(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월08일
(11) 등록번호 10-1327270
(24) 등록일자 2013년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7024202
(22) 출원일자(국제) 2006년03월22일
심사청구일자 2011년03월22일
(85) 번역문제출일자 2007년10월22일
(65) 공개번호 10-2008-0015780
(43) 공개일자 2008년02월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/010600
(87) 국제공개번호 WO 2006/104852
국제공개일자 2006년10월05일
(30) 우선권주장
60/665,125 2005년03월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20040197324 A1*
WO2005000895 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
리제네론 파라마큐티칼스 인코포레이티드
미합중국, 뉴욕주 10591, 타리타운, 올드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
딕스, 다니엘
미국 뉴욕 12540 라그랑제빌 메모리 트레일 55
프라이, 켈리
미국 뉴욕 10970 포모나 엔. 릿지 로드 29
카우츠, 수잔
미국 뉴욕 12210 알바니 홀 플레이스 3
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **혈관내피성장인자 길항제 조제물**

(57) 요 약

동결건조 전 조제물, 재생 동결건조 조제물 및 안정한 액상 조제물을 포함하여, 혈관내피성장인자(VEGF)-특이적 융합 단백질 길항제가 제공된다. 바람직하게 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 서열을 가진다.

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

pH 6.0에서 5mM 인산염 완충액, 5mM 시트르산염 완충액, 100mM NaCl, 20% 수크로즈, 25mg/ml의 융합 단백질을 포함하고, 상기 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 27-457 아미노산을 포함하고 62, 94, 149, 222 및 308에서 Asn 잔기가 글리코실화된 것을 특징으로 하는 신생혈관형성 억제용 혈관내피성장인자(VEGF)-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액상 조제물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 6개월 이후에 고유 형태의 적어도 99%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 6개월 이후에 인간 VEGF의 영향을 억제하는 능력을 모두 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 6개월 이후에 자유 VEGF에 결합하는 능력을 모두 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 12개월 이후에 고유 형태의 적어도 99%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 12개월 이후에 인간 VEGF의 영향을 억제하는 능력의 적어도 85%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 13

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 12개월 이후에 자유 VEGF에 결합하는 능력의 적어도 95%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 14

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 24개월 이후에 고유 형태의 적어도 99%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 15

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 24개월 이후에 인간 VEGF의 영향을 억제하는 능력의 적어도 75%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 16

제 7항에 있어서, 상기 융합 단백질은 5℃에서 24개월 이후에 자유 VEGF에 결합하는 능력의 적어도 95%를 유지하는 것을 특징으로 하는 안정한 액상 조제물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 혈관내피성장인자(VEGF)를 억제할 수 있는 약품을 포함하는 제약학적 조제물과 이러한 조제물의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다. 본 발명은 안정성이 증가된 제약학적 조제물을 포함한다.

배 경 기 술

[0003] **관련 기술의 언급**

[0004] 혈관내피성장인자(VEGF) 발현은 종양 신생혈관형성의 중요한 매개체라는 그 역할에 부합하게 인간의 종양에 거의 어디에나 다 있다. 분자 또는 VEGFR-2 수용체와의 결합에 의한 VEGF 기능의 봉쇄는 다른 다양한 이종이식 모델(예를 들어, Geber et al. (2000) Cancer Res. 60:6253-6258 참조)에서 이식된 종양 세포의 성장을 억제한다. "VEGF 트랩"이라 불리는 가용성 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제가 개시되었다(Kim et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11399-404; Holash et al.(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11393-8).

[0005] 동결건조(조절된 조건 하에서 냉동 건조)는 단백질의 장기간 보존을 위해 일반적으로 사용된다. 동결건조된 단백질은 냉동 건조 상태에서 분해, 응집, 산화 및 다른 퇴행성 과정에 대해 실질적으로 저항력이 있다(예를 들어, U.S. 6,436,897 참조).

발명의 상세한 설명

[0006] **발명의 간단한 개요**

[0007] VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 조제물이 본원에서 제공된다. 본원의 제약학적으로 허용가능한 조제물은 제약학적으로 허용가능한 캐리어와 함께 VEGF "트랩(trap)" 길항제를 포함한다. 특정 실시 형태들에서 액상 및 냉동-건조 또는 동결건조 조제물이 제공된다.

[0008] 첫 번째 양태로서, 본 발명은 제1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사 (Ig) 영역 2와 제2 VEGF 수용체의 Ig 영역 3으로 본질적으로 구성된 수용체 성분 및 멀티머라이징 성분을 포함하는 융합 단백질, 하나 이상의 완충액 및 하나 이상의 내열 안정제를 포함하는 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액상 조제물을 특징으로 한다. VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 구체적인 실시 형태에 있어서, 제1 VEGF 수용체는 Flt1이고 제2 VEGF 수용체는 Flk1 또는 Flt4이다. 더 구체적인 실시 형태에 있어서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시 형태에 있어서, 완충액은 인산염 완충액 및/또는 시트르산염이다. 더 바람직하게 완충액은 인산염 및 시트르산염이다. 하나의 실시 형태에 있어서 내열 안정제는 NaCl 및/또는 수크로즈이다. 더 바람직하게 내열 안정제는 NaCl 및 수크로즈 양자 모두이다.

[0009] 구체적인 실시 형태에 있어서, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액상 조제물은 약 pH 6-6.5에서 1-10mM 인산염 완충액, 1-10mM 시트르산염, 25-150mM NaCl, 5-30% 수크로즈, 10-50mg/ml 융합 단백질을 포함한다. 더 구체적인 실시 형태에 있어서, 안정한 액상 조제물은 약 pH 6.0에서, 5mM 인산염 완충액, 5mM 시트르산염 완충액, 100mM NaCl, 20% 수크로즈, 25mg/ml 융합 단백질을 포함한다. 또한 폴리소르베이트, 예를 들면 0.05-0.15%의 폴리소르베이트 20이 존재할 수 있다. 본 발명의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 안정한 액상 조제물은 25mg/ml VEGF 조제물을 -80℃에서 약 6개월 저장한 후 거의 또는 전혀 침전이 생기지 않으며, 5℃에서 6개월 저장 후 전혀 침전이 생기지 않는다.

[0010] 두 번째 양태로서, 본 발명은 약 pH 6-6.5에서 1-50mM 히스티딘, 25-150mM NaCl, 5-30% 수크로즈, 50-100mg/ml 융합 단백질 및 0.1-0.5%의 폴리소르베이트 또는 1-5% PEG의 어느 하나를 포함하는 고농도 VEGF 길항제의 안정한 액상 조제물을 특징으로 한다. 더 구체적인 실시 형태에 있어서, 고농도의 안정한 액상 조제물은 약 pH 6.0-6.5에서 10mM 히스티딘, 50mM NaCl, 5-20% 수크로즈, 50-100mg/ml 융합 단백질을 0.1%의 폴리소르베이트(예를 들면, 폴리소르베이트 20) 또는 3%의 PEG(예를 들면, PEG 3350)의 어느 하나와 함께 포함한다. 본 발명의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 고농도의 안정한 액상 조제물은 5℃에서 15개월 보관 후 약 3% 미만의 분해(75 또는 100mg/ml VEGF 트랩 단백질), 또는 24개월 후 약 1.5% 미만의 분해(50mg/ml)를 나타낸다.

[0011] 세 번째 양태로서, 본 발명은 (i) 본질적으로 제1 VEGF 수용체의 면역글로불린-유사(Ig) 영역 2와 제2 VEGF 수용체의 Ig 영역 3으로 구성된 수용체 성분 및 멀티머라이징 성분을 포함하는 융합 단백질, (ii) 완충액, (iii) 유기 조용매 또는 부피형성제(bulking agent) 및 (iv) 하나 이상의 동결건조보호제를 포함하는 혈관내피성장인자(VEGF)-특이적 융합 단백질 길항제의 동결건조 전(pre-lyophilized) 조제물을 특징으로 한다. 다양한 실시 형태에 있어서, 완충액은 히스티딘이고, 유기 조용매 또는 부피형성제는 PEG이며, 그리고 동결건조보호제는 글리신 및 수크로즈 중 적어도 하나이다. 하나의 실시 형태에 있어서 본 발명의 동결건조 전 조제물은 보존제를 포함하지 않는다.

[0012] 본 발명의 동결건조 전 조제물의 하나의 실시 형태에 있어서, 조제물은 약 pH 6.0-6.5에서 5-50mM 히스티딘, 0.1-3.0% PEG, 0.25-3.0% 글리신, 0.5-6.0% 수크로즈 및 5-75mg/ml 융합 단백질을 포함한다. 여하의 실시 형태에 있어서, 동결건조 전 조제물은 0.05mM 이하 시트르산염 및/또는 0.003-0.005% 폴리소르베이트를 더 포함할 수 있다. 폴리소르베이트는 예를 들면, 폴리소르베이트 20으로 존재할 수 있다.

[0013] 더 구체적인 실시 형태에 있어서, 동결건조 전의 조제물은 약 pH 6.25에서 약 10mM 히스티딘, 약 1.5% PEG 3350, 약 0.75% 글리신, 약 2.5% 수크로즈 및 약 12.5 내지 75mg/ml의 VEGF-특이적 융합 단백질을 포함한다. 구체적인 실시 형태에 있어서, 융합 단백질은 다중체로 존재하는, 예를 들면 이합체인 SEQ ID NO:4의 단백질 서열을 포함한다. 별도의 실시 형태에 있어서, 재생 조제물은 동결건조 전 조제물 농도의 두 배, 예를 들면 융합 단백질 20mg/ml의 동결건조 전 조제물은 융합 단백질 60mg/ml의 최종 조제물로 재생된다. 일반적으로 동결건조 조제물은 주사용으로 적합한 멸균수로 재생된다. 하나의 실시 형태에 있어서 재생 액체는 정균수일 수 있다.

[0014] 바람직한 실시 형태에 있어서, 동결건조 전 조제물은 약 pH 6.25에서 약 10mM 히스티딘, 약 1.5% PEG 3350, 약 0.75% 글리신, 약 2.5% 수크로즈 및 약 50mg/ml의 다이머로서 SEQ ID NO:4의 서열을 갖는 융합 단백질을 본질적으로 포함한다. 시트르산염(약 0.02mM 이하) 및/또는 폴리소르베이트(약 0.0005% 이하)가 존재할 수 있다. 선택적으로, 동결건조 전 조제물은 보존제, 인산염 완충액 및/또는 흔적량 이상의 NaCl을 함유하지 않는다. 하나의 실시 형태에 있어서, 동결건조 전 조제물은 pH 6.3에서 약 10mM 히스티딘, 약 1.5% PEG 3350, 약 0.75% 글리신, 약 2.5% 수크로즈 및 약 50mg/ml의 VEGF 트랩 단백질(SEQ ID NO:4)을 포함하고, 재생시 20mM 히스티딘, 3% PEG, 1.5% 글리신, 약 5% 수크로즈 및 약 100mg/ml의 VEGF 트랩 단백질을 포함한다.

[0015] 네 번째 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 동결건조 전 조제물을 동결건조시켜 동결건조 조제물을 형성하는 단계를 포함하는 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 동결건조 조제물의 제조 방법을 특징으로 한다. 동결건조

조제물은 당해 기술분야에 액체의 동결건조를 위해 알려진 여하의 방법에 의해 동결건조될 수 있다.

[0016] 다섯 번째 관련된 양태에 있어서, 본 발명은 재생 조제물을 형성하도록 본 발명의 동결건조 조제물을 재생하는 단계를 포함하는, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 재생 동결건조 조제물의 제조 방법임을 특징으로 한다. 하나의 실시 형태에 있어서 재생 조제물은 동결건조 전 조제물의 농도의 두 배이며, 예를 들어 본 발명의 방법은 (a) VEGF-특이적 융합 단백질 길항제의 동결건조 전 조제물을 제조하는 단계, (b) (a)단계의 동결건조 전 조제물을 동결건조시키는 단계 및 (c) (b)단계의 동결건조 조제물을 재생하는 단계를 포함한다.

[0017] 재생 동결건조 조제물의 제조 방법의 구체적인 실시 형태에 있어서, 동결건조 전 용액은 동결건조 전 조제물 용액 ml 당 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제 25mg으로 바이알 내에 존재하며, 이것은 동결건조 하고 50mg/ml 용액으로 재생한다. 다른 실시 형태에 있어서는, 30mg/ml의 동결건조 전 용액을 동결건조하고, 60mg/ml의 용액으로 재생한다. 다른 실시 형태에 있어서는, 40mg/ml의 동결건조 전 용액을 동결건조하고 80mg/ml의 용액으로 재생한다. 다른 실시 형태에 있어서는, 12.5mg/ml의 동결건조 전 용액을 동결건조하고 25mg/ml 용액으로 재생한다. 다른 실시 형태에 있어서는, 50mg/ml의 동결건조 전 용액을 동결건조하고 100mg/ml의 용액으로 재생한다. 다른 실시 형태에 있어서는, 75mg/ml의 동결건조 전 용액을 동결건조하고 150mg/ml의 용액으로 재생한다. 바람직하게는 재생된 동결건조 조제물은 보존제를 포함하지 않는다.

[0018] 후술하는 상세한 설명의 관점에서, 다른 목적 및 장점들이 명백해 질 것이다.

[0019] **발명의 상세한 설명**

[0020] 본 발명은 구체적인 방법과 개시된 실험 조건에, 그러한 방법이나 조건은 변할 수 있기 때문에, 제한되지 않는다. 또한 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시 형태를 설명하기 위해 사용되었음을 이해하여야 할 것이며, 본 발명의 범위는 단지 첨부된 청구항에 의해 제한될 것이기 때문에 이는 특별히 지적되지 않는 한 제한하려는 의도는 아니다.

[0021] 본 명세서와 첨부된 청구항에 사용된 단수의 표현은 본문에서 명백히 다르게 지적하지 않는 한 복수의 언급을 포함한다. 따라서 예를 들어, "방법"이라는 언급은 본원에서 기재된 유형의 하나 또는 그 이상의 방법 및/또는 단계를 포함하며, 이는 본원을 읽음으로써 당해 기술분야에 통상의 지식을 가진 자에게 명백해 진다.

[0022] **일반적 설명**

[0023] 단백질을 포함하는 조제물의 안전한 취급 및 투여는 제약학 조제자들에게 상당한 도전이다. 단백질은 안정성 문제를 제공하는 독특한 화학적 및 물리적 성질을 가지고 있다: 단백질은 화학적 및 물리적 안정성과 관련된 다양한 분해 경로가 존재한다. 화학적 불안정성은 탈아미노화, 응집, 단백질 백본의 클리핑 및 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 물리적 불안정성은 예를 들면, 응집 같은 다양한 현상을 포함한다.

[0024] 화학적 및 물리적 안정성은 단백질로부터 물을 제거함으로써 향상시킬 수 있다. 동결건조(조절된 조건하에서 냉동-건조)는 단백질의 장기간 보관에 일반적으로 사용된다. 동결건조 단백질은 냉동-건조 상태에서 분해, 응집, 산화 및 다른 퇴행 과정에 대해 실질적으로 저항력이 있다. 일반적으로 동결건조 단백질은 투여에 앞서 선택적으로 보존제(예를 들면, 벤질 알콜)를 포함하는 물로 재생된다.

[0025] **정의**

[0026] 용어 "캐리어"는 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제(adjuvant), 부형제 또는 비히클(vehicle)을 포함한다. 캐리어는 멸균 액체, 예를 들면 물 그리고 예를 들면, 낙화생유, 콩기름, 미네랄 오일, 참기름 등 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 기름을 포함할 수 있다.

[0027] 용어 "부형제"는 제약학적 조성물에 첨가되어 원하는 일관성 또는 안정화 효과를 제공하는 비-치료용 약품을 포함한다. 적절한 제약학적 부형제는 예를 들면, 전분, 글루코즈, 락토오즈, 수크로즈, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 쵸크, 실리카 겔, 스테아르산 나트륨, 모노스테아르산 글리세롤, 탈크, 염화 나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 및 유사한 것을 포함한다.

[0028] 용어 "동결건조" 또는 "냉동-건조"는 적어도 50%의 수분이 제거되는 동결건조 같은 건조 공정에 처해 졌던 물질의 상태를 포함한다.

[0029] 용어 "부피형성제(bulking agent)"는 제약학적으로 허용가능한 용제 케익(lyo cake)에 용적을 추가하는 화합물을 포함한다. 당해 기술분야에 알려진 일반적으로 허용가능한 부피형성제는 예를 들면 덱스트로스, 리보오스, 푸룩토스 등과 같은 단순 당을 포함하는 탄수화물, 예들 들면 만니톨, 이노시톨 및 소르비톨 같은 당알코올, 트

레할로즈, 수크로즈 및 락토오즈를 포함하는 이당류, 전분, 덱스트란, 키토산, 히알루론산염, 단백질(예를 들면, 젤라틴 및 혈청 알부민), 글리코겐 같은 자연적으로 얻어지는 고분자 및 합성 단량체와 고분자를 포함한다. 본 발명의 조제물에 있어서 PEG 3350은 교반, 혼합 및 처리 시 융합 단백질을 안정화하는데 사용되며, 허용가능한 용적의 생성을 돕는 부피 형성제로서 사용되는 유기 조용매이다.

[0030] 용어 "동결건조보호제"는 냉동-건조 또는 동결건조시에 냉동-건조 또는 동결건조 조제물에 단백질 구조의 유지를 돕도록 첨가되는 물질을 포함한다.

[0031] "보존제"는 조제물 내에 있는 박테리아 또는 다른 오염 미생물의 성장을 저해 또는 제거하기 위해 일반적으로 조제물에 첨가되는 정균, 살균, 정진균 또는 살진균 화합물을 포함한다. 보존제는 예를 들면, 벤질 알콜, 페놀, 염화 벤잘코늄, m-크레솔, 티메로졸(thimerosol), 클로로부탄올, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 그와 유사한 것을 포함한다. 제약학적으로 허용가능한 보존제의 다른 예는 미국 약전(USP)에서 찾을 수 있다.

[0032] **VEGF 길항제**

[0033] VEGF 길항제는 혈관내피형성인자(VEGF)의 생물학적 활동을 저해 또는 억제할 수 있는 화합물이며, 이는 VEGF를 트랩할 수 있는 융합 단백질을 포함한다. 바람직한 실시 형태에 있어서, VEGF 길항제는 SEQ ID NO:2 또는 4; 더 바람직하게는 SEQ ID NO:4의 융합 단백질이다. 특정한 실시 형태에 있어서, VEGF 길항제는 CHO 세포 같은 포유류 세포계(cell line)에서 발현되며, 복사(translation) 후에 변형될 수 있다. 특정 양태에 있어서, 융합 단백질은 SEQ ID NO:4의 27-457 아미노산을 포함하며, 그리고 이는 Asn 잔기 62, 94, 149, 222 및 308에서 글리코실화되어 있다.

[0034] 본 발명의 방법 및 조제물의 VEGF 길항제는 당해 기술분야에 알려진 또는 알려지게 된 여하의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. VEGF 길항제는 바람직하게 제약학적으로 허용가능한 조제물의 제조에 사용될 때, 실질적으로 단백질 불순물이 없다. "실질적으로 단백질 불순물이 없다"는 바람직하게 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제 단백질 질량의 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99%가 VEGF 융합 단백질 길항제 단백질임을 의미한다. 융합 단백질은 바람직하게 실질적으로 응집하지 않는다. "실질적으로 응집하지 않는다"는 융합 단백질이 제약학적으로 효능이 있는 제제의 제조에 사용될 때, 융합 단백질의 질량의 적어도 90%가 응집 상태로 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 본 발명의 방법 및 조제물의 융합 단백질은 정제 과정의 결과로서 예를 들면, 적은 양 또는 흔적량의 시르트산염 및/또는 폴리소르베이트와 같이 적은 양 또는 흔적량의 화합물을 포함할 수 있다. 융합 단백질 약 50mg/ml를 포함하는 본 발명의 동결건조 전 조제물의 하나의 양태에 있어서, 시트르산염이 약 0.02mM의 농도로 존재할 수 있고 및/또는 폴리소르베이트가 약 0.0005%의 농도로 존재할 수 있다. 만일 동결건조 전 조제물이 동결건조된 후 원래 부피(예를 들면, 100mg/ml 융합 단백질)의 반으로 재생되는 경우 결과로 얻어지는 농도는, 시르트르산염은 0.04mM 및/또는 폴리소르베이트는 0.001%일 수 있다.

[0035] **동결건조 및 동결건조 조제물**

[0036] 본 발명의 하나의 양태에 있어서, VEGF-특이적 융합 단백질 길항제를 포함하는 제약학적으로 허용가능한 조제물이 제공되며, 상기 조제물은 냉동-건조 또는 동결건조 조제물이다. 동결건조 조제물은 용액, 서스펜션, 에멀젼 또는 투여 또는 사용을 위한 여하의 다른 형태로 재생될 수 있다. 동결건조 조제물은 전형적으로 먼저 액체로서 제조되고, 그리고나서 냉동 및 동결건조된다. 동결건조 전의 총 액체 부피는 동결건조 조제물의 최종 재생 부피보다 작거나, 같거나 또는 그보다 크다. 동결건조 공정은 당해 기술분야에 통상의 지식을 가진자에게 널리 알려져 있으며, 전형적으로 조절된 조건 하에서 냉동 조제물로부터 물의 승화를 포함한다.

[0037] 동결건조 조제물은 넓은 범위의 온도에서 저장될 수 있다. 동결건조 조제물은 예를 들면, 25℃ 이하, 4℃에서 냉장 보관, 또는 상온(예를 들면, 약 25℃)에서 보관될 수 있다. 바람직하게 동결건조 조제물은 약 25℃ 이하, 더 바람직하게 약 4-20℃; 약 4℃ 이하; 약 -20℃ 이하; 약 -40℃; 약 -70℃, 또는 약 -80℃에서 저장된다.

[0038] 동결건조 조제물은 전형적으로 동결건조 조제물을 용해하기 위한 수성 용액을 첨가함으로써 사용을 위해 재생된다. 동결건조 조제물을 재생하기 위해 매우 다양한 수성 용매가 사용될 수 있다. 바람직하게 동결건조 조제물은 물을 사용하여 재생된다. 바람직하게 동결건조 조제물은 본질적으로 물(예를 들면, USP WFI 또는 주사용 물) 또는 정균수(예를 들면, 0.9% 벤질 알콜과 함께 USP WFI)로 구성된 용액으로 재생된다. 그러나 완충액 및/또는 부형제 및/또는 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 용액 또한 사용될 수 있다.

[0039] 냉동-건조 또는 동결건조 조제물은 전형적으로 액체, 즉 용액, 서스펜션, 에멀젼 및 그와 유사한 것으로부터 제조된다. 따라서 냉동-건조 또는 동결건조 처리할 액체는 바람직하게 최종 재생 액상 조제물 내에 있어야할 모든 성분을 포함한다. 결과적으로, 냉동-건조 또는 동결건조 조제물은 재생시 원하는 액상 조제물이 된다. 냉동-건

조 또는 동결건조 조제물을 형성하는데 사용되는 바람직한 액상 조제물은 제약학적으로 효능이 있는 양의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제, 완충액, 안정제 및 부피형성제를 포함한다. 융합 단백질의 동결건조시 히스티딘이 인산염에 비해서 융합 단백질을 더 효과적으로 안정화시키기 때문에 냉동-건조 또는 동결건조 조제물은 바람직하게 히스티딘을 포함한다. PEG 3350 같은 유기 조용매는 교반, 혼합 또는 처리시에 융합 단백질의 안정화에 사용된다. 바람직하게 동결건조보호제가 냉동-건조 또는 동결건조 조제물에서 사용된다. 동결건조보호제는 냉동-건조 또는 동결건조시에 단백질의 이차 구조의 유지를 돕는다. 바람직한 동결건조보호제의 두 가지 예는 글리신 및 수크로즈이며, 바람직하게 이들은 함께 사용된다.

[0040] **안정한 액상 조제물**

[0041] 하나의 양태에 있어 본 발명은 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제를 포함하는 제약학적으로 허용가능한 안정한 조제물을 제공하며, 상기 조제물은 액상 조제물이다. 바람직하게 액상 조제물은 제약학적으로 효능이 있는 양의 융합 단백질을 포함한다. 조제물은 또한 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 캐리어, 완충액, 부피형성제, 안정제, 보존제 및/또는 부형제를 포함한다. 제약학적으로 허용가능한 액상 조제물의 예는 제약학적으로 효능이 있는 양의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제, 완충액, 조용매 및 하나 이상의 안정제를 포함한다.

[0042] 바람직한 액상 조제물은 저장 시에 응집 및 낮은 분자량 생성물의 형성을 최소화하기 위해 인산염 완충액, 유기 조용매 및 하나 이상의 내열안정제 및 약 10mg/ml 내지 약 50mg/ml의 융합 단백질을 포함하며, 상기 조제물은 약 pH 6.0-6.5이다. 바람직한 액상 조제물은 약 5mM 인산염 완충액, 약 5mM 시트르산염, 약 100mM NaCl, 약 25% 수크로즈 및 약 10-50mg/ml 융합 단백질을 포함하며, 상기 조제물은 약 pH 6.0이다; 선택적으로 폴리소르베이트(예를 들면, 0.1%의 폴리소르베이트 20)가 존재할 수 있다. NaCl 또는 수크로즈 어느 것이든지 안정제로 사용될 수 있음에도 불구하고, NaCl과 수크로즈의 조합이 각각의 안정제 하나를 사용하는 것보다 융합 단백질을 더 효과적으로 안정시킬 수 있음이 밝혀졌다.

[0043] pH의 측정, 색깔 및 외형의 외관 검사, 예를 들면 UV 분광법, SDS-PAGE, 크기-배재 HPLC(size-exclusion HPLC), 활성의 생물검정(bioassay) 측정, 등전 집속 및 이소아스파르트 정량 같은 당해 기술 분야에 알려진 방법에 의한 총 단백질 함량의 측정을 포함하여, 안정성은 특정 시점에 다양한 방법으로 측정될 수 있다. VEGF 길항제의 활성 측정에 유용한 생물검정의 하나의 예에 있어서, 본 발명의 VEGF-특이적 융합 단백질 길항제에 의한 VEGF165 결합을 측정하기 위해, BAF/3VEGFR1/EPOR 세포계가 사용된다.

[0044] 조제물은 액상 또는 냉동-건조 및 동결건조 어느 것이든지 산소가 제거된 환경에서 저장될 수 있다. 산소가 제거된 환경은 예를 들면, 아르곤, 질소 또는 헬륨 같은 비활성기체 하에서 조제물을 저장함으로써 형성될 수 있다.

실 시 예

[0045] 본 발명의 방법에 대해 설명하기 전에, 본 발명은 구체적인 방법과 개시된 실험 조건에, 그러한 방법이나 조건은 변할 수 있기 때문에, 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본 발명의 범위는 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 것이므로, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시 형태를 설명하기 위한 것이고, 이는 제한하려는 의도가 아니라는 것 또한 이해되어야 한다.

[0046] 본원과 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 표현은 본문에서 명확히 다르게 지적하지 않는 한 복수의 언급을 포함한다. 따라서 예를 들면 "방법"이라는 언급은 본원에서 개시된 유형의 하나 이상의 방법 및/또는 단계를 포함하고 및/또는 이는 본원을 읽음으로써 당해 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자에게 명백해진다.

[0047] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 지식을 가진자에게 공통적으로 이해되는 의미와 동일한 의미가 있다. 본원에서 개시된 것과 동일하거나 또는 등가인 여하의 방법 및 물질은 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으며, 바람직한 방법 및 물질이 이하에 개시된다.

[0048] **실시예 1. 50mg/ml VEGF 트랩 액상 조제물의 안정성**

[0049] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 0.1% 폴리소르베이트 20, 20% 수크로즈 및 50mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에 보관하였고, 샘플을 3, 6, 9, 12, 18 및 24 개월 후에 시험하였다. 안정성은 SE-HPLC에 의해 측정되었다. 표 1에 나타낸 결과는 12 및 24 개월 후 각각 98.6% 및 98.3%의 VEGF 트랩 단백질이 본래대로(분해되지 않고) 남아 있었다. 탁도는 OD_{405nm}에서 측정되었고; 회수된 단백질 백분율은 크기 배재-

HPLC에 의해 측정되었다.

표 1

[0050]

5℃에서 보관시 50mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS065)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF 트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태 %
0	통과	0.00	6.2	100	99.0
3	통과	0.00	6.2	102	98.8
6	통과	0.01	6.2	103	98.7
9	통과	0.01	6.3	102	98.2
12	통과	0.01	6.3	106	98.6
18	통과	0.00	6.3	103	98.4
24	통과	0.00	6.2	93	98.3

[0051] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 3% PEG 3350, 20% 수크로즈, 50mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에서 보관하였고. 샘플을 3, 6, 9, 12, 18 및 24 개월 후에 시험하였다. 안정성 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0052]

5℃에서 보관시 50mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS065)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태%
0	통과	0.00	6.2	100	99.0
3	통과	0.00	6.2	100	98.8
6	통과	0.01	6.3	103	98.5
9	통과	0.00	6.3	103	98.3
12	통과	0.01	6.3	110	98.3
18	통과	0.00	6.3	113	98.0
24	통과	0.01	6.2	90	97.8

[0053] **실시예 2. 70mg/ml VEGF 트랩 액상 조제물의 안정성**

[0054] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 0.1% 폴리소르베이트 20, 20% 수크로즈 및 75mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에 보관하였고, 샘플을 0, 1, 2.3, 3, 9, 12 및 15 개월 후에 시험하였다. 안정성 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0055]

5℃에서 보관시 75mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS101)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태%
0	통과	0.00	6.2	100	97.1
1	통과	0.00	6.2	96	97.0
2.3	통과	0.00	6.2	98	96.7
3	통과	0.00	6.2	97	96.1
9	통과	-0.01	6.0	101	96.0
12	통과	0.00	6.3	110	94.5
15	통과	0.00	6.3	92	95.6

[0056] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 3% PEG 3350, 20% 수크로즈 및 75mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에 보관하였고, 샘플을 0, 1, 2.3, 3, 9, 12 및 15 개월 후에 시험하였다. 안정성 결과를

표 4에 나타내었다.

표 4

[0057]

5℃에서 보관시 75mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS101)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태%
0	통과	0.00	6.2	100	96.8
1	통과	0.00	6.2	99	96.7
2.3	통과	0.00	6.2	97	96.3
3	통과	0.00	6.2	89	95.6
9	통과	-0.01	6.2	98	95.4
12	통과	-0.01	6.3	112	94.1
15	통과	0.00	6.3	98	94.8

[0058] **실시예 3. 100mg/ml VEGF 트랩 액상 조제물의 안정성**

[0059] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 0.1% 폴리소르베이트 20, 20% 수크로즈 및 100mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에 보관하였고, 샘플을 0, 1, 2.3, 3, 9, 12 및 15 개월 후에 시험하였다. 안정성 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

[0060]

5℃에서 보관시 100mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS101)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태%
0	통과	0.00	6.3	100	96.7
1	통과	0.00	6.2	92	96.6
2.3	통과	0.00	6.2	92	96.2
6	통과	0.00	6.2	99	95.5
9	통과	-0.01	6.2	92	95.5
12	통과	-0.01	6.2	110	93.9
15	통과	0.00	6.3	108	94.8

[0061] 10mM 인산염, 50mM NaCl, 3% PEG 3350, 20% 수크로즈 및 100mg/ml VEGF 트랩(SEQ ID NO:4)을 포함하는 pH 6.25의 액상 조제물을 5℃에 보관하였고, 샘플을 0, 1, 2.3, 3, 9, 12 및 15 개월 후에 시험하였다. 안정성 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

[0062]

5℃에서 보관시 100mg/ml VEGF 트랩 단백질의 안정성(VGFT-SS101)					
개월	외관 형태	탁도	pH	회수된 VEGF트랩 %	VEGF 트랩의 고유 형태%
0	통과	0.00	6.3	100	96.5
1	통과	0.01	6.2	94	96.2
2.3	통과	0.01	6.2	93	95.7
6	통과	0.01	6.2	102	94.6
9	통과	0.00	6.2	95	94.6
12	통과	0.00	6.3	96	92.8
15	통과	0.01	6.3	102	93.9

[0063] **실시예 4. 안정한 VEGF 트랩 조제물의 더 구체적인 실시 형태**

[0064] 하나의 실시 형태에 있어서, 본 발명은 pH 6.0에서 5mM 인산염, 5mM 시트르산염, 100mM NaCl, 0.1% 폴리소르베이트 20, 20% 수크로즈, 25mg/ml VEGF 트랩 단백질을 포함하는 안정한 액상 VEGF-결합 융합 단백질(VEGF 트랩) 조제물을 제공한다. 상기 조제물은 피하주사로 전달되거나 또는 희석되어 정맥 주입에 의해 전달될 수 있다. 상기 조제물은 높은 삼투질 농도 때문에 3배로 희석해야 정맥 투여용 등-삼투성 용액이 될 수 있다. 안정성 연구는 2-8℃에서 3년간 저장 후 약 1% 미만의 분해가 관찰됨을 보여주었다.

[0065] 하나의 실시 형태에 있어서 본 발명은 예를 들면, 50에서 100mg/ml; 75에서 150mg/ml 또는 100에서 200mg/ml VEGF 트랩 단백질로와 같이, 바람직하게는 동결건조 전으로부터 동결건조 후 조제물로 두 배로 농축되는 동결건조 조제물임을 특징으로 한다. 하나의 구체적인 실시 형태에 있어서, 동결건조 전 조제물은 pH 6.3에서, 10mM 히스티딘, 1.5% PEG 3350, 0.75% 글리신, 2.5% 수크로즈, 50mg/ml VEGF 트랩 단백질을 포함하며, 이는 pH 6.3에서 20mM 히스티딘, 3% PEG 3350, 1.5% 글리신, 5% 수크로즈, 100mg/ml VEGF 트랩 단백질을 포함하는 조제물로 재생된다. 안정성 연구는 2-8℃에서 6개월 저장 후 VEGF 트랩이 전혀 분해되지 않았음을 보여주었다.

[0066] 액상 조제물의 하나의 양태에 있어서, 조제물은 10mM 히스티딘, 50mM NaCl, 5-20% 수크로즈, 50-100mg/ml VEGF 트랩 그리고 0.1% 폴리소르베이트 20 또는 3% PEG 3350 중 하나를 포함한다. 상기 조제물의 장점 중 하나는 동결건조된 제품을 제조할 필요없이 고농도의 VEGF 트랩을 제공하는 것이다. 따라서 상기 조제물은 예를 들면, 정맥 주입에 의한 전달보다 높은 농도의 액체로 미리-채워진 주사의 준비를 가능하게 함으로써, 피하전달의 용이성을 제공한다. 또한 상기 조제물은 적은 주입 부피와 짧은 주입 시간을 제공하는데 유익하게 사용될 수 있다. 5℃에서 15 또는 24 개월까지의 인큐베이션 후에 SE-HPLC에 의해 측정된 분해량이 표 7에 정리되어 있다.

표 7

[0067]

50-100mg/ml VEGF 트랩이 있는 액상 조제물의 안정성(VGFT-SS101)

인큐베이션 (개월)	VEGF 트랩 (mg/ml)	폴리소르베이트 20 %	PEG3350 %	분해 %
24	50	0.1	-	0.7
24	50	-	3	1.3
15	75	0.1	-	1.5
15	75	-	3	2.0
15	100	0.1	-	1.9
15	100	-	3	2.6

[0068] **실시예 5. 동결건조 및 액상의 안정성과 활성**

[0069] 재생 동결건조 조제물의 안정성을 6개월의 기간에 걸쳐 측정하였다. 동결건조 전 조제물은 10mM 히스티딘, 1.5% PEG 3350, 2.5% 수크로즈, 0.75% 글리신 및 50mg/ml VEGF 트랩 단백질을 포함하였다. 동결건조 후 재생된 조제물은 20mM 히스티딘, 3% PEG 3350, 5% 수크로즈, 1.5% 글리신 및 100mg/ml VEGF 트랩 단백질(SEQ ID NO:4)을 포함하였다. 결과를 표 8에 나타내었다. 활성은 VEGF 트랩이 인간 VEGF의 마우스 Baf/3 VEGFR1/EpoR 세포계에 대한 생물학적 영향을 억제하는 능력을 직접 측정하는 세포 기준의 생물검정으로 측정하였다. 따라서 상기 생물검정은 단백질의 생물학적 활성을 직접 측정할 수 있다. 그 결과를 상대효능 백분율로 나타내었다(시험 샘플 IC_{50}/기준 VEGF IC_{50} 표준 × 100). VEGF의 VEGF 트랩에 대한 결합 친화성은 VEGF 및 다양한 농도의 VEGF 트랩을 함유하는 평형화된 혼합물 중 특히 자유 VEGF를 측정하는 민감성 ELISA를 사용해 측정하였다. 결과를 상대결합 백분율(시험 샘플의 IC_{50}/기준의 IC_{50}×100)로 나타내었다. 측정된 pH는 6.3-6.5 사이의 범위였다. 모든 용액은 외관상 투명했다. 회수된 VEGF 트랩의 농도는 UV 분광광도계를 사용하여 mg/ml 단위로 A_{280}nm에서 측정하였다. 고유 형태로 회수된 VEGF의 백분율(주 봉우리 순도)은 SE-HPLC로 측정하였다.

표 8

[0070]

5℃에서 보관된 VEGF 트랩 동결건조 조제물의 안정성(VGT-RS475)

개월	생물검정	결합율 측정 (binding assay)	회수율 %	고유 형태 %
0	120	126	97.9	98.7
1	117	74	97.9	98.6

1+24시간	126	72	99.0	98.5
1+4시간	94	81	101.5	98.2
3	101	98	98.1	98.6
3+24시간	65	94	98.1	98.2
6+4시간			96.9	98.7
6+24시간			98.8	98.6

[0071] 약 5mM 인산염, 5mM 시트르산염, 100mM NaCl, 0.1% 폴리소르베이트 20, 20% 수크로즈 및 25mg/ml VEGF 트랩 단백질을 포함하는 조제물을 5℃에 보관시 안정성과 활성을 36개월에 걸쳐 시험하였다. 결과를 표 9에 나타내었다. 모든 샘플은 외관 검사에 의한 관찰에서 투명하고 무색이었다. pH는 6.0-6.1의 범위였다. *두 가지 측정(1달 및 2달)에 대한 결합율 측정(binding assay)은 표준에 대한 백분율이 아니라 직접 표시되었다.

표 9

[0072]

액상 조제물의 안정성 및 활성(VGT-FS405)

개월	고유 형태 %	생물검정	결합율 시험	단백질 함량 mg/ml
0	99.7	106	72	25.0
1	99.9	119	4.4pM*	25.2
2	99.6	102	5.4pM*	25.1
3	99.6	97	88	25.1
6	99.6	101	106	25.0
9	99.4	89	126	25.4
12	99.5	85	95	25.2
18	99.4	99	81	25.5
24	99.3	75	95	25.6
36	98.8	109	79	25.6

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> VEGF Antagonist Formulations

<130> 4030A-WO

<140> PCT/US2006/010600
<141> 2006-03-22

<150> 60/665,125
<151> 2005-03-25

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1453
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 1
aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc cccgggcgag ctcgaattcg 60
caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggtcctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggcttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420

atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcc gtctcatgga attgaactat 480
ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag caccttaact atagatggtg 660
taacccggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac 840
ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga 900

gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 1020
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 1200
gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380

tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
aatgagcggc cgc 1453

<210> 2
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 2

```
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1               5                  10                  15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu
            20                  25                  30
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
        35                  40                  45
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
    50                  55                  60

Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
65                  70                  75                  80
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
                85                  90                  95
Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
            100                 105                 110
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val
        115                 120                 125

Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val
    130                 135                 140
Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn
145                 150                 155                 160
Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg
                165                 170                 175
Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr
            180                 185                 190

Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys
        195                 200                 205
Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg
    210                 215                 220
Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
```

```
                405                 410                 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 3
<211> 1377
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 3

```
atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaaatc 120
cccgaaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg ggttacgtca 180
cctaacatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420

tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggt 600
gtaacccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1020
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga    1377
```

<210> 4
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

```
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1               5                  10                  15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
            20                  25                  30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
        35                  40                  45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
    50                  55                  60

Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
65                  70                  75                  80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
                85                  90                  95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
            100                 105                 110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
        115                 120                 125

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
    130                 135                 140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
145                 150                 155                 160
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
                165                 170                 175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
            180                 185                 190

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
        195                 200                 205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
    210                 215                 220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

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

```
    370                 375                 380

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```