



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0037251
(43) 공개일자 2020년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/36 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/36 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7003691
(22) 출원일자(국제) 2018년07월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/041319
(87) 국제공개번호 WO 2019/010496
국제공개일자 2019년01월10일
(30) 우선권주장
62/530,024 2017년07월07일 미국(US)
62/546,999 2017년08월17일 미국(US)

(71) 출원인
박스알타 인코퍼레이티드
미국, 일리노이즈 60015, 배녹번, 1200 레이크사이드 드라이브
박스알타 게엠베하
스위스 6300 추크 제호러백 4
(72) 발명자
채프먼 미란다
미국 94105 캘리포니아주 샌프란시스코 스피어 스트리트 타워 원 마켓
에웬스타인 브루스
미국 02445 매사추세츠주 브루클라인 클라핀 패스 15
플로더 베티나
미국 94105 캘리포니아주 샌프란시스코 스피어 스트리트 타워 원 마켓
(74) 대리인
양영준, 류현경

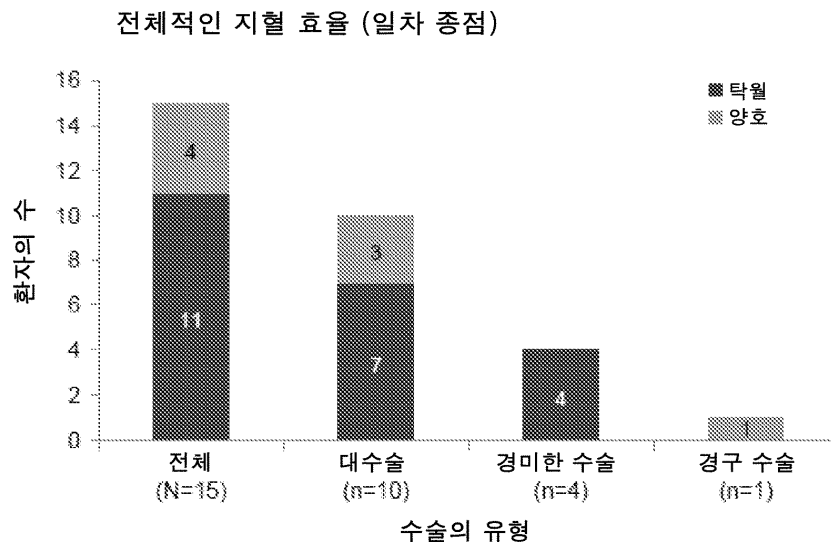
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 재조합 VWF의 투여에 의해 대기 수술을 받은 중증 폰 빌레브란트 병을 가지고 있는 환자의 치료

(57) 요약

본 발명은 수술 과정 이전 약 12시간 내지 약 24시간 사이에 약 20 IU/kg 내지 약 60 IU/kg rVWF의 범위인 용량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 수술 과정 이전에 심각한 폰빌레브란트병을 가진 대상체를 사전치료하는 방법에 관한 것으로, 여기서 인자 VIII (rFVIII)은 수술 과정 이전 rVWF와 함께 투여되지 않는다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

수술 이전에 심각한 폰빌레브란트병 (VWD)이 있는 대상체의 사전-치료를 위한 방법으로서, 상기 사전-치료는 상기 대상체에게 약 20-60 IU/kg의 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)를 수술 과정 이전 12시간 내지 24시간 사이에 투여하는 것을 포함하고 여기서 인자 VIII (FVIII)은 수술 과정 이전에 VWF와 함께 투여되지 않는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 사전-치료는 상기 수술 과정 1시간 이전에 상기 대상체에게 5-90 IU/kg rVWF를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, FVIII는 상기 수술 과정 후에 투여되지 않는, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 수술 과정은 대수술, 경미한 수술, 및 경구 수술로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 이전 12시간 내지 24시간 사이에 50-60 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정인, 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 이전 12시간 내지 24시간 사이에 35-60 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 대수술 과정인, 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 이전 12시간 내지 24시간 사이에 20-40 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경구 수술 과정인, 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 1시간 이전에 5-50 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정인, 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 1시간 이전에 15-90 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 대수술 과정인, 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 1시간 이전에 20-50 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경구 수술 과정인, 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 동안 10-50 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경구 수술 과정인, 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 후에 70-220 IU/kg rVWF가 투여되는, 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 후에 70-150 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정인, 방법.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 후에 150-220 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 대수술 과정인, 방법.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 상기 수술 과정 후에 20-50 IU/kg rVWF가 투여되고 상기 수술 과정은 경구 수술 과정인, 방법.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 100-220 IU/kg rVWF의 총 투약량이 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정인, 방법.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 220-320 IU/kg rVWF의 총 투약량이 투여되고 상기 수술 과정은 대수술 과정인, 방법.

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 대상체에는 70-190 IU/kg rVWF의 총 투약량이 투여되고 상기 수술 과정은 경구 수술 과정인, 방법.

청구항 19

청구항 1에 있어서, 상기 수술 과정은 대수술 과정이고 상기 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정이고 상기 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 용량의 rVWF를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 첫 번째 용량이 두 번째 용량보다 더 큰, 방법.

청구항 21

청구항 1에 있어서, 상기 수술 과정은 경구 수술 과정이고 상기 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 하기의 우선권을 주장한다: 미국특허 가출원 번호 62/546,999로, 2017년 8월 17일 출원된 것과, 미국특허 가출원 번호 62/530,024로, 2017년 7월 7일 출원된 것으로, 이들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 통합된다.

배경 기술

- [0003] 응고 질환, 예컨대 폰빌레브란트병 (VWD)은 일반적으로 응고 캐스케이드에서의 결핍으로 초래된다. 폰빌레브란트병 (VWD)은 폰빌레브란트 인자의 결핍에 의해 야기된 질환의 그룹을 지칭한다. 폰빌레브란트 인자는 혈소판이 함께 덩어리져 혈액 혈관 벽에 부착하는 데 도움이 되며, 이것은 정상적인 응혈을 위해 필요하다.
- [0004] 폰빌레브란트병 (VWD)은 1%의 추정된 유병률을 갖는 가장 흔한 선천적 출혈성 장애이다 (Veyradier A, 등, Medicine (Baltimore). 2016, 95(11): e3038). 그러나, 가벼운 형태의 질환을 제외하고, 단지 약 1/10,000 환자만이 실제로 치료를 요한다. 이들 응고장애에 대한 현재 치료는 정상 응고 인자를 포함하는 약제학적 제제를 사용한 대체 요법을 포함한다.
- [0005] VWF는 크기가 약 500 내지 20,000 kD의 범위인 일련의 다량체로서 혈장에서 순환하는 당단백질이다. VWF의 cDNA의 전장이 클로닝되었다; 프로폴리펩타이드는 전장 프리프로-VWF의 아미노산 잔기 23 내지 764에 상응한다 (Eikenboom et al (1995) Haemophilia 1, 77 90). VWF의 다량체 형태는 디설파이드 결합에 의해 함께 연결된 250 kD 폴리펩타이드 서브유닛으로 구성된다. VWF는, 더 큰 다량체가 향상된 지혈 활성을 나타내는 것으로, 손상된 혈관 벽의 내피밀층에 대한 초기 혈소판 접착을 매개한다. 다량체화된 VWF는 VWF의 A1 도메인에서의 상호작용을 통해 혈소판 표면 당단백질 Gp1b a에 결합하여 혈소판 접착을 촉진한다. VWF 상의 다른 부위 혈액 혈관 벽에 대한 결합을 매개한다. 따라서, VWF는 높은 전단 응력의 조건하에서 혈소판 접착 및 1차 지혈에 필수적인 혈소판과 혈관벽 사이에 브릿지를 형성한다. 정상적으로, 내피성 세포는 큰 중합체 형태의 VWF를 분비하고 더 낮은 분자량을 갖는 이들 VWF의 형태는 단백질분해 절단으로부터 발생한다. 예외적으로 큰 분자량의 다량체는 내피성 세포의 와이벨-팔레데 바다에 저장되고 효능제 예컨대 트롬빈 및 히스타민에 의한 자극에 의해 해방된다.
- [0006] VWD가 있는 환자에 대해, 특히 대수술에서 장기적인 지혈에 대한 요구가 있는 경우 폰빌레브란트 인자 (VWF) 대체로 치료하는 것이 권고된다 (Mannucci PM and Franchini M., Haemophilia, 2017, 23(2): 182-187; National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease NIH Publication No. 08-5832; December, 2007). 혈장-유래된 VWF 요법은 인자 VIII (FVIII)을 함유하고 반복된 투약으로 FVIII 축적에 대한 잠재력을 갖는다. VONVENDI[®] (폰빌레브란트 인자 [재조합], Shire, Westlake Village, CA)는 제1의 유일한 재조합 VWF (rVWF) 농축물이다 (Turecek PL, 등 Hamostaseologie. 2009;29(suppl 1): S32-38; Mannucci PM, 등 Blood, 2013;122(5): 648-657; Gill JC, 등 Blood, 2015;126(17): 2038-2046).

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이, 예를 들어, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 12 시간 및 24 시간, 14 시간 및 24 시간, 16 및 24 시간, 18 시간 및 24 시간, 또는 20 시간 및 24 시간에 환자에게 20-60 IU/kg 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)를 투여함에 의해 및 수술 과정 이전에 rVWF와 함께 인자 VIII (FVIII)를 투여하지 않음에 의해 수술 이전 심각한 폰빌레브란트병이 있는 환자에 대한 사전-치료의 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 사전-치료하는 방법은 수술 1 시간 이전에 상기 대상체에게 5-90 IU/kg rVWF를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체에게 상기 기재된 사전-치료와 함께 또는 없이 수술 후 70-200 IU rVWF가 투여된다. 일부 경우에, 수술 과정은 대수술, 경미한 수술, 및 경구 수술로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0008] 일부 구현예에서, 상기 대상체에는 대수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 35-60 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 대수술 과정 이전 1 시간에 15-90 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 대수술 과정 후에 150-220 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 대수술 과정을 받은 대상체는 220-320 IU/kg의 총 투약량이 투여된다. 일부 사례에서, 수술 과정이 대수술 과정인 경우 그리고 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "대략 동등"은 서로의 1-15%, 2-14%, 3-13%, 4-12%, 5-11%, 6-10%, 7-9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% 내인 농도를 갖는 용량을 지칭

한다.

[0009] 일부 구현예에서, 상기 대상체에는 경미한 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 50-60 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 경미한 수술 과정 이전 1 시간에 5-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 경미한 수술 과정 후에 70-150 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 경미한 수술 과정을 받은 대상체는 100-220 IU/kg의 총 투약량이 투여된다. 일부 사례에서, 수술 과정이 경미한 수술 과정인 경우, 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 용량의 rVWF를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 첫 번째 용량은 두 번째 용량보다 더 크다.

[0010] 일부 구현예에서, 상기 대상체에는 경구 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 20-40 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 경구 수술 과정 이전 1 시간에 20-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 경구 수술 과정 동안 10-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에는 경구 수술 과정 후에 70-150 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 경구 수술 과정을 받은 대상체는 70-190 IU/kg의 총 투약량이 투여된다. 일부 사례에서, 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우 그리고 사전-치료는 수술 과정 이전에 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 투여하는 것을 포함한다.

[0011] 본 발명의 다른 목적, 이점 및 구현예들은 다음의 상세한 설명으로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 연구 환자에서 전체적인 지혈 효율 (일차 종점)를 도시한다.

도 2는 연구 환자에서 지혈 효율 (2차 종점)를 도시한다.

도 3은 기준선 인구통계 및 임상 특성을 도시한다.

도 4는 VWF:RCo (n=11)에 대한 PK 파라미터를 도시한다.

도 5A 및 도 5B는 분석된 PK 데이터(n=11)(도 5A), 및 유형 3 VWD가 있는 환자의 서브셋(n=5)(도 5B)으로 VWD가 있는 모든 환자에서 rVWF 50±5 IU rVWF:RCo/kg에 반응한 평균 VWF:RCo 및 내인성 FVIII:C 수준을 도시한다.

도 6은 VWF 핵산 및 아미노산 서열을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 도입

[0014] 본 발명은 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)를 수술 과정 이전에 rVWF와 함께 인자 VIII를 투여함이 없이 환자에게 45-60 IG/kg rVWF를 투여함에 의해 수술 이전 심각한 폰빌레브란트병이 있는 환자를 사전치료하기 위한 방법을 제공한다. 일부 경우에, 수술 과정은 대수술, 경미한 수술, 및 경구 수술로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0015] PCT 출원 공개 번호 WO2012/171031의 개시내용은 모든 목적을 위해 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다.

[0016] 정의

[0017] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 “a”, “an” 및 “the”는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, “항체”에 대한 언급은 복수의 이러한 항체를 포함하고, “숙주세포”에 대한 언급은 하나 이상의 숙주세포 및 당해 분야의 숙련자에게 알려진 이들의 등가물, 등에 대한 언급을 포함한다. 청구항들은 임의의 선택적인 요소를 배제하기 위해 작성될 수 있다는 것이 추가로 인지된다. 이와 같이, 이 서술은 청구항 구성요소의 인용 또는 “부정적인” 제한의 사용과 관련하여 “단독으로”, “단지” 및 기타 동종의 것과 같은 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기초로서 제공되도록 의도된다.

[0018] 본 발명이 추가로 기재되기 전에, 본 발명은 기재된 특정 구현예로 제한되지 않으며, 이와 같이 물론 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 구현예만을 설명하기 위한 목적이며, 본 발명의 범위가 첨부된 청구항들에 의해서만 제한될 것이기 때문에 제한하려는 의도가 아님이 이해되어야 한다.

[0019] 용어 “프리-프로펩타이드 VWF”, “프리프로-VWF” 또는 “프로-VWF”는 약 22 아미노산 잔기의 신호 펩타이드, 약 741 아미노산 잔기의 VWF 프로펩타이드, 및 약 2050 아미노산 잔기의 성숙한 VWF 서브유닛을 포함하는 비-성숙

한 VWF 폴리펩타이드를 지칭한다. 프로-VWF 서브유닛은 내형질 망 내 그것의 카복실 말단 근처의 디설파이드 결합을 통해 이량체화하여 그 다음 골지로 수송되는 꼬리-대 꼬리 이량체를 형성할 수 있다. 골지에서, 추가의 헤드-대-헤드 디설파이드 결합은 서브유닛의 아미노-말단 근처에서 형성되고, 그것에 의해 다량체를 형성한다. VWF 폴리펩타이드의 단백질분해 절단은 프로테아제 푸린을 처리하는 것을 통하여 일어나고, 따라서 성숙한 VWF/VWF-PP 복합체를 생성한다. "r"이 VWF 지정 앞에 포함되는 경우, 이것은 재조합 버전을 지칭한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법은 재조합 VWF (rVWF)에 적용한다.

[0020] 용어 "VWF 복합체" 또는 "mat-VWF/VWF-PP 복합체"는 성숙한 VWF 서브유닛 및 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 비-공유결합된 헤테로이량체성 구조를 지칭한다. VWF 복합체는 프리-폴리펩타이드 VWF의 폴리펩타이드 부분과 성숙한 VWF 부분 사이의 푸린 절단의 생성물로서 생성될 수 있다. "r"이 VWF 지정 앞에 포함되는 경우, 이것은 재조합 버전을 지칭한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법은 재조합 VWF (rVWF)에 적용한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "rVWF"는 재조합 VWF를 지칭한다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "rFVIII"은 재조합 FVIII를 지칭한다.

[0022] 예를 들어, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터에 대한 참조와 함께 사용될 때 용어 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 고유 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 고유 (비-재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 달리는 비정상적으로 발현되거나, 이하로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 고유 유전자를 발현한다.

[0023] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "재조합 VWF"는 재조합 DNA 기술을 통해 수득된 VWF를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 VWF 단백질은, 예를 들어, 하기에서와 같이 제조된 작제물을 포함할 수 있다: 1986년 10월 23일 공개된 WO 1986/06096, 및 미국 특허 출원 일련번호 07/559,509로, Ginsburg 등의 이름으로 1990년 7월 23일 출원된 것, 이들은 재조합 VWF를 생산하는 방법에 관하여 본 명세서에 참고로 편입된다. 본 발명에서 VWF는 단량체성 및 다량체 형태를 포함한 모든 가능한 형태를 포함할 수 있다. 본 발명은 조합으로 사용되는 다른 형태의 VWF를 포괄한다는 것이 또한 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 발명의 VWF는 다른 다량체, 다른 유도체 및 생물학적 활성 유도체 및 생물학적 활성이 아닌 유도체 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 맥락에서, 재조합 VWF는, 예를 들어, 포유동물 예컨대 영장류, 인간, 원숭이, 토끼, 돼지, 설치류, 마우스, 랫트, 햄스터, 게르빌, 개과, 고양이, 및 이들의 생물학적 활성 유도체로부터 VWF 계열의 임의의 구성원을 포용한다. 활성을 갖는 돌연변이체 및 변이체 VWF 단백질은 또한 VWF 단백질의 기능적 단편 및 융합 단백질이기 때문에 포괄되어 진다. 게다가, 본 발명의 VWF는 정제, 검출, 또는 둘 모두를 촉진하는 태그를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 VWF는 치료적 모이어티 또는 시험관내 또는 생체내에서 이미징형성 적합한 모이어티로 추가로 변형될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "혈장-유래된 VWF (pdVWF)"는 적어도 하나의 FVIII 분자의 생체내-안정화, 예를 들어, 결합하는 특성을 갖는 포유동물로부터 수득된 성숙한 VWF를 포함한 혈액에서 발견된 모든 형태의 단백질질을 포함한다.

[0026] 용어 "고도로 다량체 VWF" 또는 "고분자량 VWF"는 적어도 10 서브유닛, 또는 12, 14, 또는 16 서브유닛, 내지 약 20, 22, 24 또는 26 서브유닛 또는 그 초과를 포함하는 VWF를 지칭한다. 용어 "서브유닛"은 VWF의 단량체를 지칭한다. 당업계에서 알려진 바와 같이, 이것은 일반적으로 더 큰 정도 다량체를 형성하기 위해 중합화하는 VWF의 이량체이다 (하기 참고: Turecek 등, Semin.Thromb.Hemost.2010, 36(5): 510-521로, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF의 다량체 분석에 관한 모든 교시를 위해 참고로 편입된다).

[0027] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "인자 VIII" 또는 "FVIII"은 환자에 내인성이든, 혈장으로부터 유래되든 또는 재조합 DNA 기술의 사용을 통해 생산되든 간에, 그리고 모든 변형된 형태의 인자 VIII를 포함한, 혈액 응고 인자 VIII의 전형적인 특성을 갖는 인자 VIII 분자의 임의의 형태를 지칭한다. 인자 VIII (FVIII)은 자연적으로 그리고 단일 유전자 산물에서 발생하는 폴리펩타이드의 불균질 분포로서 치료적 제제에 존재한다 (예를 들어, 하기 참고: Andersson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2979-2983 (1986)). 인자 VIII을 함유하는 치료적 제제의 상업적으로 입수가능한 예는 HEMOFIL M, ADVATE, 및 RECOMBINATE의 상표명 하에서 시판되는 것들을 포함한다 (미국 일리노이스주 디어필드 소재의 Baxter Healthcare Corporation으로부터 이용가능함).

[0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "혈장 FVIII 활성" 및 "생체내 FVIII 활성"은 상호교환적으로 사용된다. 표준 검정을 사용하여 측정된 생체내 FVIII 활성은 내인성 FVIII 활성, 치료적으로 투여된 FVIII의 활성 (재조합 또

는 혈장 유래된 것), 또는 내인성 및 투여된 FVIII 활성 둘 모두일 수 있다. 유사하게, "혈장 FVIII"은 내인성 FVIII 또는 투여된 재조합 또는 혈장 유래된 FVIII를 지칭한다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "폰빌레브란트병"은 폰빌레브란트 인자의 결핍에 의해 야기된 질환 군을 지칭한다. 폰빌레브란트 인자는 혈소판이 함께 덩어리져 혈액 혈관 벽에 부착하는 데 도움이 되며, 이것은 정상적인 응혈을 위해 필요하다. 본 명세서에 더욱 상세하게 기재된 바와 같이, 유형 1, 2A, 2B, 2M 및 3을 포함한 폰빌레브란트병의 몇 개의 유형이 있다.

[0030] 용어들 "단리된," "정제된," 또는 "생물학적으로 순수한"은 그것의 원상태에서 발견된 바와 같은 정상적으로 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 지칭한다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석적 화학 기술 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. VWF는 실질적으로 정제된 제제에 존재하는 우세한 종이다. 일부 구현예에서 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 일으키는 것을 나타낸다. 다른 구현예에서, 이것은 핵산 또는 단백질이 적어도 50% 순수하고, 더 바람직하게는 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 순수하다는 것을 의미한다. 다른 구현예에서 "정제한다" 또는 "정제"는 정제되는 조성물로부터의 적어도 하나의 오염물질을 제거하는 것을 의미한다. 이 관점에서, 정제는 정제된 화합물 균질한, 예를 들어, 100% 순수한 것을 요하지는 않는다.

[0031] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "투여하는 것" (및 모든 문법적 등가물)은 대상체에게 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 좌약으로 투여, 국소 접촉, 복강내, 병소내, 또는 비강내 투여, 또는 서방출 디바이스, 예를 들어, 미니-삼투 펌프의 이식을 포함한다. 투여는 비경구, 및 경점막 (예를 들어, 경구, 비강, 질, 직장, 또는 경피)를 포함한 임의의 경로에 의한다. 비경구 투여는, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 세동맥-내, 진피내, 피하, 복강내, 심실내, 및 두개내를 포함한다. 다른 전달 방식은, 비제한적으로, 리포솜 제형, 정맥내 주입, 경피 패치, 등의 사용을 포함한다.

[0032] 용어들 "치료 유효량 또는 용량" 또는 "치료적으로 충분한 양 또는 용량" 또는 "효과적인 또는 충분한 양 또는 용량"은 이것이 투여된 것에 대한 치료적 효과를 생성하는 용량을 지칭한다. 예를 들어, 혈우병을 치료하는데 유용한 약물의 치료 유효량은 혈우병과 연관된 하나 이상의 증상을 예방 또는 완화할 수 있는 양일 수 있다. 정확한 용량은 치료의 목적에 의존할 것이고, 알려진 기술을 사용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 확인가능할 것이다 (예를 들어, 하기 참고: Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); 및 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0033] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "환자" 및 "대상체"는 상호교환적으로 사용되고 질병을 갖거나 질병을 수축시킬 가능성을 갖는 포유동물 (바람직하게는 인간)을 지칭한다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 명시된 값의 플러스 또는 마이너스 10%의 대략적인 범위를 나타낸다. 예를 들어, 언어 "약 20%"는 18-22%의 범위를 포괄한다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "반감기"는 봉해되는 물질 (또는 샘플 또는 환자로부터의 청소능)의 양이 절반으로 감소하는 데 걸리는 기간을 지칭한다.

I. 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)

[0037] 본 발명은 수술 과정, 예컨대, 비제한적으로, 대수술, 경미한 수술, 또는 경구 수술을 받고 있는 심각한 VWD가 있는 대상체의 전처리를 위한 폰빌레브란트 인자 (rVWF)를 포함하는 조성물을 이용한다.

[0038] 특정 구현예에서, 본 발명의 VWF 단백질은, 예를 들어, 하기에서와 같이 제조된 작제물을 포함할 수 있다: 1986년 10월 23일 공개된 WO 1986/06096, 및 미국 특허 출원 일련번호 07/559,509로, Ginsburg 등의 이름으로 1990년 7월 23일 출원된 것, 이들은 재조합 VWF를 생산하는 방법에 관하여 본 명세서에 참고로 편입된다. 본 발명에 대해 유용한 VWF는 단량체성 및 다량체 형태를 포함한 모든 가능한 형태를 포함한다. 하나의 특히 유용한 형태의 VWF는 적어도 2개의 VWF의 호모-다량체이다. VWF 단백질은 생물학적 활성 유도체일 수 있거나, 또는 FVIII에 대해 안정화제로 단독으로 사용된 경우 VWF는 생물학적 활성이 아닌 형태의 것일 수 있다. 본 발명은 조합으로 사용되는 다른 형태의 VWF를 포괄한다는 것이 또한 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 조성물은 다른 다량체, 다른 유도체 및 생물학적 활성 유도체 및 생물학적 활성이 아닌 유도체 둘 모두를 포함할 수 있다.

- [0039] 일차 지혈에서 VWF는 혈소판과 세포외 기질, 예컨대 콜라겐의 특이적 성분 사이의 브릿지로 작용한다. 이 공정에서 VWF의 생물학적 활성은 다른 시험관내 검정에 의해 측정될 수 있다 (Turecek 등, Semin.Thromb.Hemost.28:149-160, 2002). 리스토세틴 보조인자 검정은 VWF의 존재에서 항생제 리스토세틴에 의해 유도된 신선한 또는 포르말린-고정된 혈소판의 응집에 기초한다.
- [0040] 혈소판 응집의 정도는 VWF 농도에 의해 좌우되고, 예를 들어 응집계의 사용에 의한, 비탁법에 의해 측정될 수 있다 (Weiss 등, J. Clin.Invest. 52:2708-2716, 1973; Macfarlane 등, Thromb.diath.Haemorrh.34:306-308, 1975). 제2 방법은 ELISA 기술에 기초한 콜라겐 결합 검정이다 (Brown et Bosak, Thromb.Res.43:303-311, 1986; Favaloro, Thromb.Haemost.83:127-135, 2000). 미세적정 플레이트는 유형 I 또는 III 콜라겐으로 코팅된다. 그런 다음 VWF는 콜라겐 표면에 결합되고 후속으로 효소-라벨링된 다클론성 항체로 검출된다. 마지막 단계는 ELISA 판독기로 측광으로 모니터링될 수 있는 기질 반응이다. 본 명세서에서 제공된 바와 같은, 본 발명의 VWF의 특이적 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo)은 일반적으로 시험관내 검정을 사용하여 측정된 바와 같은 VWF의 mU/ μ g의 관점에서 기재된다.
- [0041] pdVWF에 비한 본 발명의 rVWF 조성물의 이점은 rVWF가 pdVWF보다 더 높은 특이 활성을 나타낸다는 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 적어도 약 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45, 47.5, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5, 65, 67.5, 70, 72.5, 75, 77.5, 80, 82.5, 85, 87.5, 90, 92.5, 95, 97.5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 또는 그 초과 mU/ μ g의 특이 활성을 갖는다.
- [0042] 본 발명의 rVWF는 약 10 내지 약 40 서브유닛을 포함하는 고도로 다량체이다. 추가 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 생산된 다량체 rVWF는 약 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 서브유닛을 포함한다. 추가 구현예에서, rVWF는 40 서브유닛 (>10 백만 달톤)을 넘는 이량체부터 다량체까지로 크기에서 다양한 다량체로 존재한다. 최대 다량체는 혈소판 수용체 및 손상의 내피하 매트릭스 부위와 상호작용할 수 있고 VWF의 최대 지혈적으로 활성 형태인 다중 결합 부위를 제공한다. ADAMTS13의 적용은 경시적으로 극대형 rVWF 다량체를 단리할 것이지만, (일반적으로 세포 배양에서의 발현을 통한) 생산 동안, 본 발명의 rVWF 조성물은 일반적으로 ADAMTS13에 노출되지 않고 그것의 고도로 다량체 구조를 유지한다.
- [0043] 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용된 rVWF 조성물은 올리고머의 95%가 6 서브유닛과 20 서브유닛 사이를 갖는다는 점에서 특성규명된 rVWF 올리고머의 분포를 갖는다. 다른 구현예에서, rVWF 조성물은 올리고머의 95%가, 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된, WO 2012/171031의 표 2에서 발견된 변이체 458 내지 641로부터 선택된 서브유닛의 범위를 갖는다는 점에서 특성규명된 rVWF 올리고머의 분포를 갖는다.
- [0044] 일 구현예에서, rVWF 조성물은 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체에 존재하는 rVWF 분자의 백분율에 따라 특성규명될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용된 rVWF 조성물 내 적어도 20%의 rVWF 분자가 적어도 10개 서브유닛의 올리고머 착물에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용된 rVWF 조성물 내 적어도 20%의 rVWF 분자가 적어도 12개 서브유닛의 올리고머 착물에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법에서 사용된 rVWF 조성물은, 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된, 표 3 내지 표 5에서 발견된 변이체 134 내지 457 중 임의의 하나에 따른 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체 (예를 들어, 적어도 Y 서브유닛의 다량체)에 존재하는 rVWF 분자의 최소 백분율을 갖는다 (예를 들어, 적어도 X %를 갖는다).
- [0045] 상기에 따르면, (FVIII과 함께 또는 없이) 대상체에게 투여된 rVWF 조성물은 일반적으로 상당한 백분율의 고분자량 (HMW) rVWF 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, HMW rVWF 다량체 조성물은 적어도 10%-80% rVWF 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, 본 조성물은 약 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, HMW rVWF 다량체 조성물은 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다.
- [0046] rVWF 다량체의 수 및 백분율의 평가는, 예를 들어 하기 문헌에 의해 논의된 바와 같은, 비제한적으로, 크기에 의해 VWF 다량체를 분리하기 위한 전기영동 및 크기 배제 크로마토그래피 방법을 사용한 방법을 포함하는, 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다: Cumming 등, (J Clin Pathol.1993 May; 46(5): 470-473, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF의 다량체 분석에 관한 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). 이러한 기술은 면역블로팅 기술 (예컨대 웨스턴 블랏)을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 겔은 VWF에 대해 방사선평지된 항체로 면역블로팅되고 이어서 화학발광 검출된다 (예를 들어, 하기 참고: Wen 등, (1993), J. Clin.Lab.Anal., 7:317-323, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF의 다량체 분석에

관한 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). VWF에 대한 추가 검정은 VWF:항원 (VWF:Ag), VWF:리스토세틴 보조인자 (VWF:RCof), 및 VWF:콜라겐 결합 활성 검정 (VWF:CBA)을 포함하며, 이것은 폰빌레브란트병의 진단 및 분류를 위해 종종 사용된다. (예를 들어, 하기 참고: Favaloro 등, Pathology, 1997, 29(4): 341-456, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF에 대한 검정에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다).

[0047] 추가 구현예에서, 본 발명의 고차 rVWF 다량체는 투여 후 약 1 내지 약 90 시간 동안 안정하다. 또 추가의 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 약 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 시간 동안 안정하다. 또 추가의 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 시간 동안 안정하다. 특정 구현예에서 rVWF 다량체의 안정성은 시험관내 평가된다.

[0048] 일 구현예에서, 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에서 사용된 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 12 시간의 반감기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 24 시간의 반감기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는, 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된, WO 2012/171031의 표 6에서 발견된 변이체 642 내지 1045로부터 선택된 반감기를 갖는다.

[0049] 특정 양태에서, 본 발명에 따라 사용된 rVWF (재조합 또는 혈장 유래된 것)는 임의의 콘주게이션, 후-번역 또는 공유 변형으로 변형되지 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 폴리시알산, 하이드록실 에틸 전분, 폴리-탄수화물 모이어티, 및 기타 동종의 것을 포함한 수용성 폴리머로 변형되지 않는다.

[0050] 다른 양태에서, 본 발명에 따라 사용된 rVWF (재조합 또는 혈장 유래된 것)는 N- 또는 C-말단 잔기의 변형뿐만 아니라 선택된 측쇄, 예를 들어, 유리 설프하이드릴-기, 일차 아민, 및 하이드록실-기에서의 변형을 포함한, 콘주게이션, 후-번역 변형, 또는 공유 변형을 통해 변형된다. 일 구현예에서, 수용성 폴리머는 라이신기 또는 다른 일차 아민에 의해 (직접적으로 또는 링커를 통해) 단백질에 연결된다. 일 구현예에서, 본 발명의 rVWF 단백질은 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 폴리시알산, 하이드록실 에틸 전분, 폴리-탄수화물 모이어티, 및 기타 동종의 것을 포함한 수용성 폴리머의 콘주게이션에 의해 변형될 수 있다.

[0051] rVWF 및/또는 FVIII을 변형하기 위해 사용될 수 있는 수용성 폴리머는 선형 및 분지형 구조를 포함한다. 접합된 폴리머는 본 발명의 응고 단백질에 직접적으로 부착될 수 있거나, 또는 대안적으로 연결 모이어티를 통해 부착될 수 있다. 수용성 폴리머를 갖는 단백질 콘주게이션의 비-제한적인 예는 아래에 발견될 수 있다: 미국특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, 및 4,179,337뿐만 아니라 Abuchowski and Davis "Enzymes as Drugs," Holcenberg and Roberts, Eds., pp. 367 383, John Wiley and Sons, New York (1981), 및 Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008.

[0052] 단백질 콘주게이션은 수많은 당업계에서 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있고, 예를 들어, 하기를 참고한다: Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008. 그 예는 응고 단백질 또는 수용성 폴리머 모이어티 중 어느 하나의 상에 카복실기와 다른 것의 아민기 사이의 펩타이드 결합, 또는 하나의 카복실기와 다른 것의 하이드록실기 사이의 에스테르 결합을 통한 연결을 포함한다. 본 발명의 응고 단백질이 수용성 폴리머 화합물에 접합되어 질 수 있는 또 다른 연결은 피아이오테이트 산화에 의한 폴리머의 비-환원 말단에서 형성된 알데하이드기와 반응되는 폴리머 모이어티 상의 유리 아미노기 사이에 쉬프 염기를 통해 된다 (Jennings and Lugowski, J. Immunol. 1981; 127:1011-8; Femandes and Gregonradis, Biochim Biophys Acta. 1997; 1341: 26-34). 생성된 쉬프 염기는 NaCNBH₃와의 특이적 환원반응에 의해 안정화되어 이차 아민을 형성할 수 있다. 대안적인 접근법은 이전의 산화 후 NH₄Cl과 환원성 아미노화반응에 의해 폴리머 상에 말단 유리 아미노기의 생성이다. 이중작용성 시약은 2개의 아미노 또는 2개의 하이드록실기를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 아미노기를 함유하는 폴리머는 BS3 (비스(설포석신이미딜)우베레이트/Pierce, Rockford, Ill.) 같은 시약으로 응고 단백질의 아미노기에 커플링될 수 있다. 부가하여 설포-EMCS (N-엡실론.-말레이미도카프로일옥시) 설포석신이미드 에스테르/Pierce) 같은 이중이중작용성 크로스 연결 시약이 예를 들어 아민과 티올기를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 알데하이드 반응성 기, 예컨대 PEG 알콕시드 플러스 브로모아세트알데하이드의 디에틸 아세탈; PEG 플러스 DMSO 및 아세트산 무수물, 및 PEG 클로라이드 플러스 4-하이드록시벤즈알데하이드의 펜옥사이드, 석신이미딜 활성화인 에스테르, 활성화된 디티오카보네이트 PE.G., 2,4,5-트리클로로페닐클로로포르메이트 및 P-니트로페닐클로로포르메이트 활성화된 PE.G.가 응고 단백질의 콘주게이션에 사용될 수 있다.

[0053] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 rVWF는 퓨린으로 시험관내에서 성숙되었다. 추가 구현예에서, 퓨린

은 재조합 퓨린이다.

- [0054] 추가 양태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 rVWF는 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 포유동물 세포 배양에서 발현에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 포유동물 배양은 CHO 세포를 포함한다. 예시적인 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 CHO 세포 발현 시스템으로부터 단리된 rVWF 단백질을 포함한다. 추가 구현예에서, 프로캡타이드 제거는 시험관내에서 퓨린에 프로-VWF의 노출을 통해 매개되고--또 추가의 구현예에서, 프로캡타이드 제거를 위해 사용된 퓨린은 재조합 퓨린이다. 여전히 추가의 구현예에서, 완전하게 당화된/ABO 혈액형 글리칸은 부재한다.
- [0055] 또 추가의 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용된 rVWF는 적합한 진핵생물 숙주 시스템에서 발현에 의한다. 진핵 세포의 예는, 비제한적으로, 포유동물 세포, 예컨대 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2; 곤충 세포, 예를 들어, SF9 세포, SF21 세포, S2 세포, 및 하이 파이프 세포; 및 효모 세포, 예를 들어, 사카로마이세스 또는 쉬조사카로마이세스 세포를 포함한다. 일 구현예에서, VWF는 효모 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 포유동물 세포, 및 기타 동종의 것에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 인간 세포주, 햄스터 세포주, 또는 쥐 세포주 내.하나의 특별한 구현예에서, 세포주는 CHO, BHK, 또는 HEK 세포주이다. 전형적으로, 포유동물 세포, 예를 들어, 연속적 세포주로부터 CHO 세포가 본 발명의 VWF를 발현하기 위해 사용될 수 있다.
- [0056] 특정 구현예에서, VWF에 대해 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 서열은 벡터일 수 있다. 벡터는 바이러스에 의해 전달될 수 있거나 또는 플라스미드일 수 있다. 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 특이 유전자 또는 이들의 생물학적으로 기능성 부분일 수 있다. 일 구현예에서, 단백질은 VWF의 적어도 생물학적 활성 부분이다. 다양한 벡터가 VWF의 발현을 위해 사용될 수 있고 진핵 발현 벡터로부터 선택될 수 있다. 진핵 발현을 위한 벡터의 예는 하기를 포함한다:(i) 효모에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 AOX1, GAP, GAL1, AUG1, 등을 사용한 벡터 예컨대 pAO, pPIC, pYES, pMET; (ii) 곤충 세포에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, 등을 사용한 벡터 예컨대 pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, 등, 및 (iii) 포유동물 세포에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, 및 β -액틴을 사용한 벡터 예컨대 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, 등, 및 바이러스 시스템 예컨대 백시니아 바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 등으로부터 유래된 벡터.
- [0057] 본 발명의 일부 구현예에서, 핵산 서열은 단백질 예컨대 프로모터 서열, 향상제, TATA 박스, 전사 시작 부위, 폴리링커, 제한 부위, 폴리-A-서열, 단백질 프로세싱 서열, 선택 마커, 및 당해 분야의 숙련자에게 일반적으로 알려진 기타 동종의 것의 제어된 발현에 대해 적합한 다른 서열을 추가로 포함한다.
- [0058] 특정 구현예에서, 본 발명의 세포-배양 방법은 미세캐리어의 사용을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 구현예의 세포-배양은 높은 세포 밀도 및 단백질 발현을 달성하기 위한 높은 용적-특이적 배양 표면적을 제공하기에 적합한 조건 하에서 큰 생물반응기에서 수행될 수 있다. 이러한 성장 조건을 제공하기 위한 하나의 수단은 교반 탱크 생물반응기에서 세포-배양을 위한 미세캐리어를 사용하는 것이다. 미세캐리어 상에 세포-성장의 개념은 먼저 van Wezel에 의해 기술되었고 (van Wezel, A.L., Nature 216:64-5 (1967)) 그리고 성장 배지에 현탁된 작은 고체 입자의 표면 상에 세포 부착을 허용한다. 이들 방법은 높은 표면-대-용적 비를 제공하고 따라서 효율적인 영양소 이용을 허용한다. 게다가, 진핵 세포주에서 분비된 단백질의 발현에 대해, 증가된 표면-대-용적 비는 더 높은 분비 수준을 허용하고 따라서 배양물의 상청액에서 더 높은 단백질 수율을 허용한다. 마지막으로, 이들 방법은 진핵 발현 배양의 용이한 규모확대를 허용한다.
- [0059] VWF를 발현하는 세포는 세포 배양물 성장 동안 구형 또는 다공성 미세캐리어에 결합될 수 있다. 미세캐리어는 Butler에서 기재된 바와 같이 텍스트란, 콜라겐, 플라스틱, 젤라틴 및 셀룰로스 및 기타 상에 기초한 미세캐리어의 군으로부터 선택된 미세캐리어일 수 있다 (1988.In:Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology 3:283-303). 구형 미세캐리어 및 계대배양 상에서 세포를 바이오매스로 성장시키는 것으로 상기 세포가 최종 발효조 바이오매스에 도달된 때 그리고 다공성 미세캐리어 상에 발현된 단백질의 생산 이전 또는 그 반대일 때 세포를 성장시키는 것이 또한 가능하다. 적합한 구형 미세캐리어는 평활면 미세캐리어, 예컨대 Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, 및 Cytode™ 3 (GE Healthcare) 및 거대기공성 미세캐리어 예컨대 Cytopore™. 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, 및 Cytoline™ 2 (GE Healthcare)을 포함할 수 있다.
- [0060] 특정 구현예에서, rVWF는 고분자량 rVWF를 생산하는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에서 발현된다. 용어들 "세포 배양액", "세포 배양 배지 또는 배지들" 및 "세포 배양 상청액"은 일반적으로 당해 분야에서 잘 알려진 세포 배양 과정의 양태를 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 세포 배양액은 세포 배양 배지 및 세포 배양 상청액을 포함할 수 있다. 세포 배양 배지는 선택적으로 보충물과 함께 세포 배양액에 외부로 첨가되어 VWF를 발현하는 세포

를 배양하기 위한 영양소 및 다른 성분을 제공한다. 세포 배양 상청액은 세포 배양 배지로부터 영양소 및 다른 성분뿐만 아니라 배양 동안 세포로부터 방출된, 대사작용된, 및/또는 배출된 생성물을 포함하는 세포 배양액을 지칭한다. 추가 구현예에서, 배지는 동물 단백질-유리이고 화학적으로 한정될 수 있다. 동물 단백질-유리 및 화학적으로 한정된 배양 배지를 제조하는 방법은, 예를 들어, US 2008/0009040 및 US 2007/0212770에서 당해 기술에 공지되어 있고, 이 둘 모두는 본 명세서에 모든 목적을 위해 그리고 특히 세포 배양 배지에 관련된 모든 교시를 위해 편입된다. "단백질 유리" 및 관련 용어들은 배양 중에 세포에 외인성 또는 세포 이외의 원천으로부터 유래된 단백질을 지칭하며, 이는 성장 동안 자연적으로 단백질을 방출한다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 폴리캡타이드 유리이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청 유리이다. 또 다른 구현예에서 배양 배지는 동물 단백질 유리이다. 또 다른 구현예에서 배양 배지는 동물 성분 유리이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 단백질, 예를 들어, 혈청 예컨대 소태아 혈청으로부터 동물 단백질을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 배지는 외인성으로 첨가된 재조합 단백질을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 단백질은 공인된 병원체 없는 동물로부터의 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "화학적으로 한정된"은 배지가 임의의 미정의된 보충물, 예컨대, 예를 들어, 동물 성분, 기관, 선, 식물, 또는 효모의 추출물을 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서, 화학적 한정 배지의 각각의 성분은 정확하게 정의된다. 바람직한 구현예에서, 배지는 동물-성분이 없고 단백질이 없다.

[0061] 추가 구현예에서, 포유동물 세포 배양으로부터 정제에 후속하여, rFVIII은 투여 전에 재구성된다. 또 추가의 구현예에서, rVWF는 재구성 전 또는 후속하여 필터링으로 처리된다. 추가 구현예에서, 필터링은 재조합 필터링이다. 또 추가의 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 ADAMTS13에 노출되지 않아, 그 결과 극도로 크게 (즉, 10 또는 그 초과 서브유닛을 포함함) 본 발명의 rVWF 조성물에 존재한다.

[0062] 특정 양태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 rVWF는 완충액, 당 및/또는 당 알코올 (비제한적으로 트레할로스 및 만니톨을 포함함), 안정화제 (예컨대 글리신), 및 계면활성제 (예컨대 폴리소르베이트 80)를 함유하는 제형에 함유된다. 추가 구현예에서, rFVIII을 함유하는 제형의 경우, 본 제형은 추가로 나트륨, 히스티딘, 칼슘, 및 글루타티온을 포함할 수 있다.

[0063] 일 양태에서, rVWF를 포함하는 제형은 투여 이전에 동결건조된다. 동결건조는 당업계에서 일반적인 기술을 사용하여 수행되고 전개되는 조성물에 대해 최적화되어야 한다 [Tang 등, Pharm Res.21:191-200.(2004) 및 Chang 등, Pharm Res.13:243-9 (1996)].

[0064] 약제학적 제형을 제조하는 방법은 하기 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 동결건조하기 이전에 상기 혼합물에 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안정화제를 부가하는 단계, 동결건조 이전에 상기 혼합물에, 그 각각이 본 명세서에서 기재된 바와 같은, 증량제, 삼투물농도 조정 제제, 및 계면활성제로부터 선택된 적어도 하나의 제제를 부가하는 단계. 동결건조된 제형은, 일 양태에서, 적어도 완충액, 증량제, 및 안정화제 중 하나 이상으로 구성된다. 이 양태에서, 계면활성제의 유용성은 동결건조 단계 동안 또는 재구성 동안 응집이 문제가 되는 사례에서 평가되고 선택된다. 동결건조 동안 안정한 pH 영역 내에서 제형을 유지하기 위해 적절한 완충제가 포함된다.

[0065] 동결건조된 물질에 대한 표준 재구성 실시는 순수한 물 또는 멸균 주사용 물 (WFI)의 용적 (전형적으로 동결건조 동안 제거된 용적에 동등함)으로 다시 부가하는 것이지만, 항균제의 희석 용액이 비경구 투여용 의약품의 생산에 때때로 사용된다 [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. 따라서, 본 발명의 동결건조된 재조합 VWF 조성물에 희석제를 부가하는 단계를 포함하는 재구성된 재조합 VWF 조성물의 제조에 대한 방법이 제공된다.

[0066] 동결건조된 물질은 수용액으로 재구성될 수 있다. 다양한 수성 캐리어, 예를 들어, 주사용 멸균수, 다 용량 사용을 위한 보존제를 갖는 물, 또는 적절한 양의 계면활성제를 갖는 물 (예를 들어, 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 함께 혼합물 내에 활성인 화합물을 함유하는 수성 현탁액). 다양한 양태에서, 이러한 부형제는 현탁화제, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸쓰검 및 아카시아검이고; 분산제 또는 습윤제는 자연 발생 포스파타이드, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 레시틴, 또는 지방산과 알킬렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 장쇄 지방족 알코올과 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 또는 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분적 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트, 또는 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분적 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트이다. 다양한 양태에서, 수성 현탁액은 또한 하나 이상의

보존제, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 에틸, 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트를 함유한다.

[0067] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물은 주사기 또는 다른 저장 용기의 사용을 갖는 투여를 위한 액체 제형이다. 추가 구현예에서, 이들 액체 제형은 수용액으로 재구성된 본 명세서에 기재된 동결건조된 물질로부터 생산된다.

[0068] 추가 양태에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 추가로 포함한다. 어구 "약제학적으로" 또는 "약리적으로" 허용가능한은 안정하고, 단백질 분해 예컨대 응집 및 절단 생성물을 억제하고 그리고 부가하여 아래에 기재된 바와 같은 당업계에서 잘 알려진 경로를 사용하여 투여될 때 알려지성, 또는 다른 역반응을 생성하지 않는 분자 독립체 및 조성물을 지칭한다. "약제학적으로 허용가능한 캐리어"는, 상기에 개시된 제제들을 포함하여, 임의의 및 모든 임상적으로 유용한 용매, 분산매, 코팅물, 향균 및 향진균제, 등장성 및 흡수 지연제 및 동종의 것을 포함한다.

[0069] II. 재조합 VWF의 생산

[0070] 본 발명의 유리 성숙한 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)는 재조합으로 생산될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 숙주세포에서 재조합 단백질을 발현하기 위한 유용한 방법을 인지한다. 일부 사례에서, 상기 방법은 숙주세포 예컨대 a CHO 세포에서 rVWF를 인코딩하는 핵산 서열을 발현하는 단계 및 수득한 숙주세포를 특정 조건 하에서 배양하여 rVWF, 프리프로-VWF, 프로-VWF, 및 기타 동종의 것을 생산하는 단계를 포함한다.

[0071] 특정 구현예에서, VWF를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 서열은 발현 벡터일 수 있다. 벡터는 바이러스에 의해 전달될 수 있거나 또는 플라스미드일 수 있다. 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 특이 유전자 또는 이들의 생물학적으로 기능성 부분일 수 있다. 일 구현예에서, 단백질은 VWF의 적어도 생물학적 활성 부분이다. 핵산 서열은 단백질의 제어된 발현에 적합한 다른 서열 예컨대 프로모터 서열, 향상제, TATA 박스, 전사 시작 부위, 폴리링커, 제한 부위, 폴리-A-서열, 단백질 프로세싱 서열, 선택 마커, 및 당해 분야의 숙련가에게 일반적으로 알려진 기타 동종의 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 다양한 벡터가 VWF의 발현을 위해 사용될 수 있고 진핵 발현 벡터로부터 선택될 수 있다. 진핵 발현을 위한 벡터의 예는 하기를 포함한다: (i) 효모에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 AOX1, GAP, GAL1, AUG1, 등을 사용한 벡터 예컨대 pAO, pPIC, pYES, pMET; (ii) 곤충 세포에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, 등을 사용한 벡터 예컨대 pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, 등, 및 (iii) 포유동물 세포에서 발현에 대해, 프로모터 예컨대 CMV, SV40, EF-1, Ubc, RSV, ADV, BPV, 및 β -액틴을 사용한 벡터 예컨대 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, 등, 및 바이러스 시스템 예컨대 백시니아 바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 등으로부터 유래된 벡터.

[0073] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 rVWF는 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 포유동물 세포 배양에서 발현에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 포유동물 배양은 CHO 세포를 포함한다. 추가 구현예에서, rVWF는 동일한 배양물에서 재조합 인자 VIII (rFVIII)과 함께 공-발현된다. 그와 같은 구현예에서, rVWF 및 rFVIII은 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 함께 정제 (공-정제)되거나 또는 별도로 정제된다. 다른 구현예에서, rVWF는 rFVIII을 함유하지 않는 배양물에서 발현된다.

[0074] 일부 구현예에서, rVWF는 적합한 진핵생물 숙주 시스템으로부터 발현되고 단리된다. 진핵 세포의 예는, 비제한적으로, 포유동물 세포, 예컨대 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 및 HepG2; 곤충 세포, 예를 들어, SF9 세포, SF21 세포, S2 세포, 및 하이 파이프 세포; 및 효모 세포, 예를 들어, 사카로마이세스 또는 슈조사카로마이세스 세포를 포함한다. 일 구현예에서, VWF는 효모 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 포유동물 세포, 및 기타 동종의 것에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 인간 세포주, 햄스터 세포주, 또는 쥐와 세포주 내. 하나의 특별한 구현예에서, 세포주는 CHO, BHK, 또는 HEK 세포주이다. 전형적으로, 포유동물 세포, 예를 들어, 연속적 세포주로부터 CHO 세포가 본 발명의 VWF를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 특정 사례에서, VWF 단백질은 CHO 세포 발현 시스템으로부터 발현되고 단리된다.

[0075] VWF는 세포 배양 시스템에서 또는 당해 기술의 숙련가에 의해 인식된 임의의 세포 배양 방법에 따라 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 높은 세포 밀도 및 단백질 발현을 달성하기 위한 높은 용적-특이적 배양 표면적을 제공하기에 적합한 조건 하에서 큰 생물반응기에서 수행될 수 있다. 이러한 성장 조건을 제공하기 위한 하나의 수단은 교반 탱크 생물반응기에서 세포-배양을 위한 미세캐리어를 사용하는 것이다. 미세캐리어 상에 세포-성장의 개념은 먼저 van Wezel에 의해 기술되었고 (van Wezel, A.L., Nature 216:64-5 (1967)) 그리고 성장 배지에 현탁된 작은 고체 입자의 표면 상에 세포 부착을 허용한다. 이들 방법은 높은 표면-대-용적 비를 제공하고 따라서 효율적인 영양소 이용을 허용한다. 게다가, 진핵 세포주에서 분비된 단백질의 발현에 대해, 증가

된 표면-대-용적 비는 더 높은 분비 수준을 허용하고 따라서 배양물의 상청액에서 더 높은 단백질 수율을 허용한다. 마지막으로, 이들 방법은 진행 발현 배양의 용이한 규모확대를 허용한다.

[0076] VWF를 발현하는 세포는 세포 배양물 성장 동안 구형 또는 다공성 미세캐리어에 결합될 수 있다. 미세캐리어는 Butler에서 기재된 바와 같이 텍스트란, 콜라겐, 플라스틱, 젤라틴 및 셀룰로스 및 기타 상에 기초한 미세캐리어의 군으로부터 선택된 미세캐리어일 수 있다 (1988.In:Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology 3:283-303). 구형 미세캐리어 및 계대배양 상에서 세포를 바이오매스로 성장시키는 것으로 상기 세포가 최종 발효조 바이오매스에 도달된 때 그리고 다공성 미세캐리어 상에 발현된 단백질의 생산 이전 또는 그 반대일 때 세포를 성장시키는 것이 또한 가능하다. 적합한 구형 미세캐리어는 평활면 미세캐리어, 예컨대 Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, 및 Cytode™ 3 (GE Healthcare) 및 거대기공성 미세캐리어 예컨대 Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, 및 Cytoline™ 2 (GE Healthcare)을 포함할 수 있다.

[0077] 추가 구현예에서, VWF 프로펩타이드는 퓨린에 프로-VWF의 노출을 통해 시험관내에서 비-성숙한 VWF로부터 절단된다. 일부 구현예에서, 프로펩타이드 절단을 위해 사용된 퓨린은 재조합 퓨린이다.

[0078] 특정 구현예에서, rVWF는 고분자량 rVWF를 생산하는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에서 발현된다. 용어들 "세포 배양액", "세포 배양 배지 또는 배지들" 및 "세포 배양 상청액"은 일반적으로 당해 분야에서 잘 알려진 세포 배양 과정의 양태를 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 세포 배양액은 세포 배양 배지 및 세포 배양 상청액을 포함할 수 있다. 세포 배양 배지는 선택적으로 보충물과 함께 세포 배양액에 외부로 첨가되어 VWF를 발현하는 세포를 배양하기 위한 영양소 및 다른 성분을 제공한다. 세포 배양 상청액은 세포 배양 배지로부터 영양소 및 다른 성분뿐만 아니라 배양 동안 세포로부터 방출된, 대사작용된, 및/또는 배출된 생성물을 포함하는 세포 배양액을 지칭한다. 추가 구현예에서, 배지는 동물 단백질-유리이고 화학적으로 한정될 수 있다. 동물 단백질-유리 및 화학적으로 한정된 배양 배지를 제조하는 방법은, 예를 들어, US 2006/0094104, US 2007/0212770, 및 US 2008/0009040에서 당해 기술에 공지되어 있고, 이 둘 모두는 본 명세서에 모든 목적을 위해 그리고 특히 세포 배양 배지에 관련된 모든 교시를 위해 편입된다. "단백질 유리" 및 관련 용어들은 배양 중에 세포에 외인성 또는 세포 이외의 원천으로부터 유래된 단백질을 지칭하며, 이는 성장 동안 자연적으로 단백질을 방출한다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 폴리펩타이드 유리이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 혈청 유리이다. 또 다른 구현예에서 배양 배지는 동물 단백질 유리이다. 또 다른 구현예에서 배양 배지는 동물 성분 유리이다. 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 단백질, 예를 들어, 혈청 예컨대 소태아 혈청으로부터 동물 단백질을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 배지는 외인성으로 첨가된 재조합 단백질을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 단백질은 공인된 병원체 없는 동물로부터의 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "화학적으로 한정된"은 배지가 임의의 미정의된 보충물, 예컨대, 예를 들어, 동물 성분, 기관, 선, 식물, 또는 효모의 추출물을 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서, 화학적 한정 배지의 각각의 성분은 정확하게 정의된다. 바람직한 구현예에서, 배지는 동물-성분이 없고 단백질이 없다.

[0079] 특정 구현예에서, VWF를 발현하는 세포의 배양물은 적어도 약 7 일, 또는 적어도 약 14 일, 21 일, 28 일, 또는 적어도 약 5 주, 6 주, 7 주, 또는 적어도 약 2 개월, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 개월 동안 또는 더 길게 유지될 수 있다. 세포-배양이 재조합 VWF 단백질의 생산을 위해 유지되는 세포 밀도는 단백질 발현을 위해 사용된 배양-조건 및 배지에 의존할 것이다. 당해 분야의 숙련가는 VWF를 생산하는 세포-배양에 대한 최적의 세포 밀도를 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 일 구현예에서, 배양물은 연장된 기간 동안 약 0.5×10^6 내지 4×10^7 세포/ml의 세포 밀도로 유지된다. 다른 구현예에서, 세포 밀도는 연장된 기간 동안 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^7 세포/ml의 농도로 유지된다. 다른 구현예에서, 세포 밀도는 연장된 기간 동안 약 1.0×10^6 내지 약 4.0×10^6 세포/ml의 농도로 유지된다. 다른 구현예에서, 세포 밀도는 연장된 기간 동안 약 1.0×10^6 내지 약 4.0×10^6 세포/ml의 농도로 유지된다. 또 다른 구현예에서, 세포 밀도는 연장된 기간 동안 약 2.0×10^6 내지 약 4.0×10^6 , 또는 약 1.0×10^6 내지 약 2.5×10^6 , 또는 약 1.5×10^6 내지 약 3.5×10^6 , 또는 임의의 다른 유사한 범위의 농도로 유지될 수 있다. 세포 배양에서 적절한 시간 후, rVWF는 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 발현 시스템으로부터 단리될 수 있다.

[0080] 특정 구현예에서, rVWF의 생산을 위한 연속적 세포 배양의 세포 밀도는 연장된 기간 동안 2.5×10^6 세포/mL 이하의 농도로 유지된다. 다른 특정 구현예에서, 세포 밀도는 2.0×10^6 세포/mL 이하, 1.5×10^6 세포/mL, 1.0×10^6 세포/mL, 0.5×10^6 세포/mL, 또는 그 미만으로 유지된다. 일 구현예에서, 세포 밀도는 1.5×10^6 세포/mL 내지 2.5×10^6

세포/mL로 유지된다.

- [0081] 상기 기재된 세포 배양물의 일 구현예에서, 세포 배양액은 구리를 포함하는 배지 보충물을 포함한다. 이러한 세포 배양액은, 예를 들어, 하기에 기재되어 있다: 미국특허 번호 8,852,888 및 미국특허 번호 9,409,971, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 재조합 VWF를 생산하기 위한 세포 배양 방법 및 조성물과 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다.
- [0082] 프리프로-VWF의 폴리뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호:1 및 서열번호:2에 제시되어 있고, 각각 유전자은행 기탁 번호 NM_000552 (호모사피엔스 폰빌레브란트 인자 (VWF) mRNA) 및 NP_000543으로 이용가능하다. 성숙한 VWF 단백질에 상응하는 아미노산 서열은 하기에 제시되어 있다: 서열번호:3 (전장 프리프로-VWF 아미노산 서열의 아미노산 764-2813에 상응함). 일부 구현예에서, VWF는 서열번호:3의 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 100% 동일성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 서열번호:3의 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 100% 동일성을 나타낸다. 하기 참고, 예를 들어, 미국특허 번호 8,597,910, 미국특허 공보 번호 2016/0129090, 뿐만 아니라 도 6.
- [0083] 유용한 rVWF의 일 형태는 적어도 하나의 인자 VIII (FVIII) 분자의 생체내-안정화, 예를 들어 결합하는 특성 및 약리적으로 허용가능한 당화 패턴을 선택적으로 갖는 특성을 적어도 갖는다. 이들의 특정 예는 하기를 포함한다: A2 도메인 따라서 단백질분해에 대해 저항성 없는 VWF (Lankhof 등, Thromb.Haemost.77:1008-1013, 1997), 및 콜라겐과 헤파린에 대한 당단백질 1b-결합 도메인 및 결합 부위를 포함한 Val 449부터 Asn 730까지의 VWF 단편 (Pietu 등, Biochem.Biophys.Res.Commun.164:1339-1347, 1989). 일 양태에서, 적어도 하나의 FVIII 분자를 안정화시키는 VWF의 능력의 결정은 당업계에서의 상태에서 알려진 방법에 따라 VWF-결핍된 포유동물에서 수행된다.
- [0084] 본 발명의 rVWF는 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다. 하나의 특정 예는 1986년 10월 23일 공개된 WO86/06096, 및 1990년 7월 23일 출원된 미국 특허 출원 번호 07/559,509에 개시되어 있고, 이것은 재조합 VWF를 생산하는 방법에 관하여 참고로 본 명세서에 편입된다. 따라서, (i) 유전공학에 의해, 예를 들어 RNA의 역전사 및/또는 DNA의 증폭을 통해, 재조합 DNA의 생산, (ii) 형질감염에 의해, 예를 들어 전기천공 또는 미세주입을 통해, 원핵 또는 진핵 세포 안으로 재조합 DNA 도입하는 것, (iii) 예를 들어 연속적 또는 배치식 방식으로 전환된 세포를 배양하는 것, (iv) 예를 들어 구성적으로 또는 유도에 의해 VWF를 발현하는 것, 및 (v) 예를 들어 배양 배지로부터 또는 전환된 세포를 수확함에 의해 VWF를 분리하여, (vi) 예를 들어 음이온 교환 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피를 통해 정제된 rVWF를 수득하는 것에 대한 방법이 당해 기술에 공지되어 있다. 일 양태에서, 재조합 VWF는 당해 분야에서 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 전환된 숙주세포에서 제조된다. 예를 들어, 폴리펩타이드에 대해 코딩하는 서열은 적합한 제한 효소를 사용하여 DNA로부터 절단될 수 있다. 대안적으로, DNA 분자는, 또 다른 양태에서, 화학적 합성 기술, 예컨대 포스포르아미테이트 방법을 사용하여 합성된다. 또한, 또 다른 양태에서, 이들 기술의 조합이 사용된다.
- [0085] 본 발명은 또한 적절한 숙주에서 본 발명의 폴리펩타이드를 인코딩하는 벡터를 제공한다. 벡터는 적절한 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드가 벡터 안으로 삽입되기 전 또는 후에 이 조작적 연결을 유효하게 하는 방법은 잘 알려져 있다. 발현 조절 서열은 프로모터, 활성제, 향상제, 오퍼레이터, 리보솜 결합 부위, 개시 신호, 중단 신호, 캡 신호, 폴리아데닐화 신호, 및 전사 또는 번역의 조절과 관련된 다른 신호를 포함한다. 그 안에 폴리뉴클레오타이드를 갖는 수득한 벡터가 사용되어 적절한 숙주를 형질전환한다. 이 전환은 당해 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0086] 임의의 다수의 이용가능하고 잘-알려진 숙주세포가 본 발명의 실시에서 사용된다. 특정 숙주의 선택은, 예를 들어, 선택된 발현 벡터와 혼용성, DNA 분자에 의해 인코딩된 펩타이드의 독성, 전환율, 펩타이드의 회수의 용이, 발현 특성, 생체-안전성 및 비용을 포함하여, 당해 기술에 의해 인식된 수많은 인자에 의존적이다. 이들 인자의 균형은 특정 DNA 서열의 발현에 대해 모든 숙주세포가 동등하게 효과적이지 않다는 이해와 충돌되어야 한다. 이들 일반적인 지침 내에서, 유용한 미생물 숙주세포는, 비제한적으로, 배양중인 박테리아, 효모 및 다른 진균, 곤충, 식물, 포유동물 (인간을 포함함) 세포, 또는 당업계에서 알려진 다른 숙주를 포함한다.
- [0087] 전환된 숙주세포는 종래의 발효 조건하에서 배양되어 원하는 화합물이 발현된다. 이러한 발효 조건은 당해 기술에 공지되어 있다. 마지막으로, 폴리펩타이드는 배양 배지 또는 숙주세포 자체로부터 당해 분야에서 잘 알려진

방법에 의해 정제된다.

[0088] 본 발명의 화합물을 발현하기 위해 이용된 숙주세포에 의존하여, 탄수화물 (올리고당) 기는 단백질에서 당화 부위인 것으로 알려진 부위에 선택적으로 부착된다. 일반적으로, O-연결된 올리고당은 세린 (Ser) 또는 트레오닌 (Thr) 잔기에 부착되는 반면 N-연결된 올리고당은 이들이 서열 Asn-X-Ser/Thr의 일부일 때 아스파라긴 (Asn) 잔기에 부착되며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. X는 바람직하게는 프롤린을 고려하지 않은 19개 자연 발생 아미노산 중 하나이다. N-연결된 및 O-연결된 올리고당의 구조 및 각각의 유형에서 발견된 당 잔기는 상이하다. N-연결된 및 O-연결된 올리고당 둘 모두에서 통상적으로 발견된 당의 일 유형은 N-아세틸뉴라민산 (시알산으로 칭함)이다. 시알산은 일반적으로 N-연결된 및 O-연결된 올리고당 둘 모두의 말단 잔기이고, 그것의 음전하 정점에 의해, 일 양태에서, 당화된 화합물에 산성 특성을 부여한다. 이러한 부위(들)는 본 발명의 화합물의 링커에 편입될 수 있고 바람직하게는 (예를 들어, 포유동물 세포 예컨대 CHO, BHK, COS에서) 폴리펩타이드 화합물의 재조합 생산 동안 세포에 의해 당화된다. 다른 양태에서, 이러한 부위는 당업계에서 알려진 합성 또는 반-합성 절차에 의해 당화된다.

[0089] 일부 구현예에서, 시알화 (또한 일명 시알릴화)는 본 명세서에 기재된 정제 절차 (음이온 교환, 양이온 교환, 크기 배제, 및/또는 면역친화성 방법을 포함함)의 일부로 칼럼 상에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 rVWF의 증가된 안정성을 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 혈액 순환 (예를 들어, 대상체에 투여 후)에서 rVWF의 증가된 안정성을 초래한다. 일부 구현예에서, 타액화 rVWF의 증가된 안정성은 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 초과 of the 증가를 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 rVWF에 대한 증가된 반감기를 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 혈액 순환 (예를 들어, 대상체에 투여 후)에서 rVWF에 대한 증가된 반감기를 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화된 rVWF의 증가된 반감기는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교할 때 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 초과 of the 증가를 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화된 rVWF의 증가된 반감기는 시알릴화를 겪지 않은 rVWF에 비교하여 혈액 순환 (예를 들어, 대상체에 투여 후)에서 1시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간 또는 그 초과 동안 안정한 rVWF를 초래한다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 2,3 시알릴화 및/또는 2,6 시알릴화의 수를 증가시킨다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 추가의 완충액 단계로서 2,3 시알릴전달효소 및/또는 2,6 시알릴전달효소 및 CMP-NANA (시티딘-5' -모노포스포-N-아세틸뉴라민산 나트륨 염)의 첨가에 의해 증가된다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 추가의 완충액 단계로서 2,3 시알릴전달효소 및 CMP-NANA (시티딘-5' -모노포스포-N-아세틸뉴라민산 나트륨 염)의 첨가에 의해 증가된다. 일부 구현예에서, 2,3 시알릴화는 추가의 완충액 단계로서 2,3 시알릴전달효소 및 CMP-NANA (시티딘-5' -모노포스포-N-아세틸뉴라민산 나트륨 염)의 첨가에 의해 증가된다.

[0090] 일부 구현예에서, 2,6 시알릴화는 추가의 완충액 단계로서 2,6 시알릴전달효소 및 CMP-NANA (시티딘-5' -모노포스포-N-아세틸뉴라민산 나트륨 염)의 첨가에 의해 증가된다. 일부 구현예에서, 2,3 시알릴화 및/또는 2,6 시알릴화는 추가의 완충액 단계로서 2,3 시알릴전달효소 및/또는 2,6 시알릴전달효소 및 CMP-NANA (시티딘-5' -모노포스포-N-아세틸뉴라민산 나트륨 염)의 첨가에 의해 증가된다. 일부 구현예에서, CMP-NANA는 잠재적 유리 위치로 변형된 시알산을 전이하기 위해 화학적으로 또는 효소적 변형된다. 일부 구현예에서, 시알릴화는 수지 상으로 rVWF를 장입하고, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 하나 이상의 완충액으로 수세하여 원치않는 불순물을 고갈시키고, 추가의 시알릴화를 허용하는 조건에서 시알릴전달효소 및 CMP-NANA를 함유하는 하나 이상의 완충액을 적용하고, 그리고 하나 이상의 완충액으로 세정하여 과잉의 시알릴화 시약을 고갈시키고 하나 이상의 완충액으로 향상된 rVWF (예를 들어, 증가된 시알릴화를 갖는 rVWF)를 용출함에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 시알릴화 공정은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 양이온 교환 방법, 음이온 교환 방법, 크기 배제 방법, 또는 면역친화성 정제 방법의 일부로 수행된다.

[0091] 대안적으로, 본 화합물은, 예를 들어, 고상 합성 기술을 사용한 합성 방법에 의해 제조된다. 적합한 기술은 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 하기에 기재된 것들을 포함한다: Merrifield (1973), Chem.Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem.Soc.85:2149; Davis 등 (1985), Biochem.Intl.10:394-414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; 미국 특허 번호 3,941,763; Finn 등 (1976), The Proteins (3rd ed.)2:105-253; 및 Erickson 등 (1976), The Proteins (3rd ed.)2:257-527 '. 고상 합성은 이것이 작은 펩타이드를 제조하는 가장 비용-효율적인 방법이기 때문에 개별 펩타이드를 제조하는 바람직한 기술이다.

[0092] VWF의 단편, 변이체 및 유사체는 당업계에서 잘 알려진 방법에 따라 생산될 수 있다. 폴리펩타이드의 단편은 비

제한적으로, 효소적 절단 (예를 들어, 트립신, 키모트립신)을 사용하고 또한 특이적 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 단편을 생성하기 위한 재조합 수단을 사용하여 제조될 수 있다. 폴리펩타이드 단편은 특정 활성, 예컨대 다량체화 도메인을 갖는 단백질의 영역 또는 당업계에서 알려진 임의의 다른 확인가능한 VWF 도메인을 포함하여 생성될 수 있다.

[0093] 폴리펩타이드 유사체를 제조하는 방법은 또한 잘 알려져 있다. 폴리펩타이드의 아미노산 서열 유사체는 치환, 삽입, 첨가 또는 결실 유사체일 수 있다. 폴리펩타이드의 단편을 포함하는 결실 유사체는 기능 또는 면역원성 활성에 대해 필수적이지 않은 천연 단백질의 하나 이상의 잔기를 결한다. 삽입 유사체는, 예를 들어, 폴리펩타이드의 비-말단 지점에 아미노산(들)의 첨가를 포함한다. 이 유사체는, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 면역반응적인 에피토프 또는 단순히 단일 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드의 단편을 포함하는 첨가 유사체는 단백질의 둘 중 하나 또는 모두 말단에 하나 이상의 아미노산의 첨가를 포함하고, 예를 들어, 융합 단백질을 포함한다. 상기 언급된 유사체의 조합이 또한 고려된다.

[0094] 치환형 유사체는 전형적으로 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 야생형의 하나의 아미노산을 또 다른 아미노산으로 교환하고, 다른 기능 또는 특성의 완전한 소실없이 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성을 조절하도록 설계될 수 있다. 일 양태에서, 치환은 보존적 치환이다. “보존적 아미노산 치환”은 측쇄 또는 유사한 화학적 특징을 갖는 아미노산으로 아미노산의 치환이다. 보존적 치환을 만들기 위한 유사한 아미노산은 산성 측쇄 (글루탐산, 아스파르트산); 염기성 측쇄 (아르기닌, 라이신, 히스티딘); 극성 아미드 측쇄 (글루타민, 아스파라긴); 소수성, 지방족 측쇄 (류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신); 방향족 측쇄 (페닐알라닌, 트립토판, 티로신); 작은 측쇄 (글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 메티오닌); 또는 지방족 하이드록실 측쇄 (세린, 트레오닌)를 갖는 것들을 포함한다.

[0095] 일 양태에서, 유사체는 이들이 유래되는 재조합 VWF에 실질적으로 상동성이거나 또는 실질적으로 동일하다. 유사체는 야생형 폴리펩타이드의 생물학적 활성, 예를 들어 응혈 활성의 적어도 일부를 보유하는 것들을 포함한다.

[0096] 고려된 폴리펩타이드 변이체는, 비제한적으로, 유비퀴틴화, 폴리시알화 (또는 폴리시알릴화)를 포함한 당화, 치료적 또는 진단제에 콘주게이션, 라벨링, 공유 폴리머 부착 예컨대 폐길화 (폴리에틸렌 글리콜로 유도체화), 비-가수분해성 결합의 도입, 및 인간 단백질에서 정상적으로 발생하지 않는 아미노산 예컨대 오르니틴의 화학적 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기술에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드를 포함한다. 변이체는 본 발명의 비-개질된 분자의 동일 또는 본질적으로 동일한 결합 특성을 보유한다. 이와 같은 화학적 변형은 VWF 폴리펩타이드에 제제의 (예를 들어, 링커를 통한) 직접 또는 간접적 부착을 포함할 수 있다. 간접적인 부착의 경우에 있어, 링커는 가수분해성 또는 비-가수분해성일 수 있다는 것이 고려된다.

[0097] 폐길화된 폴리펩타이드 유사체를 제조하는 것은 일 양태에서 (a) 폴리펩타이드를 폴리에틸렌 글리콜 (예컨대 PEG)의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체)과 결합 작제물 폴리펩타이드가 그것에 의하여 하나 이상의 PEG 기에 부착되는 조건하에서 반응시키고, (b) 반응 생성물(들)을 수득하는 단계를 포함할 것이다. 일반적으로, 아실화 반응에 대한 최적의 반응 조건은 알려진 파라미터 및 원하는 결과에 기초하여 결정된다. 예를 들어, PEG: 단백질의 비가 클수록 폴리-폐길화된 생성물의 백분율이 더 크다. 일부 구현예에서, 결합 작제물은 N-말단에서 단일 PEG 모이어티를 갖는다. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 예를 들어, 더 긴 생체내 반감기를 제공하기 위해 응혈 인자에 부착될 수 있다. PEG 기는 임의의 편리한 분자량의 것일 수 있고 선형 또는 분지형이다. PEG의 평균 분자량은 약 2 킬로달톤 (“kD”) 내지 약 100 kDa, 약 5 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 5 kDa 내지 약 10 kDa의 범위이다. 특정 양태에서, PEG 기는 응혈 인자 상의 반응성 기 (예를 들어, 알데하이드, 아미노, 또는 에스테르기)에 PEG 모이어티 상의 천연 또는 조작된 반응성 기 (예를 들어, 알데하이드, 아미노, 티올, 또는 에스테르기)를 통해 아실화 또는 환원 알킬화를 통해 또는 당업계에서 알려진 임의의 다른 기술에 의해 응혈 인자에 부착된다.

[0098] 폴리시알릴화된 폴리펩타이드를 제조하는 방법은 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 공보 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; Biochim.Biophys.Acta 1341:26-34, 1997, 및 Saenko 등, Haemophilia 12:42-51, 2006. 간단히, 0.1 M NaIO₄를 함유하는 콜로민산 (CA)의 용액은 어둠에서 실온에서 교반되어 CA를 산화한다. 활성화된 CA 용액은 어둠에서, 예를 들어, 0.05 M 나트륨 인산염 버퍼, pH 7.2에 대해 투석되고 이 용액은 rVWF 용액에 첨가되고 온화한 셰이킹 하에서 어둠에서 실온에서 18 시간 동안 인큐베이션되었다. 유리 시약은, 예를 들어, 한외여과/정용여과에 의해 rVWF-폴리시알산 콘주게이트로부터 선택적으로 분리된다. 폴리시알산과 rVWF의 콘주게이션은 가교결합 시약으로 글루타르알데하이드를 사용하여 달성된다 (Migneault 등, Biotechniques

37:790-796, 2004).

[0099] 또 다른 양태에서 프리프로-VWF 및 프로-VWF 폴리펩타이드가 본 발명의 제형에서 치료적 이점을 제공할 것이라는 것이 또한 고려된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,005,502는 시험관내에서 트롬빈 생성을 포함하는 상당한 양의 프로-VWF를 포함하는 약제학적 제제를 기술한다. 자연 발생 성숙한 VWF의 재조합, 생물학적 활성 단편, 변이체, 또는 다른 유사체에 부가하여, 본 발명은 하기의 재조합 생물학적 활성 단편, 변이체, 또는 유사체의 사용을 고려한다: 프리프로-VWF (서열번호:2로 제시됨) 또는 프로-VWF 폴리펩타이드 (하기의 아미노산 잔기 23 내지 764: 서열번호:2)로 본 명세서에 기재된 제형의 것.

[0100] 단편, 변이체 및 유사체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생 분자에 동일 또는 유사한 생물학적 활성을 보유하는 자연 발생 분자의 생물학적 활성 단편, 변이체, 또는 유사체를 인코딩하는 기술의 작업자에 의해 쉽게 생성될 수 있다. 다양한 양태에서, 이들 폴리뉴클레오타이드는 분자, 및 기타 동종의 것을 인코딩하는 DNA의 PCR 기술, 소화/결찰을 사용하여 제조된다. 따라서, 당해 분야의 숙련가는, 비제한적으로 부위-특이적 돌연변이유발을 포함하여, 당해 분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여, 변경된 코돈 및 미스센스 돌연변이를 초래하도록 DNA 가닥에서 단일 염기 변화를 생성할 수 있을 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 “중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건”은, 예를 들어, 50% 포름아미드에서 42 ° C에서 하이브리드화 및 60 ° C에서 0.1 x SSC, 0.1% SDS에서 수세하는 것을 의미한다. 이들 조건에서의 변동은 혼성화되어 지는 서열의 길이 및 GC 뉴클레오타이드 염기 함량에 기초하여 발생한다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해된다. 당업계에서 공식 표준은 정확한 하이브리드화 조건을 결정하는데 적절하다. 하기 참고: Sambrook 등, 9.47-9.51 in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

[0101] A. VWF 다량체

[0102] rVWF 다량체의 수 및 백분율의 평가는, 비제한적으로, 예를 들어 하기에 논의된 바와 같이, 크기에 의해 VWF 다량체를 분리하기 위한 크기 배제 크로마토그래피 방법 및 전기영동을 사용하는 방법을 포함한, 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다: Cumming 등, (J Clin Pathol., 1993 May; 46(5): 470-473, 이것은 이으로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF의 다량체 분석에 관한 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). 이러한 기술은 면역블로팅 기술 (예컨대 웨스턴 블랏)을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 겔은 VWF에 대해 방사선표지된 항체로 면역블로팅되고 이어서 화학발광 검출된다 (예를 들어, 하기 참고: Wen 등, J. Clin.Lab.Anal., 1993, 7:317-323, 이것은 이으로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF의 다량체 분석에 관한 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). VWF에 대한 추가 검정은 VWF:항원 (VWF:Ag), VWF:리스토세틴 보조인자 (VWF:RCof), 및 VWF:콜라겐 결합 활성 검정 (VWF:CBA)을 포함하며, 이것은 폰빌레브란트병의 진단 및 분류를 위해 종종 사용된다 (예를 들어, 하기 참고: Favaloro 등, Pathology, 1997, 29(4): 341-456; Sadler, JE, Annu Rev Biochem, 1998, 67:395-424; 및 Turecek 등, Semin Thromb Hemost, 2010, 36:510-521, 이것은 이으로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF에 대한 검정에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). 일부 구현예에서, 본 방법을 사용하여 수득된 rVWF는 rVWF의 장입 샘플 내에 존재하는 임의의 다량체 패턴을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법을 사용하여 수득된 rVWF는 생리적으로 발생하는 다량체 패턴뿐만 아니라 초대형 VWF-다량체 패턴을 포함한다.

[0103] b. VWF 검정

[0104] 일차 지혈에서 VWF는 혈소판과 세포외 기질, 예컨대 콜라겐의 특이적 성분 사이의 브릿지로 작용한다. 이 공정에서 VWF의 생물학적 활성은 다른 시험관내 검정에 의해 측정될 수 있다 (Turecek 등, Semin Thromb Hemost, 2010, 36:510-521).

[0105] VWF:리스토세틴 보조인자 (VWF:RCof) 검정은 VWF의 존재에서 항생제 리스토세틴에 의해 유도된 신선한 또는 포르말린-고정된 혈소판의 응집에 기초한다. 혈소판 응집의 정도는 VWF 농도에 의해 좌우되고, 예를 들어, 응집계의 사용에 의한 비탁법에 의해 측정될 수 있다 (Weiss 등, J. Clin.Invest., 1973, 52:2708-2716; Macfarlane 등, Thromb.diath.Haemorrh., 1975, 34:306-308). 본 명세서에서 제공된 바와 같은, 본 발명의 VWF (VWF:RCof)의 특이적 리스토세틴 보조인자 활성은 시험관내 검정을 사용하여 측정될 때 VWF의 mU/μg의 관점에서 일반적으로 기재된다.

[0106] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 정제된 rVWF는 적어도 약 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45, 47.5, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5, 65, 67.5, 70, 72.5, 75, 77.5, 80, 82.5, 85, 87.5, 90, 92.5, 95, 97.5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 또는 그 초과 mU/μg의 특정

한 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에서 사용된 rVWF는 20 mU/μg 내지 150 mU/μg의 특정한 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, rVWF는 30 mU/μg 내지 120 mU/μg의 특정한 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, rVWF는 40 mU/μg 내지 90 mU/μg의 특정한 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, rVWF는 하기 표 3에서 발견된 변동 1 내지 133으로부터 선택된 특정한 활성을 갖는다.

[표 3]. 본 명세서에 제공된 조성물에서 발견되고 방법에서 사용된 rVWF의 특정한 활성에 대한 예시적인 구현예.

(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)	
20	Var. 1	110	Var. 35	40-150	Var. 68	70-120	Var. 101
22.5	Var. 2	115	Var. 36	40-140	Var. 69	70-110	Var. 102
25	Var. 3	120	Var. 37	40-130	Var. 70	70-100	Var. 103
27.5	Var. 4	125	Var. 38	40-120	Var. 71	70-90	Var. 104
30	Var. 5	130	Var. 39	40-110	Var. 72	70-80	Var. 105
32.5	Var. 6	135	Var. 40	40-100	Var. 73	80-150	Var. 106
35	Var. 7	140	Var. 41	40-90	Var. 74	80-140	Var. 107
37.5	Var. 8	145	Var. 42	40-80	Var. 75	80-130	Var. 108
40	Var. 9	150	Var. 43	40-70	Var. 76	80-120	Var. 109
42.5	Var. 10	20-150	Var. 44	40-60	Var. 77	80-110	Var. 110
45	Var. 11	20-140	Var. 45	40-50	Var. 78	80-100	Var. 111
47.5	Var. 12	20-130	Var. 46	50-150	Var. 79	80-90	Var. 112
50	Var. 13	20-120	Var. 47	50-140	Var. 80	90-150	Var. 113
52.5	Var. 14	20-110	Var. 48	50-130	Var. 81	90-140	Var. 114
55	Var. 15	20-100	Var. 49	50-120	Var. 82	90-130	Var. 115
57.5	Var. 16	20-90	Var. 50	50-110	Var. 83	90-120	Var. 116
60	Var. 17	20-80	Var. 51	50-100	Var. 84	90-110	Var. 117
62.5	Var. 18	20-70	Var. 52	50-90	Var. 85	90-100	Var. 118
65	Var. 19	20-60	Var. 53	50-80	Var. 86	100-150	Var. 119
67.5	Var. 20	20-50	Var. 54	50-70	Var. 87	100-140	Var. 120
70	Var. 21	20-40	Var. 55	50-60	Var. 88	100-130	Var. 121
72.5	Var. 22	30-150	Var. 56	60-150	Var. 89	100-120	Var. 122
75	Var. 23	30-140	Var. 57	60-140	Var. 90	100-110	Var. 123
77.5	Var. 24	30-130	Var. 58	60-130	Var. 91	110-150	Var. 124
80	Var. 25	30-120	Var. 59	60-120	Var. 92	110-140	Var. 125
82.5	Var. 26	30-110	Var. 60	60-110	Var. 93	110-130	Var. 126
85	Var. 27	30-100	Var. 61	60-100	Var. 94	110-120	Var. 127
87.5	Var. 28	30-90	Var. 62	60-90	Var. 95	120-150	Var. 128
90	Var. 29	30-80	Var. 63	60-80	Var. 96	120-140	Var. 129
92.5	Var. 30	30-70	Var. 64	60-70	Var. 97	120-130	Var. 130
95	Var. 31	30-60	Var. 65	70-150	Var. 98	130-150	Var. 131
97.5	Var. 32	30-50	Var. 66	70-140	Var. 99	130-140	Var. 132
100	Var. 33	30-40	Var. 67	70-130	Var. 100	140-150	Var. 133
105	Var. 34						

Var.= 변동

본 발명의 rVWF는 약 10 내지 약 40 서브유닛을 포함하는 고도로 다량체이다. 추가 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 생산된 다량체 rVWF는 약 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 서브유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, rVWF는 40 서브유닛 이상 (> 10 백만 달톤)의 이량체로부터 다량체까지의 크기에서 다양한 다량체로 존재한다. 최대 다량체는 혈소판 수용체 및 손상의 내피하 매트릭스 부위와 상호작용할 수 있고 VWF의 최대 지혈적으로 활성 형태인 다중 결합 부위를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 rVWF는 초대형 다량체 (ULM)를 포함한다. 일반적으로, 높은 및 초대형 다량체는 지혈적으로 가장 효과적인 것으로 간주된다 (하기 참고, 예를 들어, Turecek, P., Hamostaseologie, (Vol. 37): Supplement 1, pages S15-S25 (2017)). 일부 구현예에서, rVWF는 500 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 임의의 원하는 다량체 패턴은 기재된 방법을 사용하여 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 및/또는 양이온 교환기 방법이 이용된 경우, 하나 이상의 수세 단계(들)에서의 완충액 또는 구배 완충액의 pH, 전도도, 및/또는 반대이온 농도는 원하는 다량체 패턴을 수득하기 위해 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 그 다음 크기 배제 크로마토그래피 방법이 이용되고, 수집 기준은 원하는 다량체 패턴을 수득하기 위해 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 기재된 다량체 패턴은 초대형 다량체를 포함한다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 적어도 10,000 kDa, 적어도 11,000 kDa, 적어도

12,000 kDa, 적어도 13,000 kDa, 적어도 14,000 kDa, 적어도 15,000 kDa, 적어도 16,000 kDa, 적어도 17,000 kDa, 적어도 18,000 kDa, 적어도 19,000 kDa, 적어도 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 10,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 11,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 12,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 13,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 14,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 15,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 16,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 17,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 18,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 초대형 다량체는 약 19,000 kDa 내지 20,000 kDa이다. 일부 구현예에서, 본 방법을 사용하여 수득된 rVWF는 rVWF의 장입 샘플 내에 존재하는 임의의 다량체 패턴을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법을 사용하여 수득된 rVWF는 생리학적으로 발생하는 다량체 패턴뿐만 아니라 초 대형 VWF-다량체 패턴을 포함한다.

[0111] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 정제 방법에 의해 제조된 rVWF 조성물은 올리고머의 95%가 6개 서브유닛 내지 20개 서브유닛을 갖는 것으로 특성규명된 rVWF 올리고머의 분포를 갖는다. 일부 구현예에서, rVWF 조성물은 올리고머의 95%가 4에서 발견된 변동 458 내지 641로부터 선택된 서브유닛의 범위를 갖는 것으로 특성규명된 rVWF 올리고머의 분포를 갖는다.

[0112] [표 4]. 본 명세서에 제공된 조성물에서 발견되고 방법에서 사용된 rVWF 올리고머의 분포에 대한 예시적인 구현예.

서브유닛		서브유닛		서브유닛		서브유닛	
2-40	Var.458	6-16	Var.504	12-20	Var.550	20-28	Var.596
2-38	Var.459	6-14	Var.505	12-18	Var.551	20-26	Var.597
2-36	Var.460	6-12	Var.506	12-16	Var.552	20-24	Var.598
2-34	Var.461	6-10	Var.507	12-14	Var.553	20-22	Var.599
2-32	Var.462	6-8	Var.508	14-40	Var.554	22-40	Var.600
2-30	Var.463	8-40	Var.509	14-38	Var.555	22-38	Var.601
2-28	Var.464	8-38	Var.510	14-36	Var.556	22-36	Var.602
2-26	Var.465	8-36	Var.511	14-34	Var.557	22-34	Var.603
2-24	Var.466	8-34	Var.512	14-32	Var.558	22-32	Var.604
2-22	Var.467	8-32	Var.513	14-30	Var.559	22-30	Var.605
2-20	Var.468	8-30	Var.514	14-28	Var.560	22-28	Var.606
2-18	Var.469	8-28	Var.515	14-26	Var.561	22-26	Var.607
2-16	Var.470	8-26	Var.516	14-24	Var.562	22-24	Var.608
2-14	Var.471	8-24	Var.517	14-22	Var.563	24-40	Var.609
2-12	Var.472	8-22	Var.518	14-20	Var.564	24-38	Var.610
2-10	Var.473	8-20	Var.519	14-18	Var.565	24-36	Var.611
2-8	Var.474	8-18	Var.520	14-16	Var.566	24-34	Var.612
4-40	Var.475	8-16	Var.521	16-40	Var.567	24-32	Var.613
4-38	Var.476	8-14	Var.522	16-38	Var.568	24-30	Var.614
4-36	Var.477	8-12	Var.523	16-36	Var.569	24-28	Var.615
4-34	Var.478	8-10	Var.524	16-34	Var.570	24-26	Var.616
4-32	Var.479	10-40	Var.525	16-32	Var.571	26-40	Var.617
4-30	Var.480	10-38	Var.526	16-30	Var.572	26-38	Var.618
4-28	Var.481	10-36	Var.527	16-28	Var.573	26-36	Var.619
4-26	Var.482	10-34	Var.528	16-26	Var.574	26-34	Var.620
4-24	Var.483	10-32	Var.529	16-24	Var.575	26-32	Var.621
4-22	Var.484	10-30	Var.530	16-22	Var.576	26-30	Var.622
4-20	Var.485	10-28	Var.531	16-20	Var.577	26-28	Var.623
4-18	Var.486	10-26	Var.532	16-18	Var.578	28-40	Var.624
4-16	Var.487	10-24	Var.533	18-40	Var.579	28-38	Var.625
4-14	Var.488	10-22	Var.534	18-38	Var.580	28-36	Var.626
4-12	Var.489	10-20	Var.535	18-36	Var.581	28-34	Var.627
4-10	Var.490	10-18	Var.536	18-34	Var.582	28-32	Var.628
4-8	Var.491	10-16	Var.537	18-32	Var.583	28-30	Var.629
6-40	Var.492	10-14	Var.538	18-30	Var.584	30-40	Var.630
6-38	Var.493	10-12	Var.539	18-28	Var.585	30-38	Var.631
6-36	Var.494	12-40	Var.540	18-26	Var.586	30-36	Var.632
6-34	Var.495	12-38	Var.541	18-24	Var.587	30-34	Var.633
6-32	Var.496	12-36	Var.542	18-22	Var.588	30-32	Var.634
6-30	Var.497	12-34	Var.543	18-20	Var.589	32-40	Var.635
6-28	Var.498	12-32	Var.544	20-40	Var.590	32-38	Var.636
6-26	Var.499	12-30	Var.545	20-38	Var.591	32-36	Var.637
6-24	Var.500	12-28	Var.546	20-36	Var.592	32-34	Var.638
6-22	Var.501	12-26	Var.547	20-34	Var.593	34-40	Var.639
6-20	Var.502	12-24	Var.548	20-32	Var.594	36-38	Var.640
6-18	Var.503	12-22	Var.549	20-30	Var.595	38-40	Var.641

[0113]

[0114]

Var. = 변동

[0115]

일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법에 의해 제조된 rVWF 조성물은 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체에 존재하는 rVWF 분자의 백분율에 따라 특성규명될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에 사용된 rVWF 조성물 내 적어도 20%의 rVWF 분자가 적어도 10개 서브유닛의 올리고머 착물에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법에 사용된 rVWF 조성물 내 적어도 20%의 rVWF 분자가 적어도 12개 서브유닛의 올리고머 착물에 존재한다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법에서 사용된 rVWF 조성물은 표 5 내지 표 7에서 발견된 변동 134 내지 457 중 임의의 하나에 따라 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체 (예를 들어, 적어도 Y 서브유닛의 다량체)에 존재하는 rVWF 분자의 최소 백분율을 갖는다 (예를 들어, 적어도 X%를 갖는다).

[0116]

[표 5]. 본 명세서에 제공된 조성물에서 발견되고 방법에서 사용된 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체에 존재하는 rVWF 분자의 백분율에 대한 예시적인 구현예.

		rVWF 다량체에서 서브유닛의 최소 수					
		6	8	10	12	14	16
rVWF 분자의 최소 백분율	10%	Var.134	Var.152	Var.170	Var.188	Var.206	Var.224
	15%	Var.135	Var.153	Var.171	Var.189	Var.207	Var.225
	20%	Var.136	Var.154	Var.172	Var.190	Var.208	Var.226
	25%	Var.137	Var.155	Var.173	Var.191	Var.209	Var.227
	30%	Var.138	Var.156	Var.174	Var.192	Var.210	Var.228
	35%	Var.139	Var.157	Var.175	Var.193	Var.211	Var.229
	40%	Var.140	Var.158	Var.176	Var.194	Var.212	Var.230
	45%	Var.141	Var.159	Var.177	Var.195	Var.213	Var.231
	50%	Var.142	Var.160	Var.178	Var.196	Var.214	Var.232
	55%	Var.143	Var.161	Var.179	Var.197	Var.215	Var.233
	60%	Var.144	Var.162	Var.180	Var.198	Var.216	Var.234
	65%	Var.145	Var.163	Var.181	Var.199	Var.217	Var.235
	70%	Var.146	Var.164	Var.182	Var.200	Var.218	Var.236
	75%	Var.147	Var.165	Var.183	Var.201	Var.219	Var.237
	80%	Var.148	Var.166	Var.184	Var.202	Var.220	Var.238
	85%	Var.149	Var.167	Var.185	Var.203	Var.221	Var.239
	90%	Var.150	Var.168	Var.186	Var.204	Var.222	Var.240
	95%	Var.151	Var.169	Var.187	Var.205	Var.223	Var.241

Var.= 변동

[표 6]. 본 명세서에 제공된 조성물에서 발견되고 방법에서 사용된 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체에 존재하는 rVWF 분자의 백분율에 대한 예시적인 구현예.

		rVWF 다량체에서 서브유닛의 최소 수					
		18	20	22	24	26	28
rVWF 분자의 최소 백분율	10%	Var.242	Var.260	Var.278	Var.296	Var.314	Var.332
	15%	Var.243	Var.261	Var.279	Var.297	Var.315	Var.333
	20%	Var.244	Var.262	Var.280	Var.298	Var.316	Var.334
	25%	Var.245	Var.263	Var.281	Var.299	Var.317	Var.335
	30%	Var.246	Var.264	Var.282	Var.300	Var.318	Var.336
	35%	Var.247	Var.265	Var.283	Var.301	Var.319	Var.337
	40%	Var.248	Var.266	Var.284	Var.302	Var.320	Var.338
	45%	Var.249	Var.267	Var.285	Var.303	Var.321	Var.339
	50%	Var.250	Var.268	Var.286	Var.304	Var.322	Var.340
	55%	Var.251	Var.269	Var.287	Var.305	Var.323	Var.341
	60%	Var.252	Var.270	Var.288	Var.306	Var.324	Var.342
	65%	Var.253	Var.271	Var.289	Var.307	Var.325	Var.343
	70%	Var.254	Var.272	Var.290	Var.308	Var.326	Var.344
	75%	Var.255	Var.273	Var.291	Var.309	Var.327	Var.345
	80%	Var.256	Var.274	Var.292	Var.310	Var.328	Var.346
	85%	Var.257	Var.275	Var.293	Var.311	Var.329	Var.347
	90%	Var.258	Var.276	Var.294	Var.312	Var.330	Var.348
	95%	Var.259	Var.277	Var.295	Var.313	Var.331	Var.349

Var.= 변동

[표 7]. 본 명세서에 제공된 조성물에서 발견되고 방법에서 사용된 특정 고차 rVWF 다량체 또는 더 큰 다량체에 존재하는 rVWF 분자의 백분율에 대한 예시적인 구현예.

		rVWF 다량체에서 서브유닛의 최소 수					
		30	32	34	36	38	40
rVWF 분자의 최소 백분율	10%	Var.350	Var.368	Var.386	Var.404	Var.422	Var.440
	15%	Var.351	Var.369	Var.387	Var.405	Var.423	Var.441
	20%	Var.352	Var.370	Var.388	Var.406	Var.424	Var.442
	25%	Var.353	Var.371	Var.389	Var.407	Var.425	Var.443
	30%	Var.354	Var.372	Var.390	Var.408	Var.426	Var.444
	35%	Var.355	Var.373	Var.391	Var.409	Var.427	Var.445
	40%	Var.356	Var.374	Var.392	Var.410	Var.428	Var.446
	45%	Var.357	Var.375	Var.393	Var.411	Var.429	Var.447
	50%	Var.358	Var.376	Var.394	Var.412	Var.430	Var.448
	55%	Var.359	Var.377	Var.395	Var.413	Var.431	Var.449
	60%	Var.360	Var.378	Var.396	Var.414	Var.432	Var.450
	65%	Var.361	Var.379	Var.397	Var.415	Var.433	Var.451
	70%	Var.362	Var.380	Var.398	Var.416	Var.434	Var.452
	75%	Var.363	Var.381	Var.399	Var.417	Var.435	Var.453
	80%	Var.364	Var.382	Var.400	Var.418	Var.436	Var.454
	85%	Var.365	Var.383	Var.401	Var.419	Var.437	Var.455
	90%	Var.366	Var.384	Var.402	Var.420	Var.438	Var.456
	95%	Var.367	Var.385	Var.403	Var.421	Var.439	Var.457

[0123]

[0124]

Var.= 변동

[0125]

상기에 따르면, rVWF는 상당한 백분율의 고분자량 (HMW) rVWF 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, HMW rVWF 다량체 조성물은 적어도 10% - 80% rVWF 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, 본 조성물은 약 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다. 추가 구현예에서, HMW rVWF 다량체 조성물은 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 십량체 또는 고차 다량체를 포함한다.

[0126]

rVWF 다량체의 수 및 백분율의 평가는, 예를 들어 하기 문헌에 의해 논의된 바와 같은, 비제한적으로, 크기에 의해 rVWF 다량체를 분리하기 위한 전기영동 및 크기 배제 크로마토그래피 방법을 사용한 방법을 포함하는, 당해 분야에서 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다: Cumming 등, (J Clin Pathol.1993 May; 46(5): 470-473, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 rVWF 다량체의 평가에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). 이러한 기술은 면역블로팅 기술 (예컨대 웨스턴 블랏)을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 겔은 VWF에 대해 방사선표지된 항체로 면역블로팅되고 이어서 화학발광 검출된다 (예를 들어, 하기 참고: Wen 등, (1993), J. Clin.Lab.Anal., 7:317-323, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 rVWF 다량체의 평가에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다). VWF에 대한 추가 검정은 VWF:항원 (VWF:Ag), VWF:리스트세틴 보조인자 (VWF:RCof), 및 VWF:콜라겐 결합 활성 검정 (VWF:CBA)을 포함하며, 이것은 폰빌레브란트병의 진단 및 분류를 위해 종종 사용된다. (예를 들어, 하기 참고: Favaloro 등, Pathology, 1997, 29(4): 341-456, 이것은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 VWF에 대한 검정에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다).

[0127]

일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 제조된 rVWF에 대한 rFVIII 응혈원 활성 (IU rFVIII:C) 대 rVWF 리스트세틴 보조인자 활성 (IU rVWF:RCo)의 비는 3:1 내지 1:5이다. 추가 구현예에서, 비는 2:1 내지 1:4이다. 또 추가의 구현예에서, 비는 5:2 내지 1:4이다. 추가 구현예에서, 비는 3:2 내지 1:3이다. 또 추가의 구현예에서, 비는 약 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4, 또는 3:5이다. 추가 구현예에서, 비는 1:1 내지 1:2이다. 또 추가의 구현예에서, 비는 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 또는 2:1이다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법에 대해 유용한 조성물에서 rFVIII 응혈원 활성 (IU rFVIII:C) 대 rVWF 리스트세틴 보조인자 활성 (IU rVWF:RCo)의 비는 표 8에서 발견된 변동 1988 내지 2140으로부터 선택된다.

[0128]

[표 8]. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에서 사용된 rFVIII 응혈원 활성 (IU rFVIII:C) 대 rVWF 리스트세틴 보조인자 활성 (IU rVWF:RCo)의 비에 대한 예시적인 구현예.

(IU rFVIII:C) 대 (IU rVWF:RC o)		(IU rFVIII:C) 대 (IU rVWF:RC o)		(IU rFVIII:C) 대 (IU rVWF:RC o)		(IU rFVIII:C) 대 (IU rVWF:RC o)	
4:1	Var.1988	3:1-3:5	Var.2027	4:3-1:4	Var.2065	4:5-2:3	Var.2103
3:1	Var.1989	3:1-2:3	Var.2028	4:3-1:3	Var.2066	4:5-3:4	Var.2104
2:1	Var.1990	3:1-3:4	Var.2029	4:3-2:5	Var.2067	3:4-1:6	Var.2105
3:2	Var.1991	3:1-4:5	Var.2030	4:3-1:2	Var.2068	3:4-1:5	Var.2106
4:3	Var.1992	3:1-5:6	Var.2031	4:3-3:5	Var.2069	3:4-1:4	Var.2107
1:1	Var.1993	3:1-1:1	Var.2032	4:3-2:3	Var.2070	3:4-1:3	Var.2108
5:6	Var.1994	3:1-4:3	Var.2033	4:3-3:4	Var.2071	3:4-2:5	Var.2109
4:5	Var.1995	3:1-3:2	Var.2034	4:3-4:5	Var.2072	3:4-1:2	Var.2110
3:4	Var.1996	3:1-2:1	Var.2035	4:3-5:6	Var.2073	3:4-3:5	Var.2111
2:3	Var.1997	2:1-1:6	Var.2036	4:3-1:1	Var.2074	3:4-2:3	Var.2112
3:5	Var.1998	2:1-1:5	Var.2037	1:1-1:6	Var.2075	2:3-1:6	Var.2113
1:2	Var.1999	2:1-1:4	Var.2038	1:1-1:5	Var.2076	2:3-1:5	Var.2114
2:5	Var.2000	2:1-1:3	Var.2039	1:1-1:4	Var.2077	2:3-1:4	Var.2115
1:3	Var.2001	2:1-2:5	Var.2040	1:1-1:3	Var.2078	2:3-1:3	Var.2116
1:4	Var.2002	2:1-1:2	Var.2041	1:1-2:5	Var.2079	2:3-2:5	Var.2117
1:5	Var.2003	2:1-3:5	Var.2042	1:1-1:2	Var.2080	2:3-1:2	Var.2118
1:6	Var.2004	2:1-2:3	Var.2043	1:1-3:5	Var.2081	2:3-3:5	Var.2119
4:1-1:6	Var.2005	2:1-3:4	Var.2044	1:1-2:3	Var.2082	3:5-1:6	Var.2120
4:1-1:5	Var.2006	2:1-4:5	Var.2045	1:1-3:4	Var.2083	3:5-1:5	Var.2121
4:1-1:4	Var.2007	2:1-5:6	Var.2046	1:1-4:5	Var.2084	3:5-1:4	Var.2122
4:1-1:3	Var.2008	2:1-1:1	Var.2047	1:1-5:6	Var.2085	3:5-1:3	Var.2123
4:1-2:5	Var.2009	2:1-4:3	Var.2048	5:6-1:6	Var.2086	3:5-2:5	Var.2124
4:1-1:2	Var.2010	2:1-3:2	Var.2049	5:6-1:5	Var.2087	3:5-1:2	Var.2125
4:1-3:5	Var.2011	3:2-1:6	Var.2050	5:6-1:4	Var.2088	1:2-1:6	Var.2126
4:1-2:3	Var.2012	3:2-1:5	Var.2051	5:6-1:3	Var.2089	1:2-1:5	Var.2127
4:1-3:4	Var.2013	3:2-1:4	Var.2052	5:6-2:5	Var.2090	1:2-1:4	Var.2128
4:1-4:5	Var.2014	3:2-1:3	Var.2053	5:6-1:2	Var.2091	1:2-1:3	Var.2129
4:1-5:6	Var.2015	3:2-2:5	Var.2054	5:6-3:5	Var.2092	1:2-2:5	Var.2130
4:1-1:1	Var.2016	3:2-1:2	Var.2055	5:6-2:3	Var.2093	2:5-1:6	Var.2131
4:1-4:3	Var.2017	3:2-3:5	Var.2056	5:6-3:4	Var.2094	2:5-1:5	Var.2132
4:1-3:2	Var.2018	3:2-2:3	Var.2057	5:6-4:5	Var.2095	2:5-1:4	Var.2133
4:1-2:1	Var.2019	3:2-3:4	Var.2058	4:5-1:6	Var.2096	2:5-1:3	Var.2134
4:1-3:1	Var.2020	3:2-4:5	Var.2059	4:5-1:5	Var.2097	1:3-1:6	Var.2135
3:1-1:6	Var.2021	3:2-5:6	Var.2060	4:5-1:4	Var.2098	1:3-1:5	Var.2136
3:1-1:5	Var.2022	3:2-1:1	Var.2061	4:5-1:3	Var.2099	1:3-1:4	Var.2137
3:1-1:4	Var.2023	3:2-4:3	Var.2062	4:5-2:5	Var.2100	1:4-1:6	Var.2138
3:1-1:3	Var.2024	4:3-1:6	Var.2063	4:5-1:2	Var.2101	1:4-1:5	Var.2139
3:1-2:5	Var.2025	4:3-1:5	Var.2064	4:5-3:5	Var.2102	1:5-1:6	Var.2140
3:1-1:2	Var.2026						

[0129]

4:1-3:4	Var.20 13	3:2-1:4	Var.20 52	5:6-2:5	Var.20 90	1:2-1:4	Var.212 8
4:1-4:5	Var.20 14	3:2-1:3	Var.20 53	5:6-1:2	Var.20 91	1:2-1:3	Var.212 9
4:1-5:6	Var.20 15	3:2-2:5	Var.20 54	5:6-3:5	Var.20 92	1:2-2:5	Var.213 0
4:1-1:1	Var.20 16	3:2-1:2	Var.20 55	5:6-2:3	Var.20 93	2:5-1:6	Var.213 1
4:1-4:3	Var.20 17	3:2-3:5	Var.20 56	5:6-3:4	Var.20 94	2:5-1:5	Var.213 2
4:1-3:2	Var.20 18	3:2-2:3	Var.20 57	5:6-4:5	Var.20 95	2:5-1:4	Var.213 3
4:1-2:1	Var.20 19	3:2-3:4	Var.20 58	4:5-1:6	Var.20 96	2:5-1:3	Var.213 4
4:1-3:1	Var.20 20	3:2-4:5	Var.20 59	4:5-1:5	Var.20 97	1:3-1:6	Var.213 5
3:1-1:6	Var.20 21	3:2-5:6	Var.20 60	4:5-1:4	Var.20 98	1:3-1:5	Var.213 6
3:1-1:5	Var.20 22	3:2-1:1	Var.20 61	4:5-1:3	Var.20 99	1:3-1:4	Var.213 7
3:1-1:4	Var.20 23	3:2-4:3	Var.20 62	4:5-2:5	Var.21 00	1:4-1:6	Var.213 8
3:1-1:3	Var.20 24	4:3-1:6	Var.20 63	4:5-1:2	Var.21 01	1:4-1:5	Var.213 9
3:1-2:5	Var.20 25	4:3-1:5	Var.20 64	4:5-3:5	Var.21 02	1:5-1:6	Var.214 0
3:1-1:2	Var.20 26						

[0130]

[0131]

Var. = 변동

[0132]

추가 구현예에서, 본 발명의 고차 rVWF 다량체는 투여 후 약 1 내지 약 90 시간 동안 안정하다. 또 추가의 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 약 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 시간 동안 안정하다. 또 추가의 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 시간 동안 안정하다. 특정 구현예에서 rVWF 다량체의 안정성은 시험관내 평가된다.

[0133]

일 구현예에서, 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에서 사용된 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 12 시간의 반감기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 투여 후 적어도 24 시간의 반감기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 고차 rVWF 다량체는 표 9에서 발견된 변동 642 내지 1045로부터 선택된 반감기를 갖는다.

[0134]

[표 9]. 본 명세서에서 제공된 방법에 의해 제조된 조성물에서 발견된 고차 rVWF 다량체의 반감기에 대한 예시적인 구현예.

시간		시간		시간		시간	
적어도 1	Var.642	4-22	Var.743	14-78	Var.844	24-30	Var.945
적어도 2	Var.643	4-20	Var.744	14-72	Var.845	24-27	Var.946
적어도 3	Var.644	4-18	Var.745	14-66	Var.846	27-90	Var.947
적어도 4	Var.645	4-16	Var.746	14-60	Var.847	27-84	Var.948
적어도 5	Var.646	4-14	Var.747	14-54	Var.848	27-78	Var.949
적어도 6	Var.647	4-12	Var.748	14-48	Var.849	27-72	Var.950
적어도 7	Var.648	4-10	Var.749	14-45	Var.850	27-66	Var.951
적어도 8	Var.649	4-8	Var.750	14-42	Var.851	27-60	Var.952
적어도 9	Var.650	4-6	Var.751	14-39	Var.852	27-54	Var.953
적어도 10	Var.651	6-90	Var.752	14-36	Var.853	27-48	Var.954
적어도 11	Var.652	6-84	Var.753	14-33	Var.854	30-90	Var.955
적어도 12	Var.653	6-78	Var.754	14-30	Var.855	30-84	Var.956
적어도 14	Var.654	6-72	Var.755	14-27	Var.856	30-78	Var.957
적어도 16	Var.655	6-66	Var.756	14-24	Var.857	30-72	Var.958
적어도 18	Var.656	6-60	Var.757	14-22	Var.858	30-66	Var.959
적어도 20	Var.657	6-54	Var.758	14-20	Var.859	30-60	Var.960
적어도 22	Var.658	6-48	Var.759	14-18	Var.860	30-54	Var.961
적어도 24	Var.659	6-45	Var.760	14-16	Var.861	30-48	Var.962
적어도 27	Var.660	6-42	Var.761	16-90	Var.862	30-45	Var.963
적어도 30	Var.661	6-39	Var.762	16-84	Var.863	30-42	Var.964
적어도 33	Var.662	6-36	Var.763	16-78	Var.864	30-39	Var.965
적어도 36	Var.663	6-33	Var.764	16-72	Var.865	30-36	Var.966
적어도 39	Var.664	6-30	Var.765	16-66	Var.866	30-33	Var.967
적어도 42	Var.665	6-27	Var.766	16-60	Var.867	33-90	Var.968
적어도 45	Var.666	6-24	Var.767	16-54	Var.868	33-84	Var.969
적어도 48	Var.667	6-22	Var.768	16-48	Var.869	33-78	Var.970
적어도 54	Var.668	6-20	Var.769	16-45	Var.870	33-72	Var.971
적어도 60	Var.669	6-18	Var.770	16-42	Var.871	33-66	Var.972
적어도 66	Var.670	6-16	Var.771	16-39	Var.872	33-60	Var.973
적어도 72	Var.671	6-14	Var.772	16-36	Var.873	33-54	Var.974
적어도 78	Var.672	6-12	Var.773	16-33	Var.874	33-48	Var.975
적어도 84	Var.673	6-10	Var.774	16-30	Var.875	33-45	Var.976
적어도 90	Var.674	6-8	Var.775	16-27	Var.876	33-42	Var.977
2-90	Var.675	8-90	Var.776	16-24	Var.877	33-29	Var.978
2-84	Var.676	8-84	Var.777	16-22	Var.878	33-36	Var.979
2-78	Var.677	8-78	Var.778	16-20	Var.879	36-90	Var.980
2-72	Var.678	8-72	Var.779	16-18	Var.880	36-84	Var.981
2-66	Var.679	8-66	Var.780	18-90	Var.881	36-78	Var.982
2-60	Var.680	8-60	Var.781	18-84	Var.882	36-72	Var.983
2-54	Var.681	8-54	Var.782	18-78	Var.883	36-66	Var.984
2-48	Var.682	8-48	Var.783	18-72	Var.884	36-60	Var.985
2-45	Var.683	8-45	Var.784	18-66	Var.885	36-54	Var.986
2-42	Var.684	8-42	Var.785	18-60	Var.886	36-48	Var.987
2-39	Var.685	8-39	Var.786	18-54	Var.887	36-45	Var.988
2-36	Var.686	8-36	Var.787	18-48	Var.888	36-42	Var.989
2-33	Var.687	8-33	Var.788	18-45	Var.889	36-39	Var.990

[0135]

2-30	Var.688	8-30	Var.789	18-42	Var.890	39-90	Var.991
2-27	Var.689	8-27	Var.790	18-39	Var.891	39-84	Var.992
2-24	Var.690	8-24	Var.791	18-36	Var.892	39-78	Var.993
2-22	Var.691	8-22	Var.792	18-33	Var.893	39-72	Var.994
2-20	Var.692	8-20	Var.793	18-30	Var.894	39-66	Var.995
2-18	Var.693	8-18	Var.794	18-27	Var.895	39-60	Var.996
2-16	Var.694	8-16	Var.795	18-24	Var.896	39-54	Var.997
2-14	Var.695	8-14	Var.796	18-22	Var.897	39-48	Var.998
2-12	Var.696	8-12	Var.797	18-20	Var.898	39-45	Var.999
2-10	Var.697	8-10	Var.798	20-90	Var.899	39-42	Var.1000
2-8	Var.698	10-90	Var.799	20-84	Var.900	42-90	Var.1001
2-6	Var.699	10-84	Var.800	20-78	Var.901	42-84	Var.1002
2-4	Var.700	10-78	Var.801	20-72	Var.902	42-78	Var.1003
3-90	Var.701	10-72	Var.802	20-66	Var.903	42-72	Var.1004
3-84	Var.702	10-66	Var.803	20-60	Var.904	42-66	Var.1005
3-78	Var.703	10-60	Var.804	20-54	Var.905	42-60	Var.1006
3-72	Var.704	10-54	Var.805	20-48	Var.906	42-54	Var.1007
3-66	Var.705	10-48	Var.806	20-45	Var.907	42-48	Var.1008
3-60	Var.706	10-45	Var.807	20-42	Var.908	42-45	Var.1009
3-54	Var.707	10-42	Var.808	20-39	Var.909	45-90	Var.1010
3-48	Var.708	10-39	Var.809	20-36	Var.910	45-84	Var.1011
3-45	Var.709	10-36	Var.810	20-33	Var.911	45-78	Var.1012
3-42	Var.710	10-33	Var.811	20-30	Var.912	45-72	Var.1013
3-39	Var.711	10-30	Var.812	20-27	Var.913	45-66	Var.1014
3-36	Var.712	10-27	Var.813	20-24	Var.914	45-60	Var.1015
3-33	Var.713	10-24	Var.814	20-22	Var.915	45-54	Var.1016
3-30	Var.714	10-22	Var.815	22-90	Var.916	45-48	Var.1017
3-27	Var.715	10-20	Var.816	22-84	Var.917	48-90	Var.1018
3-24	Var.716	10-18	Var.817	22-78	Var.918	48-84	Var.1019
3-22	Var.717	10-16	Var.818	22-72	Var.919	48-78	Var.1020
3-20	Var.718	10-14	Var.819	22-66	Var.920	48-72	Var.1021
3-18	Var.719	10-12	Var.820	22-60	Var.921	48-66	Var.1022
3-16	Var.720	12-90	Var.821	22-54	Var.922	48-60	Var.1023
3-14	Var.721	12-84	Var.822	22-48	Var.923	48-54	Var.1024
3-12	Var.722	12-78	Var.823	22-45	Var.924	54-90	Var.1025
3-10	Var.723	12-72	Var.824	22-42	Var.925	54-84	Var.1026
3-8	Var.724	12-66	Var.825	22-39	Var.926	54-78	Var.1027
3-6	Var.725	12-60	Var.826	22-36	Var.927	54-72	Var.1028
3-4	Var.726	12-54	Var.827	22-33	Var.928	54-66	Var.1029
4-90	Var.727	12-48	Var.828	22-30	Var.929	54-60	Var.1030
4-84	Var.728	12-45	Var.829	22-27	Var.930	60-90	Var.1031
4-78	Var.729	12-42	Var.830	22-24	Var.931	60-84	Var.1032
4-72	Var.730	12-39	Var.831	24-90	Var.932	60-78	Var.1033
4-66	Var.731	12-36	Var.832	24-84	Var.933	60-72	Var.1034
4-60	Var.732	12-33	Var.833	24-78	Var.934	60-66	Var.1035
4-54	Var.733	12-30	Var.834	24-72	Var.935	66-90	Var.1036
4-48	Var.734	12-27	Var.835	24-66	Var.936	66-84	Var.1037
4-45	Var.735	12-24	Var.836	24-60	Var.937	66-78	Var.1038

[0136]

4-42	Var.736	12-22	Var.837	24-54	Var.938	66-72	Var.1039
4-39	Var.737	12-20	Var.838	24-48	Var.939	72-90	Var.1040
4-36	Var.738	12-18	Var.839	24-45	Var.940	72-84	Var.1041
4-33	Var.739	12-16	Var.840	24-42	Var.941	72-78	Var.1042
4-30	Var.740	12-14	Var.841	24-39	Var.942	78-90	Var.1043
4-27	Var.741	14-90	Var.842	24-36	Var.943	78-84	Var.1044
4-24	Var.742	14-84	Var.843	24-33	Var.944	84-90	Var.1045

[0137]

[0138]

Var.= 변동

[0139]

일부 구현예에서, 본 발명에 따라 정제된 프로-VWF 및/또는 정제된 rVWF는 임의의 큰주게이션, 후-번역 또는 공유 변형으로 변형되지 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 프로-VWF 및/또는 정제된 rVWF는, 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 폴리스알산, 하이드록실 에틸 전분, 폴리-탄수화물 모이어티, 및 기타 동종의 것을 포함한, 수용성 폴리머로 변형되지 않는다.

- [0140] 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 정제된 프로-VWF 및/또는 정제된 rVWF는 N- 또는 C-말단 잔기의 변형뿐만 아니라 선택된 측쇄, 예를 들어, 유리 설프하이드릴-기, 일차 아민, 및 하이드록실-기에서의 변형을 포함한, 콘주게이션, 후-번역 변형, 또는 공유 변형을 통해 변형된다. 일 구현예에서, 수용성 폴리머는 라이신기 또는 다른 일차 아민에 의해 (직접적으로 또는 링커를 통해) 단백질에 연결된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로-VWF 및/또는 정제된 rVWF는 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 폴리시알산, 하이드록실 에틸 전분, 폴리-탄수화물 모이어티, 및 기타 동종의 것을 포함한, 수용성 폴리머의 콘주게이션에 의해 변형될 수 있다.
- [0141] 프로-VWF 및/또는 정제된 rVWF를 변형하기 위해 사용될 수 있는 수용성 폴리머는 선형 및 분지형 구조를 포함한다. 접합된 폴리머는 본 발명의 응고 단백질에 직접적으로 부착될 수 있거나, 또는 대안적으로 연결 모이어티를 통해 부착될 수 있다. 수용성 폴리머와 단백질 콘주게이션의 비-제한적인 예는 아래에 발견될 수 있다: 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, 및 4,179,337뿐만 아니라 Abuchowski and Davis "Enzymes as Drugs," Holcenberg and Roberts, Eds., pp. 367 383, John Wiley and Sons, New York (1981), 및 Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc.2008.
- [0142] 단백질 콘주게이션은 수많은 당업계에서 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있고, 예를 들어, 하기를 참고한다: Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc.2008. 그 예는 응고 단백질 또는 수용성 폴리머 모이어티 중 어느 하나의 상에 카복실기와 다른 것의 아민기 사이의 펩타이드 결합, 또는 하나의 카복실기와 다른 것의 하이드록실기 사이의 에스테르 결합을 통한 연결을 포함한다. 본 발명의 응고 단백질이 수용성 폴리머 화합물에 접합되어 질 수 있는 또 다른 연결은 피아이오데이트 산화에 의한 폴리머의 비-환원 말단에서 형성된 알데하이드기와 반응되는 폴리머 모이어티 상의 유리 아미노기 사이에 쉬프 염기를 통해 된다 (Jennings and Lugowski, J. Immunol. 1981; 127:1011-8; Femandes and Gregonradis, Biochim Biophys Acta.1997; 1341: 26-34). 생성된 쉬프 염기는 NaCNBH₃와의 특이적 환원반응에 의해 안정화되어 이차 아민을 형성할 수 있다. 대안적인 접근법은 이전의 산화 후 NH₄Cl과 환원성 아미노화반응에 의해 폴리머 상에 말단 유리 아미노기의 생성이다. 이중작용성 시약은 2개의 아미노 또는 2개의 하이드록실기를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 아미노기를 함유하는 폴리머는 BS3 (비스(설포석신이미딜)우베레이트/Pierce, Rockford, Ill.) 같은 시약으로 응고 단백질의 아미노기에 커플링될 수 있다. 또한, 설포-EMCS (N--말레이미도카프로일옥시) 설포석신이미드 에스테르(Pierce) 같은 이중이중작용성 크로스 연결 시약이 예를 들어 아민과 티올기를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 알데하이드 반응성 기, 예컨대 PEG 알콕시드 플러스 브로모아세트알데하이드의 디에틸 아세탈; PEG 플러스 DMSO 및 아세트산 무수물, 및 PEG 클로라이드 플러스 4-하이드록시벤즈알데하이드의 펜옥사이드, 석신이미딜 활성인 에스테르, 활성화된 디티오카보네이트 *PE.G.*, 2,4,5-트리클로로페닐클로로포르메이트 및 P-니트로페닐클로로포르메이트 활성화된 *PE.G.*가 응고 단백질의 콘주게이션에 사용될 수 있다.
- [0143] VWF의 생물학적 활성을 측정하기 위한 또 다른 방법은 ELISA 기술에 기초한 콜라겐 결합 검정이다 (Brown and Bosak, Thromb.Res., 1986, 43:303-311; Favaloro, Thromb.Haemost., 2000, 83 127-135). 미세적정 플레이트는 유형 I 또는 III 콜라겐으로 코팅된다. 그런 다음 VWF는 콜라겐 표면에 결합되고 후속으로 효소-라벨링된 다클론성 항체로 검출된다. 마지막 단계는 ELISA 판독기로 측광으로 모니터링될 수 있는 기질 반응이다.
- [0144] 폰빌레브란트 인자 (VWF:Ag)의 면역학적 검정은 혈장에서 VWF 단백질의 농도를 측정하는 면역검정이다. 그들은 VWF 기능에 대한 것과 같은 조짐을 제공하지 않는다. VWF:Ag를 측정하기 위한 수많은 방법이 존재하고 이들은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 자동화 라텍스 면역검정 (LIA.) 둘 모두를 포함한다 많은 실험실에서 이제 완전하게 자동화 라텍스 면역검정을 사용한다. 역사적으로 실험실은 라우렐 전기면역검정 'Laurell Rocket s'를 포함한 다양한 기술을 사용했지만 이들은 오늘날 대부분의 실험실에서는 거의 사용되지 않는다.
- [0145] **III. 키트**
- [0146] 추가의 양태로서, 본 발명은 대상체에게 투여에 대해 이의 사용을 용이하게 하는 방식으로 포장된 하나 이상의 동결건조된 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 키트는 밀봉된 병 또는 용기와 같은 용기에 포장된, 용기에 부착되거나 또는 방법을 실시하는데 화합물 또는 조성물의 사용을 기술하는 패키지에 포함된 표지를 갖는, 본 명세서에 기재된 약제학적 제형 (예를 들어, 치료적 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 조성물)을 포함한다. 일 구현예에서, 약제학적 제형은 용기 내 상부공간의 양 (예를 들어, 액체 제형과 용기의 최상부 사이의 공기의 양)이 매우 작도록 용기에 포장된다. 바람직하게는, 상부공간의 양은 무시할만하다 (예를 들어, 거의 없다). 일 구현예에서, 키트는 치료적 단백질 또는 펩타이드 조성물을 갖는 제1 용기 및 상기 조성물에 대해 생리적으로 허용가능한 재구성 용액을 갖는 제2 용기를 함유한다. 일 양태에서, 약제학적 제형은 단위

투약 형태로 포장된다. 본 키트는 특이적 투여 경로에 따라 약제학적 제형을 투여하기에 적합한 디바이스 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 약제학적 제형의 사용을 기술하는 표지를 함유한다.

[0147] **IV. 수술하에 있는 VWD가 있는 환자를 사전치료하는 방법에 대한 rVWF**

[0148] 수술을 위한 사전 치료를 위한 심각한 VWD가 있는 대상체에게 rVWF를 투여하는 이점 중 하나는 pdVWF에 비교하여 rVWF의 더 높은 특이 활성이 투여된 rVWF의 양과 대상체가 재-투약되는 횟수에서 가요성을 허용한다는 것이다. 인정되는 바와 같이 그리고 본 명세서에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이, 공-투여된 FVIII은 재조합 또는 혈장 유래될 수 있다

[0149] rVWF의 단일 또는 다중 투여는 치료하는 의사에 의해 선택된 용량 수준 및 패턴으로 수행된다. 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투약량은 치료되는 질환의 유형 (예를 들어, 폰빌레브란트병), 질환의 중증도 및 경과, 약물이 예방적 또는 치료적 목적에 투여되는지 여부, 이전의 요법, 환자의 임상 이력 및 약물에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의해 좌우된다.

[0150] 일부 양태에서, rVWF는 20-60 IU/kg의 범위, 예를 들어, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 20-60, 35-70, 20-40, 35-60, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, 또는 50-55 IU/kg으로 대상체에게 수술 과정 이전에 투여된다. 일부 구현예에서, rVWF는 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이, 예를 들어, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 12 시간 내지 24 시간, 14 시간 내지 24 시간, 16 내지 24 시간, 18 시간 내지 24 시간, 또는 20 시간 내지 24 시간에 투여된다. 일부 양태에서, 인자 VIII (FVIII)은 수술 과정 이전 rVWF로 투여되지 않는다.

[0151] 일부 구현예에서, rVWF는 하기의 범위로 대상체에게 투여된다: 5-90 IU/kg, 예를 들어, 5-90, 5-50, 10-90, 15-90, 20-90, 30-90, 40-90, 50-90, 60-90, 70-90, 80-90, 5-80, 10-70, 20-60, 30-50, 35-60, 5-50, 5-40, 5-30, 5-20, 10-90, 10-50, 또는 20-40 IU/kg으로 수술 1 시간 이전. 다른 구현예에서, rVWF는 70-200 IU/kg, 예를 들어, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 110-200, 120-200, 130-200, 130-200, 140-200, 150-200, 160-200, 170-200, 180-200, 190-200, 70-170, 80-180, 60-160, 50-150, 40-140, 30, 130, 20-120, 10-110, 70-100, 또는 70-90 IU/kg의 용량으로 수술 후 투여된다. 일부 경우에, 수술 과정은 대수술, 경미한 수술, 및 경구 수술로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0152] 일부 구현예에서, 상기 대상체에 대수술 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 35-60 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에 대수술 1 시간 이전 15-90 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에 대수술 후 150-220 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 대수술은 받은 대상체에 220-320 IU/kg의 총 투약량이 투여된다.

[0153] 일부 구현예에서, 상기 대상체에 경미한 수술 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 50-60 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에 경미한 수술 1 시간 이전 5-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에 경미한 수술 후 70-150 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 경미한 수술을 받은 대상체에 100-220 IU/kg의 총 투약량이 투여된다.

[0154] 일부 구현예에서, 상기 대상체에 경구 수술 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 20-40 IU/kg rVWF가 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 대상체에 경구 수술 1 시간 이전에 20-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에 경구 수술 동안 10-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 또 다른 구현예에서, 상기 대상체에 경구 수술 후 20-50 IU/kg rVWF가 투여된다. 일부 사례에서, 경구 수술을 받은 대상체에 70-190 IU/kg의 총 투약량이 투여된다.

[0155] rVWF의 조성물은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 약제학적 제형에 함유될 수 있다. 이러한 제형은 경구로, 국소적으로, 경피로, 비경구로, 흡입에 의해 스프레이, 질로, 직장으로, 또는 두개내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 낭내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 정맥내, 진피내, 근육내, 유선내, 복강내, 척추강내, 안구내, 폐내 주사에 의한 투여 및 또는 특정 부위에서 수술적 이식이 또한 고려된다. 일반적으로, 조성물은 본질적으로 발열원뿐만 아니라 수령체에 대해 유해할 수 있는 다른 불순물이 없다.

[0156] 일 양태에서, 본 발명의 제형은 초기 볼러스에 의해 투여되고 이어서 연속적 주입에 의해 투여되어 의약품의 치료적 순환 수준을 유지한다. 또 다른 예로서, 본 발명 화합물은 1회용 용량으로 투여된다. 당해 분야의 숙련가

는 개별 환자의 양호한 의료적 실시 및 임상 상태에 의해 결정될 때 효과적인 투약량 및 투여 레지멘을 쉽게 최적화할 것이다. 투여 경로는, 비제한적으로, 정맥내, 복강내, 피하, 또는 근육내 투여에 의할 수 있다. 투약 빈도는 제제의 약동학적 파라미터 및 투여 경로에 좌우된다. 최적의 약제학적 제형은 투여 경로 및 원하는 투약량에 의존하여 당해 분야의 숙련가에 의해 결정된다. 예를 들어, 하기 참고: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.18042 페이지 1435-1712, 그것의 개시내용은 이로써 전체적으로 모든 목적을 위해 그리고 특히 의약품에 대한 제형, 투여 경로 및 투약량에 관련된 모든 교시를 위해 참고로 편입된다. 이러한 제형은 투여된 제제의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출율, 및 생체내 청소능의 속도에 영향을 미친다. 투여 경로에 의존하여, 적합한 용량은 체중, 체표면적 또는 장기 크기에 따라 계산된다. 적절한 투약량은 적절한 용량-반응 데이터와 공조하여 혈중 농도 투약량을 결정하기 위한 확립된 검정의 사용을 통해 확인될 수 있다. 최종 투약 요법은 약물의 작용, 예를 들어 약물의 특이 활성, 손상의 중증도 및 환자의 반응성, 연령, 증상, 체중, 성별 및 환자의 식이, 임의의 감염의 중증도, 투여 시간 및 다른 임상 인자를 변형하는 다양한 인자를 고려하여 주치의에 의해 결정된다. 예로써, 본 발명의 재조합 VWF의 전형적인 용량은 500 μ g/kg에 등등한 대략 50 IU/kg이다. 연구가 수행됨에 따라, 다양한 질환 및 병태에 대한 치료의 적절한 투약량 수준 및 기간에 관한 추가 정보가 제시될 것이다.

[0157] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 유기 화학의 종래의 기술 및 설명, 폴리머 기술, 분자 생물학 (재조합 기술을 포함함), 세포 생물학, 생화학, 및 면역학을 이용할 수 있고, 이것은 당해 기술 내에 있다. 그와 같은 종래의 기술은 폴리머 어레이 합성, 하이브리드화, 결찰, 및 표지를 사용한 하이브리드화의 검출을 포함한다. 적합한 기술의 특이적 예시는 하기 본 명세서에서의 실시예를 참고로 할 수 있다. 그러나, 다른 동등한 종래의 절차가, 물론, 또한 사용될 수 있다. 이러한 종래의 기술 및 설명은 아래에 발견될 수 있다: 표준 실험실 매뉴얼 예컨대 Genome Analysis:A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), Using Antibodies:A Laboratory Manual, Cells:A Laboratory Manual, PCR Primer:A Laboratory Manual, and Molecular Cloning:A Laboratory Manual (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L.(1995) Biochemistry (4th Ed.)Freeman, Highly stabilized York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W.H.Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y. and Berg 등 (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H.Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y., 이들 모두는 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된다.

[0158] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의한다. 따라서, 예를 들어, "중합효소"에 대한 언급은 그러한 제제 중 하나의 제제 또는 그 혼합물을 지칭하고, "방법"에 대한 언급은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 동등한 단계 및 방법 등에 대한 언급을 포함한다.

[0159] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의한다. 따라서, 예를 들어, "중합효소"에 대한 언급은 그러한 제제 중 하나의 제제 또는 그 혼합물을 지칭하고, "방법"에 대한 언급은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 동등한 단계 및 방법 등에 대한 언급을 포함한다.

[0160] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 언급된 모든 공보는 공보에 기재되어 있고 현재 기재된 발명과 관련하여 사용될 수 있는 디바이스, 조성물, 제형 및 방법론을 기술하고 개시할 목적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0161] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한, 그 범위의 상한 및 하한과 그 언급된 범위 내 다른 언급되거나 개재하는 값 사이에서, 하한 단위의 10분의 1까지 각각의 개재하는 값이 본 발명 내에 포괄된다는 것이 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 포함될 수 있으며 더 작은 범위에서는 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한도에 대해, 본 발명 내에 또한 포괄된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계의 둘 중 어느 하나를 제외한 범위가 또한 본 발명에 포함된다.

[0162] 상기 설명에서, 수많은 특이적 세부사항이 본 발명의 보다 철저한 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 본 발명은 이들 특이적 세부사항 중 하나 이상 없이도 실시될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 다른 사례에서, 당해 분야의 숙련가에게 잘-알려진 특징 및 잘 알려진 절차는 본 발명을 불명확하게 하지 않기 위해 기재되지 않았다.

- [0163] 본 발명은 특정 구현예와 관련하여 주로 기재되었지만, 다른 구현예도 본 개시내용을 읽을 때 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이며, 그러한 구현예들이 본 발명의 방법 내에 함유되는 것으로 의도된다는 것이 또한 구상된다.
- [0164] a. 동결건조된 VWF 제형
- [0165] 본 방법은 또한 본 명세서에 제공된 치료 방법에 사용하기 위한 rVWF의 제형을 제공한다. 일부 구현예에서, rVWF 조성물은 약제학적 조성물의 생산을 위해 사용된다. 일부 구현예에서, rVWF는 동결건조된 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0166] 일부 구현예에서, 본 발명의 VWF 폴리펩타이드를 포함하는 제형은 정제 후 그리고 대상체에게 투여 전에 동결건조된다. 동결건조는 당업계에서 일반 기술을 사용하여 수행되고 전개되어 지는 조성물에 대해 최적화되어야 한다 (Tang 등, Pharm Res.21:191-200, (2004) 및 Chang 등, Pharm Res.13:243-9 (1996)).
- [0167] 일 양태에서, 동결건조 사이클은 3개 단계: 동결, 일차 건조, 및 이차 건조로 구성된다 (A.P.Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)). 동결 단계에서, 용액은 냉각되어 얼음 형성을 개시한다. 게다가, 이 단계는 증량제의 결정화를 유도한다. 얼음은 일차 건조 단계에서 승화되는데, 이는 진공을 사용하여 얼음의 증기압 이하의 챔버 압력을 감소시키고 열을 도입하여 승화를 촉진함에 의해 수행된다. 마지막으로, 흡착된 또는 결합된 물은 이차 건조 단계에서 감소된 챔버 압력 및 상승된 보관 온도에서 제거된다. 본 공정은 동결건조된 케이크로 알려진 물질을 생산한다. 그 후에 본 케이크는 주사용 멸균수 또는 적합한 희석제 중 어느 하나로 재구성될 수 있다.
- [0168] 동결건조 사이클은 부형제의 최종 물리적 상태를 결정할뿐만 아니라 다른 파라미터 예컨대 재구성 시간, 외관, 안정성 및 최종 수분 함량에도 영향을 미친다. 냉동된 상태에서의 조성물 구조는 특이적 온도에서 발생하는 몇 개의 전이 (예를 들어, 유리전이, 습윤, 및 결정화)를 통해 진행되며, 구조는 동결건조 공정을 이해하고 최적화하는데 사용될 수 있다. 유리전이 온도 (T_g 및/또는 T_g')는 용질의 물리적 상태에 대한 정보를 제공할 수 있고 시차 주사 열량측정 (DSC)에 의해 결정될 수 있다. T_g 및 T_g' 는 동결건조 사이클을 설계할 때 고려해야 하는 중요한 파라미터이다. 예를 들어, T_g' 는 일차 건조에 중요하다. 게다가, 건조된 상태에서, 유리전이 온도는 최종 생성물의 저장 온도에 대한 정보를 제공한다.
- [0169] b. 일반적인 약제학적 제형 및 부형제
- [0170] 부형제는 의약품 (예를 들어, 단백질)의 안정성 및 전달을 부여하거나 향상시키는 첨가제이다. 그것의 봉입에 대한 이유에 무관하게, 부형제는 제형의 필수 성분이고 따라서 환자에게 안전하고 용인될 필요가 있다. 단백질 약물의 경우, 부형제의 선택은 약물의 효능 및 면역원성 둘 모두에 영향을 줄 수 있기 때문에 특히 중요하다. 그러므로, 단백질 제형은 적합한 안정성, 안전성, 및 시장성을 제공하는 적절한 부형제의 선택으로 개발될 필요가 있다.
- [0171] 동결건조된 제형은, 일 양태에서, 적어도 완충액, 증량제, 및 안정화제 중 하나 이상으로 구성된다. 이 양태에서, 계면활성제의 유용성은 동결건조 단계 동안 또는 재구성 동안 응집이 문제가 되는 사례에서 평가되고 선택된다. 동결건조 동안 안정한 pH 영역 내에서 제형을 유지하기 위해 적절한 완충제가 포함된다. 액체 및 동결건조된 단백질 제형에 대해 고려된 부형제 성분의 비교가 표 10에 제공되어 있다.

[0172] 표 1: 동결건조된 단백질 제형의 부형제 성분

부형제 성분	동결건조된 제형에서 기능
버퍼	◦ 동결건조 동안 및 재구성시 제형의 pH를 유지함
긴장제/안정화제	◦ 안정화제는 냉동 및 동결보호제를 포함함 ◦ 예는 폴리올, 당 및 폴리머를 포함함 ◦ 냉동보호제는 단백질을 동결 스트레스로부터 보호함 ◦ 냉동보호제는 동결-건조 상태에서 단백질을 안정화시킴
증량제	◦ 생물학적 간결함을 증진하고 분출을 방지하기 위해 사용됨 ◦ 동결 케이크에 구조적 강도를 제공함 ◦ 예는 만니톨 및 글리신을 포함함
계면활성제	◦ 동결건조 과정 동안 응집이 문제되는 경우 사용됨 ◦ 재구성 시간을 줄이는 작용을 할 수 있음 ◦ 예는 폴리솔베이트 20 및 80을 포함함
항-산화제	◦ 통상적으로 사용되지 않음, 동결 케이크에서 분자 반응이 크게 지연됨
금속 이온/킬레이팅 제제	◦ 특정한 금속 이온이 보조-인자로서만 포함되는 경우 또는 금속 이온이 프로테아제 활성을 위해 요구되는 경우 포함될 수 있음 ◦ 킬레이팅 제제는 일반적으로 동결 제형에 요구되지 않음
보존제	◦ 단지 다중-복용 제형 경우 ◦ 제형에서 미생물 성장에 대한 보호를 제공함 ◦ 통상적으로 재구성 희석제 (예를 들어, bWFI)에 포함됨

[0173]

[0174]

단백질에 대한 제형을 개발하는데 주요한 과제는 제조, 선적 및 저장의 스트레스에 대비하여 제품을 안정화시키는 것이다. 제형 부형제의 역할은 이들 스트레스에 대한 안정화를 제공하는 것이다. 부형제는 또한 그것의 전달을 가능하게 하고 환자 편의성을 향상시키기 위해 고농도 단백질 제형의 점도를 감소시키기 위해 이용된다. 일반적으로, 부형제는 다양한 화학적 및 물리적 스트레스에 대해 단백질을 안정화시키는 기전에 기초하여 분류될 수 있다. 일부 부형제는 특정한 스트레스의 영향을 경감시키거나 특정한 단백질의 특정 감수성을 조절하기 위해 사용된다. 다른 부형제는 단백질의 물리적 및 공유 안정성에 대해 보다 일반적인 영향을 미친다. 본 명세서에 기재된 부형제는 그것의 화학적 유형 또는 제형에서의 그것의 기능적 역할에 의해 조직화된다. 각각의 부형제 유형을 논의할 때 안정화의 방식의 간단한 설명이 제공된다.

[0175]

본 명세서에 제공된 교시 및 안내가 주어지면, 당해 분야의 숙련가는 생물약제 (예를 들어, 단백질)의 안정성에서의 유지를 촉진하는 본 발명의 생물약제학적 제형을 달성하기 위해 임의의 특정 제형에 어떤 양 또는 범위의 부형제가 포함될 수 있는지를 알 것이다. 예를 들어, 본 발명의 생물약제학적 제형에 포함되어 지는 염의 양 및 유형은 최종 용액의 원하는 삼투물농도 (예를 들어, 등장성, 저삼투압 또는 고장성)뿐만 아니라 제형에 포함되는 다른 성분의 양 및 삼투물농도에 기초한 선택된다.

[0176]

예로써, 약 5% 소르비톨의 봉입은 등장성을 달성할 수 있는 반면에 약 9%의 수크로스 부형제는 등장성을 달성하기 위해 필요하다. 본 발명의 생물약제학적 제형 내에 포함될 수 있는 하나 이상의 부형제의 양 또는 농도 범위의 선택은 염, 폴리올 및 당류에 대해 참고로 상기에 예시되었다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는 본 명세서에 기재되고 특이적 부형제를 참고로 추가로 예시된 고려사항들은 예를 들어, 염, 아미노산, 다른 긴장제, 계면활성제, 안정화제, 증량제, 동결보호제, 동결건조보호제, 산화방지제, 금속 이온, 킬레이팅제 및/또는 보존제를 포함한 부형제의 모든 유형 및 조합에 동등하게 적용가능하다는 것이 이해될 것이다.

[0177]

또한, 특정 부형제가 몰 농도로 보고된 경우, 당해 분야의 숙련가는 용액의 등가 퍼센트 (%) w/v ($<g_0>$ 예를 들어 $</g_0>$, (용액 샘플 내 물질의 그램/용액의 mL) $\times 100\%$)가 또한 고려된다는 것을 인식할 것이다.

[0178]

물론, 당해 분야의 숙련가는 본 명세서에 기재된 부형제의 농도가 특정 제형 내에서 상호의존성을 공유한다는 것을 인식할 것이다. 예로써, 예를 들어, 높은 단백질 농도가 있거나 또는, 예를 들어, 높은 안정화제 농도가 있는 경우, 증량제의 농도는 낮아질 수 있다. 또한, 당해 분야의 숙련가는 증량제가 없는 특정 제형의 등장성을 유지하기 위해, 안정화제의 농도가 그에 따라서 조정될 것이다 (예를 들어, 안정화제의 “토닉화” 양이 사용될 것이다)는 것을 인식할 것이다. 일반 부형제가 당해 기술에 공지되어 있고 아래에서 발견될 수 있다: Powell 등, Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm.Sci. Technology, 52:238-

311.

[0179] c. 약제학적 완충액 및 완충제

[0180] 약리적으로 활성인 단백질 제형의 안정성은 일반적으로 좁은 pH 범위에서 최대인 것으로 관측된다. 최적의 안정성의 이 pH 범위는 사전-제형 연구 동안 초기에 확인될 필요가 있다. 몇 개의 접근법, 예컨대 가속화된 안정성 연구 및 열량측정 스크리닝 연구가 이 노력에 유용하다 (Remmele R.L. Jr., 등, Biochemistry, 38(16): 5241-7 (1999)). 일단 제형이 최종화되면, 단백질은 그것의 저장수명에 걸쳐 제조되고 유지되어야 한다. 그러므로, 완충제는 제형에서 pH를 제어하기 위해 거의 항상 이용된다.

[0181] 완충 종의 완충 용량은 pKa와 동등한 pH에서 최대이고, 이 값으로부터 pH가 증가 또는 감소함에 따라 감소한다. 완충 용량의 90 퍼센트는 그것의 pKa의 하나의 pH 단위 내에 존재한다. 완충 용량은 또한 완충액 농도 증가와 비례하여 증가한다.

[0182] 완충액을 선택할 때 몇 개의 인자가 고려될 필요가 있다. 제1 및 가장 중요한 것으로, 완충액 종 및 그것의 농도가 그것의 pKa 및 원하는 제형 pH에 기초하여 정의될 필요가 있다. 동등하게 중요한 것은 완충액이 단백질 및 다른 제형 부형제와 양립가능하고 열화 반응을 촉매작용하지 않는 것을 보장하는 것이다. 고려되어 지는 세 번째 중요한 양태는 투여시 완충액이 유발할 수 있는 따끔거림과 자극의 감각이다. 예를 들어, 시트레이트는 주사시 따끔거림을 야기하는 것으로 알려져 있다 (Laursen T, 등, Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2): 218-21 (2006)). 따끔거림과 자극에 대한 가능성은 피하 (SC) 또는 근육내 (IM) 경로를 통해 투여되는 약물의 경우 더 큰데, 여기서 약물 용액은 제형이 투여 시 혈액 안으로 빠르게 희석되는 IV 경로에 의해 투여될 때 보다 상대적으로 더 긴 기간 동안 그 부위에 유지된다. 직접 IV 주입에 의해 투여되는 제형의 경우, 완충액 (및 임의의 다른 제형 성분)의 총량이 모니터링되어 질 필요가 있다. 환자에서 심혈관 효과를 유발할 수 있는, 칼륨 인산염 완충액의 형태로 투여된 칼륨 이온에 대해 특히 주의해야 한다 (Hollander-Rodriguez JC, 등, Am. Fam. Physician., 73(2): 283-90 (2006)).

[0183] 동결건조된 제형에 대한 완충액은 추가의 고려를 필요로 한다. 인산나트륨 같은 일부 완충액은 동결 동안 단백질 비정질 상에 결정화되어 pH에서의 이동을 초래할 수 있다. 다른 일반적인 완충액 예컨대 아세테이트 및 이미다졸은 동결건조 공정 동안 승화 또는 증발할 수 있으며, 그것에 의해 동결건조 동안 또는 재구성 후 제형의 pH를 이동시킨다.

[0184] 조성물에 존재하는 완충제는 생리적으로 양립가능하고 약제학적 제형의 원하는 pH를 유지하도록 선택된다. 일 구현예에서, 용액의 pH는 pH 2.0 내지 pH 12.0이다. 예를 들어, 용액의 pH는 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 4.0, 4.3, 4.5, 4.7, 5.0, 5.3, 5.5, 5.7, 6.0, 6.3, 6.5, 6.7, 7.0, 7.3, 7.5, 7.7, 8.0, 8.3, 8.5, 8.7, 9.0, 9.3, 9.5, 9.7, 10.0, 10.3, 10.5, 10.7, 11.0, 11.3, 11.5, 11.7, 또는 12.0일 수 있다.

[0185] pH 완충 화합물은 사전결정된 수준으로 제형의 pH를 유지하기에 적합한 임의의 양으로 존재할 수 있다. 일 구현예에서, pH 완충 농도는 0.1 mM 내지 500 mM (1 M)이다. 예를 들어, pH 완충제는 적어도 0.1, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 또는 500 mM인 것이 고려된다.

[0186] 본 명세서에서 제시된 바와 같은 제형을 완충하기 위해 사용된 예시적인 pH 완충제는, 비제한적으로 유기 산, 글리신, 히스티딘, 글루타메이트, 석시네이트, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, Tris, HEPES, 및, 비제한적으로 아스파르테이트, 히스티딘, 및 글리신을 포함한, 아미노산 또는 아미노산의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 완충제는 시트레이트이다.

[0187] d. 약제학적 안정화제 및 증량제

[0188] 본 약제학적 제형의 일 양태에서, 안정화제 (또는 안정화제의 조합)이 저장-유도된 응집 및 화학적 열화를 방지하거나 감소시키기 위해 첨가된다. 재구성시 흐리거나 탁한 용액은 단백질이 침전되었거나 적어도 응집되었음을 나타낸다. 용어 “안정화제”는 수성 상태에서 화학적 열화 (예를 들어, 자기 분해, 탈아미드화, 산화, 등)를 포함하여 응집 또는 물리적 열화를 방지할 수 있는 부형제를 의미한다. 고려된 안정화제는, 비제한적으로, 수크로스, 트레할로스, 만노스, 말토스, 락토스, 글루코스, 라피노오스, 셀로비오스, 젠티오비오스, 이소말토스, 아라비노오스, 글루코사민, 푸록토스, 만니톨, 소르비톨, 글리신, 아르기닌 HCL, 다당류 예컨대 텍스트란, 전분, 하이드록시에틸 전분, 사이클로덱스트린, N-메틸 피롤리덴, 셀룰로스 및 하이알루론산을 포함한 폴리-하이드록시 화합물, 염화나트륨을 포함한다, (Carpenter 등, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)). 본 제형에서, 안정화제는 약 0.1, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, 또는 1000 mM의 농도로 편입된다. 본 발명의 일 구현예에서, 만니톨 및 트레할로스가 안정화제로 사용된다.

[0189] 요망하는 경우, 제형은 또한 적절한 양의 증량 및 삼투물농도 조절 제제를 포함한다. 증량제는, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 만니톨, 글리신, 수크로스, 폴리머 예컨대 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈, 카복시메틸셀룰로스, 락토스, 소르비톨, 트레할로스, 또는 자일리톨을 포함한다. 일 구현예에서, 증량제는 만니톨이다. 증량제는 약 0.1, 0.5, 0.7, 0.8 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, 또는 1000 mM의 농도로 편입된다.

[0190] e. 약제학적 계면활성제

[0191] 단백질은 표면과 상호작용하는 높은 경향을 가져 공기-액체, 바이알-액체 및 액체-액체 (실리콘 오일) 계면에서 흡착 및 변성에 민감하게 한다. 이 열화 경로는 단백질 농도에 역으로 의존적인 것으로 관찰되었으며, 가용성 및 불용성 단백질 응집체의 형성 또는 표면으로의 흡착을 통한 용액으로부터 단백질의 손실을 초래한다. 용기 표면 흡착 이외에도, 제품의 선적 및 취급 도중에 경험할 수 있는 물리적 진탕으로 표면-유도된 열화가 악화된다.

[0192] 계면활성제는 표면-유도된 열화를 방지하기 위해 단백질 제형에 통상적으로 사용된다. 계면활성제는 계면 위치에 대한 경쟁-단백질보다 나은 능력을 갖는 양친매성 분자이다. 계면활성제 분자의 소수성 부분은 계면 위치 (예를 들어, 공기/액체)를 차지하는 반면, 분자의 친수성 부분은 벌크 용매를 향하여 유지된다. 충분한 농도 (전형적으로 세제의 중요한 교질입자 농도 주변)에서, 계면활성제 분자의 표면 층은 계면에서 단백질 분자가 흡착되는 것을 방지하는 역할을 한다. 이에 의해, 표면-유도된 열화가 최소화된다. 본 명세서에 고려된 계면활성제는, 비제한적으로, 소르비탄 폴리에톡실레이트의 지방산 에스테르, 예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80을 포함한다. 2개는 각각 분자, C-12 및 C-18에 소수성 특성을 부여하는 지방족 사슬의 길이에서만 상이하다. 따라서, 폴리소르베이트-80은 폴리소르베이트-20보다 더 표면-활성적이고 낮은 임계 교질입자 농도를 갖는다.

[0193] 세제는 또한 단백질의 열역학적 형태적 안정성에 영향을 줄 수 있다. 여기서 다시, 주어진 세제 부형제의 효과는 단백질 특이적일 것이다. 예를 들어, 폴리소르베이트는 일부 단백질의 안정성을 감소시키고 다른 단백질의 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 단백질의 세제 불안정화는 부분적으로 또는 전체적으로 접하지 않은 단백질 상태와의 특이적 결합에 참여할 수 있는 세제 분자의 소수성 꼬리의 관점에서 합리적으로 될 수 있다. 이들 유형의 상호작용은 보다 팽창된 단백질 상태를 향한 형태적 평형에서의 이동 (예를 들어 폴리소르베이트 결합에 대해 보체에서 단백질 분자의 소수성 부분의 노출을 증가시키는 것)을 유발할 수 있다. 대안적으로, 단백질 원상태가 일부 소수성 표면을 나타내는 경우, 원상태에 대한 세제 결합은 그 형태를 안정화시킬 수 있다.

[0194] 폴리소르베이트의 또 다른 양태는 이들이 본질적으로 산화 열화에 민감하다는 것이다. 종종, 원료로서, 이들은 단백질 잔기 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 유발하기에 충분한 양의 퍼옥사이드를 함유한다. 안정화제의 첨가로부터 발생하는 산화적 손상에 대한 가능성은 부형제의 최저 효과적인 농도가 제형에서 사용되어야 한다는 점을 강조한다. 계면활성제의 경우, 주어진 단백질의 효과적인 농도는 안정화의 기전에 의존할 것이다.

[0195] 계면활성제는 또한 동결 및 건조 동안 표면 관련된 응집 현상을 방지하기 위해 적절한 양으로 첨가된다 (Chang, B, J. Pharm.Sci. 85:1325, (1996)). 따라서, 예시적인 계면활성제는, 비제한적으로, 자연 발생 아미노산으로부터 유래된 계면활성제를 포함한, 음이온성, 양이온성, 비이온성, 켄비타이온성, 및 양쪽성 계면활성제를 포함한다. 음이온성 계면활성제는, 비제한적으로, 나트륨 라우릴 설페이트, 디옥틸 나트륨 설페이트, 디옥틸 나트륨 설페이트, 케노테옥시콜산, N-라우로일사르코신 나트륨 염, 리튬 도데실 설페이트, 1-옥탄설폰산 나트륨 염, 나트륨 콜레이트 수화물, 나트륨 테옥시콜레이트, 및 글리코테옥시콜산 나트륨 염을 포함한다. 양이온성 계면활성제는, 비제한적으로, 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤즈에토늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드 일수화물, 및 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드를 포함한다. 켄비타이온성 계면활성제는, 비제한적으로, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, 및 SB3-12를 포함한다. 비-이온성 계면활성제는, 비제한적으로, 디기토닌, 트리톤 X-100, 트리톤 X-114, TWEEN-20, 및 TWEEN-80을 포함한다. 계면활성제는 또한, 비제한적으로 라우로메크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소첨가된 피마자유 10, 40, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 대두 레시틴 및 다른 인지질 예컨대 디올레일 포스파티딜 콜린 (DOPC), 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 (DMPG), 디미리스토일포스파티딜 콜린 (DMPC), 및 (디올레일 포스파티딜 글리세롤) DOPG; 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 이들 계면활성제를 개별적으로 또는 상이한 비율의 혼합물로서 포함하는 조성물이 따라서 추가로 제공된다. 본 발명의 일 구현예에서,

계면활성제는 TWEEN-80이다. 본 제형에서, 계면활성제는 약 0.01 내지 약 0.5 g/L의 농도로 편입된다. 제공된 제형에서, 계면활성제 농도는 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0 g/L이다.

[0196] f. 약제학적 염

[0197] 염은 종종 제형의 이온 강도를 증가시키기 위해 첨가되는데, 이는 단백질 용해도, 물리적 안정성 및 등장성에 중요할 수 있다. 염은 다양한 방식으로 단백질의 물리적 안정성에 영향을 줄 수 있다. 이온은 단백질의 표면에 하전된 잔기에 결합함으로써 단백질의 원상태를 안정화시킬 수 있다. 대안적으로, 염은 단백질 백본을 따라 펩타이드 기 (-CONH-)에 결합함에 의해 변성된 상태를 안정화시킬 수 있다. 염은 또한 단백질 분자 내의 잔기 사이의 반발 정전기 상호작용을 차폐함으로써 단백질 고유 형태를 안정화시킬 수 있다. 단백질 제형에서의 염은 또한 단백질 응집 및 불용해성으로 이어질 수 있는 단백질 분자 사이의 인력 정전기 상호작용을 차폐할 수 있다. 제공된 제형에서, 염 농도는 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300, 내지 500 mM 사이이다.

[0198] g. 다른 일반적인 부형제 성분: 약제학적 아미노산

[0199] 아미노산은 완충액, 증량제, 안정화제 및 산화방지제로서 단백질 제형에서 다용도 사용이 밝혀졌다. 따라서, 일 양태에서 히스티딘 및 글루탐산은 각각 5.5 - 6.5 및 4.0 - 5.5의 pH 범위에서 단백질 제형을 완충시키는 데 사용된다. 히스티딘의 이미다졸기는 pKa = 6.0을 갖고 글루탐산 측쇄의 카복실기는 4.3의 pKa를 가지며 이것은 이들 아미노산을 그것의 각각의 pH 범위에서 완충하는데 적합하게 만든다. 글루탐산이 그와 같은 경우에 특히 유용하다. 히스티딘은 시판되는 단백질 제형에서 통상적으로 발견되고, 이 아미노산은 주사 시 찌르는 것으로 알려진 완충액인 시트레이트에 대한 대안을 제공한다. 흥미롭게도, 히스티딘은 액체 및 동결건조된 제시 둘 모두에서 고농도로 사용될 때 응집과 관련하여 안정화 효과를 갖는 것으로 보고되었다 (Chen B, 등, Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). 히스티딘은 또한 높은 단백질 농도 제형의 점도를 감소시키는 것으로 다른 사람들에게 의해 관측되었다. 그러나, 동일한 연구에서, 본 저자들은 스테인레스강 용기에서 항체의 동결-해동 연구 동안 히스티딘 함유 제형에서 응집 및 변색이 증가함을 관측했다. 히스티딘에 대한 또 다른 주의 사항은 이것이 금속 이온의 존재하에서 광-산화에 당한다는 점이다 (Tomita M, 등, Biochemistry, 8(12): 5149-60 (1969)). 제형에서 산화방지제로서 메티오닌의 사용은 유망한 것으로 보인다; 이것은 다수의 산화적 스트레스에 대해 효과적인 것으로 관측되었다 (Lam XM, 등, J Pharm Sci, 86(11): 1250-5 (1997)).

[0200] 다양한 양태에서, 아미노산 글리신, 프롤린, 세린, 아르기닌 및 알라닌 중 하나 이상을 포함하는 제형이 제공되고 우선적인 배제의 기전에 의해 단백질을 안정화시키는 것으로 밝혀졌다. 글리신은 또한 동결건조된 제형에서 통상적으로 사용된 증량제이다. 아르기닌은 응집을 억제하는데 효과적인 제제인 것으로 밝혀졌으며, 액체 및 동결건조된 제형 둘 모두에서 사용되었다.

[0201] 제공된 제형에서, 아미노산 농도는 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300, 내지 500 mM 사이이다. 본 발명의 일 구현예에서, 아미노산은 글리신이다.

[0202] h. 다른 일반적인 부형제 성분: 약제학적 산화방지제

[0203] 단백질 잔기의 산화는 수많은 상이한 공급원으로부터 발생한다. 특정한 산화 방지제의 첨가 외에도, 산화 단백질 손상의 예방은 대기 산소, 온도, 광노출 및 화학적 오염과 같은 생성물의 제조 공정 및 저장 전체에 걸쳐 여러 인자들의 주의 깊은 제어를 포함한다. 본 발명은 따라서, 비제한적으로, 환원제, 산소/자유 라디칼 포착제, 또는 킬레이트제를 포함한 약제학적 산화방지제의 사용을 고려한다. 치료적 단백질 제형에서 산화방지제는, 일 양태에서, 수용성이고 생성물 저장-수명 전체에 걸쳐 활성을 유지한다. 환원제 및 산소/자유 라디칼 포착제는 용액에서 활성 산소 종을 제거함에 의해 작용한다. 킬레이트제 예컨대 EDTA는 자유 라디칼 형성을 증진하는 미량 금속 오염물질을 결합함에 의해 효과적이다. 예를 들어, EDTA는 시스테인 잔기의 금속 이온 촉매접촉된 산화를 억제하기 위해 산성 섬유모세포 성장 인자의 액체 제형에 이용되었다.

[0204] 단백질 산화를 방지하기 위한 다양한 부형제의 유효성에 부가하여, 산화방지제 자체가 단백질에 대한 다른 공유 또는 물리적 변화를 유도할 가능성이 우려된다. 예를 들어, 환원제는 디설파이드 서플링으로 이어질 수 있는 분자내 디설파이드 연결기의 파괴를 야기할 수 있다. 전이 금속 이온의 존재에서, 아스코르브산 및 EDTA는 수많은 단백질 및 펩타이드에서 메티오닌 산화를 증진하는 것으로 밝혀졌다 (Akers MJ, and Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999));

Fransson J.R., /. Pharm.Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, 등, Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). 티오황산나트륨은 rhuMab HER2에서 광 및 온도 유도된 메티오닌-산화의 수준을 감소시키는 것으로 보고되었다; 그러나, 티오설페이트-단백질 부가물의 형성이 또한 이 연구에서 보고되었다 (Lam XM, Yang JY, 등, J Pharm Sci. 86(11): 1250-5 (1997)). 적절한 산화방지제의 선택은 단백질의 특이적 스트레스 및 민감성에 따라 이루어졌다. 특정 양태에서 고려된 산화방지제는, 비제한적으로, 환원제 및 산소/자유 라디칼 포착제, EDTA, 및 티오황산나트륨을 포함한다.

[0205] i. 다른 일반적인 부형제 성분:약제학적 금속 이온

[0206] 일반적으로, 전이 금속 이온은 단백질에서 물리적 및 화학적 열화 반응을 촉매할 수 있기 때문에 단백질 제형에서 바람직하지 않다. 그러나, 특이적 금속 이온은 이들이 단백질에 대해 보조인자일 때 및 이들이 배위 착물을 형성하는 단백질의 현탁액 제형 (예를 들어, 인슐린의 아연 현탁액)에서 제형에 포함된다. 최근에, 마그네슘 이온의 사용 (10 -120 mM)은 이소아스파르트산으로 아스파르트산의 이성질체화를 억제하는 것이 제안되었다 (WO 2004039337).

[0207] 금속 이온이 단백질에서 안정성 또는 증가된 활성을 부여하는 두 가지 예는 인간 데옥시리보뉴클레아제 (rhDNase, 폴모자임®), 및 인자 VIII이다. rhDNase의 경우, Ca^{+2} 이온 (최대 100 mM)은 특이적 결합 부위를 통한 효소의 안정성을 증가시켰다 (Chen B, 등, / Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). 사실상, EGTA로 용액에서 칼슘 이온의 제거는 탈아미드화 및 응집에서의 증가를 야기했다. 그러나, 이 효과는 단지 Ca^{+2} 이온으로만 관측되었고; 다른 2가 양이온 Mg^{+2} , Mn^{+2} 및 Zn^{+2} 은 rhDNase를 불안정화시키는 것으로 관찰되었다. 유사한 효과가 인자 VIII에서 관측되었다. Ca^{+2} 및 Sr^{+2} 이온은 단백질을 안정화시키는 반면 Mg^{+2} , Mn^{+2} 및 Zn^{+2} , Cu^{+2} 및 Fe^{+2} 같은 다른 것은 효소를 불안정화시켰다 (Fatouros, A., 등, Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997)). 인자 VIII로 별도의 연구에서, 응집 속도에서의 유의미한 증가가 Al^{+3} 이온의 존재에서 관측되었다 (Derrick TS, 등, /. Pharm.Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). 저자들은 완충액 염 같은 다른 부형제가 Al^{+3} 이온으로 종종 오염되어 있으며 제형화된 생성물에 적절한 품질의 부형제를 사용해야 할 필요성을 예시한다는 것을 인지한다.

[0208] j. 다른 일반적인 부형제 성분:약제학적 보존제

[0209] 동일한 용기에서 1 초과 추출을 포함하는 다용도 비경구 제형을 개발할 때 보존제가 필요하다. 그것의 일차 기능은 미생물 성장을 억제하고 의약품의 저장-수명 또는 사용의 기간 내내 생성물 멸균을 보장하는 것이다. 통상적으로 사용된 보존제는, 비제한적으로, 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸을 포함한다. 비록 보존제가 오랜 사용 역사를 가지고 있지만, 보존제를 포함하는 단백질 제형의 개발은 어려울 수 있다. 보존제는 거의 항상 단백질에 대한 탈안정화 효과 (응집)를 가지며, 이는 다중-용량 단백질 제형에서의 이의 사용을 제한하는 주요 요인이 되었다 (Roy S, 등, J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)).

[0210] 현재까지, 대부분의 단백질 약물은 일회용으로 만 제형화되었다. 그러나, 다중-용량 제형이 가능할 때, 환자 편리, 및 증가된 시장성을 가능하게 하는 이점이 추가된다. 양호한 예는 보존성 제형의 개발이 보다 편리한 다중-용도 주입 펜 제시의 상용화로 이끈 인간 성장 호르몬 (hGH)이다. hGH의 보존성 제형을 함유하는 적어도 4개의 이와 같은 펜 기기가 현재 시장에서 이용가능하다. 노디트로핀® (액체, Novo Nordisk), 뉴트로핀 AQ® (액체, Genentech) & 제노트로핀 (동결건조된 - 이중 챔버 카트리지, Pharmacia & Upjohn)은 페놀을 함유하는 반면 소마트로프® (Eli Lilly)는 m-크레졸로 제형화된다.

[0211] 몇 개의 양태가 보존성 투약 형태의 제형 개발 동안 고려되어 질 필요가 있다. 의약품에서 효과적인 보존제 농도는 최적화되어야 한다. 이것은 단백질 안정성을 손상시키지 않으면서 항-미생물 효과를 부여하는 농도 범위로 투여 형태에서 주어진 보존제를 시험할 것을 요한다. 예를 들어, 3가지 보존제가 시차 주사 열량측정 (DSC)을 사용한 인테리퀸-1 수용체 (유형 I)에 대한 액체 제형의 개발에서 성공적으로 선별되었다. 보존제는 시판되는 생성물에서 통상적으로 사용된 농도에서 안정성에 대한 그것의 영향을 기준으로 순위가 정렬되었다 (Remmele RL Jr., 등, Pharm Res., 15(2): 200-8 (1998)).

[0212] 보존제를 함유하는 액체 제형의 개발은 동결건조된 제형보다 더 도전적이다. 냉동건조된 생성물은 보존제 없이 동결건조될 수 있고 사용 시에 희석제를 함유하는 보존제로 재구성될 수 있다. 이는 보존제가 단백질과 접촉하는 시간을 단축시켜 관련된 안정성 위험을 상당히 최소화시킨다. 액체 제형의 경우, 보존제 유효성 및 안정성은 전체 생성물 저장수명 (- 18 -24 개월)에 걸쳐 유지되어야 한다. 주목할 중요한 점은 보존제 유효성이 활성인

약물 및 모든 부형제 성분을 함유하는 최종 제형에서 실증되어야 한다는 것이다.

[0213] 일부 보존제는 주사 부위 반응을 유발할 수 있으며, 이는 보존제를 선택할 때 고려해야 할 또 다른 인자이다. 노디트로핀에서의 보존제 및 완충액의 평가에 중점을 둔 임상시험에서, m-크레졸을 함유하는 제형에 비교해 페놀 및 벤질 알코올을 함유하는 제형에서 통증 지각이 보다 낮은 것으로 관측되었다 (Kappelgaard A.M., Horm Res.62 Suppl 3:98-103 (2004)). 흥미롭게도, 통상적으로 사용된 보존제 중에서, 벤질 알코올은 마취제 특성을 보유한다 (Minogue SC, and Sun DA., AnesthAnalg., 100(3): 683-6 (2005)). 다양한 양태에서 보존제의 사용은 어떤 부작용 보다 더 큰 이점을 제공한다.

[0214] k. 약제학적 제형의 제조 방법

[0215] 본 발명은 약제학적 제형의 제조에 대한 방법을 추가로 고려한다.

[0216] 본 방법은 하기 단계 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 본 명세서에서 기재된 바와 같은 안정화제를 동결건조하기 이전에 상기 혼합물에 추가하는 단계, 동결건조 이전에 상기 혼합물에, 그 각각이 본 명세서에서 기재된 바와 같은 증량제, 삼투물농도 조절 제제, 및 계면활성제로부터 선택된 적어도 하나의 제제를 추가하는 단계.

[0217] 동결건조된 물질에 대한 표준 재구성 실시는 (전형적으로 동결건조 동안 제거된 용적에 동등한) 주사용 순수한 물 또는 멸균수 (WFI)의 용적을 다시 첨가하는 것이지만, 항균제의 희석 용액은 때때로 비경구 투여용 의약품의 생산에 사용된다 (Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)). 따라서, 본 발명의 동결건조된 rVWF 조성물에 희석제를 추가하는 단계를 포함하는 재구성된 rVWF 조성물의 제조에 대한 방법이 제공된다.

[0218] 동결건조된 물질은 수용액으로 재구성될 수 있다. 다양한 수성 캐리어, 예를 들어, 주사용 멸균수, 다 용량 사용을 위한 보존제를 갖는 물, 또는 적절한 양의 계면활성제를 갖는 물 (예를 들어, 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 함께 혼합물 내에 활성인 화합물을 함유하는 수성 현탁액). 다양한 양태에서, 이러한 부형제는 현탁화제, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸검 및 아카시아검이고; 분산제 또는 습윤제는 자연 발생 포스파타이드, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 레시틴, 또는 지방산과 알킬렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 장쇄 지방족 알코올과 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 헵타데카에틸-엔옥시세탄올, 또는 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분적 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트, 또는 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분적 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트이다. 다양한 양태에서, 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 에틸, 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조이트를 함유한다.

[0219] l. 투여를 위한 예시적인 rVWF 제형

[0220] 일부 구현예에서, 본 방법은 치료용 용적 (100 IU/ml 내지 10000 IU/ml)을 감소시키기 위해 최종 생성물이 높은 효력 (높은 rVWF 농도 및 향상된 장기간 안정성)을 갖도록 하는 향상된 제형을 제공한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 100 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 500 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 1000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 2000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 3000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 4000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 5000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 6000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 7000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 8000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 투여용 제형에서 rVWF 농도는 약 9000 IU/ml 내지 10000 IU/ml이다.

[0221] 일부 구현예에서, 투여용 제형은 예를 들어, 히스티딘, 글리신, 아르기닌과 같은 아미노산을 포함한 하나 이상의 쓰비타이온성 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은, 예를 들어 폴리소르베이트 80, 옥틸피라노시드, 디펩타이드, 및/또는 양친매성 펩타이드를 포함한, 최소 하나의 소수성 및 하나의 친수성기를 갖는 양친매성 특징을 갖는 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은, 예를 들어, 소르비톨, 만니톨, 수크로스, 또는 트레할로스를 포함한 비환원 당 또는 당 알코올 또는 이당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은, 예를 들어, 생리적 삼투물농도를 초래하는 염화나트륨을 포함한 비독성 수용성 염을 포함한다. 일부 구현

예에서, 투여용 제형은 6.0 내지 8.0 범위의 pH를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은 약 6.0, 약 6.5, 약 7, 약 7.5 또는 약 8.0의 pH를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은, 예를 들어, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 및/또는 이들의 조합을 포함한, rVWF를 안정화시키는 하나 이상의 2가 양이온을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은 약 1 mM 내지 약 50 mM 글리신, 약 1 mM 내지 약 50 mM 히스티딘, 약 0 내지 약 300 mM 염화나트륨 (예를 들어, 300 mM 미만의 나트륨), 약 0.01 % 내지 약 0.05% 폴리소르베이트 20 (또는 폴리소르베이트 80), 및 약 7.0의 pH를 갖고 투여 시점에서 생리적 삼투물농도를 갖는 약 0.5 % 내지 약 20% (w/w) 수크로스를 포함한다.

[0222] 일부 구현예에서, 투여용 제형은 냉동건조될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은 안정하고 약 2° C 내지 약 8° C뿐만 아니라 약 18° C 내지 약 25° C에서 액체 상태로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은 안정하고 약 2° C 내지 약 8° C에서 액체 상태로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여용 제형은 안정하고 약 18° C 내지 약 25° C에서 액체 상태로 저장될 수 있다.

[0223] m. 투여/복용

[0224] 인간 또는 테스트 동물에게 조성물을 투여하기 위해, 일 양태에서, 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함한다. 어구 "약제학적으로" 또는 "약리적으로" 허용가능한 안정하고, 단백질 분해 예컨대 응집 및 절단 생성물을 억제하고 그리고 부가하여 아래에 기재된 바와 같은 당업계에서 잘 알려진 경로를 사용하여 투여될 때 알려지성, 또는 다른 역반응을 생성하지 않는 분자 독립체 및 조성물을 지칭한다. "약제학적으로 허용가능한 캐리어"는, 상기에 개시된 제제들을 포함하여, 임의의 및 모든 임상적으로 유용한 용매, 분산매, 코팅물, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 및 동종의 것을 포함한다.

[0225] 약제학적 제형은 경구로, 국소적으로, 경피로, 비경구로, 흡입에 의해 스프레이, 질로, 직장으로, 또는 두개내 주사에 의해 투여된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 낭내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 특정 부위에서 정맥내, 진피내, 근육내, 유선내, 복강내, 척추강내, 안구내, 및/또는 폐내 주사에 의한 투여가 또한 고려된다. 일반적으로, 조성물은 본질적으로 발열원뿐만 아니라 수렴제에 대해 유해할 수 있는 다른 불순물이 없다.

[0226] 본 발명에 따르면, rVWF는 인자 VIII (FVIII)의 부제에서 투여된다. 일부 구현예에서, FVIII는 투여되지 않는다.

[0227] 일부 구현예에서, rVWF는 본 명세서에서 논의된 바와 같이 수술 과정 이전에 투여된다. 일부 구현예에서, rVWF는 수술 과정 이전 적어도 12 시간, 적어도 13 시간, 적어도 14 시간, 적어도 15 시간, 적어도 16 시간, 적어도 17 시간, 적어도 18 시간, 적어도 19 시간, 적어도 20 시간, 적어도 21 시간, 적어도 22 시간, 적어도 23 시간, 또는 적어도 24 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 대수술 과정이다. 일부 구현예에서, FVIII는 투여되지 않는다.

[0228] 일부 구현예에서, 35-60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 적어도 12 시간, 적어도 13 시간, 적어도 14 시간, 적어도 15 시간, 적어도 16 시간, 적어도 17 시간, 적어도 18 시간, 적어도 19 시간, 적어도 20 시간, 적어도 21 시간, 적어도 22 시간, 적어도 23 시간, 또는 적어도 24 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, 50-60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 적어도 12 시간, 적어도 13 시간, 적어도 14 시간, 적어도 15 시간, 적어도 16 시간, 적어도 17 시간, 적어도 18 시간, 적어도 19 시간, 적어도 20 시간, 적어도 21 시간, 적어도 22 시간, 적어도 23 시간, 또는 적어도 24 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, 20-40 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 적어도 12 시간, 적어도 13 시간, 적어도 14 시간, 적어도 15 시간, 적어도 16 시간, 적어도 17 시간, 적어도 18 시간, 적어도 19 시간, 적어도 20 시간, 적어도 21 시간, 적어도 22 시간, 적어도 23 시간, 또는 적어도 24 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 대수술 과정이다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경구 수술 과정이다. 일부 구현예에서, FVIII는 투여되지 않는다.

[0229] 일부 구현예에서, 약 50-60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 투여된다. 일부 구현예에서, 50-60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 약 55-60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 약 50-55 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 약 50 IU/kg, 약 52 IU/kg, 약 54 IU/kg, 약 56 IU/kg, 약 58 IU/kg, 또는 약 60 IU/kg rVWF가 수술 과정 이전 12 시간 내지 24 시간 사이에 투여되고 상기 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, FVIII는 투여되지 않는다.

투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, FVIII은 투여되지 않는다.

[0240]

[illegible]

[0241]

[illegible]

[0242]

일부 구현예에서, 총 투약량 약 70-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 투여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 80-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 투여된다. 일부

구현예에서, 총 투약량 9 약 0-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 100-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 110-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 120-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 130-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 140-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 150-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 160-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 170-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 180-190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 70 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 80 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 90 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 100 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 110 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 120 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 130 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 140 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 150 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 160 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 170 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 180 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, 총 투약량 약 190 IU/kg rVWF가 수술 과정이 경구 수술 과정인 경우에 부여된다. 일부 구현예에서, FVIII은 부여되지 않는다.

[0243] 일부 구현예에서, 수술 과정이 대수술 과정인 경우, 사전-치료는 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 수술 과정 이전에 부여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 투약량은 상기에 열거된 바와 같은 투약량이다. 일부 구현예에서, FVIII은 부여되지 않는다. 일부 구현예에서, 수술 과정이 경미한 수술 과정인 경우, 사전-치료는 적어도 2개의 용량의 rVWF를 수술 과정 이전에 부여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 수술 과정이 경미한 수술 과정인 경우, 사전-치료는 적어도 2개의 용량의 rVWF를 수술 과정 이전에 부여하는 것을 포함하고, 여기서 첫 번째 용량은 두 번째 용량보다 더 크다. 일부 구현예에서, 투약량은 상기에 열거된 바와 같은 투약량이다. 일부 구현예에서, FVIII은 부여되지 않는다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경구 수술 과정이고 사전-치료는 적어도 2개의 대략 동등 용량의 rVWF를 수술 과정 이전에 부여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 투약량은 상기에 열거된 바와 같은 투약량이다. 일부 구현예에서, FVIII은 부여되지 않는다.

[0244] 일반적으로, 유형 1 VWD는 <30 IU/dL VWF:RCo, <30 IU/dL VWF:Ag, 낮은 또는 정상 FVIII, 및 >0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 유형 2A VWD는 <30 IU/dL VWF:RCo, <30-200 IU/dL VWF:Ag, 낮은 또는 정상 FVIII, 및 <0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 유형 2B VWD는 <30-200 IU/dL VWF:RCo, <30 IU/dL VWF:Ag, 낮은 또는 정상 FVIII, 및 일반적으로 <0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 유형 2M VWD는 <30 IU/dL VWF:RCo, <30-200 IU/dL VWF:Ag, 낮은 또는 정상 FVIII, 및 <0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 유형 2N VWD는 30-2000 IU/dL VWF:RCo, 30-200 IU/dL VWF:Ag, 초저 FVIII, 및 >0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 유형 3 VWD는 <3 IU/dL VWF:RCo, <3 IU/dL VWF:Ag, 극도로 낮은 (<10 IU/dL) FVIII에 의해 표시되고, VWF:RCo/VWF:Ag 비는 해당 없다. 정상은 50-200 IU/dL VWF:RCo, 50-200 IU/dL VWF:Ag, 정상 FVIII, 및 >0.5-0.7 IU/dLVWF:RCo/VWF:Ag 비에 의해 표시된다. 일부 구현예에서, 대상체는 유형 3 VWD를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 심각한 유형 1 VWD를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 심각한 유형 2 VWD를 갖는다.

[0245] V. 수술 과정

[0246] 본 발명의 방법에 따른 수술 과정은 대수술 과정 또는 경미한 수술 과정일 수 있다.

[0247] 일반적으로, 대수술은 보다 광범위한 절제가 수행되는, 예를 들어, 체강이 들어가거나, 기관이 제거되거나, 또는 정상 해부학이 변경되는 임의의 침습성 수술 절차를 포함한다. 일반적으로, 간엽 장벽이 개방된 경우 (예를 들어, 늑막 공동, 복막, 수막), 수술이 대수술로 간주된다. 일부 구현예에서, 대수술은 500 mL 초과인 예상되는 혈액 손실, 현저한 체액 이동 및 전형적으로 병원에서 적어도 하룻밤 있는 수술이다. 예시적인 대수술 과정은 비제한적으로 비만대사 수술/위 바이패스, 중격 근절개술, 채장절제술, 흉부 대동맥 절개 회복, 식도절제술, 방

광적출술, 관상동맥 혈관재생, 척추 골수염 수술, 외과적 심실 회복, 두개절제술, 복강경검사 수술 (담낭절제술 및 관 결찰 제외), 기관의 개방 절제, 큰 관절 대체, 재건을 통한 유방절제, 및/또는 척추, 흉부, 혈관, 및/또는 두개내 수술을 포함한다. 대수술의 추가의 예는 비제한적으로 상악 또는 하악 절골술, 후두 절제술, (재건 수술을 하거나 하지 않는) 병원에서 밤새 체류를 요하는 큰 양성 또는 악성 덩어리의 절제 및/또는 림프절 절개, (림프절 생검 또는 거드랑이 절개를 하거나 하지 않는) 즉각적인 조직 재건을 통한 유방절제, (예를 들어, 위, 소장, 결장, 간, 췌장, 비장, 부신 또는 간의) 복강경검사 또는 개방 회복 또는 절제, 개방 담낭절제술, 큰 절개, 상복부 또는 복부 탈장 수복, 내시경적 절제 또는 절제, 자궁절제술 및/또는 부속기 수술, 광범위한 자궁내막증에 대한 복강경검사, 복부 또는 질식 골반 마루 수술, 두개내 수술, 척추 쇄골절제술 및/또는 융합, 무릎 대체, 고관절 대체, 어깨 대체, 팔꿈치 관절 대체, 감염 또는 부전에 대한 하드웨어 제거 또는 교정, 절단, 척추 쇄골절제술 및/ 또는 융합, 프리 프랩 재건 (성형 수술), 지방충절제, 종격내시경, 폐 절제, 식도 절제, 종격 질량 절제 (흉강경 또는 개방), 열공 탈장 수복 (흉강경 또는 개방), 방광 종양 절제 (경요도 또는 개방), 전립선 종양 (경요도 또는 개방), 신장 절제술 (복강경검사 또는 개방), 요관 절제 (복강경검사 또는 개방), 고환 절제 (경추 또는 복부), 절단, 말초 동맥 바이패스 수술, 대동맥 동맥류 회복 (혈관내 또는 개방), 및/또는 경동맥 내막절제술을 포함한다.

[0248] 경미한 수술은 피부 또는 점액 막 및 결합 조직 만이 절제되는 임의의 침습성 수술 절차 예를 들어 카테터 배치를 위한 혈관 절개, 피하 조직에 펌프를 이식하는 것이다. 경미한 수술 과정은 전형적으로 전신 마취를 사용하지 않거나 호흡기 도움이 필요하지 않은, 외래 환자 환경에서 안전하게 수행될 수 있는 임의의 절차를 포함한다. 일부 구현예에서, 경미한 수술은 500 mL 미만의 예상되는 혈액 손실, 최소 체액 이동이 있으며 전형적으로 보행성 기반 (일일 수술/당일 퇴원)에서 수행되는 수술이다. 이러한 외래환자 수술 과정은 비제한적으로 백내장 수술, 재건 없는 유방 수술, 복강경검사 담낭절제술 및 관 결찰, 및 대부분의 피부, 표층, 내시경 및 관 절경 수술을 포함할 수 있다. 경미한 수술의 추가의 예는 비제한적으로 발치, 편도절제술, 아데노이드절제술, 비중격성형술, 터빈절제술, 코성형술, 인두 생검, 후두 생검, 레이저 또는 다른 수단에 의한 경미한 절개, 중이 수술, 유양돌기절제술, 코클리어 이식, 내시경 부비동 수술, 양성 및 악성 덩어리의 작은 절제 (보행성 기반에서 수행됨; 즉, 하악 토리, 상완골 낭종, 작은 설암), 갑상선절제술, 유방소피절제술 (림프절 생검 또는 거드랑이 절개를 하거나 하지 않는 것), 유방절제 (림프절 생검 또는 거드랑이 절개를 하거나 하지 않는 것), 서혜 탈장 수복 (복강경검사 또는 개방 접근법), 배꼽 탈장 수복 (복강경검사 또는 개방 접근법), 복강경검사 담낭절제술, 치질절제술, 팽창, 소파술, 진단 자궁경검사, 복강경검사, 열 풍선에 의한 자궁내막 절제, 관 결찰, 복강경검사 - 제한된 자궁내막증, 질내 테이프 삽입, 절제술, 백내장 추출, 대부분의 안과적 수술, 관절경 수술 (ACL 회복 포함), 일상적인 하드웨어 제거 (감염 경우 아님), 힘줄 수술, 무지외반증수술, 추간판절제술, 손목골 해제, 듀피트렌 구축 해제, 주요 힘줄 수술, 경미한 힘줄 수술, 작은 회전식 플랩 및 피부 이식, 기저 세포 암종 절제, 지방종 절개, 축소유방성형술 및 양성 유방 질환에 대한 다른 수술, 성형 유방 수술, 기관지내시경검사, 방광경검사, 요도경검사, 결석에 대한 내시경, 협착에 대한 내시경, 생검에 대한 내시경, 음낭수종 절개, 정계 정맥류 절개, 정관절단술, 포경수술, 및/또는 하지정맥류 절개를 포함한다.

[0249] 경구 수술 과정은, 비제한적으로, 예를 들어 발치를 포함한 다양한 치과 절차 및 경구 수술을 포함한다.

[0250] 일부 구현예에서, 수술 과정은 대수술 과정이다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경미한 수술 과정이다. 일부 구현예에서, 수술 과정은 경구 수술 과정이다.

[0251] 실시예

[0252] 실시예 1: RVWF의 지혈 효능 및 안전성

[0253] 이 연구는 대기 수술 하에 있는 심각한 VWD가 있는 환자에서 ADVATE (항혈우병 인자 [재조합]), Baxalta US Inc., 캘리포니아주 웨스트레이크 빌리지 소재 (rFVIII)와 함께 또는 없는 rVWF의 지혈 효능 및 안전성을 평가했다.

[0254] 방법

[0255] 심각한 VWD가 있고 대기 수술을 받기로 계획된 ≥ 18 세 연령의 환자에서 10개 국가 내 14개 위치 (NCT02283268)에서 단계 3, 개방 라벨, 조절되지 않는, 무작위화되지 않은 연구. 환자는 수술 후 14일 동안 모니터링되었다.

[0256] 치료

[0257] 수술 12-24시간 전, 내인성 FVIII:C 수준이 ≥ 30 IU/dL (경미한/경구 수술) 또는 ≥ 60 IU/dL (대수술)로 증가

하도록 rVWF 40-60 IU/kg rVWF:RCo가 정맥내로 주어졌다. FVIII:C 수준은 수술의 개시 3시간 이내에 평가되었다. 표적 FVIII:C 수준이 달성된 경우, rVWF 단독이 수술 1시간 전에 투여되어 표 2에 기재된 피크 수준을 달성했다. 표적 FVIII:C 수준이 달성된 경우, rVWF 단독이 수술 1시간 전에 투여되어 표 2에 기재된 피크 수준을 달성했다. 수술중 및 수술후 투약이 개별화되어 약동학적 (PK) 및 약력학적 (PD) 결과에 따른 표적 최저치뿐만 아니라 지혈 도전의 강도 및 기간을 유지했다.

[표 2]. 수술 도중 및 이후 과도한 출혈의 예방을 위한 VWF:RCo 및 FVIII:C 표적 수준: 권고

수술 유형	VWF:RCo 표적 피크 혈장 수준 (IU/dL)	FVIII:C 표적 피크 혈장 수준* (IU/dL)	rVWF 용량의 계산 (요구된 IU VWF:RCo)†
경미한/경구	50-60	40-50	$\Delta VWF:RCo \times BW \text{ (kg)} / IR \ddagger$
대수술	100	80-100	$\Delta VWF:RCo \times BW \text{ (kg)} / IR \ddagger$

BW=체중; FVIII:C=인자 VIII 활성; IR=충분적 회복; rVWF=재조합 폰빌레브란트 인자; VWF:RCo=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성.

*추가된 rFVIII이 권고된 FVIII:C 표적 피크 혈장 수준을 달성하기 위해 요구될 수 있다.

† 수술 전 1시간 이내에 투여됨.

‡ IR이 이용불가능한 경우, IU/kg 당 2.0 IU/dL의 IR을 가정함.

$\Delta VWF:RCo$ = 표적 피크 혈장 VWF:RCo - 기준선 혈장 VWF:RCo.

평가

전체적인 지혈 효능 (일차 결과)은 마지막 수술전후 주입 후 24시간 또는 연구 완료 중 어느 것이나 먼저 발생하는 것에서 조사자에 의해 평가되었다 (표 3). 수술중 지혈 효능은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실과 함께 외과의사에 의해 평가되었다(표 3). 안전성 평가는 유해 사례 (AE) 및 rVWF, rFVIII, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 췌장 면역글로불린 G (IgG), 및 rFurin에 대한 항체를 포함했다.

[표 3]. 전체적* 및 수술중† 지혈 효능 평가 척도

등급	평가
탁월	rFVIII 이 있거나 없이 rVWF 로 달성된 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것보다 양호하거나 더 나았다
양호	rFVIII 이 있거나 없이 rVWF 로 달성된 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것과 같이 아마 양호하였다
중간정도	rFVIII 이 있거나 없이 rVWF 로 달성된 지혈은 수행된 절차의 유형에 대해 최적인 것보다 분명히 낮지만, rVWF 농축물을 변경할 필요 없이 유지되었다
없음	환자가 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않은 출혈을 경험했으며, rVWF 농축물의 변경을 필요로 했다

rFVIII=재조합 인자 VIII; rVWF=재조합 폰빌레브란트 인자.

*조사자에 의해 평가됨.

† 외과의사에 의해 평가됨.

통계

설명적 분석은 Clopper Pearson 테스트를 사용하여 "탁월/양호"로 평가된 지혈 효능을 갖는 환자의 수에 대해 점수 추정치 및 90% CI를 포함하였다. 기술적 통계를 사용하여 PK/PD 및 안전성을 요약하였다.

결과

[0275] 환자

[0276] [표 4]. 기준선 인구통계 및 임상 특성

파라미터 성, n (%)	N=15
남성	7 (46.7)
여성	8 (53.3)
중위 연령 (범위), y	40 (20–70)
중량 체중 (범위), kg	73.5 (52.0–127.2)
중량 BMI (범위), kg/m ²	25.6 (17.1–38.0)
VWD 유형, n (%)	
1	3 (20.0)
2A	2 (13.3)
2B	1 (6.7)
2M	1 (6.7)
3	8 (53.3)
수술 분류, n (%)	
대수술	10 (66.7)
경미한	4 (26.7)
경구	1 (6.7)
평균 (SD) FVIII:C, IU/dL	
모든 VWD 유형 (n=11)	20.6 (23.7)
유형 3 VWD (n=5)	1.8 (1.1)
평균 (SD) VWF:RCO, IU/dL	
모든 VWD 유형 (n=11)	9.7 (11.0)
유형 3 VWD (n=5)	<8 (0.0)

[0277]

[0278] BMI=체질량 지수; FVIII:C=인자 VIII 활성; VWD=폰빌레브란트병; VWF:RCO=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성.

[0279] 전체적인 지혈 효능은 모든 15명 환자에 대해 "탁월" 또는 "양호"로 등급화되었다 (90% CI: 81.9–100.0) (도 1).

[0280] 효능

[0281] 전체적인 지혈 효능은 모든 15명 환자에 대해 "탁월" 또는 "양호"로 등급화되었다 (90% CI: 81.9–100.0) (도 1).

[0282] 수술중 지혈 효능은 모든 15명 환자에 대해 "탁월" 또는 "양호"로 등급화되었다 (90% CI: 81.9–100.0) (도 2). 유형 3 VWD이 있는 8명 환자 중, 전체적인 및 수술중 지혈 효능은 7명 환자에 대해 "탁월" 및 1명 환자에 대해 "양호"로 양자로 평가되었다. 예상된 혈액 손실에 대한 평균 $\pm$ SD 수술중 실제의 혈액 손실은 70% $\pm$ 45%이고 13명 환자에 대해 "탁월" 및 2명 환자에 대해 "양호"로 평가되었다.

[0283] 노출

[0284] 환자는 외과적 출혈을 예방 또는 치료하기 위해 총 104회 주입의 rVWF를 투여받았다; rVWF의 중앙 전체적인 외과적 용량은 220.4 IU/kg이었다 (범위, 63.8–648.4 IU/kg) (표 4). 93 (89.4%) rVWF 단독의 주입: 15 (수술 12–24 h 전), 12 (수술 1 h 전), 및 66 (수술후). 11 (10.6%) rFVIII와 함께 rVWF의 주입: 3 (수술 1 h 전), 1 (수술중), 및 7 (수술후). 5명 환자는 rFVIII와 함께 rVWF의 11 주입을 투여받았고 rFVIII와 함께 rVWF의 7 수술후 주입 중 6은 1명 환자에서 있었다.

[0285] 대수술을 받은 10명 환자 중, 7명 (70%)은 rFVIII의 공투여를 요하지 않았다.

[0286] [표 5]. 전체적인 및 수술 분류에 의한 중앙 rVWF 노출

	수술 분류			
	경미한 (n=4)	대수술 (n=10)	경구 (n=1)	전체 (N=15)
주입의 중앙 총수* (범위)	3 (2-4)	7.5 (4-15)	5	6 (2-15)
중앙 노출 (범위), d	3 (2-4)	6.5 (4-15)	4	6 (2-15)
수술 12-24 h 전 중앙 용량 (범위), IU/kg	57.2 (55.0-59.9)	49.3 (37.4-57.6)	36.1 55.0	(36.1-59.9)
수술 1 h 전 중앙 용량 (범위), IU/kg	39.3 (8.0-46.4)	37.6 (15.7-82.7)	18.1	35.8 (8.0-82.7)
중앙 수술중 용량 (범위), IU/kg	0	0	18.1	18.1
중앙 수술후 용량 (범위), IU/kg	79.3 (42.8-115.9)	214.8 (47.7-533.3)	36.1	189.8 (36.1-533.3)
중앙 총 외과적 용량 (범위), IU/kg	119.9 (63.8-217.3)	307.6 (125.2-648.4)	108.4	220.4 (63.8-648.4)

[0287]

[0288] rVWF=제조합 폰빌레브란트 인자.

[0289] *수술전 프라이밍 주입, 수술전 초기 부하 용량, 수술전 보충 부하 용량, 수술중 용량, 및 수술후 용량의 총수.

[0290] 안전성

[0291] 6명 환자가 12개 치료-발생 AE를 보했다; 어느 것도 치료와 관련된 것으로 고려되지 않았다. 환자는 심각한 AE (게실염 및 심부 정맥 혈전증 [DVT]; 각각은 1명의 환자에서 발생함)를 가졌다; 어느 사건도 인자 대체 치료와 관련된 것으로 고려되지 않았다.

[0292] 심각한 DVT는 수술후 8일째에 발생하였다 (초기에 수술후 4일째에는 심각하지 않은 DVT로 보고됨). 사건은 무증상이었고 일상적인 이중 스캔 후 관찰되었다. 사건은 rVWF와 관련이 있는 것 같지 않고 rFVIII 또는 연구 절차와 관련이 없는 것으로 평가되었고; 환자의 대수술 (총 고관절 교체) 및 진행 중인 비만 이력과 인과적으로 연관되었다. FVIII:C의 수술후 수준은 150 IU/dL을 초과하지 않았다. 이 사건은 캐벌 필터의 배치를 초래했고 결과적으로 후유증 없이 해결되었다. 심각한 알러지성 반응; rFVIII, CHO 단백질, 젖과 IgG, 또는 rFurin에 대해 중화하는 항체는 없다.

[0293] 주요한 전체 무릎 교체 수술 동안 팩형 적혈구의 수술 중 수혈을 받은 VWD 유형 3이 있는 1명의 환자가 수술후 7일째에 VWF에 대한 항체 결합에 대해 양성으로 시험되었다.

[0294] PK 분석을 받은 환자 (n=11)에 대한 VWF:RCo에 대한 PK 파라미터는 도 4에 도시되어 있다. VWF:RCo, VWF:Ag, 및 VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB)의 평균 농도는 30분까지 피크 수준에 도달하였고, 주입후 72시간에 기간에 걸쳐 서서히 감소하였다 (도 4).

[0295] rVWF 단독의 투여는 평가된 모든 환자 (n=11; 도 5A) 중에서뿐만 아니라 유형 3 VWD가 있는 환자의 서브셋 (n=5; 도 5B)에서 24 시간까지 도달된 피크 FVIII:C 수준으로, 주입 6-12 h 후 내인성 FVIII:C 수준의 실질적이고 신속한 안정화를 초래했다. 전반적으로, 환자는 주입후 6 시간까지 평균 FVIII:C >60 IU/dL을 달성하였고 (도 5A), 더 높은 기준선 FVIII:C가 있는 (예를 들어, 1형 또는 2형 VWD가 있는) 환자는 보다 신속하게 표적 수준을 달성할 수 있었다. 기준선에서 평균 FVIII:C 수준 <2 IU/dL을 가짐에도 불구하고, rVWF 단독의 투여는 유형 3 VWD를 가진 환자가 주입후 12 시간까지 달성된 FVIII:C >60 IU/dL로, 빠르게 표적 VWF:RCo 및 FVIII:C 수준을 달성할 수 있게 하였다 (도 5B).

[0296] 결론

[0297] 이 수술 연구에서, 전체적인 및 수술중 지혈 효능은 15명 환자 모두에 대해 "탁월" 또는 "양호"로 평가되었다. 대수술의 경우, 전체적인 지혈 효능은 7명 환자에서 "탁월", 3명 환자에서 "양호"였고, 수술중 효능은 8명 환자에서 "탁월", 2명의 환자에서 "양호"였다. 수술중 및 수술후 지혈을 달성하기 위한 주입의 거의 90%가 rVWF 단

독으로 되었고; 대수술의 70%가 rVWF 단독으로 관리되었다. rVWF는 VWD의 일차 기능 이상을 목표로 하고 의사는 FVIII 측정에 대한 우려 없이 최적의 효능을 달성하는 데 집중할 수 있다. 이들 데이터는 대수술 및 경미한 수술에서 rVWF의 안전하고 효과적인 사용을 지원한다.

[0298] **실시예 2: 수술을 받는 심각한 폰빌레브란트병이 있는 대상체에서 재조합 폰빌레브란트 인자**

[0299] 이 실시예는 수술을 받고 있는 심각한 폰 빌레브란트병 (VWD)이 있는 대상체의 치료를 조사한 연구로부터의 연구 결과를 제공한다.

[0300] 결과 측정:

[0301] 일차 결과 측정:

[0302] 조사자 (혈우병 의사)에 의해 평가된 바와 같은 전체적인 지혈 효능 [기간: 마지막 수술전후 주입 후 24 시간 또는 14일째 ($\pm$ 2일) 방문의 완료 중, 어느 것이나 더 빨리 발생하는 것]. 지혈 효능은 탁월 - 양호 - 중간 정도 - 없음의 척도로 평가되었다.

[0303] · 탁월: ADVATE의 유무에 관계없이 rVWF로 달성된 수술중 및 수술후 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행되는 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것보다 양호하거나 더 나았다.

[0304] · 양호: ADVATE의 유무에 관계없이 rVWF로 달성된 수술중 및 수술후 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행되는 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것과 같이 아마 같은 양호하였다.

[0305] · 중간 정도: ADVATE의 유무에 관계없이 rVWF로 수술중 및 수술후 지혈은 수행된 절차의 유형에 대해 최적의 것보다 분명히 낮지만, rVWF 농축물을 변경할 필요 없이 유지되었다.

[0306] · 없음: 참가자가 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않는 출혈을 경험했으며, rVWF 농축물의 변경을 필요로 했다.

[0307] 이차 결과 측정:

[0308] #1: 수술하는 외과 의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 [기간: 0 일째 (수술의 완료 시)]. 예상된 혈액 손실은 참가자와 동일한 성별, 연령, 신장 및 동반이환의 지혈적으로 정상 개체에 기초하여 수술하는 외과 의사에 의해 수술전으로 추정되었다. 실제 혈액 손실은 마취과 의사의 기록에 따라 절차 중 멍, 타월 및 흡입을 포함한, 추정된 혈액 손실로 구성되는 손실로 평가되었다.

[0309] #2: 예상된 혈액 손실에 대한 수술중 실제의 혈액 손실 [기간: 0 일째 (수술의 완료 시)]. 예상된 혈액 손실에 대한 실제의 혈액 손실은 [예상된 혈액 손실 (mL)로 나눈 [실제의 혈액 손실 (mL)]에 100을 곱하여 계산되었다.

[0310] #3: 수술하는 외과 의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 점수 [기간: 0 일째 (수술의 완료 시)]

[0311] · 지혈 효능은 탁월 - 양호 - 중간 정도 - 없음의 척도로 평가되었다.

[0312] · 탁월: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 기대된 최대 혈액 손실과보다 낮거나 동등하였다 ($\leq 100\%$).

[0313] · 양호: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 최대의 기대된 혈액 손실보다 최대 50% 많았다 (101-150%) 중간 정도: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 기대된 최대 혈액 손실의 50%보다 많았다 ($>150\%$).

[0314] · 없음: 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않는 출혈로, 응고 인자 대체 레지멘의 변화를 필요로 하였다.

[0315] #4: 수술하는 외과 의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 지혈 효능 점수 [기간: 0 일째 (수술의 완료 시)]

[0316] · 지혈 효능은 탁월 - 양호 - 중간 정도 - 없음의 척도로 평가되었다.

[0317] · 탁월: ADVATE가 있거나 없이 rVWF로 달성된 수술중 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것보다 양호하거나 더 나았다.

[0318] · 양호: ADVATE가 있거나 없이 rVWF로 달성된 수술중 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것과 같이 아마 양호하였다.

- [0319] · 중간 정도: ADVATE가 있거나 없이 rVWF로 수술중 지혈은 수행된 절차의 유형에 대해 최적인 것보다 분명히 낮지만, rVWF 농축물을 변경할 필요 없이 유지되었다.
- [0320] · 없음: 참가자가 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않은 출혈을 경험했으며, rVWF 농축물의 변경을 필요로 했다.
- [0321] #5: ADVATE가 있거나 없이 rVWF의 매일 수술중 및 수술후 중량-조정된 용량 [기간: 수술 일로부터 수술후 14일차 (± 2 일)까지, 매일]
- [0322] #6: 유해 사례의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2 일)까지 걸침]. 치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 평가되었다.
- [0323] #7: 혈전성 사건의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2 일)까지 걸침]. 치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 항전성 사건에 대해 평가되었다.
- [0324] #8: 심각한 알러지성 반응 (예를 들어, 과민증)의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2 일)까지 걸침]. 치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 심각한 알러지성 반응에 대해 평가되었다.
- [0325] #9: 폰빌레브란트 인자 (VWF)에 대한 억제성 및 총 결합 항체와 인자 VIII (FVIII)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수 [기간: 검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2 일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다]. 참가자는 ADVATE가 있거나 없이 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)로 치료되었다.
- [0326] #10: 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 마우스 면역글로불린 G (IgG) 또는 재조합 Furin (rFurin)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수 [기간: 검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2 일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다]. 참가자는 ADVATE가 있거나 없이 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)로 치료되었다.
- [0327] #11: 약동학: 주입후 0 내지 72시간 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-72 h/용량) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 주입후 0 내지 72 시간 혈장 농도/시간 곡선 하의 면적은 선형 사다리꼴 규칙을 사용하여 계산되었다. AUC(0-72h)의 계산의 경우 72 시간에서의 수준은 2개 최근접한 샘플링 시점으로부터 선형으로 보간/외삽되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac), FVIII 응고 활성 (FVIII:C)
- [0328] #12: 약동학: 0부터 무한대 시간까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0- ∞ /용량) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 0부터 무한대 시간까지의 혈장 농도/시간 곡선 하의 면적 및 0부터 무한대 시간까지의 제1 모멘트 곡선 하의 면적은 시간 0부터 마지막 정량화가능 농도의 시간까지의 AUC 또는 AUMC 플러스 각각 C_t/λ_z 및 $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$ 로 계산된 꼬리 면적 정정의 합으로 계산되었고, 여기서 C_t 는 마지막 정량화가능 농도이고, t 는 마지막 정량화가능 농도의 시간이고 그리고 λ_z 는 말단 또는 성향 속도 상수였다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac), FVIII 응고 활성 (FVIII:C)
- [0329] #13: 약동학: 평균 체류 시간 (MRT) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 평균 체류 시간은 시간 0부터 무한대까지의 제1 모멘트 곡선 하의 면적을 시간 0부터 무한대까지의 곡선하 면적 마이너스 $T/2$ 로 나눔으로 계산되었고 여기서 T 는 주입의 기간이었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)

- [0330] #14: 약동학: 청소능 (CL) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 ($\pm$ 5)분, 60 ($\pm$ 5)분, 6 ($\pm$ 1)시간, 12 ($\pm$ 1)시간, 24 ($\pm$ 2)시간, 48 ($\pm$ 2)시간 및 72 ($\pm$ 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 청소능은 용량 (IU/kg)을 시간 0부터 무한대까지의 곡선 하의 면적으로 나눔으로 계산되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
- [0331] #15: 약동학: 증분적 회복 (IR) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 ($\pm$ 5)분, 60 ($\pm$ 5)분, 6 ($\pm$ 1)시간, 12 ($\pm$ 1)시간, 24 ($\pm$ 2)시간, 48 ($\pm$ 2)시간 및 72 ($\pm$ 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 증분적 회복은 (C_{max} 마이너스 C주입전)을 용량 (IU/kg)으로 나눔으로 계산되었고 여기서 kg은 투약 시의 체중을 지칭하고, C_{max} 는 주입-전 값에 대해 정정 전 관측된 최대 농도였다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
- [0332] #16: 약동학: 제거 단계 반감기 ($T_{1/2}$) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 ($\pm$ 5)분, 60 ($\pm$ 5)분, 6 ($\pm$ 1)시간, 12 ($\pm$ 1)시간, 24 ($\pm$ 2)시간, 48 ($\pm$ 2)시간 및 72 ($\pm$ 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 말단 또는 성향 반감기 ($T_{1/2}$)는 $\ln 2 / \lambda_z$ 로 계산되었고 여기서 λ_z 는 적어도 3개 정량화가능 농도를 사용하여 WinNonlin NCA에서 계산된 말단 제거율 상수였다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
- [0333] #17: 약동학: 정상 상태에서 분포의 용적 (V_{ss}) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 ($\pm$ 5)분, 60 ($\pm$ 5)분, 6 ($\pm$ 1)시간, 12 ($\pm$ 1)시간, 24 ($\pm$ 2)시간, 48 ($\pm$ 2)시간 및 72 ($\pm$ 2)시간에서 수행되었다.] 이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. V_{ss} 는 청소능을 평균 체류 시간과 곱함으로 계산되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
- [0334] **적격성 기준**
- [0335] 연구에 대해 자격있는 연령: 18세 이상; 연구에 대해 자격있는 성: 모두
- [0336] **포함 기준:**
- [0337] 하기 열거된 바와 같은 심각한 폰빌레브란트병 (VWD)의 진단 및 대기 수술 과정이 계획됨:
- [0338] • 1. 유형 1 (폰빌레브란트 인자: 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo) < 20 IU/dL), 또는,
- [0339] • 2. 유형 2A (다량체 패턴에 의해 확인됨), 유형 2B (유전자형에 의해 진단됨), 유형 2N(FVIII:C) $< 10\%$ 및 역사적으로 문서로 기록된 유전학), 유형 2M, 또는,
- [0340] • 3. 유형 3 (폰빌레브란트 인자 항원 (VWF:Ag) ≤ 3 IU/dL)
- [0341] 출혈을 제어하기 위해 폰빌레브란트 인자 (VWF) 농축물로 치환 요법을 요하는 이력이 있는 VWD.
- [0342] 유형 3 VWD (VWF 항원/VWF:Ag ≤ 3 IU/dL)인 경우, 참가자는 VWF/FVIII 응고 인자 농축물 (동결침전물 또는 신선한 냉동된 혈장을 포함함)에 적어도 20 노출 일의 병력을 갖는다.
- [0343] 유형 1 또는 유형 2 VWD인 경우, 참가자는 VWF/FVIII 응고 인자 농축물 (동결침전물 또는 신선한 냉동된 혈장을 포함함)을 요하는 지난 대수술 또는 5 노출 일의 병력을 갖는다.
- [0344] 참가자는 적어도 18세의 연령이었다.
- [0345] 가임 여성인 경우, 참가자는 음성 임신 테스트를 제시한다.
- [0346] 적용 가능한 경우, 참가자는 연구 기간 동안 적절한 피임 방법을 사용하기로 동의한다.
- [0347] 참가자는 프로토콜의 요구 사항을 기꺼이 준수할 수 있다.

- [0348] 제외 기준:
- [0349] 의사 VWD 또는 또 다른 유전적 또는 후천적 응고 장애의 진단 (즉 정성적 및 정량적 혈소판 장애 또는 상승된 프로트롬빈 시간 [PT]/국제 정상화 비율 [INR] >1.4).
- [0350] 스크리닝시에 VWF 억제제의 이력 또는 존재.
- [0351] 역가 ≥ 0.4 BU (Nijmegen-변형 Bethesda 검정) 또는 ≥ 0.6 BU (Bethesda 검정에 의함)를 갖는 인자 VIII (FVIII) 억제제의 이력 또는 존재.
- [0352] 마우스 또는 햄스터 단백질과 같은 연구 약물의 임의의 성분에 대해 알려진 과민증.
- [0353] 계절성 알러지성 비염/결막염, 온건한 천식, 음식 알러지 또는 동물 알러지를 제외한, 면역학적 장애의 병력.
- [0354] 혈전색전성 사건의 병력.
- [0355] 절대적인 CD4 수 $< 200/\text{mm}^3$ 으로 HIV 양성.
- [0356] 혈소판 수 $< 100,000/\text{mL}$.
- [0357] 비제한적으로, 하기 중 임의의 것에 의해 입증된 바와 같은, 상당한 간 질환의 진단: 혈청 알라닌 아미노기전달 효소 (ALT) 정상인 상한치 5배; 저알부민혈증; 문맥 고혈압 (예를 들어, 달리 원인불명 비장비대증의 존재, 식도 정맥류의 이력) 또는 아동 B 또는 C로 분류된 간경변.
- [0358] 혈청 크레아티닌 수준 ≥ 2.5 mg/dL를 갖는 신장 질환의 진단.
- [0359] 참가자는 공지된 동의서에 서명하기 이전 30일 이내에 국소 치료 (예를 들어, 연고, 비강 스프레이)를 제외한 면역조절 약물로 치료되었다.
- [0360] 참가자는 공지된 동의서를 획득시에 임신 또는 수유 중이었다.
- [0361] 참가자는 등록 이전 30일 이내에 ADVATE가 있거나 없는 rVWF 이외의 조사적인 생성물 (IP), 또는 조사적인 디바이스를 포함한 또 다른 임상 연구에 참여했거나, 또는 이 연구의 과정 동안 IP 또는 조사적인 디바이스를 포함한 또 다른 임상 연구에 참여할 계획이다. 그러나, rVWF 예방 연구 (071301)에 참여하는 자격있는 환자는 등록될 수 있다.
- [0362] 진행성 치명적 질환 및/또는 3개월 미만의 기대 수명.
- [0363] **결과:**
- [0364] 등록은 10개 국가 (미국, 호주, 대만, 독일, 러시아, 스페인, 우크라이나, 영국, 이탈리아, 터키)에서 14개 연구 사이트에서 수행되었다.

[0365] [표 6]: 보고 그룹

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0367] [표 6]: 참가자: 전체적인 연구

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
개시됨	15
완료됨	14
완료되지 않음	1
대상체에 의해 철회	1

[0368]

[0369] [표 7]: 기준 측정

재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	
분석된 전체 참가자	15
[단위: 참가자]	
연령	40.0
[단위: 년]	
중앙 (완전 범위)	(20.0 내지 70.0)
성: 여성, 남성	
[단위: 참가자]	
참가자의 수	
여성	8 53.3%
남성	7 46.7%

[0370]

[0371] 일차 결과: 결과 #1

[0372] 표 8: 결과 측정

[0373] 1. 일차: 조사자 (혈우병 의사)에 의해 평가된 바와 같은 전체적인 지혈 효능 [기간: 마지막 수술전후 주입 24 시간 후 또는 14일째 (± 2일) 방문의 완료 중, 어느 것이든 더 일찍 발생하는 것].

[0374] [표 9]: 일차 결과 #1

측정 유형	일차
측정 표제	조사자 (혈우병 의사)에 의해 평가된 바와 같은 전체적인 지혈 효능
측정 설명	지혈 효능은 탁월-양호-중간 정도-없음의 척도로 평가되었다. 탁월: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 달성된 수술중 및 수술후 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것보다 양호하거나 더 나왔다. 양호: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 달성된 수술중 및 수술후 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것과 같이 아마 양호하였다. 중간 정도: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 수술중 및 수술후 지혈은 수행된 절차의 유형에 대해 최적인 것보다 분명히 낮지만, rVWF 농축물을 변경할 필요 없이 유지되었다. 없음: 참가자가 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않은 출혈을 경험했으며, rVWF 농축물의 변경을 필요로 했다.
기간	마지막 수술전후 주입 24 시간 후 또는 14 일째 (± 2 일) 방문의 완료 중, 어느 것이든 더 일찍 발생하는 것

[0375]

[0376] 모집단 설명 결과 #1

[0377] 주요한, 경미한 및 경구 수술을 한 참가자의 수와 폰빌레브란트 유형 1, 2A, 2B, 2M 및 3을 갖는 참가자의 수는 분석된 참가자의 전체적인 수에 합산한다. 조사적인 생성물을 투여받고 적어도 하나의 지혈 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, 전체 분석 데이터 세트가 분석에 사용되었다.

[0378] [표 10]: 보고 그룹 결과 #1

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)
경미한 수술	경미한 수술을 받은 모든 참가자.
대수술 수술	대수술을 받은 모든 참가자.
경구 수술	경구 수술을 받은 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 1 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2A 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2B 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 2M 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 3	폰빌레브란트병 유형 3 이 있는 모든 참가자.

[0379]

[0380] [표 11]: 측정된 값 결과 #1

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	경미한 수술	대수술 수술	경구 수술	폰빌레브란트 병 유형 1	폰빌레브란트 병 유형 2A	폰빌레브란트 병 유형 2B	폰빌레브란트 병 유형 2M	폰빌레브란트 병 유형 3
분석된 참가자	15	4	10	1	3	2	1	1	8
조사자 (혈우병 의사)에 의해 평가된 바와 같은 전체적인 지혈 효능 [단위: 참가자 참가자의 수]									
탁월	11 73.3 %	4 100.0 %	7 70.0 %	0 0.0 %	2 66.7%	1 50.0%	1 100.0%	0 0.0%	7 87.5%
양호	4 26.7%	0 0.0 %	3 30.0 %	1 100.0 %	1 33.3%	1 50.0%	0 0.0%	1 100.0%	1 12.5%
중간정 도	0 0.0%	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%
없음	0 0.0%	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%

[0381]

[0382] 이차 결과: 결과 #2

[0383] 2. 이차: 수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 [기간: 0일째 (수술의 완료 시)]

[0384] [표12] 일차 결과 #2

측정 유형	이차
측정 표제	수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실
측정 설명	예상된 혈액 손실은 참가자와 동일한 성별, 연령, 신장 및 동반이환의 지혈적으로 정상 개체에 기초하여 수술하는 외과의사에 의해 수술전으로 추정되었다. 실제 혈액 손실은 마취과의사의 기록에 따라 절차 중 면봉, 타월 및 흡입을 포함한, 추정된 혈액 손실로 구성되는 손실로 평가되었다.
기간	0 일째 (수술의 완료시)

[0385]

[0386] 모집단 설명 결과 #2

[0387] 예상된 혈액 손실에 대해 분석된 참가자의 수는 (주요 수술 보고 그룹에 포함된) 1명의 참가자에 대해 예상된 혈액 손실이 수집되지 않았기 때문에 14명이었다. 조사적인 생성물을 투여받고 적어도 하나의 지혈 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, 전체 분석 데이터 세트가 분석에 사용되었다.

[0388] [표 13]: 보고 그룹 결과 #2

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)
경미한 수술	경미한 수술을 받은 모든 참가자.
대수술 수술	대수술을 받은 모든 참가자.
경구 수술	경구 수술을 받은 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 1 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2A 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2B 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 2M 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 3	폰빌레브란트병 유형 3 이 있는 모든 참가자.

[0389]

[0390] [표 26]: 측정된 값 결과 #2

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	경미한 수술	대수술 수술	경구 수술	폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 3
분석된 참가자 의과외사에 의해 평가된 수술중 실제 대예상된 혈액 손실 [단위: mL] 평균 (표준 편차) 실제의 혈액 손실	15	4	10	1	3	2	1	1	8
분석된 참가자 실제의 혈액 손실	94.3 (177.88)	0.0 (0.00)	127.0 (209.27)	145.0 [1]	115.0 (103.32)	42.5 (53.03)	50.0 [1]	50.0 [1]	110.6 (240.87)
예상된 혈액 손실	106.1 (161.82)	2.5 (5.00)	152.8 (186.33)	100.0 [1]	100.0 (100.00)	10.0 [1]	50.0 [1]	50.0 [1]	134.4 (206.46)

[0391]

[0392] [1] 단 하나의 참가자가 분석되었기 때문에 가능한 표준 편차 없음.

[0393] 수술하는 외과외사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실에 대하여 제공된 통계적인 분석은 없다

[0394] 이차 결과: 결과 #3

[0395] 3. 이차: 예상된 혈액 손실에 대한 수술중 실제의 혈액 손실 [기간: 0일째 (수술의 완료 시)]

[0396] [표 14]: 결과 #3

측정 유형	이차
측정 표제	예상된 혈액 손실에 대한 수술중 실제의 혈액 손실
측정 설명	예상된 혈액 손실에 대한 실제의 혈액 손실은 [실제의 혈액 손실 (mL)]을 [예상된 혈액 손실 (mL)에 100 을 곱한 것으로 나눔으로 계산되었다.
기간	0 일째 (수술의 완료시)

[0397]

[0398] 모집단 설명 결과 #3

[0399] 분석된 참가자의 수는 3명 참가자에 대해 실제 및 예상된 혈액 손실은 제로였고 1명 참가자에 대해 예상된 혈액 손실이 수집되지 않았기 때문에 11명이었다. 따라서 '예상된 혈액 손실에 대한 실제의 혈액 손실'은 계산될 수 없었다. 전체 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석을 위해 사용되었다.

[0400] [표 15]: 보고 그룹 결과 #3

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)
경미한 수술	경미한 수술을 받은 모든 참가자.
대수술 수술	대수술을 받은 모든 참가자.
경구 수술	경구 수술을 받은 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 1 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2A 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2B 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 2M 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 3	폰빌레브란트병 유형 3 이 있는 모든 참가자.

[0401]

[0402] [표 16]: 측정된 값

	재조합 폰빌레브 란트 인자 (rVWF)	경미 한 수술	대수술 수술	경구 수술	폰빌레브란 트병 유형 1	폰빌레브란 트병 유형 2A	폰빌레브란 트병 유형 2B	폰빌레브란 트병 유형 2M	폰빌레브란 트병 유형 3
분석된 참가자	11	1	9	1	2	1	1	1	6
예상된 혈액 손실에 대한 수술 중 실제의 혈액 손실	69.6 (44.77)	0.0 [1]	68.9 (34.48)	145.0 [1]	122.5 (31.82)	50.0 [1]	100.0 [1]	100.0 [1]	45.0 (38.92)
[단위: 퍼 센트] 평균 (표준 편차)									

[0403]

[0404] [1] 단 하나의 참가자가 분석되었기 때문에 가능한 표준 편차 없음.

[0405] 예상된 혈액 손실에 대한 수술중 실제의 혈액 손실에 대하여 제공된 통계적인 분석은 없다

[0406] 이차 결과: 결과 #4

[0407] 4. 이차: 수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 점수 [기간: 0일째 (수술의 완료 시)]

[0408] [표 17]: 결과 #4

측정 유형	이차
측정 표제	수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 점수
측정 설명	지혈 효능은 탁월-양호-중간 정도-없음의 척도로 평가되었다. 탁월: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 기대된 최대 혈액 손실과 보다 낮거나 동등하였다 ($\leq 100\%$). 양호: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 최대의 기대된 혈액 손실보다 최대 50% 많았다 (101-150%) 중간 정도: 수술중 혈액 손실이 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술의 유형에 대해 기대된 최대 혈액 손실의 50%보다 많았다 ($>150\%$). 없음: 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않는 출혈로, 응고 인자 대체 레지멘의 변화를 필요로 하였다.
기간	0 일째 (수술의 완료시)

[0409]

[0410] [표 18]: 모집단 설명 결과 #4

주요한, 경미한 및 경구 수술을 한 참가자의 수와 폰빌레브란트 유형 1, 2A, 2B, 2M 및 3 을 갖는 참가자의 수는 분석된 참가자의 전체적인 수에 합산한다. 조사적인 생성물을 투여받고 적어도 하나의 지혈 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, 전체 분석 데이터 세트가 분석에 사용되었다.

[0411]

[0412] [표 19]: 보고 그룹 결과 #4

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)
경미한 수술	경미한 수술을 받은 모든 참가자.
대수술 수술	대수술을 받은 모든 참가자.
경구 수술	경구 수술을 받은 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 1 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2A 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2B 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 2M 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 3	폰빌레브란트병 유형 3 이 있는 모든 참가자.

[0413]

[0414] [표 20]: 측정된 값 결과 #4

	재조합 폰빌레브 란트 인자 (rVWF)	경미한 수술	대수술 수술	경구 수술	폰빌레브 란트병 유형 1	폰빌레브 란트병 유형 2A	폰빌레브 란트병 유형 2B	폰빌레브 란트병 유형 2M	폰빌레브 란트병 유형 3
분석된 참가자	15	4	10	1	3	2	1	1	8
외과의사 에 의해 평가된 수술중 실제 대예상된 혈액 손실 점수 [단위: 참 가자] 참가자의 수									
탁월	13 86 .7%	4 100 .0%	8 80 .0%	1 100 .0%	3 100.0 %	1 50.0 %	1 100.0 %	1 100.0 %	7 87.5 %
양호	2 13.3 %	0 0 .0%	2 20 .0%	0 0 .0%	0 0.0 %	1 50.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	1 12.5 %
중간 정도	0 0 0%	0 0 .0%	0 0 .0%	0 0 .0%	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %
없음	0 0 0%	0 0 .0%	0 0 .0%	0 0 .0%	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %	0 0.0 %

[0415]

[0416] 수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 실제 대 예상된 혈액 손실 점수에 대하여 제공된 통계적인 분석은 없다

[0417]

이차 결과: 결과 #5

[0418]

5. 이차: 수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 지혈 효능 점수 [기간: 0일째 (수술의 완료 시)]

[0419]

[표 21]: 결과 #5

측정 유형	이차
측정 표제	수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 지혈 효능 점수
측정 설명	지혈 효능은 탁월-양호-중간 정도-없음의 척도로 평가되었다. 탁월: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 달성된 수술중 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것보다 양호하거나 더 나았다. 양호: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 달성된 수술중 지혈은 지혈적으로 정상 대상체에서 수행된 수술 과정의 유형에 대해 기대된 것과 같이 아마 양호하였다. 중간 정도: ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 로 수술중 지혈은 수행된 절차의 유형에 대해 최적인 것보다 분명히 낮지만, rVWF 농축물을 변경할 필요 없이 유지되었다. 없음: 참가자가 적절한 투약에도 불구하고 부적절한 치료적 반응의 결과인 조절되지 않은 출혈을 경험했으며, rVWF 농축물의 변경을 필요로 했다.
기간	0 일째 (수술의 완료시)

[0420]

[0421] [표 22]: 모집단 설명 결과 #5

주요한, 경미한 및 경구 수술을 한 참가자의 수와 폰빌레브란트 유형 1, 2A, 2B, 2M 및 3 을 갖는 참가자의 수는 분석된 참가자의 전체적인 수에 합산한다. 조사적인 생성물을 투여받고 적어도 하나의 지혈 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, 전체 분석 데이터 세트가 분석에 사용되었다.

[0422]

[0423] [표 23]: 보고 그룹 결과 #5

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)
경미한 수술	경미한 수술을 받은 모든 참가자.
대수술 수술	대수술을 받은 모든 참가자.
경구 수술	경구 수술을 받은 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 1	폰빌레브란트병 유형 1 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2A	폰빌레브란트병 유형 2A 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2B	폰빌레브란트병 유형 2B 가 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 2M	폰빌레브란트병 유형 2M 이 있는 모든 참가자.
폰빌레브란트병 유형 3	폰빌레브란트병 유형 3 이 있는 모든 참가자.

[0424]

[0425] [표 24]: 측정된 값 결과 #5

	재조합 폰빌레브 란트 인자 (rVWF)	경미한 수술	대수술 수술	경구 수술	폰빌레브 란트병 유형 1	폰빌레브 란트병 유형 2A	폰빌레브 란트병 유형 2B	폰빌레브 란트병 유형 2M	폰빌레브 란트병 유형 3
분석된 참가자	15	4	10	1	3	2	1	1	8
외과의사 에 의해 평가된 수술중 지혈 효능 점수 [단위: 참 가자] 참가자의 수									
탁월	13 86.7%	4 100.0%	8 80.0%	1 100.0%	3 100.0%	1 50.0%	1 100.0%	1 100.0%	7 87.5%
양호	2 13.3%	0 0.0%	2 20.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 50.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 12.5%
중간	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%
정도	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%
없음	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%

[0426]

[0427] 수술하는 외과의사에 의해 평가된 바와 같은 수술중 지혈 효능 점수에 대하여 제공된 통계적인 분석은 없다

[0428] 이차 결과: 결과 #6

[0429] 6. 이차: ADVATE가 있거나 없이 rVWF의 매일 수술중 및 수술후 중량-조정된 용량 [기간: 수술 일로부터 수술후 14일째 (± 2일)까지에 걸쳐 매일]

[0430] [표 25]: 결과 #6

측정 유형	이차
측정 표제	ADVATE가 있거나 없이 rVWF의 매일 수술중 및 수술후 중량-조정된 용량
측정 설명	입력된 텍스트 없음.
기간	수술 일로부터 수술후 14 일차 (± 2 일)까지, 매일

[0431]

[0432] [표 25]: 모집단 설명 결과 #6

분석된 참가자의 수는 개별 치료에 따른 시점에 대해 상이하였다. 조사적인 생성물을 투여받고 적어도 하나의 지혈 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, 전체 분석 데이터 세트가 분석에 사용되었다.
--

[0433]

[0434] [표 40]: 보고 그룹 결과 #6

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0435]

[0436] [표 26]: 측정된 값 결과 #6

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
ADVATE 가 있거나 없이 rVWF 의 매일 수술중 및 수술후 중량- 조정된 용량 [단위: IU/kg] 중앙 (사분위 범위)	
수술중	
분석된 참가자	1
수술중	18.1 (18.1 내지 18.1)
수술후 1 일차	
분석된 참가자	3
수술후 1 일차	23.5 (16.9 내지 47.2)
수술후 2 일차	
분석된 참가자	11
수술후 2 일차	42.3 (23.2 내지 50.6)
수술후 3 일차	
분석된 참가자	12
수술후 3 일차	28.6 (20.6 내지 48.9)
수술후 4 일차	
분석된 참가자	9
수술후 4 일차	33.9 (23.2 내지 44.3)
수술후 5 일차	
분석된 참가자	7
수술후 5 일차	31.5 (18.8 내지 47.2)
수술후 6 일차	
분석된 참가자	5
수술후 6 일차	23.2 (18.8 내지 23.6)
수술후 7 일차	
분석된 참가자	5

[0437]

수술후 7 일차	23.8 (23.6 내지 50.8)
수술후 8 일차	
분석된 참가자	7
수술후 8 일차	33.9 (23.6 내지 53.6)
수술후 9 일차	
분석된 참가자	3
수술후 9 일차	23.6 (16.3 내지 53.6)
수술후 10 일차	
분석된 참가자	3
수술후 10 일차	23.6 (16.3 내지 34.8)
수술후 11 일차	
분석된 참가자	3
수술후 11 일차	23.6 (16.3 내지 53.6)
수술후 12 일차	
분석된 참가자	4
수술후 12 일차	29.3 (20.1 내지 44.2)
수술후 13 일차	
분석된 참가자	1
수술후 13 일차	16.3 (16.3 내지 16.3)
수술후 14 일차	
분석된 참가자	2
수술후 14 일차	25.5 (16.3 내지 34.8)
수술후 15 일차	
분석된 참가자	1
수술후 15 일차	16.3 (16.3 내지 16.3)

[0438]

[0439] ADVATE가 있거나 없이 rVWF의 매일 수술중 및 수술후 중량-조정된 용량에 대하여 제공된 통계적인 분석은 없다

[0440] **이차 결과: 결과 #7**

[0441] 7. 이차: 유해 사례의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일) 까지 걸침].

[0442] **[표 27]: 결과 #7**

측정 유형	이차
측정 표제	유해 사례의 발생
측정 설명	치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 평가되었다.
기간	조사적인 생성물의 제 1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)까지 걸침

[0443]

[표 28]: 모집단 설명 결과 #7

임의의 양의 조사적인 생성물을 투여받은 모든 참가자를 포함하여, 안전성 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[표 29]: 보고 그룹 결과 #7

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[표 30]: 측정된 값

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
유해 사례의 발생 [단위: 유해 사례]	
치료 관련 유해 사례 (TEAE)	12
심각한 TEAE	1
rVWF에 관련된 TEAE	0
ADVATE에 관련된 TEAE	0
rVWF 및 ADVATE 둘 모두에 관련된 TEAE	0
치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)	2
rVWF에 관련된 TESAE	0
ADVATE에 관련된 TESAE	0
rVWF 및 ADVATE 둘 모두에 관련된 TESAE	0
rVWF의 중단으로 이어지는 TEAE	0
ADVATE의 중단으로 이어지는 TEAE	0
연구의 중단으로 이어지는 TEAE	0
사망으로 이어지는 TEAE	0
연구 절차에 관련된 TEAE	0
연구 절차에 관련된 TESAE	0

유해 사례의 발생에 대해 제공된 통계적인 분석을 없다

이차 결과: 결과 #8

8. 이차: 혈전성 사건의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)까지 걸침]

[표 31]: 결과 #8

측정 유형	이차
측정 표제	혈전성 사건의 발생
측정 설명	치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 항전성 사건에 대해 평가되었다.
기간	조사적인 생성물의 제 1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)까지 걸침

[표 32]: 모집단 설명 결과 #8

임의의 양의 조사적인 생성물을 투여받은 모든 참가자를 포함하여, 안전성 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0457] [표 33]: 보고 그룹

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0458]

[0459] [표 34]: 측정된 값 결과 #8

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
혈전성 사건의 발생 [단위: 유해 사례]	
혈전성 TEAE	2
혈전성 TESAE	1

[0460]

[0461] 혈전성 사건의 발생에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0462] 이차 결과: 결과 #9

[0463] 9. 이차: 심각한 알러지성 반응 (예를 들어, 과민증)의 발생 [기간: 조사적인 생성물의 제1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)까지 걸침]

[0464] [표 35]: 결과 #9

측정 유형	이차
측정 표제	심각한 알러지성 반응 (예를 들어, 과민증)의 발생
측정 설명	치료 관련 유해 사례 (TEAE) 및 치료 관련 심각한 유해 사례 (TESAE)가 심각한 알러지성 반응에 대해 평가되었다.
기간	조사적인 생성물의 제 1 주입으로부터 연구 완료 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)까지 걸침

[0465]

[0466] [표 36]: 모집단 설명 결과 #9

임의의 양의 조사적인 생성물을 투여받은 모든 참가자를 포함하여, 안전성 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다..
--

[0467]

[0468] [표 37]: 보고 그룹 결과 #9

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0469]

[0470] [표 38]: 측정된 값 결과 #9

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
심각한 알러지성 반응 (예를 들어, 과민증)의 발생 [단위: 유해 사례]	
심각한 알러지성 반응 TEAE	0
심각한 알러지성 반응 TESAE	0

[0471]

[0472] 심각한 알러지성 반응 (예를 들어, 과민증)의 발생에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0473] 이차 결과: 결과 #10

[0474] 10. 이차: 폰빌레브란트 인자 (VWF)에 대한 억제성 및 총 결합 항체 및 인자 VIII (FVIII)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수 [기간: 검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다.]

[0475] [표 39]: 모집단 설명 결과 #10

측정 유형	이차
측정 표제	폰빌레브란트 인자 (VWF)에 대한 억제성 및 총 결합 항체와 인자 VIII (FVIII)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수
측정 설명	참가자는 ADVATE 가 있거나 없이 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)로 치료되었다.
기간	검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다.

[0476]

[0477] [표 40]: 모집단 설명 결과 #10

임의의 양의 조사적인 생성물을 투여받은 모든 참가자를 포함하여, 안전성 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0478]

[0479] [표 41]: 보고 그룹 결과 #10

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0480]

[0481] [표 55]: 측정된 값 결과 #10

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
폰빌레브란트 인자 (VWF)에 대한 억제성 및 총 결합 항체와 인자 VIII (FVIII)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수 [단위: 참가자] 참가자의 수	
VWF 에 대한 억제성 항체의 전개	0
VWF 에 대한 총 결합 항체의 전개	1
FVIII 에 대한 억제성 항체의 전개	0

[0482]

[0483] 폰빌레브란트 인자 (VWF)에 대한 억제성 및 총 결합 항체 및 인자 VIII (FVIII)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0484] **이차 결과: 결과 #11**

[0485] 11. 이차: 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 마우스 면역글로불린 G (IgG) 또는 재조합 Furin (rFurin)에 대한 항체를 전개한 참가자의 수 [기간: 검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다.]

[0486] **[표 42]: 결과 #11**

측정 유형	이차
측정 표제	차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 마우스 면역글로불린 G (IgG) 또는 재조합 Furin (rFurin)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수
측정 설명	참가자는 ADVATE가 있거나 없이 재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)로 치료되었다.
기간	검사는 과도한 출혈 또는 원인불명 출혈의 경우에 스크리닝, 사전 PK 주입, 수술-전, 수술-후에, 수술후 7일째 및 연구 완료 방문 (즉, 수술-후 14 (± 2)일)에서 연구 전반에 걸쳐 수행했다.

[0487]

[0488] **[표 43]: 모집단 설명 결과 #11**

임의의 양의 조사적인 생성물을 투여받은 모든 참가자를 포함하여, 안전성 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0489]

[0490] **[표 44]: 보고 그룹 결과 #11**

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0491]

[0492] **[표 59]: 측정된 값 결과 #11**

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	15
차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 마우스 면역글로불린 G (IgG) 또는 재조합 Furin (rFurin)에 대한 억제성 항체를 전개한 참가자의 수	0
[단위: 참가자]	
참가자의 수	

[0493]

[0494] 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질, 마우스 면역글로불린 G (IgG) 또는 재조합 Furin (rFurin)에 대한 항체를 전개한 참가자의 수에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0495] **이차 결과: 결과 #12**

[0496] 12. 이차: 약동학: 주입후 0 내지 72시간 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-72 h/용량) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0497] [표 45]: 결과 #12

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 주입후 0 내지 72 시간 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-72 h/용량)
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 주입후 0 내지 72 시간 혈장 농도/시간 곡선 하의 면적은 선형 사다리꼴 규칙을 사용하여 계산되었다. AUC(0-72h)의 계산의 경우 72 시간에서의 수준은 2 개 최근접한 샘플링 시점으로부터 선형으로 보간/외삽되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac), FVIII 응고 활성 (FVIII:C)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0498]

[0499] [표 46]: 모집단 설명 결과 #12

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0500]

[0501] [표 47]: 보고 그룹 결과 #12

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0502]

[0503] [표 48]: 측정된 값 결과 #12

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 주입후 0 내지 72 시간 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-72 h/용량) [단위: 시간*IU/dL] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RC₀	
분석된 참가자	11
VWF:RC₀	31.91 (37.5%)
VWF:Ag	
분석된 참가자	11
VWF:Ag	57.08 (25.6%)
VWF:CB	
분석된 참가자	11
VWF:CB	63.91 (29.4%)
VWF:Ac	
분석된 참가자	11
VWF:Ac	54.61 (28.1%)
FVIII:C	
분석된 참가자	5
FVIII:C	67.49 (31.1%)

[0504]

[0505] 약동학: 주입후 0 내지 72시간 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-72 h/용량)에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0506] **이차 결과: 결과 #13**

[0507] 13. 이차: 약동학: 0부터 무한대 시간까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-∞/용량) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0508] [표 49]: 결과 #13

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 0 부터 무한대 시간까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0- ∞ /용량)
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50 ± 5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 0 부터 무한대 시간까지의 혈장 농도/시간 곡선 하의 면적 및 0 부터 무한대 시간까지의 제 1 모멘트 곡선 하의 면적은 시간 0 부터 마지막 정량화가능 농도의 시간까지의 AUC 또는 AUMC 플러스 각각 C_t/λ_z 및 $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$로 계산된 꼬리 면적 정정의 합으로 계산되었고, 여기서 C_t는 마지막 정량화가능 농도이고, t는 마지막 정량화가능 농도의 시간이고 그리고 λ_z는 말단 또는 성향 속도 상수였다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac), FVIII 응고 활성 (FVIII:C)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0509]

[0510] [표 50]: 모집단 설명 결과 #13

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한 PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.
--

[0511]

[0512] [표 51]: 보고 그룹 결과 #13

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0513]

[0514] [표 52]: 측정된 값

	재조합 폰빌레브란드 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 0 부터 무한대 시간까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-∞ /용량) [단위: 시간*IU/dL] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RCo	
분석된 참가자	11
VWF:RCo	34.43 (43.3%)
VWF:Ag	
분석된 참가자	11
VWF:Ag	68.87 (31.5%)
VWF:CB	
분석된 참가자	11
VWF:CB	71.82 (34.1%)
VWF:Ac	
분석된 참가자	11
VWF:Ac	61.90 (32.2%)
FVIII:C	
분석된 참가자	3
FVIII:C	75.00 (30.9%)

[0515]

[0516] 약동학: 0부터 무한대 시간까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 하의 면적 (AUC 0-∞/용량) 에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0517] **이차 결과: 결과 #14**

[0518] 14. 이차: 약동학: 평균 체류 시간 (MRT) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0519] [표 53]: 결과 #14

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 평균 체류 시간 (MRT)
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50±5 IU/kg rVWF:RCo 의 용량에서 PK 주입을 받았다. 평균 체류 시간은 시간 0 부터 무한대까지의 제 1 모멘트 곡선 하의 면적을 시간 0 부터 무한대까지의 곡선 하 면적 마이너스 T/2 로 나눔으로 계산되었고 여기서 T는 주입의 기간이었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0520]

[0521] [표 54]: 모집단 설명 결과 #14

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0522]

[0523] [표 55]: 보고 그룹 결과 #14

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0524]

[0525] [표 56]: 측정된 값

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 평균 체류 시간 (MRT) [단위: 시간] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RC ₀	22.69 (41.3%)
VWF:Ag	37.92 (28.4%)
VWF:CB	29.35 (31.1%)
VWF:Ac	29.75 (28.6%)

[0526]

[0527] 약동학: 평균 체류 시간 (MRT)에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0528] 이차 결과: 결과 #15

[0529] 15. 이차: 약동학: 청소능 (CL) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0530] [표 57]: 결과 #15

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 청소능 (CL)
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50±5 IU/kg rVWF:RC ₀ 의 용량에서 PK 주입을 받았다. 청소능은 용량 (IU/kg)을 시간 0 부터 무한대까지의 곡선 하의 면적으로 나눔으로 계산되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RC ₀), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0531]

[0532] [표 58]: 모집단 설명 결과 #15

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0533]

[0534] [표 59]: 보고 그룹 결과 #15

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0535]

[0536] [표 60]: 측정된 값

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 청소능 (CL) [단위: dL/hour/kg] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RCo	0.02904 (43.3%)
VWF:Ag	0.01452 (31.5%)
VWF:CB	0.01392 (34.1%)
VWF:Ac	0.01616 (32.2%)

[0537]

[0538] 약동학: 청소능 (CL)에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0539] 이차 결과: 결과 #16

[0540] 16. 이차: 약동학: 증분적 회복 (IR) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0541] [표 61]: 결과 #16

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 증분적 회복 (IR)
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50±5 IU/kg rVWF:RCo의 용량에서 PK 주입을 받았다. 증분적 회복은 (C _{max} 마이너스 C 주입전)을 용량 (IU/kg)으로 나눔으로 계산되었고 여기서 kg은 투약 시의 체중을 지칭하고, C _{max} 는 주입-전 값에 대해 정정 전 관측된 최대 농도였다. PK 분석은 하기 표본식물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RCo), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
기간	PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0542]

[0543] [표 77]: 모집단 설명 결과 #16

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한, PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.

[0544]

[0545] [표 62]: 보고 그룹 결과 #16

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0546]

[0547] [표 63]: 측정된 값 결과 #16

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 증분적 회복 (IR)	
[단위: IU/dL]	
평균 (표준 편차)	
VWF:RC ₀	1.961 (0.45445)
VWF:Ag	1.991 (0.38395)
VWF:CB	2.780 (0.56640)
VWF:Ac	2.635 (0.38050)

[0548]

[0549] 약동학: 증분적 회복 (IR)에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0550] 이차 결과: 결과 #17

[0551] 17. 이차: 약동학: 제거 단계 반감기 (T_{1/2}) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0552] [표 64]: 결과 #17

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 제거 단계 반감기 (T _{1/2})
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50±5 IU/kg rVWF:RC ₀ 의 용량에서 PK 주입을 받았다. 말단 또는 성향 반감기 (T _{1/2})는 $\ln 2 / \lambda_z$ 로 계산되었고 여기서 λ_z 는 적어도 3 개 정량화가능 농도를 사용하여 WinNonlin NCA 에서 계산된 말단 제거율 상수였다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RC ₀), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0553]

[0554] [표 65]: 모집단 설명 결과 #17

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한 PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.
--

[0555]

[0556] [표 66]: 보고 그룹 결과 #17

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0557]

[0558] 측정된 값

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 제거 단계 반감기 (T1/2) [단위: 시간] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RC ₀	16.52 (42.7%)
VWF:Ag	26.88 (26.5%)
VWF:CB	21.07 (33.2%)
VWF:Ac	22.19 (28.5%)

[0559]

[0560] 약동학: 제거 단계 반감기 (T1/2)에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0561] 이차 결과: 결과 #18

[0562] 18. 이차: 약동학: 정상 상태에서 분포의 용적 (V_{ss}) [기간: PK 측정은 주입-전 30분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.]

[0563] [표 67]: 결과 #18

측정 유형	이차
측정 표제	약동학: 정상 상태에서 분포의 용적 (V _{ss})
측정 설명	이 평가는 대수술을 경험한 대상체에 대해서만 필요했다. 대상체는 수술 이전 42 일 이내에 50±5 IU/kg rVWF:RC ₀ 의 용량에서 PK 주입을 받았다. V _{ss} 는 청소능을 평균 체류 시간과 곱함으로 계산되었다. PK 분석은 하기 피분석물에 대해 수행되었다: VWF 리스토세틴 보조인자 활성 (VWF:RC ₀), VWF 항원 활성 (VWF:Ag), VWF 콜라겐 결합 활성 (VWF:CB), VWF 활성 측정된 INNOVANCE VWF Ac 검정 (VWF:Ac)
기간	PK 측정은 주입-전 30 분 내, 및 주입 후 30 (± 5)분, 60 (± 5)분, 6 (± 1)시간, 12 (± 1)시간, 24 (± 2)시간, 48 (± 2)시간 및 72 (± 2)시간에서 수행되었다.

[0564]

[0565] [표 68]: 모집단 설명 결과 #18

관련된 시점에서 수집된 데이터로 PK 평가를 받은 모든 참가자를 포함한 PK 분석 데이터 세트가 이 결과 측정의 분석에 대해 사용되었다.
--

[0566]

[0567] [표 69]: 보고 그룹 결과 #18

	설명
재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)	재조합 폰빌레브란트 인자로 치료된 수술 참가자 (rVWF)

[0568]

[0569] 측정된 값 결과 #18

	재조합 폰빌레브란트 인자 (rVWF)
분석된 참가자	11
약동학: 정상 상태에서 분포의 용적 (V _{ss}) [단위: dL/kg] 기하 평균 (기하학적 변동 계수)	
VWF:RC ₀	0.6591 (28.8%)
VWF:Ag	0.5506 (18.4%)
VWF:CB	0.4086 (24.0%)
VWF:Ac	0.4806 (21.5%)

[0570]

[0571] 약동학: 정상 상태에서 분포의 용적 (V_{ss})에 대해 제공된 통계적인 분석은 없다

[0572] 상기 제시된 실시예는 당해 분야의 숙련자에게 본 발명의 조성물, 시스템 및 방법의 구현예를 제조 및 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제공되고, 본 발명자들이 그것의 발명으로 간주하는 것의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 당해 분야의 숙련자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 상기-기재된 방식의 변형은 하기의 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개는 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련자의 기술의 수준을 나타낸다. 본 개시내용에서 인용된 모든 참고문헌은 각각의 참고문헌이 개별적으로 전체적으로 참고로 포함된 것과 동일한 정도로 참고로 포함된다.

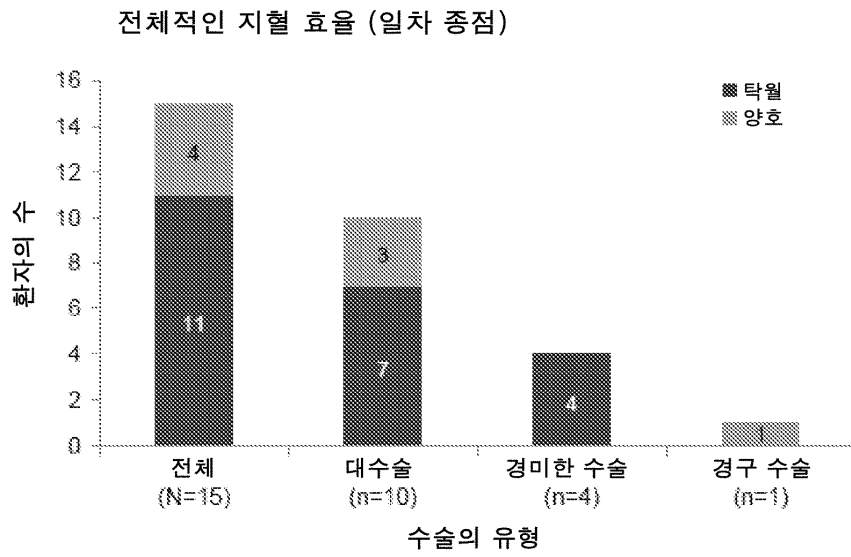
[0573] 모든 제목과 섹션 지정은 명확성 및 참고 목적으로만 사용되며 어떤 식으로든 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 당해 분야의 숙련자는 본 명세서에 기재된 본 발명의 사상 및 범위에 따라 적절하게 상이한 제목 및 섹션으로부터 다양한 양태를 조합하는 유용성을 인정할 것이다.

[0574] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌은 각각의 개별 공보 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 그것의 전체적으로 그리고 모든 목적을 위해 본 명세서에 이로써 참고로 포함된다.

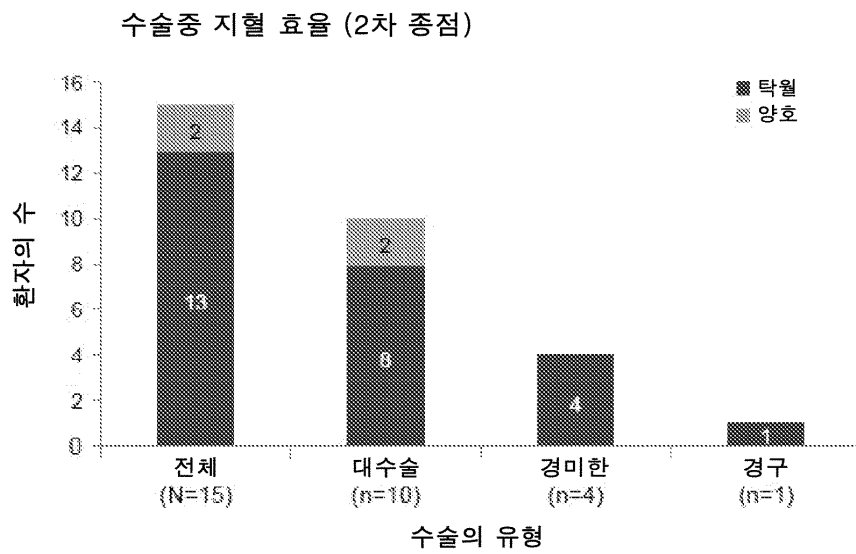
[0575] 당해 분야의 숙련자에게 명백한 바와 같이, 본원의 많은 변형 및 변동이 그 사상 및 범위를 벗어남이 없이 이루어질 수 있다. 본 명세서에 기재된 특정 구현예 및 실시예는 단지 예로써 제공되며, 본 출원은 청구항에 부여되는 등가물의 전체 범위와 함께 첨부된 청구항들의 용어들에 의해서만 제한되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

표 3. 기준선 인구통계 및 임상 특성

파라미터	N=15
성, n (%)	
남성	7 (46.7)
암컷	8 (53.3)
중위 연령 (범위), y	40 (20-70)
중량 중량 (범위), kg	73.5 (52.0-127.2)
중량 BMI (범위), kg/m ²	25.6 (17.1-38.0)
VWD 유형, n (%)	
1	3 (20.0)
2A	2 (13.3)
2B	1 (6.7)
2M	1 (6.7)
3	8 (53.3)
수술 분류, n (%)	
경미한	10 (66.7)
대수술	4 (26.7)
경구	1 (6.7)
평균 (SD) FVIII:C, IU/dL	16.4 (19.9)
평균 (SD) VWF:RCO, IU/dL	10.6 (13.3)

BMI=체질량 지수; FVIII:C=인자 VIII 활성; VWD=폰빌레브란트병;
VWF:RCO=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성

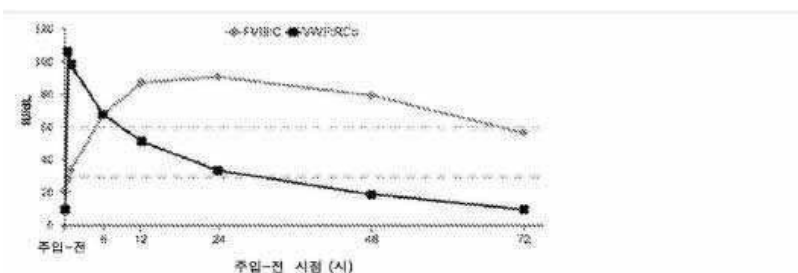
도면4

표 4. VWF:RCo에 대한 PK 파라미터 (n=11)

파라미터	평균	SD	범위
$AUC_{0-\infty}$ /용량, (h*IU/dL)/(IU/kg)	37.50	18.14	19.2-83.5
AUC_{0-72h} /용량, (h*IU/dL)/(IU/kg)	34.08	14.59	18.3-72.6
C_{max} , IU/dL	96.27	22.01	49.0-118
$T_{1/2}$, h	17.83	7.34	9.08-31.6
C_{max} 에서 IR, (IU/dL)/(IU/kg)	1.96	0.45	1.06-2.48

AUC =곡선하 면적; C_{max} =피크 농도; IR=증분적 회복; NC=계산되지 않음;
PK=약동학적; SD=표준 편차; T_{max} =피크 농도에 대한 시간; $T_{1/2}$ =말단 반감기;
VWF:RCo=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성.

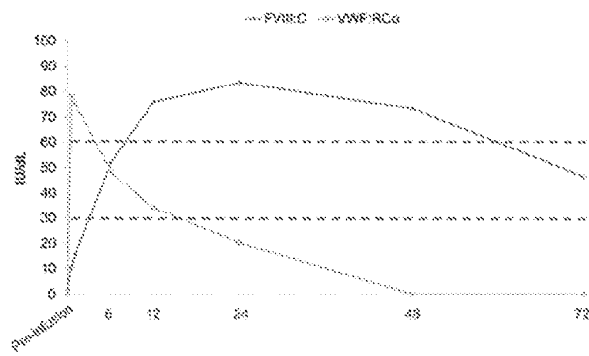
도면5a



FVIII:C=인자 VIII 활성; VWF:RCo=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성.

표적 내인성 FVIII:C 수준 (경미한/경구 수술에 대해 30 IU/dL 또는 대수술에 대해 60 IU/dL)은 대시지표로 된 수평선에 의해 표시됨.

도면5b



FVIII:C=인자 VIII 활성; VWF:RCO=폰빌레브란트 인자 리스토세틴 보조인자 활성.

표적 내인성 FVIII:C 수준 (경미한/경구 수술에 대해 30 IU/dL 또는 대수술에 대해 60 IU/dL)은 대시기호로 된 수평선에 의해 표시됨.

도면6a

서열번호: 1

agctcacagc	tattgtgggtg	ggaagggag	ggtggttgg	ggatgtcaca	gcttgggctt	60
tatctccccc	agcagtgggg	actccacagc	ccctgggcta	cataacagca	agacagtccg	120
gagctgtagc	agacctgatt	gagcctttgc	agcagctgag	agcatggcct	agggtagggc	180
gcaccattgt	ccagcagctg	agtttccca	ggaccttgga	gatagccgca	gccctcattt	240
gcaggggaag	atgattcctg	ccagatttgc	cggggtgctg	cttgctctgg	ccctcatttt	300
gccaggggacc	ctttgtgcag	aaggaaactcg	cggcagggtca	tccacggccc	gatgcagcct	360
tttcgggaagt	gacttcgtca	acacctttga	tgggagcatg	tacagctttg	cgggatactg	420
cagttacctc	ctggcagggg	gctgccagaa	acgtctcttc	tcgattattg	gggacttcca	480
gaatggccaag	agagtggacc	tctccgtgta	tcttggggaa	ttttttgaca	tccatttggt	540
tgtaaatggt	accgtgacac	agggggacca	aagagtctcc	atgccctatg	cctccaaagg	600
gctgtatcta	gaaactgagg	ctgggtacta	caagctgtcc	ggtgaggcct	atggctttgt	660
ggccaggatc	gatggcagcg	gcaactttca	agtctgtctg	tcagacagat	acttcaacaa	720
gacctgctgg	ctgtgtggca	actttaacat	ctttgctgaa	gatgacttta	tgacccaaga	780
agggaccttg	acctcggaac	cttatgactt	tgccaaactca	tgggctctga	gcagtggaga	840
acagtgggtg	gaacgggcat	ctcctcccag	cagctcatgc	aacatctcct	ctggggaaat	900
gcagaagggc	ctgtgggagc	agtggcagct	tctgaagagc	acctcggtgt	ttgcccctcg	960
ccacctctcg	gtggaccctcg	agccttttgt	ggccctgtgt	gagaagactt	tgtgtgagtg	1020
tgctgggggg	ctggagtgcg	cctgccttgc	cctcctggag	tacgcccga	cctgtgcccc	1080
ggagggaatg	gtgctgtacg	gctggaccga	ccacagcgcg	tgacgcccag	tgtgccctgc	1140
tggtatggag	tataggcagt	gtgtgtcccc	ttgcgccagg	acctgccaga	gcctgcacat	1200
caatgaaatg	tgtcaggagc	gatgcgtgga	tggctgcagc	tgccctgagg	gacagctcct	1260
ggaatgaagg	ctctgcgtgg	agagcaccca	gtgtccctgc	gtgcattccg	gaaagcgcta	1320
ccctcccgcc	acctccctct	ctcgagactg	caacacctgc	atgtgcccga	acagccagtg	1380
gactctgcag	aatgaagaat	gtccagggga	gtgccttctg	acaggtcaat	cacacttcaa	1440
gagctttgac	aacagatact	tcaccttcag	tggatctgac	cagtacctgc	tggcccggga	1500
ttgccaggac	cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgcga	1560
cgctgtgtgc	accgcgtccg	tcaccgtccg	gctgcctggc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	1620
actgaagcat	ggggcaggag	ttgccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctcctgaa	1680
aggtgacctc	cgcattccagc	atacagtgc	ggcctccgtg	gcctcagctc	acggggagga	1740
cctgcagatg	gactgggatg	gcccggggag	gctgctgggt	aagctgtccc	ccgtctatgc	1800
cggggaagacc	tgccggctgt	gtgggaatta	caatggcaac	caggggcgacg	acttcccttac	1860
ccctctctgg	ctggcggagc	cccggtggga	ggacttccgg	aacgcctgga	agctgcacgg	1920
ggactgccag	gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcattgc	1980
cagggtctcc	gaggaggcgt	gcccgggtcc	gacgtccccc	acattcagag	cctgccatcg	2040
tgccgtcagc	ccgctgcctc	acctgcggaa	ctgcgcgtac	gacgtgtgct	cctgctcgga	2100
cgcccgcgag	tgccctgtgc	gcccctgggc	cagctatgcc	gcccctgcg	cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc	gcgtggcgcg	agccaggccg	ctgtgagctg	aaactgccga	aaggccaggt	2220
gtacctgcag	tgccgggacc	cctgcaacct	gacctgcgcg	tctctctctt	acccggatga	2280
ggaatgcaat	gaggcctgcc	tggagggtcg	cttctgcccc	ccagggtctc	acatggatga	2340
gaggggggac	tgctgtccca	aggcccagtg	cccctgttac	tatgacggtg	agatcttcca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	gcttcatgca	2460
ctgtaccatg	agtggagtcc	ccggaaagctt	gctgcctgac	gctgtectca	gcagtccctc	2520
gtctcatcgc	agcaaaagga	gcctatcctg	tcggcccccc	atggtcaagc	tggtgtgtcc	2580
cgtgacaac	ctgcgggctg	aagggtctga	gtgtacccaa	acgtgccaga	actatgacct	2640
ggagtgcagt	agcatgggct	gtgtctcttg	ctgcctctgc	cccccgggca	tggtccggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaaggtg	tccctgcttc	catcagggca	aggagtatgc	2760
ccctggagaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcggggac	ggaagtggaa	2820
ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccacgata	ggcatggccc	actacctcac	2880
cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttcccccg	ggagtgccag	tacgttcttg	tgacggatta	2940
ctgcggcagt	aaccttggga	cctttctggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccaccc	3000
ctcagtgaat	tgcaagaaac	gggtcacccat	cctggtggag	ggaggagaga	ttgagctgtt	3060
tgacggggag	gtgaatgtga	agaggcccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	3120
gtctggccgg	tacatcattc	tgctgctggg	caaagccctc	tccgtgtgtc	gggaccgcca	3180
cctgagcatc	tccgtgggtc	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	3240
gaattttgat	ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggagggaaga	3300
ccctgtggac	tttgggaact	cctggaaagt	gagctcgag	tgtgctgaca	ccagaaaagt	3360
gcctctggac	tcatccctcg	ccacctgcca	taacaacatc	atgaagcaga	cgatggtgga	3420
ttctctctgt	agaatcctta	ccagtgacgt	cttccaggac	tgcaacaagc	tggtaggacc	3480
cagagccatat	ctggatgtct	gcaatttaca	cacctgctcc	tgtgagtcca	ttggggactg	3540

도면6b

cgctgcttc	tgcgacacca	ttgtctgccta	tgcccacgtg	tgtgcccagc	atggcaaggt	3600
ggtagacctg	aggacggcca	cattgtgtccc	ccagagctgc	gaggagagga	atctccggga	3660
gaacgggtat	gagtgtgagt	ggcgctataa	cagctgtgca	cctgacctgc	aagtccagtg	3720
tcagcaccc	gagccactgg	cctgccccgt	gcagtgtgtg	gagggctgcc	atgcccactg	3780
ccctccaggg	aaaatcctgg	atgagctttt	gcagacctgc	gttgacctcg	aagactgtcc	3840
agtggtgtgag	gtggctgtgcc	ggcgttttgc	ctcaggaaag	aaagtcacct	tgaatcccag	3900
tgacctgtgag	cactgcccaga	tttgcccactg	tgatgtttgtc	aacctcacct	gtgaagcctg	3960
ccaggagccg	ggaggcctgg	tgggtccctcc	cacagatgcc	ccgggtgagcc	ccaccactct	4020
gtatgtggag	gacatctcgg	aaccgcccgt	gcacgatttc	tactgcagca	ggctactgga	4080
cctggctcttc	ctgctggatg	gctcctccag	gctgtccgag	gctgagtttg	aagtgcctgaa	4140
ggcctttgtg	gtggacatga	tggagcgggt	gcgcatctcc	cagaagtggg	tccgcgtggc	4200
cgtggtggag	taccacgacg	gctcccacgc	ctacatcggt	ctcaaggacc	ggaagcgacc	4260
gtcagagctg	cggcgcatatg	ccagccaggt	gaagtatgctg	ggcagccagg	tggcctccac	4320
cagcgaggtc	ttgaaataca	cactgttcca	aatcttcagc	aagatcgacc	gcccagaagc	4380
ctcccgctac	acccctgctcc	tgatgtgccag	ccaggagccc	caacggatgt	cccggaactt	4440
tgtccgctac	gtcccagggcc	tgaagaagaa	gaaggtcatt	gtgatcccg	tgggcatttg	4500
gccccatgcc	aacctcaagc	agatccgcct	catcgagaag	cagggccctg	agaacaaggc	4560
cttcgtgtcg	atccgtgtgg	atgagctgga	gcagcaaagg	gcagagatcg	ttagctacct	4620
ctgtgaacct	gccccgaag	ccccctctcc	taetctgccc	ccgcacatgg	cacaagtcac	4680
tgtgggcccc	gggtctcttg	gggtttcgac	cctggggccc	aagaggaaat	ccatggttct	4740
ggatgtggcg	ttcgtcctgg	aaggatcgga	caaaattggt	gaagccgact	tcaacaggag	4800
caaggagttc	atgggagggg	tgattcagcg	gatggatgtg	ggccaggaca	gcattccact	4860
caagggtctg	cagtactcct	acatgggtgac	tgtggagtac	cccttcagcg	aggcacagtc	4920
caaaagggac	atccgtcagc	gggtgcgaga	gatccgctac	cagggcgcca	acaggacca	4980
cactgggctg	gccccggtg	acctctctga	ccacagcttc	ttggtcagcc	agggtgaccg	5040
ggagcaggcg	cccaacctgg	tctacatggt	caccggaaat	cctgacctcg	atgagatcaa	5100
gaggctgcct	ggagacatcc	aggtggtgct	cattggagtg	ggccctaatg	ccaacgtgca	5160
ggagctggag	aggattggtg	ggcccaatgc	ccctatctct	atccaggact	ttgagacgct	5220
cccccgagag	gtctctgacc	tgggtgtgca	gaggtgtctg	tccggagagg	ggctgcagat	5280
ccccccctc	tccccgac	ctgactgcag	ccagccccctg	gacgtgatcc	ttctctgga	5340
tggctcctcc	agtttcccc	cttcttattt	tgatgaaatg	aagagtctcg	ccaaggcttt	5400
catttcaaaa	gccaatbatg	ggcctcgtct	cactcaggtg	tcagtgtctg	agtatggaaa	5460
catcaccacc	atttagctgc	catggaaagt	ggtcccggag	aaagcccat	tgctgagcct	5520
tgtggacgtc	atgcagcggg	agggaggccc	cagccaaatc	ggggatgctt	tgggcttttg	5580
tgtcggtatc	ttgacttcag	aaatgcatgg	tgccaggccc	ggagccctcaa	aggcggtggt	5640
catcctgggt	acggagctct	ctgtggatcc	agtggtatgca	gcagctgatg	ccgcagggtc	5700
caacagagtg	acagtggtcc	ctattggaat	tggagatcgc	tacgatgcag	cccgctacg	5760
gatcttggca	ggcccagcag	gcgactccaa	cgtggtgaa	ctccagcgaa	tcgaagacct	5820
ccctaccatg	gtcaccttgg	gcaatttcct	ccctccaaaa	ctgtgctctg	gatttgttag	5880
gatttgcagt	gatgaggatg	ggaatgagaa	gagggccggg	gacgtctgga	ccttgccaga	5940
ccagtgccac	accgtgaact	gccagccaga	tggccagacc	ttgctgaaga	gtcatcggtt	6000
caactgtgac	cgggggctga	ggccttcgtg	ccctaacagc	cagtccctcg	ttaaagtggg	6060
agagacctgt	ggctgcccgt	ggacctgccc	ctgcgtgtgc	acaggcagct	ccactcggca	6120
catcgtgacc	tttgatgggg	agaatttcaa	gctgaactg	agctgttctt	atgtcctatt	6180
tcaaaacaag	gagcaggacc	tggaggtgat	tctccataat	ggtgctgca	gccttgagac	6240
aaggcagggc	tgcatagaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gcctctctcg	tcgagctgca	6300
cagtacatg	gaggtgacgg	tgaatgggag	actggtctct	gttcttaccg	tgggtgggaa	6360
catggaagtc	aacgttttatg	gtgccatcat	gcattgaggtc	agattcaatc	accttggtca	6420
catcttcaca	ttcactccac	aaaacaatga	gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	6480
tgcttcaaa	acgtatgggt	tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	6540
gctgagggat	ggcacagtca	ccacagactg	gaaaaactct	gttcagggaat	ggactgtgca	6600
gcggccaggg	cagacgtgcc	agcccatcct	ggaggagcag	tgtcttgctc	ccgacagctc	6660
ccactgccag	gtcctcctct	taccactgtt	tgtggaatgc	cacaaggctc	tggctccagc	6720
cacattctat	gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	6780
cgctctttat	gccccctct	gtcggaccac	cggggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
ttctgtgtct	atgtcatgcc	cacctctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccggcactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggaccat	ccctccgaag	gctgtttctg	6960
ccctccagat	aaagtcatgt	tggaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtgag	gatggagctc	agcaccagtt	cctgggaagcc	tgggtcccg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgcacatgcc	tcagcggg	gaaggtcaac	tgcacaacgc	agccctgccc	7140
cacggccaaa	gctcccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgcctccg	agaatgcaga	7200

도면6c

```

ccagtgtgtc cccgagtatg agtgtgtgtg tgacccagtg agctgtgacc tgccccagtg 7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa 7320
cttcacctgc gctgtcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc 7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgtgtgtgt gagtatgagt gtgcctgcaa 7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtccctt tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga 7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat 7560
ctaccctgtg gggcagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgacccctga ccgacatgga 7620
ggatgccctg atgggcctcc gcgtggccca gtgtccctag aagccctgtg aggacagctg 7680
tcggctgggc ttactttacg ttctgcatga aggcgagtg tgtggaaggt gcctgccatc 7740
tgctgtgtgag gtgggtgactg gctcaccgag gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt 7800
cgctccctag tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga 7860
ggaggaggtc ttatataaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccccgtctg 7920
ccctcgggc ttccagctga gctgttaagc ctccagctgc tgcccaagct gtcgctgtga 7980
gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat 8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcatctctg gattcaagct 8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaacccctg cccctgggtg tacaaggaaag aaaataacac 8160
aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca 8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa 8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga 8340
tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400
cacatgtgag gacccctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg 8460
aagctgttaag tctgaagtag aggtggatgt ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa 8520
agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580
acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga 8640
ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc cccagggaag tgacagcaagt gaggtgctg 8700
cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgtgtcc 8760
agtctctgct atgttctgct cttgtgcccc tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820
tcttgcaaaa ggc 8833

```

서열번호: 2

```

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly
1           5           10           15

Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
20          25          30

Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
35          40          45

Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys
50          55          60

Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys Arg Val Ser
65          70          75          80

Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu Phe Val Asn
85          90          95

Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro Tyr Ala Ser
100         105         110

Lys Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys Leu Ser Gly Glu Ala Tyr
115         120         125

Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly Asn Phe Gln Val Leu Leu
130         135         140

Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn
145         150         155         160

```

도면6d

```

Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser
      165              170              175
Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala Leu Ser Ser Gly Glu Gln
      180              185              190
Trp Cys Glu Arg Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met
      195              200              205
Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val
      210              215              220
Phe Ala Arg Cys His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Cys Glu Lys
      225              230              235              240
Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu
      245              250              255
Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly
      260              265              270
Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu
      275              280              285
Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His
      290              295              300
Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro
      305              310              315              320
Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys
      325              330              335
Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser
      340              345              350
Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser
      355              360              365
Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe
      370              375              380
Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr
      385              390              395              400
Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu
      405              410              415
Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val
      420              425              430
Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His
      435              440              445
Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu
      450              455              460
Lys Gly Asp Leu Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu
      465              470              475              480
Ser Tyr Gly Glu Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu

```

도면6e

485										490					495				
Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys				
			500						505										
Gly	Asn	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly				
			515						520										
Leu	Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His				
			530						535										
Gly	Asp	Cys	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu				
			545						550										
Asn	Pro	Arg	Met	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr				
			565						570										
Ser	Pro	Thr	Phe	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr				
			580						585										
Leu	Arg	Asn	Cys	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu				
			595						600										
Cys	Leu	Cys	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg				
			610						615										
Val	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly				
			625						630										
Gln	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser				
			645						650										
Leu	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys				
			660						665										
Phe	Cys	Pro	Pro	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys	Ala	Gln				
			675						680										
Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Phe				
			690						695										
Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	His	Cys				
			705						710										
Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Ser				
			725						730										
Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Pro	Pro				
			740						745										
Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu				
			755						760										
Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Met	Ser	Met				
			770						775										
Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Arg	His	Glu				
			785						790										
Asn	Arg	Cys	Glu	Arg	Cys	Pro	Cys	Phe	His	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala				

도면6f

805										810										815									
Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Cys	Arg	Asp														
820										825										830									
Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr														
835										840										845									
Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe														
850										855										860									
Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn														
865										870										875									
Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Pro														
885										890										895									
Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu														
900										905										910									
Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Pro	Met	Lys	Asp														
915										920										925									
Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu														
930										935										940									
Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg	His	Leu	Ser	Ile	Ser														
945										950										955									
Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly														
965										970										975									
Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln														
980										985										990									
Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser														
995										1000										1005									
Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala															
1010										1015										1020									
Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser															
1025										1030										1035									
Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu															
1040										1045										1050									
Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val	Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys															
1055										1060										1065									
Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile															
1070										1075										1080									
Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln	His	Gly	Lys	Val	Val	Thr															
1085										1090										1095									
Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn															
1100										1105										1110									
Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys															
1115										1120										1125									

도면6g

Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln	His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala
1130						1135					1140			
Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys	His	Ala	His	Cys	Pro	Pro
1145						1150					1155			
Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu
1160						1165						1170		
Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly	Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly
1175						1180						1185		
Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile
1190						1195						1200		
Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu
1205						1210						1215		
Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro
1220						1225						1230		
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp
1235						1240						1245		
Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly
1250						1255						1260		
Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe
1265						1270						1275		
Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val
1280						1285						1290		
Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile
1295						1300						1305		
Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala
1310						1315						1320		
Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu
1325						1330						1335		
Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg
1340						1345						1350		
Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	Gln	Glu
1355						1360						1365		
Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu
1370						1375						1380		
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His
1385						1390						1395		
Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu
1400						1405						1410		
Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln
1415						1420						1425		

도면6h

Arg Asp	Glu Ile Val Ser Tyr	Leu Cys Asp Leu Ala	Pro Glu Ala
1430	1435	1440	
Pro Pro	Pro Thr Leu Pro Pro	Asp Met Ala Gln Val	Thr Val Gly
1445	1450	1455	
Pro Gly	Leu Leu Gly Val Ser	Thr Leu Gly Pro Lys	Arg Asn Ser
1460	1465	1470	
Met Val	Leu Asp Val Ala Phe	Val Leu Glu Gly Ser	Asp Lys Ile
1475	1480	1485	
Gly Glu	Ala Asp Phe Asn Arg	Ser Lys Glu Phe Met	Glu Glu Val
1490	1495	1500	
Ile Gln	Arg Met Asp Val Gly	Gln Asp Ser Ile His	Val Thr Val
1505	1510	1515	
Leu Gln	Tyr Ser Tyr Met Val	Thr Val Glu Tyr Pro	Phe Ser Glu
1520	1525	1530	
Ala Gln	Ser Lys Gly Asp Ile	Leu Gln Arg Val Arg	Glu Ile Arg
1535	1540	1545	
Tyr Gln	Gly Gly Asn Arg Thr	Asn Thr Gly Leu Ala	Leu Arg Tyr
1550	1555	1560	
Leu Ser	Asp His Ser Phe Leu	Val Ser Gln Gly Asp	Arg Glu Gln
1565	1570	1575	
Ala Pro	Asn Leu Val Tyr Met	Val Thr Gly Asn Pro	Ala Ser Asp
1580	1585	1590	
Glu Ile	Lys Arg Leu Pro Gly	Asp Ile Gln Val Val	Pro Ile Gly
1595	1600	1605	
Val Gly	Pro Asn Ala Asn Val	Gln Glu Leu Glu Arg	Ile Gly Trp
1610	1615	1620	
Pro Asn	Ala Pro Ile Leu Ile	Gln Asp Phe Glu Thr	Leu Pro Arg
1625	1630	1635	
Glu Ala	Pro Asp Leu Val Leu	Gln Arg Cys Cys Ser	Gly Glu Gly
1640	1645	1650	
Leu Gln	Ile Pro Thr Leu Ser	Pro Ala Pro Asp Cys	Ser Gln Pro
1655	1660	1665	
Leu Asp	Val Ile Leu Leu Leu	Asp Gly Ser Ser Ser	Phe Pro Ala
1670	1675	1680	
Ser Tyr	Phe Asp Glu Met Lys	Ser Phe Ala Lys Ala	Phe Ile Ser
1685	1690	1695	
Lys Ala	Asn Ile Gly Pro Arg	Leu Thr Gln Val Ser	Val Leu Gln
1700	1705	1710	
Tyr Gly	Ser Ile Thr Thr Ile	Asp Val Pro Trp Asn	Val Val Pro
1715	1720	1725	
Glu Lys	Ala His Leu Leu Ser	Leu Val Asp Val Met	Gln Arg Glu

도면6i

1730	1735	1740
Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg 1745 1750 1755		
Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys 1760 1765 1770		
Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp 1775 1780 1785		
Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro 1790 1795 1800		
Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu 1805 1810 1815		
Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile 1820 1825 1830		
Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His 1835 1840 1845		
Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly 1850 1855 1860		
Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys 1865 1870 1875		
His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser 1880 1885 1890		
His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn 1895 1900 1905		
Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp 1910 1915 1920		
Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val 1925 1930 1935		
Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr 1940 1945 1950		
Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His 1955 1960 1965		
Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser 1970 1975 1980		
Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp 1985 1990 1995		
Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val 2000 2005 2010		
Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu 2015 2020 2025		
Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln 2030 2035 2040		

도면6j

Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser
2045						2050					2055			
Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn
2060						2065					2070			
Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr
2075						2080					2085			
Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln
2090						2095					2100			
Pro	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu
2105						2110					2115			
Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala
2120						2125					2130			
Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln
2135						2140					2145			
Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn
2150						2155					2160			
Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser
2165						2170					2175			
Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro
2180						2185					2190			
Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser
2195						2200					2205			
Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser
2210						2215					2220			
Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly
2225						2230					2235			
Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro
2240						2245					2250			
Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr
2255						2260					2265			
Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys
2270						2275					2280			
Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu
2285						2290					2295			
Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val
2300						2305					2310			
Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly
2315						2320					2325			
Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys
2330						2335					2340			

도면6k

Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr
2345						2350					2355			
Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn
2360					2365						2370			
Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser
2375					2380						2385			
Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro
2390					2395						2400			
Asp	Lys	Val	Cys	Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln
2405					2410						2415			
Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu
2420					2425						2430			
Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro
2435					2440						2445			
Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu
2450					2455						2460			
Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val
2465					2470						2475			
Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val
2480					2485						2490			
Gly	Ser	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg
2495					2500						2505			
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro
2510					2515						2520			
Gln	Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys
2525					2530						2535			
Lys	Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu
2540					2545						2550			
Ala	Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val
2555					2560						2565			
Met	Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly
2570					2575						2580			
Val	Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn
2585					2590						2595			
Pro	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys
2600					2605						2610			
Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly
2615					2620						2625			
Gly	Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly
2630					2635						2640			
Cys	Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe

도면61

2645	2650	2655
Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys		
2660	2665	2670
Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys		
2675	2680	2685
Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg		
2690	2695	2700
Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val		
2705	2710	2715
Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr		
2720	2725	2730
Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser		
2735	2740	2745
Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val		
2750	2755	2760
Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro		
2765	2770	2775
Arg Lys Cys Ser Lys		
2780		

서열번호: 3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp		
1	5	10 15
Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr		
	20	25 30
Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro		
	35	40 45
Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys		
	50	55 60
Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys		
	65	70 75 80
Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr		
	85	90 95
Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr		
	100	105 110
Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr		
	115	120 125
Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile		
	130	135 140

도면6m

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
 165 170 175
 Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
 180 185 190
 Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
 195 200 205
 Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
 260 265 270
 Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285
 Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300
 Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu

도면6n

465	470	475	480
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val			
	485	490	495
Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu			
	500	505	510
Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala			
	515	520	525
Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu			
	530	535	540
Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp			
	545	550	555
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu			
	565	570	575
Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala			
	580	585	590
Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys			
	595	600	605
Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser			
	610	615	620
Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly			
	625	630	635
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His			
	645	650	655
Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn			
	660	665	670
Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp			
	675	680	685
Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro			
	690	695	700
Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu			
	705	710	715
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val			
	725	730	735
Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn			
	740	745	750
Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly			
	755	760	765
Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr			
	770	775	780
Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln			
	785	790	795
			800

도면60

Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Gly
				805						810					815
Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Leu	Val	Ser	Gln	Gly
			820					825					830		
Asp	Arg	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr	Met	Val	Thr	Gly	Asn	Pro
			835				840					845			
Ala	Ser	Asp	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Pro
			850			855					860				
Ile	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly
	865				870					875					880
Trp	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg
			885						890					895	
Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly	Leu
			900					905					910		
Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro	Leu	Asp
		915					920					925			
Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Tyr	Phe
	930					935					940				
Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser	Lys	Ala	Asn	Ile
	945				950					955					960
Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr
				965					970					975	
Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu
			980					985					990		
Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly
		995					1000					1005			
Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr		Ser	Glu	Met	His
	1010					1015						1020			
Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val		Ile	Leu	Val	Thr
	1025					1030						1035			
Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala		Asp	Ala	Ala	Arg
	1040					1045						1050			
Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	
	1055					1060					1065				
Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	
	1070					1075					1080				
Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	
	1085					1090					1095				
Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	
	1100					1105					1110				

도면6p

Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	
1115						1120					1125				
Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	
1130					1135						1140				
Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	
1145					1150						1155				
Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	
1160					1165						1170				
Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	
1175					1180						1185				
Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	
1190					1195						1200				
Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	
1205					1210						1215				
Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	
1220					1225						1230				
Ala	Arg	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	
1235					1240						1245				
Leu	Ser	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	
1250					1255						1260				
Arg	Leu	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	
1265					1270						1275				
Val	Tyr	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	
1280					1285						1290				
His	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	
1295					1300						1305				
Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	
1310					1315						1320				
Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	
1325					1330						1335				
Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	
1340					1345						1350				
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	
1355					1360						1365				
Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	
1370					1375						1380				
Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	
1385					1390						1395				
Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	
1400					1405						1410				
Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	

도면6q

1415	1420	1425
Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser	1430 1435 1440	
Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp	1445 1450 1455	
Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe	1460 1465 1470	
Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu	1475 1480 1485	
Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln	1490 1495 1500	
Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys	1505 1510 1515	
Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys	1520 1525 1530	
Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg	1535 1540 1545	
Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val	1550 1555 1560	
Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu	1565 1570 1575	
Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro	1580 1585 1590	
Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser	1595 1600 1605	
Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr	1610 1615 1620	
Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser	1625 1630 1635	
Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn	1640 1645 1650	
Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys	1655 1660 1665	
Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu	1670 1675 1680	
Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met	1685 1690 1695	
Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser	1700 1705 1710	
Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys	1715 1720 1725	

도면6r

Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro
1730						1735					1740			
Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp
1745						1750					1755			
Ala	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val
1760						1765					1770			
Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln
1775						1780					1785			
Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys
1790						1795					1800			
Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala
1805						1810					1815			
Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met
1820						1825					1830			
Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val
1835						1840					1845			
Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro
1850						1855					1860			
Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys
1865						1870					1875			
Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly
1880						1885					1890			
Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys
1895						1900					1905			
Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp
1910						1915					1920			
Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys
1925						1930					1935			
Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys
1940						1945					1950			
Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Gln	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu
1955						1960					1965			
Gln	Tyr	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val	Asp
1970						1975					1980			
Ile	His	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser
1985						1990					1995			
Ile	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro
2000						2005					2010			
Thr	Arg	Thr	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Leu	His	Cys	Thr	Asn	Gly
2015						2020					2025			

도면6s

Ser	Val	Val	Tyr	His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Lys	Cys
2030						2035					2040			
Ser	Pro	Arg	Lys	Cys	Ser	Lys								
2045						2050								

서열 목록

<110> Baxalta Incorporated
 Baxalta GmbH
 Chapman, Miranda
 Ewenstein, Bruce
 Ploder, Bettina

<120> TREATMENT OF PATIENTS WITH SEVERE VON WILLEBRAND DISEASE
UNDERGOING ELECTIVE SURGERY BY ADMINISTRATION OF RECOMBINANT VWF

<130> 008073-5186-US

<140> US 16/030,653

<141> 2018-07-09

<150> US 62/530,024

<151> 2017-07-07

<150> US 62/546,999

<151> 2017-08-17

<160> 3

<170> KoPatentIn version 3.0

<210> 1

<211

> 8833

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> prepro-VWF

<400> 1

agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctcccc agcagtgggg actccacagc ccttgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttggg gatagccgca gccctcattt	240
gcagggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt	300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca	480
gaatggcaag agagttagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctctg tcagacagat acttcaaca	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcgtgaa gatgacttta tgaccaaga	780
agggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgtgtg gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900

gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgtg	960
ccacctctg gtggacccc agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagt	1020
tgtgtggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccga cctgtgcca	1080
ggagggaatg gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc	1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat	1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgcctgagg gacagtcct	1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctccccgc acctccctct ctgcagactg caacacctgc atttccgaa acagccagt	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccgga	1500
ttgccaggac cactccttct ccatgtcat tgagactgtc cagtgtgtg atgaccgca	1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc cctcctgaa	1680
aggtgacctc cgcatecagc atacagtgc ggccctccgtg cgcctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc cgtctatgc	1800
cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac caggcgacg acttccttac	1860
cccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac	1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggctct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgccgtcagc ccgtgcctt acctgcggaa ctgccgtac gacgtgtgt cctgctcgga	2100
cggccgcgag tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt	2220
glacctgcag tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga	2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggtg ctctgtcccc ccagggtctt acatgatga	2340
gaggggggac tgcgtgcca aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgtac tgtgaggatg gcttcatgca	2460
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtctca gcagtccct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggccccc atggtcaagc tgggtgttcc	2580
cgctgacaac ctgcgggctg aagggtctga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct	2640
ggagtgcag agcatgggt gtgtctctgg ctgcctctgc cccccggga tggtcggca	2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaaggtg tcctgtctc catcaggga aggagtatgc	2760

ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac ggcatggccc actacctac	2880
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta	2940
ctgcggcagt aaccctggga ctttcggat cctagtgggg aataaggat gcagccaccc	3000
ctcagtgaat tgcaagaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgcgtctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca	3180
cctgagcacc tccgtgtgac tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaattttgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac ttgggaaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcacccctg ccacctgcca taacaacac atgaagcaga cgatggtgga	3420
ttcctcctgt agaataccta ccagtacgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgtcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgctgtcttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca catttgtccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcacctt gagccactgg cctgcctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaaactctg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctgagaaag aaagtcacct tgaatcccag	3900
tgacctgag cactgccaga ttgcccactg tgatgtgtc aacctacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tgggtgctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgattc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctccacgc ctacatcggt ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcagggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc accctgtccc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgtac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatccgg tgggcattgg	4500

gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gcccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtgggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagagggaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaatttgt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc ggggtcgcga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggtgcct ggagacatcc aggtgggtgcc cattggagtg ggccctaata ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggtattggt ggcccaatgc ccctatctc atccaggact ttgagacgt	5220
ccccgagag gctcctgacc tgggtctgca gaggtgtgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tccctgcac ctgactgcag ccagccccctg gacgtgatcc ttctctgga	5340
tggctcctcc agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggctcgtct cactcagggtg tcagtgtgc agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccgag aaagcccatt tgctgacct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcccaa aggcggtggt	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagt acagtgttcc ctattggaat tggagatgc tacgatgcag ccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag	5880
gatttgcagt gatgaggatg ggaatgagaa gaggccccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtccccctg ttaaagtga	6060
agagacctgt ggctgccgt ggacctgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccaactcgga	6120
catcgtgacc ttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaacaag gaggcaggacc tggaggatgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240

aaggcagggc tgcataaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gtctcttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggtea	6420
catcttcaca ttactccac aaaacaatga gtccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgccc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtctctctct taccactgtt tgcgtaatgc cacaaggtcc tggtccagc	6720
cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgctcttat gccacactct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcatgt tggaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt	7020
cattggtgag gatggagtc agcaccagt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgctccgcc agaattcaga	7200
ccagtgtgc cccagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tcagccac actgaccaac cctggcagat gcagaccaa	7320
cttcacctgc gcctgcagga aggaggagt caaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccaccttc ggaagacca gtgtgtgat gattatgagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tcacagtga gctgtccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat	7560
ctacctgtg ggccagtct gggaggagg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggcca gtgtctccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tcggtcgggc ttacttacg ttctgcatga aggcagtgct tgtggaaggt gcctgccatc	7740
tgctgtgag gtgtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttct ggaagagtgt	7800
cggctccag tgggcctcc cggagaacct ctgctcacc aatgagtgtg tccgagtga	7860
ggaggaggtc ttataacaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
ccctcgggc ttacagtga gctgtaagac ctgagctgc tgcccaagct gtgctgtga	7980
gcgatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg ccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcatctctg gattcaagct	8100

ggagtgcagg aagaccacct gcaacccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac 8160
 aggtgaatgt tgtgggagat gtttcctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca 8220
 gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa 8280
 ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccttga 8340

tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400
 cacatgtgag gacctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg 8460
 aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa 8520
 agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac 8580
 acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtacatga 8640
 ggttctcaat gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg 8700
 cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgtgcc 8760

agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta 8820
 tcttgcaaaa ggc 8833

<210> 2

<211> 2783

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> prepro-VWF

<400> 2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly

1 5 10 15

Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys

20 25 30

Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr

35 40 45

Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly Cys Gln Lys

50 55 60

Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys Arg Val Ser

65 70 75 80

Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu Phe Val Asn

85 90 95

Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro Tyr Ala Ser

100 105 110

Lys Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys Leu Ser Gly Glu Ala Tyr

115 120 125

Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly Asn Phe Gln Val Leu Leu

130 135 140

Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn

145 150 155 160

Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser

165 170 175

Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala Leu Ser Ser Gly Glu Gln

180 185 190

Trp Cys Glu Arg Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met

195 200 205

Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val

210 215 220

Phe Ala Arg Cys His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Cys Glu Lys

225 230 235 240

Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu

245 250 255

Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly

260 265 270

Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu

275 280 285

Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His

290 295 300

Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser

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

 385 390 395 400
 Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu
 405 410 415
 Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val
 420 425 430
 Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His
 435 440 445
 Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu
 450 455 460

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

 530 535 540
 Gly Asp Cys Gln Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu
 545 550 555 560
 Asn Pro Arg Met Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr
 565 570 575
 Ser Pro Thr Phe Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr
 580 585 590
 Leu Arg Asn Cys Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu

595 600 605
 Cys Leu Cys Gly Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg
 610 615 620
 Val Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly
 625 630 635 640
 Gln Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser
 645 650 655
 Leu Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys
 660 665 670
 Phe Cys Pro Pro Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys Ala Gln
 675 680 685
 Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp Ile Phe
 690 695 700
 Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met His Cys
 705 710 715 720
 Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val Leu Ser
 725 730 735
 Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro
 740 745 750
 Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu
 755 760 765
 Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met Ser Met
 770 775 780
 Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg His Glu
 785 790 795 800
 Asn Arg Cys Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala
 805 810 815
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp
 820 825 830
 Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr
 835 840 845

Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe
850 855 860

Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn
865 870 875 880

Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro
885 890 895

Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu
900 905 910

Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp
915 920 925

Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu
930 935 940

Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser
945 950 955 960

Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly
965 970 975

Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln
980 985 990

Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser
995 1000 1005

Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr
1010 1015 1020

Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg
1025 1030 1035 1040

Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro
1045 1050 1055

Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser
1060 1065 1070

Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His
1075 1080 1085

Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu
1090 1095 1100

Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu

1105 1110 1115 1120

Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys

1125 1130 1135

Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys

1140 1145 1150

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr

1155 1160 1165

Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg

1170 1175 1180

Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His

1185 1190 1195 1200

Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp

1235 1240 1245

Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser

1250 1255 1260

Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val

1265 1270 1275 1280

Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala

1285 1290 1295

Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp

1300 1305 1310

Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr

1315 1320 1325

Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu

1330 1335 1340

Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr

1345 1350 1355 1360
 Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe
 1365 1370 1375
 Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
 1380 1385 1390
 Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu

 1395 1400 1405
 Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu
 1410 1415 1420
 Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala
 1425 1430 1435 1440
 Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr
 1445 1450 1455
 Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
 1460 1465 1470

 Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile
 1475 1480 1485
 Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile
 1490 1495 1500
 Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln
 1505 1510 1515 1520
 Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser
 1525 1530 1535
 Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly

 1540 1545 1550
 Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser
 1555 1560 1565
 Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr
 1570 1575 1580
 Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly
 1585 1590 1595 1600
 Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln

1605 1610 1615
 Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1620 1625 1630
 Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys
 1635 1640 1645
 Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp
 1650 1655 1660
 Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser
 1665 1670 1675 1680
 Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe

 1685 1690 1695
 Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu
 1700 1705 1710
 Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro
 1715 1720 1725
 Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly
 1730 1735 1740
 Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu
 1745 1750 1755 1760

 Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
 1765 1770 1775
 Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
 1780 1785 1790
 Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
 1795 1800 1805
 Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
 1810 1815 1820
 Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val

 1825 1830 1835 1840
 Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg
 1845 1850 1855

Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp
1860 1865 1870

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln
1875 1880 1885

Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro
1890 1895 1900

Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly
1905 1910 1915 1920

Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His
1925 1930 1935

Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser
1940 1945 1950

Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His
1955 1960 1965

Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile
1970 1975 1980

Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu
1985 1990 1995 2000

Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn
2005 2010 2015

Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn
2020 2025 2030

His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln
2035 2040 2045

Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys
2050 2055 2060

Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly
2065 2070 2075 2080

Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln
2085 2090 2095

Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser
2100 2105 2110

Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys

2115 2120 2125
Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys

2130 2135 2140
His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys

2145 2150 2155 2160
Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala

2165 2170 2175
Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys

2180 2185 2190

Pro Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser

2195 2200 2205
Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys

2210 2215 2220
Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln

2225 2230 2235 2240
His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile

2245 2250 2255
Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys

2260 2265 2270
Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu

2275 2280 2285
Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp

2290 2295 2300
Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly Leu

2305 2310 2315 2320
Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys

2325 2330 2335

Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro

2340 2345 2350
Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr

2355 2360 2365
 Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly
 2370 2375 2380
 Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr
 2385 2390 2395 2400
 Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val

 2405 2410 2415
 Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met
 2420 2425 2430
 Glu Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro
 2435 2440 2445
 Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly
 2450 2455 2460
 Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly
 2465 2470 2475 2480

 Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln
 2485 2490 2495
 Trp Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu Glu
 2500 2505 2510
 Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro
 2515 2520 2525
 Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys
 2530 2535 2540
 Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr

 2545 2550 2555 2560
 Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys
 2565 2570 2575
 Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys
 2580 2585 2590
 Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn
 2595 2600 2605
 Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile

2610 2615 2620
 Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu
 2625 2630 2635 2640
 Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu
 2645 2650 2655
 Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His
 2660 2665 2670
 Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys
 2675 2680 2685
 Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu

 2690 2695 2700
 Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile
 2705 2710 2715 2720
 His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
 2725 2730 2735
 Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr
 2740 2745 2750
 Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val
 2755 2760 2765

 Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
 2770 2775 2780
 <210> 3
 <211> 2050
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mature-VWF
 <400> 3
 Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15
 Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
 20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro

35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys

50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys

65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr

85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr

100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr

115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys

145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly

165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val

180 185 190

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

195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr

210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln

225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val

245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg

260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met

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

 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400

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

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

530 535 540
 Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 565 570 575
 Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 580 585 590
 Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 595 600 605
 Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser

 610 615 620
 Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670
 Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 675 680 685

 Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 690 695 700
 Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
 705 710 715 720
 Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
 725 730 735
 Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
 740 745 750
 Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly

 755 760 765
 Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
 770 775 780

Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
785 790 795 800
Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
805 810 815
Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
820 825 830
Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
835 840 845
Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
850 855 860
Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
865 870 875 880
Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
885 890 895
Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu
900 905 910
Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
915 920 925
Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
930 935 940
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
945 950 955 960
Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
965 970 975
Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu
980 985 990
Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly
995 1000 1005
Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly
1010 1015 1020
Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
1025 1030 1035 1040

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg

1045 1050 1055

Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln

1060 1065 1070

Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu

1075 1080 1085

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

1090 1095 1100

Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp

1105 1110 1115 1120

Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys

1125 1130 1135

His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His

1140 1145 1150

Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln

1155 1160 1165

Ser Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro

1170 1175 1180

Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly

1185 1190 1195 1200

Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn

1205 1210 1215

Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro

1220 1225 1230

Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala

1235 1240 1245

Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg

1250 1255 1260

Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr

1265 1270 1275 1280

Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe

1285	1290	1295	
Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys			
1300	1305	1310	
Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn			
1315	1320	1325	
Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp			
1330	1335	1340	
Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys			
1345	1350	1355	1360
Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys			
1365	1370	1375	
Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala			
1380	1385	1390	
Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu			
1395	1400	1405	
Gln Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn			
1410	1415	1420	
Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys			
1425	1430	1435	1440
Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His			
1445	1450	1455	
Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys			
1460	1465	1470	
Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu			
1475	1480	1485	
Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe			
1490	1495	1500	
Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys			
1505	1510	1515	1520
Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala			
1525	1530	1535	
Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn			

1540 1545 1550
 Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser
 1555 1560 1565
 Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr
 1570 1575 1580
 Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg
 1585 1590 1595 1600
 Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg
 1605 1610 1615
 Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala

 1620 1625 1630
 Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala
 1635 1640 1645
 Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro
 1650 1655 1660
 Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe
 1665 1670 1675 1680
 Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala
 1685 1690 1695

 Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp
 1700 1705 1710
 Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys
 1715 1720 1725
 Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg
 1730 1735 1740
 Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser
 1745 1750 1755 1760
 Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu Glu

 1765 1770 1775
 Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro
 1780 1785 1790

Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys
1795 1800 1805

Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr
1810 1815 1820

Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys
1825 1830 1835 1840

Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys
1845 1850 1855

Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn
1860 1865 1870

Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile
1875 1880 1885

Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu
1890 1895 1900

Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu
1905 1910 1915 1920

Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His
1925 1930 1935

Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys
1940 1945 1950

Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu
1955 1960 1965

Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile
1970 1975 1980

His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
1985 1990 1995 2000

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr
2005 2010 2015

Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr
2020 2025 2030

His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys
2035 2040 2045

Ser Lys

2050