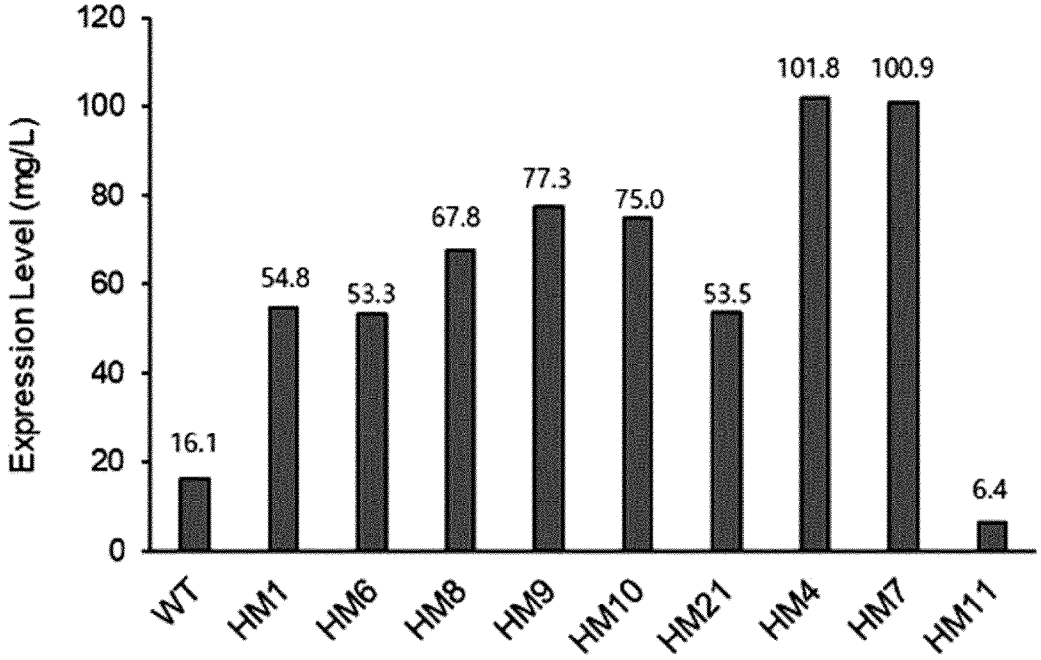
[청구항 28] 제27항에 있어서, 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 숙주세포.

[청구항 29] 제28항에 따른 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 PH20 변이체 또는 이의 절편의 제조방법.

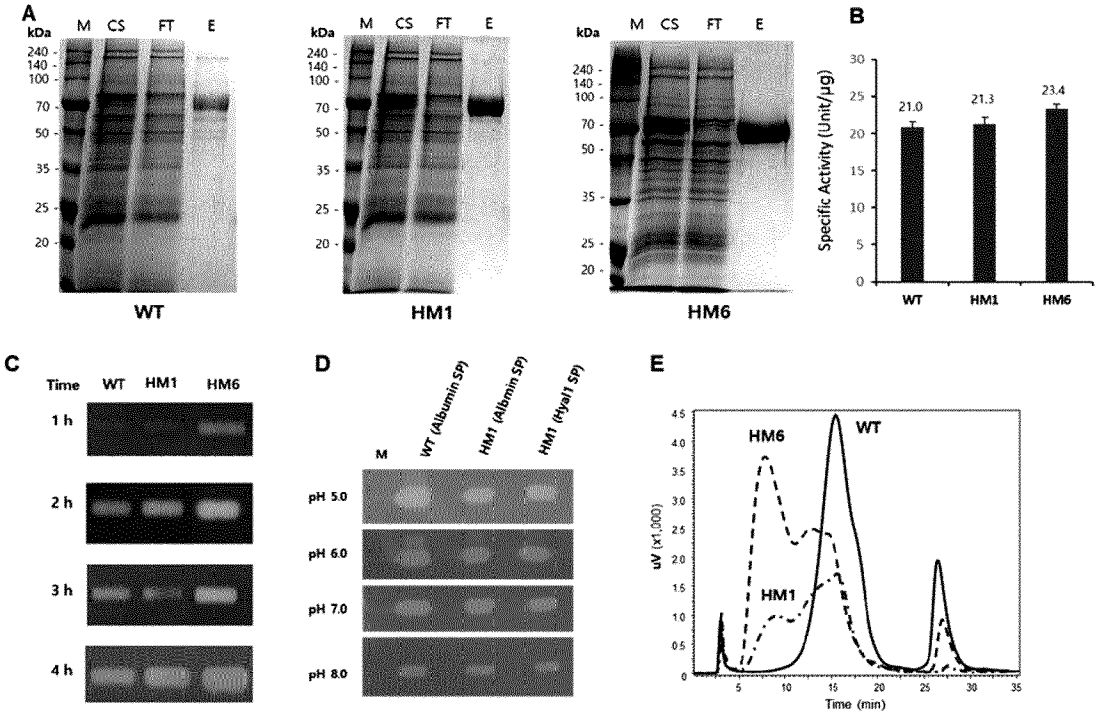
[도1]


A
D146
E148
B
L342
S343
T341
G340
I344
α8
α7
C
C351
C60
α8
F315
D69
3.5Å
Y357
N363

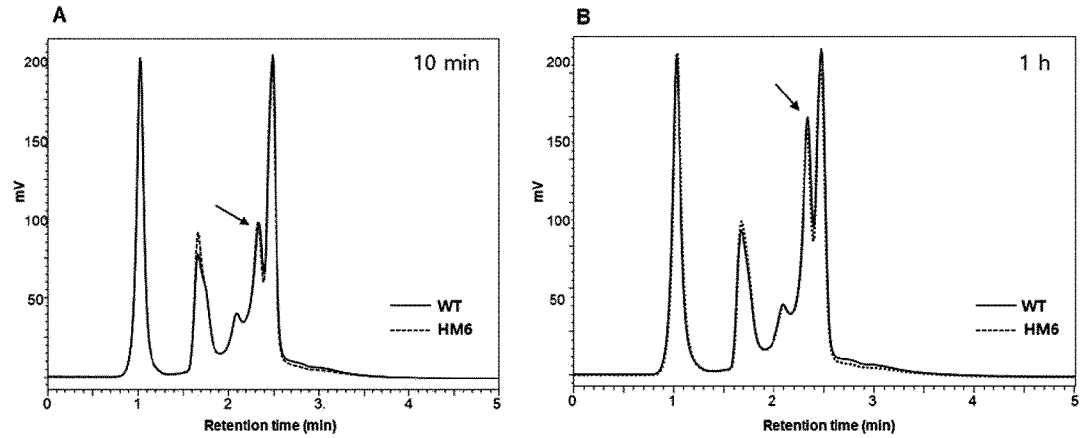
[도2]


Expression Level (mg/L)
120
100
80
60
40
20
0
16.1
54.8
53.3
67.8
77.3
75.0
53.5
101.8
100.9
6.4
WT
HM1
HM6
HM8
HM9
HM10
HM21
HM4
HM7
HM11

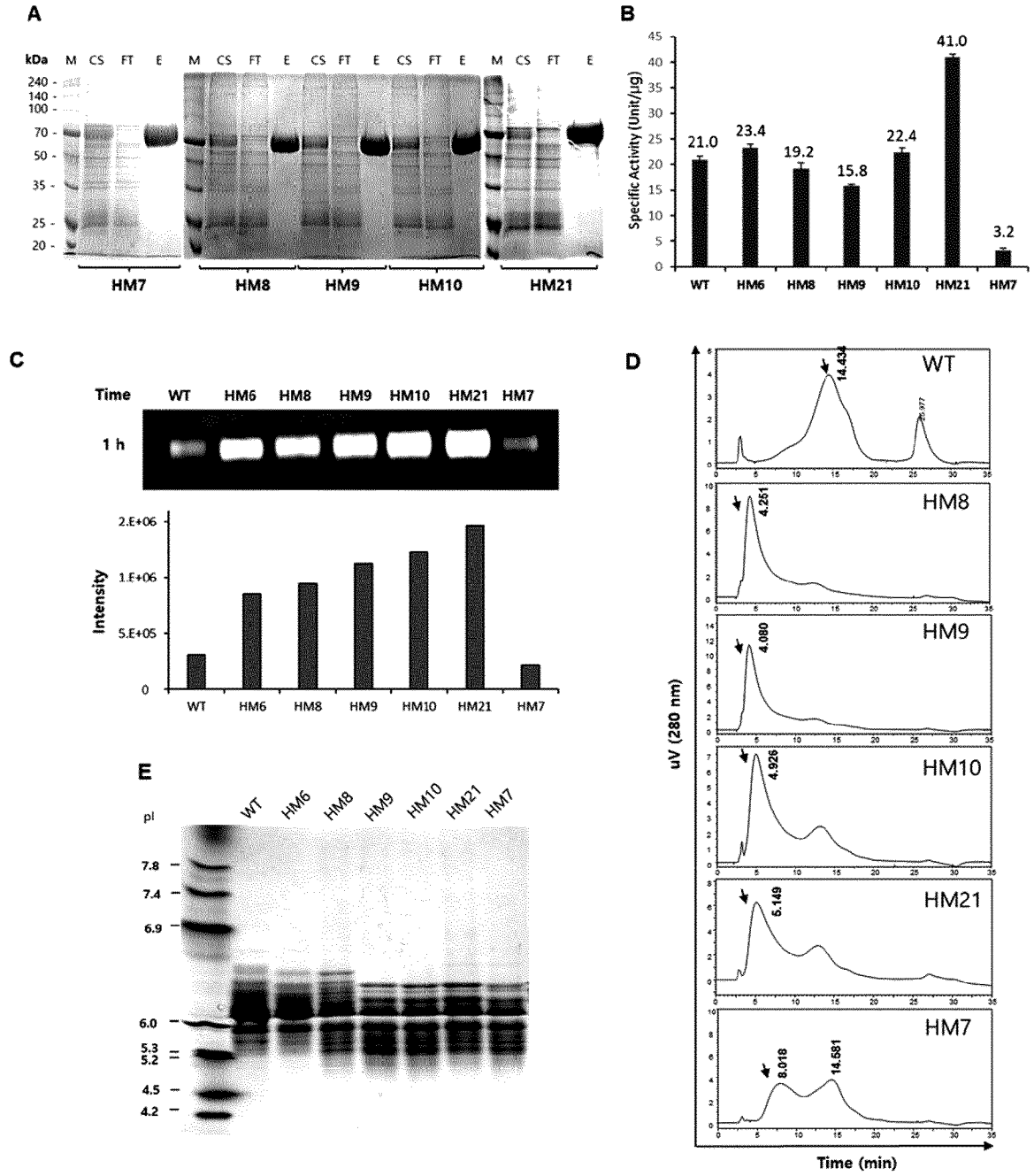
[도3]


A
kDa
M CS FT E
240
140
100
70
50
35
25
20
WT
HM1
HM6
B
Specific Activity (Unit/μg)
21.0
21.3
23.4
WT
HM1
HM6
C
Time
WT HM1 HM6
1 h
2 h
3 h
4 h
D
M
WT (Albumin SP)
HM1 (Albmin SP)
HM1 (Hyal1 SP)
pH 5.0
pH 6.0
pH 7.0
pH 8.0
E
HM6
WT
HM1
uV (x1,000)
Time (min)

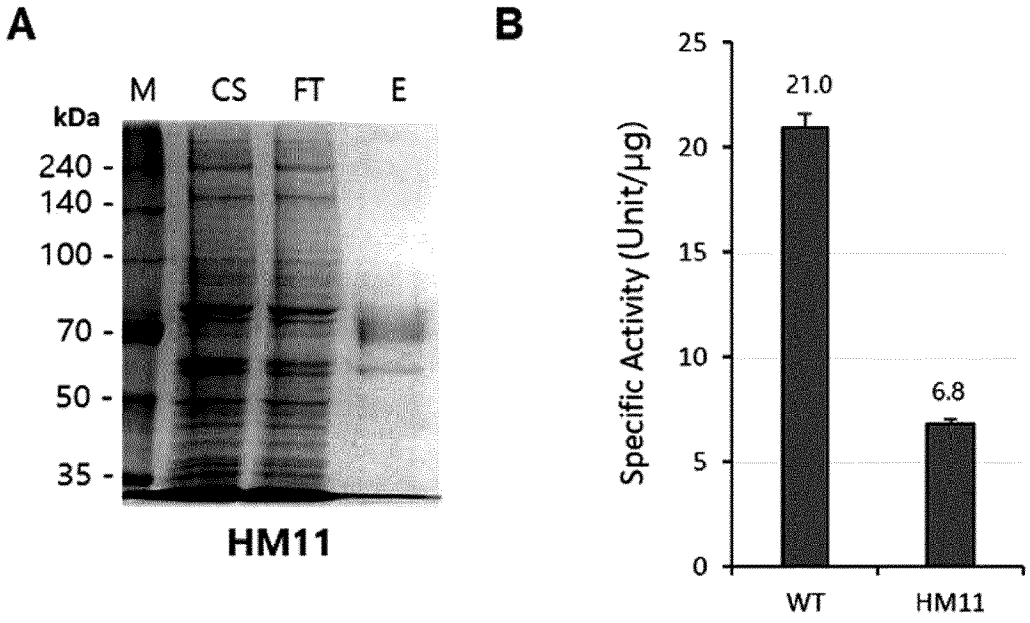
[도4]


A
10 min
mV
WT
HM6
Retention time (min)
B
1 h
mV
WT
HM6
Retention time (min)

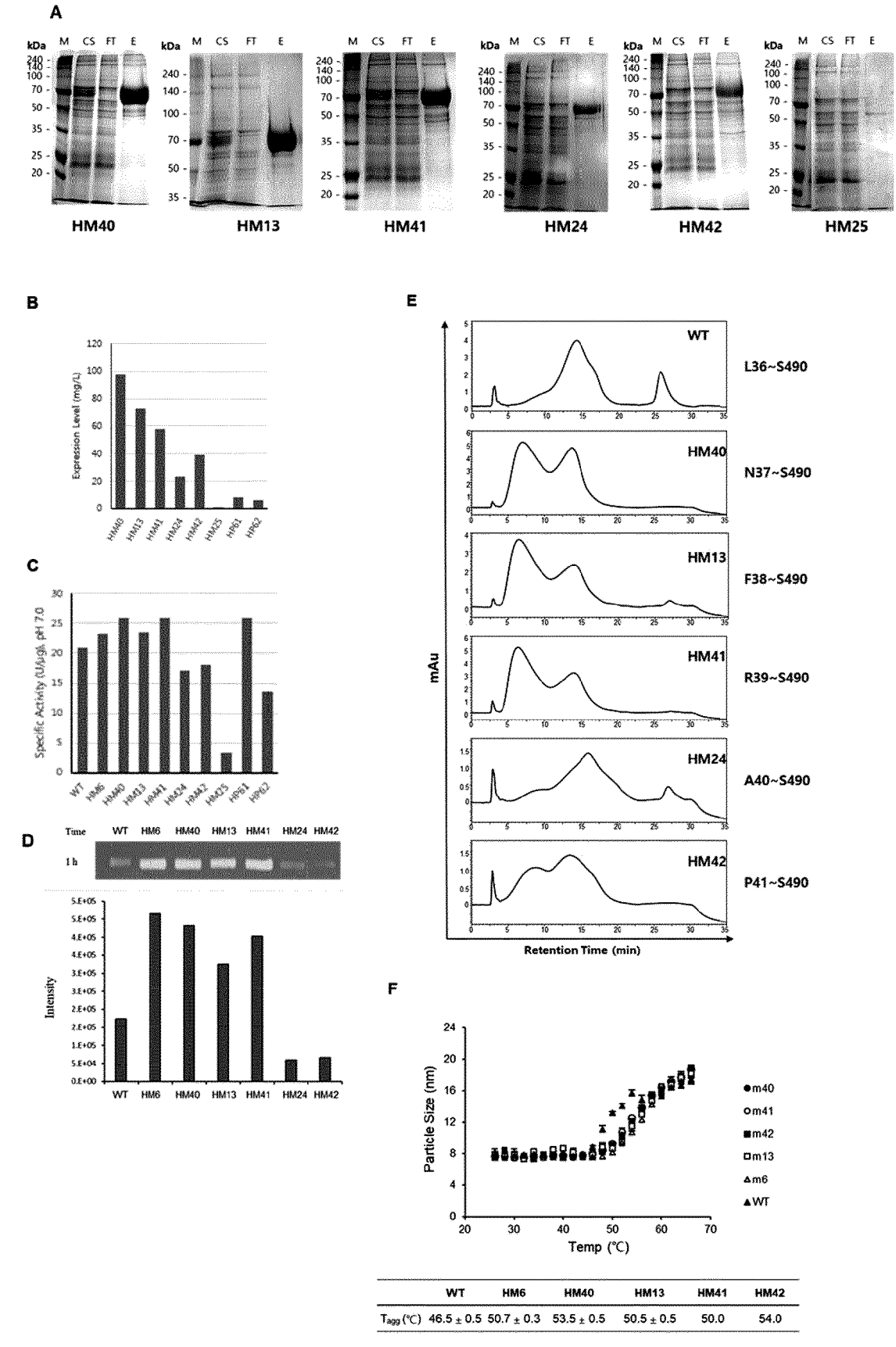
[도5]


A
kDa M CS FT E M CS FT E CS FT E CS FT E M CS FT E
240 -
140 -
100 -
70 -
50 -
35 -
25 -
20 -
HM7
HM8
HM9
HM10
HM21
B
Specific Activity (Unit/μg)
21.0
23.4
19.2
15.8
22.4
41.0
3.2
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
C
Time WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
1 h
Intensity
2.E+06
1.E+06
5.E+05
0
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
D
WT
14.434
HM8
4.251
HM9
4.080
HM10
4.926
HM21
5.149
HM7
8.018
14.581
uV (280 nm)
Time (min)
E
pI
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
7.8
7.4
6.9
6.0
5.3
5.2
4.5
4.2

[도6]

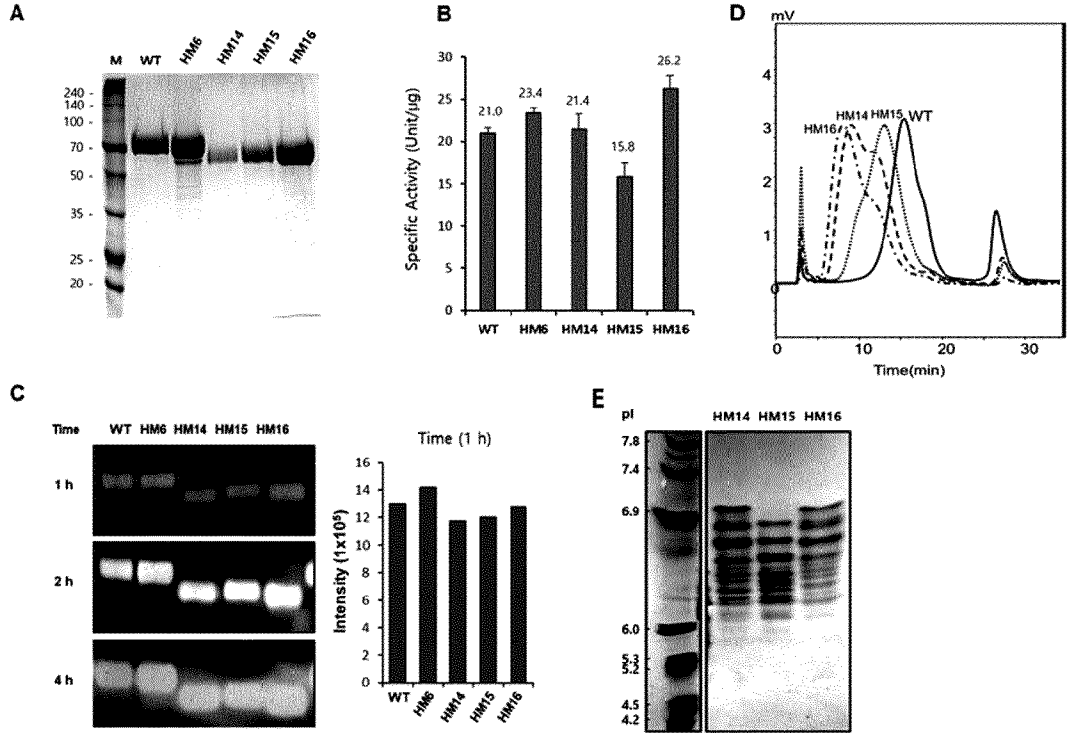

A
M
CS
FT
E
kDa
240 -
140 -
100 -
70 -
50 -
35 -
HM11
B
Specific Activity (Unit/μg)
25
20
15
10
5
0
21.0
6.8
WT
HM11

[도7]

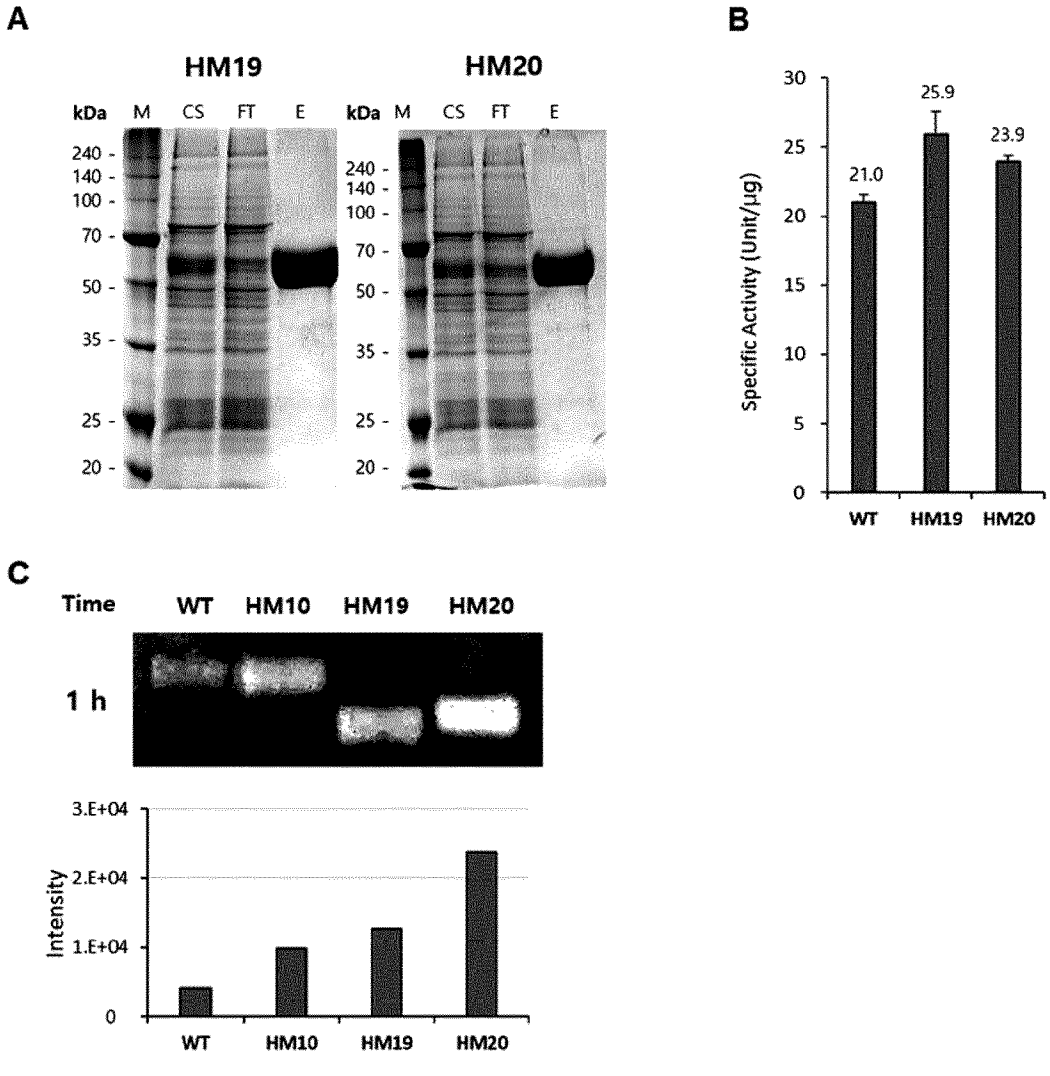


	WT	HM6	HM40	HM13	HM41	HM42
T_{agg} (℃)	46.5 ± 0.5	50.7 ± 0.3	53.5 ± 0.5	50.5 ± 0.5	50.0	54.0

[도8]


A
M WT HM6 HM14 HM15 HM16
240
140
100
70
50
35
25
20
B
Specific Activity (Unit/μg)
21.0
23.4
21.4
15.8
26.2
WT HM6 HM14 HM15 HM16
D
mV
HM14 HM15 WT
HM16
Time(min)
C
Time WT HM6 HM14 HM15 HM16
1 h
2 h
4 h
Time (1 h)
Intensity (1x10⁵)
E
pI
HM14 HM15 HM16
7.8
7.4
6.9
6.0
5.3
5.2
4.5
4.2

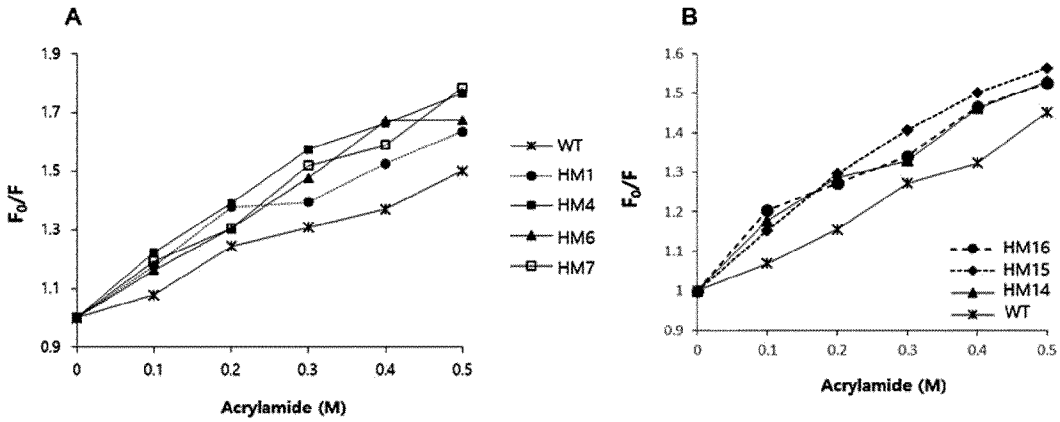
[도9]


A
HM19
HM20
kDa M CS FT E
240
140
100
70
50
35
25
20
B
Specific Activity (Unit/μg)
21.0
25.9
23.9
WT HM19 HM20
C
Time WT HM10 HM19 HM20
1 h
Intensity
3.E+04
2.E+04
1.E+04
0
WT HM10 HM19 HM20

[도10]

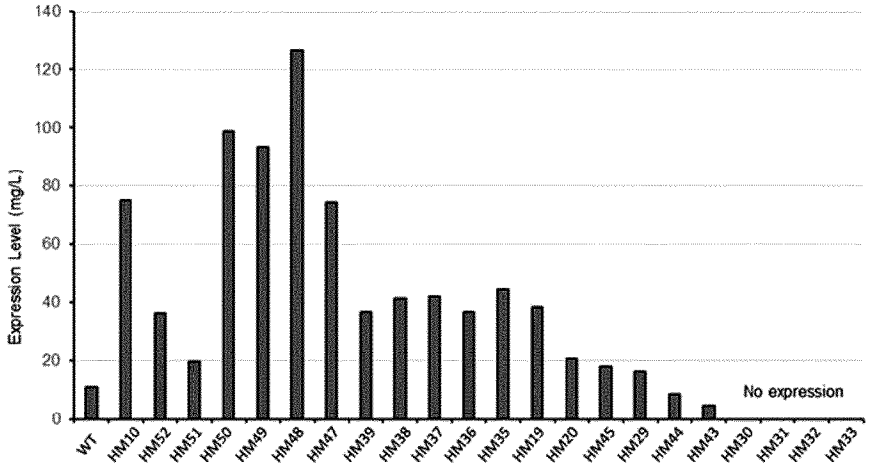
	응집온도 (°C)
WT	46.5 ± 0.5
HM1	53.0 ± 1.2
HM4	56.5 ± 1.5
HM6	50.5 ± 0.5
HM7	58.0 ± 1.0
HM8	52.5 ± 0.5
HM9	53.0 ± 1.0
HM10	55.5 ± 0.5
HM13	50.5 ± 0.5
HM14	51.0 ± 1.0
HM15	49.0 ± 1.0
HM16	51.0 ± 1.0
HM19	53.0 ± 1.0
HM20	51.0 ± 1.0
HM21	51.7 ± 0.7

[도11]



[도12]

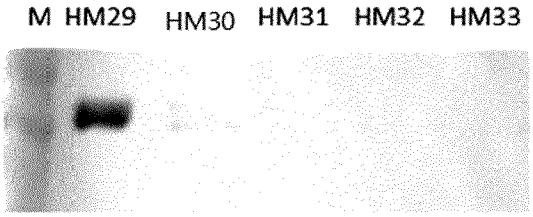
A



B

	Total length	Expression level (mg/L)		Total length	Expression level (mg/L)		Total length	Expression level (mg/L)
WT	L36~S490	16.1	**HM39**	F38~E476	36.7	**HM29**	L36~A467	16.3
HM10	L36~S490	75.0	**HM38**	F38~T475	41.4	**HM44**	F38~D466	8.5
HM52	F38~T488	36.2	**HM37**	F38~E474	41.9	**HM43**	F38~I465	4.7
HM51	F38~P486	19.7	**HM36**	F38~M473	36.6	**HM30**	L36~C464	No
HM50	F38~A484	98.9	**HM35**	F38~P472	44.8	**HM31**	L36~D461	No
HM49	F38~Y482	93.4	**HM19**	F38~K470	38.3	**HM32**	L36~C458	No
HM48	F38~I480	126.5	**HM20**	F38~F468	20.8	**HM33**	L36~V455	No
HM47	F38~P478	74.4	**HM45**	F38~A467	17.9			

[도13]

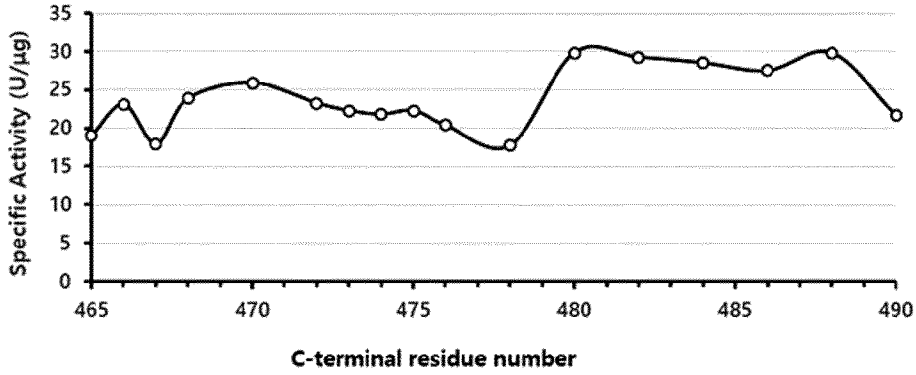


[도14]

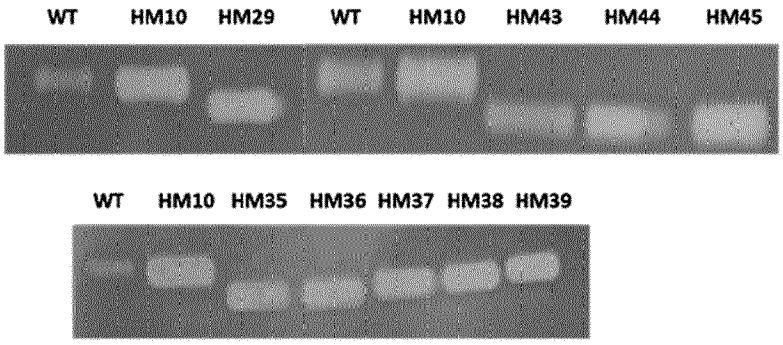
A

	C-term residue number	Specific activity (U/μg), pH 7.0		C-term residue number	Specific activity (U/μg), pH 7.0
WT	490	22.3 ± 0.4	HM36	473	22.0 ± 0.3
HM10	490	21.7 ± 0.6	HM35	472	23.3 ± 0.2
HM52	488	29.5 ± 1.9	HM19	470	25.9 ± 1.6
HM51	486	27.5 ± 1.8	HP19	470	19.9 ± 0.6
HM50	484	28.5 ± 2.4	HM20	468	23.9 ± 0.5
HM49	482	29.3 ± 1.7	HP20	468	21.6 ± 0.6
HM48	480	29.9 ± 0.7	HM45	467	18.0 ± 2.5
HM47	478	17.8 ± 0.3	HM29	467	18.2 ± 0.2
HM39	476	20.4 ± 0.2	HM44	466	23.2 ± 0.2
HM38	475	22.3 ± 0.4	HM43	465	19.1
HM37	474	21.8 ± 0.5			

B

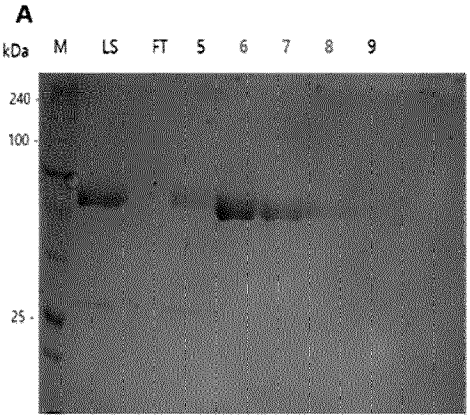


C

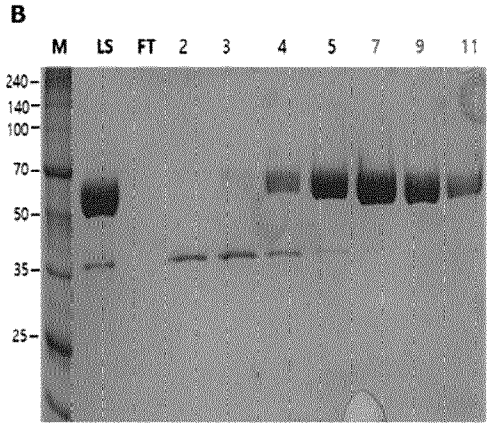


[도15]

A



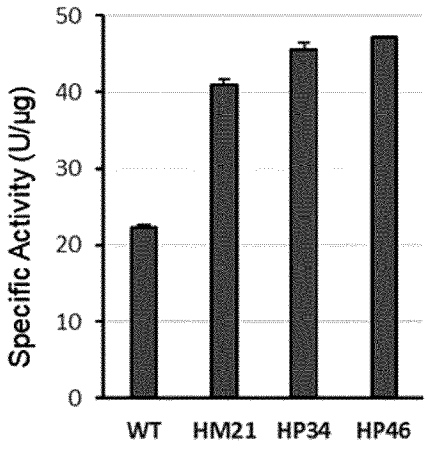
B



[도16]

A

	Specific activity (U/μg), pH 7.0
WT	22.3 ± 0.4
HM21	41.0 ± 0.6
HP34	45.6 ± 0.9
HP46	47.2



B

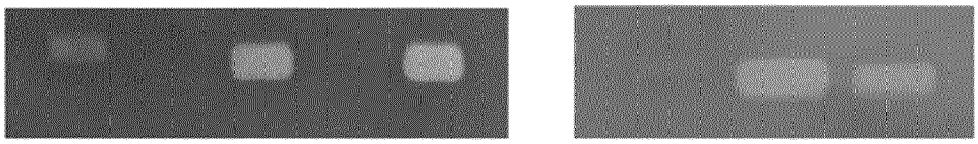
	K_m (mg/mL)	k_{cat} (1/min)	k_{cat}/K_m (1/min/mg/mL)
HW2	2.29±0.20	0.72±0.01	0.32±0.03
HM21	1.65±0.10	0.88±0.12	0.53±0.06
HP34	1.94±0.18	1.03±0.13	0.54±0.08
HP46	1.78±0.04	1.31±0.10	0.73±0.04

[도17]

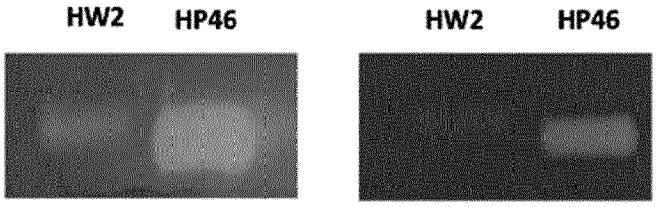
A

	T_{agg} (℃)
HW2	46.5
HM21	51.7
HP34	51.5
HP46	51.0

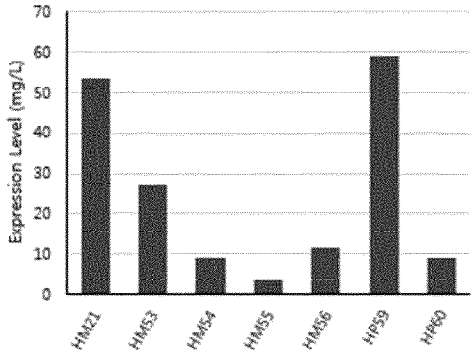
B



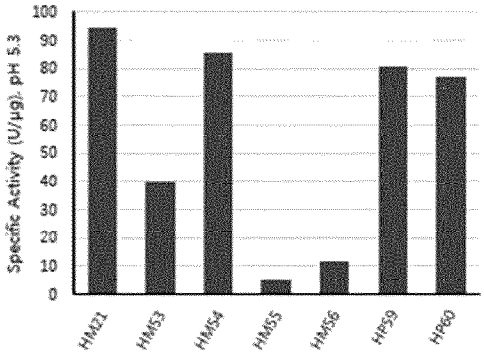
C



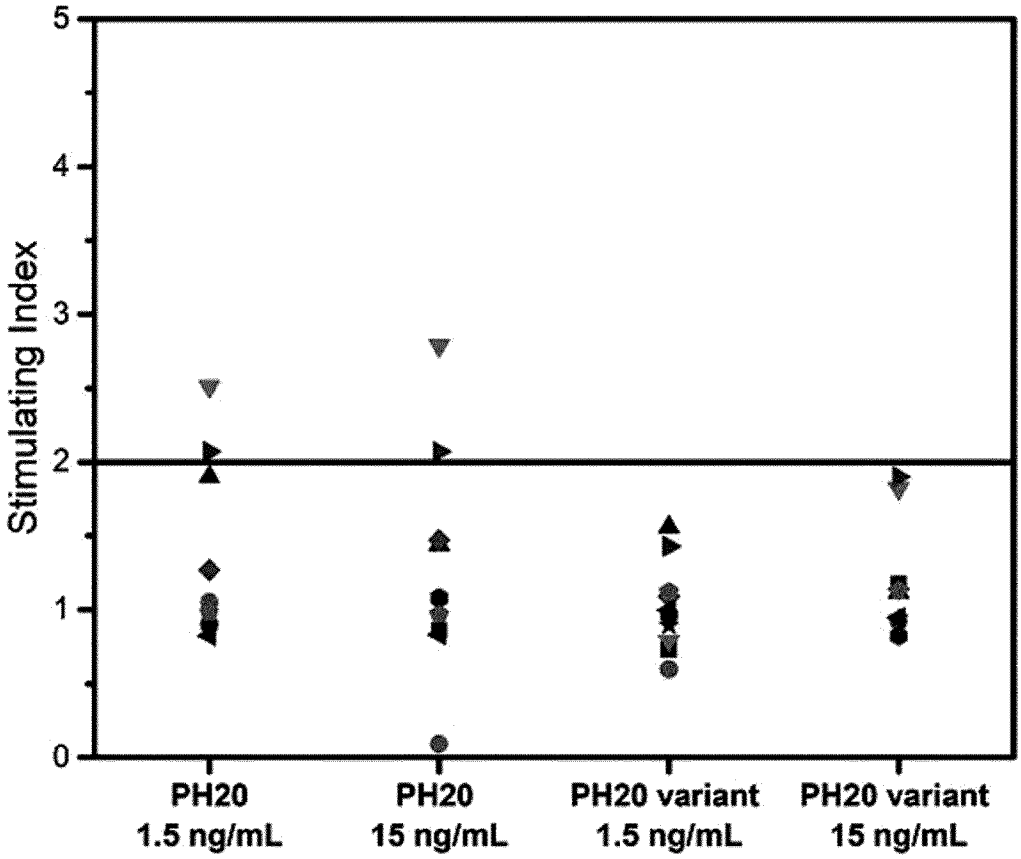
D



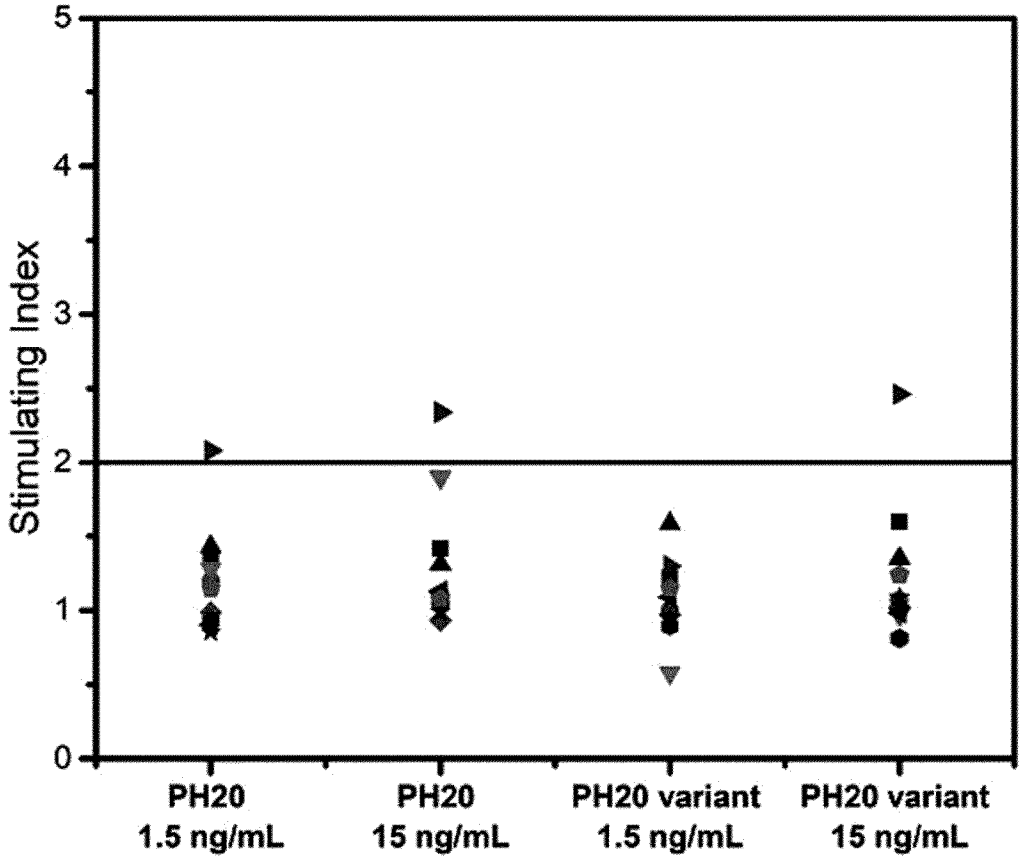
E



[도18]


Stimulating Index
0
1
2
3
4
5
PH20
1.5 ng/mL
PH20
15 ng/mL
PH20 variant
1.5 ng/mL
PH20 variant
15 ng/mL

[도19]


Stimulating Index
0
1
2
3
4
5
PH20
1.5 ng/mL
PH20
15 ng/mL
PH20 variant
1.5 ng/mL
PH20 variant
15 ng/mL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/009215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/26(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/26; A61K 31/337; A61K 38/46; A61K 38/47; A61K 38/16; A61K 45/06; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Hyaluronidase, variation, substitution, enzyme activity, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015-0010529 A1 (WEI, Ge) 08 January 2015 See paragraphs [0005], [0009]; and figure 1.	1-17,19,20
A	KR 10-2013-0116386 A (HALOZYME, INC.) 23 October 2013 See the entire document.	1-17,19,20
A	US 2010-0143457 A1 (WEI, Ge et al.) 10 June 2010 See the entire document.	1-17,19,20
A	WO 2013-102144 A2 (HALOZYME, INC.) 04 July 2013 See the entire document.	1-17,19,20
A	MCATEE, Caitlin O. et al. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. Advances in Cancer Research. 2014, vol. 123, pages 1-34 See the entire document.	1-17,19,20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 OCTOBER 2019 (29.10.2019)	**29 OCTOBER 2019 (29.10.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/009215

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **22-24, 26-29**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 22-24 and 26-29 refer to a claim violating PCT Rule 6.4(a). Thus, claims 22-24 and 26-29 are unclear.

3. ☒ Claims Nos.: **18, 21, 25**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/009215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2015-0010529 A1	08/01/2015	TW 201534726 A	16/09/2015
		WO 2015-003167 A1	08/01/2015
KR 10-2013-0116386 A	23/10/2013	AU 2009-236635 A1	22/10/2009
		AU 2009-236635 B2	13/02/2014
		CA 2721229 A1	22/10/2009
		CN 102065886 A	18/05/2011
		CN 103381267 A	06/11/2013
		EP 2285402 A2	23/02/2011
		EP 2662090 A1	13/11/2013
		EP 3192525 A1	19/07/2017
		JP 2011-519361 A	07/07/2011
		JP 2014-041131 A	06/03/2014
		JP 2016-074664 A	12/05/2016
		JP 5898146 B2	06/04/2016
		JP 6262700 B2	17/01/2018
		KR 10-1647932 B1	11/08/2016
		KR 10-2010-0135291 A	24/12/2010
		KR 10-2015-0024436 A	06/03/2015
		KR 10-2016-0052812 A	12/05/2016
		NZ 588638 A	28/09/2012
		NZ 601248 A	27/06/2014
		SG 187427 A1	28/02/2013
		US 10328130 B2	25/06/2019
		US 2010-0003238 A1	07/01/2010
		US 2012-0171153 A1	05/07/2012
		WO 2009-128917 A2	22/10/2009
		WO 2009-128917 A3	14/01/2010
US 2010-0143457 A1	10/06/2010	AU 2009-333918 A1	07/07/2011
		AU 2009-333918 B2	05/06/2014
		CA 2746181 A1	08/07/2010
		CA 2746181 C	15/03/2016
		CA 2915783 A1	08/07/2010
		CN 102307993 A	04/01/2012
		CN 102307993 B	25/06/2014
		CN 103205407 A	17/07/2013
		CN 103205407 B	16/03/2016
		CO 6341652 A2	21/11/2011
		DK 3037529 T3	20/05/2019
		EP 2367936 A1	28/09/2011
		EP 2367936 B1	02/03/2016
		EP 3037529 A1	29/06/2016
		EP 3037529 B1	27/03/2019
		ES 2573462 T3	08/06/2016
		JP 2012-511327 A	24/05/2012
		JP 2014-128277 A	10/07/2014
		JP 5670913 B2	18/02/2015
		JP 5885765 B2	15/03/2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/009215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		KR 10-1493644 B1	13/02/2015
		KR 10-1546563 B1	28/08/2015
		KR 10-2011-0099126 A	06/09/2011
		KR 10-2014-0021046 A	19/02/2014
		LT 3037529 T	27/05/2019
		MX 2011006110 A	24/06/2011
		NZ 593641 A	25/01/2013
		RS 58728 B1	28/06/2019
		SG 172064 A1	28/07/2011
		SG 194364 A1	29/11/2013
		SI 3037529 T1	28/06/2019
		US 2012-0213767 A1	23/08/2012
		US 8927249 B2	06/01/2015
		US 9284543 B2	15/03/2016
		WO 2010-077297 A1	08/07/2010
		ZA 201104116 B	19/12/2018
WO 2013-102144 A2	04/07/2013	AU 2012-362141 A1	10/07/2014
		AU 2012-362141 B2	21/09/2017
		AU 2017-245352 A1	02/11/2017
		AU 2017-245352 B2	01/08/2019
		BR 112014016195 A2	13/06/2017
		CA 2861919 A1	04/07/2013
		CA 2861919 C	02/04/2019
		CN 104244968 A	24/12/2014
		CN 104244968 B	25/07/2017
		DK 2797622 T3	16/01/2017
		EA 030252 B1	31/07/2018
		EA 201400772 A1	30/07/2015
		EP 2797622 A2	05/11/2014
		EP 2797622 B1	12/10/2016
		EP 3130347 A1	15/02/2017
		EP 3130347 B1	18/09/2019
		ES 2609582 T3	21/04/2017
		JP 2015-504666 A	16/02/2015
		JP 2017-112999 A	29/06/2017
		JP 6067746 B2	25/01/2017
		JP 6422933 B2	14/11/2018
		MX 2014007966 A	17/10/2014
		MX 361727 B	14/12/2018
		NZ 626126 A	24/06/2016
		SG 10201604470T A	28/07/2016
		SG 11201403714T A	30/07/2014
		US 2013-0302275 A1	14/11/2013
		US 2016-0362670 A1	15/12/2016
		US 9447401 B2	20/09/2016
		WO 2013-102144 A3	06/02/2014

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/009215

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/26(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/26; A61K 31/337; A61K 38/46; A61K 38/47; A61K 38/16; A61K 45/06; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 히알루로니다제(Hyaluronidase), 변이(variation), 치환(substitution), 효소 활성(enzyme activity), 암(cancer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2015-0010529 A1 (WEI, GE) 2015.01.08 단락 [0005], [0009]; 및 도면 1 참조.	1-17,19,20
A	KR 10-2013-0116386 A (할로자임, 아이엔씨) 2013.10.23 전체 문헌 참조.	1-17,19,20
A	US 2010-0143457 A1 (WEI, GE 등) 2010.06.10 전체 문헌 참조.	1-17,19,20
A	WO 2013-102144 A2 (HALOZYME, INC.) 2013.07.04 전체 문헌 참조.	1-17,19,20
A	MCATEE, CAITLIN O. 등, 'Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy', Advances in Cancer Research, 2014, 123권, 페이지 1-34 전체 문헌 참조.	1-17,19,20

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 10월 29일 (29.10.2019)	2019년 10월 29일 (29.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/009215

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 22-24,26-29
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

청구항 22-24 및 26-29는, PCT 규칙 제6.4(a)조를 위반한 청구항을 인용하고 있습니다. 따라서 청구항 22-24 및 26-29는 불명료 합니다.

3. ☒ 청구항: 18,21,25
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/009215

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2015-0010529 A1	2015/01/08	TW 201534726 A	2015/09/16
		WO 2015-003167 A1	2015/01/08
KR 10-2013-0116386 A	2013/10/23	AU 2009-236635 A1	2009/10/22
		AU 2009-236635 B2	2014/02/13
		CA 2721229 A1	2009/10/22
		CN 102065886 A	2011/05/18
		CN 103381267 A	2013/11/06
		EP 2285402 A2	2011/02/23
		EP 2662090 A1	2013/11/13
		EP 3192525 A1	2017/07/19
		JP 2011-519361 A	2011/07/07
		JP 2014-041131 A	2014/03/06
		JP 2016-074664 A	2016/05/12
		JP 5898146 B2	2016/04/06
		JP 6262700 B2	2018/01/17
		KR 10-1647932 B1	2016/08/11
		KR 10-2010-0135291 A	2010/12/24
		KR 10-2015-0024436 A	2015/03/06
		KR 10-2016-0052812 A	2016/05/12
		NZ 588638 A	2012/09/28
		NZ 601248 A	2014/06/27
		SG 187427 A1	2013/02/28
		US 10328130 B2	2019/06/25
		US 2010-0003238 A1	2010/01/07
		US 2012-0171153 A1	2012/07/05
		WO 2009-128917 A2	2009/10/22
		WO 2009-128917 A3	2010/01/14
US 2010-0143457 A1	2010/06/10	AU 2009-333918 A1	2011/07/07
		AU 2009-333918 B2	2014/06/05
		CA 2746181 A1	2010/07/08
		CA 2746181 C	2016/03/15
		CA 2915783 A1	2010/07/08
		CN 102307993 A	2012/01/04
		CN 102307993 B	2014/06/25
		CN 103205407 A	2013/07/17
		CN 103205407 B	2016/03/16
		CO 6341652 A2	2011/11/21
		DK 3037529 T3	2019/05/20
		EP 2367936 A1	2011/09/28
		EP 2367936 B1	2016/03/02
		EP 3037529 A1	2016/06/29
		EP 3037529 B1	2019/03/27
		ES 2573462 T3	2016/06/08
		JP 2012-511327 A	2012/05/24
		JP 2014-128277 A	2014/07/10
		JP 5670913 B2	2015/02/18
		JP 5885765 B2	2016/03/15

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/009215

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-1493644 B1	2015/02/13
		KR 10-1546563 B1	2015/08/28
		KR 10-2011-0099126 A	2011/09/06
		KR 10-2014-0021046 A	2014/02/19
		LT 3037529 T	2019/05/27
		MX 2011006110 A	2011/06/24
		NZ 593641 A	2013/01/25
		RS 58728 B1	2019/06/28
		SG 172064 A1	2011/07/28
		SG 194364 A1	2013/11/29
		SI 3037529 T1	2019/06/28
		US 2012-0213767 A1	2012/08/23
		US 8927249 B2	2015/01/06
		US 9284543 B2	2016/03/15
		WO 2010-077297 A1	2010/07/08
		ZA 201104116 B	2018/12/19
WO 2013-102144 A2	2013/07/04	AU 2012-362141 A1	2014/07/10
		AU 2012-362141 B2	2017/09/21
		AU 2017-245352 A1	2017/11/02
		AU 2017-245352 B2	2019/08/01
		BR 112014016195 A2	2017/06/13
		CA 2861919 A1	2013/07/04
		CA 2861919 C	2019/04/02
		CN 104244968 A	2014/12/24
		CN 104244968 B	2017/07/25
		DK 2797622 T3	2017/01/16
		EA 030252 B1	2018/07/31
		EA 201400772 A1	2015/07/30
		EP 2797622 A2	2014/11/05
		EP 2797622 B1	2016/10/12
		EP 3130347 A1	2017/02/15
		EP 3130347 B1	2019/09/18
		ES 2609582 T3	2017/04/21
		JP 2015-504666 A	2015/02/16
		JP 2017-112999 A	2017/06/29
		JP 6067746 B2	2017/01/25
		JP 6422933 B2	2018/11/14
		MX 2014007966 A	2014/10/17
		MX 361727 B	2018/12/14
		NZ 626126 A	2016/06/24
		SG 10201604470T A	2016/07/28
		SG 11201403714T A	2014/07/30
		US 2013-0302275 A1	2013/11/14
		US 2016-0362670 A1	2016/12/15
		US 9447401 B2	2016/09/20
		WO 2013-102144 A3	2014/02/06