



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월27일  
(11) 등록번호 10-2014844  
(24) 등록일자 2019년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/59 (2006.01) A61K 38/24 (2019.01)  
A61K 38/36 (2006.01) C07K 14/505 (2006.01)  
C07K 14/745 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/59 (2013.01)  
A61K 38/24 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7004563(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2010년07월01일  
심사청구일자 2019년02월15일  
(85) 번역문제출일자 2019년02월15일  
(65) 공개번호 10-2019-0018063  
(43) 공개일자 2019년02월20일  
(62) 원출원 특허 10-2017-7033906  
원출원일자(국제) 2010년07월01일  
심사청구일자 2017년11월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/IL2010/000532  
(87) 국제공개번호 WO 2011/004361  
국제공개일자 2011년01월13일  
(30) 우선권주장  
61/224,366 2009년07월09일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20070190611 A1  
(뒷면에 계속)  
전체 청구항 수 : 총 33 항

(73) 특허권자  
옵코 바이오로지스 리미티드  
이스라엘 8211804 이스라엘 키르야트 가트 애쉬레  
간 스트리트 16  
(72) 발명자  
피마 우디 이얼  
이스라엘 84833 베에르-세바 알벡 스트리트 30  
하트 길리  
이스라엘 소함 야스민 스트리트 87  
(74) 대리인  
유미특허법인

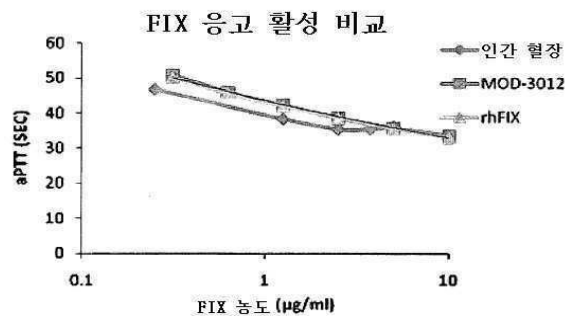
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 장기-작용성 응고 인자 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 옴모막성 고나도트로핀의 하나 이상의 카르복시 말단 펩타이드(CTP)를 포함하는, 폴리펩타이드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

**A61K 38/36** (2013.01)

**C07K 14/505** (2013.01)

**C07K 14/745** (2013.01)

**C07K 2319/00** (2013.01)

**C07K 2319/90** (2013.01)

**C07K 2319/91** (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20090130060 A1

US20030216313 A1

US6238890 B1

KR1020070043051 A

KR1020080093148 A

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

응고인자 및 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 융모막성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin) 카르복시 말단 펩타이드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩타이드를 포함하며,  
상기 응고 인자가 인자 VII 또는 인자 VIIa인,  
혈우병에 걸린 개체에서 출혈 또는 출혈의 위험성을 감소시키기 위한 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 응고 인자가 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 응고 인자가 신호 서열을 포함하지 않는 것인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 응고 인자가 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 39-444의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 7

응고인자 및 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 융모막성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin) 카르복시 말단 펩타이드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩타이드를 포함하며,  
상기 응고 인자가 인자 VII 또는 인자 VIIa인,  
혈우병에 걸린 개체에서 멍 또는 멍의 위험성을 감소시키기 위한 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 응고 인자가 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 10

제7항에 있어서, 상기 응고 인자가 신호 서열을 포함하지 않는 것인, 조성물.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 상기 응고 인자가 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 39-444 의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 13

응고인자 및 상기 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 3개의 융모막성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin) 카르복시 말단 펩타이드(CTP)로 구성된 CTP-변형된 폴리펩타이드를 포함하며,

상기 응고 인자가 인자 VII 또는 인자 VIIa인,

혈우병에 걸린 개체에서 지혈 항상성을 유도하기 위한 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 응고 인자가 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 전구체 인자 VII 또는 전구체 인자 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 응고 인자가 신호 서열을 포함하지 않는 것인, 조성물.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 상기 응고 인자가 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa인, 조성물.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 성숙형 VII 또는 성숙형 VIIa가 서열번호 9의 아미노산 39-444 의 아미노산 서열을 가지는 것인, 조성물.

#### 청구항 19

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 의 서열이 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 4 의 처음 10개 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 20

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 하나 이상의 당화 부위(glycosylation site)를 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 21

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 절단형(truncated)인, 조성물.

#### 청구항 22

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP가 링커를 통해 상기 응고 인자에 부착된 것인, 조성물.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 링커가 펩타이드 결합인, 조성물.

#### 청구항 24

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 의 서열이 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호

4의 처음 10개 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 25

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 하나 이상의 당화 부위(glycosylation site)를 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 26

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 절단형(truncated)인, 조성물.

#### 청구항 27

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP가 링커를 통해 상기 응고 인자에 부착된 것인, 조성물.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 링커가 펩타이드 결합인, 조성물.

#### 청구항 29

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 의 서열이 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 4의 처음 10개 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 30

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 하나 이상의 당화 부위(glycosylation site)를 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 31

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP 가 절단형(truncated)인, 조성물.

#### 청구항 32

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 CTP가 링커를 통해 상기 응고 인자에 부착된 것인, 조성물.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 링커가 펩타이드 결합인, 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 미국 가출원 61/224,366호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 응고 인자의 C-말단(카르복시 말단)에 부착된 융모막성 고나도트로핀(chorionic gonadotrophin)의 하나 이상의 카르복시-말단 펩타이드(CTP)를 포함하는 폴리펩타이드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 폴리펩타이드는 혈액, 간 또는 신장에서 변성되거나 효소적으로 분해되기 쉽다. 즉, 폴리펩타이드는 전형적으로 수시간의 짧은 순환성 반감기를 가지고 있다. 이의 낮은 안정성으로 인해, 펩타이드 약물은 통상적으로 활성 펩타이드의 유효한 혈장 농도 유지를 위해 지속적인 빈도로 전달된다. 아울러, 펩타이드 약물들은 통상적으로 주입(infusion)에 의해 투여되기 때문에, 잦은 펩타이드 약물의 주입은 개체에게 상당한 불편함을 야기한다. 따라서, 치료적 폴리펩타이드의 높은 약리학적 효능을 유지하면서 반감기를 연장시킬 수 있는 기법들이 요구되

고 있다. 또한, 이러한 필요한 펩타이드는 증진된 혈청 안정성, 높은 활성의 요건 및 개체에 주입시 바람직하지 않은 면역 반응의 유발 가능성이 낮아야 하는 등의 요건을 만족시켜야 한다.

[0004] 짧은 혈청 반감기와 같은 비우호적인 약물 동태성은 다수의 유망한 약물 후보체의 약학적 개발에 방해가 될 수 있다. 혈청 반감기는 분자의 실험적인 특징이므로, 각각의 새로운 잠재적인 약물에 대해서는 실험을 통해 평가하여야 한다. 예컨대, 낮은 분자량의 폴리펩타이드 약물의 경우에는, 필요한 투약 요법의 비용 또는 빈도로 인해, 신장 여과와 같은 생리적인 소거 기전이, 약물의 치료학적 수준의 유지를 어렵게 할 수 있다. 반대로, 긴 혈청 반감기도 약물 또는 이의 대사산물이 독성 부작용을 가진 경우에는 부적절하다. ㄴ

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 일 구현예에서, 본 발명은 응고 인자와 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단(CTP) 펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0006] 다른 구현예에서, 본 발명은, 응고 인자와 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드로 구성된, 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 추가로 제공한다.

[0007] 다른 구현예에서, 본 발명은, 응고 인자의 카르복시 말단에 1 내지 5개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 부착시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자의 생물학적 반감기가 개선되는, 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0008] 다른 구현예에서, 본 발명은, 응고 인자의 카르복시 말단에 1 내지 5개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 부착시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자의 곡선하 면적(AUC: area under the curve)이 개선되는, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0009] 다른 구현예에서, 본 발명은, 응고 인자의 카르복시 말단에 1 내지 5개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 부착시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자의 투여 횟수가 감소되는, 응고 인자의 투여 횟수를 줄이는 방법을 추가로 제공한다.

[0010] 다른 구현예에서, 본 발명은, 필요한 개체에게, 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공하는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자 치료법의 이용에 대한 순응성(compliance)가 증가되는, 응고 인자 치료법의 이용 순응성을 증가시키는 방법을 추가로 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 일 구현예에서, 본 발명은 장기-작용성 응고 인자와 이의 제조 및 이용 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 장기-작용성 응고 인자는 카르복시 말단 펩타이드(CTP, 또한 CTP 유닛으로도 지칭됨)를 포함한다. 다른 구현예에서, 응고 인자를 포함하는 장기-작용성 폴리펩타이드는 인간 용모막성 고나도트로핀(hCG)의 카르복시 말단 펩타이드(CTP)를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, CTP는 응고 인자의 분해에 대한 방지제로서 작용한다. 다른 구현예에서, CTP는 응고 인자의  $C_{max}$ 를 연장시킨다. 다른 구현예에서, CTP는 응고 인자의  $T_{max}$ 를 연장시킨다. 다른 구현예에서, CTP는 응고 인자의 순환성 반감기를 연장시킨다. 일부 구현예에서, CTP는 응고 인자의 효능을 강화한다.

[0012] 다른 구현예에서, 본 발명은, 1 내지 10개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하여, 응고 인자의 생물학적 반감기를 개선시킴으로써, 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 1 내지 5개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하여, 응고 인자의 생물학적 반감기를 개선시킴으로써, 응고 인자의 생물학적 반감기를 연장시키는 방법을 제공한다.

[0013] 다른 구현예에서, 본 발명은, 1 내지 10개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하여, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시킴으로써, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 1 내지 5개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하여, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시킴으로써, 응고 인자의 곡선하 면적(AUC)을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0014] 다른 구현예에서, 본 발명의 응고 인자는 단백질이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 응고 인자는 펩타이드이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 응고 인자는 폴리펩타이드이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 효소이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 세린 프로테아제이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 당단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 트랜스글루타미나제이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 비활성 자이모젠이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 응고 인자이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FVIII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FV이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 인자 XIII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 인자 X이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 트롬빈이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 피브리노겐이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FVIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FVII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FIX이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FX이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FXIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FXII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FXa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FVa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 프로트롬빈이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 트롬빈이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FV이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FXI이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 vWF이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FVIIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 B-결손된 도메인 FVIII (FVIII<sub>BDD</sub>)이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FIXa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 프리칼리크레인(prekallikrein)이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 칼리크레인(kallikrein)이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FXIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 피브리노젠이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 트롬보모듈린이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 FII이다.

[0015] 다른 구현예에서, 응고 인자는 당단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 비타민 K 의존형 당단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 비타민 K 비의존형 당단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 당단백질이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FV이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVI이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVIII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FIX이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FX이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FXI이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FXII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FvW이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FII이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FIXa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FXIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 피브리노겐이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FXa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 프로트롬빈이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 트롬빈이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FVIIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 프리칼리크레인이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 칼리크레인이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 재조합 FXIIa이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 임의의 공지된 재조합 응고 인자이다. 다른 구현예에서, 단일 펩타이드를 코딩하는 응고 인자는 임의의 공지된 재조합 응고 인자이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 C-말단에 부착된 1-10개의 CTP 반복체를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 단일 펩타이드를 포함하는 응고 인자는 임의의 공지된 재조합 응고 인자이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 C-말단에 부착된 하나 이상의 CTP를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, C-말단에 부착된 1-10개의 CTP 반복체를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는 응고 인자는 조작된 응고 인자(engineered coagulation factor)이다. 다른 구현예에서, C-말단에 부착된 하나 이상의 CTP를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는 응고 인자는 조작된 응고 인자이다. 다른 구현예에서, C-말단에 부착된 1-10개의 CTP 반복체를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는 응고 인자는, 접합된 응고 인자(conjugated coagulation factor)이다. 다른 구현예에서, C-말단에 부착된 하나 이상의 CTP를 포함하며 N-말단에 부착된 CTP는 포함하지 않는 응고 인자는 접합된 응고 인자이다.

[0016] 다른 구현예에서, 응고 인자는 FIX, FVII, 인자 X, 단백질 C 및 프로트롬빈의 도메인 구성과 유사하거나 동일한 도메인 구성을 포함한다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 N-말단 프로펩타이드를 가진 전구체로서 합성된다. 다른 구현예에서, 본원에서 사용되는 응고 인자는 비활성 프로-엔자임 형태이다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 간 세포에서 생산된다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 글루탐산(Glu)을 감마 카르복시 글루탐산(Gla)으로 변환시키는 감마카르복실라제에 대한 도킹 부위를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에서 사용되는 응고 인자는 상업적으로 이용가능한 응고 인자이다.

[0017] 다른 구현예에서, 인자 VII의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0018] MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFTQEEAHGLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKFLWISYSDGDCASSPCQNGGCKDQ

LQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PW  
QVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTNHDIALLRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF  
SERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCAT  
VGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (서열번호 9).

[0019] 다른 구현예에서, 인자 VII의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0020] MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQ  
LQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PW  
QVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTNHDIALLRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF  
SERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCAT  
VGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP\*GCGR (서열번호 10).

[0021] 다른 구현예에서, 인자 VII를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함한다:

[0022] CGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGG  
CAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGACAGTGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGC  
AACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCCTGCGAGC  
CCCATTTCCTGAGGATGCGGCCGC (서열번호 11).

[0023] 다른 구현예에서, 인자 VII-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함한다:

[0024] CGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGG  
CAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGACAGTGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGC  
CACCGTGGGCCACTTCGCGTGTACACCAGGGTGTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTGATGAGAAGCGAGCCAGACCCGGCGTGTCTGTGAGAGC  
CCCCTTCCCAGCAGCAGTCCAAGGCCCTCCCCTAGCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCACGACACCCCATCTGCCCCAGTGAGGATC  
CGCGGCCGC (서열번호 12).

[0025] 다른 구현예에서, 인자 VII-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0026] MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQ  
LQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PW  
QVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTNHDIALLRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF  
SERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCAT  
VGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQ\* (서열번호 13).

[0027] 다른 구현예에서, 인자 VII-CTP-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함한다:

[0028] CGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGG  
CAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGACAGTGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGC  
CACCGTGGGCCACTTCGCGTGTACACCAGGGTGTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTGATGAGAAGCGAGCCAGACCCGGCGTGTCTGTGAGAGC  
CCCCTTCCCAGCAGCAGTCCAAGGCCCTCCCCTAGCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACCAATCCTGCCACAGCAGCTC  
CTCTAAGGCCCTCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCGGCTGCCAGGCCCTCTGACACCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGTCTGGATCCGCGGCCGC  
(서열번호 14).

[0029] 다른 구현예에서, 인자 VII-CTP-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0030] MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQ  
LQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PW  
QVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVP GTTNHDIALLRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF  
SERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCAT  
VGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQSSSKAPPPSLPSRLPGSDTPILPQ\*\* (서열번호 15).



- [0031] 다른 구현예에서, 인자 IX를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함한다:
- [0032] GAATACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTCCAGTACCTTAGA GTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGT CAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATAT GGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTGAACGCGGCCGC (서열번호 16).
- [0033] 다른 구현예에서, 인자 IX의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- [0034] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMECKSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPC LNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNINRGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQDVVNS TEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKIIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIETEHEQKRNVIIRIIPHNNYN AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIDKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVHFHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQ GDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLT\* (서열번호 17).
- [0035] 다른 구현예에서, 인자 IX-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함 한다:
- [0036] GGAATACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCCAGTACCTTAG AGTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATG TCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATA TGGAAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGCCTGCCCTCCCC AAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACCAATCTGCCACAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (서열번호 18).
- [0037] 다른 구현예에서, 인자 IX-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한 다:
- [0038] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMECKSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPC LNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNINRGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQDVVNS TEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKIIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIETEHEQKRNVIIRIIPHNNYN AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIDKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVHFHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQ GDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ\*\* (서열번호 19).
- [0039] 다른 구현예에서, 인자 IX-CTP-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)를 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 포함한다:
- [0040] GAATACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCCAGTACCTTAGA GTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGT CAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATAT GGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGCCTGCCCTCCCCA AGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACCAATCCTGCCACAGAGCAGCTCCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCCCC TCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (서열번호 20).
- [0041] 다른 구현예에서, 인자 IX-CTP-CTP (카르복시 말단에 부착된 형태)의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포 함한다:
- [0042] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMECKSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPC LNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNINRGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQDVVNS TEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKIIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIETEHEQKRNVIIRIIPHNNYN AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIDKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVHFHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQ GDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPSRLPGPS DTPILPQ\*\* (서열번호 21).
- [0043] 다른 구현예에서, 퓨린(furin)을 본 발명의 응고 인자-CTP를 발현하는 세포에 첨가한다. 다른 구현예에서, 퓨 린은 세포에서 본 발명의 응고 인자-CTP의 생산 효율을 높인다. 다른 구현예에서, 퓨린을 본 발명의 응고 인자 -CTP의 코딩 서열을 포함하는 벡터와 함께 공동-형질감염시킨다. 다른 구현예에서, 퓨린은 별개의 벡터에 의해 코딩된다. 다른 구현예에서, 퓨린 및 응고 인자-CTP는 하나의 벡터에 의해 코딩된다. 다른 구현예에서, 퓨린 의 코딩 서열은 pCI-DHFR에 삽입된다. 다른 구현예에서, 퓨린의 코딩 서열은 pCI-dhfr/smaI+Not I,

Furin/AsisI F.I.+NotI로 조작된다.

- [0044] 다른 구현예에서, 퓨린을 코딩하는 핵산 서열은 하기 핵산 서열을 GCTCCCGGCAAGCCAGAGCAGCCGAGAGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGTGCCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGC TGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCGGCTCAGCTGCGCCTTCATCGTGTGCTTCTGCTACTGTCTTCTGGTCTGCAGCTGCGCTCTGGCTTTA GTTTTCGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCCTACAAGGGGTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGGCCGTCTGACTCAGAAG AGGACGAGGGCCGGGCGAGAGACCGCCTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGAACGCGGCCGC (서열번호 22).
- [0045] 다른 구현예에서, 퓨린의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열을 포함한다: MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWRHGVTKRSLSPHRPHSRLQREPQVQWLEQQ VAKRRTKRDVYQEPTDPKFPQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHI VVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFVDNDQDPDPQPRYTQMNDRHGTTRCAGE VAAVANNGVCGVGAYNARIGGVRMLDGEVTDAVEARSGLNPNHIHYSASWGPEDDGKTVDPARLAEAEAFRGVSQGRGLGSIFVWASNGGREGHDS NCDGYNSIYTLSSISATQFGNVPWYSEACSSLTATYSSGNQNEKQIVTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGI IALTLEANKNLTWDRMQLVVTQSKPAH LNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTPVAPQRKCI IDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLA IHLVS PMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPGSEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAEGLPVPPESSGCKLTLSQACVCEEGFSLHQKS CVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPEVQTCRSRQSQSSRESPPQQPRLPPEVEAGQRLRAGLLPS HLEPVVAGLSCAFI VLVFVTFLVLQLRSGFSFRGVKVVYTMDRGLI SYKGLPPEAWQECPDSEDEDEGRGERTAFIKDQSAL\* (서열번호 23).
- [0046] 일부 구현예에서, 용어 응고 인자는 응고 활성을 가진 공지의 응고 인자들의 상동체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 상동체는 또한 결손, 삽입 또는 아미노산 치환 등의 치환 변이체 및 생물학적 활성 형의 폴리펩타이드 단편을 포괄한다.
- [0047] 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 활성을 가진 응고 인자의 상동체를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 활성을 가진 본원에 기술된 응고 인자의 상동체를 포함한다. 다른 구현예에서, 상동체, 예컨대, 폴리펩타이드는, 디폴트 파라미터를 사용하여 국립 생물공학 정보 센터(NCBI)의 BlastP 소프트웨어에 의해 결정된 바에 따라 응고 인자에 대해 50 % 이상, 55 % 이상, 60 % 이상, 65 % 이상, 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 87 % 이상, 89 % 이상, 91 % 이상, 93 % 이상, 95 % 이상 또는 99% 이상 상동하다.
- [0048] 다른 구현예에서, 본 발명은 퓨린의 상동체를 포함한다. 다른 구현예에서, 상동체, 예컨대 폴리펩타이드는, 디폴트 파라미터를 사용하여 국립 생물공학 정보 센터(NCBI)의 BlastP 소프트웨어에서 결정된 바에 따라, 50 % 이상, 55 % 이상, 60 % 이상, 65 % 이상, 70 % 이상, 75 % 이상, 80 % 이상, 85 % 이상, 87 % 이상, 89 % 이상, 91 % 이상, 93 % 이상, 95 % 이상 또는 99% 이상 상동하다.
- [0049] 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-10개의 고나도트로핀 카르복시 말단(CTP) 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-8개의 고나도트로핀 카르복시 말단(CTP) 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-3개의 고나도트로핀 카르복시 말단(CTP) 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-5개의 고나도트로핀 카르복시 말단(CTP) 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-5개의 CTP를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 그 아미노 말단에 CTP를 가지고 있지 않은 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 그것의 카르복시 말단에 하나 이상의 CTP를 가진 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 그것의 카르복시 말단에 하나 이상의 CTP를 가지며 그것의 아미노 말단에 CTP를 가지지 않는, 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0050] 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 카르복시 말단에 하나 이상의 CTP를 가진 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드이다. 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 카르복시 말단에 하나의 CTP를 가진 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드이다. 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 카르복시 말단에 하나의 CTP를 가진 응고 인자로 구성된 폴리펩타이드이다. 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 카르복시 말단에 직렬로 부착된 2개의 CTP 펩타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 조작된 응고 인자는 생물학적 활성 측면에서 비-CTP 변형된 응고 인자와 등가이다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 조작된 응고 인자는 약물 동태성 및/또는 약물 약동성 등의 약리학적 측정에서 비-CTP 변형된 응고 인자와 적어도 등가이다.
- [0051] 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 B형 혈우병 환자의 치료 목적으로 사용하기 위한 것이다. 다른 구현예에

서, 그것의 카르복시 말단에 직렬로 2개의 CTP를 포함하는 응고 인자 IX(MOD-3012)는 B형 혈우병 환자의 치료 목적으로 사용하기 위한 것이다. 다른 구현예에서, 그것의 카르복시 말단에 1개의 CTP 반복체를 포함하는 응고 인자 IX(MOD-3011)는 B형 혈우병 환자의 치료 목적으로 사용하기 위한 것이다. 다른 구현예에서, 조작된 응고 인자는 주입율, 필요량 및 이의 조합을 낮출 수 있다.

[0052] 다른 구현예에서, 그것의 카르복시 말단에 직렬로 2개의 CTP를 포함하는 응고 인자 IX (MOD-3012)는, FIX-CTP 수확물 또는 rhFIX 대비 이의 응고 활성을 유지하면서 개선된 PK 프로파일을 나타낸다. 다른 구현예에서, 그것의 카르복시 말단에 직렬로 2개의 CTP를 포함하는 응고 인자 IX (MOD-3012)는, rhFIX와 비교하여, 3배 긴 반감기와 4.5배 높은 AUC를 나타낸다.

[0053] 다른 구현예에서, 용어 "CTP 펩타이드," "카르복시 말단 펩타이드" 및 "CTP 서열"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, 용어 카르복시 말단 펩타이드는 전장 CTP이다. 다른 구현예에서, 카르복시 말단 펩타이드는 절단형(truncated) CTP이다. 각각의 가능성은 본 발명의 구분되는 구현예이다.

[0054] 다른 구현예에서, 용어 조작된 응고 인자는 성숙형 응고 인자의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 용어 조작된 응고 인자는 그것의 신호 서열 또는 신호 펩타이드를 포함하는 응고 인자의 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 다른 구현예에서, "신호 서열" 및 "신호 펩타이드"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 분자 언급시 사용되는 경우에 "서열"은 코딩 영역을 지칭할 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 구분되는 구현예이다.

[0056] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 하나 이상의 CTP를 포함하는 조작된 응고 인자는, 하나 이상의 CTP가 없는 동일한 응고 인자와 비교하여, 강화된 생체내 생물학적 활성을 가진다.

[0057] 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 응고 인자의 분해에 대한 강화된 보호를 제공한다. 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 강화된 소거 방지를 제공한다. 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 소거 시간(clearance time)을 연장시킨다. 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 이의  $C_{max}$  강화를 제공한다. 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 이의  $T_{max}$  강화를 제공한다. 일부 구현예에서, 응고 인자의 카르복시 말단에서의 하나 이상의 CTP 서열은 이의  $T_{1/2}$ 를 연장시킨다.

[0058] 다른 구현예에서, 본 발명의 접합된 응고 인자는 비변형된 접합된 응고 인자와 동일한 방식으로 이용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 접합된 응고 인자는 증가된 순환성 반감기와 혈장 체류 시간, 감소된 소거성, 및 증가된 생체내 임상적인 활성을 가진다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자의 개선된 특성으로 인해, 이러한 접합체는 동일한 응고 인자의 비변형된 형태 보다 적은 빈도로 투여된다.

[0059] 다른 구현예에서, 투여 횟수 감소는 개선된 치료 성과로 이어지는 환자 순응성 뿐만 아니라 환자의 삶의 질도 개선시킬 것이다. 다른 구현예에서, 응고 인자의 통례적인 접합체와 비교하여, 본 발명의 접합체의 분자량 및 링커 구조를 가지는 접합체가, 개선된 효능, 개선된 안정성, 상승된 AUC 수준 및 강화된 순환성 반감기를 가지는 것으로, 확인되었다.

[0060] 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 접합된 응고 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 접합된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 접합된 응고 인자의 치료학적 유효량은 치료 중인 실제 증상의 유형, 치료 중인 환자의 증상 뿐만 아니라 조성물내 다른 성분과 같은 인자에 따라 결정된다. 다른 구현예에서, 접합된 응고 인자의 치료학적 유효량은 1일 1회 내지 매주 1회 투여되는 체중 1 kg 당 50-500 IU이다. 다른 구현예에서, 접합된 응고 인자의 치료학적 유효량은 1일 1회 체중 1 kg 당 150-250 IU이다. 다른 구현예에서, 접합된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 인간 환자에게 다양한 수단으로 투여하기에 유효한 농도로 제형화된다.

[0061] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 혈우병에 걸린 개체의 치료에 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 혈우병의 예방학적 요법에 유용하며 따라서 출혈 및 관련 합병증의 위험성을 낮춘다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 외인적으로 투여된 응고 인자에 대한 저해 항체가 생성될 위험성을 낮추면서 혈우병에 걸린 개체를 치료하는데 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 혈우병에 걸린 개체의 치료에 유용하며 따라서 항상성을 유도한다.

- [0062] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 과도한 출혈 또는 멍 발생을 경험하거나, 또는 프로트롬빈 시간(PT: Prothrombin Time) 또는 부분 트로보플라스틴 시간(PTT: Partial Thromboplastin Time)이 연장된 개체의 치료에 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 비타민 K 결핍증 또는 간 질환 등의 출혈을 야기하는 후천적인 질환을 가진 개체의 치료에 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 후천적(다른 질환으로 인한) 또는 선천적인, 경증 내지 중증의, 영구적인 또는 일시적인, 응고 인자 결핍증들을 가지고 있는 개체를 치료하는데 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 A형 혈우병에 걸린 개체를 치료하는데 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 B형 혈우병에 걸린 개체를 치료하는데 유용하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는, 간 질환 또는 암과 같은 만성 질환; 빠른 속도로 응혈 인자를 소모시키는 범발성 혈관내 응고(DIC: disseminated intravascular coagulation) 등의 급성 증상; 또는 비타민 K 결핍증 또는 와파린과 같은 비타민 K 길항제를 이용한 치료가 원인인, 후천적인 결핍증을 가진 개체를 치료하는데 유용하다(인자 II, VII, IX 및 X의 생산에는 비타민 K가 필요함). 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 응고 인자는 응혈 불균형(clotting imbalance)을 야기하는 질환에 걸린 개체를 치료하는데 유용하며, 그 예로는, 비제환적인 예로서, 간 질환, 요독증, 암, 골수 장애, 뱀 독에 노출, 비타민 K 결핍증, 항응고 요법, 항응고제 와파린의 우발적인 섭취, 복수 수혈(저장된 혈액 유닛들에는 일부 이의 응고 인자가 소실되어 있음)가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 다른 구현예에서, 본원에서 개체는 인간 개체이다. 다른 구현예에서, 개체는 애완동물이다. 다른 구현예에서, 개체는 포유류이다. 다른 구현예에서, 개체는 농장 동물이다. 다른 구현예에서, 개체는 원숭이이다. 다른 구현예에서, 개체는 말이다. 다른 구현예에서, 개체는 소이다. 다른 구현예에서, 개체는 마우스이다. 다른 구현예에서, 개체는 랫이다.
- [0064] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 [(CTP)<sub>n>1</sub>-응고 인자]는 전장 응고 인자 또는 이의 카르복시 말단 상에 펩타이드 결합을 통해 하나 이상의 CTP 단위가 연결되어 있으나 이의 아미노 말단에는 CTP가 없는 그것의 활성 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 [(CTP)<sub>n>1</sub>-응고 인자]는 응고 인자, 또는 펩타이드 결합을 통해 추가적인 CTP 단위에 연결되어 있는, 하나 이상의 CTP 단위가 펩타이드 결합을 통해 연결되어 있으나 이의 아미노 말단에는 CTP가 없는 그것의 활성 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 하나의 핵산 분자는 이의 C-말단에 부착된 하나 이상의 CTP를 포함하나 이의 아미노 말단에 CTP가 없는 조각된 응고 인자를 코딩한다.
- [0065] 다른 구현예에서, CTP는 링커를 통해 응고 인자에 부착된다. 다른 구현예에서, 상기 CTP 서열을 응고 인자에 연결시키는 링커는 공유 결합이다. 다른 구현예에서, CTP 서열을 응고 인자에 연결시키는 링커는 펩타이드 결합이다. 다른 구현예에서, CTP를 응고 인자에 연결시키는 링커는 치환된 펩타이드 결합이다. 다른 구현예에서, CTP 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0066] 다른 구현예에서, 서열번호 1은 다음의 아미노산 (AA) 서열: DPRFQDSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPIL (서열번호 1)을 포함한다. 다른 구현예에서, 서열번호 2는 다음의 아미노산 (AA) 서열: SSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (서열번호 2)을 포함한다.
- [0067] 다른 구현예에서, 본 발명의 카르복시 말단 펩타이드 (CTP)는 서열번호 1에 기술된 인간 용모막성 고나도트로핀의 아미노산 112 - 145번 위치의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 서열번호 2에 기술된 인간 용모막성 고나도트로핀의 아미노산 118 - 145번 위치의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CTP 서열은 또한 인간 용모막성 고나도트로핀의 112-118번 위치 중 임의의 위치에서 시작되며 145번 위치에서 종결된다. 일부 구현예에서, CTP 서열은 28, 29, 30, 31, 32, 33 또는 34개의 아미노산 길이이고, CTP 아미노산 서열의 112, 113, 114, 115, 116, 117 또는 118번의 위치에서 종결된다.
- [0068] 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는, 미국 특허 5,712,122호에 기술된 바와 같이, 1-5개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 미국 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는 1개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는 2개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는 3개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는 4개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 펩타이드는 5개의 보존적인 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와 상이한 용모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 펩타이드와 70% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드 아미노산 서열은



천연 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 펩타이드와 80% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 펩타이드와 90% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 펩타이드와 95% 이상 상동하다.

[0069] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드의 DNA 서열은 천연 인간 CTP DNA 서열 또는 그것의 펩타이드와 70% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드의 DNA 서열은 천연 인간 CTP DNA 서열 또는 그것의 펩타이드와 80% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드의 DNA 서열은 천연 인간 CTP DNA 서열 또는 그것의 펩타이드와 90% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드의 DNA 서열은 천연 인간 CTP DNA 서열 또는 그것의 펩타이드와 70% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩타이드의 DNA 서열은 천연 인간 CTP DNA 서열 또는 그것의 펩타이드와 95% 이상 상동하다.

[0070] 일 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열 중 하나 이상은 절단형이다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열의 양자는 절단형이다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열 중 2개는 절단형이다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열들 모두가 절단형이다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호의 첫번째 10개의 아미노산을 포함한다. 다른 구현예에서, 서열번호 3은 다음의 아미노산 (AA) 서열: SSSSKAPPPSLP를 포함한다.

[0071] 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 첫번째 10개의 아미노산을 포함한다. 다른 구현예에서, 서열번호 4는 다음의 아미노산 (AA) 서열: SSSSKAPPPSLPSPSRPLPGSDTPILPQ를 포함한다.

[0072] 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서 11개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서 12개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4 또는 서열번호 3의 앞에서부터 8개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서부터 13개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서부터 14개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4 또는 서열번호 3의 앞에서부터 6개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4 또는 서열번호 3의 앞에서부터 5개의 아미노산을 포함한다.

[0073] 일 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열의 하나 이상이 당화된다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열의 양자가 당화된다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열 중 2개가 당화된다. 다른 구현예에서, 용모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열들 모두 당화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 하나 이상의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 2개의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 3개의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 4개의 당화 부위를 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, CTP 서열의 변형은 보다 낮은 투여량의 용법을 허용하는데 있어 유익하다. 일부 구현예에서, CTP 서열의 변형은 더 적은 빈도로의 투약을 허용하는데 유익하다. 일부 구현예에서, CTP 서열의 변형은 안전한 장기 작용 효과를 허용하는데 유익하다.

[0075] 일부 구현예에서, "폴리펩타이드", "조작된 응고 인자", 또는 "단백질"은, 본원에서, 천연 폴리펩타이드(분해산물, 합성에 의해 합성된 폴리펩타이드 또는 재조합 폴리펩타이드) 및 펩타이드 모방체(전형적으로, 합성에 의해 합성된 폴리펩타이드), 뿐만 아니라, 폴리펩타이드 유사체인 펩토이드(peptoid) 및 세미펩토이드(semipeptoid)를 포괄하며, 일부 구현예에서, 상기 펩토이드 및 세미펩토이드는, 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드가 체내에서 보다 더 안정적이게 하거나 세포로의 침투성을 강화시킬 수 있는 변형을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, 변형은 비제한적인 예로서 C 말단 변형, 폴리펩타이드 결합 변형, 예컨대 비제한적으로 CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH 또는 CF=CH, 백본 변형 및 잔기 변형을 포함한다. 펩타이드 모방체 화합물의 제조 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에 명시되어 있으며, 이 문헌은 본원에 전체 내용이 포함되는 것과 같이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0077] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 내부의 폴리펩타이드 결합 (-CO-NH-)은 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 N-메틸화 결합 (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-)으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 에스테르 결합 (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 케토메틸렌 결합 (-CO-CH<sub>2</sub>-)으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 α-아자 결합 (-NH-N(R)-CO-)으로 치환되며, 이때

R은 임의의 알킬, 예컨대 메틸, 카바 결합( $-CH_2-NH-$ )이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 하이드록시 에틸렌 결합 ( $-CH(OH)-CH_2-$ )으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 티오아미드 결합 ( $-CS-NH-$ )으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 올레핀 이중 결합 ( $-CH=CH-$ )으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 레트로 아미드 결합 ( $-NH-CO-$ )으로 치환된다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 결합은 폴리펩타이드 유도체 ( $-N(R)-CH_2-CO-$ )로 치환되며, 이때 R은 탄소 원자 상에 천연적으로 존재하는 "정상" 측쇄이다. 일부 구현예에서, 이러한 변형은 폴리펩타이드 체인에서 임의의 결합에서 이루어지며, 동시에 여러 곳(2-3개의 결합)에서 이루어진다.

[0078] 일부 구현예에서, Trp, Tyr 및 Phe와 같은 폴리펩타이드의 천연 방향족 아미노산은 페닐글리신, TIC, 나프틸렌 아닌(No1), Phe의 고리-메틸화된 유도체, Phe의 할로젠화된 유도체 또는 o-메틸-Tyr 등의 비천연 합성 산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형된 아미노산 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체(예, 지방산, 복합 탄수화물 등)를 포함한다.

[0079] 일 구현예에서, "아미노산" 또는 "아미노산 서열"은 20개의 천연 발생 아미노산; 대개 생체내에서 번역 후 변형된 아미노산, 예컨대 하이드록시프로린, 포스포세린 및 포스포트레오닌; 및 그외 비통상적인 아미노산, 예컨대, 비제한적인 예로서, 2-아미노아디프산, 하이드록시라이신, 이소데스모신, 노르발린, 노르루신 및 오르니틴을 포함하는 것으로 이해된다. 일 구현예에서, "아미노산"은 D-아미노산과 L-아미노산 양자를 포괄한다.

[0080] 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 응고 인자를 포함하는 폴리펩타이드가 가용성 형태이어야 되는 치료제로 활용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는, 이의 하이드록실-함유 측쇄로 인해 폴리펩타이드 가용성을 증가시킬 수 있는, 비제한적인 예로서 세린 및 트레오닌을 포함한, 하나 이상의 비-천연 또는 천연 극성 아미노산을 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는, 환화(cyclicization)가 조작된 응고 인자의 특징을 심각하게 간섭하지 않는 경우에, 조작된 응고 인자의 환 형태도 이용할 수 있다는 것이 당해 기술 분야의 당업자에겐 명확할 것이지만, 선형 형태로 이용된다.

[0082] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 표준 고상 기법의 이용과 같이 생화학적으로 합성된다. 일부 구현예에서, 이러한 생화학적 방법으로는 배제 고상 합성, 부분 고상 합성, 단편의 축합 또는 고전적인 용액 합성이 있다.

[0083] 일부 구현예에서, 재조합 단백질 기법을 이용하여 본 발명의 조작된 응고 인자를 제조한다. 일부 구현예에서, 재조합 단백질 기법은 비교적 긴 폴리펩타이드(예, 아미노산 18-25개 보다 긴)의 제조에 사용된다. 일부 구현예에서, 재조합 단백질 기법은 본 발명의 조작된 응고 인자를 다량 제조하는데 이용된다. 일부 구현예에서, 재조합 기법은 Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680, Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 및 Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463에 기술되어 있다.

[0084] 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-10개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-10개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-7개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2-8개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1-5개의 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[0085] 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 세포를 포함

하는 구성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 진핵 생물의 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 원핵 생물의 세포이다.

[0086] 다른 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자를 이용하여 합성한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자는, 시스-조절 서열(예, 프로모터 서열)의 전사 조절을 포함하는 발현 벡터에 삽입(ligation)된다. 일부 구현예에서, 상기 시스-조절 서열은 본 발명의 조작된 응고 인자의 구성적인 발현(constitutive expression)을 지시하는데 적합하다. 일부 구현예에서, 상기 시스-조절 서열은 본 발명의 조작된 응고 인자의 조직 특이적인 발현 지시에 적합하다. 일부 구현예에서, 상기 시스-조절 서열은 본 발명의 조작된 응고 인자의 유도성 발현의 지시에 적합하다.

[0087] 일부 구현예에서, 본 발명에 사용하기 적합한 조직-특이적인 프로모터는 특정 세포 집단에서 기능하는 서열을 포함하며, 예컨대, 비제한적인 예로서, 간 특이적인 알부민 등의 프로모터 [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프성계 특이적인 프로모터 [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; 특히 T 세포 수용체[Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] 및 면역글로불린[Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740]의 프로모터, 뉴로필라멘트 프로모터 [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477] 등의 뉴론-특이적인 프로모터, 췌장-특이적인 프로모터 [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] 또는 유장 프로모터 (미국 특허 4,873,316 및 유럽 출원 공개 번호 264,166) 등의 유선-특이적인 프로모터가 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 유도성 프로모터는 예컨대 테트라사이클린-유도성 프로모터 (Srouf, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405)를 포함한다.

[0088] 일 구현예에서, "폴리뉴클레오티드 분자"라는 표현은 RNA 서열, 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열(cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 컴포지트 폴리뉴클레오티드 서열(예, 전술한 것의 조합)의 형태로 분리 및 제공되는, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 핵산 서열을 지칭한다.

[0089] 일 구현예에서, "상보적인 폴리뉴클레오티드 서열"은 역전사효소 또는 임의의 다른 RNA 의존적인 DNA 중합효소를 이용하여 메신저 RNA의 역전사로부터 만들어지는 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 이 서열은 DNA 중합효소를 이용하여 이후에 생체내 또는 시험관내에서 증폭시킬 수 있다.

[0090] 일 구현예에서, "게놈 폴리뉴클레오티드 서열"은 염색체로부터 유래된 (분리된) 서열을 지칭하며, 염색체의 연속한 영역을 나타낸다.

[0091] 일 구현예에서, "컴포지트 폴리뉴클레오티드 서열"은 적어도 부분적으로 상보적이며 적어도 부분적으로 게놈인 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 컴포지트 서열은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 코딩에 필수적인 일부 엑손 서열 뿐만 아니라 그 사이에 있는 일부 인트론 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 인트론 서열은 다른 유전자의 것을 비롯하여 임의의 소스의 것일 수 있으며, 전형적으로 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 인트론 서열은 시스 작용하는 발현 조절 요소를 포함한다.

[0092] 일 구현예에서, 발현 및 분비 후, 신호 펩타이드는 조작된 응고 인자 전구체로부터 분리되어 성숙형의 조작된 응고 인자가 만들어진다.

[0093] 일부 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR 기법이나 또는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 다른 방법 또는 과정을 이용하여 제조한다. 일부 구현예에서, 상기 과정은 2종의 다른 DNA 서열을 연결하는 단계를 포함한다(예, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

[0094] 일 구현예에서, 조작된 응고 인자를 코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터(즉, 핵산 구조체)에 삽입하여, 재조합 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 원핵 생물에서의 복제 및 통합(integration)에 적합할 수 있도록 해주는 추가적인 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 진핵 생물에서의 복제 및 통합에 적합할 수 있도록 해주는 추가적인 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 원핵 생물과 진핵 생물 둘다에서의 복제 및 통합에 적합하게 하는 서열 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 클로닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열(예, 프로모터, 인핸서) 및 전사 및 번역 종결인자(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다.

[0095] 일 구현예에서, 다양한 원핵 생물 또는 진핵 생물 세포를 본 발명의 응고 인자를 발현시키기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 것으로는, 비제한적인 예로서, 미생물, 예컨대, 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는, 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 폴리펩타이드

코딩 서열을 포함하는, 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 토마토 모자이크 바이러스, TMV) 또는 Ti 플라스미드 등의 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템이 있다.

- [0096] 일부 구현예에서, 본 발명의 응고 인자를 발현시키기 위해 비-박테리아 발현 시스템(예, CHO 세포 등의 포유류 발현 시스템)을 사용한다. 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포에서 발현시키기 위해 사용되는 발현 벡터는, CMV 프로모터와 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 pCI-DHFR 벡터이다. 상기 pCI-dhfr 벡터의 구축은 실시예 1에서 일 실시예로 설명된다.
- [0097] 일부 구현예에서, 본 발명의 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 폴리펩타이드에 대한 의도된 용도에 따라 유리하게 선택할 수 있다. 일 구현예에서, 다량의 폴리펩타이드가 바람직하다. 일 구현예에서, 발현되는 산물을 박테리아의 원형질막 공간(periplasm)으로 또는 단백질 산물이 쉽게 정제되는 배양 배지로 향하게 하는, 가능하게는 소수성 신호 서열과의 융합체로서, 단백질 산물을 높은 수준으로 발현되게 하는 벡터가 바람직하다. 일 구현예에서, 특정 융합 단백질은 폴리펩타이드의 회수를 돕기 위해 특정 절단 부위를 구비하도록 조작된다. 일 구현예에서, 이러한 조작에 적응가능한 벡터로는, *E. coli* 발현 벡터의 pET 시리즈가 있으나, 이로 한정되지 않는다 [Studier *et al.*, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].
- [0098] 일 구현예에서, 효모 발현 시스템을 사용한다. 일 구현예에서, 구성적인 프로모터 또는 유도성 프로모터를 포함하는 다수의 벡터는 미국 특허 출원 제 5,932,447호에 기술된 바와 같이 효모에서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 효모 염색체로의 외래 DNA 서열 통합을 촉진시키는 벡터를 사용한다.
- [0099] 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 내부 리보솜 도입부(IRES)와 같은 단일 mRNA 및 프로모터-키메라 폴리펩타이드의 게놈 통합을 위한 서열로부터의 수개의 단백질의 번역을 허용하는, 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열을, 추가로 포함할 수 있다.
- [0100] 일부 구현예에서, 포유류 발현 벡터로는, 인비트로젠사로부터 입수가 가능한, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1 및 pNMT41 및 pNMT81, 프로메가사로부터 입수가 가능한 pCI, 스트라테진사로부터 입수가 가능한, pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, 크론텍사로부터 입수가 가능한 pTRES 및 이들의 유도체가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0101] 일부 구현예에서, 본 발명에서는 레트로바이러스와 같이, 진핵 생물 바이러스 유래의 조절 인자를 포함하는 발현 벡터를 사용한다. SV40 벡터로는 pSVT7 및 pMT2가 있다. 일부 구현예에서, 소 파필로마 바이러스 유래 벡터로는 pBV-1MTHA가 있으며, 엡스타인 바 바이러스 유래의 바이러스로는 pHEBO 및 p205가 있다. 다른 예시적인 벡터로는, pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMT010/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, 베클로바이러스 pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤라인 유방암 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터 또는 진핵 생물 세포에서의 발현에 유효한 것으로 입증된 그외 프로모터의 지시 하에, 단백질의 발현을 허용하는, 임의의 다른 벡터가 있다.
- [0102] 일부 구현예에서, 재조합 바이러스 벡터는 측면 감염(lateral infection) 및 타겟팅 특이성과 같은 이점을 제공하기 때문에, 본 발명의 응고 인자의 생체내 발현을 위해 사용가능하다. 일 구현예에서, 측면 감염은 예컨대 레트로바이러스의 생화 주기에 선천적이며, 감염된 단일 세포가 발아되어 이웃한 세포를 감염시키는 자손 비리온을 만들어내는 프로세스이다. 일 구현예에서, 이러한 결과 넓은 영역이 급속하게 감염되게 되며, 대부분은 처음에 오리지날 바이러스 입자에 의해 감염되지 않았다. 일 구현예에서, 측면으로 전파할 수 없는 바이러스 벡터를 제조한다. 일 구현예에서, 이러한 특징은, 원하는 목적이 국한된 수의 타겟 세포만에 명시된 유전자를 도입하는 것인 경우에, 사용할 수 있다.
- [0103] 일 구현예에서, 다양한 방법을 이용하여 본 발명의 발현 벡터를 세포내로 도입할 수 있다. 이러한 방법들은 일반적으로 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang *et al.*, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega *et al.*, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 및 Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예컨대, 안정적인 또는 일시적인 형질감염, 리포펙션, 전기충격 및 재조합 바이러스 벡터로의 감염을 포함한다. 또한, 파지티브-네거티브 선별 방법에 대해 미국 특허 5,464,764 및 5,487,992를 참조한다.
- [0104] 일부 구현예에서, 바이러스 감염에 의한 핵산의 도입은, 바이러스의 감염성 특성으로 인해 형질감염 효율이 더



높기 때문에, 리포펙션 및 전기충격과 같은 다른 방법 보다 몇가지 이점을 제공한다.

- [0105] 일 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 또한 전술한 임의의 적합한 투여 방식(즉, 생체내 유전자 요법)을 채택하여 개체에게 투여되는 핵산 구조체로부터 발현될 수 있음이 자명할 것이다. 일 구현예에서, 핵산 구조체는 적절한 유전자 전달 비히클/방법(형질감염, 형질전이, 상동성 재조합 등)과 필요에 따라서는 발현 시스템을 통해 적절한 세포에 도입한 다음, 변형된 세포를 배양을 통해 증폭시키고 개체에게로 다시 복귀시킨다(즉, 생체의 유전자 요법).
- [0106] 일 구현예에서, 식물 발현 벡터를 이용한다. 일 구현예에서, 폴리펩타이드 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터에 의해 작동시킨다. 일부 구현예에서, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터들 [Brisson *et al.*, Nature 310:511-514 (1984)], 또는 TMV의 막 단백질 프로모터 [Takamatsu *et al.*, EMBO J. 6:307-311 (1987)] 등의 바이러스 프로모터를 사용한다. 다른 구현예에서, 예컨대, RUBISCO의 소형 서브유닛 [Coruzzi *et al.*, EMBO J. 3:1671-1680 (1984); 및 Brogli *et al.*, Science 224:838-843 (1984)] 또는 열 충격 프로모터, 예컨대 soybean hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B [Gurley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]와 같은 식물 프로모터를 사용한다. 일 구현예에서, 구조체는 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접 DNA 형질전환, 미세 주입, 전기충격 및 그의 당업자에게 잘 공지된 기법을 이용하여 식물 세포에 도입한다. 예로, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]를 참조한다. 곤충 및 포유류 숙주 세포 시스템과 같이 당해 기술 분야에 잘 공지된 다른 발현 시스템을 역시 본 발명에서 사용할 수 있다.
- [0107] 삽입된 코딩 서열(폴리펩타이드 코딩 서열)의 전사 및 번역에 필수적인 요소를 포함하는 것 이외에도, 본 발명의 발현 구조체는 또한 발현된 폴리펩타이드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 활성을 최적화하기 위한 조작된 서열을 포함할 수 있음은 자명할 것이다.
- [0108] 일부 구현예에서, 숙주 세포 시스템에 본 발명의 발현 벡터를 도입하기 위해 다양한 방법들을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 방법들은 일반적으로 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang *et al.*, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega *et al.*, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 및 Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예컨대 안정적인 또는 일시적인 형질감염, 리포펙션, 전기충격 및 재조합 바이러스 벡터에 의한 감염을 포함한다. 또한, 파지티브-네거티브 선별 방법에 대해 미국 특허 5,464,764 및 5,487,992를 참조한다.
- [0109] 일부 구현예에서, 형질전환된 세포는, 재조합 조작된 응고 인자를 다량 발현시킬 수 있는, 유효한 조건 하에 배양한다. 일부 구현예에서, 유효한 배양 조건은, 비제한적인 예로서, 단백질 생산을 허용하는 유효 배지, 생물 반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함한다. 일 구현예에서, 유효 배지는 세포를 배양하여 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 생산하는 임의의 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, 배지는 전형적으로 동화가능한 탄소원, 질소원 및 인원, 및 적절한 염, 미네랄, 금속 및 비타민 등의 그의 영양분을 포함하는 수용액이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 세포는 기존의 발효 생물반응기, 교반 플라스크, 시험관, 마이크로타이터 디쉬 및 페트리 플레이트에서 배양할 수 있다. 일부 구현예에서, 배양은 재조합 세포에 적합한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행한다. 일부 구현예에서, 배양 조건은 당해 기술 분야의 당업자의 지식내에 포함된다.
- [0110] 일부 구현예에서, 생산에 사용되는 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 본 발명의 제조되는 조작된 응고 인자는 재조합 세포 내부에 체류하거나, 발효 배지로 분비되거나, *E. coli*와 같이 페리플라스믹 공간 등의 2개의 세포막 사이 공간으로 분비되거나 또는 세포막이나 바이러스 막의 외표면 상에 유지된다.
- [0111] 일 구현예에서, 미리 결정된 시간동안 배양한 후, 재조합 조작된 응고 인자의 회수를 실시한다.
- [0112] 일 구현예에서, "재조합 조작된 응고 인자 회수"라는 표현은 본원에서 폴리펩타이드를 함유한 전체 발현 배지를 수집하는 것을 지칭하며, 추가적인 분리 또는 정제 단계를 내포하지 않아도 된다.
- [0113] 일 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 비제한적인 예로서 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘 카나발린 A 크로마토그래피, 크로마토포커싱 및 차별 가용화 등의 다양한 표준 단백질 정제 기법을 이용하여 정제한다.

- [0114] 일 구현예에서, 용이한 회수를 위해, 발현된 코딩 서열은 본 발명의 조작된 응고 인자 및 융합된 절단성 모이어티를 코딩하도록 조작할 수 있다. 일 구현예에서, 융합 단백질은, 폴리펩타이드를 친화성 크로마토그래피, 예컨대 절단가능한 모이어티에 대해 특이적인 컬럼 상에서의 고정화에 의해 쉽게 분리할 수 있도록, 설계할 수 있다. 일 구현예에서, 절단성 부위는 조작된 응고 인자와 절단가능한 모이어티 사이에서 조작되며, 폴리펩타이드는 그 부위에서 융합 단백질을 특이적으로 절단시키는 적합한 효소나 제제를 처리함으로써 크로마토그래피 컬럼으로부터 분리시킬 수 있다 [예, Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); and Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].
- [0115] 일 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 "실질적으로 순수한" 형태로 회수된다.
- [0116] 일 구현예에서, "실질적으로 순수한"이라는 표현은 본원에 기술된 출원들에서 단백질의 유효한 사용이 가능한 순도를 지칭한다.
- [0117] 일 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 또한 시험관내 발현 시스템을 이용하여 합성할 수 있다. 일 구현예에서, 시험관내 합성 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 시스템의 구성들은 상업적으로 입수가능하다.
- [0118] 일부 구현예에서, 재조합 조작된 응고 인자를 합성하고 정제하며, 이의 치료 효능은 생체내 또는 시험관내에서 분석할 수 있다. 일 구현예에서, 재조합 조작된 응고 인자의 결합 활성은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 다양한 분석을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0119] 다른 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 그 자체로 개체에게 제공될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 조작된 응고 인자는 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는, 약학 조성물의 일부로서 개체에게 제공될 수 있다.
- [0120] 다른 구현예에서, "약학 조성물"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제 등의 다른 화학 성분과 함께 본원에 기술된 활성 성분 하나 이상으로 구성된 조제물을 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 유기체에 화합물의 투여를 쉽게 하기 위한 것이다.
- [0121] 다른 구현예에서, "활성 성분"은 생물학적 효과를 담당하는 대상 폴리펩타이드 서열을 지칭한다.
- [0122] 다른 구현예에서, 본 발명의 임의의 조성물들은 임의의 형태로 조작된 대상 응고 인자의 카르복시 말단에만 결합된 하나 이상의 CTP 서열을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 본 발명은 조합된 조제물을 제공한다. 일 구현예에서, "조합된 조제물"은, 특히 전술한 조합 파트너를 독립적으로 투여하거나 또는 상당량의 조합 파트너와의 여러가지 고정된 조합물들을 즉 동시에, 공동으로, 개별적으로 또는 순차적으로 사용함으로써 투여하는 의미에서, "부품 키트(kit of parts)"로 구성된다. 일부 구현예에서, 그런 후, 부품 키트의 구성 요소들을 예컨대 동시에, 또는 연대적 시차적으로(chronologically staggered), 즉, 여러가지 시간대에, 부품 키트를 구성하는 임의의 구성 요소에 대해 동일한 또는 상이한 시간 간격으로 투여할 수 있다. 조합 파트너의 총량의 비율은, 일부 구현예에서, 조합된 조제물로 투여할 수 있다. 일 구현예에서, 조합된 조제물은, 예컨대, 당해 기술 분야의 당업자에게 자명할 수 있는 바와 같이, 특정 질환, 질환의 중증도, 연령, 성별 또는 체중으로 인해, 치료받을 환자 서브집단의 필요 또는 단일 환자의 필요를 충족시키기 위해, 변경가능하다.
- [0123] 다른 구현예에서, "생리적으로 허용가능한 담체" 및 "약학적으로 허용가능한 담체"라는 표현은 상호 호환적으로 유기체에 유의한 자극을 야기하지 않으며, 투여된 화합물의 생물 활성 및 특성을 방해하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보강제도 이러한 표현에 해당된다. 일 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체에 포함되는 성분들 중 한가지는, 예컨대 유기 매질과 수성 매질 둘다에 광범위한 용해성을 가진 생체친화적인 폴리머인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다 (Mutter *et al.* (1979)).
- [0124] 다른 구현예에서, "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 쉽게 할 수 있도록 하기 위해 약학 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 지칭한다. 일 구현예에서, 부형제는 칼슘 카보네이트, 세슘 포스페이트, 다양한 당류 및 전분 타입들, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0125] 약물의 제형화 및 투여 기법들은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾아볼 수 있으며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0126] 다른 구현예에서, 적정 투여 경로는, 예컨대, 경구, 직장, 경점막, 경비, 장 또는 비경구 전달, 예컨대 근육내, 피하 및 골수강내(intramedullary) 주입 뿐만 아니라 강내(intrathecal), 직접 뇌실내(intraventricular), 정

맥내, 복막내, 코내 또는 안내 주입을 포함한다.

- [0127] 다른 구현예에서, 조제물은 전신 방식 보다는 국소로, 예컨대 환자 신체의 특정 부위에 직접 조제물을 조사함으로써 국소로 투여한다.
- [0128] 본 발명은 다양한 용량 범위의 구현예들을 포괄한다. 본 발명의 조작된 응고 인자의 투여량은, 일 구현예에서, 0.005-100 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.005-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-20 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-10 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.01 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.1 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.5-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.2-15mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.8-65 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 8-15 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-20mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 20-40 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 60-120 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 12-40 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 40-60 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50-100mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-60 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 15-25 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 55-65 mg/day의 범위이다.
- [0129] 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 코내 투약 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 주사용 투약 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.0001 mg - 0.6 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.001 mg - 0.005 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.005 mg - 0.01 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.01 mg - 0.3 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.2 mg - 0.6 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자는 이의 아미노 말단에 CTP가 존재하지 않는다.
- [0130] 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 1-100 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 10-80 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 20-60 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 10-50 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 40-80 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0-30 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 30-60 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다.
- [0131] 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 0.2 mg - 2 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 2 mg - 6 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 4 mg - 10 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 5 mg -15 mg 범위의 투여량으로 개체에게 투여된다.
- [0132] 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 근육내 주입된다(근육내 주입). 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 피하 주입된다(피하 주입). 다른 구현예에서, IFN 단백질 및 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 근육내로 주입된다. 다른 구현예에서, IFN 단백질 및 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 피하로 주입된다.
- [0133] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 응고 인자, 상기 응고 인자의 아미노 말단에 부착된 하나의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드(CTP) 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 2개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 포함하는 펩타이드를, 이를 필요로 하는 개체에게 제공하여, 응고 인자 요법의 이용

순응성을 증가시키는, 응고 인자 요법의 이용 순응성을 증가시키는 단계를 포함한다.

- [0134] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 응고 인자 요법이 필요한 만성 질환에 걸린 환자의 순응성을 높이는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 후술되는 바와 같이 응고 인자를 CTP를 부가하여 변형시킴으로써 응고 인자의 투약 빈도를 낮출 수 있다. 다른 구현예에서, 용어 순응성은 엄수이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 응고 인자의 투여 횟수를 줄이므로써 응고 인자 요법이 필요한 환자의 순응성을 높이는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 응고 인자의 투여 횟수 감소는 CTP-변형된 응고 인자를 보다 안정하게 하는 CTP 변형으로 달성된다. 다른 구현예에서, 응고 인자의 투여 횟수 감소는 응고 인자의 T1/2 증가의 결과로서 달성된다. 다른 구현예에서, 응고 인자의 투여 횟수 감소는 응고 인자의 소거 시간 증가의 결과로서 달성된다. 다른 구현예에서, 응고 인자의 투여 횟수 감소는 응고 인자의 AUC 측정치 증가의 결과로서 달성된다.
- [0135] 다른 구현예에서, 1 내지 10개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자의 투여 횟수가 감소되는, 응고 인자의 투여 횟수를 줄이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 1 내지 5개의 CTP를 응고 인자의 카르복시 말단에 부착시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자의 투여 횟수가 감소되는, 응고 인자의 투여 횟수를 줄이는 방법을 제공한다.
- [0136] 다른 구현예에서, 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 10개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 이를 필요로하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자 요법의 사용에 대한 순응성을 높이는, 응고 인자 요법의 사용에 대한 순응성을 높이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 응고 인자 및 응고 인자의 카르복시 말단에 부착된 1 내지 5개의 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드를 이를 필요로하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 그에 따라 응고 인자 요법의 사용에 대한 순응성을 높이는, 응고 인자 요법의 사용에 대한 순응성을 높이는 방법을 제공한다.
- [0137] 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 1일 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 2일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 3일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 4일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 5일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 6일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 7-14일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 10-20일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 5-15일 마다 1회로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 응고 인자와 하나 이상의 CTP 유닛을 포함하는 폴리펩타이드는 15-30일 마다 1회로 개체에게 투여된다.
- [0138] 다른 구현예에서, 투여량은 50-500 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50-150 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 100-200 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 150-250 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 200-300 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 250-400 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 300-500 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 350-500 mg/day이다.
- [0139] 일 구현예에서, 투여량은 20 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 30 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 40 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 50 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 0.01 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.530 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.05 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 20-70 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5 mg/day.
- [0140] 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/2일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/3일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/4일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/5일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/6일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/9일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/11일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/14일이다.
- [0141] 다른 구현예에서, 응고 인자 투여량은 10-50 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/2일이다. 다른



구현예에서, 투여량은 10-50 mg/3일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/4일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/5일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/6일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/9일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/11일이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/14일이다.

[0142] 경구 투여는, 일 구현예에서, 정제, 캡슐제, 로젠제(lozenges), 씹어먹는 정제, 현탁제, 에멀전제 등을 포함하는 단위 투약 형태를 포함한다. 이러한 단위 투약 형태는 본 발명의 바람직한 응고 인자를 안전하고 유효한 양으로 포함하며, 이는 일 구현예에서, 약 0.7 또는 3.5 mg - 약 280 mg/70 kg이고, 또는 다른 구현예에서, 약 0.5 또는 10 mg - 약 210 mg/70 kg이다. 경구용 투여를 위한 단위 투약 형태의 제조에 적합한 약학적으로 허용 가능한 담체는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 정제는 통상적으로 칼슘 카보네이트, 소듐 카보네이트, 만니톨, 락토스 및 셀룰로스 등의 비활성 희석제; 전분, 젤라틴 및 슈크로스 등의 결합제; 전분, 알긴산 및 크로스카멜로스 등의 붕해제; 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 및 탈크 등의 윤활제와 같이 통상적인 약학적으로 상용가능한 보강제를 포함한다. 일 구현예에서, 분말-혼합물의 유도 특징을 개선시키기 위해 실리콘 다이옥사이드 등의 유동성 개선제(glidant)를 사용한다. 일 구현예에서, 착색제, 예컨대 FD&C 염료를 외양상 첨가할 수 있다. 아스파르탐, 사카린, 멘톨, 페퍼민트 및 과일향과 같은 감미제 및 향제를 씹어먹는 정제에 대한 유용한 보강제이다. 캡슐제는 전형적으로 전술한 하나 이상의 고형 희석제를 포함한다. 일부 구현예에서, 담체 성분의 선택은, 본 발명의 목적에 있어 중요한 것은 아니지만, 당해 기술 분야의 당 맛, 비용 및 저장 안정성과 같은 부차적인 고려 사항에 따라 결정되며, 당해 기술 분야의 당업자가 용이하게 실시할 수 있다.

[0143] 일 구현예에서, 경구 투약 형태는 미리 결정된 방출 프로파일을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 지속 방출 정제(extended release tablet), 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 서방형 정제, 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 즉시 방출 정제, 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 경구 투약 형태는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 바와 같이 약학 활성 성분의 원하는 방출 프로파일에 따라서 제형화한다.

[0144] 경구 조성물(Peroral composition)은, 일부 구현예에서, 액체 용액, 에멀전, 현탁제 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물의 제조에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 액체 경구 조성물은 바람직한 화합물 또는 화합물들을 약 0.001% 내지 약 0.933%, 또는 다른 구현예에서, 약 0.01% 내지 약 10 %로 포함한다.

[0145] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물은 용액 또는 에멀전이며, 일부 구현예에서는 본 발명의 화합물의 안전한 유효량과, 선택적으로 국소 코내 투여용으로 의도된 그외 화합물을 포함하는 수계 용액 또는 에멀전을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 대상 화합물을 약 0.001% 내지 약 10.0% w/v로, 더 바람직하게는, 약 0.1% 내지 약 2.0로 포함하며, 이는 코내 경로에 의한 화합물의 전신 전달용으로 사용된다.

[0146] 다른 구현예에서, 약학 조성물은 액체 조제물의 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주입에 의해 투여한다. 일부 구현예에서, 액체 제형은 용액제, 현탁제, 분산제, 에멀전제, 오일 등을 포함한다. 일 구현예에서, 약학 조성물은 정맥내로 투여하며, 따라서 이는 정맥내 투여에 적합한 형태로 제형화한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 동맥내로 투여하며, 따라서 이는 동맥내 투여에 적합한 형태로 제형화한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 근육내로 투여하며, 따라서 이는 근육내 투여에 적합한 형태로 제형화한다.

[0147] 추가적으로, 다른 구현예에서, 약학 조성물은 신체 표면에 국소 투여하며, 따라서 이는 국소 투여에 적합한 형태로 제형화한다. 적합한 국소 제형으로는 겔제, 연고제, 크림제, 로션제, 점적제 등이 있다. 국소 투여를 위해서, 본 발명의 화합물을, 약학적 담체가 첨가 또는 무첨가된, 생리적으로 허용가능한 희석제 중의 용액제, 현탁제 또는 에멀전으로서 제조 및 적용되는, 추가적인 적합한 치료 제제 또는 제제들과 조합한다.

[0148] 일 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 당해 기술 분야에 공지된 프로세스들, 예컨대 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조, 레비게이션(levigating), 에멀전화, 캡슐화, 포집화(entrapping) 또는 동결건조 프로세스의 수단에 의해 제조한다.

[0149] 일 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은, 약학적으로 사용할 수 있는 조제물로 활성 성분들을 가공하는 과정을 돕는, 부형제 및 보조제를 포함하는, 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체를 이용하여, 통상적인 방식으로 제형화한다. 일 구현예에서, 제형은 선택한 투여 경로에 따라 결정된다.

- [0150] 일 구현예에서, 본 발명의 주사제(injectable)는 수용액으로 제형화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 주사제는 헵크 용액, 링거 용액 또는 생리 염 완충액 등의 생리적으로 상용가능한 완충액 중에서 제형화된다. 일부 구현예에서, 경점막 투여를 위해서는, 투여되는 장벽에 적합한 침투제를 제형에 사용한다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- [0151] 일 구현예에서, 본원에 기술된 조제물은 비경구 투여용으로, 예컨대 볼루스 주입 또는 연속 주입에 의한 용도로 제형화된다. 일부 구현예에서, 주입용 제형은, 단위 투약 형태, 예컨대 앰플, 또는 다회 투여(multidose) 용기 내로, 선택적으로 첨가된 보존제와 함께, 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 오일성 또는 수계 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전이며, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산화제와 같은 제형성 제제(formulatory agent)를 포함한다.
- [0152] 또한, 조성물은, 벤즈알코늄 클로라이드 및 티메로살 등과 같은 보존제; 에디테이트 소듐 등의 킬레이트제; 포스페이트, 시트레이트 및 아세테이트 등의 완충액; 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 글리세린, 만니톨 등의 긴장성 제제(tonicity agent); 아스코르브산, 아세틸시스틴, 소듐 메타바이설포에이트 등의 항산화제; 방향성 제제; 셀룰로스 및 이의 유도체 등의 폴리머와 같은 점성 조절제; 및 폴리비닐 알코올 및 필요에 따라 이들 수계 조성물의 pH를 조절하기 위한 산과 염기를 포함한다. 또한, 조성물은, 일부 구현예에서, 국소 마취제 또는 그의 활성제를 포함한다. 조성물은 스프레이, 미스트, 점액제 등으로 사용할 수 있다.
- [0153] 일부 구현예에서, 비경구 투여용 약학 조성물은 활성 수용성 형태인 활성 조제물의 수용액을 포함한다. 추가적으로, 활성 성분의 현탁액, 일부 구현예에서, 적절한 오일 또는 수(water) 기반의 주입 현탁물로서 제조된다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클로서, 일부 구현예에서, 참기름과 같은 지방 오일, 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜 등의 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주입 현탁액은, 일부 구현예에서, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란 등의, 현탁물의 점성을 증가시키는 물질을 함유한다. 다른 구현예에서, 현탁액은 또한 고도로 농축된 용액을 제조할 수 있도록 활성 성분들의 용해성을 증가시키는 적정 안정화제 또는 물질을 포함한다.
- [0154] 다른 구현예에서, 활성 화합물은 비히클, 특히 리포솜으로 전달할 수 있다(Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*).
- [0155] 다른 구현예에서, 조절된 방출 시스템(controlled release system)으로 전달되는 약학 조성물은 정맥내 주입, 이식가능한 삼투성 펌프, 경피 패치, 리포솜 또는 그의 투여 방식용으로 제형화한다. 일 구현예에서, 펌프가 사용될 수 있다 (Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989) 참조). 다른 구현예에서, 폴리머성 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 조절된 방출 시스템은 치료 타겟, 즉 뇌 근처에 위치시킬 수 있으며, 그에 따라 전신 투여량 중 일부만 필요할 수 있다(예, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 조절된 방출 시스템에 대해 Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990))가 검토하였다.
- [0156] 일부 구현예에서, 활성 성분은 사용하기 전에 적정 비히클, 예컨대, 살균, 발열원-제거된 수계 용액을 이용하여 만들기 위한 분말 형태이다. 조성물은, 일부 구현예에서, 미립자화 및 흡입 투여용으로 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 미립자화 수단이 장착된 용기에 수용된다.
- [0157] 일 구현예에서, 본 발명의 조제물은 예컨대 코코아 버터 또는 그의 글리세라이드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 이용하여 좌제나 정제 관장제(retention enemas) 등의 직장 조성물로 제형화된다.
- [0158] 일부 구현예에서, 본 발명의 측면에 사용하기 적합한 약학 조성물은, 활성 성분들이 의도한 목적을 달성하는데 유효한 양으로 포함된 조성물을 포함한다. 일 구현예에서, 치료학적 유효량은 치료 중인 개체의 질환 증상을 예방, 경감 또는 개선시키거나 또는 생존을 연장시키는데 유효한 활성 성분의 양을 의미한다.
- [0159] 일 구현예에서, 치료학적 유효량의 결정은 당해 기술 분야의 당업자의 능력내에서 충분히 이루어진다.
- [0160] 약학적으로 허용가능한 담체 또는 이의 구성 성분으로서 제공할 수 있는 물질의 일부 예는, 락토스, 글루코스 및 슈크로스 등의 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분 등의 전분류; 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 메틸 셀룰로스 등의 셀룰로스 및 이의 유도체; 트라가칸트 분말; 말트; 젤라틴; 탈크; 스테아르산 및 마그네슘

스테아레이트 등의 고휘 윤활제; 칼슘 설페이트; 땅콩 오일, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 테오브로마 오일 등의 식물성 오일; 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리올; 알긴산; 트윈 상품의 유화제 등의 유화제; 소듐 라우릴 설페이트 등의 습윤제(wetting agent); 착색제; 향제; 타정제(tableting agent), 안정화제; 향산화제; 보존제; 발열원-결핍 수; 등장 염수; 및 포스페이트 완충 용액이다. 화합물과 함께 사용하기 위한 약학적으로 허용가능한 담체의 선택은, 기본적으로는, 화합물의 투여 방식에 따라 결정한다. 만일 대상 화합물을 주입하고자 한다면, 일 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체는, 혈액-친화적인 현탁화제가 첨가된 살균, 생리학적 염수이며, 이의 pH는 약 7.4로 조정된 것이다.

[0161] 아울러, 조성물은, 추가적으로, 결합제(예, 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴, 카보머, 에틸 셀룰로스, 구아르검, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스, 포비돈), 붕괴제(예, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 실리콘 다이옥사이드, 크로스카르멜로스 소듐, 크로스포비돈, 구아르검, 소듐 전분 글리콜레이트), pH와 이온 세기가 다양한 완충액(예, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), 표면 측수를 방지하기 위한 알부민 또는 젤라틴 등의 첨가제, 디터전트(예, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, 담즙산염), 프로테아제 저해제, 계면활성제(예, 소듐 라우릴 설페이트), 투과 강화제(permeation enhancer), 가용화제(예, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜), 향산화제(예, 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트, 부틸화된 하이드록시아니솔), 안정화제(예, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 점성 증가제(예, 카보머, 콜로이드형의 실리콘 다이옥사이드, 에틸 셀룰로스, 구아르검), 감미제(예, 아스파르탐, 시트르산), 보존제(예, 티메로살, 벤질 알코올, 파라벤), 윤활제(예, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트), 유동-보조제(flow-aid)(예, 콜로이드형 실리콘 다이옥사이드), 가소화제(예, 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트), 유화제(예, 카보머, 하이드록시프로필 셀룰로스, 소듐 라우릴 설페이트), 폴리머 코팅제(예, 폴록사머 또는 폴록사민), 코팅 및 막 형성제(예, 에틸 셀룰로스, 아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트) 및/또는 보강제를 포함한다.

[0162] 시럽제, 엘릭서제, 에멀전제 및 현탁제에 대한 전형적인 담체 성분들로는 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 슈크로스, 소르비톨 및 물을 포함한다. 현탁액의 경우, 전형적인 현탁화제로서 메틸 셀룰로스, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 셀룰로스(예, Avicel™, RC-591), 트라가칸트 및 소듐 알기네이트를 포함하며; 전형적인 습윤제로서 레시틴 및 폴리에틸렌 옥사이드 소르비탄(예, 폴리소르베이트 80)을 포함한다. 전형적인 보존제로는 메틸 파라벤 및 소듐 벤조에이트를 포함한다. 다른 구현예에서, 경구 액체 조성물은 또한 진술한 감미제, 향제 및 착색제 등의 하나 이상의 성분들을 포함한다.

[0163] 조성물은 또한 폴리락타산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등의 폴리머성 화합물의 미립자 조제물 내부 또는 상으로, 또는 리포솜, 마이크로에멀전, 마이셀, 유니라멜라 또는 멀티라멜라 비히클, 에리트로사이트 고스트 또는 스페로플라스트 상으로의, 활성 물질의 합체를 포함한다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해성, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 소거율에 영향을 미칠 것이다.

[0164] 또한, 본 발명은 폴리머(예, 폴록사머 또는 폴록사민)로 코팅된 미립자 조성물 및 조직-특이적인 수용체, 리간드 또는 항원에 대한 항체와 커플링되거나 조직-특이적인 수용체의 리간드와 커플링된 화합물을 포괄한다.

[0165] 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜-폴리프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리프로린 등의 수용성 폴리머의 공유 결합에 의해 화합물을 변형시킨다. 다른 구현예에서, 변형된 화합물은 대응되는 비변형된 화합물 보다는 정맥내 주입 후 실질적으로 연장된 혈중 반감기를 보인다. 일 구현예에서, 변형은 또한 화합물의 수용액 용해성을 증가시키고, 응집을 해소시키고, 화합물의 물리적 안정성과 화학적 안정성을 강화시키고, 화합물의 면역원성과 반응성을 크게 감소시킨다. 다른 구현예에서, 바람직한 생체내 생물 활성은, 이러한 폴리머-화합물 앵덕트(abduct)를 비변형된 화합물 보다 낮은 빈도로 또는 낮은 투여량으로 투여함으로써, 달성한다.

[0166] 일부 구현예에서, 유효량 또는 투여량의 조제는 시험관내 분석으로 먼저 추정할 수 있다. 일 구현예에서, 투여량은 동물 모델에서 공식화될 수 있으며, 이러한 정보는 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하는데 사용할 수 있다.

[0167] 일 구현예에서, 본원에 기술된 활성 성분들의 독성 및 치료 효능은 시험관내, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준적인 약학적 공정에 의해 측정할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 시험관내 및 세포 배양 분석 및 동물 실험으로부터 수득한 데이터는 인간에게 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화하는데 이용할 수 있다. 일 구현예에서, 투여량은 채택되는 투약 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 달라진다. 일 구현예에서, 실제 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태에 비추어 개개 의사가 선택할 수 있다[예, Fingl, et al., (1975) "The

Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

- [0168] 일 구현예에서, 치료할 증상의 중증도 및 반응성에 따라, 투약은 1회 투여 또는 다회 투여일 수 있으며, 치료 기간은 수일 내지 수개월이거나, 또는 치유가 질환 상태에 영향을 미치거나 감소시킬 때까지 달성된다.
- [0169] 일 구현예에서, 투여할 조성물의 양도 역시 치료 중인 개체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방의의 판단에 따라 결정될 것이다.
- [0170] 일 구현예에서, 상용가능한 약학 담체 중에 제형화된 본 발명의 조제물 등의 조성물은, 또한, 제조하여, 적정 용기에 넣고, 치료 지시 증상을 표시한다.
- [0171] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자는 전신 투여를 통해 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자는 정맥내, 근육내 또는 피하 주입에 의해 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자는 비이온성 계면 활성 제제(즉, 계면활성제), 다양한 당류, 유기 폴리올 및/또는 인간 혈청 알부민과 같은 컴플렉스 유기 부형제 및 안정화제와 조합된 동결건조된(즉, 동결-건조된) 조제물이다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균수내에 기술된 동결건조된 응고 인자를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균 PBS내에 기술된 동결건조된 응고 인자를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균 0.9% NaCl내에 기술된 동결건조된 응고 인자를 포함한다.
- [0172] 다른 구현예에서, 약학 조성물은, 본원에 기술된 응고 인자와, 인간 혈청 알부민, 폴리올, 당류 및 음이온성 계면 활성 안정화제 등의 컴플렉스 담체를 포함한다. 예로, WO 89/10756 (Hara et al.- containing polyol and p-hydroxybenzoate)을 참조한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 응고 인자, 락토바이온산(lactobionic acid) 및 아세테이트/글리신 완충액을 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 응고 인자와 인터페론 조성물의 수 용해성을 높이는 아미노산, 예컨대 아르기닌 또는 글루타메이트를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은, 본원에 기술된 동결건조된 응고 인자와, 글리신 또는 인간 혈청 알부민(HSA), 완충액(예, 아세테이트) 및 등장성 제제(예, NaCl)를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 동결건조된 응고 인자와 포스페이트 완충액, 글리신 및 HSA를 포함한다.
- [0173] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 pH 약 4 - 7.2의 완충화된 용액 중에 두었을 때 안정화된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 안정화제로서 아미노산, 일부 경우에 염(아미노산에 하전된 측쇄가 없는 경우)을 이용하여 안정화시킨다.
- [0174] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 아미노산 안정화제를 약 0.3% 내지 5%로 포함하는 액체 조성물이다.
- [0175] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 투약 정확성 및 산물 안전성을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 주입 적용에 사용하기 위한 생물학적으로 활성형이고, 안정적인 액체 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 비-동결건조된 응고 인자를 포함한다.
- [0176] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 투여하기 전에 저장 및 수송에 용이한 액체 상태로 장기간 동안 저장할 수 있는 액체 제형을 제공한다.
- [0177] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 매트릭스 물질로서 고상 지질을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 주입용 약학 조성물은 매트릭스 물질로서 고상 지질을 포함한다. 다른 구현예에서, 분무 응결(spray congealing)에 의한 액체 미세입자의 제조에 대해서는 Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54)에 의해 기술되었으며, 경구 투여용 액체 나노펠렛에 대해 기술되어 있다 (Speiser EP 0167825 (1990)). 다른 구현예에서, 사용되는 지질은 신체에 잘 허용된다(예, 비경구 영양용 에멀전에 존재하는 지방산으로 구성된 글리세라이드).
- [0178] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 리포솜 형태이다 (J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).
- [0179] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물을 미세입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 주입용 약학 조성물은 폴리머성 미세입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 나노입자를 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 리포솜을 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 지질 에멀전을 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은



마이크로스피어를 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 지질 나노입자를 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 양쪽성 지질 (amphiphilic lipid)을 포함하는 지질 나노입자를 구성한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 응고 인자를 포함하는 약학 조성물은 약물, 지질 매트릭스 및 계면활성제를 포함하는 지질 나노입자를 구성한다. 다른 구현예에서, 지질 매트릭스는 50% w/w 이상으로 모노글리세라이드를 포함한다.

[0180] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 팩 또는 분배 장치, 예컨대 FDA 승인된 키트로 제공되며, 여기에는 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 단위 투약 형태가 포함된다. 일 구현예에서, 팩은 예컨대 블리스터 팩 등의 금속 또는 플라스틱 호일로 구성된다. 일 구현예에서, 팩 또는 분배 장치는 투여 설명서를 수반한다. 일 구현예에서, 팩 또는 분배기는 약제의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관으로부터 지정된 형태로 용기에 조합된 고지를 수반하며, 고지는 조성물의 형태 또는 인간이나 수의학적 투여 기관에 의한 인가를 나타낸다. 이러한 고지는, 일 구현예에서, 처방약에 대한 미국 식의약청에 의해 승인된 표시이거나 또는 승인된 제품 인서트 (product insert)에 대한 고지이다.

[0181] 일 구현예에서, 본 발명의 응고 인자는 각 제제 자체에 의해 치료와 비교하여 개선된 치료학적 효과를 달성하기 위해, 추가적인 활성 제제와 함께 개체에게 제공할 수 있다. 다른 구현예에서, 병용 요법(combination therapy)과 관련있는 부작용에 대해 조치를 취한다.

[0182] 본 발명의 추가적인 목적, 이점 및 새로운 특징들은 한정하고자 하는 의도가 아닌 후술된 실시예의 수행시 당해 기술 분야의 당업자에게 명확해질 것이다. 즉, 상기에서 논의되고 하기 청구항 부분에서 청구된 본 발명의 각각의 다양한 구현예들과 측면들은 후술된 실시예로부터 실험적으로 뒷받침된다.

#### [0183] 실시예

[0184] 일반적으로, 본원에서 사용되는 명칭과 본원에서 이용되는 실험 공정들은 분자, 생화학, 미생물 및 재조합 DNA 기법들을 포함한다. 이러한 기법들은 문헌들에 잘 기술되어 있다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에 기술된 방법들; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)을 참조하며, 이용가능한 면역분석법들은 특허 및 과학 문헌, 예컨대, 미국 특허 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521에 광범위하게 기술되어 있으며; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)을 참조하며, 이들 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 그외 일반적인 참조문헌들도 이러한 문서에 전반적으로 제시되어 있다.

#### 도면의 간단한 설명

[0185] 도 1은 rFVII-CTP 구조체 (A), rFVII-CTP-CTP 구조체 (B), rFIX-CTP 구조체 (C), 및 rFIX-CTP-CTP 구조체 (D)를 나타낸 도면이다.

도 2A는 비타민 K3 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 존재 하에 제한 희석 형질감염시키고 선별한 FVII-CTP 변형체들의 수확물을 나타

낸 막대 그래피이다. FVII의 수준은 FVII Elisa (AssayPro)를 이용하여 정량하였다.

도 2B는 비타민 K3 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 존재 하에 제한 희석 형질감염시키고 선별한 FVII-CTP 변형체들의 수확물을 나타낸 막대 그래피이다. FVII 활성은 FVII 발색 활성 분석 (AssayPro)을 이용하여 정량하였다.

도 2C는 비타민 K3 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 존재 하에 제한 희석 형질감염시키고 선별한 FVII-CTP 변형체들의 수확물을 나타낸 막대 그래피이다. FVII의 비활성(specific activity)은 활성 수치를 수득한 FVII 농도로 나누어 각 버전에 대해 계산하였다.

도 2D는 정상적인 풀(pool) 인간 혈장의 응고 활성 대비, FVII, FVII-CTP 및 FVII-(CTP)<sub>2</sub> 응고 활성을 가진, 제한 희석 형질감염시키고 선별한 세포의 수확물을 나타낸 그래프이다.

도 2E는 FVII, FVII-CTP-CTP 및 FVII-CTP 수확물들의 PK 프로파일을 나타낸 그래프이다.

도 3A는 비타민 K3 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 존재 하에 제한 희석 형질감염시키고 선별한 FIX-CTP 및 FIX-CTP-CTP 변형체들의 수확물을 나타낸 막대 그래피이다. FIX의 수준은 인간 FIX ELISA 키트 (Affinity Biologicals; cat. No. FIX-AG RUO)를 이용하여 정량하였고, 단백질의 농도 계산치는 2회의 독립적인 실험 결과의 평균으로 나타낸다.

도 3B는 FIX Ab 인식(recognition)를 보여주는 SDS-PAGE 겔의 현미경 사진으로, 현미경 사진 A는 웨스턴 블롯에서의 항-FIX 항체 인식을 보여주며; 현미경 사진 B는 웨스턴 블롯에서의 항- $\gamma$  카르복실화 항체의 인식을 보여준다. A-B에서 1번 레인에는 재조합 FIX가 포함된 샘플을 로딩하였다. A-B에서 2번 레인에는 FIX-CTP 수확물이 포함된 샘플을 주입하였다. A-B에서 3번 레인에는 FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물이 포함된 샘플을 주입하였다.

도 4는 rhFIX (American Diagnostics) 대비, FIX-CTP 및 FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 상대적인 발색 활성(EC<sub>50</sub> 농도에 의해 측정함)을 나타낸 그래프이다.

도 5는 rhFIX (American Diagnostics) 대비, FIX-CTP 및 FIX-(CTP) 수확물들의 응고 활성을 나타낸 그래프이다.

도 6은 rhFIX, FIX-CTP-CTP의 수확물 및 FIX-CTP의 수확물의 PK 프로파일을 나타낸 그래프이다.

도 7은 FIX-CTP의 수확물, FIX-CTP-CTP\_MOD-3011 및 MOD-3012의 각각의 수확물과, 인간 FIX ELISA 키트 (Affinity Biologicals; cat. No. FIX-AG RUO)를 이용하여 결정된, MOD3012 정제형 단백질의 FIX 항원 수준을 나타낸 막대 그래피이고, 단백질의 농도 계산치는 2회의 독립적인 실험 결과의 평균으로 나타낸다.

도 8은 FIX Ab 인식을 보여주는 SDS-PAGE 겔의 현미경 사진이다. 현미경 사진 A는 코마시 블루 염색 결과이고; 현미경 사진 B는 웨스턴 블롯에서의 항-FIX 항체의 인식을 보여주며; 현미경 사진 C는 웨스턴 블롯에서의 항- $\gamma$  카르복실화 항체의 인식을 보여준다. A-B에서 1번 레인에는 FIX-(CTP)<sub>2</sub> (MOD-3012)가 포함된 샘플을 로딩하였다. A-B에서 2번 레인에는 비결합형 FIX-(CTP)<sub>2</sub>가 포함된 샘플을 로딩하였다. A-B에서 3번 레인에는 FIX-(CTP)<sub>2</sub> (MOD-3012)의 농축된 용리물이 포함된 샘플을 로딩하였다.

도 9는 인간의 정상 풀(pool) 혈장 및 rhFIX (American Diagnostics) 대비, MOD3012의 발색 활성(샘플 농도/O.D.)을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 10은 인간의 정상 풀(pool) 혈장 및 rhFIX 대비, MOD3012의 응고 활성을 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 정제된 MOD3012, rhFIX, FIX-CTP-CTP의 수확물 및 FIX-CTP의 수확물의 PK 프로파일을 나타낸 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 실시예 1

### 응고 인자 IX에 대한 일반적인 내용 및 용도

인자 IX (FIX)는 415개의 아미노산으로 구성된 (55KDa) 당단백질로서, 응고 시스템과 관련있는 비타민 K 의존적인 당단백질의 일군에 속한다. FIX는 인자 FVII, 인자 X, 단백질 C 및 성숙형 아미노산 서열 다음에 N-말단 프로펩타이드가 있는 전구체로서 합성되는 프로트롬빈과 유사한 도메인 구성을 가진다.

FIX는 생화학적 특성 및 약물 동태학적 특성에 중요한 다수의 복잡한 전사 후 변형을 겪고 단백질 분자로서 분비된다. 모든 전사 후 변형들에서, 비타민 K 의존적인 감마 카르복실라제에 의해 감마 카르복실화되는, FIX의 아

미노 말단 근처 12개의 글루탐산 잔기들이 가장 중요한 것이다. 카르복실화는 FIX와 인지질 표면과의 상호 작용과 최적 FIX 활성화에 필요하다. 아미노 말단 프로펩타이드는 감마 카르복실라제에 대한 인식 부위로서 제공하며 따라서, 감마 카르복실화된 후, 골지 기관의, Paired basic Amino acid Cleave Enzyme (PACE/Furin)로 알려져 있는, 세린 프로테아제에 의해 절단된다. 4가지의 추가적인 전사 후 변형, 155번 티로신의 황산화, 158번 세린의 인산화, 63번 세린에서의 O-당화 및 마지막으로 Asn 157 및 16번에서의 N-당화는 골지 기관에서 이루어진다.

[0190] FIX는 단쇄 비활성형 자이모겐으로서 혈장내에서 순환한다(평균 농도 5  $\mu\text{g/ml}$ ). 2개의 펩타이드 결합: Arg 145 및 Arg 180에서 하나 또는 2가지의 생리학적 활성화 인자인 FVIIa- TF 복합체 또는 FIXa에 의한 단백질분해성 절단이 이루어지면, 활성화된 펩타이드는 제거되고 FIX는 하나의 이황화 결합에 의해 연결된 경쇄 및 중쇄로 구성된 완전 활성형 효소로 변환된다. N-말단 경쇄는 도메인처럼 비-촉매성 감마 카르복시글루탐산(Gla: carboxylglutamic acid) 및 2개의 Epidrml 성장 인자를 포함하고 있으며, C-말단 중쇄는 분자의 촉매 도메인과 같이 트립신을 포함하고 있다. 오직 FIXa만 불량한 촉매 활성이 특징적이다. 그러나, FVIII와 복합체를 이루게 되면, 이의 단백질분해 활성은 이의 천연 기질 FX에 비해 4-5배 크기로 증가된다.

[0191] B형 혈우병은, FIX의 전응고 활성(procoagulant)의 결핍을 발생시키는, 인자 IX (FIX) 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된 X 관련 출혈성 장애이다. B형 혈우병은 종종 불구성 관절병(crippling Arthoathy)을 야기하는 자발적인 연조직 출혈 및 재발성 혈관절증(recurrent hemarthrosis)을 가지고 있다. 이러한 환자에 대한 현재의 치료법은 재조합 FIX의 정맥내 투여를 포함한다. 그러나, 비용과 순환계로부터의 FIX의 상대적으로 신속한 소거 문제로 인해 장기 작용하는 FIX를 개발하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

[0192] 장기 작용성 FIX의 개발에 CTP 기법을 이용하였다. 구체적으로, 재조합 rFIX 분자의 반감기 연장은 하나 이상의 인간 CTP를 FIX에 융합함으로써 수행하였다. 재조합 FIX-CTP를 포유류 세포에서 발현시키고, 시험관내 및 생체내에서 특정화하였다. rFIX-CTP의 시험관내 활성이 rFIX과 비슷한 것으로 확인하였다. 랫에서의 약물 동태성 및 효능 연구를 수행하여, rFIX-CTP의 특성 개선을 입증하였다. 이러한 연구 결과, 천연형 효소와 유사한 지혈 특성을 가진 반감기가 연장된 rFIX 분자를 개발하는 것이 실현가능함을 확인하였다.

[0193] **재조합 FIX 분자의 클로닝 및 발현:** Dg44 세포를 100 mm 조직 배양 디쉬에 접종하여 50-60% 컨플루언스로 배양하였다. 단백질 무첨가 배지(Invitrogene CD Dg44) 중에서 FuGene 시약 (Roche)을 이용하여 하나의 100 mm 플레이트에서의 형질감염시, 총 2  $\mu\text{g}$  (마이크로그램)의 FIX cDNA를 사용하였다. 형질감염 후 48시간에 배지를 제거하고, G418 (Neomycin) 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 존재 하에 뉴클레오시드가 무첨가된 단백질 무첨가 배지 (Invitrogene CD Dg44)로 교체하였다. 14일 후, 형질감염된 세포 집단을 T25 조직 배양 플라스크로 옮기고, 세포가 안정적인 클론으로 성장할 때까지 다시 10-14일 동안 계속 선별하였다. 고발현성 클론을 선별하였다. 약  $2 \times 10^7$ 개의 세포를 이용하여, 비타민 K3 (메나디온 소듐 바이셀레이트; Sigma) 5 ng/ml이 보충된, 1700cm<sup>2</sup> 롤러 바틀 (Corning, Corning NY)내 배양 배지 300 ml에 접종하였다. 세포 생존성이 약 70%로 갑자기 감소된 후 생산 배지(회수)를 수집하였다. 생산 배지를 먼저 투명하게 처리한 다음 약 20배 농축한 후, 흐름 여과 카세트(10KDa MWC; Millipore Corp.)를 이용하여 PBS로 투석하였다.

[0194] **FIX 항원 수준의 측정:** FIX-CTP 회수물의 항원 수준을 AssayMax Human FIX ELISA 키트 (AssayPro- EF1009-1)를 이용하여 측정하였고, 단백질 농도 계산치는 2번의 독립 실험에서의 3가지 여러가지 회석물에서의 평균이다 (도 3A).

## 표 1

[0195] 단백질 농도 계산치

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
FIX Ag 수준 ( $\mu\text{g/ml}$ )	41.9	19.2
SD	8.76	3.67
%CV	20.92	19.15

[0196] **FIX SDS-PAGE - 면역 블롯:** FIX-CTP 수확물(harvest) 또는 정제된 rhFIX (American Diagnostics), 단백질 100 ng을 Precision plus 듀얼 컬러 단백질 마커 (Bio-Rad)를 이용하여 12% Tris -글리신 겔 상에 로딩하였다. 항 인간 FIX 다클론 Ab 및 항 인간 감마 카르복실화 단일클론 항체(American Diagnostics)를 이용한 웨스턴 면역블

롯에 의해 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 기존에 보고된 바와 같이, rhFIX는 55KDa로 이동하였고, 2개의 CTP와 융합된 FIX는 75KDa로 이동하였다. 2가지 FIX-CTP 단백질 변이체들은 감마 카르복실화된 것으로 확인되었다(도 3B).

[0197] **FIX 발색 활성의 측정:** FIX-CTP 수확물 대 rhFIX-단백질 (American Diagnostics)의 시험관내 효능에 대한 비교 평가를, 상업적으로 입수가 가능한 발색 활성 테스트 키트, BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802)를 이용하여 수행하였다. 트롬빈, 인지질, 칼슘의 존재 하에, 과량의 FIXa는 샘플링한 FIX를 FIXa로 활성화한다. FIXa는 트롬빈, 활성화된 FVIII:C (과량 제공됨) 인지질 및 칼슘과의 효소 복합체를 형성하며, 분석 시스템에서 제공되는 인자 X를 FIXa로 활성화한다. 활성은 제한 요소인 FIX의 양과 직접 관련있었다. 형성된 FIXa는 FIXa 발색 기질(pNA)에 대한 이의 비활성(specific activity)을 통해 측정하였다. 제조되는 pNA의 양은 FIXa의 활성과 정비례하였다. rhFIX와 FIX-CTP 수확물을 연속 희석하고, rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 조제물에 대해 FIX 수확물의 용량 반응 곡선을 비교함으로써 효능을 평가하였다. FIX의 평균 EC50은 21 ng/ml인데 반해 FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 EC50 계산치는 382 ng/ml이었고, FIX-CTP 수확물의 EC50 계산치는 1644 ng/ml이었다. FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 효소 활성의 약 15배 감소가 관찰되었다(도 4).

[0198] **FIX 응고 활성 (aPTT):** 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT: activated partial thromboplastin time)은 응고 캐스케이드의 고유 경로 및 공통 경로의 완전성(integrity)을 측정한 값이다. aPTT는, 고유 경로 활성 인자, 인지질 및 칼슘을 추가한 이후의 혈장이 응고되는 시간, 초이다. aPTT 시약은 부분 트롬보플라스틴이라고 하는데, 그 이유는 조직 인자가 프로타임(PT: protime)에서와 같이 인지질을 함유하지 않기 때문이다. 활성 인자는 시스템을 개시시키며, 그런 후, 고유 경로의 나머지 단계들이 인지질의 존재 하에 이루어지게 된다. 기준 aPTT 범위는 실험 마다 달라지지만, 통상적으로는 27 - 34초의 범위이다.

[0199] 분석의 주된 목적은 rhFIX 첨가에 의한 FIX 고갈된 인간 혈장의 응고 활성을 회복시키는 FIX-CTP 수확물의 능력을 정량하고자 하는 것이다. FIX 결핍성 인간 혈장 300  $\mu$ l를 rhFIX 또는 FIX-CTP 수확물 100  $\mu$ l와 혼합하고, 연속적으로 희석하였다. 37°C에서 60초간 인큐베이션한 다음, 트롬보플라스틴, CaCl<sub>2</sub> 및 인지질을 상기 혼합물에 첨가하고, 응고 시간을 초 단위로 측정하였다( American Medical Laboratories에서 수행됨). 효능은, rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 조제물에 대해 FIX 수확물의 용량 반응 곡선을 비교함으로써 평가하였고, FIX 활성 1 단위는 인간 정상 혈장 1 ml의 활성과 동일한 활성을 보이는데 필요한 FIX 농도이다. 제공되는 aPTT 결과에 따르면, FIX-(CTP)<sub>2</sub>는 rhFIX와 비교하여 응고 비활성이 5.7배 감소한 것으로 보인다. 아울러, aPTT 결과는 시험관내 발색 활성과 종합하여, FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물이 FIX-CTP 수확물 대비 향상된 효소 활성을 가짐을 시사해준다(도 5). FIX-CTP 단백질의 개선된 활성은 발현 시스템의 최적화(즉, Furin과의 공동-형질감염 및 Vit K3 매질 농도의 최적화)를 거친 후에 수득될 것이다.

## 표 2

[0200]

FIX 응고 활성

rhFIX(AD) ( $\mu$ g/ml )	PTT(Sec)	FIX-CTP ( $\mu$ g/ml )	PTT (Sec)	FIX-CTP-CTP ( $\mu$ g/ml )	PTT (Sec)
5	31.3	9	45.2	4	47.5
1.25	35.7	2.25	53.3	1	55.9
0.3125	43	0.5625	64.1	0.25	67
0.078125	52.1	0.140625	76.3	0.0625	77.4

[0201] **약물 동태학적 연구:** rhFIX (American Diagnostic) 및 FIX-CTP 수확물을 스프라그 다우리 랫에 75ug/kg(체중)의 용량으로 1회 정맥내 주사로 투여하였다.

## 표 3

[0202]

PK 실험의 운영 계획

처리군	시험 항목	동물 수/군	투여 경로	성별	투여량 수준 ( $\mu$ g/kg )	투여량 수준 ( $\mu$ g/동물 )	주입 부피 ( $\mu$ l )	농도 ( $\mu$ g/ml )	*시간대 (투여 후 시간)
-----	-------	--------	-------	----	-----------------------	-----------------------	-------------------	-------------------	----------------

1	rFIX	6	IV	M	75	15	500	30	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72
2	rFIX-CTP	6	IV	M	75	15	500	30	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72
3	rFIX-CTP-CTP	6	IV	M	75	15	1000	15	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72

[0203] 투여 후 0.083, 0.5, 1.5, 4, 8, 24, 48, 72시간 후에, 3마리의 랫으로부터 안와 뒷쪽으로부터 혈액 샘플을 취하였다. 샘플을 취한 후 즉시 혈장을 분리하여 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다. FIX 농도는 FIX Elisa 특이 분석 (AssayPro)에 의해 정량하고, 각 단백질에 대한 약물 동태 프로파일을 계산하였고, 각 시간대에 동물 3마리의 평균 값으로 하였고(도 6), 최종 반감기(Terminal half-life)를 PK solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 표 4에 여러가지 샘플링 시간 대에서의 관찰된 FIX 농도를 종합 개시한다. PK 프로파일과 최종 반감기의 요약 결과는 표 5에 요약 개시한다.

#### 표 4

[0204] PK 프로파일의 요약 개시

시간(Hr)	FIX- AD (ng/ml)	FIX-CTP (ng/ml)	FIX-CTP-CTP (ng/ml)
0.083	1506.7	1477.5	1914.8
0.5	1949.8	1150.1	1830.1
1.5	2189.4	1009.0	1264.3
4	733.90	709.33	1000.00
8	319.80	167.20	1234.67
24	BLQ	54.625	230
48	BLQ	BLQ	120.9

[0205] FIX-CTP 수확물들은 rhFIX와 비교하여 개선된  $T_{1/2\beta}$  값을 나타내었다(각각 2배 및 5배 증가). FIX 투여시, 24 시간째에 수집한 동물 혈청 농도는 정량 한계 미만(BLQ)이었고, 추가적인 PK 프로파일은 계산하지 않았다.

#### 표 5

[0206] PK 프로파일의 요약 개시

산물	최종 반감기 (hr)	비율 (MOD-301X/rhFIX)
rhFIX (American Diagnostics)	2.62	—
MOD-3011 (FIX-CTP)	5.55	2.11
MOD-3011 (FIX-CTP-CTP)	12.9	4.92

[0207] 본 실험에서, FIX 반감기를 연장시키면서 치료학적 효능을 유지하기 위한 새로운 접근법을 기술하였다. 활성 단백질에 CTP 펩타이드의 부가는 단백질의 활성을 간섭한다는 점에서 유해한 잠재성이 있어, 따라서, FIX의 C-말단에 CTP 서열 부가에 의해 활성형의 재조합 FIX-CTP가 제조된다는 것은 예상하지 못하였다.

[0208] **면역친화성으로 정제한 FIX-CTP-CTP (MOD-3012)의 특정화**

[0209] **MOD3012 정제**

[0210] MOD3012는 C-말단에 직렬식으로 2개의 CTP 유닛을 가지고 있는 변형된 FIX이다. MOD3012를 FIX의 N-말단부에 존재하는  $\gamma$  카르복시글루타미드(Gla)에 대한 매트릭스 결합된 단일클론 항체(American Diagnostics Cat# 3570MX)를 이용하여 정제하였다. 단일클론 Ab를 세파로스 CL-4B에 결합시켰다. 88  $\mu$ g/ml 농도의 MOD3012 수확물을 20 mM Tris, 150 mM NaCl 및 10 mM EDTA, PH = 7.4에서 투석하였다. 주입 속도는 0.5 ml/min이며, 용출은 20 mM Tris-HCl, 350 mM NaCl 및 50 mM CaCl을 이용하여 수행하였고, 미결합 분획은 5번 재사용하였다. 마지막으로, 용출 분획을 PBS로 투석하고, 추출하여 농축하였다.



[0211] **FIX 항원의 수준 결정**

[0212] FIX-CTP 및 FIX-(CTP)<sub>2</sub>; MOD-3011 및 MOD-3012 각각의 수확물 및 MOD3012 정제된 단백질 수준을 인간 FIX ELISA 키트 (Affinity Biologicals; cat# FIX-AG RUO)를 이용하여 결정하였고, 단백질 계산 농도( $\mu\text{g/ml}$ )는 2번의 독립 실험의 수행 결과의 평균이다(도 7).

**표 6**

[0213] 단백질의 농도 계산치

	FIX-CTP	FIX-CTPOCTP	MOD3012(정제형)
FIX Ag 수준( $\mu\text{g/ml}$ )	125.78	88.53	172.9
SD	17.28	21.31	2.63
% CV	13.74	24.08	1.52

[0214] 추가적으로, MOD-3012를 브래드포드 분석으로 정량하였다. 농도 계산값은 202  $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 이는 인간 FIX ELISA에 의해 수득한 농도와 비슷하였다.

[0215] **SDS-PAGE 블롯**

[0216] MOD3012 수확물, 미결합 분획 및 정제형 단백질을 12% Tris-글리신 겔에 Precision plus dual color protein marker (Bio-Rad)를 이용하여 주입하였다. 겔을 코마시 블루 시약(단백질의 800 ng)으로 염색하여, SDS-PAGE 코마시 분석을 수행하였고, (단백질의 100 ng) 항 인간 FIX 다클론 항체(Ab) 및 항 인간 감마 카르복실화 단일 클론 Ab (American Diagnostics Cat #499, 3570)를 이용하여 웨스턴 면역블롯을 수행하였다. 면역친화성 정제 공정은 불순물을 낮추면서 MOD3012 단백질을 상당히 농화시켰다(도 8).

[0217] **N-말단 서열분석:**

[0218] MOD-3012 정제형 단백질을 12% Tris-글리신 SDS-PAGE에 의해 분리시킨 다음 PVDF 막으로 전기-블롯팅을 수행하였다. 대상 밴드를 잘라, 정제된 바이오브렌 처리한 유리섬유 필터 상에서 넣었다. N-말단 서열 분석은 140 C HPLC 마이크로-농도구배 시스템이 장착된 펄스형 액상 단백질 서열분석기를 이용하여 에드만 분해로 수행하였다. N-말단 서열분석 결과, MOD3012는 불완전 및 완전 프로펩타이드 절단형 단백질의 혼합물이었다. 불충분하지만 프로 펩타이드 절단이 FIX 응고 활성을 낮추는 것으로 입증되었다. 퓨린과의 공동-형질감염시, 개선된 프로 펩타이드 절단 공정을 달성할 수 있다.

[0219] **FIX 발색 활성의 결정**

[0220] MOD-3012 정제형 단백질 대 rhFIX (American Diagnostics) 및 인간 정상 혈장 풀의 시험관내 효능에 대한 비교 평가를, 시판되는 발색 활성 테스트 키트 BIOPHEN (Hyphen BioMed 221802)을 이용하여 수행하였다. 트롬빈, 인지질 및 칼슘의 존재시, 과량의 FIXa는 FIX를 FIXa로 활성화하였다. FIXa는 트롬빈, (과량으로 제공된) 인지질 및 칼슘과 효소적 복합체를 형성하여, 분석 시스템에 존재하는 인자 X를 FXa로 활성화한다. 활성은 제한 인자 인 FIX의 양과 직접적인 상관 관계에 있었다. 형성된 FXa는 FXa 발색 기질(pNA) 상에서의 이의 비활성으로 측정하였다. 형성된 pNA의 양은 FIXa 활성과 정비례하였다. rhFIX, 인간 혈장 및 MOD-3012를 연속 희석하고, 용량 반응 곡선을 비교하여 효능을 평가하였다(도 9). rhFIX의 평균 EC<sub>50</sub>는 68.74 ng/ml인 반면, MOD-3012의 EC<sub>50</sub> 계산값은 505 ng/ml이었다. MOD-3012의 효소 활성은 재조합 FIX 대비 약 7배 감소가 관찰되었고, 정상 인간에서 추출한 혈장 대비 16.5배 감소가 관찰되었다. 이러한 활성 감소는, N-말단 분석으로 동정된, N-말단 프로-펩타이드의 불충분한 절단에 의한 것으로 설명할 수 있었다.

[0221] **FIX 응고 활성 (aPTT)**

[0222] 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)은 응고 캐스케이드의 고유 경로 및 공통 경로의 완전성(integrity)을 측정한 값이다. aPTT는, 고유 경로 활성 인자, 인지질 및 칼슘을 추가한 이후의 혈장이 응고되는 시간(초)이다.

[0223] 본 분석에서는 rhFIX의 부가에 의한 FIX 고갈된 인간 혈장의 응고 활성을 회복시키는 MOD-3012 단백질의 능력을 정량하였다. FIX 결핍성 인간 혈장 300  $\mu\text{l}$ 를 100  $\mu\text{l}$ 의 rhFIX, MOD-3012 (FIX-CTP-CTP (CTP는 C-말단에 직렬로 배치됨)), 또는 추가적으로 희석한 정상 풀 인간 혈장과 혼합하였다. 37°C에서 60초간 인큐베이션한 후, 조직

인자 (TF),  $\text{CaCl}_2$ , 및 인지질을 상기 혼합물에 첨가하였다. 응고 시간(초)을 측정하였다. 효능은 MOD3012의 용량 반응 곡선을 rhFIX 또는 인간 혈장으로 구성된 기준 조제물과 비교함으로써 평가하였다. FIX 1 단위는 1 ml 인간 정상 혈장의 활성화에 해당되는 FIX의 양으로서 규정하였다.

[0224] 나타난 aPTT 결과(도 10), MOD3012 응고 활성화는 정상 풀 인간 혈장에 비해 단지 1.4배 낮았고, rhFIX와 비슷한 것으로 보인다. aPTT 결과는 발색 활성화 시험관내 분석과 더불어, MOD-3012 정제가 이의 활성을 손상시키지 않음을 시사한다.

[0225] MOD3012의 약물 동태 활성화

[0226] 정제된 MOD3012, rhFIX (American Diagnostic) 및 MOD3012 및 MOD3011을 포함한 수확물 (FIX-CTP)을 스프라그 다우리 랫(물질 당 랫 8마리)에  $100 \mu\text{g/kg}$  (체중) 투여량으로 1회 정맥내 주사로 투여하였다.

## 표 7

[0227] PK 실험의 개요

처리군	시험 항목	동물군의 수/시간대	투약 수준( $\mu\text{g/kg}$ )	투약 수준( $\mu\text{g/동물}$ )	주입 부피( $\mu\text{l}$ )	농도( $\mu\text{g/ml}$ )	시간대(투여 후 시간)
A	rFIX	8	100	20	500	40	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
B	rFIX-CTP (수확물)	8	100	20	500	40	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
C	rFIX-CTP-CTP (수확물)	6	100	20	500	40	0 (투여 전) 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72.
D	rFIX-CTP-CTP (정제형)	4	100	20	500	40	0.083, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10, 24, 4, 8, 72.

[0228] 투여 후 0.083, 0.5, 2, 4, 7, 10, 24, 48 및 72시간 후에, 4마리의 랫으로부터 안와 뒷쪽으로부터 혈액 샘플을 취하였다. 샘플을 취한 후 즉시 사이트레이트 처리한 혈장(0.32%)을 분리하여 분석하기 전까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. FIX 농도는 FIX Elisa 특이 분석 (Affinity Biologicals)을 이용하여 정량하였다. 각 단백질에 대한 약물 동태 프로파일을 각 시간대의 동물 4마리의 평균 값으로 계산하였다(도 11). 최종 반감기(Terminal half-life)를 PK solutions 2.0 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 표 8에 여러가지 샘플링 시간대에 관찰된 FIX 농도를 종합 개시한다. PK 파라미터에 대한 요약 결과는 표 9에 요약 개시한다.

## 표 8

[0229] PK 프로파일의 요약 개시

시간(Hr)	FIX-CTP 수확물 ng/ml	FIX-(CTP) <sub>2</sub> 수확물 ng/ml	rhFIX ng/ml	정제된 MOD-3012 ng/ml
0.085	1038.97	1123.62	325.05	886.48
0.5	939.12	956.80	274.58	670.92
1	791.97	843.85	222.90	674.17
2	304.98	673.31	186.00	503.91
4	315.37	525.50	109.69	357.36
7	171.45	384.36	67.62	257.02
10	50.34	250.73	40.20	158.66
24	10.07	78.50	BLQ	52.13
48	BLQ	23.40	BLQ	18.07

## 표 9

[0230]

PK 파라미터의 요약 개시

	T1/2 (hr)	AUC ng-hr/ml	MRT (hr)	Vd ml/Kg	CL ml/hr/Kg
FIX-CTP 수확물	4.17	3622	4.5	155.1	27.6
FIX-(CTP) <sub>2</sub> 수확물	10.44	9105.7	12	165.4	10.9
rhFIX	3.72	1416.8	5.1	373.8	70.183
정제된 MOD-3012	11.14	6314.2	12.3	254.5	15.83

[0231]

MOD-3012 수확물들은 MOD3011 수확물과 비교하여 개선된 PK 프로파일을 가진다는 것이 확인되었다. 아울러, 정제된 MOD-3012는 rhFIX 대비 T1/2<sub>β</sub> 수치의 3배 증가 및 AUC의 4.5배 증가를 나타내었다.

[0232]

CTP 하나가 융합된 융합체 대비 2개의 CTP 분자가 직렬 융합된 분비된 FIX의 양 감소는, 여분의 CTP 부가가 원인인 것으로 보이며, ELISA에 의한 검출 감소는 아닌 것으로 보인다. 이러한 추측은, 브래드포드 정제된 MOD-3012의 농도 계산치가 수득한 ELISA 농도 계산치와 유사하다는 사실을 기반으로 한다.

[0233]

MOD3012 응고 활성은 풀 인간 혈장과 유사하였지만, 그러나, 이의 시험관내 발색 활성은 rhFIX 또는 수집한 인간 혈장에 비해 상당히 낮았다. 발색 활성 분석은 응고 분석에 비해 매우 민감한 분석인 것으로 보고되었다. MOD3012의 활성 감소의 이유는 다양할 수 있다. CTP 부가에 의한 FXIa에 대한 친화성 감소 또는 전사 후 변형 감소(예, 12-10 GLA 잔기 및 프로-펩타이드 절단). N-말단 분석을 통해, MOD-3012 프로-펩타이드의 단백질분해성 절단은 분비되기 전에는 충분히 완료되지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 전사 후 변형은 단백질의 정상적인 효소 활성에 중요하기 때문에, Furine-PACE 플라스미드와의 공동-형질감염이 유익하며, MOD3012 활성을 개선시킬 수 있다.

[0234]

마지막으로, 랫에서의 MOD-3012 비교 PK 연구를 통해, FIX의 C-말단에 2개의 직렬 CTP의 융합이 반감기가 연장된 FIX를 만들어내는 것으로 확인되었다. MOD-3012의 PK 특성을 FIX-FC 또는 FIX-FP와 비교한 결과 (경쟁적인 재조합 단백질; 아래 표 10), MOD3012의 T1/2는 FIX-FP에 비해 개선되지만 FIX-FC에 비해서는 감소되는 것으로 보인다.

표 10

[0235]

장기 작용성 FIX들의 PK 특성

제품	회사	T1/2 (Ratio)	AUC	CL
FIX-FP	CSL-Behring	2	미기재	미기재
MOD-3012	Prolor	3	4.5	4.7

[0236]

비 = 장기 작용 / rhFIX 또는 BeneFIX

[0237]

FIX 고갈된 마우스 모델

[0238]

생체내 활성 모델을 평가하기 위해, FIX 낮아웃 마우스를 입수하여, 품종 콜로니(breeding colony)를 확립하였다. 시판되는 재조합 hFIX (Benefix) 또는 rFIX-(CTP)<sub>2</sub> (MOD-3012) 10 μg을 마취한 FIX 낮아웃 마우스(22-28g)의 꼬리 정맥에 주사하였다. 단백질의 주사량은 정상 혈장에서의 필요한 FIX의 농도에 해당된다 (5 μg/ml). 특정 시간대에 클리핑한 정맥으로부터 혈액 샘플을 취하여 해파린 처리한 모세관에 넣는다. 혈장 샘플을 대상으로 ELISA에 의해 FIX 수준을 평가하고, aPTT 응고 분석으로 효능을 측정한다.

[0239]

**FIX 프로펩타이드 절단 효능의 증가:** CTP 펩타이드 cDNA를 인간 FIX cDNA의 3' 말단에 융합시켰다. 대응되는 rFIX 및 퓨린 발현 구조체를 Dg44 세포에 공동-형질감염시키고, 인간 rFIX cDNA를 대조군으로서 퓨린 플라스미드와 함께 공동-형질감염시켰다. FIX의 고수준의 발현은, 세포내에서의 퓨린 프로테아제의 제한된 양으로 인해, 프로-인자 및 성숙형 인자 FIX의 혼합물의 분비를 유도한다. 퓨린 발현 벡터와 프로-인자 발현 벡터의 공동-형질감염은 회수율을 증가시키며, 배지로의 완전히 가공된 FIX의 분비를 발생시킨다.

[0240]

FIX-(CTP)<sub>2</sub> 및 퓨린 공동-형질감염 이후에, 안정적인 클론들을 제조하여, 프로펩타이드 절단 평가를 위해 수확물을 채집한다. 단백질 100 ng을 12% Tris-글리신 겔 상에 Precision plus dual color protein marker (Bio-



Rad)를 이용하여 로딩한다. 항 인간 FIX 다클론 Ab (American Diagnostics) 및 항 프로펩타이드 다클론 항체를 이용한 웨스턴 면역블롯으로, SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 기존에 보고된 바와 같이, rhFIX는 55KDa 위치로 이동하였지만, 2개의 CTP가 융합된 FIX는 75KDa 위치로 이동하였다. FIX-단백질의 2가지 변형체들은 적절한, 충분한 프로-펩타이드 절단을 겪는 것으로 확인되었다.

[0241] 적절한 프로-펩타이드 절단이 FIX-(CTP)<sub>2</sub> 효소 활성을 개선시키는지를 결정하기 위해, 퓨린과 공동-형질감염시킨 FIX-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 발색 활성과 응고 활성의 비교 평가를 수행하였다. FIX-(CTP)<sub>2</sub> 비활성에 현저한 개선이 관찰되었는데 이는 rhFIX에서와 유사하였다.

[0242] 결론적으로, 본원에 기술된 결과들은, MOD-3012를 B형 혈우병 환자의 치료에 유효하게 사용될 수 있음을 시사해 준다. CTP 구조체가 융합된 FIX는 특정 시험관내 조치에서 문제점을 해결하는 생체내 약리학적 성분을 개선시키는 이점이 있다. 이러한 제안된 치료는 주입율 및 필수 투여량의 감소로 기존 치료법 보다 유익하다.

[0243] 알부민이 융합된 분자 전략을 이용하여 FIX 반감기를 개선시키고자 한 경우, 재조합 FIX가 불활성화되었다는 것은 중요하다. 본 발명의 새로운 방법의 이용은, 개선된 장기 지속 활성을 제공하는 새로운 재조합 FIX 융합 단백질의 설계 및 정제를 도출한다. 단순한 크기 변형은 주입된 FIX의 약물 동태성을 개선시키지 않았으므로, FIX에 융합된 CTP가 약물 동태학적 파라미터들을 촉진시킨다는 사실은 예측되지 않았다. 고도로 당화된 펩타이드-시알산 잔기의 존재는 단백질을 안정화시키며, 이를 FIX 기능의 주요 결정 인자를 방해하지 않으면서 혈관 수용체와의 상호작용을 방지한다.

[0244] FIX-CTP는 B형 혈우병 환자에서 rFIX에 대한 비슷한 치료학적 효과를 나타내며, 필수 투여 횟수는 낮다. 또한, FIX-CTP의 1회 주사만으로도 출혈 발생을 통제하고 B형 혈우병 환자에게 외과적 개입이 이루어지는 동안에 필요한 주입 횟수를 낮출 수 있을 것으로 보인다.

## [0245] 실시예 2

### [0246] 응고 인자 FVII의 제조 및 이용

[0247] 재조합 응고 인자 VIIa (NovoSeven) (FVIIa)는 상업적으로 입수가 가능하며, 이는 혈우병 환자의 출혈이 발생하였을 때 저해제로 치료하는 용도로 1996년에 승인받았다. 그러나, rFVIIa는 중요한 문제점이 있는데, rFVIIa는 빠르게 소거되는데 최종 반감기는 2.5시간이다. 그 결과, 경도 내지 중도의 출혈 발생시 적절한 항상성을 달성하기 위해, 통상적으로 환자에게 여러번의 잦은 주입(2-3시간 간격으로 2-3회 투여)이 요구되었다.

[0248] 본원에서, FVII과 인간 CTP의 융합으로 반감기가 연장된 재조합 FVIIa-CTP 분자의 제조에 대해 기술한다. 재조합 FVIIa-CTP는 포유류 세포에서 발현시켜, 시험관내 및 생체내에서 특정화하였다. rFVII-CTP 활성은 rFVII과 비슷한 것으로 확인되었으며, 랫에서의 약물 동태학 및 효능 연구 결과 rFVII-CTP에서의 개선된 특징들이 확인되었다. 본 연구를 통해, 야생형 효소와 매우 유사한 지혈 특성을 가지며 반감기가 연장된 rFVIIa 분자의 개발이 실현가능하다는 것이 입증되었다.

[0249] **재조합 FVII 분자의 클로닝 및 발현:** 몇가지 인자 VII 클론들을 진핵생물 발현 벡터(pCI-dhfr)내에 구축하였다 (도 1). 호모 사피엔스 응고 인자 VII의 서열이 포함된 인간 MGC 검증된 FL cDNA 클론(IRCM)을 "Open Biosystems" (OB-MHS4426)에 주문하였다. 하기 프라이머들을 하기 서열로 Sigma-Genosys에서 합성하였다: 프라이머 67: 5'CTGAGGACATGGTCTCCAGGCC3' (인자 VII DNA의 5' 말단 및 XhoI 제한효소 부위 포함) (서열번호 5); 프라이머 68<sup>R</sup>: 5' TCTAGAATAGGTATTTTCCACATG3' (XbaI 제한효소 부위 포함) (서열번호 6); 프라이머 69: 5' TCTAGAAAAAGAAATGCCAGC3' (XbaI 제한효소 부위 포함) (서열번호 7); 및 프라이머 70<sup>R</sup>: 5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAATGGGCTCGCA3' (인자 VII DNA의 3' 말단 및 NotI 제한효소 부위 포함) (서열번호 8).

[0250] 클로닝은 2세트의 PCR 반응으로 수행하였다. 1차 반응은 프라이머 67과 프라이머 68<sup>R</sup>을 이용하여 수행하였고, 주형으로서 인자 VII 서열을 가진 cDNA 플라스미드(OB-MHS4426)를 사용하였고, PCR 증폭 결과 ~ 534 bp 산물이 형성되어 이를 분리한 다음 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, catalog K2000-01)에 삽입하였다. 인자 VII 서열의 아미노 말단이 포함된 XhoI-XbaI 단편을 분리하였다. 2차 반응은 프라이머 69와 프라이머 70<sup>R</sup>을 이용하여 수행하고, 주형으로서 인자 VII 서열을 가진 cDNA 플라스미드(OB-MHS4426)를 다시 사용하였으며, PCR 증폭 결과 ~ 813 bp 산물이 형성되어 이를 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 연결하였다. 인자 VII 서열의 카르복시 말단이 포함된 XhoI-NotI 단편을 분리하였다. 2개의 단편들을 진핵생물 발현 벡터인 pCI-dhfr (3

회 연결)에 삽입하여, 501-0-p136-1 클론을 제작하였다.

[0251] 플라스미드 501-p136-1 (pCI-dhfr 벡터내 인자 VII)을 제한효소 XhoI과 KpnI으로 절단하였다. ~1186 bp의 단편을 분리하였다. CTP 서열 앞에 있는 부분 인자 VII 클론(1180 bp-1322 bp), 종결 인자 및 GeneArt (0721543)에서 합성한 NoyI 서열을 제한효소 KpnI 및 NotI로 절단하였다. ~ 253 bp의 절편을 분리하였다. 2개의 절편을 진핵생물 발현 벡터인 pCI-dhfr (3번 연결)에 삽입하여, 501-1-p137-2 클론을 제작하였다. pCI-dhfr-701-2-p24-2를 제한효소 XhoI 및 ApaI으로 절단하여, 큰 단편(벡터)을 분리하였다.

[0252] pCI-dhfr-501-2-p137-2 (인자 VII-ctp x1)를 제한효소 XhoI 및 ApaI으로 절단하고, ~ 1200 bp의 삽입체를 분리하였다. 벡터와 삽입체를 연결하여 501-2-p139-2를 제작하였다. Dg44 세포를 100mm 조직 배양 디쉬에 과중하여, 컨플루언스 50-60%로 배양하였다. 단백질 결핍 배지(Invitrogen CD Dg44)에서의 FuGene reagent (Roche)을 이용한 하나의 100 mm 플레이트의 형질감염에 총 2  $\mu$ g의 DNA를 사용하였다. 배지는 형질감염한지 48시간 후에 제거하고, 뉴클레오시드가 첨가되지 않은 단백질 결핍 배지(Invitrogen CD Dg44)로 교체하였다. 14일 후, 형질감염된 세포 집단을 T25 조직 배양 플라스크로 옮긴 다음, 세포가 안정적인 클론으로 성장하기 시작할때까지 10-14일간 계속 선별하였다. 고발현성 클론을 선별하였고, 세포 약  $2 \times 10^7$  개를 1700  $\text{cm}^2$  롤러 보틀 (Corning, Corning NY)내 비타민 K3 (메나디온 소듐 바이설페이트; Sigma) 5 ng/ml이 첨가된 배양 배지 300 ml에 접종하였다. 세포 생존율이 거의 70%로 갑자기 감소된 후에 생산 배지(수확물)를 수집하였다. 생산 배지를 먼저 원심 분리로 투명화 처리한 다음 약 20배 농축시키고, 흐름 여과 카세트(10KDaMWC0; Millipore Corp, Billerica, MA)를 이용하여 PBS로 투석하였다.

[0253] **FVII 항원 수준 결정**

[0254] CTP 펩타이드를 코딩하는 cDNA를 cDNA 코딩 인간 FVII의 3' 말단에 융합하였다. 대응되는 rFVII 구조체를 Dg44 세포에 형질감염시켰다. 대조군으로서, 인간 rFVII cDNA를 사용하였다. 생산 배지(수확물)를 수집하여, 농축한 다음, 분비된 재조합 FVII을 추가로 분석하였다. rFVII, rFVII-CTP 및 rFVII-CTP-CTP 항원 수준은 AssayMax Human FVII ELISA 키트 (AssayPro)에 의해 측정하였다 (도 2A). rFVII-CTP 및 rFVII-(CTP)<sub>2</sub>의 분비 수준은 천연형 rFVII와 현저한 차이가 없었다.

[0255] **SDS-PAGE 블롯**

[0256] 수확물, 정제형 또는 활성형 rFVII 단백질 50 ng을 로딩하여, SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 샘플을 Precision plus dual color protein marker (Bio-Rad)를 이용하여 12% 트리스-글리신 겔에 로딩하였다. 항 인간 FVII 단일클론 Ab(R&D systems) 또는 토끼에서 생산된 항-CTP 다클론 항체를 이용한 웨스턴 면역블롯을 수행하여, SDS-PAGE 분석을 행하였다.

[0257] rFVII 항원의 수준은 항 FVII Ab로 면역블롯팅한 SDS-PAGE에서 검출된 단백질 수준과 상호 관련있었다. rFVII-CTP는 단일 밴드로서 이동하였고, FVII 대조군에 해당되는 분자량은 약 52KDa이었으나, 이들 2가지 단백질들은 면역블롯에서 FVII에 특이적인 항체에 반응하였다. 또한, rFVII-CTP 역시 CTP 특이 항체에 반응하였다. rFVII는 미량의 활성형 단백질 무첨가시 자이모젠(zymogene) 형태로 분비되었다.

[0258] **FVII 발색 활성:**

[0259] rFVII, rFVII-CTP 및 rFVII-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 활성을 상업적으로 구입가능한 발색 테스트 키트 (AssaySense Human FVII chromogenic Activity assay kit (AssayPro))를 이용하여 측정하였다. rFVII-CTP의 기능적인 특정화 및 이의 더욱 활성화되는 능력(FVIIa)에 대해, 인자 X를, FXa 특이 기질의 존재 하에 정량화된 신호 (AssayPro)를 방출시키는 인자 Xa로, 활성화시키는 TF/FVIIa의 능력을 측정하는, 상업적으로 구입가능한 발색 테스트 키트에, 농축된 rFVII-CTP(수확물)를 사용하였다. rFVII 단백질의 C-말단에 CTP 펩타이드 부가는 이의 세린 프로테아제 활성을 손상시키지 않았다(도 2B, C).

[0260] **FVII 응고 활성:**

[0261] 프로트롬빈 시간 (PT)은 응고의 외인성 경로(extrinsic pathway)를 측정한다. PT는 외인성 경로 활성 인자, 인지질 및 칼슘을 첨가한 후 혈장이 응고되는데 걸리는 시간(초)이다. 이는 특히 와파린 투약, 간 손상 및 비타민 K 상태의 조치시 혈액의 응고 경향(clotting tendency)을 결정하기 위해 사용된다. 프로트롬빈의 기준 범위(reference range)는 통상 약 12-15초이다. 특히, FVII-CTP 및 FVII-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의, rhFVII 첨가에 의한 FVII 고갈된 인간 혈장의 응고 활성을 회복시키는 능력을 정량하였다. FVII 결핍성 인간 혈장 300  $\mu$ l를 특정

농도의 FVII, FVII-CTP 및 FVII-(CTP)<sub>2</sub> 수확물 또는 정상풀 인간 혈장 100 $\mu$ l와 혼합한 다음, 더욱 희석하였다. 37℃에서 60초간 인큐베이션한 다음, 조직 인자 (TF), CaCl<sub>2</sub>, 및 인지질을 상기 혼합물에 첨가하였다. 응고 시간(초)를 측정하였다. 효능은, FVII-CTP 및 FVII-(CTP)<sub>2</sub> 수확물의 용량 반응 곡선을 rhFVII 또는 인간 풀 혈장으로 구성된 기준 조제물과 비교하여, 평가하였다. 활성화형 FVII의 1 유닛은 인간 정상 혈장 1 ml의 활성화에 해당하는 FVLL의 양으로 정하였다. rFVII 및 rFVII-CTP의 PT 응고 활성을 응고측정기 (coagulometer)(Instrumentation Laboratory)에서 측정하였다.

[0262] 앞서 나타낸 바와 같이, rFVII 단백질의 C-말단에 CTP 펩타이드의 부가는 이의 세린 프로테아제 활성을 손상시키지 않았으며, 인간 혈장내에서의 천연 인자 X 및 인자 IX의 개시 및 활성화를 유도하였다. C 말단에 CTP 부가 후 세린 프로테아제 활성의 3배 감소가 관찰되었다(도 2D).

[0263] **약물 동태학 연구:** rFVII, rFVII-CTP, 및 rFVII-(CTP)<sub>2</sub> 수확물들을 스프라그 다우리 랫(물질 당 랫 6마리)에 100  $\mu$ g/kg(체중) 투여량으로 정맥내 주사로 투여하였다. 모든 생체내 실험에서는, 각 단백질의 양을 FVII Elisa 키트로 결정하였다. 각 FVII 테스트 기질의 경우, 주입량은 상이한 물 농도를 발생시키는 rFVII 대 rFVII-CTP의 분자량 차이를 고려하여 계산하였다.

[0264] 샘플링 공정 레벨의 간섭을 최소화하기 위해, 다양한 샘플 수득 계획에 따라 안와 뒷쪽으로부터 혈액 샘플을 취하였다: 랫 3마리에서는 30분, 90분, 2시간, 6시간 및 48시간, 나머지 3마리 랫에서는 15분, 60분, 1.5시간, 4시간 및 24시간. 샘플링한 즉시 혈장을 분리하여 분석하기 전까지 -20℃에 보관하였다. FVII 농도는 FVII Elisa 특이 분석에 의해 정량하였다. 반감기와 곡선하 면적(AUC)을 선형 트라페조이드 규칙(linear trapezoidal rule)을 이용하여 계산하였다. 이들 소거 파라미터들을 비교한 결과, 생체내 반감기와 rFVII-(CTP)<sub>2</sub> AUC가 rFVII 보다 현저하게 높은 것으로 나타났다(표 11).

### 표 11

[0265] PK 실험 파라미터

그룹	경로	투여량 $\mu$ g/kg	T <sub>1/2</sub> 분	AUC <sub>0-t</sub> ng/min/mL	CL/F mL/min/kg	MRT 분
FVII	IV	60	4.07	3314.7	6.195	6.2
FVII-CTP	IV	60	$\beta$ = 51.06	31353.9	0.287	73.7
FVII-CTP-CTP	IV	60	$\beta$ = 13.66	7626.8	1.18	15.4

[0266] **재조합 FVIIa-CTP의 특성화:**

[0267] 활성화 동안에, FVII은 하나의 이황화 결합에 의해 결합되어 있는 중쇄 및 경쇄 도메인을 형성하는 R152를 절단한다. rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>를 이온 교환 컬럼 정제 공정으로 정제 및 활성화한다. rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>를 충분히 평가하기 위해, 단백질을 시판 FVIIa (Novoseven<sup>®</sup>)에 대한 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 로딩하였다. 중쇄와 경쇄 도메인이 분리되어 분자량 55 및 25 KDa의 분리된 밴드로 이동하였다. 이들 단백질들은 FVII에 특이적인 항체에 반응하였고, rFVIIa-CTP의 중쇄는 특이적으로 항-CTP 특이 항체에 반응하였는데, 이는, 이 밴드가 CTP 융합된 FVII 중쇄임을 의미한다. 경쇄는 감마 카르복실라제 Ab에 특이적으로 반응하였다. FVIIa 단백질의 농도는 FVIIa 특이적인 ELISA 키트로 결정하였다.

[0268] **FVIIa N-말단 서열 분석:**

[0269] 활성화 형태의 rFVII-CTP-CTP 또는 자이모겐 정제된 단백질을 SDS-PAGE (12% 트리스-글리신)로 분리시킨 다음, PVDF 막으로 전기적으로 블롯팅하였다. 대상 밴드들을 잘라서, 정제된 바이오브렌 처리된 유리섬유 필터 상에 두었다. N-말단 서열 분석은 140 C HPLC 마이크로-농도구배 시스템이 장착된 펄스형 액상 단백질 서열분석기를 이용하여 에드만 분해로 수행하였다. N-말단 서열분석에 의해, 재조합 단백질의 정제와 적합한 프로-펩타이드 절단이 추가적으로 검증되었다.

[0270] **FVIIa 응고 활성:**

[0271] FVII-(CTP)<sub>2</sub> 응고 활성을 평가하기 위해, 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 분석을 수행하였다. FVIII

결핍성 혈장 샘플을 rFVIIa (NovoSeven) 또는 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>로 교체하고, FVII 결핍성 인간 혈장 혈장 300  $\mu$ l를 특정 농도의 FVIIa 또는 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>, 또는 추가적으로 희석한 정상 풀 인간 혈장 100  $\mu$ l와 혼합하였다. 37 °C에서 60초간 인큐베이션한 후, 조직 인자 (TF), CaCl<sub>2</sub>, 및 인지질을 상기 혼합물에 첨가하였다. 응고 시간 (초)를 측정하였다. 효능은 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>의 용량 반응 곡선을 rhFIX 또는 인간 풀 정상 혈장으로 구성된 기준 조제물과 비교함으로써 평가하였다. FVIIa 1 단위는 1 ml 인간 정상 혈장의 활성화에 해당되는 FVIIa의 양으로서 규정하였다. rFVII 및 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>의 aPTT 응고 활성화는 비슷하였다.

[0272] **랫에서의 약물 동태학 연구:**

[0273] rFVIIa에 CTP 부가가 장기간의 수명 잠재성에 미치는 영향을 특정화하기 위해, 랫에서 비교 약물 동태 실험을 수행하였다. NovoSeven (rFVIIa)과 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>를 TBS 중에서 IV로 SD 랫 6마리에 주사하였다. FVIIa의 경시적인 수준을 FVIIa ELISA 키트를 이용하여 검출하였다. 각 단백질에 대해 반감기와 AUC를 계산하였다. 이들 소거 파라미터의 비교를 통해, rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>의 생체내 측정치, 즉 반감기, 수율 및 AUC가 NovoSevenare 보다 우수한 것으로 나타났다.

[0274] **FVIIa-CTP 생체내 효능 모델:**

[0275] rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>의 생체내 활성을 평가하기 위해, 응고 인자 Gla 도메인의 비타민 K 의존적인 감마 카르복실화를 저해하기 위한 목적으로 SD 랫 6마리에겐 펜프로코쿰(phenprocoumn)을 처리하였다. FVII의 짧은 반감기로 인해, 천연 FVIII는 다른 비타민 K 의존형 응고 인자들 보다 신속하게 고갈된다. 16시간 후, FVIII 활성화는 거의 완전히 고갈되는 것으로 확인되었다. 이 시점에, 보정된-응고 시간 감소를 확인하기 위해, 랫에 FVIIa를 외부적으로 첨가하였다. NovoSeven 및 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>를 비교하기 위해, 이들 단백질을 펜프로코쿰 처리한 지 16시간 후에 동일 투여량으로 랫에 주사하였다. 랫 혈액의 응고 시간은 2가지 재조합 단백질에 의해 정상 수치로 보정하였다. 이에, 2가지 단백질들은 이 모델에서 비슷한 효과를 나타내었다.

[0276] 별개의 실험으로, NovoSeven 및 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>를 펜프로쿰 처리 후 즉시 주사하였고, 16시간 후에 응고 파라미터를 측정하였다. NovoSeven은 짧은 반감기로 인해 이러한 조건 하에서 응고 시간을 보정하지 않았다. 반면, rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> 처리한 동물의 응고 시간은 건강한 대조군의 값에 가까운 수치로 보정되었다. 이는, rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>가 여전히 존재하고 있으면, 장기간 후에도 생물학적 활성을 유지함을 시사한다. 이러한 데이터는, CTP 변형된 rFVIIa를 이용시의 유효한 이점을 다시 검증해준다.

[0277] **FIX 고갈된 마우스 모델(아직 미수행):**

[0278] **FVIII 혈우병 마우스 모델:**

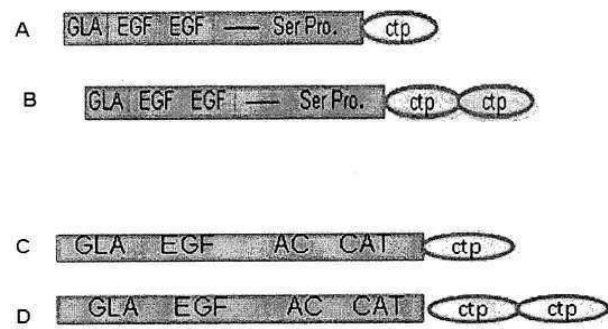
[0279] 생체내 활성 모델을 평가하기 위해, FVII 낫아웃 마우스를 수득하고, 품종 콜로니를 확립하였다. 시판되는 재조합 hFVIIa (Novoseven) 또는 rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub> 10  $\mu$ g을 마취한 FVIII 낫아웃 마우스(22-28g)의 꼬리 정맥에 주사하였다. 단백질의 주사량은 정상 혈장에서의 필요한 FVIII의 농도에 해당된다 (5  $\mu$ g/ml). 특정 시간대에 클리핑 평한 꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플을 취하여 헤파린 처리한 모세관에 넣었다. 혈장 샘플을 대상으로 ELISA에 의해 FVIIa 수준을 평가하고, aPTT 응고 분석으로 효능을 측정하였다.

[0280] 본 연구에서, FVII와 CTP의 융합 구조체를 제조하였다. 이 재조합 단백질은, 적합하며 유익한 치료 효능을 가지고 있으며 반감기 연장을 제공하는 치료에 대한 베이스이다.

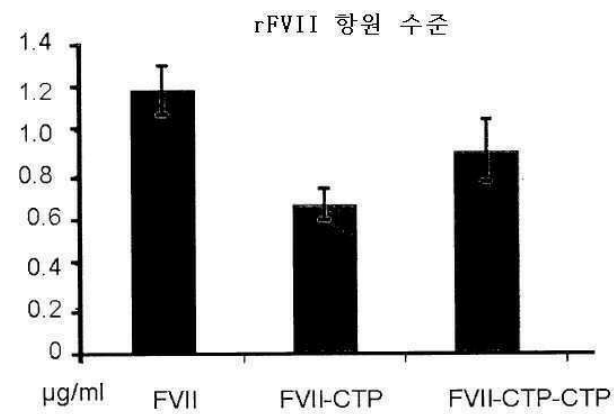
[0281] 이러한 결과들은, rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>가 혈우병 환자에서 rFVIIa와 유사한 치료 효능을 가진다는 것을 시사한다. 아울러, 이러한 기법에는 낮은 투약 빈도가 필요하다. rFVIIa-(CTP)<sub>2</sub>의 1회 주사만으로도 출혈 발생을 통제하고 외과 개입 동안에 필요한 주입 횟수를 감소시키는데 충분한 것으로 보인다. 이들 재조합 단백질은 장기적인 예방 치료제로서 사용할 수 있다.

## 도면

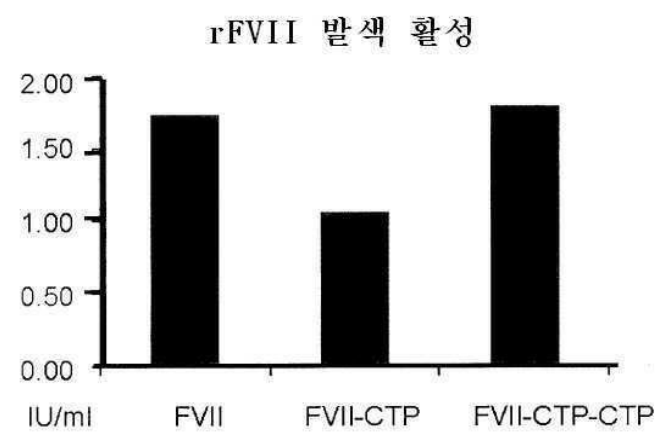
### 도면1



### 도면2a

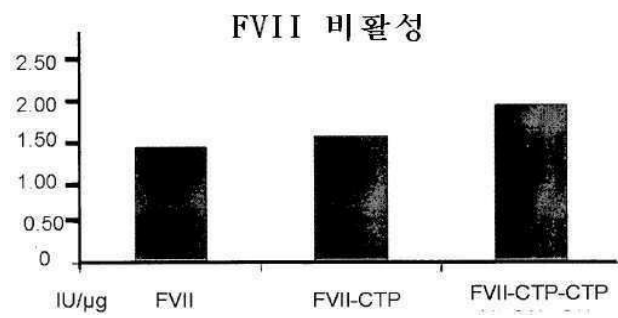


### 도면2b

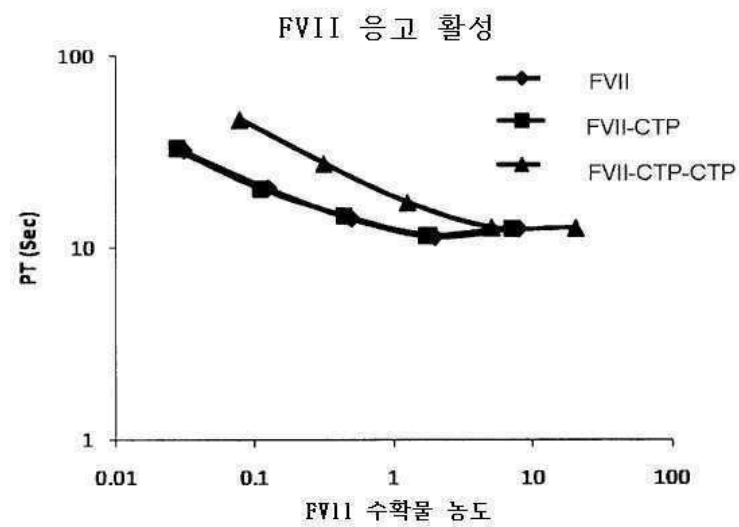




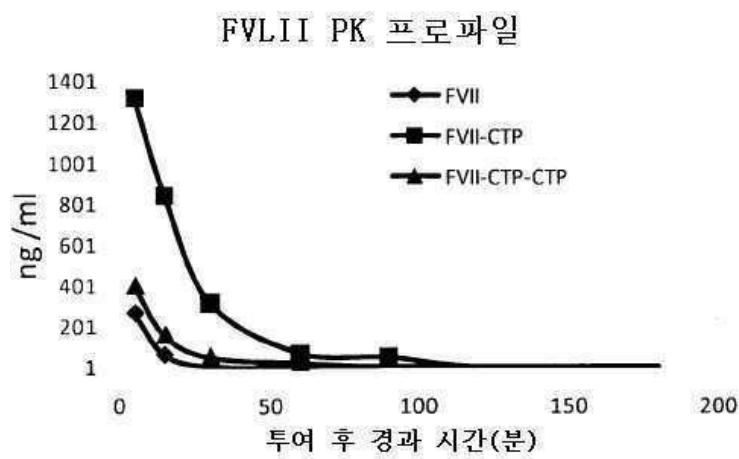
도면2c



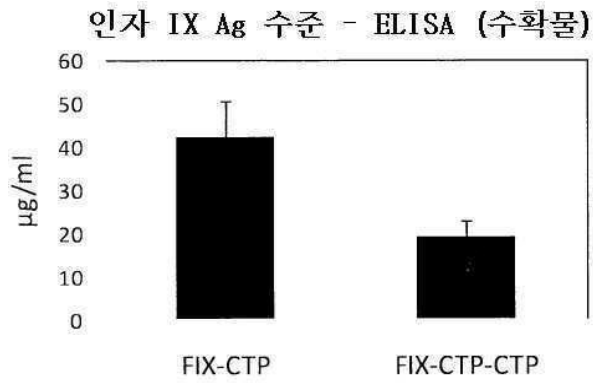
도면2d



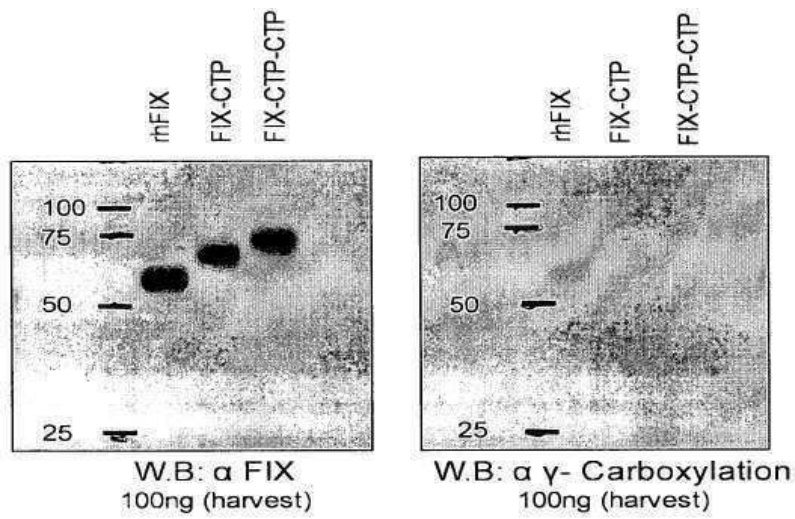
도면2e



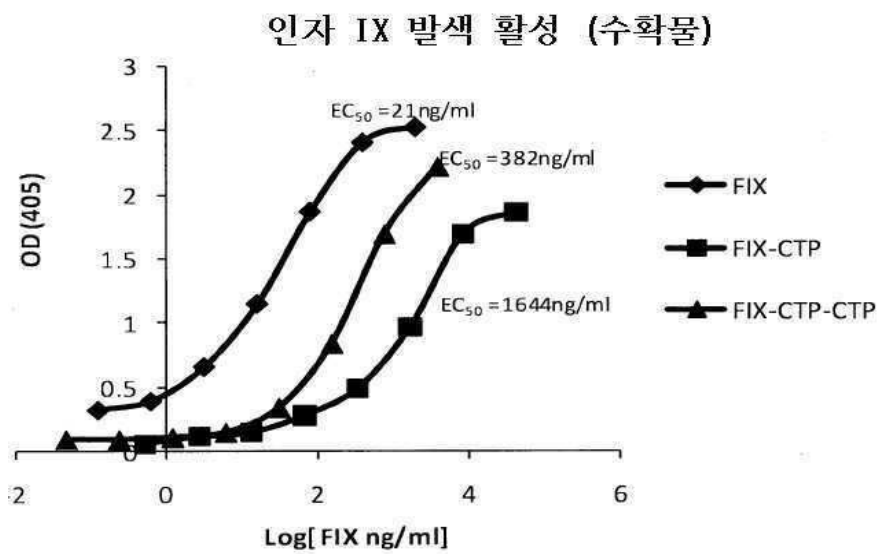
도면3a



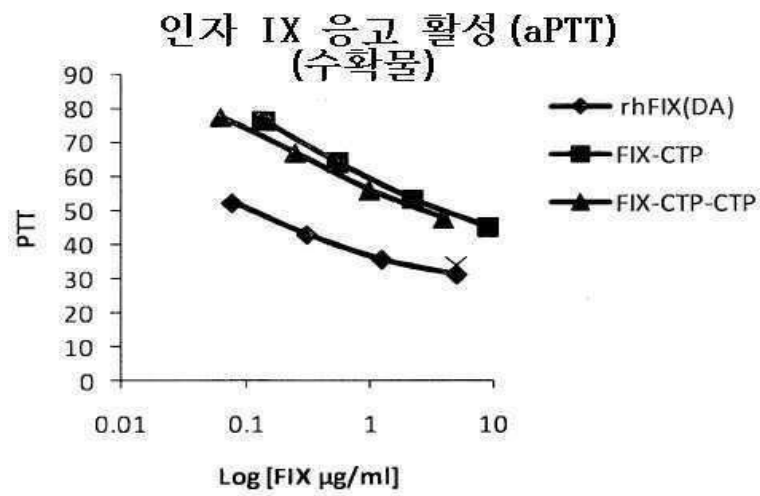
도면3b



도면4

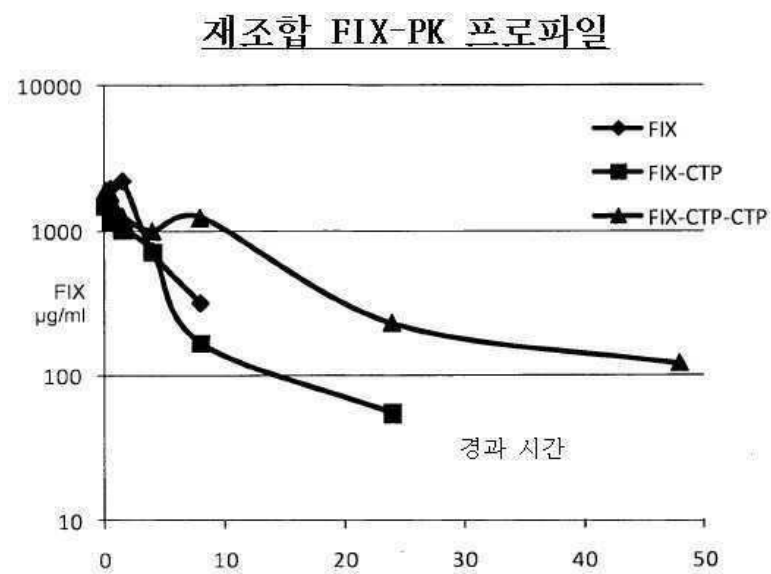


도면5



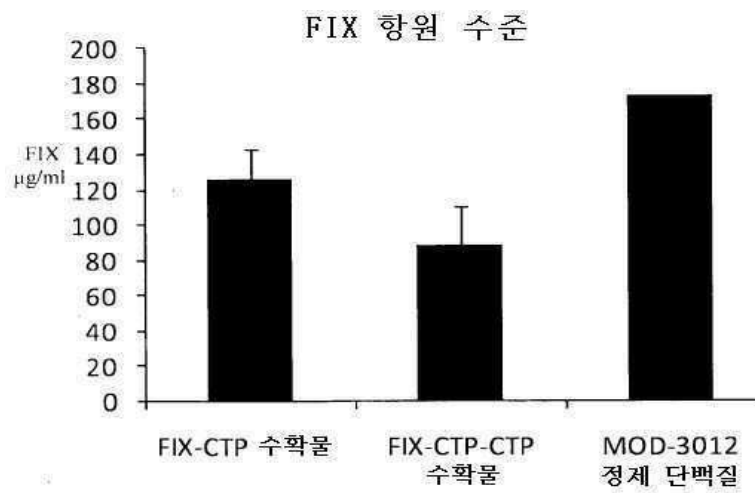
Protein	rh FIX	MOD-3011	MOD-3012
Specific Activity (U/mg)	214.5	30.45	38

도면6

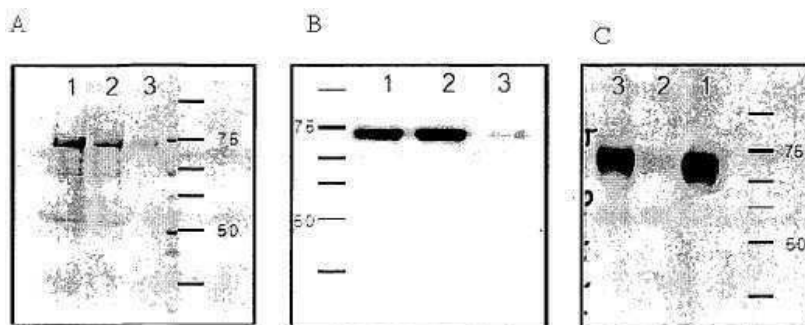




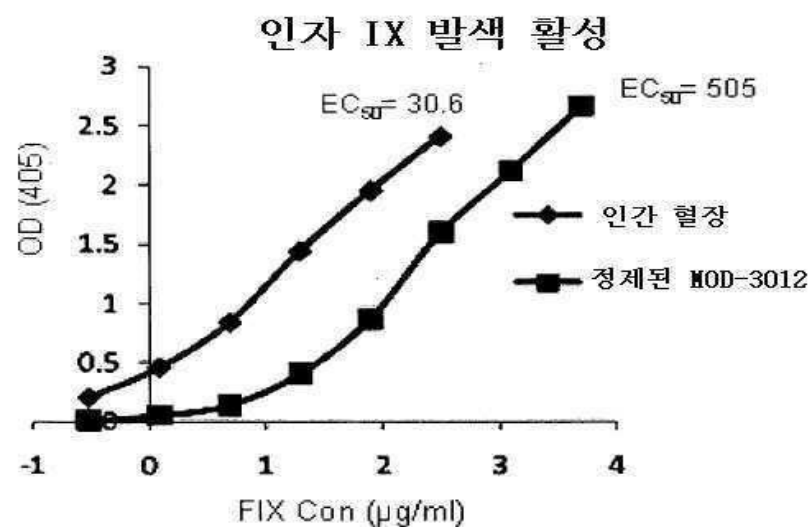
도면7



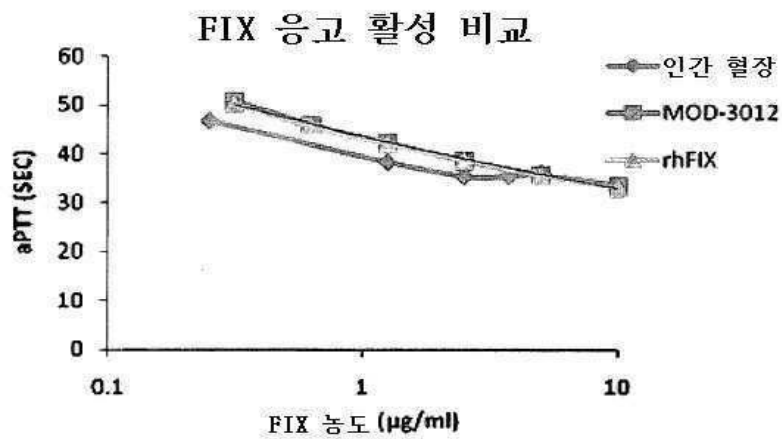
도면8



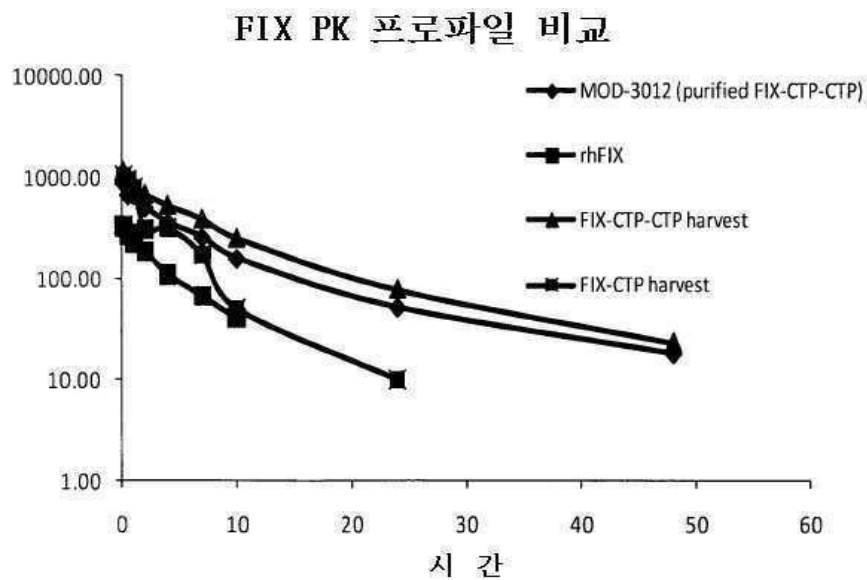
도면9



도면10



도면11



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Prolor Biotech Inc.

<120> LONG-ACTING COAGULATION FACTORS AND METHODS OF PRODUCING SAME

<130> P-9520-PC3

<140> PCT/IL2010/000532

<141> 2010-07-01

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

20 25 30

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

1 5 10

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 ctcgaggaca tggctctcca ggccc 25  
 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 tctagaatag gtatitttcc acatg 25  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 tctagaaaaa agaaatgcca gc 22  
 <210> 8  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 gcggccgcat cctcaggga atggggctcg ca 32  
 <210> 9  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20 25 30

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



275                      280                      285  
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg  
 290                      295                      300  
 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser  
 305                      310                      315                      320  
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325                      330                      335  
  
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340                      345                      350  
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355                      360                      365  
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370                      375                      380  
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385                      390                      395                      400  
  
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405                      410                      415  
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420                      425                      430  
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro  
 435                      440  
  
 <210> 10  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
  
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln  
 1                      5                      10                      15  
  
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val  
 20                      25                      30  
 Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro  
 35                      40                      45

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

290	295	300	
Thr Phe Ser Glu Arg Thr	Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315	320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met			
325	330	335	
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser			
340	345	350	
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala			
355	360	365	
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly			
370	375	380	
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val			
385	390	395	400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr			
405	410	415	
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu			
420	425	430	
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg			
435	440	445	
<210> 11			
<211> 1356			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 11			
ctcgaggaca tggctctcca ggccctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc	60		
tgcctggctg cagtcttctg aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg	120		
cgcgccaacg cgttctctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180		
gagcagtgtc ctttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240		
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc	300		
tcctgcaagg accagctcca gtccatatc tgtttctgcc tcctgcctt cgagggccgg	360		
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420		

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttgggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggacctga tcaacacat ctgggtgggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcggtgggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgtgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcttactga ccatgtggtg 900

ccctctgccc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgtttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaactgac cccgctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggtggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200

ggcatcgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggccc actttggggt gtacaccagg 1260

gtctccagc acatcgagt gctgcaaaag ctcatgcgt cagagccacg cccaggagtc 1320

ctctgcgag cccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

<210> 12

<211> 1442

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ctcaggagca tggctctcca ggccctcagg ctctctgccc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcttggtc cagttctctg aaccaggag gaagccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcccaacg cgttctctga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgt cttcaggga ggcccgagg atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tctgcaagg accagctcca gtctatatc tgtttctgcc tccctgctt caggggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acgggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660  
gggacacctga tcaacaccat ctgggtgggtc tccgcggccc actgtttcga caaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgtctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
gagcagagcc ggcggtgggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
aaccacgaca tcgcgtctgt ccgcctgcac cagcccggtg tcttactga ccatgtggtg 900  
ccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgtttctca 960  
ttggtcagcg gctggggcca gctgtgggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
ctcaactgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080  
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggac acttcggcgt gtacaccagg 1260  
gtgtccaggt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccgcgctg 1320  
ctgtgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380  
cctagcagac tgctggggc cagcgacacc cccatcctgc ccagtgagg atccgcggcc 1440  
gc 1442

<210> 13

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly



	85	90	95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro			
	100	105	110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile			
	115	120	125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr			
	130	135	140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala			
145	150	155	160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile			
	165	170	175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val			
	180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu			
	195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile			
	210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg			
225	230	235	240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly			
	245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr			
	260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln			
	275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg			
	290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser			
305	310	315	320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met			
	325	330	335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350  
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365  
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400  
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415  
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430  
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
 435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
 450 455 460  
 Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 465 470

<210> 14

<211> 1535

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

ctcgaggaca tggctctccca ggccctcagg ctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc	60
tgcttggtg cagtcttcgt aaccaggag gaagccacg gcgtcctgca cggcgccgg	120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag	180
gagcagtgtc cttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg	240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc	300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatac tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg	360
aactgtgaga cgcacaagga tgaccagtg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag	420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgtcctgtc ggtgccacga ggggtactct	480
ctgctggcag acgggggtgc ctgcacacc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct	540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caggccgaa ttgtggggg caaggtgtgc 600  
 cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720  
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780  
 gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840  
 aaccacgaca tcgcgtgctt ccgcctgcac cagcccgtgg tctcactga ccatgtggtg 900  
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgtttctca 960  
 ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020  
 ctcaacgtgc cccggtgat gacccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140  
 tgcaaggggg acagtggagg ccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200  
 ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc atttcggcgt gtacaccagg 1260  
 gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccgcgctg 1320  
 ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc cteccctag cctgccagc 1380  
 cctagcagac tgctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctctaag 1440  
 gcccctctc catccctgcc atccccctc cggtgccag gcccctctga caccctatc 1500

ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 1535

<210> 15  
 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

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

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu  
 50 55 60  
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile

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

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser  
 340 345 350  
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala  
 355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly  
 370 375 380  
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val  
 385 390 395 400  
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr  
 405 410 415  
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu  
 420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser  
 435 440 445  
 Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro  
 450 455 460  
 Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro  
 465 470 475 480  
 Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro  
 485 490 495

Ile Leu Pro Gln  
 500

<210> 16

<211> 1404

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Cys Gly Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Gly Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Thr Cys Ala Thr



20 25 30  
 Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys  
 35 40 45  
 Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr  
  
 50 55 60  
 Thr Thr Thr Ala Gly Gly Ala Thr Ala Thr Cys Thr Ala Cys Thr Cys  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly  
 85 90 95  
 Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Gly Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Ala Ala Ala Cys Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Thr  
  
 115 120 125  
 Cys Thr Gly Ala Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala  
 130 135 140  
 Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Thr Thr Cys Ala Gly Gly Thr Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Thr Thr  
 165 170 175  
 Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala  
  
 180 185 190  
 Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala  
 195 200 205  
 Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala  
 210 215 220  
 Gly Ala Ala Gly Cys Ala Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr Gly Ala Ala Ala Gly  
  
 245 250 255  
 Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Gly Gly  
 260 265 270

Ala Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Thr Gly Thr Thr Gly Ala Thr Gly  
275 280 285

Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Cys  
290 295 300

Cys Ala Ala Thr Cys Cys Ala Thr Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr  
305 310 315 320

Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly  
325 330 335

Ala Thr Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Cys Cys Thr Ala  
340 345 350

Thr Gly Ala Ala Thr Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys  
355 360 365

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala  
370 375 380

Ala Gly Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Thr Thr Ala Gly Ala  
385 390 395 400

Thr Gly Thr Ala Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Ala Cys Ala Thr Thr  
405 410 415

Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Gly  
420 425 430

Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala  
435 440 445

Thr Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Ala Ala Cys Ala Ala Gly  
450 455 460

Gly Thr Gly Gly Thr Thr Thr Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala  
465 470 475 480

Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ala Thr Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr  
485 490 495

Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly  
500 505 510

Thr Cys Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly

515	520	525
Thr Gly Cys Cys Ala Thr	Thr Thr Cys Cys Ala Thr	Gly Thr Gly Gly
530	535	540
Ala Ala Gly Ala Gly Thr	Thr Thr Cys Thr Gly Thr	Thr Thr Cys Ala
545	550	555
Cys Ala Ala Ala Cys Thr	Thr Cys Thr Ala Ala Gly Cys	Thr Cys Ala
565	570	575
Cys Cys Cys Gly Thr Gly	Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys	Thr Gly Thr
580	585	590
Thr Thr Thr Thr Cys Cys	Thr Gly Ala Thr Gly Thr	Gly Gly Ala Cys
595	600	605
Thr Ala Thr Gly Thr Ala	Ala Ala Thr Thr Cys Thr	Ala Cys Thr Gly
610	615	620
Ala Ala Gly Cys Thr Gly	Ala Ala Ala Cys Cys	Ala Thr Thr Thr
625	630	635
Gly Gly Ala Thr Ala Ala	Cys Ala Thr Cys Ala Cys	Thr Cys Ala Ala
645	650	655
Ala Gly Cys Ala Cys Cys	Cys Ala Ala Thr Cys	Ala Thr Thr Thr
660	665	670
Ala Thr Gly Ala Cys Thr	Thr Cys Ala Cys Thr	Cys Gly Ala Gly Thr
675	680	685
Thr Gly Thr Thr Gly Gly	Thr Gly Gly Ala Gly	Ala Ala Gly Ala Thr
690	695	700
Gly Cys Cys Ala Ala Ala	Cys Cys Ala Gly Gly	Thr Cys Ala Ala Thr
705	710	715
Thr Cys Cys Cys Thr Thr	Gly Gly Cys Ala Gly	Gly Thr Thr Gly Thr
725	730	735
Thr Thr Thr Gly Ala Ala	Thr Gly Gly Thr Ala	Ala Ala Gly Thr Thr
740	745	750
Gly Ala Thr Gly Cys Ala	Thr Thr Cys Thr Gly	Thr Gly Gly Ala Gly
755	760	765

Gly Cys Thr Cys Thr Ala Thr Cys Gly Thr Thr Ala Ala Thr Gly Ala  
 770 775 780  
 Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Cys Thr  
 785 790 795 800  
 Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly  
 805 810 815  
 Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala Thr  
 820 825 830  
 Thr Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Gly Thr  
 835 840 845  
 Gly Ala Ala Cys Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Gly Ala Gly Gly  
 850 855 860  
 Ala Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Ala Thr Ala Cys Ala Gly Ala  
 865 870 875 880  
 Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly  
 885 890 895  
 Ala Thr Thr Cys Gly Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Cys Thr Cys  
 900 905 910  
 Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys  
 915 920 925  
 Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Thr Ala Cys  
 930 935 940  
 Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Cys  
 945 950 955 960  
 Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Cys Gly Ala  
 965 970 975  
 Ala Cys Cys Cys Thr Thr Ala Gly Thr Gly Cys Thr Ala Ala Ala Cys  
 980 985 990  
 Ala Gly Cys Thr Ala Cys Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala  
 995 1000 1005  
 Thr Thr Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Ala

1010	1015	1020
Ala Gly Gly Ala Ala Thr	Ala Cys Ala Cys Gly Ala	Ala Cys Ala
1025	1030	1035
Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr	Cys Ala Ala Ala Thr	Thr Thr Gly
1040	1045	1050
Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly	Cys Thr Ala Thr Gly	Thr Ala Ala
1055	1060	1065
Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly	Gly Gly Gly Ala Ala	Gly Ala Gly

1070	1075	1080
Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala	Cys Ala Ala Ala Gly	Gly Gly Ala
1085	1090	1095
Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys	Thr Thr Thr Ala Gly	Thr Thr Cys
1100	1105	1110
Thr Cys Cys Ala Gly Thr Ala	Cys Cys Thr Thr Ala	Gly Ala Gly
1115	1120	1125
Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr	Thr Gly Thr Thr Gly	Ala Cys Cys

1130	1135	1140
Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys	Ala Thr Gly Thr Cys	Thr Thr Cys
1145	1150	1155
Gly Ala Thr Cys Thr Ala Cys	Ala Ala Ala Gly Thr	Thr Cys Ala
1160	1165	1170
Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala	Thr Ala Ala Cys Ala	Ala Cys Ala
1175	1180	1185
Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly	Thr Gly Cys Thr Gly	Gly Cys Thr

1190	1195	1200
Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala	Ala Gly Gly Ala Gly	Gly Thr Ala
1205	1210	1215
Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys	Ala Thr Gly Thr Cys	Ala Ala Gly
1220	1225	1230
Gly Ala Gly Ala Thr Ala Gly	Thr Gly Gly Gly Gly	Gly Ala Cys
1235	1240	1245

Cys Cys Cys Ala Thr Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Ala Ala Gly

1250 1255 1260

Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr

1265 1270 1275

Thr Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Ala

1280 1285 1290

Thr Thr Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly

1295 1300 1305

Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly

1310 1315 1320

Gly Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Ala Thr

1325 1330 1335

Ala Thr Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Ala Thr Cys Cys Cys

1340 1345 1350

Gly Gly Thr Ala Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala

1355 1360 1365

Thr Thr Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala

1370 1375 1380

Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Cys Gly Cys

1385 1390 1395

Gly Gly Cys Cys Gly Cys

1400

<210> 17

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20

25

30



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

275 280 285  
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
 325 330 335  
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr

340 345 350  
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365  
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380  
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val

405 410 415  
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430  
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445  
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr  
 450 455 460

<210> 18

<211> 1502

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcgatcgcca tgcagcgct gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60  
 tgccttttag gatattact cagtgtctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120  
 aacaaaattc tgaatcgccc aaagaggat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180  
 gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240

tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtg 300  
gagtccaatc catgttttaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360  
tggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaagggtgg ttgctcctgt 480  
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540  
tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccc gtgctgagac tgtttttcct 600  
gatgtggact atglaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660  
acccaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgcaa accaggtcaa 720  
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780  
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840

gtgcgagtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900  
cgaattattc ctaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960  
cttctggaac tggacgaacc cttagtcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020  
gacaaggaat acacgaacat ctctctcaaa tttggatctg gctatgtaag tggctgggga 1080  
agagtcttc acaaaggag atcagcttta gttcttcagt acctagagt tccattgtt 1140  
gaccgagcca catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct 1200  
ggcttccatg aaggagtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttact 1260

gaagtggaag ggaccagttt cttaactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg 1320  
aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtag tcaactggat taaggaaaaa 1380  
acaaagctca ctagctccag cagcaaggcc cctccccga gccigccctc cccaagcagg 1440  
ctgcctgggc cctccgacac accaatcctg ccacagtat gaaggtctgg atccgcggcc 1500  
gc 1502

<210> 19

<211> 489

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1	5	10	15
Ile	Cys	Leu	Leu
Gly	Tyr	Leu	Leu
Ser	Ala	Glu	Cys
Thr	Val	Phe	Leu
20	25	30	

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

275 280 285  
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile

325 330 335  
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
 340 345 350  
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
 355 360 365  
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
 370 375 380  
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His

385 390 395 400  
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
 420 425 430  
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
 435 440 445  
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser

450 455 460  
 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

485

<210> 20

<211> 1585

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgata atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60

tgcccttttag gatattact cagtgtgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120

aacaaaattc tgaatcgcc aaagaggat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180

gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240

tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt 300

gagtcgaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360

tgggtgtccct ttggatttga aggaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtctgata acaagggtgt ttgtctctgt 480

actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540

tgtggaagag ttctgtttc acaaacttct aagctcacc gtgctgagac tgttttctc 600

gatgtggact atgtaaatc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660

accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgcaa accaggtcaa 720

ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780

aatgaaaaat ggattgtaac tctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840

gtcgcagggt aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aatgtgatt 900

cgaattattc ctaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960

cttctggaac tggacgaacc cttagtcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020

acaaggaata cacgaacatc ttctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080

gagttctcca caaagggaga tcagcttttag ttcttcagta ccttagagtt ccacttgttg 1140

accgagccac atgtcttca tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200

gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260

aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggaagag tgtgcaatga 1320

aaggcaaata tggaatatat accaaggat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380

caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgcctcc ccaagcaggc 1440

tgccctggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctctaaag gcccctctc 1500

catcctgcc atccccctc cggtgcctg gcccctctga caccctatc ctgcctcagt 1560

gatgaaggtc tggatccgc gccgc 1585

<210> 21

<211> 517

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 21

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys

50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln

85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile

100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys

115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe

130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly

145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe

165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala

180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu

195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe

210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp

225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly  
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu  
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn  
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu  
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile  
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr  
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val  
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg  
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His  
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val  
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly  
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser  
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser  
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro

485	490	495	
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr			
500	505	510	
Pro Ile Leu Pro Gln			
515			
<210> 22			
<211> 2413			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 22			
tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca	60		
ggaaccttgg tctgtctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg	120		
gctgtgcgca tccttgagg cccagcgggt gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc	180		
ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccacttct ggcatcgagg agtgacgaag	240		
cggctccctgt cgcctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag	300		
tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca	360		
gaccccaagt ttcttcagca gtggtacctg tctggtgtca ctacagcgga cctgaatgtg	420		
aaggcggcct gggcgcaggg ctacacaggg cagggcattg tggctccat tctggacgat	480		
ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagttttgat	540		
gtcaatgacc aggacctga cccccagcct cggtacacac agatgaatga caacaggcac	600		
ggcacacggt gtgcggggga agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tgggttaggt	660		
gtggcctaca acgcccgcct tggaggggtg cgcattcttg atggcgaggt gacagatgca	720		
gtggaggcac gctcgtctgg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg	780		
ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc	840		
ttcctgtggg ttagccaggg ccgagggggg ctgggtcca tctttgtctg ggcctcgggg	900		
aacgggggccc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg	960		
ctgtccatca gcagcgccac gcagtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgctcg	1020		
tccacactgg ccacgacctc cagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact	1080		
gacttgcggc agaagtgcac ggagtctcac acgggcacct cagcctctgc ccccttagca	1140		
gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa	1200		
cacctggtgg tacagacctc gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat	1260		
ggtgtgggccc ggaaagtgag ccactcatat ggctacgggc ttttggacgc aggcgcatg	1320		

gtggccctgg cccagaattg gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcac catcgacatc 1380

ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc 1440

ctgggcgagc ccaaccacat cactcggtctg gagcacgctc aggcgcggct caccctgtcc 1500

tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggtcagcc ccatgggcac ccgtccacc 1560

ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcag 1620

acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggg tcctagagat tgaaaacacc 1680

agcgaagcca acaactatgg gacgtgacc aagttcacc tcgtactcta tggcaccgcc 1740

cctgaggggc tgcccgatcc tccagaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagtcag 1800

gcctgtgtgg tgtgcgagga aggcctctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc 1860

cctccaggct tcgccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920

accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cagcctcat gtgccacatg ccaggggccc 1980

gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cagcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040

tgtccccgc aaagccagag cagccgagag tccccccac agcagcagcc acctcggtg 2100

ccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgtgcctc acacctgcct 2160

gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttctg 2220

gtcctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280

ggcctcatct ctiacaagg gctgccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340

tcagaagagg acgagggccg gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgcctc 2400

tgaacgcggc cgc 2413

<210> 23

<211> 794

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn

20 25 30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val

35 40 45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr

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

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr  
 325 330 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val  
 340 345 350  
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser  
 355 360 365  
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala  
 370 375 380  
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr  
 385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val  
 405 410 415  
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly  
 420 425 430  
 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg  
 435 440 445  
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg  
 450 455 460

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His  
 465 470 475 480  
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg  
 500 505 510  
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe  
 515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser  
 530 535 540  
 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr



545                      550                      555                      560  
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu  
                          565                      570                      575  
 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser  
                          580                      585                      590  
  
 Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys  
                          595                      600                      605  
 Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp  
                          610                      615                      620  
 Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val  
 625                      630                      635                      640  
 Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu  
                          645                      650                      655  
  
 Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu  
                          660                      665                      670  
 Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln  
                          675                      680                      685  
 Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu  
                          690                      695                      700  
 Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu  
 705                      710                      715                      720  
  
 Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu  
                          725                      730                      735  
 Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met  
                          740                      745                      750  
 Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln  
                          755                      760                      765  
 Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg  
                          770                      775                      780  
  
 Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu  
 785                      790